บทที่ 6

โครงสร้างของผนังละอองเกสร

ผนังของละอองเกสรมีความแตกต่างจากผนังของเซลพืชโดยทั่วไป เนื่องจากประกอบด้วยเนื้อเยื่อสองชั้น ชั้นนอกเรียกเอกซีน (exine) และชั้นในเรียกอินทีน (intine) ที่ผิวของผนังชั้นเอกซีนจะมีลวดลาย (sculptures) และช่องเปิด (apertures) ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะมีลักษณะแตกต่างกัน (Erdtman, 1972) บางทีจะพบช่องเปอร์ฟอเรชั่น (perforation) ซึ่งเป็นรูเปิดเล็ก ๆ ที่ผิวชั้นเอกซีนอีกด้วยเช่นละอองเกสรของ strawberry (Mass, 1977) โดยทั่วไปแล้วผนังชั้นเอกซีนจะหนากว่าชั้นอินทีน และผนังชั้นเอกซีนยังเป็นตัวกำหนดแบบแผนของลวดลายที่ผิวของละอองเกสรด้วย (Moore และ Webb, 1978) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษา เพื่อตรวจดูลักษณะของโครงสร้างทั้งภายนอก และภายในของละอองเกสรพืชทั้ง 7 พันธุ์ ว่าจะมีลักษณะและแบบแผนเป็นอย่างไร

6.1 วิธีการศึกษา

6.1.1 การศึกษาโครงสร้างภายนอกของผนังละอองเกสรด้วย SEM

6.1.1.1 การสุ่มเก็บตัวอย่าง

เก็บละอองจากพืชพันธุ์ละ 3 ต้น โดยเก็บอับละออง 100 อับละอองใน 1 ต้น จากทุกทิศทางและนำละอองจากทั้ง 3 ต้นรวมเข้าด้วยกัน เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1.1.2 การเตรียมละอองเกสร เพื่อนำไปศึกษาด้วย SEM (เวคิน, 2527)

การศึกษาโครงสร้างภายนอกของละอองเกสรด้วย SEM จำเป็นต้องอาศัยวิธีการเตรียมตัวอย่างที่มีความพิเศษโดยเฉพาะ ซึ่งมีลำดับขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บรักษาตัวอย่างระหว่างรอการศึกษา (storage)

เก็บละอองเกสรไว้ในตลับพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3ซม. นำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4 °ซ. (ชั้นล่างติดห้องแช่น้ำแข็งของตู้เย็นมาตรฐาน)

ขั้นตอนที่ 2 การล้างทำความสะอาดตัวอย่าง (rinsing)

กรองละอองเกสรด้วยผ้าตาถี่ เพื่อแยกเอาอับละอองเกสรออก แล้วแช่ละอองเกสรใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เนื่องจากละอองเกสรมีขนาดเล็กมาก ดังนั้นการเปลี่ยน phosphate buffer แต่ละครั้งจะนำละอองเกสรไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนที่ 3 การตรึงการเปลี่ยนแปลง (Fixation)

เป็นการทำให้โครงสร้างของละอองเกสรอยู่ตัวและคงทน เพื่อนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป การตรึงการเปลี่ยนแปลงนี้จะทำ 2 ครั้ง ได้แก่

- การตรึงครั้งแรก (primary fixation) นำละอองเกสรที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วแช่ใน glutaraldehyde นาน 2 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ.

- การตรึงครั้งที่สอง (secondary fixation) วิธีการคือนำละอองเกสรที่ผ่านขบวนการตรึงครั้งแรกแล้วไปล้างด้วย phosphate buffer 1 ครั้ง แล้วแช่ใน 1% osmium tetraoxide (1% O_sO_4 ใน phosphate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

buffer pH 7.2) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงระหว่างการตรึงเก็บที่อุณหภูมิปกติในตู้ควัน

ขั้นตอนที่ 4 การกำจัดน้ำ (dehydration)

นำละอองเกสรที่ผ่านการตรึงครั้งที่สองแล้วไปล้างด้วย phosphate buffer pH 7.2 1 ครั้ง เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำละอองเกสรไปผ่านสารละลายที่ขจัดน้ำออกโดยการใช้ ethyl alcohol ตามลำดับขั้นตอนดังนี้

35%	ethyl alcohol	15-20 นาที
70%	ethyl alcohol	15-20 นาที
95%	ethyl alcohol	15-20 นาที (2 ครั้ง)
100%	ethyl alcohol	15-20 นาที (2 ครั้ง)

ขั้นตอนที่ 5 การติดตัวอย่าง (mounting)

นำละอองเกสรที่ผ่านการกำจัดน้ำแล้ว ซึ่งอยู่ในหลอดทดสอบเทลงบนกระดาษกรอง ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิปกติ 30-45 นาที ให้ alcohol ระเหยไปจนหมด แล้วใช้พู่กันเล็ก ๆ ป้ายละอองเกสรไปเคาะลงบนแท่นวางตัวอย่าง ซึ่งเรียกว่า stub แผ่นวางตัวอย่างนี้มีรูปทรงกระบอกต้นมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. สูง 0.5 ซม. ทำด้วยโลหะทองเหลือง การติดตัวอย่างบน stub นี้ทำได้โดยใช้เทปกาว 2 หน้า ติดไว้ที่ผิวหน้าของ stub

ขั้นตอนที่ 6 การฉาบผิวของตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (meltal coating)

นำ stub ที่มีละอองเกสรติดอยู่ไปฉาบผิวด้วยโลหะหนัก โดยเครื่องฉาบผิว (sputter ion) เป็นเวลา 15 นาที โลหะหนักที่นำมาใช้ในการฉาบผิว หรือให้กระจายโมเลกุลไปจับติดบนผิวของตัวอย่างต้องเป็นโลหะธาตุหนักซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็ก ได้แก่ ทอง (Au) และพาลลาเดียม (Pd) ผสมกันในอัตรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

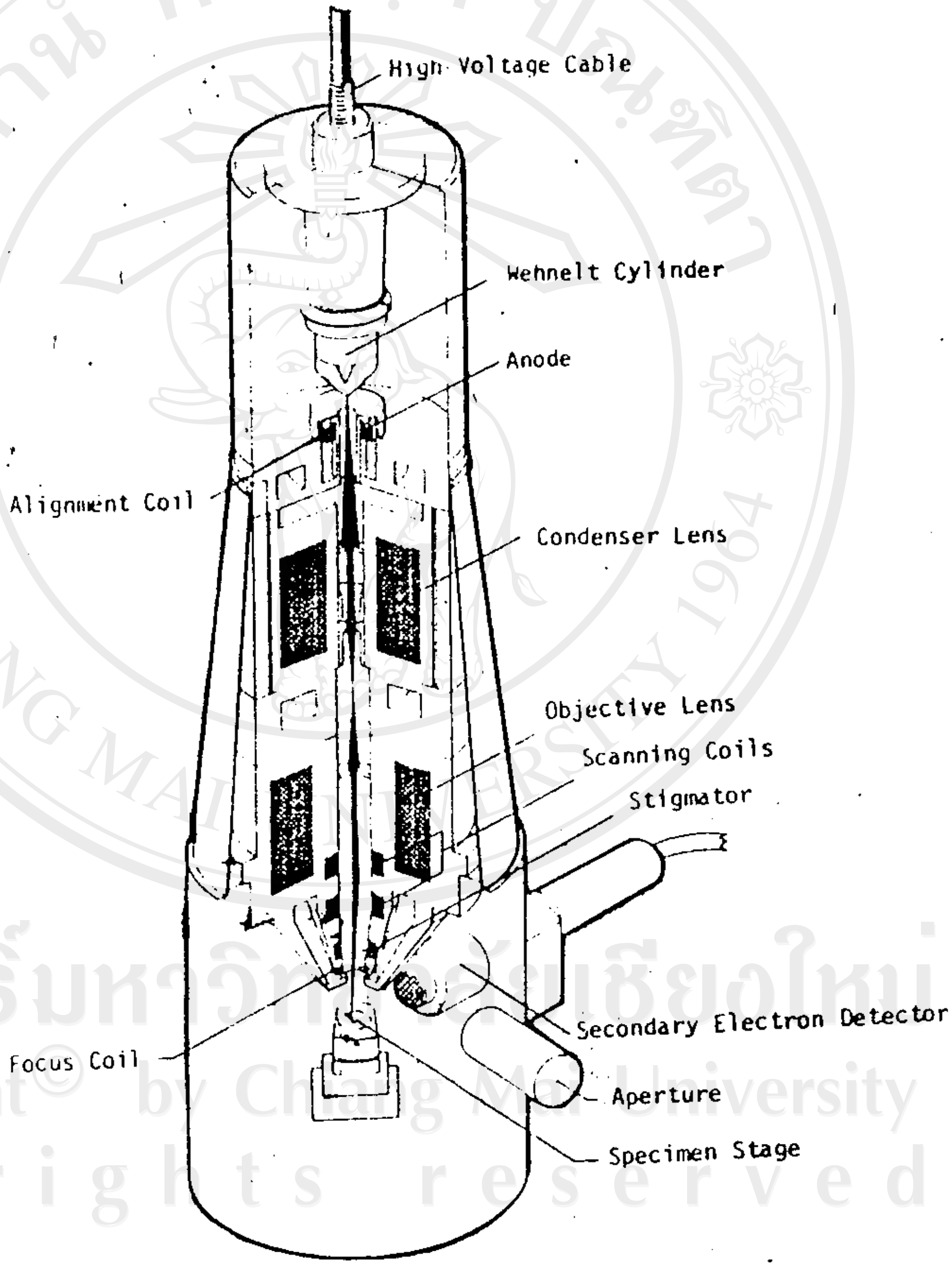
ส่วน 2:3 (w/w) การฉาบผิวโมเลกุลของธาตุหนักดังกล่าวใช้หลักการกระจายโมเลกุลของธาตุภายใต้สูญญากาศ กำลังไฟฟ้า 200-400 volts ความดัน 10^{-4} torrs การฉาบผิวจะต้องหนาไม่เกิน 20 nanometres ถ้าฉาบผิวหนาเกินไปจะทำให้รายละเอียดปลีกย่อยบนผิวตัวอย่างคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง ประโยชน์ของการฉาบผิวตัวอย่างนี้เพื่อให้เกิดประจุอีเลคตรอนทุติยภูมิ (secondary electron) หลักการโดยย่อคือเมื่อมีลำแสงอีเลคตรอนปฐมภูมิ (primary electron) ที่เกิดจากแหล่งกำเนิด (electron gun) โดยมีขดลวด tungsten เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ จากนั้นจะมีขดลวด scan coils เป็นตัวผลักลำแสง primary electron ให้เคลื่อนไปบนผิวของตัวอย่างทุกจุดเป็นผลให้เกิดประจุ อีเลคตรอนจากโมเลกุลของธาตุหนักสะท้อนออกมาเรียก อีเลคตรอนทุติยภูมิ และจะถูกรวบรวมแปลงเป็นสัญญาณภาพให้ปรากฏบนจอแก้วคล้ายจอโทรทัศน์ (Cathode ray tube) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า CRT (ภาพที่ 24-26)

6.1.1.3 การศึกษาด้วย SEM

เมื่อผ่านขั้นตอนการฉาบผิวตัวอย่างด้วยโมเลกุลของธาตุหนักแล้ว นำ stub ไปวางในช่องตัวอย่าง ซึ่งเรียก specimen chamber ซึ่งอยู่ติดกับฐานเรียก gonimeter stage อยู่ภายในช่องสูญญากาศ gonimeter stage จะมีเครื่องบังคับให้หมุนหรือเอียงได้ตามต้องการ เพื่อเปลี่ยนทิศทางของภาพที่เกิดบนจอ CRT หลังจากนำ stub เข้าที่แล้วก็ทำการศึกษาภาพ และรายละเอียดต่าง ๆ โดยใช้แผงควบคุม ซึ่งเรียกว่า คอนโซลยูนิต (console unit)

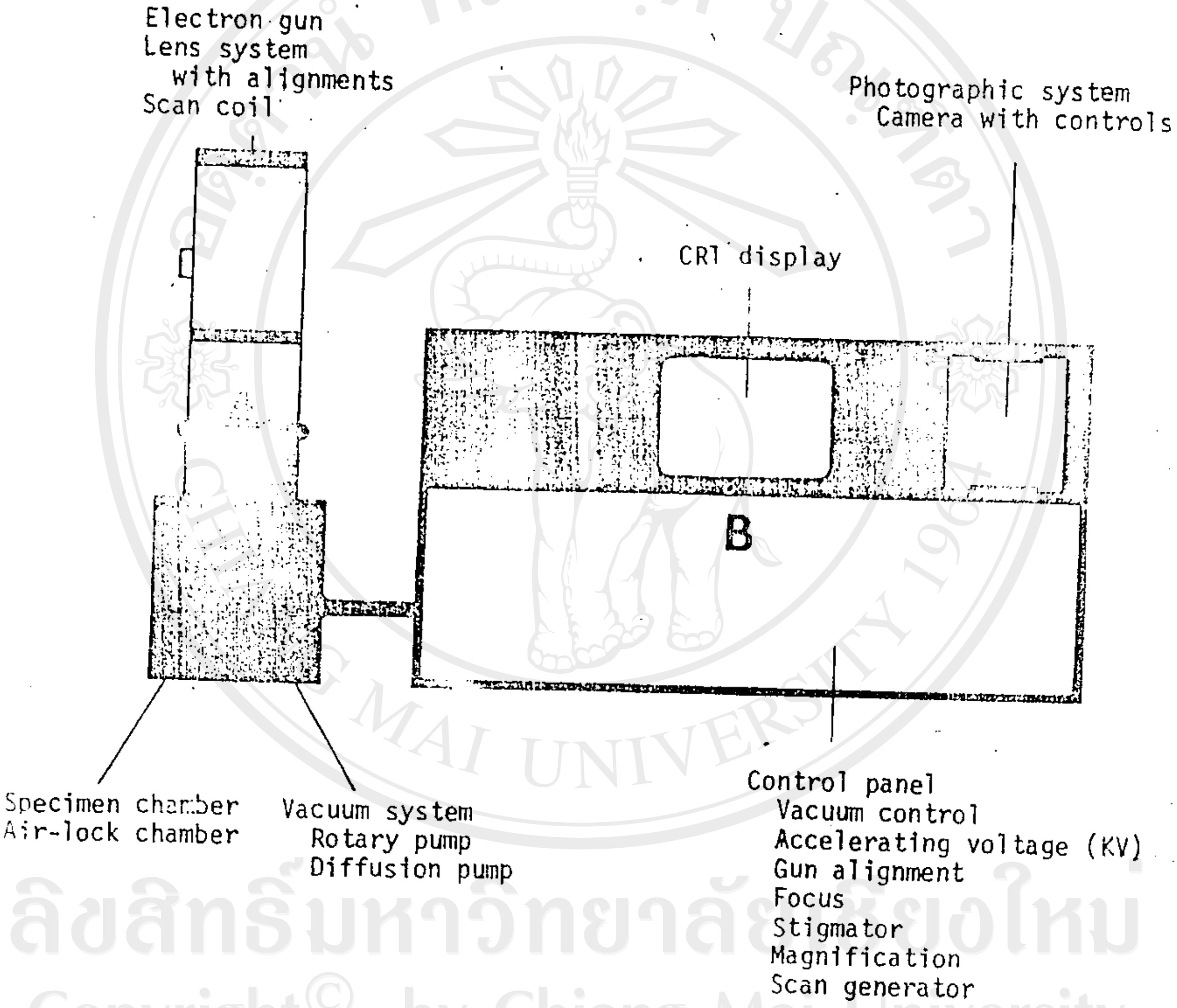
ทำการศึกษารูปร่างลักษณะด้านข้าง (equatorial views) และด้านขั้ว (polar views) ช่องเปิด (apertures) ช่องเปอร์ฟอเรชัน (perforation) รวมทั้งพื้นผิวที่ผนังชั้นเอกซีน บันทึกภาพที่มีขนาดขยาย 3,000 เท่า และ 15,000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



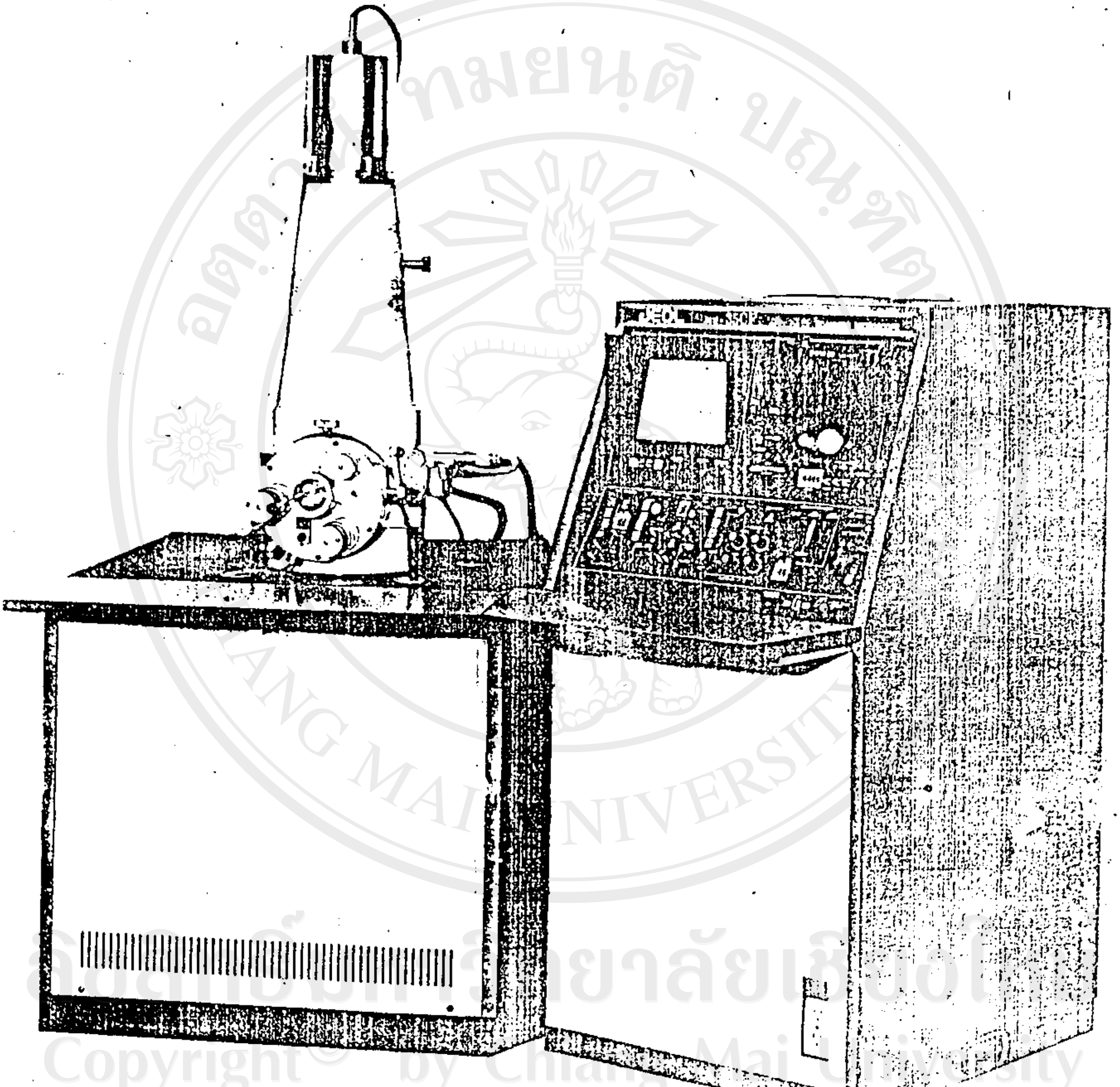
ภาพที่ 24 แสดงให้เห็นส่วนประกอบที่สำคัญของ SEM ที่เป็นจุดกำเนิดของภาพ (จากเวคิน, 2527)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 25 แสดงให้เห็นส่วนประกอบต่าง ๆ รวมทั้งระบบภายใน column (A) และ console unit (B) ของ SEM (จากเวคิน, 2527)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 26 แสดงกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope) หรือ SEM รุ่นที่กำลังเป็นที่นิยมรุ่นหนึ่งในปัจจุบัน Model JSM-35CF, JEOL LTD., Japan,

(จากเวคิน, 2527)

6.1.2 วิธีศึกษาโครงสร้างภายในของผนังละอองเกสรด้วย TEM

6.1.2.1 การสุ่มเก็บตัวอย่าง

เก็บละอองเกสรจากพืชพันธุ์ละ 3 ต้น โดยเก็บอับละอองเกสร 100 อับละอองเกสรใน 1 ต้น จากทุกทิศทาง นำอับละอองทั้งหมดรวมกันเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

6.1.2.2 การเตรียมละอองเกสรเพื่อจะนำมาศึกษา

การศึกษาโครงสร้างภายในของละอองเกสรนี้ ทำการศึกษาโดยใช้ TEM ซึ่งมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ซับซ้อนและยุ่งยากกว่าการเตรียมเพื่อศึกษาด้วย SEM การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย TEM มีลำดับขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บรักษาตัวอย่างระหว่างรอการศึกษา

เก็บละอองเกสรรวมทั้งอับละอองเกสรไว้ในตลับพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. นำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4 °ซ. (ชั้นล่างติดห้องแช่แข็งของตู้เย็นมาตรฐาน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 2 การล้างทำความสะอาดตัวอย่าง

ใช้ผ้าที่มีตาถี่กรองอับละอองเกสรออก และแช่ละอองใน 0.1 M. phosphate buffer pH 7.2 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที การเปลี่ยนสารแต่ละครั้งนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนที่ 3 การฝังตัวอย่างในวุ้น

เนื่องจาก ขั้นตอนการเตรียมเพื่อศึกษาด้วย TEM จะต้องนำละอองไปผ่านสารที่มีความหนืดหลายครั้ง และละอองมีขนาดเล็กจะมีความลำบากใน

การแยกเอาละอองออกมา จึงใช้วิธีการฝังละอองเข้าไปในวุ้นเสียก่อน วิธีการทำคือ ใช้วุ้น 1% ต้มให้สุก แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อให้มีความหนา 1 มม. รอให้วุ้นเกือบจะแข็งตัวแล้วใช้พู่กันเขี่ยละอองเกสรที่ผ่านขั้นตอนทำความสะอาดแล้วลงไปในวุ้น เมื่อวุ้นแข็งตัวแล้ว ใช้ cutter ตัดวุ้นบริเวณที่มีละอองเกสรฝังอยู่ให้เป็นแผ่นเล็ก ๆ กว้างประมาณ 2 มม. ยาว 5 มม. เพื่อนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 การตรึงการเปลี่ยนแปลง

เป็นการทำให้โครงสร้างของละอองเกสรอยู่ตัวและคงทนในการที่จะนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป ซึ่งจะทำการตรึง 2 ครั้ง คือ

การตรึงครั้งแรก ทำได้โดยนำละอองเกสรที่ผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดแล้วแช่ใน glutaraldehyde นาน 2 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ.

การตรึงครั้งที่สอง นำละอองเกสรที่ผ่านการตรึงครั้งแรกแล้วไปล้างด้วย phosphate buffer 1 ครั้ง แล้วแช่ใน 1% osmium tetraoxide (1% OsO_4 ใน phosphate buffer pH 7.2) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระหว่างการตรึงเก็บที่อุณหภูมิปกติในตู้ควัน

ขั้นตอนที่ 5 การกำจัดน้ำ

นำละอองเกสรที่ผ่านการตรึงครั้งที่สองแล้วไปล้างด้วย phosphate buffer pH 7.2 1 ครั้ง เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำละอองเกสรไปผ่านสารละลายที่ขจัดน้ำออกโดยการใช้ ethyl alcohol ตามลำดับขั้นตอน ดังนี้

35%	ethyl alcohol	15-20 นาที
70%	ethyl alcohol	15-20 นาที
95%	ethyl alcohol	15-20 นาที (2 ครั้ง)
100%	ethyl alcohol	15-20 นาที (2 ครั้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 6 การฝังตัวอย่าง (embedding)

นำละอองเกสรที่ผ่านขั้นตอนที่ 5 ฝังเข้าไปในspurr's resin โดยมีลำดับ ดังนี้

แช่ตัวอย่างใน	100% ethyl alcohol + n-butyl glycidyl ether (Qy-1) อัตราส่วน 1:1	15-30 นาที
แช่ตัวอย่างใน	100% ethyl alcohol + Qy-1 อัตราส่วน 1:2	15-30 นาที
แช่ตัวอย่างใน	Qy-1	15-30 นาที
แช่ตัวอย่างใน	Spurr's resin + Qy-1 อัตราส่วน 1:1	1.30 ชั่วโมง
แช่ตัวอย่างใน	Spurr's resin + Qy-1	1.30 ชั่วโมง
แช่ตัวอย่างใน	Spurr's resin ครั้งละ	1 ชั่วโมง (2 ครั้ง)

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วน agar ที่มีละอองฝังอยู่ไปฝังใน spurr's resin ซึ่งเตรียมไว้ในช่องตัวอย่าง ช่องตัวอย่างนี้จะอยู่บนแผ่นยางมีจำนวนหลายช่องแต่ละช่อง กว้าง 0.5 ซม. ยาว 1 ซม. ลึก 0.3 ซม. การฝังตัวอย่างต้องพยายามให้แผ่นวุ้นที่มีละอองเกสรฝังอยู่นั้นให้อยู่ในระดับกลางของspurr's resin โดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อกดเบา ๆ เสร็จแล้วนำแผ่นยางที่บรรจุตัวอย่างลงไปเรียบร้อยแล้ว ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 60 °ซ. เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 7 การตัดตัวอย่าง (cutting)

นำ spurr's resin ที่มีละอองเกสรฝังอยู่และผ่านการอบจนแข็งตัวแล้วไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่ออย่างละเอียด (ultramicrotome) การตัดจะต้องให้บางโดยจะต้องหนาไม่เกิน 60 nanometres (nm) การที่จะรู้ว่าชิ้นส่วนที่ตัดหนาหรือบางนั้น สังเกตได้จากสีของชิ้นส่วน โดยใช้ stereomicroscope ของ ultramicrotome ถ้าชิ้นส่วนมีสีทองแสดงว่าหนาไม่เกิน 60 nm. แต่ถ้าหนาเกิน 60 nm. ชิ้นส่วนจะมีสีเงิน การตัดนี้เป็นการสุ่มตัด spurr's resin ซึ่งมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละอองเกสรฝังอยู่ ultramicrotome จะทำงานโดยอัตโนมัติ และชิ้นส่วนที่ตัดได้จะมีทั้งหนาและบาง แผ่นชิ้นส่วนจะตกไปลอยอยู่เหนือน้ำในช่องเก็บตัวอย่าง จากนั้นใช้ตะแกรงแผ่นเล็กๆทำด้วยทองแดงเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. เรียกว่า grid ไปตักเอาชิ้นส่วน โดยใช้เข็มเขี่ยเล็ก ๆ (นิยมใช้ขนตาของคน) เขี่ยเอาชิ้นส่วนที่ต้องการเข้าไปใน grid

ขั้นตอนที่ 8 การย้อมตัวอย่าง (stainning)

การย้อมตัวอย่างเป็นการทำให้โมเลกุลของ uranyl และตะกั่วแทรกซึมเข้าไปฉาบเนื้อเยื่อของตัวอย่างเพื่อไม่ให้เกิดการฉีกขาดเมื่อลำแสงอีเลคตรอนกระทบหรือผ่านตัวอย่าง การย้อมตัวอย่างจะทำเป็น 2 ขั้นตอน คือ

- ขั้นตอนแรก ย้อมด้วย uranyl acetale วิธีการ คือ นำ grid ที่มีชิ้นส่วนของตัวอย่างแช่ใน uranyl acetate ซึ่งเตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อ ใช้เวลา 20-30 นาที แล้วล้างด้วย 50% ethyl alcohol
- ขั้นที่สอง ย้อมด้วย lead citrate นำแผ่น grid ที่ผ่านการย้อมครั้งแรกแช่ใน lead citrate ในจานเพาะเชื้อพอให้ท่วม ใช้เวลา 5-10 นาที ล้างด้วย 0.2 N NaoH และน้ำกลั่นตามลำดับ

6.1.2.3 การศึกษาด้วย TEM

นำ grid ที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านขบวนการต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วเก็บใน Desiccator 2-3 ชั่วโมง เพื่อดูดความชื้นออกแล้วนำแผ่น grid ที่มีตัวอย่างติดอยู่ใส่เข้าไปใน specimen chamber ของ TEM แล้วศึกษารายละเอียดบนจอภาพบันทึกภาพด้วยกำลังขยาย 3000 เท่า และ 15000 เท่า ไว้ทำการศึกษา การเกิดภาพใน TEM นั้นจะแตกต่างจากการเกิดภาพใน SEM เนื่องจากภาพของ TEM เกิดจากความโปร่งใส และความทึบแสงที่ลำแสงอีเลคตรอนผ่านหรือไม่สามารถผ่านได้ ดังนั้นภาพที่เกิดขึ้นก็คือเงาของตัวอย่างนั้นเอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2 ผลการทดลอง

6.2.1 ผลการศึกษาโครงสร้างภายนอกของผนังละอองเกสรด้วย SEM

6.2.1.1 ช่องเปิด (apertures)

จากการศึกษาด้วย SEM พบว่า ช่องเปิดของละอองเกสรของมะม่วงพันธุ์แก้ว (ภาพที่ 27-A_1) มะม่วงพันธุ์อกร่อง (ภาพที่ 27-B_1) ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (ภาพที่ 28-A_1) ลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะ (ภาพที่ 28-B_1) ลำไยพันธุ์ดอ (ภาพที่ 29-A_1) ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว (ภาพที่ 29-B_1) ลำไยพันธุ์แห้ว (ภาพที่ 29-C_1) มีลักษณะเป็นร่องยาว (furrow) เหมือนกันทั้งหมด เรียกลักษณะนี้ว่า คอลเพต (colpate) และเมื่อพิจารณาภาพด้านขั้วจาก SEM ของละอองเกสรของมะม่วงพันธุ์แก้ว (ภาพที่ 27-A_2) มะม่วงพันธุ์อกร่อง (ภาพที่ 27-B_2) ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (ภาพที่ 28-A_2) ลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะ (ภาพที่ 28-B_2) ลำไยพันธุ์ดอ (ภาพที่ 29-A_2) ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว (ภาพที่ 29-B_2) และลำไยพันธุ์แห้ว (ภาพที่ 29-C_2) พบว่าละอองเกสรของพืชทั้ง 7 พันธุ์ มีจำนวนช่องเปิดเท่ากัน โดยจะมีจำนวน 3 ช่อง และช่องเปิดทั้งสองดังกล่าวอยู่ในตำแหน่งที่สมมาตรกันจึงเรียกลักษณะนี้ว่า ไตรโซโนคอลเพต (trizonocolpate)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

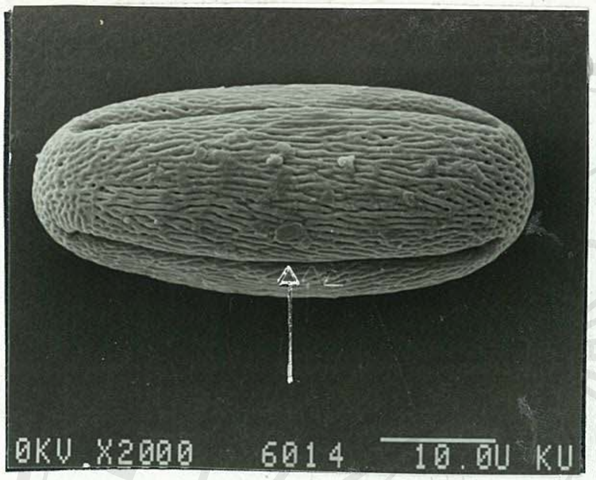
6.2.1.2 ลวดลาย (sculptures)

จากการพิจารณาภาพพื้นผิวของละอองเกสรพืชทั้ง 7 พันธุ์ พบว่าละอองเกสรของมะม่วงพันธุ์แก้ว (ภาพที่ 30-A) และละอองเกสรของมะม่วงพันธุ์อกร่อง (ภาพที่ 30-B) มีลวดลายที่ผนังชั้นเอกซีนเป็นแบบร่างแห หรือเรติคูเลต (reticulate) สำหรับละอองเกสรของลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (ภาพที่ 31-A) ลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะ (ภาพที่ 31-B) ลำไยพันธุ์ดอ (ภาพที่ 32-A) ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว (ภาพที่ 32-B) และละอองเกสรของลำไยพันธุ์แห้ว (ภาพที่ 32-C) มีลวดลายที่ผิวของเอกซีนเป็นแบบกลุ่มเส้นขนาน หรือ สไตรเอต (striate)

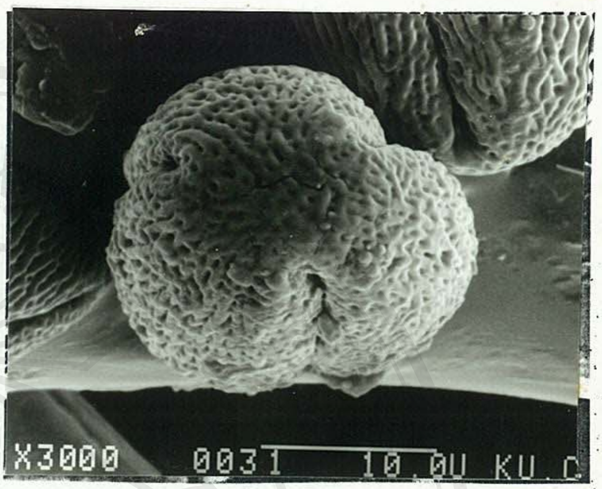
6.2.1.3 ช่องเปอร์ฟอเรชั่น (perforation)

เมื่อตรวจพิจารณาดูช่องเปอร์ฟอเรชั่น พบว่ามีช่องเปอร์ฟอเรชันที่ผิวของผนังละอองเกสรมะม่วงพันธุ์แก้ว (ภาพที่ 30-A) มะม่วงพันธุ์อกร่อง (ภาพที่ 30-B) ลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะ (ภาพที่ 31-B) ลำไยพันธุ์ดอ (ภาพที่ 32-A) ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว (ภาพที่ 32-B) และละอองเกสรลำไยพันธุ์แห้ว (ภาพที่ 32-C) ส่วนละอองของลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (ภาพที่ 31-A) ไม่พบช่องเปอร์ฟอเรชัน ขนาดของเปอร์ฟอเรชันจะแตกต่างกัน (ตารางที่ 14) ในแต่ละพืช และแม้แต่ในละอองเกสรเดียวกันขนาดของเปอร์ฟอเรชันยังแตกต่างกัน ช่องเปอร์ฟอเรชันขนาดใหญ่ที่สุดพบในละอองเกสรลำไยพันธุ์แห้ว 0.33 µ และเล็กที่สุดพบในละอองเกสรลำไยพันธุ์แห้วเช่นเดียวกัน 0.08 µ ช่องเปอร์ฟอเรชันที่มีความถี่มากที่สุดพบในละอองเกสรมะม่วงพันธุ์อกร่อง 0.13 µ ส่วนลำไยพันธุ์ดอและลำไยพันธุ์แห้วมีช่องเปอร์ฟอเรชันห่างที่สุด 0.38 µ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

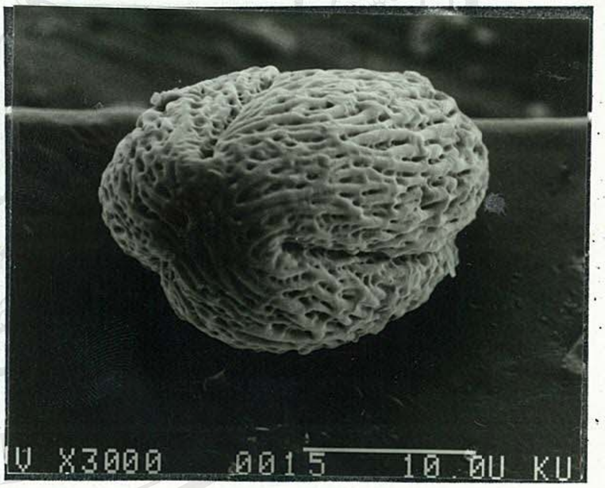


27-A$_1$



27-A$_2$

27-B$_1$



27-B$_2$

<u>ภาพที่</u> 27 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบภายนอกบนพื้นผิวของละอองเกสรมะม่วง (SEM)

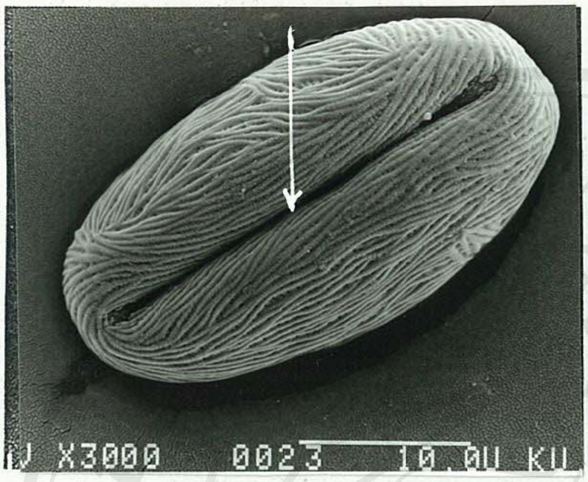
27-A : ละอองเกสรมะม่วงพันธุ์แก้ว

27-B : ละอองเกสรของมะม่วงพันธุ์อกร่อง

1 : equatorial views 2 : polar views

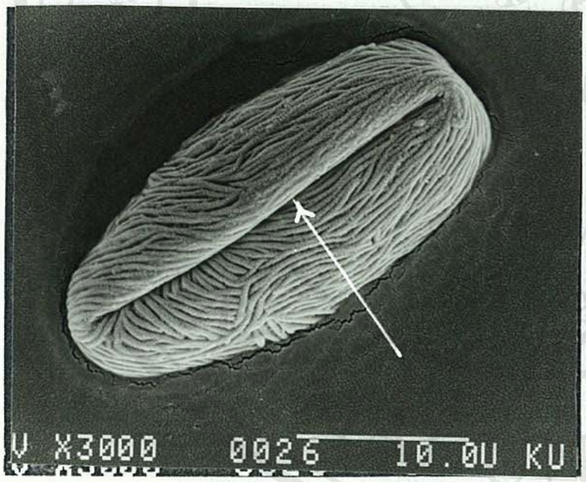
ลูกศร : ช่องเปิด(apertures)ของละอองเกสร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



28-A₁

28-A₂



28-B₁

28-B₂

<u>ภาพที่</u> 28 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบภายนอกบนพื้นผิวของละอองเกสร ลิ้นจี่ (SEM)

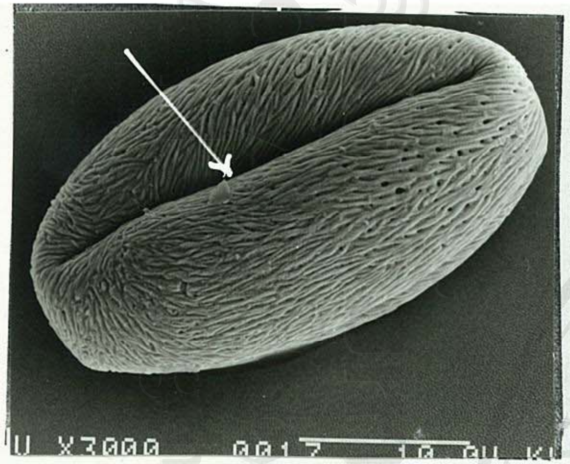
28-A : ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

28-B : ลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะ

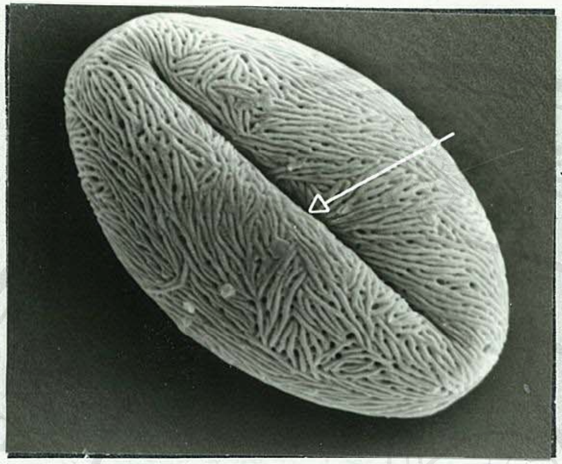
1 : equatorial views   2 : polar views

ลูกศร : ช่องเปิด (apertures) ของละอองเกสร

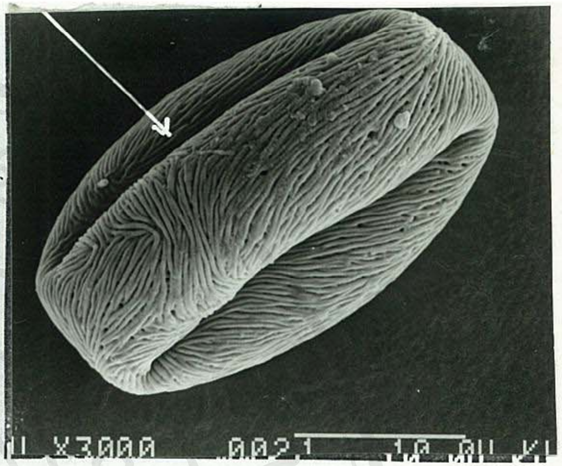
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



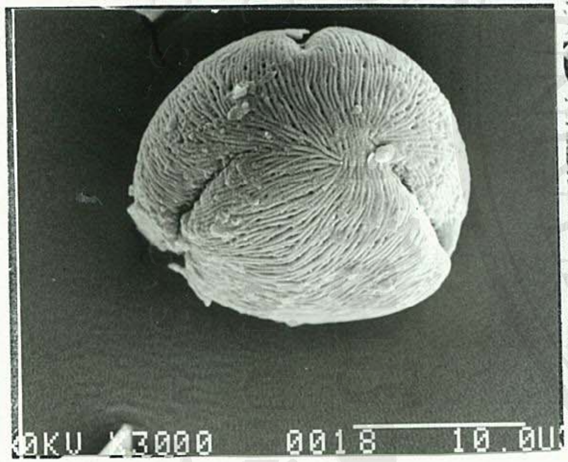
29-A$_1$



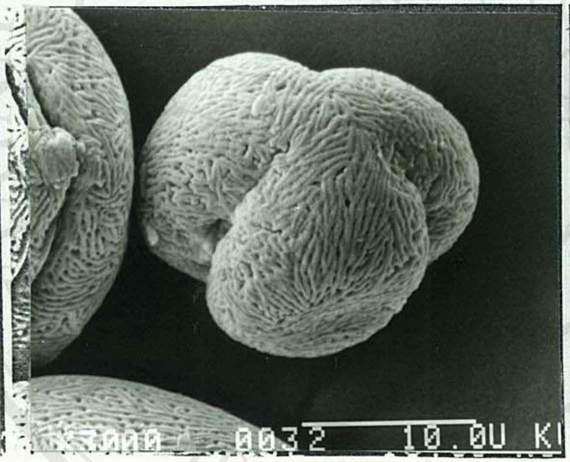
29-B$_1$



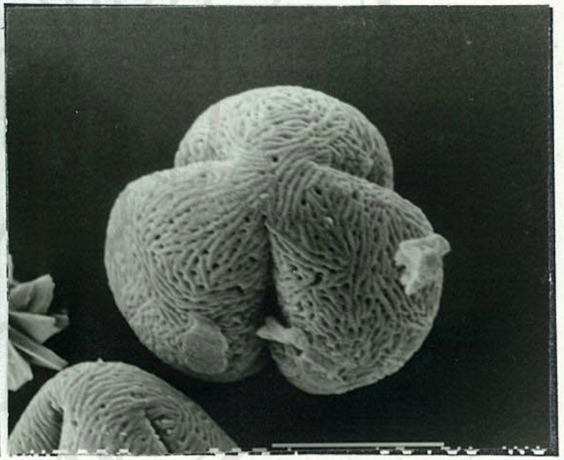
29-C$_1$



29-A$_2$



29-B$_2$



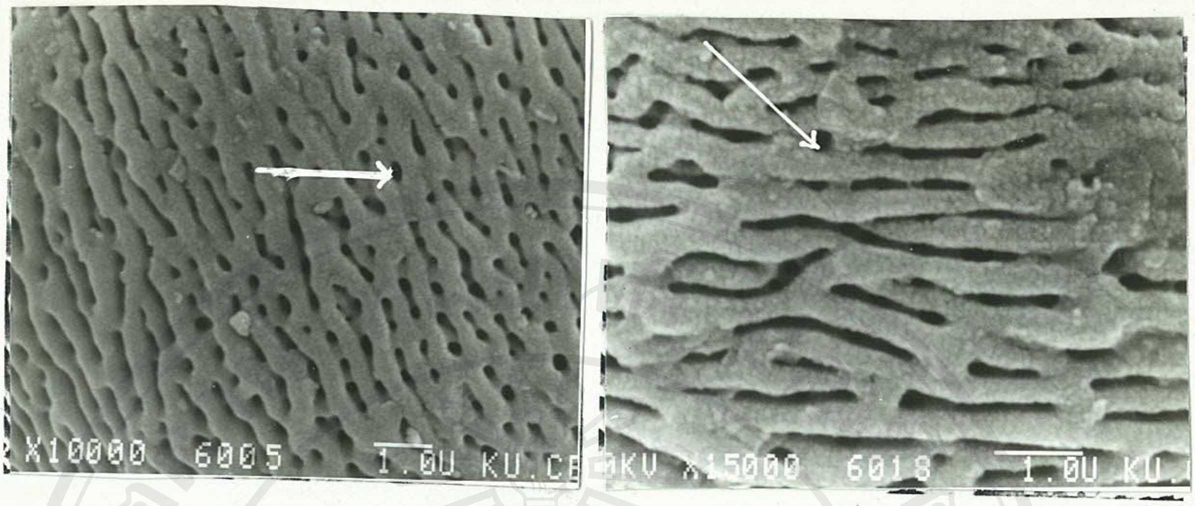
29-C$_2$

<u>ภาพที่</u> 29 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบภายนอกบนพื้นผิวของละอองเกสรลำไย(SEM)

29-A : ละอองเกสรลำไยพันธุ์ดอ　　1 : equatorial views　2 : polar views

29-B : ละอองเกสรลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว　　ลูกศร : ช่องเปิด(apertures) ของละอองเกสร

29-C : ละอองเกสรลำไยพันธุ์แห้ว

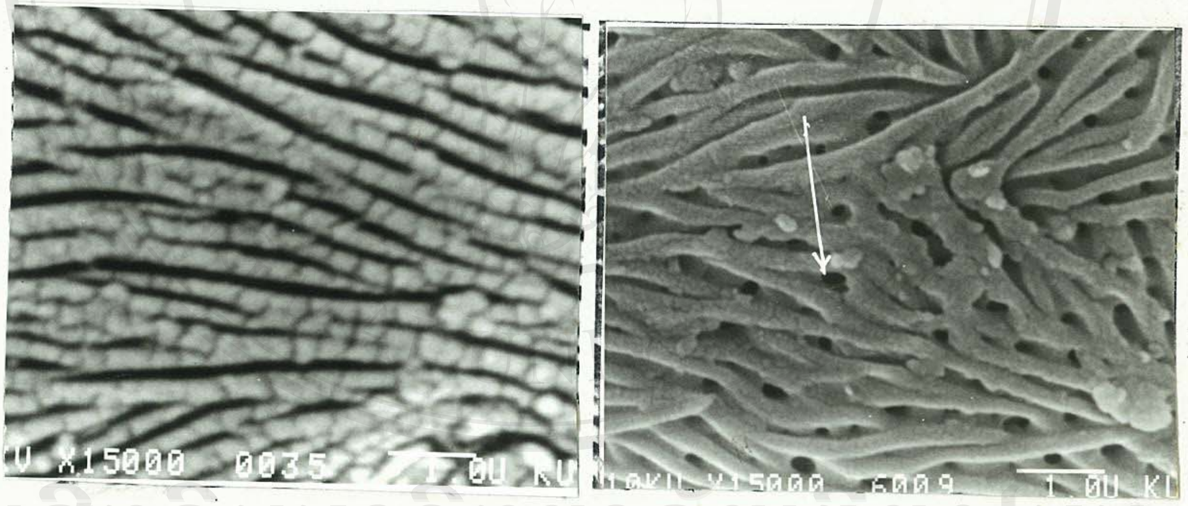


30-A 30-B

<u>ภาพที่</u> 30 แสดงลวดลายและช่องเปอร์ฟอเรชั่น (ลูกศรชี้) ของละอองเกสรมะม่วง

30-A : ละอองเกสรมะม่วงพันธุ์แก้ว

30-B : ละอองเกสรมะม่วงพันธุ์อกร่อง



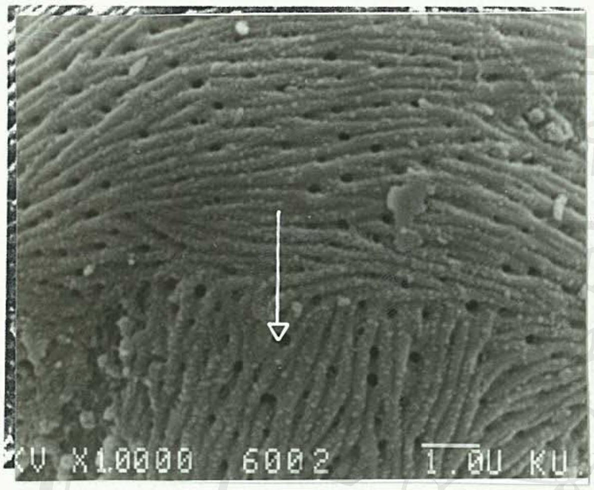
31-A 31-B

<u>ภาพที่</u> 31 แสดงลวดลาย (sculptures) และช่องเปอร์ฟอเรชั่น (ลูกศรชี้) ของละอองเกสรลิ้นจี่ (SEM)

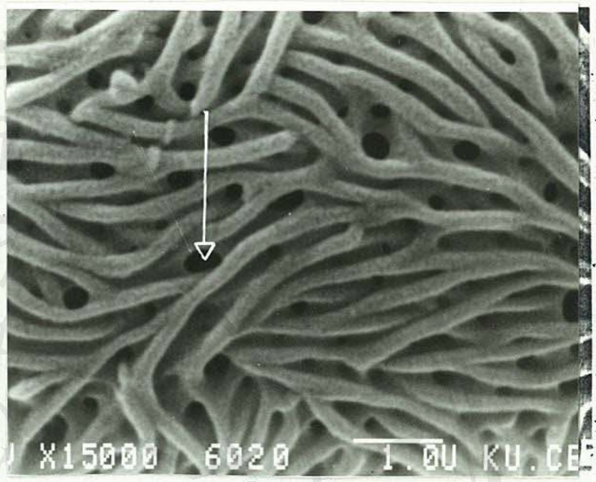
31-A : ละอองเกสรลิ้นจี่พันธุ์องฮวย

31-B : ละอองเกสรลิ้นจี่พันธุ์องเฮียะ

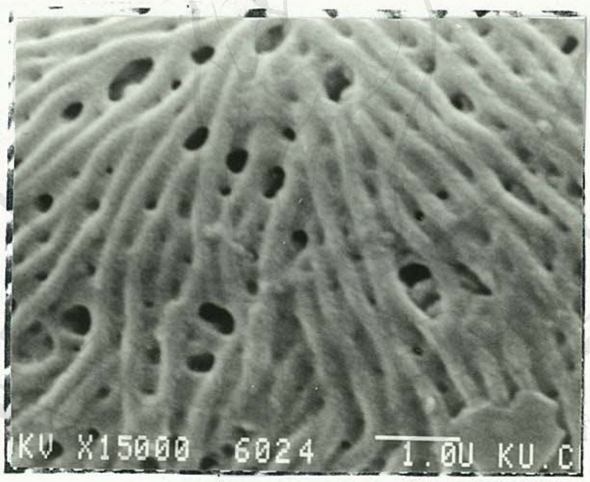
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



32-A



32-B



32-C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>ภาพที่</u> 32 แสดงลวดลาย (sculptures) และช่องเปอร์ฟอเรชัน (ลูกศรชี้) ของละอองเกสรลำไย (SEM)

32-A : ละอองเกสรลำไยพันธุ์ดอ

32-B : ละอองเกสรลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว

32-C : ละอองเกสรลำไยพันธุ์แห้ว

<u>ตารางที่</u> 14 เปรียบเทียบขนาดของเปอร์ฟอเรชันของละอองเกสรมะม่วง ลิ้นจี่และลำไย

ละอองเกสร	ขนาดของเปอร์ฟอเรชัน (μ)		ความถี่ของเปอร์ฟอเรชัน (μ)
	ใหญ่	เล็ก	
มะม่วงพันธุ์แก้ว	0.25	0.14	0.13
มะม่วงพันธุ์อกร่อง	0.29	0.13	0.17
ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย	-	-	-
ลิ้นจี่พันธุ์องเฮียะ	0.23	0.10	0.25
ลำไยพันธุ์ดอ	0.25	0.13	0.38
ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว	0.29	0.15	0.33
ลำไยพันธุ์แห้ว	0.33	0.08	0.38

6.2.2 ผลการศึกษาโครงสร้างภายในของผนังละอองเกสรด้วย TEM

6.2.2.1 แบบแผนของเซกซีน (sexine)

ผนังชั้นเอกซีน ซึ่งเป็นชั้นนอกของละอองเกสรนั้น ยังแบ่งเป็นเนกซีนและเซกซีน เซกซีนจะอยู่นอกสุดและเป็นส่วนที่ทำให้เกิดลวดลาย แบบต่าง ๆ ขึ้น จากการศึกษาด้วย TEM พบว่าแบบแผนของเซกซีนของละอองเกสรมะม่วงพันธุ์แก้ว (ภาพที่ 33-A1,A2) มะม่วงพันธุ์อกร่อง (ภาพที่ 33-B1,B2) ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (ภาพที่ 34-A1,A2) ลิ้นจี่พันธุ์องเฮียะ (ภาพที่ 34-B1,B2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

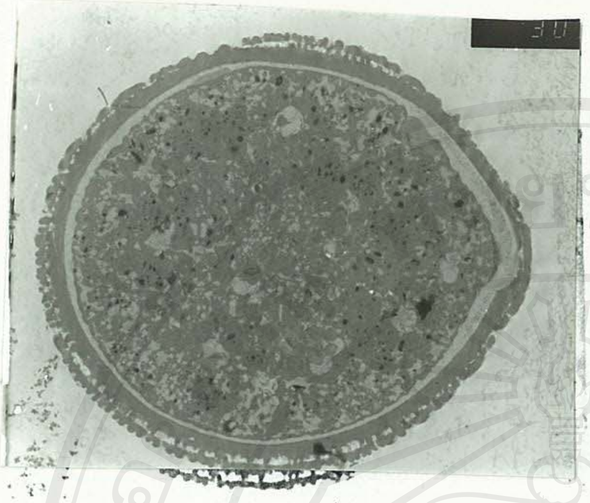
ลำไยพันธุ์ดอ (ภาพที่ 35-A1,A2) ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว (ภาพที่ 35-B1,B2) และละอองเกสรของลำไยพันธุ์แห้ว (ภาพที่ 35-C1, C2) มีแบบแผนเป็นแบบเทคเตต (tectate) เหมือนกันทั้งหมดดังไดอะแกรม (ภาพที่ 10 หน้า 22) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นหลังคาหรือเทคตั้ม และมีก้านค้ำจุน คอลูเมลลา ซึ่งตั้งอยู่บนฐาน (foot layer)

6.2.2.2 ความหนาของผนังละอองเกสร

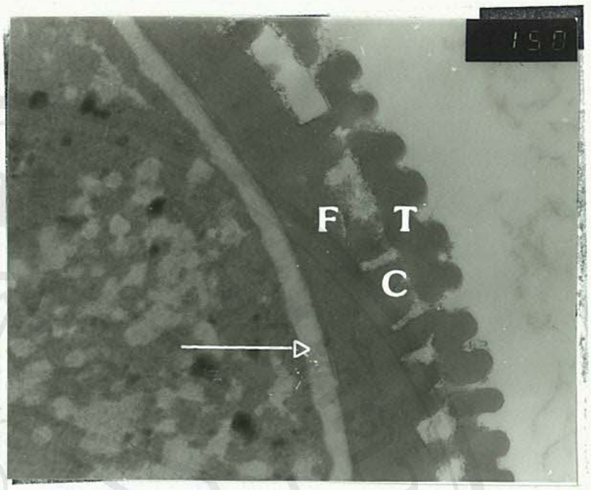
เมื่อเปรียบเทียบความหนาของผนังชั้นเอกซีน กับชั้นอินทีนของละอองเกสร พบว่าพืชทั้ง 7 พันธุ์ จะมีผนังชั้นเอกซีนหนากว่าชั้นอินทีน โดยความหนาของชั้นอินทีน และเอกซีนของละอองเกสรของพืชทั้ง 7 พันธุ์ จะแตกต่างกัน (ตารางที่ 15) ละอองเกสรมะม่วงพันธุ์อกร่องมีชั้นเอกซีนหนาที่สุดคือ 3.48 μ และบางที่สุดได้แก่ละอองเกสรของลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะคือ 1.50 μ ส่วนชั้นอินทีนหนาที่สุดได้แก่ ละอองเกสรของมะม่วงพันธุ์อกร่องคือ 0.43 μ สำหรับละอองเกสรของลำไยพันธุ์ดอ จะมีชั้นอินทีนบางที่สุดคือ 0.17 μ

นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนของอินทีนจะมีความหนาไม่เท่ากันในแต่ละพืช จะมีบางบริเวณที่มีอินทีนหนามากเห็นได้ชัดเจนจากภาพ TEM ส่วนหนาที่มากที่สุดคือ 3.18 μ พบในลำไยพันธุ์ดอ ส่วนที่หนาแต่น้อยที่สุดพบในละอองเกสรลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยคือ 1.14 μ สำหรับละอองเกสรของลำไยพันธุ์แห้วจะไม่พบส่วนที่หนาเหมือนละอองเกสรของพืชอื่น (ตารางที่ 15)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

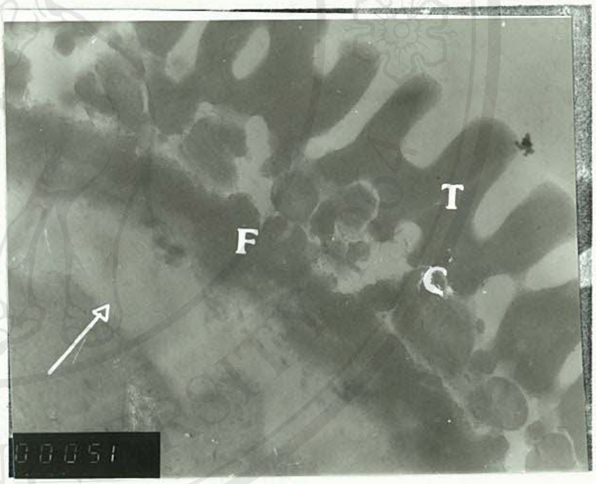


33-A$_1$



33-A$_2$

33-B$_1$ 10 μ



33-B$_2$ 1 μ

<u>ภาพที่</u> 33 แสดงโครงสร้างภายในของผนังละอองเกสรมะม่วง (TEM)

