

การเกิดและเจริญเติบโตของคัพภะส้มเขียวหวาน

Studies on the Formation and Development of Tangerine's Embryos

วัฒนา เสถียรสวัสดิ์ และ รวี ภัคดีกุลสัมพันธุ์

Vatana Satiansavat and Ravee Pachdikulsumpun

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

Tangerine flowers arises from terminal as well as lateral buds. The flowers are of perfect and solitary types. The inflorescences arrange cymosely from the terminal branch with 4—6 petals, 5 sepals, 16—24 stamens and 10—14 carpels. Each carpel consists of 4—5 ovule arranged as crassinucellate type. The ovule are anatropous with 2 layers of integument and arranged in the way of axile placentation.

The anther consists of two lobes, with two locules in each lobe. The microspore tetrad has tetrahedral arrangement and appears as binucleated pollen.

The megaspore tetrad has linear arrangement. The embryo sac develops normally or as the polygonum type in the ovule.

The receptive time for stigma is 2—3 days before blooming, and double fertilization occurs 4 days after pollination. The zygote divides 45 days after fertilization and develops into gametic embryo at about the same time as nucellar embryo development which taken place near the micropylar end. The endosperm develops as the nuclear type.

The largest embryo may be either nucellar or gametic embryos. If the nucellar embryo quickly develops and becomes large the gametic embryo may degenerate.

The reasons of polyembryo formation in tangerine are:—

- Cleavage of zygote or fission of gametic embryo.
- There are two embryo sac in one ovule and both embryo sacs develop into gametic embryo.
- nucellus cell divides into nucellar embryo.
- budding of nucellar embryo.

ส้มเขียวหวานเป็นไม้ผลที่ปลูกกันมากในเขตร้อนและกึ่งร้อน โดยมีถิ่นกำเนิดอยู่ในบริเวณตอนใต้ของจีนและหมู่เกาะมลายู (2, 19) เชื่อกันว่าชาวจีนนำพันธุ์ส้มเขียวหวานเข้ามาปลูกในประเทศไทยเมื่อประมาณร้อยกว่าปีมาแล้ว (2, 4) และทำรายได้ให้ชาวสวนเป็นอย่างดี จนมีการปลูกแพร่หลายไปทุกภาคของประเทศไทย แม้ประเทศไทยจะมีการปลูกส้มเขียวหวานกันอย่างแพร่หลาย แต่ก็ยังไม่มีรายงานการศึกษ

มากร้อยกว่าปีมาแล้ว (2, 4) และทำรายได้ให้ชาวสวนเป็นอย่างดี จนมีการปลูกแพร่หลายไปทุกภาคของประเทศไทย แม้ประเทศไทยจะมีการปลูกส้มเขียวหวานกันอย่างแพร่หลาย แต่ก็ยังไม่มีรายงานการศึกษ

เกี่ยวกับดอกและพัฒนาการของดอกหรือผลเลย การศึกษาทางด้านpolyembryonyนั้นว่ามีน้อย แต่ปัจจุบันในต่างประเทศมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ nucellar seedling เป็นอันมาก ลักษณะที่ดีของ nucellar seedling ก็คือ มีส่วนประกอบทางพันธุกรรมเหมือนกับแม่ทุกประการ (9, 11, 20) ทั้งนี้ เพราะเกิดจาก somatic cell ของต้นแม่ ผลมีคุณภาพสูง อายุการตกดอกสั้นกว่าต้นแม่ หรือ old clone และให้ผลผลิตสูงขึ้น (6, 7, 8, 9, 13, 20) มีลักษณะ neophysis คือรวมเอาความแข็งแรง (vigor) ที่เสียไปในระหว่างการขยายพันธุ์แบบ vegetative มาเป็นเวลานานกลับคืนมา (6, 9, 13, 14, 15) และเป็นต้นกล้าที่ปราศจากโรคไวรัส ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีและสำคัญ (6, 8, 9, 15, 20) เพราะโรคไวรัสนี้เป็นโรคที่ร้ายแรงมาก (17, 19) ด้วยเหตุนี้การศึกษาถึงการเกิดและพัฒนาการของการมีคัพพะหลายอัน (origin and development of polyembryony) ของส้มเขียวหวาน เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่มีอยู่เดิมให้ดียิ่งขึ้น เช่น การหาต้นตอที่ต้านทานโรค การคัดเลือกต้นกล้าที่ปราศจากโรคไวรัส ซึ่งนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการปลูกส้มเขียวหวานในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการศึกษาทางกายวิภาคของจุดกำเนิดดอกการเจริญของคัพพะ (embryo) และจุดกำเนิดของ polyembryony ในเมล็ดส้มเขียวหวาน โดยเก็บตัวอย่างตาดอกส้มเขียวหวานตั้งแต่เริ่มเป็นดอกจนถึงดอกบานและเริ่มติดผล จนถึงผลอายุประมาณ 50 วัน ในระยะต่าง ๆ กัน ในน้ำยา FAA (formalin-acetic alcohol) และตัด section ที่เตรียมขึ้นโดย paraffin

embedding method (10, 21) ด้วย rotary microtome ทำการบันทึกภาพแสดงการเกิด และพัฒนาการของคัพพะในระยะต่าง ๆ แล้วศึกษารายละเอียดที่ปรากฏในภาพประกอบผลการทดลอง

ผลการทดลอง

ดอกส้มเขียวหวานเป็นดอกเดี่ยว (solitary) มีข้อดอกจัดเรียงแบบ cymose ลักษณะดอกเป็น superior ovary ตัวดอกตั้งอยู่บนฐานรองดอก (receptacle) ซึ่งเกิดจากก้านดอก (peduncle) ที่ขยายใหญ่ขึ้น มี sepal สีเขียวขนาดเล็ก 5 กลีบ เชื่อมติดกับส่วนฐาน ปลายแยกจากกัน ส่วน petal สีขาว มีจำนวน 4-6 กลีบ กลุ่มเกสรตัวผู้ (androecium) ประกอบด้วย stamen ซึ่งมีสีเหลืองติดกับส่วนปลายของ filament สีขาว ในหนึ่งดอกจะมี anther ประมาณ 16-24 อัน ชั้นในสุดเป็นชั้นของกลุ่มเกสรตัวเมีย (gynoecium) ซึ่ง pistil ประกอบด้วย stigma และ style สีเหลืองอ่อน และ ovary สีเขียว ovary ตั้งอยู่บน floral disk ประกอบด้วย carpel ระหว่าง 10-14 อัน ใน 1 carpel มี 1 locule ภายใน carpel จะพบ ovule เกาะติดอยู่กับแถบกลางเป็น 2 แถว สำหรับ style และ stigma นั้น พบว่ามี stylar canal ต่อจาก stigma ผ่านลงมายัง style จนถึง carpel

จุดกำเนิดของดอก (floral primordium) เกิดที่บริเวณส่วนปลายกลีบอ่อนเป็นตาดอกยอดและเกิดที่ leaf axil เป็นตาดอกข้าง และเจริญกลายเป็น calyx lobe หุ้มปิดข้อเยื่อส่วนกลาง (central primordium) ไว้ (รูปที่ 1, 2) ในระยะนี้เมื่อเยื่อส่วนกลางจะโค้งนูนเป็นรูปครึ่งวงกลมและ primordium ของ corolla จะ differentiate ชั้นที่ axil ของ calyx lobe (รูปที่ 3) ต่อมาจะเห็น primordium ของ stamen เกิดขึ้นที่

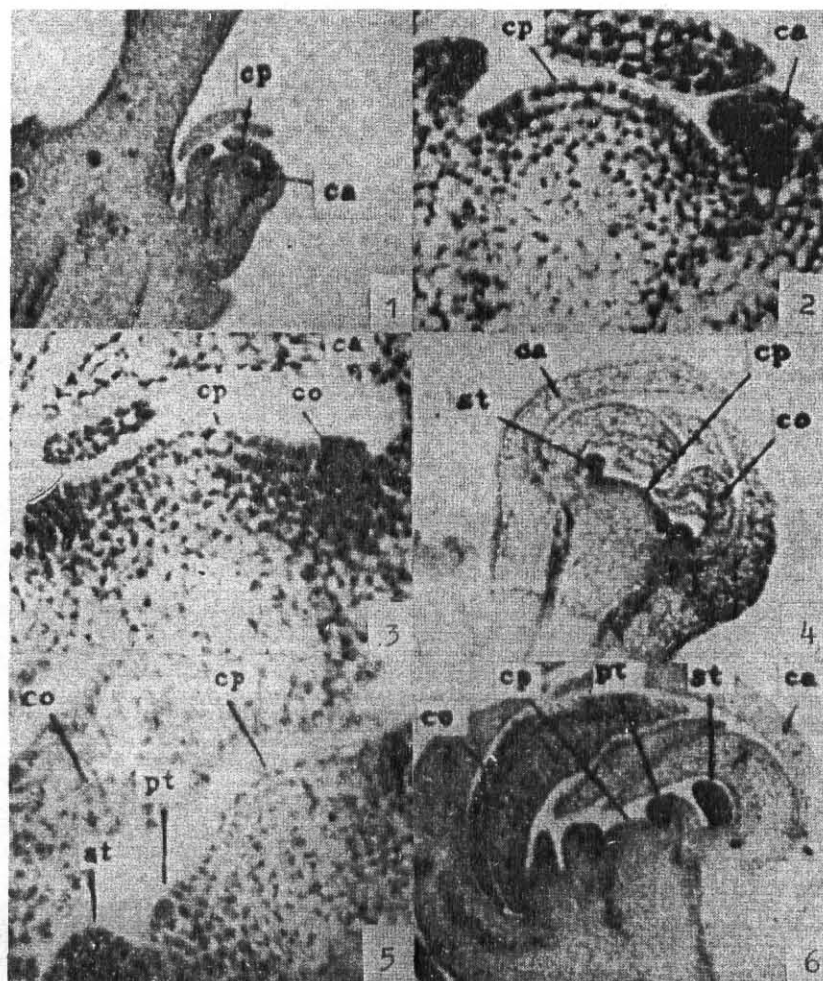


Fig. 1-6. Thin section แสดง 1) ดาดอกส้มเขียวหวาน (ตัดตามยาว) แสดงให้เห็น central primordium (cp) และจุดกำเนิดของ calyx (ca) 52 $\times$. 2) ดาดอกส้มเขียวหวานจากรูปที่ 1 ขยายใหญ่ขึ้น 270 $\times$. 3) Primordium ของ corolla (co) และเกิดขึ้นที่ axil ของ calyx lobe (ca) 270 $\times$. 4) Primordium ของ stamen (st) เกิดขึ้นที่ axil ของ corolla (co) 52 $\times$. 5) Primordium ของ pistil (pt) เกิดขึ้นที่ axil ของ stamen (st) 270 $\times$. 6) primordium ของ pistil (pt) เจริญยืดยาวขึ้น 52 $\times$.

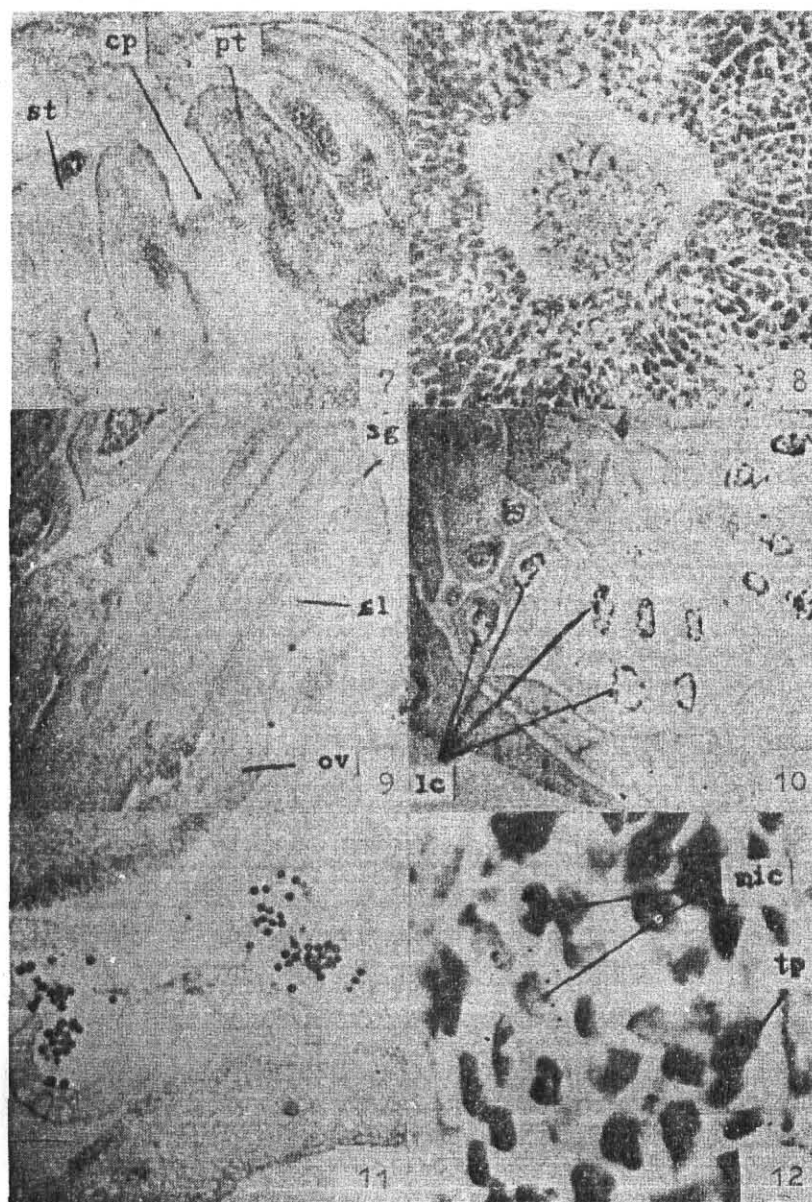


Fig. 7—12. Thin section แสดง 7) Protuberance ของ pistil (pt) เจริญยืดยาวต่อไปอีก 52 ×. 8) Pistil ที่ตัดตามขวางแสดงให้เห็นลักษณะเป็นกลีบ ๆ คล้ายนิ้วมือ (finger-like) ซึ่งจะเจริญขึ้นมาเป็น carpel ของ ovary 270 ×. 9) ส่วนของ pistil เจริญขึ้นกลายเป็น ovary (ov), style (sl) และ stigma (sg) 52 ×. 10) Anther ของดอกอ่อนที่มี microsporangium เป็น 4 locule (lc) 52 ×. 11) Anther ของดอกส้มเขียวหวานก่อนดอกบาน 1 วัน มี 2 locule รวมกันเป็น pollen sac อันเดียว 52 ×. 12) Anther ของดอกส้มเขียวหวานอายุประมาณ 6 วัน แสดงให้เห็นถึง microspore mother cell (mic) และ tapetal cell (tp) 770 ×.

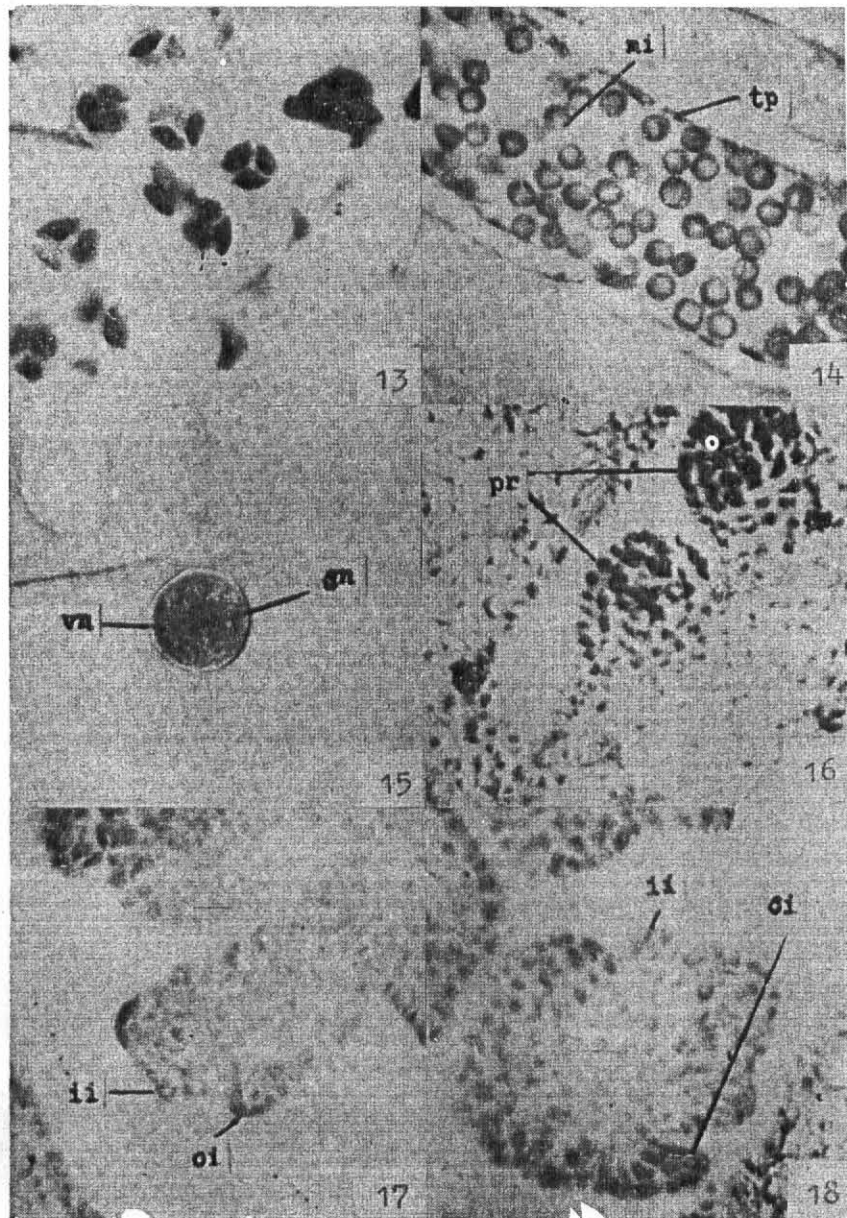


Fig. 13—18. Thin section แสดง 13) Anther ของดอกส้มเขียวหวานอายุประมาณ 8 วัน แสดงถึง microspore tetrad ที่เกาะกันเป็นรูป tetrahedral $770\times$. 14) Anther ของดอกส้มเขียวหวานอายุประมาณ 10 วันแสดงถึง microspore (mc) และ tapetal cell (tp) ที่กำลังขยายตัว $770\times$. 15) Binucleate pollen ในดอกส้มอายุประมาณ 12 วันแสดงถึง vegetative nucleus (vn) และ generative nucleus (gn) $770\times$. 16) Protuberance (pr) ของ ovule ที่โป่งนูนออกจากผนังของ placenta ในดอกอายุประมาณ 8 วัน $300\times$. 17) ลักษณะ ovule ที่โค้งงอและห้อยหัวลง และแสดงถึงจุดกำเนิดของ outer integument (oi) และ inner integument (ii) $270\times$. 18) ลักษณะของ ovule ที่โค้งงอมากขึ้น $270\times$.

axil ของ corolla (รูปที่ 4) หลังจาก primordium ของ stamen เกิดได้ไม่นานจะเกิด primordium ของ pistil และแปรรูปเป็น protuberance ของ carpel initial ขึ้นที่รอบๆเยื่อส่วนกลาง (รูปที่ 5) ในระยะนี้ชั้นของ corolla เจริญขึ้นมาจนซ้อนทับกัน protuberance ของ carpel จะเจริญยืดยาวขึ้น (รูปที่ 6, 7) ภายในมีลักษณะเป็นกลีบๆ หรือเป็นคลื่น (รูป 8) ต่อมาส่วนล่างของ carpel initial จะขยายตัวออกกลายเป็น ovary ซึ่งต้นโผล่พ้น calyx lobe ออกมา ส่วนที่ยืดยาวออกนี้จะกลายเป็น style และ stigma (รูปที่ 9)

Microsporogenesis and Pollen Development.

จาก section ที่ตัดตามขวางของดอกส้มเขียวหวาน อายุประมาณ 8 วัน หลังจากปรากฏออกมา พบว่า anther แต่ละอันจะแยกได้เป็น 2 lobes แต่ละ lobe ประกอบด้วย 2 locules รวมเป็น 4 locules (รูปที่ 10) แต่ละ locule จะพัฒนาขึ้นเป็น microsporangium ในระยะจวนจะถึง anthesis ในแต่ละ lobe ของ anther นั้น microsporangium 2 อัน จะรวมตัวกันเป็น pollen sac อันเดียว (รูปที่ 11)

เมื่อดอกมีอายุ 6-7 วัน พ้นจากขนาดที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จะพบ sporogenous tissue อยู่ภายใน sporangium ซึ่งต่อมากลายไปเป็น microspore mother cell (รูปที่ 12) เป็นเซลล์ที่มองเห็น nucleus ชัดเจน ในระยะนี้จะพบ tapetal cell ปรากฏขึ้นรอบๆ locule

ต่อจากนั้น microspore mother cell จะแบ่งตัวแบบ meiosis กลายเป็น microspore dyad และ microspore tetrad ตามลำดับ ต่อมา microspore tetrad จะเกาะกันเป็นรูป tetrahedral (รูปที่ 13)

หลังจากนั้นจะแยกตัวจากกันกลายเป็น microspore (รูปที่ 14) และพัฒนาขึ้นเป็น pollen grain ซึ่งในระยะนี้ tapetal cell เริ่มสลายตัวแล้ว ก่อนดอกบานนั้น pollen grain จะเป็น binucleate pollen (รูปที่ 15) ประกอบด้วย nucleus อันใหญ่ ซึ่งจะเป็น vegetative nucleus ส่วนอันเล็กจะเป็น generative nucleus

Ovule Development, Megasporegenesis, Embryo Sac Development. ในระยะแรกๆ นั้น ผังของ placenta จะเริ่มนูน (protuberance) (รูปที่ 16) และเจริญเอียงลงมาทางด้านล่างแล้วโค้งงอขึ้น ในระยะนี้จะพบจุดกำเนิดของ integument เป็นปุ่มเล็กๆ (รูปที่ 17) outer integument ด้านที่ติดกับ placenta จะรวมกับ funiculus ตั้งแต่เริ่มมี differentiation ของ integument (รูปที่ 18, 19) ระยะต่อมา integument ทั้งสองชั้นจะเจริญขึ้นมาหุ้มส่วนของ nucellus จนเหลือเป็นช่องเล็กๆ เรียกว่า micropyle ใน ovule ที่พัฒนาเต็มที่แล้ว จะหันเอาด้าน micropyle เข้าหา placental tissue (รูปที่ 20) ลักษณะของ ovule แบบนี้เรียกว่า anatropous ovule

เมื่อดอกมีอายุประมาณ 14 วัน นับจากขนาดที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จะสังเกตเห็น mother cell เกิดขึ้นที่กลาง nucellus เป็นเซลล์ข้างเคียงและมี nucellus ใหญ่เห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 21) ovule ของส้มเขียวหวานจัดเป็นแบบ crassinucellate type ของ nucellus (มี parietal tissue ที่เจริญได้ดีและ megaspore mother cell แยกออกจาก nucellar epidermis โดยมีเซลล์หนึ่งหรือหลายเซลล์กั้นอยู่) ต่อมาเกิดการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ได้ megaspore dyad และ megaspore tetrad ตามลำดับ megaspore tetrad มีการเรียงตัวแบบ linear megaspore (รูปที่ 22) ซึ่งจะ

