หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การดำเนินงาน และลักษณะที่ใช้ตรวจสอบ

วัสดุ และอุปกรณ์

สารเคมี

1. Potassium hydroxide (KOH) 10 %
2. น้ำกลั่น
3. Glacial acetic acid (CH_3COOH)
4. Sulphuric acid conc. (H_2SO_4 conc.)
5. Acetic acid anhydride $(CH_3CO)_2O$
6. Ethyl alcohol 70 %, 95 % และ absolute
7. Benzene (C_6H_6)
8. Silicone oil ความหนืด 2,000 centistokes
9. Immersion oil
10. Paraffin จุดหลอมเหลว 49 ° C

เครื่องมือ เครื่องใช้

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) OLYMPUS แบบ BHB 413 ที่มีกำลังขยาย 40, 100, และ 1,000 เท่า และเป็นชนิดที่ติดอุปกรณ์การถ่ายรูปได้
2. กล้องจุลทรรศน์ อีเลคตรอนแบบสแกน (SEM) JEOL แบบ JSM - 25 S
3. เครื่องมือในการเคลือบผิวเรณูที่จะนำไปศึกษาด้วย SEM
4. เครื่องปั่น (centrifuge)
5. ลวดอาลูมินั่มสำหรับใช้ในการเคลือบผิวเรณู

6. ฟิลม์ ขาว-ดำ Panatomic X ASA 32 ใช้กับ LM ฟิลม์ขาว-ดำ Verichrome pan 120 ASA 125 ใช้กับ SEM

7. หลอดทดลองก้นแหลม (centrifuge tube) ขนาดจุ 15 มล.

8. ผ้ากรอง มีตาขนาด 100 ไมครอน

9. แท่งแก้วคนสาร ยาว 8-10 นิ้ว

10. บิกเกอร์ขนาดจุ 100 มล.

11. หลอด vial เล็ก ๆ สำหรับเก็บรักษาเรณูแต่ละชนิด

12. hot plate

13. warm plate

14. micrometer

15. สไลด์ และแผ่นแก้วปิด

16. ไม้ซี้นเล็ก ๆ ขนาดยาวประมาณ 5 ซม. กว้างประมาณ 0.3 ซม.

<u>ตัวอย่างพันธุ์ไม้ที่ใช้ศึกษาลักษณะของเรณูในครั้งนี้</u>

เรณูของตัวอย่างพันธุ์ไม้วงศ์ Bignoniaceae ที่เป็นพันธุ์ไม้พื้นเมืองของไทย ได้มาจาก หอพรรณไม้ งานพฤกษศาสตร์ป่าไม้ กองบำรุง กรมป่าไม้(BKF) และศึกพืชพรรณ งานพฤกษศาสตร์ กองวิทยาการ กรมวิชาการเกษตร (BK) นอกจากนี้มีบางชนิดที่เก็บได้จากตัวอย่างสด รวมเป็นเรณูที่ศึกษาทั้งหมดจากพันธุ์ไม้ 12 สกุล 22 ชนิด 2 วาไรตี มีชื่อและจำนวนตัวอย่างที่ได้ศึกษาดังนี้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวอย่าง
	Tribe Bignonieae	
ปีป	Millingtonia hortensis Linn. f.	3
เครือหมูปอย	Nyctocalos brunfelsiiflora Teijsm.& Binn.	1
เพกา	Oroxylum indicum (Linn.) Kurz	2
	Tribe Tecomeae	
แคผู้	Barnettia kerrii (Barnett & Sandwith) Santisuk	2
แคขาว	Barnettia pagetii (Craib) Santisuk	1
แคนา	Dolichandrone serrulata (DC.) Seem.	2
แคทะเล	Dolichandrone spathacea (Linn.f.)K.Schum.	2
แคหางค่าง	Fernandoa adenophylla(Wall.ex G.Don) Steenis	3
รังแร้ง	Heterophragma sulfureum Kurz	1
พีแก	Markhamia pierrei P. Dop	1
แคเขา	Markhamia stipulata (Wall.) Seem. var. kerrii Spraque	1
แคหัวหมู	Markhamia stipulata (Wall.) Seem.var.stipulata	1
อีโปง	Pajanelia longifolia (Willd.) K. Schum.	2
-	Pauldopia ghorta (Buch-Ham.ex G.Don) Steenis	1
เพกาผู้	Radermachera glandulosa (Bl.) Miq.	3
กาลี	Radermachera hainanensis Merr.	2

ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวอย่าง
กาสะลองคำ	Radermachera ignea (Kurz) Steenis	4
-	Radermachera peninsularis Steenis	1
เพกาพรุ	Radermachera pinnata (Blanco) Seem. ssp. acuminata (Steenis) Steenis	1
แคหิน	Stereospermum colais (Ham. ex Dillw.)Mabberley	3
แคฝอย	Stereospermum cylindricum Pierre ex P. Dop	2
แคยอดดำ	Stereospermum fimbriatum (Wall.ex G. Don)A.DC.	2
แคดง	Stereospermum neuranthum Kurz	2

หมายเหตุ พันธุ์ไม้ในวงศ์ Bignoniaceae ที่เป็นไม้พื้นเมืองของไทย รวมทั้งสิ้นมี 23 ชนิด และ 2 วาไรตี แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีตัวอย่างเรณูของ Fernandoa collignonii (Pl.Dop) Steenis เนื่องจากเป็นพันธุ์ไม้ที่มีเขตการกระจายพันธุ์จำกัด (endemic species)อยู่ในเขตจังหวัดน่านของประเทศไทยต่อเขตประเทศลาวเท่านั้น และตัวอย่างพันธุ์ไม้ชนิดนี้เก็บได้เพียงหมายเลขเดียวเท่านั้น

วิธีเตรียมเรณูสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM)

1. การเตรียมเรณูด้วยวิธี acetolysis

การเตรียมเรณูด้วยวิธี acetolysis ของ Erdtman(1952)เป็นวิธีที่ยอมรับกันทั่วไปว่า สามารถทำให้เห็นรายละเอียดต่าง ๆ ของผนังเรณูที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงได้แจ่มชัด เพราะสามารถกำจัด protoplasm ภายในเรณู

ซึ่งเป็นปัญหาขัดขวางต่อการศึกษารายละเอียดที่ผนังเรณูได้ เรณูที่ผ่านกรรมวิธีนี้แล้วจะคงเหลือไว้แต่ผนังในชั้น exine ที่ต้องการศึกษาโครงสร้างและลวดลายของผนังเรณูเท่านั้น เช่นเดียวกับที่พบในเรณูที่เป็น fossil

วิธีเตรียม

1.1 เขี่ยอับเรณูลงในบิกเกอร์ เติม KOH 10% ประมาณ 10 ml แล้วนำไปต้มบน hot plate ให้เดือดประมาณ 3-5 นาที (ถอยระวังอย่าให้น้ำยาแห้ง) เพื่อกำจัดไขมันที่ผิวเรณู ทำลายบางส่วนของ protoplasm และผนังเรณูชั้น intine ในขั้นต้น

1.2 นำทั้งหมดจากข้อ 1 มากรอง ทิ้งส่วนกากไป เก็บเฉพาะส่วนของเหลวที่มีเรณูไว้ แล้วนำไปรินใส่หลอดทดลองก้นแหลม นำเข้าเครื่องปั่น ปั่นด้วยความเร็ว ประมาณ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นก็นำหลอดออกมา ดูดำหลอดเพื่อเทของเหลวทิ้ง

1.3 นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น โดยเติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดคนให้ทั่ว นำเข้าเครื่องปั่น 1 นาที เทน้ำทิ้ง กวรล้างด้วยน้ำกลั่นนี้ประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อให้หมด KOH

1.4 เติม glacial acetic acid ลงในหลอดประมาณ 10ml แล้วปั่น 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เพื่อกำจัดน้ำให้หมดไป มิฉะนั้นเมื่อเติม acetolysis mixture ในหัวข้อ 1.5 จะทำให้เกิดปฏิกริยารุนแรง กระเด็นขึ้นมาจากหลอดเป็นอันตราย และทำให้เรณูแตกเสียหายไปด้วย

1.5 นำน้ำยา acetolysis mixture (acetic anhydride: conc. H_2SO_4 = 9:1 ที่เตรียมไว้ รินลงหลอดทดลอง จากนั้นนำหลอดไปอุ่นในน้ำร้อน 70-100 °C เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำเข้าเครื่องปั่น 1 นาที จากนั้นก็เทน้ำยาทิ้ง

1.6 ล้างน้ำยา acetolysis mixture ที่หลงเหลืออยู่ด้วยการเติม glacial acetic acid แล้วปั่น 1 นาที เทน้ำยาทิ้ง

2. การเก็บรักษาเรณูซึ่งได้ acetolysed แล้ว

การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารที่ใช้เป็น media ในการเก็บรักษาเรณูหลังจาก acetolysis แล้ว เริ่มขึ้นจาก Christensen(1954) ซึ่งสรุปว่า glycerin และ glycerin-jelly ที่ใช้เป็น media กันทั่วไปสมัยนั้น ไม่เหมาะที่จะใช้เป็น media เพราะเรณูมีขนาดเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งการเพิ่มขนาดนี้ก็ไม่มีความแน่นอน หลังจากนั้น Svend Th. Andersen(1960) ได้ค้นพบและพิสูจน์ได้ว่า silicone oil มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น media ในการเก็บรักษาเรณู ดังนี้คือ

ก. มีค่า refractive index ที่เหมาะสมต่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้ทั่วไป หรือ แบบ phase contrast

ข. มี viscosity index ที่ 2000 centistokes ที่พอเหมาะสามารถทำให้เรณูพลิกได้ตามตำแหน่งที่ต้องการ

ค. คุณสมบัติทางเคมีของ silicone oil คงที่มาก ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโน่าซองความหนืด หรือ คุณสมบัติทางฟิสิกค์อย่างอื่นที่อาจเกิดได้

ง. ไม่ทำให้ขนาดของเรณู เปลี่ยนแปลงไปมาก เช่น mounting media อื่น หลังจากเก็บรักษาไว้นานถึงปี

การเก็บรักษาเรณูตามวิธีของ Svend Th. Andersen(1960) มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำเรณูที่ได้ acetolysed แล้ว (จากข้อ 1.6 หน้า 10) มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง

2.2 ล้างด้วย ethyl alcohol 70% 95 % และ absolute ตามลำดับ ในครั้งสุดท้ายหลังจากล้างด้วย absolute alcohol แล้ว ให้ดูดหลอดลงบนกระดาษกรอง เพื่อให้หลอดแห้ง

2.3 เติม benzene 1 ml ลงในหลอดเขย่า แล้วริน benzene ที่มีเรณูแขวนลอยอยู่นั้น ลงสู่หลอดเล็ก ๆ ที่จะใช้เก็บรักษาเรณู เติม silicone

oil 2-3 หยด ตามลงไป เปิดฝาหลอดเก็บเรณูนั้นทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้ benzene ระเหยไป เหลือแต่เรณูและ silicone oil

3. การทำสไลด์ถาวร

ใช้ไม้ชิ้นเล็ก ๆ เขี่ยเรณูใน silicone oil มาหยดลงบนสไลด์ 1 หยดเล็ก ๆ แล้วปิดด้วย cover glass จากนั้นนำ paraffin ชิ้นบาง ๆ 2 ชิ้น วางไว้ที่ขอบ cover glass 2 ด้าน ที่อยู่ตรงข้ามในแนวเส้นทะแยงมุม แล้วนำแผ่นสไลด์นี้ไปวางบน warm plate เพื่อให้ paraffin ละลายแทรกเข้าไปอยู่ใต้ cover glass และล้อมปิด silicone oil ที่มีเรณูอยู่ไว้โดยรอบ เมื่อ paraffin ละลายเข้าไปล้อม silicone oil เป็นวงเรียบร้อยแล้ว ก็นำสไลด์ลงจาก warm plate วางบนพื้นเพื่อให้ paraffin กลับแข็งตัวอีกครั้งหนึ่ง ก็จะได้เป็นสไลด์ถาวรใช้ศึกษาดูด้วย LM ต่อไป

<u>วิธีการเตรียมเรณูเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (SEM)</u>

แบ่งเรณูที่ acetolysed และผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นจากขั้นตอนที่ 1 ของการเก็บรักษาเรณู มาหยดลงเล็กน้อย บนดุมโลหะที่ทาไว้ด้วยไขมันเพื่อให้เรณูติดอยู่บนดุมโลหะดีขึ้น จากนั้นทิ้งเรณูไว้ให้แห้งในอากาศบนดุมโลหะ แล้วจึงนำไปเข้าเครื่องเคลือบผิวเรณูด้วยไออาลูมินั่มเป็นขั้นตอนสุดท้ายก่อนที่จะนำไปตรวจดูด้วย SEM ได้ทันที

ลักษณะของเรณูที่นำมาศึกษา

1. ขนาดของเรณู
2. รูปร่างของเรณู
3. polar area index
4. polarity
5. รูปแบบของช่องเปิด และความกว้างของช่องเปิด

6. ความหนาของ exine

7. ความหนาของ nexine

8. ลวดลายของผนังเรณู และโครงสร้างของผนังเรณู

9. ขนาดของ lumina ที่บริเวณ mesocolpium apocolpium และขอบของช่องเปิด

10. ความกว้างของ muri และจำนวนแถวของ columella ที่รองรับ muri

โดยที่ข้อมูลทางลักษณะของเรณูเหล่านี้ ได้มาจากการสุ่มตัวอย่างจากเรณูในแต่ละตัวอย่าง ดังนี้ ลักษณะของเรณูในข้อ 1-5 ศึกษาจาก 25 เรณู และในข้อ 6-10 ศึกษาจาก 15 เรณู

คำศัพท์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะของเรณูในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตามแบบของ Erdtman(sec.1952) Faegri and Iversen(sec. 1964) Iverson and Troels-Smith (1950) Praglowski (1971) และ Walker (1974) โดยมีคำอธิบายศัพท์เหล่านี้บรรจุไว้ในภาคผนวก นอกจากคำศัพท์เหล่านี้แล้ว ยังมีคำศัพท์ที่ได้กำหนดขึ้นมาจากการศึกษาครั้งนี้ เพื่อจัดกลุ่มตามขนาดของ lumina ของลวดลายของผนังเรณูแบบ per-reticulate ออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งการจัดแบ่งนี้ดัดแปลงมาจากของ Hyde, H.A. และ K.F. Adams (1958) เพื่อความเหมาะสมกับข้อมูลที่ศึกษาได้ดังนี้ คือ

ขนาด lumina	$\leq$ 1.0	µm	micro reticulation
ขนาด lumina	1.0- 2.0	µm	fine reticulation
ขนาด lumina	2.0- 3.0	µm	medium reticulation
ขนาด lumina	3.0- 3.5	µm	coarse reticulation
ขนาด lumina	$>$ 3.5	µm	very coarse reticulation (loose reticulation)