33-A : ละอองเกสรมะม่วงพันธุ์แก้ว

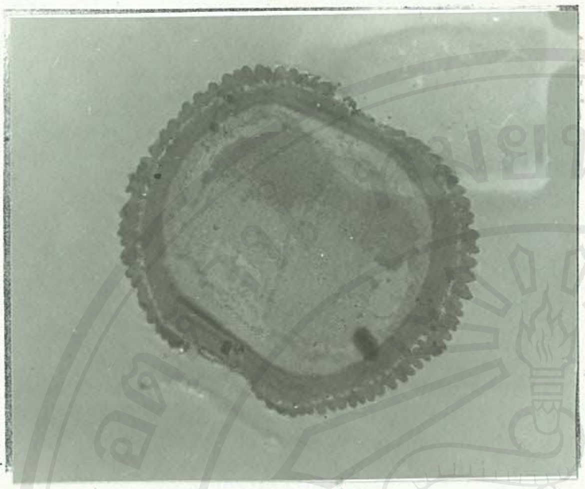
33-B : ละอองเกสรมะม่วงพันธุ์อกร่อง

1 : กำลังขยาย 3000 เท่า 2 : กำลังขยาย 15000 เท่า

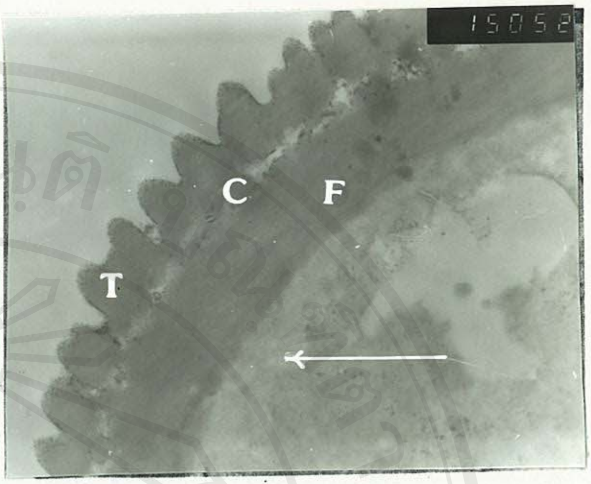
ลูกศรขาว : ผนังชั้นอินทีน (intine) T : เตคตั้ม (tectum)

F : foot layer C : columella

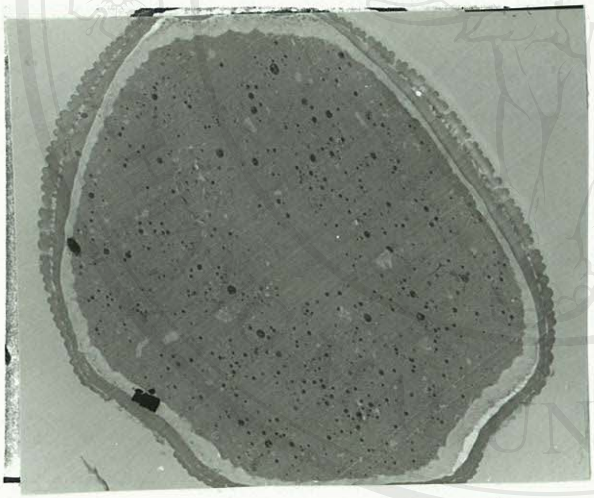
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



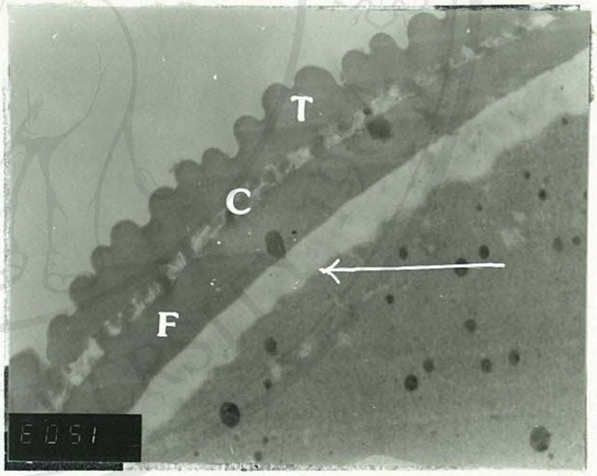
34-A_1



34-A_2



34-B_1 10 μ



34-B_2 1 μ

<u>ภาพที่</u> 34 แสดงโครงสร้างภายในของผนังละอองเกสรลิ้นจี่ (SEM)

34-A : ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

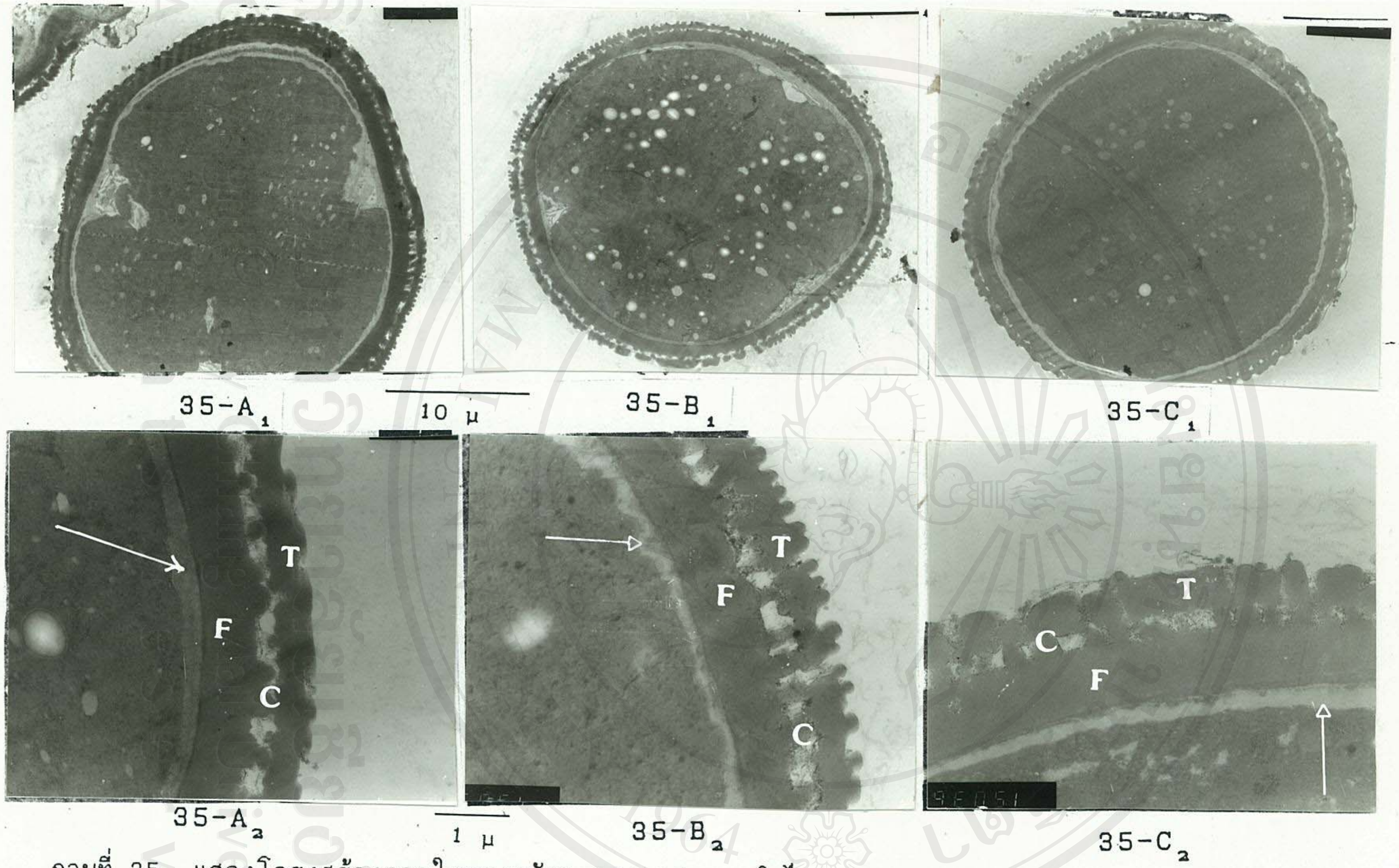
34-B : ลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะ

1 : กำลังขยาย 3000 เท่า 2 : กำลังขยาย 15000 เท่า

ลูกศรขาว : ผนังชั้นอินทีน(intine) T : เตคตั้ม (tectum)

F : foot layer C : columella

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



<u>ภาพที่</u> 35 แสดงโครงสร้างภายในของผนังละอองเกสรของลำไย (TEM)

35-A : ละอองเกสรของลำไยพันธุ์ดอ 1 : กำลังขยาย 3000 เท่า T : เตคตั้ม (tectum)

35-B : ละอองเกสรของลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว 2 : กำลังขยาย 15000 เท่า C : columella

35-C : ละอองเกสรของลำไยพันธุ์แห้ว ลูกศร : ผนังชั้นอินทีน (intine) F : foot layer

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบความหนาของผนังชั้นเอกซีน และอินทีนของละอองเกสร มะม่วง ลิ้นจี่ และลำไย

ละอองเกสร	ความหนาของผนัง (μ)		บริเวณ intine ที่หนา (μ)
	exine	intine	
มะม่วงพันธุ์แก้ว	1.67	0.25	1.59
มะม่วงพันธุ์อกร่อง	3.48	0.43	2.27
ลิ้นจี่พันธุ์องฮวย	2.08	0.42	1.14
ลิ้นจี่พันธุ์องเฮียะ	1.50	0.42	1.36
ลำไยพันธุ์ดอ	1.83	0.17	3.18
ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว	0.58	0.25	2.27
ลำไยพันธุ์แห้ว	1.67	0.21	—

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.3 อภิปรายผล

เมื่อพิจารณาถึงจำนวน ตำแหน่ง และลักษณะช่องเปิดของพืชทั้ง 7 พันธุ์แล้ว จะเห็นว่ายังใช้แยกความแตกต่างไม่ได้ เนื่องจากมีลักษณะเหมือนกันและมีจำนวนเท่ากัน แต่การที่ละอองเกสรของพืชทั้ง 7 พันธุ์ มีช่องเปิดแบบ คอลเพต (colpate) น่าจะบ่งบอกได้แต่เพียงว่าพืชเหล่านี้มีวิวัฒนาการมาต่ำ (Moore และ Webb, 1978) ซึ่งก็น่าจะมีชีวิตมาในยุคหรือสมัยเดียวกัน

สำหรับลวดลายบนผนังชั้นเอกซีนนั้น สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มแรกมีลวดลายแบบเรติคูเลต (reticulate) ได้แก่ละอองเกสรของมะม่วงพันธุ์แก้ว และมะม่วงพันธุ์อกร่อง กลุ่มที่สองมีลวดลายแบบ สไตรเอต (Striate) ได้แก่ละอองเกสรของลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย ลิ้นจี่พันธุ์องเฮียะ ลำไยพันธุ์ดอ ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว และลำไยพันธุ์แห้ว การที่ลิ้นจี่ และลำไยมีลักษณะลวดลายที่เหมือนกันก็คงจะเนื่องมาจากมีความใกล้เคียงกันทาง taxonomy (Keng, 1969)

Moore และ Webb (1978) ได้กล่าวถึงลักษณะลวดลายแบบสไตรเอตว่าเป็นกลุ่มเส้นขนานซึ่งอาจมีกลุ่มเดียวหรือหลายกลุ่มก็ได้ เมื่อมาพิจารณาดูกลุ่มของเส้นขนานจากภาพที่บันทึกด้วย SEM แล้ว ลำไยน่าจะมีกลุ่มของเส้นขนานมากกว่าลิ้นจี่ จะเห็นได้ว่าลักษณะลวดลายที่ผิวของผนังละอองเกสรสามารถที่จะใช้เป็นเกณฑ์ในการแยกกลุ่มของพืชได้ ซึ่งได้ทำกันมากแล้ว เช่น กันยา (2527) ศึกษาในพืชวงศ์ปีป Westwood และ Challice (1978) ศึกษาใน พืชสกุล <u>Pyrus</u> L.

ส่วนช่องเปอร์ฟอเรชันนั้น จะเห็นว่ามีขนาดกระจายอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 9) และเปอร์ฟอเรชันของละอองเกสรในพืชแต่ละพันธุ์ก็จะมีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กปะปนกัน จึงลำบากที่นำมาเป็นเกณฑ์ในการจัดแยกกลุ่มของพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามถ้าพิจารณาในแง่ความถี่ของช่องเปอร์ฟอเรชัน พอจะจัดแยกได้เป็นสามกลุ่ม กลุ่มแรกมีความถี่ของช่องเปอร์ฟอเรชันมากที่สุด ได้แก่ มะม่วงพันธุ์แก้วมีความถี่ 0.13 µ และมะม่วงพันธุ์อกร่องมีความถี่ 0.1 µ กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความถี่ของช่วงเปอร์ฟอเรชันน้อยที่สุด ได้แก่ ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว ลำไยพันธุ์ดอ และลำไยพันธุ์แห้ว มีความถี่ 0.33, 0.38 และ 0.38 ตามลำดับ กลุ่มที่สามมีความถี่ของช่องเปอร์ฟอเรชันอยู่ระหว่างสองกลุ่มแรกมีความถี่ 0.25 μ ได้แก่ ลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะ สำหรับการใช้เปอร์ฟอเรชันในการแบ่งกลุ่มพืชนี้ Martens และ Fretz (1980) ได้ทำมาแล้วใน Crab apples

ในลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยไม่พบช่องเปอร์ฟอเรชันซึ่งอาจเป็นไปได้สองกรณี กรณีแรกละอองเกสรของลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยไม่มีช่องเปอร์ฟอเรชัน กรณีที่สองละอองเกสรมีช่องเปอร์ฟอเรชัน แต่การไม่พบช่องเปอร์ฟอเรชันนั้นอาจเกิดจากการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM ไม่ดีพอทำให้ได้ภาพไม่ละเอียด เมื่อพิจารณาดูภาพพื้นผิว (ภาพที่ 31-A) พบว่ามีรอยแตกตามสัน หรือมูไร (muri) อาจเป็นสารพวกไขมันหรือสารพวกขี้ผึ้งมาเคลือบ สาเหตุอาจเกิดจากขบวนการล้างตัวอย่างไม่ดีพอ หรือขบวนการล้างดีพอแต่สารที่เคลือบอยู่นั้นมีความพิเศษที่จะต้องทำความสะอาดด้วยสารอื่น หรือวิธีการอื่น

สำหรับการพิจารณาโครงสร้างผนังชั้นในของละอองเกสรด้วย TEM พบว่าพืชทั้ง 7 พันธุ์ มีแบบแผนของชั้นเซกซีนเป็นแบบเทคเตตทั้งหมด ซึ่งตรงกับที่ Moore และ Webb (1978) ได้เสนอไว้ว่า ละอองเกสรของพืชที่มีลวดลายแบบสไตรเอต และเรติคูเลตจะมีแบบแผนของเซกซีนเป็นแบบเทคเตตหรือเซมิเทคเตตเท่านั้น

สำหรับความหนาของชั้นเอกซีนและชั้นอินทีนนั้นพบว่า ละอองเกสรของพืชทุกชนิดจะมีชั้นเอกซีนหนากว่าชั้นอินทีนเป็นไปตามที่ Erdtman (1972) ได้เสนอไว้

Knox (1984) ได้กล่าวว่า ผนังชั้นอินทีนบริเวณช่องเปิดจะมีความหนากว่าส่วนอื่น เนื่องจากจะต้องใช้เนื้อเยื่อส่วนนี้ในการยืดตัวของหลอดละอองเกสรและจะให้ความแข็งแรงต่อเซล เมื่อมีการดูดน้ำเข้าไปด้วย เมื่อพิจารณาภาพที่ได้จาก TEM พบว่าในลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (ภาพที่ 34-A_1) ลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะ (ภาพที่ 34-B_1) ลำไยพันธุ์ดอ (ภาพที่ 35-A_1) ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว (ภาพที่ 35-B_1) มีส่วนอินทีนที่หนาพบ 3 บริเวณตามจำนวนของช่องเปิด เหมือนกับที่ Knox (1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กล่าวไว้ ส่วนละอองเกสรของมะม่วงพันธุ์แก้ว (ภาพที่ 33-A_1) พบเพียงบริเวณเดียว ละอองเกสรของมะม่วงพันธุ์อกร่อง (ภาพที่ 33-B_1) พบ 2 บริเวณ สำหรับละอองของลำไยพันธุ์แห้ว (ภาพที่ 35-C_1) ไม่พบส่วนของอินทีนที่หนาดังกล่าว ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่าละอองเกสรของลำไยพันธุ์แห้วไม่มีส่วนของอินทีนที่หนา หรือไม่ก็อาจจะมีแต่การไม่พบอาจเกิดจากขบวนการตัดโดยอาจจะตัดขนานไปกับช่องเปิด ซึ่งมีส่วนของอินทีนที่หนาก็เป็นได้ ส่วนละอองของมะม่วงพันธุ์แก้วและพันธุ์อกร่องนั้นอาจจะถูกตัดในลักษณะที่เฉียง จึงทำให้พบอินทีนส่วนที่หนาเพียงบางบริเวณ การตัดมีผลต่อการเกิดลักษณะดังกล่าวได้ เพราะการตัดเป็นการสุ่มตัดโดยใช้เครื่อง ultra-microtome

6.4 สรุปผล

จากการศึกษาโครงสร้างภายนอกของละอองเกสร พบว่า ละอองเกสรของพืชทั้ง 7 พันธุ์มีช่องเปิดแบบ trizonocolpate ที่ผนังชั้นเอกซีนของละอองเกสรมะม่วงทั้งสองพันธุ์ มีลวดลายแบบ เรติคูเลต ส่วนลิ้นจี่สองพันธุ์ และลำไยสามพันธุ์มีลวดลายแบบ สไตรเอต ช่องเปอร์ฟอเรชัน จะไม่พบในละอองเกสรลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย แต่จะพบในลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะ มะม่วงทั้งสองพันธุ์และลำไยทั้งสามพันธุ์ โดยขนาดของเปอร์ฟอเรชันจะมีขนาดแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด

สำหรับโครงสร้างภายในนั้น ละอองเกสรของพืชทั้ง 7 พันธุ์ จะมีแบบแผนของชั้นเซกซีนเป็นแบบเทคเตต ผนังชั้นเอกซีนจะหนากว่าชั้นอินทีน ละอองเกสรมะม่วงพันธุ์อกร่องมีชั้นเอกซีนหนาที่สุดคือ 3.48 μ และบางที่สุด พบในละอองเกสรลิ้นจี่พันธุ์ฮงเฮียะคือ 1.50 μ ส่วนชั้นอินทีนหนาที่สุดพบในละอองเกสรมะม่วงพันธุ์อกร่องคือ 0.43 μ และบางที่สุด ได้แก่ ละอองเกสรลำไยพันธุ์ดอคือ 0.17 μ ละอองเกสรส่วนมากจะมีอินทีนบางส่วนหนากว่าปกติซึ่งจะพบ 1,2 หรือ 3 บริเวณ ยกเว้นละอองเกสรของลำไยพันธุ์แห้วจะไม่พบอินทีนส่วนที่หนาดังกล่าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved