

เทคนิคการเตรียมตัวอย่างเรณูที่มีผนังบาง สำหรับศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

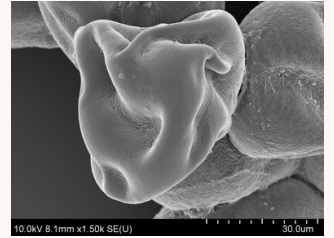
ยุพดี เผ่าพันธุ์
นักวิจัยเชี่ยวชาญ

ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2568)

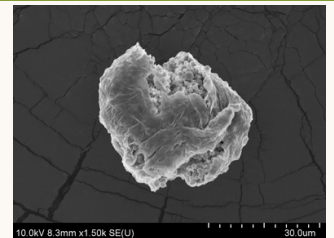
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) เป็นเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยาของเรณูพืช (pollen morphology) เช่น ลักษณะลวดลายผนัง (exine sculpturing) รูปร่าง (shape) และขนาด (size) ของเรณู (pollen) ซึ่งกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดทำงานภายใต้สภาวะสุญญากาศ (vacuum) ดังนั้นตัวอย่างเรณูพืชที่จะนำไปศึกษาต้องปราศจากความชื้น จึงจำเป็นต้องทำการเตรียมตัวอย่างเรณูให้ปราศจากความชื้นดังนั้นในการเตรียมตัวอย่างเรณูที่มีผนังเรณูค่อนข้างบาง เพื่อคงสภาพโครงสร้างให้มีความสมบูรณ์เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นพิเศษ เรณูพืชที่มีผนังค่อนข้างบางได้แก่พืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae Family) ซึ่งทำให้รักษาสภาพของเรณูให้สมบูรณ์ได้ยาก เทคนิคการเตรียมตัวอย่างจึงมีความสำคัญในการรักษาสภาพเรณูพืชไว้ให้สมบูรณ์ โดยทั่วไปการเตรียมตัวอย่างเรณูมัก ใช้วิธีการ acetolysis ของ Erdtman (1972) ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้เตรียมตัวอย่างเรณูมาอย่างยาวนาน แต่เมื่อนำมาใช้ในการเตรียมเรณูที่มีผนังบางพบว่าทำให้เรณูเกิดการแตก หรือผนังเรณูเกิดการยุบตัว หรือเสียรูปร่างไปมีผลให้ไม่สามารถรายงานลักษณะรูปร่างและลวดลายบนผนังเรณูได้ ซึ่งวิธีการทำให้เรณูปราศจากความชื้นนั้นมีหลายวิธีการด้วยกัน เช่นการทำให้เรณูแห้งโดยการเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccator) ซึ่งทำให้เรณูเกิดการยุบตัวและเสียรูปร่าง ส่วนการเตรียมตัวอย่างเรณูพืชโดยวิธีการต้มเรณูพืชด้วย 10% potassium hydroxide เพื่อกำจัด pollenkitt ซึ่งเป็นการทำความสะอาดพื้นผิวของผนังเรณูซึ่งใช้ได้ดีผลดีกับเรณูพืชโดยทั่วไป แต่สำหรับเรณูที่มีผนังบางจะทำให้เรณูเกิดการแตก ผนังของเรณูเกิดการเสียรูปร่าง หดตัว และยุบตัว แต่วิธีการที่สามารถใช้ได้ผลดีคือการ เตรียมตัวอย่างทางเคมีโดยการคงสภาพเรณูพืชด้วยสารเคมี glutaraldehyde หรือ formaldehyde ร่วมกับ osmium tetroxide ซึ่งเรียกเทคนิคการใช้สารเคมี 2 กลุ่มนี้ในการคงสภาพเรณูพืชนี้ว่าการทำ double fixation ซึ่งทำให้สามารถคงรูปร่างเรณูไว้ได้เป็นอย่างดี แต่ในบางครั้งจะพบปัญหาความไม่สะอาดของผนังเรณูซึ่งอาจมี pollenkitt หรือสิ่งต่างๆปกคลุมพื้นผิวของเรณูอยู่ทำให้ไม่สามารถศึกษาลวดลายของผนังเรณูซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญใช้ในการจัดจำแนกพืช (classification) หรือ การระบุชนิดพืช (identification) ได้ สิ่งที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือการคัดเลือกเรณูที่มีช่วงอายุที่มีความเหมาะสมจะช่วยลดปัญหานี้ลงได้ การเลือกเรณูจากอับละอองเรณู (anther) ที่เจริญสมบูรณ์หรืออับเรณูเริ่มมีการแตก หลังจากนำเรณูระยะดังกล่าวไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีทางเคมีแล้วนอกจากจะได้เรณูที่มีรูปร่างสมบูรณ์ และผนังของเรณู (exine) มีความสะอาดปราศจากสิ่งปกคลุม หรือปนเปื้อน ทำให้สามารถศึกษาลวดลายของผนังเรณู และช่องเปิด (pollen aperture) ได้อย่างครบถ้วนสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

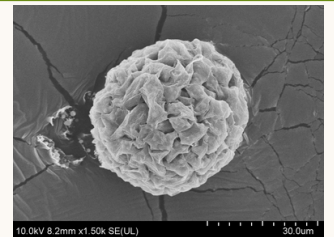
- Erdtman G. 1972. Pollen Morphology and Plant Taxonomy. 3rd ed., Hafner Publishing Company Inc., New York.
- Paopun Y., Thanomchat P., Changjan D., and Charoensub R. 2019. Techniques for Preparing Fragile Pollen of *Curcuma supameeana* W.J. Kress & K. Larsen Skornick. For Morphological Observation. Microsc. Microanal. Res. 32(1) 41-44.



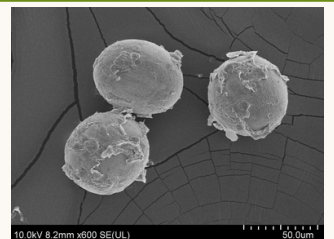
ภาพที่ 1 เรณูที่ทำแห้งโดยการเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น ทำให้เรณูเกิดการยุบตัว



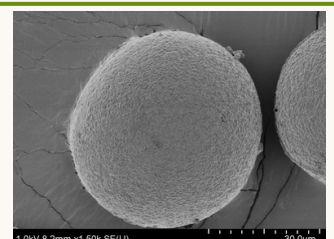
ภาพที่ 2 เรณูที่ผ่านการต้มด้วย 10% potassium hydroxide เพื่อกำจัด pollenkitt ทำให้เรณูเกิดการแตกเสียรูปร่าง



ภาพที่ 3 เรณูที่ผ่านการต้มด้วย 10% potassium hydroxide เพื่อกำจัด pollenkitt ทำให้เรณูเกิดการเหี่ยวยุบเสียรูปร่าง



ภาพที่ 4 เรณูที่ได้จากอับเรณูที่ยังไม่มีรอยแตก และผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการทางเคมี



ภาพที่ 5 เรณูที่ได้จากอับเรณูที่เจริญสมบูรณ์และอับเรณูเริ่มมีการแตก และผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการทางเคมี