



บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ ตัวอย่างเรณูที่นำมาศึกษา การดำเนินการทดลอง ลักษณะที่ใช้ในการตรวจสอบ

1. วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ
 - 1.1 potassium hydroxide (KOH) 10 %
 - 1.2 น้ำกลั่น
 - 1.3 glacial acetic acid (CH_3COOH)
 - 1.4 sulphuric acid conc. (conc. H_2SO_4)
 - 1.5 acetic acid anhydride (CH_3CO)₂O
 - 1.6 ethyl alcohol 95 % และ absolute
 - 1.7 benzene (C_6H_6)
 - 1.8 silicone oil ความหนืด 2,000 centistokes
 - 1.9 paraffin จุดหลอมเหลว 49°C
 - 1.10 เครื่องปั่น (centrifuge)
 - 1.11 หลอดทดลองกันแหลม (centrifuge tube) ขนาดจุ 15 มล.
 - 1.12 ถ้วยกรอง (gooch crucible) ขนาด 100 μ และถ้วยกระเบื้องรองรับ
 - 1.13 แท่งแก้วสำหรับคน
 - 1.14 วิกเกอร์ขนาดจุ 100 มล.
 - 1.15 เต้าไฟฟ้า หรือ hot plate
 - 1.16 warm plate
 - 1.17 สไลด์และแผ่นแก้วปิด
 - 1.18 หลอดแก้วขนาดเล็ก (vial) สำหรับเก็บรักษาเรณู
 - 1.19 เหล็กปลายแหลมสำหรับเขี่ยเรณูจากขวด vial ลงบนสไลด์
 - 1.20 กล้องจุลทรรศน์แบบไข้แสงที่มีกำลังขยาย 10, 40, 100 เท่า
 - 1.21 micrometer สำหรับวัดขนาดเรณู

- 1.22 ช่องกระดาษขนาด 3 x 5 นิ้ว
- 1.23 ฟิล์มขาวดำ (panatomic X, ASA 32), ฟิล์มสไลด์สี (ektactrome 64)
สำหรับถ่ายภาพกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM), ฟิล์มสี (kodak VR 100)
สำหรับถ่ายภาพยดเหลืองที่ตกตามทีต่าง ๆ และฟิล์มขาวดำขนาด 6" x 9" สำหรับ
ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (SEM)
- 1.24 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (SEM) ชนิด JSM-35 cf. และ
JSM-200 cx.

2. เรือที่นำมาศึกษา

2.1 เรือจากไม้ต้นและไม้พุ่มในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เก็บมาศึกษา

ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ลักษณะนิสัย	ช่วงมีดอก
2.1.1 ชาโก้	<u>Sericocalyx schomburgkii</u> Brem.	Acanthaceae	Shrub	ธ.ค-ก.พ
2.1.2 มะม่วง	<u>Mangifera indica</u> Linn.	Anacardiaceae	Tree	ต.ค-เม.ย
2.1.3 ต้นเป็ดน้ำ	<u>Cerbera odollam</u> Gaertn.	Apocynaceae	Tree	ตลอดปี
2.1.4 ต้นเป็ดทราย	<u>Cerbera manghas</u> Linn.	Apocynaceae	Shrubbytree	ตลอดปี
2.1.5 ยี่โถ	<u>Nerium indicum</u> Mill.	Apocynaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.6 ส้มทม	<u>Plumeria acuminata</u> Ait.	Apocynaceae	Shrubbytree	ตลอดปี
2.1.7 ร่าเหย	<u>Thevetia peruviana</u> Schum.	Apocynaceae	Shrubbytree	ตลอดปี
2.1.8 โมก	<u>Wrightia religiosa</u> (T&B) Hook. f.	Apocynaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.9 ทนกวปลาหมึก	<u>Schefflera actinophylla</u> Harms.	Araliaceae	Tree	เม.ย-พ.ค
2.1.10 ต้นเป็ดฝรั่ง	<u>Crescentia alata</u> Linn.	Bignoniaceae	Shrubbytree	ตลอดปี
2.1.11 แคนแลด	<u>Spathodea campanulata</u> Beauv.	Bignoniaceae	Tree	ตลอดปี
2.1.12 ยมพุดน้ำรั้ว	<u>Tabebuia pentaphylla</u> Hemsl.	Bignoniaceae	Shrub	ม.ค-เม.ย
2.1.13 ทองอุไร	<u>Tecoma stans</u> <i>Griseb.</i>	Bignoniaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.14 ราขาวดี	<u>Buddleja paniculata</u> Wall.	Buddlejaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.15 กากหลง	<u>Bauhinia acuminata</u> Linn.	Caesalpiniaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.16 ชงโค	<u>Bauhinia purpurea</u> Linn.	Caesalpiniaceae	Shrubbytree	ตลอดปี
2.1.17 โยทะกา	<u>Bauhinia tomentosa</u> Linn.	Caesalpiniaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.18 ทางนกยูงไทย (ดอกสีแดง)	<u>Caesalpinia pulcherrima</u> Sw.	Caesalpiniaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.19 ทางนกยูงไทย (ดอกสีเหลือง)	<u>Caesalpinia pulcherrima</u> Sw. var. <i>flava</i>	Caesalpiniaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.20 กัลปพฤกษ์	<u>Cassia bakeriana</u> Craib	Caesalpiniaceae	Shrub	มี.ค-เม.ย
2.1.21 ตูน	<u>Cassia fistula</u> Linn.	Caesalpiniaceae	Tree	ก.พ-พ.ค

ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ลักษณะนิสัย	ช่วงมีดอก
2.1.22 ชัยพฤกษ์	<u>Cassia grandis</u> Linn.	Caesalpinaceae	Tree	ก.พ-พ.ค
2.1.23 ชีเหล็กอเมริกา	<u>Cassia spectabilis</u> DC.	Caesalpinaceae	Shrubbytree	ตลอดปี
2.1.24 ทรงบาดาล	<u>Cassia surattensis</u> Burm. f.	Caesalpinaceae	Shrubbytree	ตลอดปี
2.1.25 ทางนกยูงฝรั่ง	<u>Delonix regia</u> Rafin.	Caesalpinaceae	Tree	มี.ค-พ.ค
2.1.26 นนทรีย์	<u>Peltophorum pterocarpa</u> (DC.) Back.	Caesalpinaceae	Tree	ก.พ-มี.ค
2.1.27 ประดู่แดง	<u>Phyllocarpus septentrionalis</u> Donn. Smith.	Caesalpinaceae	Tree	ก.พ-มี.ค
2.1.28 ลูพรรณิการิ	<u>Cochlospermum religiosum</u> Alston.	Cochlospermaceae	Shrubbytree	ม.ค-เม.ย
2.1.29 หูกวาง	<u>Terminalia catappa</u> Linn.	Combretaceae	Shrub	ม.ค-ก.พ ก.ค-ส.ค
2.1.30 ล้าน	<u>Dillenia suffruticosa</u> (Griff.) Martelli.	Dilleniaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.31 ยางขาว	<u>Dipterocarpus alatus</u> Roxb.	Dipterocarpaceae	Tree	มี.ค-เม.ย
2.1.32 หุปลາฮ่อน	<u>Acalypha wilkesiana</u> Muel.	Euphorbiaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.33 โกล่น	<u>Codiaeum variegatum</u> Bl.	Euphorbiaceae	Shrub	เป็นระยะ ตลอดปี
2.1.34 บัตตาเวีย	<u>Jatropha integerrima</u> Jacq.	Euphorbiaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.35 กระทิง	<u>Calophyllum inophyllum</u> Linn.	Guttiferae	Tree	มี.ค-มี.ค
2.1.36 ส่าหรื	<u>Ochrocarpus siamensis</u> Kosterm.	Guttiferae	Tree	ธ.ค-ม.ค
2.1.37 ลูกปืนใหญ่	<u>Couroupita guianensis</u> Aubl.	Lecythidaceae	Tree	ตลอดปี
2.1.38 ตะแบก	<u>Lagerstroemia floribunda</u> Jack.	Lythraceae	Tree	มี.ค-มี.ย
2.1.39 ชีเข่ง	<u>Lagerstroemia indica</u> Linn.	Lythraceae	Shrubbytree	มี.ย-ต.ค
2.1.40 เล้ลา	<u>Lagerstroemia loudonii</u> T. & B.	Lythraceae	Tree	เม.ย-พ.ค
2.1.41 อินทนิลน้ำ	<u>Lagerstroemia speciosa</u> Pers.	Lythraceae	Tree	มี.ค-พ.ค
2.1.42 จำปี	<u>Michelia alba</u> DC.	Magnoliaceae	Tree	ก.ย-ธ.ค
2.1.43 พุดตาน	<u>Hibiscus mutabilis</u> Linn.	Malvaceae	Shrubbytree	ตลอดปี

ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ลักษณะนิสัย	ช่วงผลิดอก
2.1.44 ชบาขาว	<u>Hibiscus rosa-sinensis</u> Linn.	Malvaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.45 ชบาซ้อน	<u>Hibiscus rosa-sinensis</u> Linn. var. <u>plenus</u>	Malvaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.46 โพทะเล	<u>Thespesia populnea</u> Linn.	Malvaceae	Shrubbytree	ตลอดปี
2.1.47 ประยงค์	<u>Aglaia odorata</u> Lour.	Meliaceae	Shrubbytree	ตลอดปี
2.1.48 เสียน	<u>Melia azedarach</u> Linn.	Meliaceae	Tree	พ.ย-ธ.ค
2.1.49 กระถินณรงค์	<u>Acacia auriculaeformis</u> A. Cunn.	Mimosaceae	Tree	ต.ค-พ.ย
2.1.50 คามจุรสีทอง	<u>Albizia lebeck</u> Benth.	Mimosaceae	Tree	ก.พ-เม.ย
2.1.51 ชูช่มพู่	<u>Calliandra haematocephala</u> Hassk.	Mimosaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.52 คามจุรสีช่มพู่	<u>Samanea saman</u> Merr.	Mimosaceae	Tree	ก.พ-พ.ค
2.1.53 แปรงล้างขวด	<u>Callistemon viminalis</u> G. Don. ex Loud.	Myrtaceae	Tree	ตลอดปี
2.1.54 เฟื่องฟ้า (สีเขียว-ช่มพู่)	<u>Bougainvillea spectabilis</u> Willd.	Nyctaginaceae	Scandent	ตลอดปี
2.1.55 เฟื่องฟ้า (สีส้ม)	<u>Bougainvillea spectabilis</u> Willd. var. <u>sanderiana</u>	Nyctaginaceae	Scandent	ตลอดปี
2.1.56 ปาล์มมณฑลา	<u>Veitchia merrillii</u> Bece.	Palmae	Palm	ตลอดปี
2.1.57 ทองกวาว	<u>Butea frondosa</u> Roxb.	Papilionaceae	Tree	ธ.ค-ก.พ
2.1.58 ทองกลางฮ่องทง	<u>Erythrina crista-galli</u> Linn.	Papilionaceae	Tree	ม.ค-มี.ค
2.1.59 ทองกลางลาบ	<u>Erythrina indica</u> Lamk. var. <u>picta</u> Hort.	Papilionaceae	Shrubbytree	ก.พ-พ.ค
2.1.60 แคฝรั่ง	<u>Gliricidia sepium</u> Steud.	Papilionaceae	Shrubbytree	ก.พ-พ.ค
2.1.61 ปี้น	<u>Milletia brondisiana</u> Kurz.	Papilionaceae	Tree	ม.ค-มี.ค
2.1.62 รัตมา	<u>Parkinsonia aculeata</u> Linn.	Papilionaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.63 ประอู่เหลือง	<u>Pterocarpus indicus</u> Willd.	Papilionaceae	Tree	มี.ค-เม.ย
2.1.64 พบหมอก	<u>Plumbago auriculata</u> Lamk.	Plumbaginaceae	Shrub	ตลอดปี

ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ลักษณะนิสัย	ช่วงมีดอก
2.1.65 พาราซินโตล	<u>Triplaris surinamensis</u> Cham.	Polygonaceae	Tree	มี.ค-พ.ค
2.1.66 เข็มขาว	<u>Ixora macrothyrsa</u> Wall. ex G. Don.	Rubiaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.67 เข็มแดง	<u>Ixora macrothyrsa</u> Teijsm. & Binn.	Rubiaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.68 แก้ว	<u>Murraya paniculata</u> Jack.	Rutaceae	Shrub	ตลอดปี
2.1.69 คukul	<u>Mimusops elengi</u> Linn.	Sapotaceae	Tree	ม.ค-พ.ค
2.1.70 ช้องแมว	<u>Gmelina asiatica</u> Linn.	Verbenaceae	Shrub	มี.ค-พ.ค
2.1.71 เขียนหยด	<u>Duranta repens</u> Linn.	Verbenaceae	Scandent	ตลอดปี

2.2 หยอดเหลืองที่ติดตามรถยนต์และใบไม้ไนบรี เวนจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีเตรียมเรณูเพื่อศึกษารูปปร่างลักษณะภายนอก

เก็บดอกไม้จากไม้ต้นและไม้พุ่มในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวม 71 ตัวอย่าง (68 species, 3 variety) แยกเอาเฉพาะส่วน anther นำมาใส่ช่องกระดาษตากแห้ง หรือนำเข้าตู้อบลมแห้งประมาณ 50°C และเตรียมเรณูจากตัวอย่างที่เก็บตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 การทำ acetolysis

3.1.1 เชี่ยวเรณูหรือทั้งอับริณูลงในปีคเกอร์ เติม KOH 10 % ลงไปจนท่วม ตัวอย่าง นำไปต้มให้ KOH เตือดประมาณ 2 นาที เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดมากับเรณู ในขณะที่ต้มคอยระวังอย่าให้ KOH แห้ง

3.1.2 นำเรณูใน KOH มากกรอง ส่วนกากทิ้งไป นำส่วนที่กรองแล้วถ่ายใส่หลอดทดลอง นำเข้าเครื่องปั่น (ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที) 1 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง ให้เหลือตะกอนเรณูอยู่ก้นหลอด

3.1.3 นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น โดยเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดทดลอง นำเข้าเครื่องปั่น (ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที) 1 นาที เทน้ำทิ้ง ควรล้างด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้ง โดยนำเข้าเครื่องปั่น เพื่อล้าง KOH ออกให้หมด

3.1.4 เติม glacial acetic acid ลงในหลอด นำเข้าเครื่องปั่น (ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที) เป็นเวลา 1 นาที ทั้งนี้เพื่อกำจัดน้ำให้หมดไป มิฉะนั้นเมื่อเติม acetolysis mixture จะทำให้เกิดปฏิกิริยารุนแรง อาจทำให้เรณูแตกเสียหายได้ง่าย

3.1.5 เติมน้ำยา acetolysis mixture (acetic anhydride : conc. $H_2SO_4 = 9 : 1$) โดยปริมาตรที่เตรียมไว้ลงในหลอด แล้วนำไปจุ่มในน้ำที่ก่ำงเดือดเป็นเวลา 1 นาที นำหลอดเข้าเครื่องปั่น (ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที) เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง น้ำยา acetolysis mixture ที่ใช้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งไป ไม่ควรเตรียมทิ้งค้างไว้

3.1.6 ล้างน้ำยา acetolysis mixture ออกให้หมดด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้ง โดยนำเข้าเครื่องปั่น

3.2 การเก็บรักษาเรณูที่ผ่านกรรมวิธี acetolysis แล้ว

3.2.1 กำจัดน้ำออกให้หมดโดยเติมน้ำ ethanol 70 % นำหลอดเข้าเครื่องปั่น (ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที) เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วทำซ้ำอีกโดยใช้น้ำ ethanol 95 % และ ethanol absolute

010042

3.2.2 ล้างเรณูด้วย benzene โดยนำเข้าเครื่องปั่น (ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที่) 1 นาที เทของเหลวทิ้ง

3.2.3 ถ่ายเรณูที่ตกค้างอยู่ที่ก้นหลอดลงในขวดแก้วขนาดเล็ก แล้วเติม silicone oil ลงไป 2 - 3 หยด ไขแห้งแก้วคนให้ silicone oil เข้ากับ benzene

3.2.4 นำขวดแก้วเข้าตู้อบอุณหภูมิประมาณ 50°C หรือเปิดฝาขวดตั้งไว้ที่ warm plate ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ benzene ระเหยไป เหลือแต่เรณูใน silicone oil

3.3 การทำสไลด์ถาวรและการเตรียมเรณูเพื่อศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแคบ (SEM)

3.3.1 การทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM)

ใช้เหล็กแหลมเล็ก ๆ เชี่ยวเรณูใน silicone oil มาหยดลงบนสไลด์ 1 หยด ปิดด้วย cover glass นำ paraffin ขึ้นบาง ๆ มาวางที่ขอบของ cover glass ทั้ง 2 ข้าง แล้วนำแผ่นสไลด์นี้ไปวางบน warm plate อุณหภูมิประมาณ 50°C เพื่อให้ paraffin ละลายแทรกเข้าไปอยู่ใต้ cover glass และล้อมรอบหยด silicone oil ที่มีเรณูไว้โดยรอบ หลังจากนั้นนำสไลด์ลงจาก warm plate วางไว้บนพื้นเพื่อให้ paraffin แข็งตัว ก็จะได้สไลด์ถาวรเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงต่อไป

3.3.2 การเตรียมเรณูเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

นำเรณูที่ทำ acetolysis และล้างด้วยน้ำแล้วจากขั้นตอน 3.1.6 มาหยดลงบน stub โดยใช้ carbon colloidal adhesive ซึ่งเป็นสารที่เป็นตัวนำไฟฟ้า เช่น ผงถ่าน บ้ายทับบนหยดเรณูที่ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นทิ้ง stub ให้แห้งในอากาศ หรืออาจทำให้แห้งโดยวิธี critical point drying แล้วนำเข้าเครื่องเคลือบผิวเรณูด้วยทองผสมพาลาเดียม (Au - Pd coating) จากนั้นนำไปศึกษารูปร่างลักษณะของเรณูโดยใช้กล้อง SEM ชนิด JSM-35 cf. หรือ JSM-200 cx.

3.3.3 วิธีการศึกษาหยดเหลืออง

ลุ่มเก็บตัวอย่างหยดเหลือองที่ตกตามบริเวณต่าง ๆ เช่น บนใบไม้ บนรถ ในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วงเดือนมกราคม - มิถุนายน นำหยดเหลือองมาศึกษาด้วย

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดย mount ลงบนสไลด์ด้วย Hoyer's fluid เพื่อจะดูว่าประกอบ ด้วยเรณูของพืชชนิดใดบ้าง นำหยดเหลืองอีกส่วนหนึ่งไปศึกษาด้วย SEM โดยนำหยดเหลืองไปทำ acetolysis เช่นเดียวกับในข้อ 3.1

3.4 ลักษณะของเรณูที่นำมาศึกษา

3.4.1 รูปทรง (shape) ได้จากอัตราส่วนของค่าความยาวของเรณูในแนวแกน ระหว่างขั้วทั้งสองของเรณู (polar axis : P) ต่อค่าความกว้างของเรณูในแนวเส้นศูนย์สูตร (equatorial axis : E) (Erdtman, 1952) ในกรณีที่ไม่มีช่องเปิดหรือมีช่องเปิดกระจาย อยู่ทั่ว grain วัดโดย focus ให้เห็น median optical section แล้ววัด 2 ครั้งใน แนวตั้งฉากกัน

3.4.2 ขนาดของเรณู (size) โดยวัด polar axis และ equatorial diameter จำนวนของเรณูที่วัดในแต่ละชนิด 10 หรือ 15 grains

3.4.3 ขั้ว (pole)

3.4.4 ช่องเปิด (aperture)

3.4.5 ลวดลายบนผนังเรณู (exine sculpturing)

คำศัพท์ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะของเรณูใช้ตามแบบของ Erdtman, 1952 และ Faegri and Iversen, 1964 และคำศัพท์ที่ใช้อธิบายลวดลายแบบตาข่ายโดย Hyde H.A. และ K.F. Adams, 1958 ซึ่งพิจารณาความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของ lumina ดังนี้คือ

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