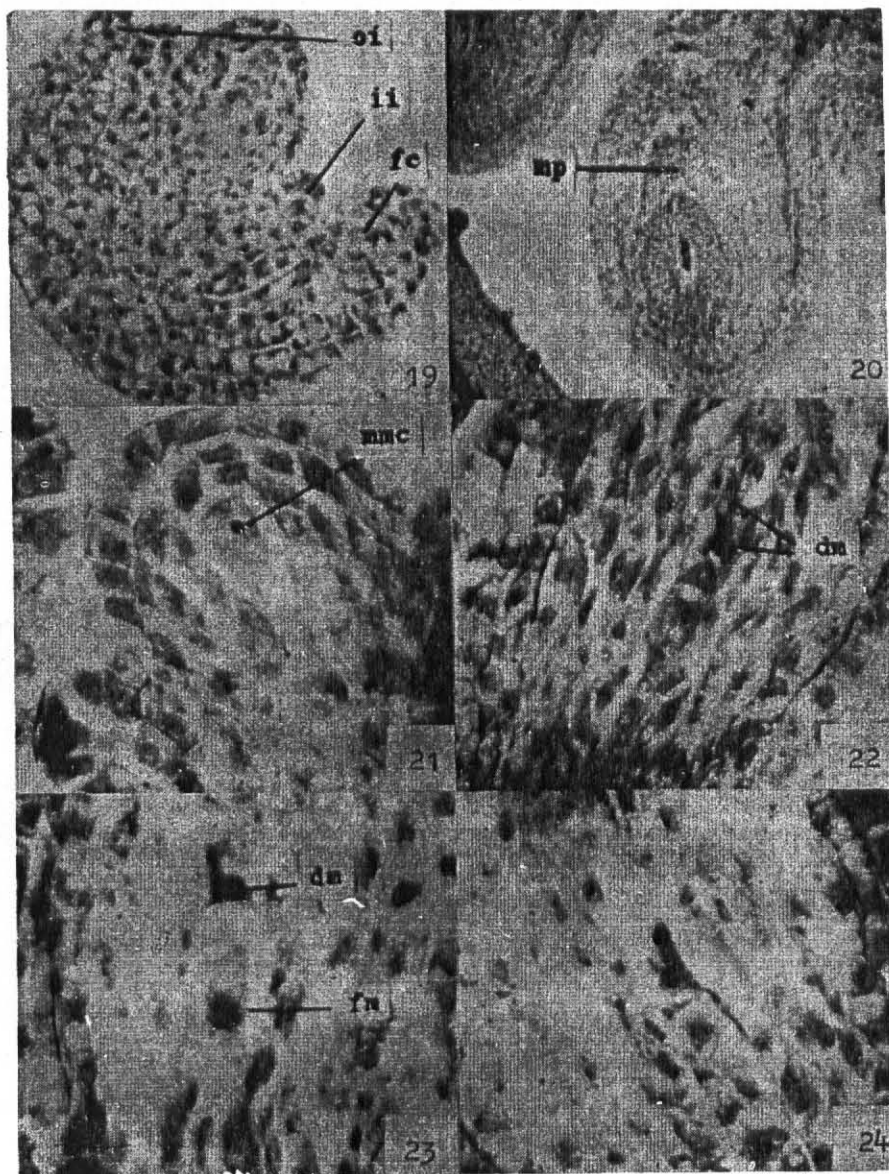


Fig. 19—24. Thin section แสดง 19) Integument ทั้งสองชั้นเจริญขึ้นมาหุ้ม nucellus และ outer integument ด้านที่ติดกับ placenta จะรวมกับ funiculus (fc) เป็นเนื้อเดียวกัน $270\times$. 20) Ovule หลังจากดอกบาน 1 วันแสดงถึง integument ทั้งสองชั้นเจริญขึ้นมาหุ้มส่วนของ nucellus จนหมดเหลือแต่ช่อง micropyle (mp) $52\times$. 21) แสดง megaspore mother cell (mmc) ในดอกส้มเขียวหวานอายุประมาณ 16 วัน $710\times$. 22) แสดง linear tetrad ของ megaspore 3 อันที่อยู่ทางด้าน micropyle จะ degenerate ไป (dm) $710\times$. 23) แสดง functional megaspore (fm) ที่ขยายใหญ่ขึ้นและ megaspore 3 อันที่อยู่ทางด้าน micropyle (dm) สลาย ตัวไป $710\times$. 24) แสดง two—nucleate stage embryo sac $710\times$.

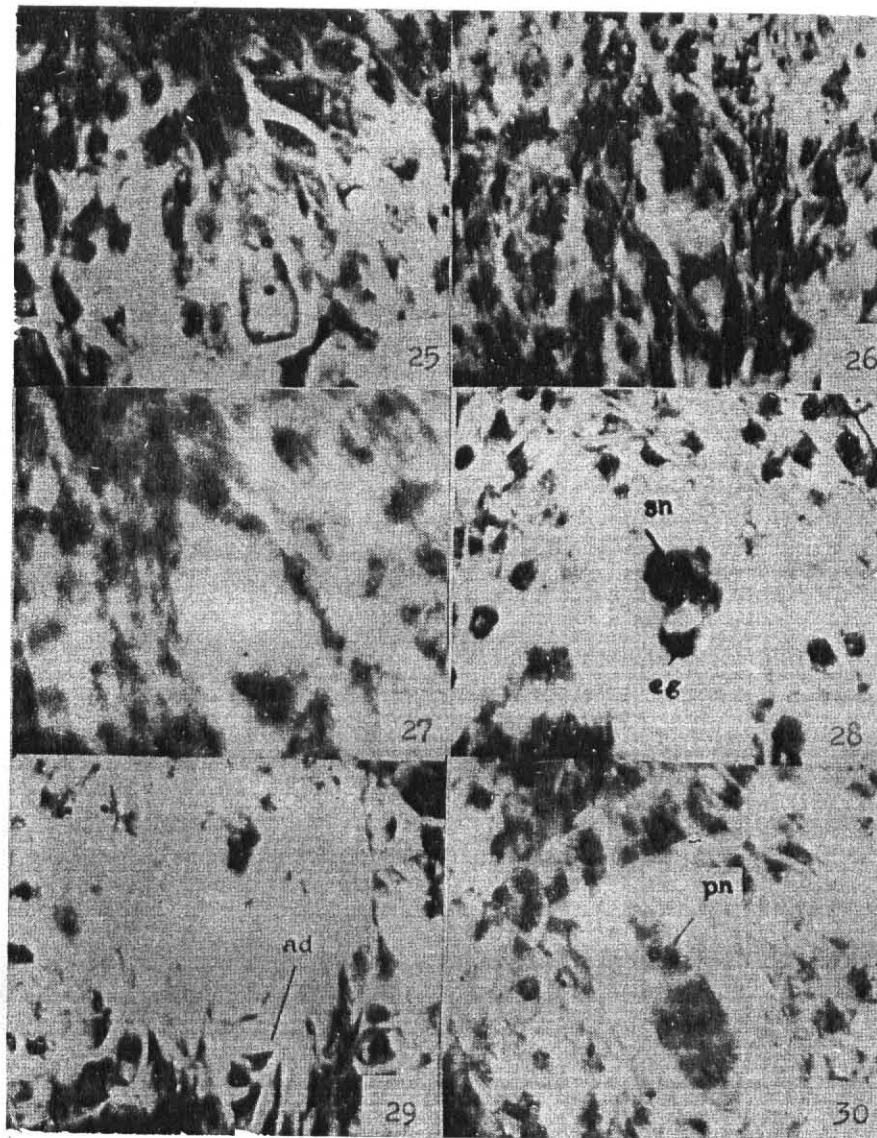


Fig. 25 — 30. Thin section แสดง 25) Two — nucleate stage embryo sac 770 $\times$. 26) แสดงถึง 2 nuclei ที่เคลื่อนที่ไปอยู่ คนละขั้วของ embryo sac 770 $\times$. 27) แสดงถึง four — nucleate stage embryo sac 770 $\times$ 28) Egg apparatus ที่ประกอบด้วย egg nucleus (eg) และ synergids (sn) 2 nuclei ที่อยู่ด้าน micropyle 770 $\times$. 29) Antipodals (ad) 3 nuclei ที่อยู่ด้าน chalaza 700 $\times$. 30) แสดงถึง polar nuclei (pn) ที่อยู่บริเวณตรงกลาง 770 $\times$.

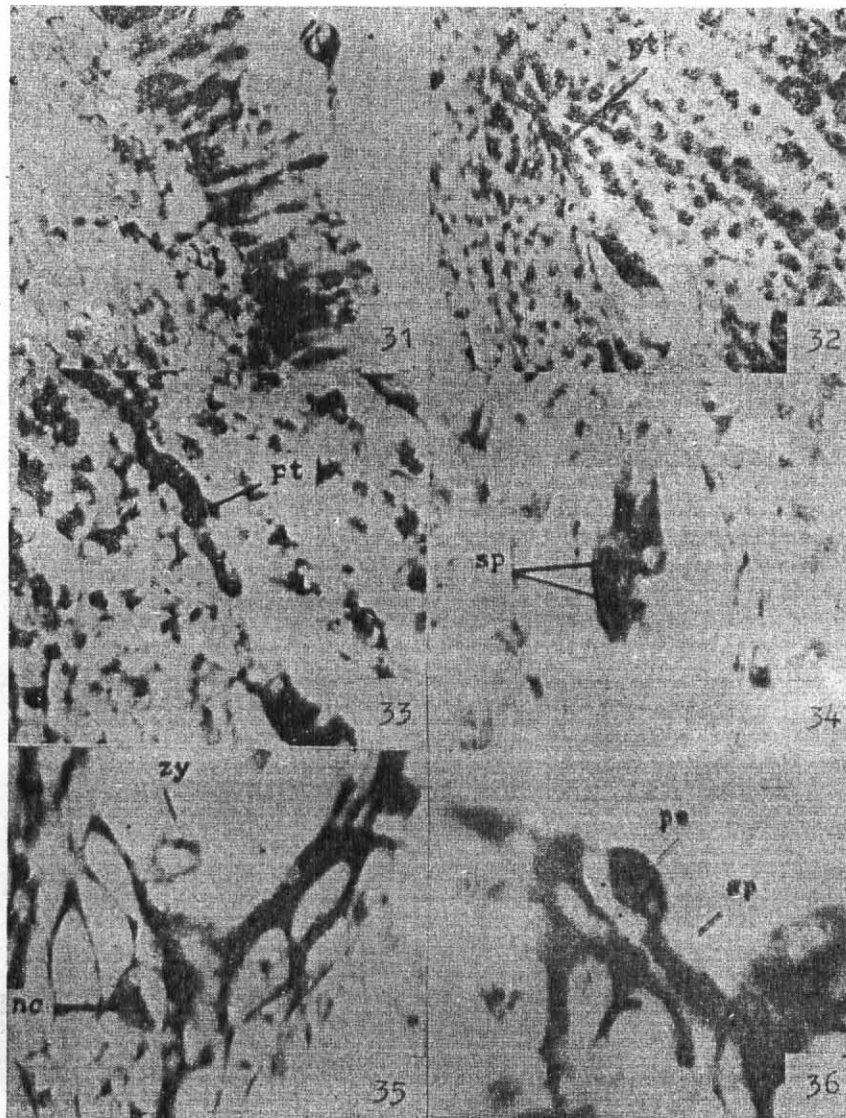


Fig. 31 – 36. Thin section แสดง 31) Pollen กำลังงอก tube บน stigma ในวันที่เกิด pollination 300 x. 32) Pollen tube (pt) กำลังผ่าน micropyle ก่อนจะเกิด fertilization 300 x. 33) Pollen tube กำลังผ่าน micropyle ขยายใหญ่ขึ้น 710 x. 34) Double fertilization เกิดขึ้นหลังจาก pollination ประมาณ 4 วันแสดง sperm nucleus (sp) ทั้งสองอันก่อนเข้าผสมกับ egg nucleus และ polar nuclei 710 x. 35) Zygote (zy) อายุประมาณ 40 วัน หลังจาก fertilization และแสดง nucellus (nc) ที่มี cytoplasm เข้มข้นมาก 710 x. 36) ขนาดผลอายุประมาณ 45 วันหลังจาก fertilization แสดง zygote ที่แบ่งได้หลาย เซลล์ กลายเป็น proembryo (pe) และ suspensor (sp) 710 x.

มีเพียงเซลล์เดียวอยู่ทางด้าน chalaza ที่จะกลายเป็น functional megaspore โดยอีก 3 เซลล์ที่เหลือจะสลายตัวไป (รูปที่ 23) functional megaspore นี้จะเจริญเป็น female gametophyte โดยที่เซลล์จะขยายขนาดออกไปเป็นรูปไข่ ด้านส่วนของ nucellus ให้กว้างขึ้น และกลายเป็น one nucleate embryo sac ต่อมา nucleus จะแบ่งตัวแบบ mitosis ได้ 2 nuclei (รูปที่ 24, 25) ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปอยู่คนละขั้วของ embryo sac ทางด้าน micropyle และ chalaza (รูปที่ 26) จาก 2 nuclei นี้จะแบ่งแบบ mitosis อีก 2 ครั้งได้เป็น four nucleate stage (รูปที่ 27) และ eight nucleate stage ตามลำดับ ที่ปลายด้าน micropyle จะมี 3 nuclei จับกันเป็น egg apparatus ซึ่งประกอบด้วย egg nucleus ที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 nuclei ที่อยู่ข้างๆ หรือ synergids (รูปที่ 28) egg nucleus มักถูก synergids บังไว้ทำให้มองเห็นได้ไม่ชัด ส่วนปลายด้าน chalaza นั้นมีกลุ่มของ 3 nuclei หรือ antipodals (รูปที่ 29) nucleus ที่อยู่ทางด้าน micropyle 1 อัน และทางด้าน chalaza อีก 1 อัน ที่เคลื่อนที่มาบริเวณตรงกลางของ embryo sac (รูปที่ 31) รวมกันเป็น polar nuclei ซึ่ง nuclei ทั้ง 8 อันนี้ไม่สามารถจะพบได้ใน 1 section ทั้งนี้เพราะ nuclei เหล่านี้ไม่ได้อยู่ใน plane เดียวกับ embryo sac ที่มีการเกิดและเรียงตัวของ nuclei แบบนี้เรียกว่า monosporic light nucleate embryo sac ของ polygonum type หรือ normal type

การถ่ายละอองและการผสมเกสรของส้มเขียวหวาน จากการศึกษาดอกร่วมส้มเขียวหวานพบว่า stigma จะเริ่มทำหน้าที่ก่อนดอกบาน 2-3 วัน โดยสังเกตเห็นว่ามีส่วนของเหลวเหนียว แต่ anther ยังไม่แตก (non-dehiscent) pollen shed ในระยะ

anthesis โดยมีแมลงหลายชนิดช่วยในการถ่ายละอองเกสร ละอองเกสรจะเริ่มงอกหลังจากตกลงบน stigma ภายในวันแรกที่มีการถ่ายละอองเกสร (รูปที่ 31)

double fertilization (รูปที่ 35) เกิดขึ้นหลังจากถ่ายละอองเกสรประมาณ 4 วัน pollen tube จะงอกผ่าน style ลงไปจนถึง ovule แล้วผ่านเข้าทาง micropylar canal (รูปที่ 32,33) เข้าสู่ embryo sac หลังจากการผสมเกสรประมาณ 10-15 วัน primary endosperm nucleus จะมีการแบ่งตัวแบบ mitosis ได้ free nuclei เป็นจำนวนมาก กระจายรอบ embryo sac ตามชั้น cytoplasm ที่มีอยู่เพียงชั้นบางๆ เท่านั้นและไม่มีผนังกัน การเกิด endosperm จัดเป็นแบบ nuclear type ต่อมาจึงมีผนังเปลี่ยนสภาพเป็น cellular state หลังจากการผสมเกสรประมาณ 40-45 วัน (รูปที่ 35) zygote จะมีการแบ่งตัวแบบ mitosis เซลล์ที่ติดกับ micropyle จะเจริญเป็น suspensor ส่วนเซลล์ที่อยู่ด้านในจะเจริญเป็น proembryo (รูปที่ 36) และเจริญเข้าไปใน embryo sac เพื่อใช้อาหารจาก endosperm ในการแปรรูปไปเป็นส่วนต่างๆ ของคัพภะจนถึงโตเต็มที่

ลักษณะการเกิด polyembryony ในส้มเขียวหวานนั้น พบว่าเกิดได้ 4 ทาง คือ

1. เกิดจากการมี 2 embryo sac ใน 1 ovule (รูปที่ 37)
2. อาจเกิดจาก fission ของ proembryo (รูปที่ 38) หรืออาจเกิดจาก cleavage ของ zygote (รูปที่ 39)

ในทั้งสองกรณีนี้พบว่าเป็น gametic embryo ทั้งสิ้น

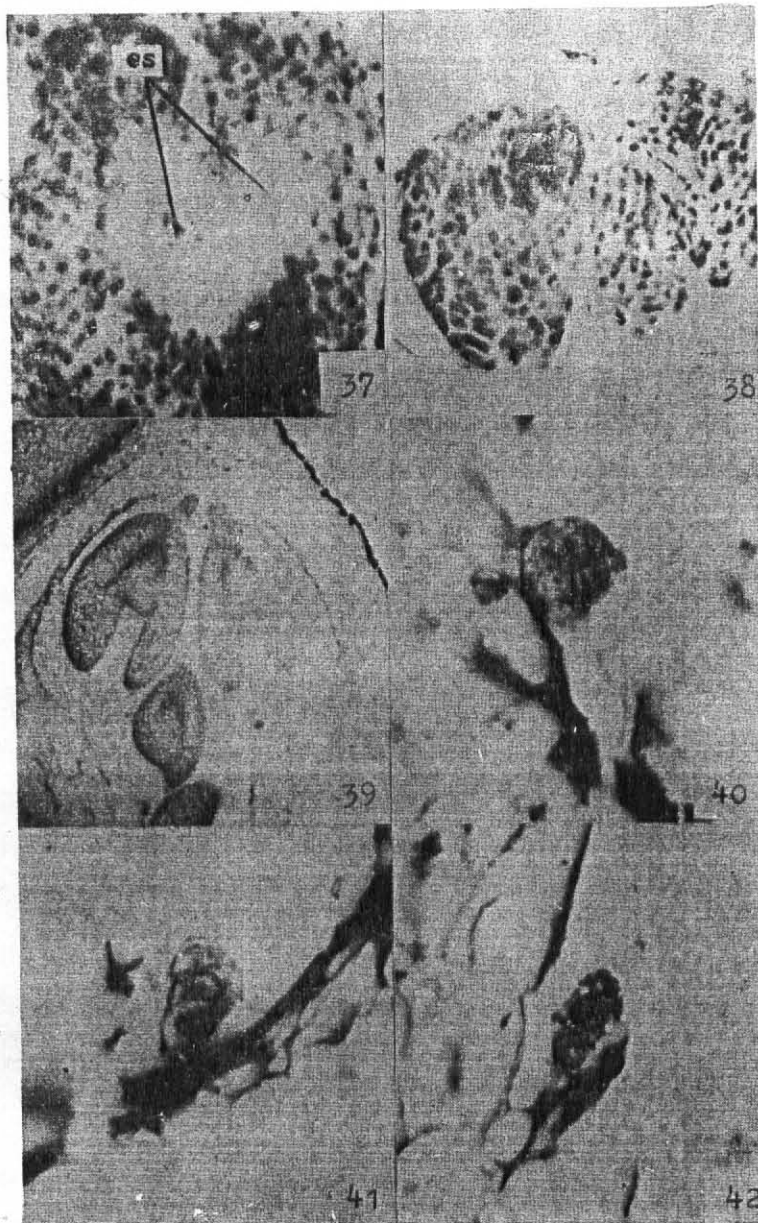


Fig. 37—42. Thin section แสดง 37) การมี 2 embryo sac (es) ใน 1 ovule 300 ×. 38) แสดง fission ของ gametic embryo ที่พบในเมล็ดอ่อนอายุประมาณ 5 เดือน 270 ×. 39) แสดง embryo ที่มีแนวโน้มว่าจะเกิดจาก cleavage ของ zygote 52 ×. 40, 41, 42) แสดง nucellar embryo (ne) กำลังมีการแบ่งเซลล์ในผลที่มีอายุประมาณ 45 วัน หลังจาก fertilization 710 ×.

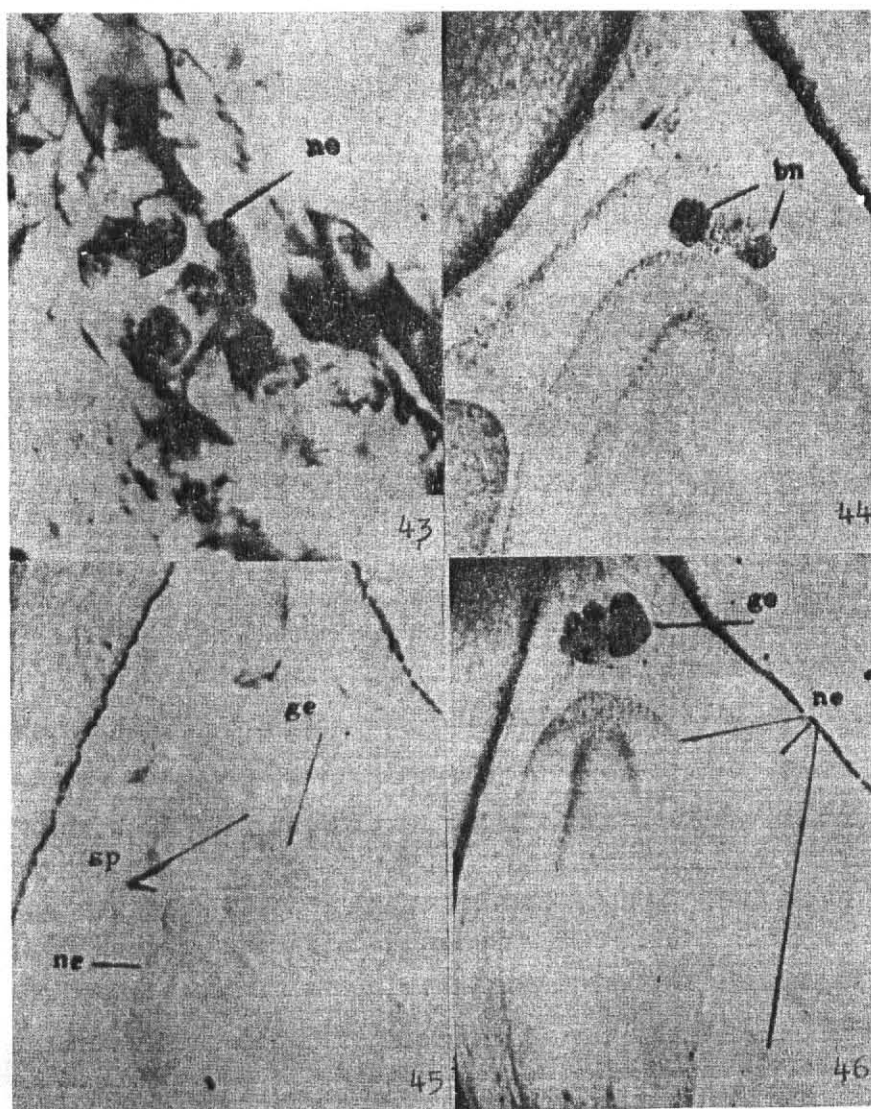


Fig. 43 — 46. Thin section แสดง 43) Nucellar embryo (ne) ที่แบ่งตัวจนได้หลายเซลล์ 710 $\times$. 44) แสดง budding (bn) ของ nucellar embryo ในเมล็ดอ่อนอายุประมาณ 5 เดือน 52 $\times$. 45) แสดง ตำแหน่งของ gametic embryo (ge) ที่อยู่ตรงบริเวณ micropyle และการมี suspensor ของ nucellar embryo (ne) และอยู่ทางด้านข้าง ของ embryo sac 52 $\times$. 46) แสดง nucellar embryo (ne) ที่มีขนาดใหญ่ แต่ gametic embryo (ge) ยังมีขนาดเล็กอยู่และอาจ degenerate ไปในที่สุด 52 $\times$.

3: เกิดจาก somatic cell ของ ovule (รูปที่ 40, 41, 42, 43) เรียกว่า nucellar embryo

4. อาจเกิดจาก budding ของ nucellar embryo ก็ได้ (รูปที่ 44)

ในการศึกษาครั้งนี้พบ suspensor ทั้งใน gametic embryo และ nucellar embryo (รูปที่ 45) จากการที่ nucellar embryo มี suspensor นี้จะทำให้การวินิจฉัยว่าคัพพะได้เป็น nucellar embryo ลำบากยิ่งขึ้น ต้องใช้เฉพาะตำแหน่งที่เกิดของคัพพะในระยะแรกเท่านั้น อันที่จะเป็น gametic embryo จะต้องมี suspensor ต่อทอดจาก micropyle ลงมา ส่วน nucellar embryo นั้น suspensor จะมาจากบริเวณอื่นๆ ตามด้านข้างของ embryo sac และอยู่ตอนบริเวณก่อนมาทางด้าน micropyle มากกว่าด้าน chalaza การพัฒนาของคัพพะทั้งสองชนิดนี้อยู่ในระยะที่ใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 45 วัน หลังจากการผสม ในบางกรณีพบว่า nucellar embryo มีการเจริญเติบโตรวดเร็วและมีขนาดใหญ่กว่า gametic embryo มาก (รูปที่ 46) ลักษณะเช่นนี้เมื่อ ovule เจริญเต็มที่แล้วเชื่อว่า gametic embryo จะสลายตัวไป

วิจารณ์

ดอกส้มเขียวหวานที่เจริญจากตาข้างใน บริเวณส่วนต่างๆ ของกิ่งอ่อนนั้น มักจะเกิดเป็นดอกเดี่ยว ส่วนดอกที่ปลายมักเกิดเป็นช่อดอกแบบ cymose (18)

การกำเนิดของส่วนต่างๆ ของดอกเรียงลำดับจากชั้นนอกสุดเข้าไปชั้นในสุด จะเป็นดังนี้ sepal, petal, stamen และ pistil stamen primordium เริ่มเกิดขึ้นในตาดอก นับจากขนาดที่มองเห็นด้วยตาเปล่าประมาณ 4 วัน ส่วน pistil primordium จะเริ่มเกิดหลังจาก stamen primordium ประมาณ 1 วัน

ในขณะที่เริ่มเกิด microspore mother cell นั้น tapetal cell จะเกิดขึ้นอยู่รอบๆ พร้อมกัน อายุของดอกนับจากขนาดที่มองเห็นประมาณ 6-7 วัน พบว่า tapetal cell มีการแบ่งตัวจนมี nuclei 2-3 อัน ส่วน mother cell มีการแบ่งตัวแบบ meiosis เป็น microspore tetrad ซึ่งจับกันเป็นรูป tetrahedral อายุดอกในระยะนี้ประมาณ 10 วัน และจากการตัด section ดูไม่พบระยะ microspore dyad ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะช่วงระยะการแบ่งเซลล์สั้นเร็วมากจนไม่อาจพบได้ ดอกส้มเขียวหวานส่วนใหญ่พบว่า pollen ในดอกเดียวกัน จะมีการพัฒนาขึ้นไม่พร้อมกัน จากการตัด section ดูพบว่า anther บางอัน อยู่ในระยะของ microspore tetrad แต่บาง anther ยังอยู่ในระยะ microspore mother cell ในระยะที่ดอกมีอายุประมาณ 12 วัน พบว่า pollen grain เป็น binucleate pollen แล้ว

พัฒนาการของ ovule นั้นเกิดมาจากเยื่อของ placenta ปลายนอกเมื่อดอกมีอายุประมาณ 8-9 วัน โดยในระยะแรกๆ เซลล์ส่วนใหญ่จะเป็นส่วนของ funiculus และ nucellus integument เริ่มมีจุดกำเนิดขึ้นเมื่อดอกมีอายุประมาณ 12 วัน จากนั้น integument จะเจริญขึ้นมาหุ้ม nucellus ไว้ โดยชั้น inner integument มีเซลล์ 2-3 ชั้น ส่วน outer integument มีเซลล์ 4-5 ชั้น และ outer integument ที่ติดกับ placenta จะรวมกับ funiculus ลักษณะของ ovule จะเป็นแบบ avatropous

pollen จะงอก tube ในวันแรกที่มีการถ่ายละออง การผสมเกสรจะเกิดขึ้นหลังจากการถ่ายละอองประมาณ 4 วัน โดยพบจาก pollen tube ที่กำลังผ่าน micropyle พอดีขณะงอก ฤดูที่เก็บตัวอย่างนี้เป็นฤดูหนาว (ต้นเดือนธันวาคม ที่ อ. ปากช่อง) ส่วนในฤดูร้อนหรือฤดู

ฝน ช่วงระยะเวลาระหว่างการถ่ายละอองจนถึงผสมเกสรนั้นอาจผันแปรไปได้เล็กน้อย โดยเฉพาะในภาคเหนือ นั้น ความแตกต่างของช่วงอุณหภูมิในฤดูร้อนและฤดูหนาวมีมากกว่าในภาคกลาง ทั้งนี้ เนื่องจากอุณหภูมิเป็นตัวการสำคัญในการควบคุมการงอกของ pollen tube

สำหรับการศึกษา embryogenesis นั้น section ที่ตัดในแต่ละช่วง 5 วัน อาจจะนานเกินไป ทำให้ไม่อาจพบระยะ zygote และ nucellus ที่เริ่มแบ่งเซลล์ได้ และขนาดของผลค่อนข้างใหญ่ยากแก่การ embed ทั้งนี้เพราะ paraffin มักจะซึมเข้าไม่ถึงภายใน zygote จะแบ่งเซลล์หลังจากการผสมเกสรแล้ว 40-50 วัน ลักษณะของ polyembryony ในกรณีที่เกิดจาก cleavage เชื่อว่าเกิดขึ้นในระยะก่อนจะเริ่มมีการแบ่งเซลล์ของ zygote จากรายงานของ Cameron และ Garber (5) ได้ศึกษาลูกผสมระหว่าง *Citrus* × *Poncirus* ที่เกิดจาก cleavage ของ zygote นี้จะเป็นลักษณะของ identical twin คือมีส่วนประกอบเหมือนกันทางพันธุกรรม รวมทั้งลักษณะการเจริญเติบโตและทางรูปร่างลักษณะด้วย ถ้าหากเป็นเช่นนั้นจริง cleavage ของ zygote ที่เกิดจากการผสมตัวเองก็ควรจะมัลักษณะของ identical twin ด้วย สำหรับ fission ของ gametic embryo นั้นเป็นการแบ่งตัวของ proembryo ทำให้เกิดได้เป็น 2 หรือ 3 คัพภะ หรือกว่านั้น ส่วนกรณีที่มีจำนวน 2 embryo sac ใน 1 ovule นั้น อาจพบ gametic embryo ได้ 2 คัพภะ สำหรับ polyembryony ที่เป็น nucellar embryo นั้นเกิดจากเซลล์ของ nucellus ที่อยู่รอบๆ embryo sac ก่อนมาทางด้าน micropyle ตรงตามที่ได้มีรายงานไว้ (11, 12, 20, 22) มีการแบ่งเซลล์จนได้หลายคัพภะ ในกรณีของส้มเขียวหวานนี้พบอีกลักษณะหนึ่งคือ budding

ของ nucellar embryo ด้วย ซึ่งอาจจะเกิดเป็นคัพภะได้ เนื่องจากพบ budding นี้ใน nucellar embryo ที่มีขนาดโตแล้ว จึงเชื่อได้ว่าส่วนที่เจริญออกมาจะไม่อาจพัฒนาต่อไปจนเป็นคัพภะที่สมบูรณ์ได้

โดยปกติ nucellar embryo ในส้มจะไม่มี suspensor (11, 20) แต่สำหรับส้มเขียวหวานจาก section ของเมล็ดอายุ 5 เดือน พบว่ามี suspensor ใน nucellar embryo ด้วย ซึ่งตรงกับรายงานของ Maheshwari และ Ranga Swamy (12) ที่ได้ศึกษาใน *Citrus microcarpa* จากการพบ suspensor ของคัพภะในส้มทั้งสองชนิดนี้ ทำให้เข้าใจว่าลักษณะของการมี suspensor ใน nucellar embryo อาจเกิดจากการควบคุมทางพันธุกรรม ทั้งนี้เพราะ *C. microcarpa* นั้น เชื่อว่าเป็นลูกผสมที่เกิดจาก *C. reticulata* var. *austera* ซึ่งเป็น species เดียวกับส้มเขียวหวานผสมกับ *Fortunella* sp. (19)

ในบาง section พบว่า nucellar embryo เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วขึ้นมากลายเป็นคัพภะขนาดใหญ่ โดยที่ gametic embryo ยังมีขนาดเล็กอยู่ ลักษณะเช่นนี้ทำให้เชื่อว่า gametic embryo จะสลายตัวไปในที่สุด ดังนั้น ลักษณะ polyembryony เช่นในกรณีนี้จึงเป็น nucellar embryo ทั้งสิ้น ไม่มี gametic embryo เลย และบาง section ก็พบทั้ง gametic embryo และ nucellar embryo ที่มีขนาดใหญ่เท่าๆ กันด้วย

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ข้อสงสัยที่ว่าคัพภะใหญ่ที่สุดในเมล็ดนั้นควรจะเป็น gametic embryo หรือ nucellar embryo อย่างใดอย่างหนึ่งโดยเฉพาะ (3) จึงผิดพลาดไป ดังนั้น แนวความคิดที่จะแยกเอา

gametic embryo ออกจาก nucellar embryo โดยอาศัยลักษณะทางรูปร่าง และในการใช้เพาะเลี้ยงคัพภะในอาหาร (1,3) จึงไม่อาจทำได้ และในทางปฏิบัติวิธีการแยกลักษณะของต้นกล้าที่เกิดจากคัพภะทั้งสอง

ชนิดนี้ออกจากกัน โดยวิธีการผสม pollen ของส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata*) ตามรายงานของ Ozsan และ Cameron (16) จึงยังเป็นวิธีเดียวที่เชื่อถือได้ในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

1. นิยมไทย, วีระพล พ.ศ. 2510 การทดลองแยกกล้านิวเซลลส์ออกจากกลักามेटิกในเมล็ดส้มพันธุ์ต่าง ๆ รายงานประจำปี งานวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 161 หน้า
2. ผลประสิทธิ์, ไพโรจน์ พ.ศ. 2507 ส้มเขียวหวาน: คำนำ—ถิ่นกำเนิดและแพร่พันธุ์แหล่งปลูกที่สำคัญ—สภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการปลูกส้มเขียวหวาน—เชื้อสายของส้มเขียวหวานพันธุ์ หนังสือเอกสาร 37:1-15.
3. เกียรติสวัสดิ์, วัฒนา พ.ศ. 2512 การปรับปรุงคุณภาพส้มเขียวหวาน การทดลองแยกต้นกล้าที่เกิดจากคัพภะไม่แท้จากคัพภะแท้โดยวิธีการเลี้ยงในอาหารวัน รายงานวิจัยพืชสวน 2:3-10.
4. เสนาณรงค์, อำพล พ.ศ. 2499. ประวัติการปลูกส้มและการทดลองติดตามส้ม วิทยานิพนธ์ประกอบปริญญาตรี คณะกสิกรรมและสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 58 หน้า
5. CAMERON, J.W. and M.J. Garber. 1968. Identical twin hybrids of Citrus × Poncirus from strictly sexual seed parents. Amer. J. Bot. 55:199-204.
6. CAMERON, J.W., et al. 1958. Behavior of nucellar seedling lines. Calif. Citrogr. 43:290-293. (Abstr. in Hort. Abstr. 28:637-638. 1958).
7. CHAPOT, H. 1963. New citrus clones and varieties in Morocco. Fruits d' Outre Mer 18:263-264. (Abstr. in Hort. Abstr. 33:793. 1963).
8. COOPER, W.C. et al 1958. Nursery and orchard performance of nucellar seedling clones of citrus in the Rio Grande Valley of Texas. J. Rio Grande Valley Hort. Inst. 12:14-52. (Abstr. in Hort. Abstr. 28:637. 1958).
9. HODGSON, R.W. 1961. Horticultural applications of polyembryony in citrus. Indian. J. Hort. 18:245-250.
10. JOHENSEN, D.A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York. 523 p.
11. MAHESHWARI, P. 1950. An Introduction to the Embryology of Angiosperms. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.
12. MAHESHWARI, P., and M.S. Ranga Swamy. 1958. Polyembryony and in vitro culture of Citrus and Mangifera. Indian J. Hort. 15:275-282.
13. MAJSURADZE, N.I. 1959. Intervarietal hybrids and nucellar seedlings in orange. Agrobiologija 2:188-192. (Abstr. in Hort. Abstr. 28:637-638. 1958).
14. MAJSURADZE, N.I. 1963. Nucellar orange. Hort. Abstr. 33:600.
15. MOREIRA, S. 1962. Nucellar clones: the way to a new citriculture. Pacificaba 37:73-82. (Abstr. in Hort. Abstr. 33:159. 1963).

- Ozsan, M., and J.W. Cameron. 1963. Artificial culture of small citrus embryos and evidence against nucellar embryony in highly zygotic varieties. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 82:200-216.
- PRATT, R.M. 1958. Florida guide to citrus insects, diseases and nutritional disorders in color. Agr. Exp. Sta., Gainesville, Florida. 191 p.
- RENDLE, A.B. 1959. The classification of flowering plants. vol. 11. dicotyledons. Cambridge Univ. Press. 640 p.
- REUTHER, W., H. J. Webber and L.D. Batchelor. 1967. The citrus industry. vol. 1. History world distribution, botany and varieties. Conten. Publ. Univ. California. 611 p.
- 20 REUTHER, W., L. D. Batchelor and H.J. Webber. 1968. The citrus industry. vol. 2. Anatomy, physiology, genetics and reproduction. Conten. Publ. Univ. California. 398 p.
- 21 SASS, J.E. 1964. Botanical Microtechnique. Iowa State Univ. Press Ames. 228 p.
- 22 YANG, H.J. 1968. Fertilization and development of embryo on Satsuma orange (*Citrus unshiu* Marc.) and Natsudaïdai (*C. natsudaïdai* Hayata). J. Jap. Soc. Hort. Sci. 37:102-108. (Abstr. in Hort. Abstr. 39:673. 1969).