หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์ผล (DISCUSSION)

ดอกพุทธรักษาที่มี ovary สูง 5 มิลลิเมตรซึ่งดอกยังไม่บานเนื่องได้เริ่มทำการถ่ายละอองเรณูนั้น วันรุ่งขึ้นกลีบดอกจึงบาน และบานไป หลายวัน และได้เหี่ยวในวันที่หก แล้วเมื่อดู section ของ ovule อายุหกวันนั้นก็พบ pollen tube เข้ามาถึง embryo sac และได้พบ egg ถูกผสมแล้วเป็น zygote ซึ่งเป็นลักษณะที่ตรงกันพอดี คือวันที่ pollen tube เข้าถึง embryo sac และมีการผสมนั้นส่วนภายนอกคือกลีบดอกได้เหี่ยว นับว่าตรงกับที่ Wardlaw (1955) ได้รายงานในพืชล้มลุก (herbaceous plant) ว่าระยะที่ดอกเริ่มเหี่ยวมักจะแสดงว่ามีการผสม

ในพุทธรักษาพบ pollen tube เจริญเข้ามาในหนึ่ง ovule จำนวนสองอัน ซึ่งนับว่าเป็นภาวะไม่ปกติ Maheshwari (1950) กล่าวว่าปกติจะมีเพียงหนึ่ง pollen tube เท่านั้นที่เข้ามาใน embryo sac พืชอื่นๆที่มีจำนวน pollen tube สองอันเจริญเข้ามาใน ovule เท่าๆกับพุทธรักษาได้แก่ Pisum sativum (Cooper, 1938) และตามที่ Maheshwari (1950) ได้รวบรวมไว้ ยังมีชื่อพืชอื่นๆอีกคือ Acacia , Beta , Boerhaavia , Cephalanthera , Elodea , Fagopyrum , Juglans , Nicotiana , Platanthera

ช่วงเวลา (period) ระหว่างการถ่ายละอองเรณู และการผสม (fertilization) แตกต่างกันในพืชแล้วแต่ชนิด พืชบางอย่างมีช่วงเวลาค่อนข้างนานมากนับเป็นเดือนตั้งแต่ 1-7 เดือน เป็น Alnus glutinosa และพวกใน family Orchidaceae หลายชนิด บางอย่างมีช่วงเวลาที่จะเกิดการผสมนับเป็นวัน เช่น Carica papaya 13 วัน, Carya illionoensis 4-7วัน บางอย่างกินเวลาประมาณหนึ่งวันกว่าๆเช่น Cotton 36 - 40 ชั่วโมง (Gore, 1932) Oryza sativa 24 - 48 ชั่วโมง

(Maheshwari,1950) ในข้าวโพดใช้เวลา 25 ชั่วโมง(Randolph,1936) และที่ใช้เวลาสั้นมากไปถึงชั่วโมงได้แก่ Hordeum distichum palmella (Maheshwari,1950) สำหรับพุทธรักษาช่วงเวลาดังกล่าวเป็นเวลานานกว่าในพืชพืช 2 - 3 ชนิดที่กล่าวมา คือนานถึง 6 วัน ในการทดลองนี้ หรือถ้านับเอาวันที่ดอกบานตามธรรมชาติก็ 5 วัน ดังได้กล่าวไว้แล้วว่าดอกที่มี ovary สูง 5 มิลลิเมตรแล้ว มักจะบานในวันรุ่งขึ้น

พุทธรักษา ในระยะที่รอการผสมหรือยังไม่ได้ทำการถ่ายละอองเรณู embryo sac ที่เจริญเต็มที่ประกอบด้วย egg และ central cell หรือ secondary nucleus ที่เกิดจากการรวมกันของสอง polar nuclei แสดงว่าในพุทธรักษา polar nuclei สองอันรวมกันก่อนเกิดการถ่ายละอองเรณู ซึ่งเหมือนกับพืชอื่นๆส่วนมาก อย่างมีรายงานในพืชบางชนิดที่ polar nuclei ไม่รวมกันก่อนการถ่ายละอองเรณู เช่นใน Arceuthobium douglasii (Jones & Gordon, 1965)

โดยทั่วๆไป egg มีนิวเคลียสอยู่ทางด้านปลาย (distal end) หรือทางทิศเข้าสู่ chalaza และ vacuole ขนาดใหญ่อยู่ทางด้านฐาน (basal end) หรือทางด้านชิด micropyle(Wardlaw, 1955) พุทธรักษาก็เป็นเช่นนี้ แสดงว่าพุทธรักษามี egg ลักษณะเหมือนพืชอื่นๆโดยมาก

ในพุทธรักษา nucellus ที่อยู่ชิด embryo sac ด้านใกล้ micropyle ได้ยืดยาวเข้ามาใน embryo sac แล้วเจริญต่อไปได้ถึงขั้นแบ่งตัวอีกหนึ่งครั้งได้รวมเป็นสองเซลล์ เคยมีรายงานที่ Maheshwari (1950) รวบรวมไว้ว่าเนื้อเยื่อใน nucellus ได้เจริญเติบโตยื่นเข้ามาใน embryo sac และเจริญเป็น embryo ได้แก่พวกส้ม (Citrus) ซึ่ง embryo พิเศษอย่างนี้จัดประเภทเป็น adventive embryo แต่ของพุทธรักษาไม่ได้เจริญต่อถึงขั้นเป็น embryo เพราะได้ฝ่อไปหลังจากเป็นสองเซลล์แล้วจึงไม่อาจนับเป็น adventive embryo และยังไม่มีใครบรรยายตั้งชื่อไว้ ในที่นี้จึงเรียก nucellar

extension ไปพลางๆก่อน หน้าที่อาจจะช่วยในการนำอาหารจากนอก embryo sac เช่นจาก nucellus เข้ามาก็ได้ หรืออาจจะเนื่องจากการที่มีการผสม (fertilization) เกิดขึ้นใน embryo sperm nucleus ที่เข้ามาซึ่งปกติมักจะมี hormone ด้วย (Maheshwari,1950) อาจจะกระตุ้นให้เซลล์บางเซลล์เจริญเติบโตและยืดยาวออกเป็นพิเศษก็ได้ ซึ่งเรื่องนี้ก็น่าสนใจศึกษาต่อไปด้วย

ในพืชส่วนมาก primary endosperm nucleus มักจะแบ่งตัวก่อน zygote เช่นใน Triticum vulgare อาจแบ่งได้ 4 หรือ 8 นิวเคลียสหรืออาจแบ่งได้ 8-16 นิวเคลียสแล้ว zygote เริ่มแบ่ง (Brink&Cooper,1947) หรือใน Primula officinalis primary endosperm nucleus อาจแบ่งได้ถึง 1000 นิวเคลียสแล้วขณะที่ zygote ยังไม่ได้แบ่งตัวหรือพักอยู่ (Brink &Cooper,1947 เล่าถึงงานของ Dahlgren,1916) ใน Fouquieria endosperm จะเจริญถึงขั้นเต็มที่แล้วแต่ zygote ยังไม่ได้แบ่งตัว (Johansen, 1936) ในทางตรงกันข้ามในพืชบางชนิด zygote อาจจะเจริญเติบโตโดยการแบ่งตัวก่อน primary endosperm nucleus เช่นใน Elodea canadensis, Limnocharis omarginata,Najas major(Brink&Cooper,1947 เล่าถึงงานของ Wylie 1904,Hall 1902 และ Guignard 1901 ตามลำดับ) และใน Cynomorium,Restio,Allium spp.(Maheshwari,1950) เป็นต้น ในพุทธรักษา zygote และ primary endosperm nucleus เจริญเติบโตแบ่งเซลล์ไปอย่างพร้อมกัน คือในวันที่เจ็ดหลังการถ่ายละอองเรณูหรือหนึ่งวันหลังการผสมก็ได้พบ zygote เจริญได้เป็น proembryo ระยะสองเซลล์และพบ endosperm สองนิวเคลียสเป็นแบบ free nuclei นับว่าคล้ายกับพืชใน family Alismataceae,Valeriana officinalis,Vallisneria spiralis ซึ่ง Maheshwari (1950) รวบรวมไว้

Proembryo เจริญต่อไปจนเป็น proembryo ที่มีจำนวนเซลล์หลายแถว การที่ได้พบ endosperm นิวเคลียสเป็นจำนวนเลขคี่ในบางระยะ เช่น

เคยพบสามนิวเคลียสนั้น แสดงว่า endosperm nucleus มี activity ไม่เท่ากัน ทำให้แบ่งตัวไม่พร้อมกันก็ได้ Diboll & Larson (1966) ได้กล่าวถึงงานของ Wallace ในปี 1963 ที่เกี่ยวกับ central cell ว่า ใน central cell มี dictyosomes ซึ่งมี E.R. บาง literature เขียน ER ซึ่งเป็นคำย่อของ endoplasmic reticulum เป็นจำนวนมาก เพราะฉะนั้นใน endosperm nucleus ที่มี dictyosome และ E.R. มากกว่า จะมี activity สูงกว่าจึงแบ่งตัวได้เร็ว จึงได้ endosperm nucleus ที่มีสามนิวเคลียสบ้าง สี่นิวเคลียสบ้าง

ในพืชบางชนิด endosperm จะเป็น free nuclei ตลอดไปไม่มีการสร้างผนังเซลล์ ได้แก่ Lopezia , Stenosiphon , Cardiospermum , Tropaeolum และ Melastoma (Maheshwari , 1950) บางอย่างเมื่อ endosperm ประกอบด้วยสี่นิวเคลียสก็เริ่มสร้างผนังได้แก่ Coffea หรือเมื่อประกอบด้วย 8 -16 นิวเคลียสก็สร้างผนังได้แก่ Asclepias (Maheshwari, 1950) ใน Abutilon theophrasti พบว่ามีการอยนิวเคลียสขึ้นไปจึงมีการสร้างผนัง (Winter,1960)สำหรับ Hordeum jubatum นั้น Cooper & Brink (1944) พบว่า เมื่อ endosperm ประกอบด้วยประมาณ 128 นิวเคลียส ภายใน 32 ชั่วโมงก็มีการสร้างผนัง และเมื่อมีประมาณ 256 นิวเคลียสก็จะมีผนังหมดแล้ว ใน Zea mays (Randolph,1936) พบว่า endosperm ประกอบด้วย 128 นิวเคลียส ภายในสามวันหลังการถ่ายละอองเรณู และในราวสามวันกึ่งหลังการถ่ายละอองเรณูก็เริ่มสร้างผนัง สี่วันหลังการถ่ายละอองเรณูหรือสามวันหลังการผสมก็พบมีการสร้างผนังเซลล์หมดแล้ว ส่วนของพุทธรักษา endosperm nucleus แบ่งตัวได้เป็นสองนิวเคลียสในวันที่เจ็ดหลังการถ่ายละอองเรณูแล้วก็คล้าย ๆ พักไปห้าวัน พอถึงวันที่ 12 หลังการถ่ายละอองเรณูจึงเริ่มแบ่งตัวไปช้า ๆ จนถึง 16 วันหลังการถ่ายละอองเรณูจึงมีประมาณ 75 นิวเคลียส แล้ววันที่ 20 หลังการถ่ายละอองเรณูหรือ 14 วันหลัง การผสมจึงได้สร้างผนัง นับว่าการสร้างผนังช้ากว่าพวก Hordeum jubatum และ Zea mays

นอกจากนั้นในพุทธรักษายังสร้างเนื้อแถวเยื่อเท่านั้นไม่สร้างเป็นเซลล์เต็มหมดเหมือนที่ Cooper & Brink (I944) และ Randolph (I936) พบใน Hordeum jubatum และ Zea mays ตามลำดับ

พืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่รู้จักกันดีว่าไม่มี endosperm คือพืชใน family Orchidaceae (Maheshwari,I950) การที่ไม่มี endosperm นั้น ที่จริงมีการผสมของ polar nuclei จนได้ primary endosperm nucleus แต่ก็เจริญมาได้ 2 -3 free nuclei เช่น Vanilla และ Cephalanthera นิวเคลียสเหล่านี้ก็จะฝ่อหายไปในไม่ช้า นอกจากนั้น Brink & Cooper (I947) ซึ่งได้รวบรวมเขียนเรื่องเกี่ยวกับ endosperm ได้เล่าไว้ว่า basal cell ของกล้วยไม้เจริญเป็น haustoria มีดยาวมาสู่micropyle แล้วมาสู่ funiculus และอาจจะเข้าถึง placenta ได้ด้วย haustoria ได้ทำหน้าที่เป็นเซลล์สำหรับดูด (absorbing cell)และนำอาหาร

Suspensor ของพุทธรักษาไม่ยาวมากนัก ประกอบด้วยเซลล์เพียงไม่กี่แถว ประมาณหกแถว ซึ่งเจริญมาจากbasal cell สองแถว และจากกลางของหมู่เซลล์ที่ได้จาก terminal cell อีกสี่แถว ในพืชอื่น ๆ เช่น Pisum sativum (Cooper,I938) รายงานว่าbasal cell ได้แบ่งตัวตามยาวได้เป็น suspensor เพียงสองเซลล์เท่านั้น แต่ได้เจริญโดยการยืดตัวยาวออกกว่าเดิมมาก ใน Rhinanthus (Tiagi,I966) suspensor ยาวมาก ประกอบด้วยจำนวนเซลล์ถึง 25 เซลล์

Embryo ของพุทธรักษาเป็นท่อนยาวแบบตั้งตรง ในพืชอื่นบางชนิดอาจมี embryo ซึ่งไม่ตรงแต่บวนเป็นเกลียว เช่น Cuscuta gronovii (Truscott I966) ซึ่ง embryo อาจจะม้วนเป็นเกลียวเกือบสองรอบ

Antipodal ใน Hordeum jubatum เจริญดีมาก Cooper &Brink (I944) พบว่า ขณะที่พืชนี้พร้อมจะผสมนั้นมี antipodal ถึง I5 ฉัน และกินเนื้อที่ถึงหนึ่งในสี่ของ embryo sac พอถูกผสมตามปกติด้วย pollen ใน

species เดียวกันก็ค่อย ๆ ใหญ่มากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง 28 ชั่วโมงแล้วก็ค่อย ๆ ฝ่อไป ส่วน antipodal ของ Zea mays มีในระยะแรก ๆ 2-3 อันแล้วค่อย ๆ แบ่งตัวมีมากขึ้นจนไกถึงระยะที่จะผสมนั้นประมาณ 30 - 40 นิวเคลียส และแม้จะเป็นเวลาถึง 25 วันภายหลังการถ่ายละอองเรณูแล้วก็ยังพบ antipodal อยู่ (Cooper, 1937) ส่วน Randolph (1936) ซึ่งได้ตรวจใน Zea mays เช่นกันบรรยายไว้ว่า ระยะที่จะผสมนั้น antipodal มี 24 - 48 เซลล์ และจาก ovule ที่เขาตรวจทั้งหมด มีจำนวนครึ่งหนึ่งที่ antipodal หายไปหมดภายใน 10 - 12 วัน อีกครึ่งหนึ่งนั้นยังต่างกันเป็นสองแบบคือ แบบหนึ่งมีจำนวนคงเดิมอีกแบบหนึ่งยังคงแบ่งตัวต่อไปแม้ ovule กำลังกลายเป็นเมล็ดจะถึงระยะ maturity แล้ว ส่วนของพุทธรักษาที่ได้สังเกตนั้น antipodal ได้เสื่อมสลายไปเร็วตั้งแต่ในระยะที่ดอกยังไม่บานและ ovary สูง 5 มิลลิเมตรนั้นก็ไม่พบ antipodal เลย Diboll & Larson (1966) ได้วิจารณ์เรื่อง antipodal ว่า แม้ว่าหน้าที่ของมันจะยังไม่เป็นที่แน่ใจ แต่ส่วนมากก็ยังมีผู้ให้ความเห็นว่ามีบทบาทในทางด้านอาหาร (nutritive role) และพวก Graminae ยังแบ่งตัวต่อไปได้หลายเซลล์ ในไม้ไผ่อาจถึงหลายร้อยเซลล์ และเมื่อเขาได้ตรวจ antipodal ของข้าวโพดโดยใช้กล้อง electron microscope ก็ได้พบพื้นที่ผิว (surface area) ของ ER (endoplasmic reticulum) มาก มีหลาย cisternal dictyosomes และมี mitochondria มาก ซึ่งเขาได้ให้ความเห็นว่า antipodal น่าจะมีอัตราของ respiration และความสามารถในการสังเคราะห์ (synthetic activity) ได้มาก ถ้าจะเปรียบเทียบว่าพวก Hordeum jubatum และ Zea mays ซึ่งมี antipodal มากเป็นพืชที่สร้าง endosperm ได้ดี แต่พุทธรักษามี endosperm น้อยและ antipodal ฝ่อหายไปเร็วตั้งแต่ที่แรก ก็น่าจะเป็นข้อที่น่าคิดและศึกษาความสัมพันธ์ของ antipodal กับ endosperm ต่อไปได้อย่างหนึ่ง

พุทธรักษาได้แสดง polarity แบบ endoscopic polarity

คล้ายกับพืชชั้นสูงทั่ว ๆ ไปของ Tracheophyte บางชนิด เช่นจำพวกไม้ดอก และจำพวก gymnosperms คือเมื่อ zygote แบ่งตามขวางให้เซลล์สอง เซลล์คือ terminal cell อยู่ทางปลายบนและ basal cell อยู่ทางด้าน ฐาน Terminal cell ซึ่งเป็นอันที่หันเข้าสู่ด้านในจะแบ่งตัวเจริญเติบโตต่อไป ให้ส่วนต่าง ๆ ของ embryo คือ plumule (embryonic bud) , cotyledon, caulicle (embryonic stem) และ radicle (embryonic-root) พวก Selaginella และ Isoetes มี polarity เป็นแบบ endoscopic polarity เช่นเดียวกัน แต่แตกต่างกับ Tracheophyte จำพวกไม้ดอกและจำพวก gymnosperms เล็กน้อยคือ เมื่อ zygote แบ่งตามขวางให้สองเซลล์ สำหรับ Isoetes เซลล์ที่เทียบเท่ากับ terminal cell ในพืชชั้นสูงจะเจริญเติบโตแบ่งตัวให้เฉพาะลำต้นกับใบเท่านั้น แต่ root และ foot เกิดจากเซลล์ซึ่งเทียบเท่ากับ basal cell ของไม้ดอก Isoetes ไม่มี suspensor (Foster & Gifford Jr. , 1959) ส่วน Selaginella คล้ายคลึงกับพืชชั้นสูงแบ่งส่วนประกอบของ embryo จะไม่เหมือนกันกับพืชชั้นสูงในขั้นปลาย แต่มีหลักคล้าย ๆ กับพุทธรักษาบางคือ เมื่อ zygote แบ่งตัวได้สองเซลล์แล้ว เซลล์อันที่เทียบเท่ากับ basal cell ในพืชชั้นสูงจะเจริญเติบโตให้ suspensor ส่วนเซลล์ที่เทียบเท่ากับ terminal cell จะเจริญให้ stem, leaf ,root และ foot(Foster & Gifford, Jr.,1959) Endoscopic polarity ใน Tracheophyte จำพวกพืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่ค่อยแบ่งเฉพาะลงไปว่า terminal cell จะต้องเจริญเติบโตแบ่งตัวให้ embryo และ basal cell จะต้องเจริญเติบโตให้ suspensor เท่านั้น อาจจะแตกต่างกันบ้าง เช่น endoscopic polarity ในพืชจำพวก Luzula forsteri ใน family Juncaceae ส่วน basal cell เจริญให้บางส่วนของ root cap และ periblem ส่วน terminal cell เจริญให้ส่วนอื่น ๆ ของ embryo ใน Sagittaria sagittifolia ใน

family Liliaceae Basal cell ไม่ได้แบ่งตัวอีกแต่ได้ขยายใหญ่ขึ้นมาก เป็น suspensor และ suspensor อีกบางส่วนอาจจะได้มาจากบางเซลล์ของ terminal cell ส่วนอื่น ๆ คือ ราก ลำต้น plumule และ cotyledon เกิดจากterminal cell ทั้งสิ้น (Maheshwari , 1950)

กล้ายในพุทธรักษา

น้ำยา Petrunkevitsch's Fluid เหมาะที่จะใช้ fix ovary หรือ ovule ของพุทธรักษาได้ดีกว่า FAA เพราะ Petrunkevitsch's Fluid มีส่วนผสมของสารเคมีนอกเหนือจาก FAA คือ nitric acid และ mercuric chloride อาจจะเป็นเพราะ mercuric chloride สามารถซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เร็ว และทำให้ protein และ nucleic acid ตกตะกอนได้ดี ทำให้เห็นส่วนต่าง ๆ ปรากฏชัดเจนขึ้น กว่าน้ำยา fixative ที่ละลายและเอาส่วนประกอบภายในของเซลล์ออกไป ส่วน nitric acid เป็นตัวช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปยังเนื้อเยื่อได้ยิ่งขึ้น (Johansen , 1940) ทำให้เนื้อเยื่อภายในได้รับ fixative โดยเร็ว ซึ่งจะสามารถป้องกันมิให้มีการเปลี่ยนสภาพเซลล์เปื่อยยุ่ยไป

Material ที่นำมาศึกษาส่วนต่าง ๆ ของ embryo อายุ 22 วัน หลังการถ่ายละอองเรณู ได้พบว่าที่ใช้ Modified Navashin Fluid ดีกว่าที่ใช้ Petrunkevitsch's Fluid อาจจะเป็นเพราะModified Navashin Fluid ประกอบด้วย chromic acid เป็นสารสำคัญ Chromic acid มีสมบัติตกตะกอนโปรตีน nucleic acid ได้ดี และตะกอนนี้ไม่ละลายในน้ำด่าง (Johansen , 1940) และอาจเนื่องจาก Modified Navashin Fluid ที่ใช้มี formalin ซึ่งเป็น fixative ที่ดีอย่างหนึ่งอยู่ด้วยก็ได้