บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ
(MATERIALS AND METHODS)

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำเอาลำต้นที่ทอดขนานไปกับพื้นดิน (Creeping stem) ของคนทิสอทะเล (Vitex trifolia Linn. var. simplicifolia Cham.) ที่ขุดมาจากต้นเดียวกัน นำเอามาแบ่งเป็นท่อน ๆ แล้วปลูกในกะบะทราย ซึ่งเป็นทรายที่นำมาจากริมทะเลบริเวณที่คนทิสอทะเลขึ้นอยู่ในธรรมชาติ การที่ต้องนำเอาลำต้นที่ทอดขนานไปกับดินของต้นเดียวกันมาปลูก ก็เพื่อต้องการให้ดอกคนทิสอทะเลทุกดอกที่นำมาศึกษามีความแตกต่างกันในทางพันธุกรรมน้อยที่สุด เพราะการนำเอาลำต้นมาปลูก เป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) เลี้ยงลำต้นเหล่านี้ของคนทิสอทะเลจนเติบโตและออกดอก จึงนำดอกเหล่านั้นมาทำการศึกษา

ดอกของคนทิสอทะเลที่นำมาศึกษาการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลง (Development) ของ embryo sacs นี้เป็นดอกระยะที่ยังไม่มีการผสม (Fertilization) และยังไม่ได้รับละอองเกสรตัวผู้ คือยังไม่มี pollination และได้เลือกจากดอกที่ anther ยังไม่แตก ดอกยังไม่บาน เพื่อศึกษาให้ทราบการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นระยะ ๆ ติดต่อกันไปตั้งแต่ดอกอ่อน จนถึงดอกที่กำลังจะบาน จึงศึกษาในดอกขนาดต่าง ๆ กัน ได้แยกดอกเหล่านี้ออกเป็นพวก ๆ (ตารางที่ 1) โดยใช้การบานของดอก และความกว้างความยาวของดอก(ไม่รวมกลีบดอก) เป็นหลัก จะใช้ความกว้างความยาวของดอกเป็นหลักแต่เพียงอย่างเดียวไม่ได้ เพราะดอกมีขนาดเล็ก ดอกที่อ่อนกับดอกที่แก่มีขนาดต่างกันไม่มากนัก

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของดอกคนทิสอทะเล (Vitex trifolia var. simplicifolia Cham. ที่ได้นำมาทำการศึกษา

พวกที่	ขนาดดอก		หมายเหตุ
	ยาว(มม.)	กว้าง(มม.)	
1	1	1	ภาพที่ 2
2	2	1	
3	3	1	
4	5	1 1/2	
5	5	2	
6	5	2	

นำดอกคนทิสอทะเลที่จัดเป็นพวก ๆ แล้วนี้ พวกละประมาณ 25 ดอก (แต่ได้บันทึกจำนวนที่แน่นอนไว้เพื่อประโยชน์ในการหาอัตราเฉลี่ยต่าง ๆ ต่อไป) มาแช่ในน้ำยาเพื่อฆ่าเซลล์ให้ตายอย่างรวดเร็วและรักษาส่วนต่าง ๆ ภายในเซลล์ให้คงสภาพเดิมมากที่สุด (Killing & fixing fluid) โดยใช้ [1] Petrunkevitsch's fluid(Johansen, 1940)

---

[1] Petrunkevitsch's fluid(Johansen,1940) ประกอบด้วย

40 % Ethyl alcohol	125.0	cc.
Concentrated nitric acid	2.5	cc.
Glacial acetic acid	27.5	cc.
Mercuric chloride	to saturated	

โดยทั่ว ๆ ไป killing และ fixing fluid ที่ใช้ในทางพฤกษศาสตร์ มักจะใช้ [2]FAA แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ Petrunkevitsch's fluid เป็น killing และ fixing fluid เพราะเหมาะกับการรักษาสภาพ (fix) ของ megaspore โดยเฉพาะ (Johansen,1940) และคำรงธรรม(2512) ได้ทดลองใช้ FAA และ Petrunkevitsch's fluid เพื่อเปรียบเทียบกัน ในการศึกษา embryo sacs ของพุทธรักษา (Canna edulis Linn.) พบว่า FAA ใช้ไม่ได้ผล เพราะส่วนต่าง ๆ ของ embryo sacs จะเน่าและหลุดไปหมด ทำให้ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่ได้ ส่วน Petrunkevitsch's fluid ใช้ได้ผลดี ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ - Petrunkevitsch's fluid

เมื่อนำดอกคนทิสอทะเลแต่ละพวกมา fix ใน Petrunkevitsch's fluid ครบ 15 – 16 ชั่วโมงแล้ว เท Petrunkevitsch's fluid ทิ้ง ล้างด้วยน้ำประมาณ 3 ครั้ง ต่อไปล้างด้วย 50 % อัลกอฮอลอีกประมาณ 3 ครั้ง เพื่อล้างเอา mercuric chloride ซึ่งเกาะอยู่ที่ผิว ๆ ของดอกออกไป

---

[2] FAA (Formalin – aceto – alcohol) ประกอบด้วย

50 % (Or 70 %)	Ethyl alcohol	90.0	cc.
	Glacial acetic acid	5.0	cc.
	Formalin	5.0	cc.

ต่อจากนั้นก็นำเอาไป dehydrate ตามวิธีที่เรียกว่า [3]Ethyl – butyl alcohol series ซึ่งประกอบด้วย dehydrants 12 ชนิด แช่ดอกแต่ละพวกที่ fix แล้วใน dehydrant แต่ละชนิด ๆ ละ 2 ชั่วโมง เริ่มจากหมายเลข 1 ถึงหมายเลข 12

เมื่อ dehydrate เสร็จแล้วก็นำเอาดอกแต่พวกไปแช่ใน [4]tissuemat ที่หลอมเหลว โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 55 – 60°ซ ใน paraffin oven แช่

---

[3]Ethyl – butyl alcohol series ประกอบด้วย

Dehydrant No.	Distilled water (cc.)	95% EtOH (cc.)	Butyl alcohol (cc.)	100% EtOH (cc.)	Eosin	Paraffin oil (cc.)
1	95	5	–	–	–	–
2	90	10	–	–	–	–
3	80	20	–	–	–	–
4	70	30	–	–	–	–
5	50	40	10	–	–	–
6	30	50	20	–	–	–
7	15	50	35	–	–	–
8	5	40	55	–	–	–
9	–	–	75	25	–	–
10	–	–	100	–	Eosin	–
11	–	–	100	–	–	–
12	–	–	50	–	–	50

ดอกไว้ใน tissuemat ที่อุณหภูมิประมาณ 55 – 60°ซ เป็นเวลาประมาณ 3 – 4 ชั่วโมง แล้วเท tissuemat เก่าทิ้ง เท tissuemat ใหม่ลงไปแทน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 55–60°ซอีกประมาณ 3 – 4 ชั่วโมง ทำตามวิธีนี้ต่อไปอีก 4 ครั้ง จึงนำดอกแต่ละพวกมาฝังใน tissuemat (embed) ทำเป็น tissuemat block

นำเอา tissuemat block ที่มีดอกคนทิสอทะเลฝังอยู่เหล่านี้มาตัดแบ่งออกเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ แท่งหนึ่งให้มีดอกอยู่ 1 ดอก แล้วตัดแต่ง (trim) ให้แท่ง block เหล่านี้เป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์

เมื่อตัดแต่ง tissuemat block เรียบร้อยแล้วก็นำเอาไปติดกับ block ของเครื่องตัด sections (Microtome) เรียกว่า objective block ทำการตัด section โดยใช้ rotary microtome จะได้ sections ติดกันเป็นแถบยาว ๆ (Ribbon) แบ่ง ribbon เหล่านี้ออกเป็นส่วน ๆ ให้พอเหมาะกับขนาดสไลด์ ติด sections บนสไลด์โดยใช้ [5]Haupt's adhesive (Johansen, 1940)

ในการเตรียมสไลด์ถาวร (Permanent slides) เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำเป็นสไลด์ต่อเนื่อง (Serial sections) ทั้งหมด และได้ตัดรังไข่ (Ovary) ทั้งตามขวางและตามยาว คือตัดรังไข่ตามขวางพวกละ 10 ดอก พวกที่ 1 มีขนาดกว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 1 มิลลิเมตร และพวกที่ 2 มีขนาดกว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 2 มิลลิเมตร ตัด หนา 5 μ พวกที่ 3 – 6 มีขนาดกว้าง 1 – 2 มิลลิเมตร ยาว 3 – 5 มิลลิเมตร ตัดหนา 8 μ และได้ตัดตามยาวรังไข่พวกละ 15 ดอก พวกที่ 1 และพวกที่ 2 ตัดหนา

---

[4] Tissuemat: ชื่อผึ้งพาราฟินแบบผสมพิเศษของบริษัท Fisher Scientific Co., U.S.A. ชนิดที่ใช้มีจุดหลอมเหลว 55.0°ซ

[5] Haupt's adhesive (Johansen, 1940) ประกอบด้วย

gelatin	1 gm.	glycerin C.P.	15 cc.
phenol crystal	2 gm.	distilled water	100 cc.

5 μ พวกที่ 3 ถึงพวกที่ 6 ตัดหนา 15 μ (ตารางที่ 1)

เมื่ออุนสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ครบ 24 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อยแล้ว นำสไลด์ไปย้อมสี สีที่ใช้ย้อมในการศึกษาครั้งนี้ ย้อมด้วย 3 สี คือ[6] Safranin O, [7] Haidenhain's Iron Hematoxylin และ[8] Orange G

---

[6] Safranin O เตรียมตามวิธีของ Johansen (1940) ดังนี้

Safranin O	4.0	gm.
Methyl cellosolve	200.0	cc.
Ethyl alcohol	100.0	cc.
Sodium acetate	4.0	gm.
Formalin	8.0	cc.

[7] Haidenhain's Iron Hematoxylin ประกอบด้วยสี hematoxylin พวกหนึ่ง และ[7.1] alum เป็น mordant อีกพวกหนึ่ง Haidenhain's Iron Hematoxylin เตรียมตามสูตรของ Johansen (1940) ดังนี้

10% Hematoxylin in absolute alcohol	5.0	cc.
Methyl cellosolve	100.0	cc.
Distilled water	50.0	cc.
Tap water	50.0	cc.
Sodium bicarbonate		เล็กน้อย

[7.1] Alum ใช้ 4 % ferric alum เป็น mordant เตรียมตาม Lang's modification (Sass, 1958) ดังนี้

4% Ferric alum	500.0	cc.
Glacial acetic acid	5.0	cc.
10% Sulfuric acid	6.0	cc.

ขบวนการย้อมสีนั้นดำเนินเป็นขั้น ๆ ตามวิธีของ Johansen (1940) ดังนี้

1. แช่ใน xylol 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที เพื่อละลาย tissuemat ออก

2. แช่ในส่วนผสมอย่างละเท่า ๆ กันของ xylol และ absolute alcohol 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

3. แช่ใน 100 % alcohol 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

4. แช่ใน 70 % alcohol 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

5. แช่ใน 35 % alcohol 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

6. แช่ในน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

7. แช่ใน mordant ซึ่งเป็น 4 % ferric alum ตามสูตรที่กล่าวแล้ว 1 ครั้ง ประมาณ 2 – 3 ชั่วโมง

8. ล้าง mordant ที่สไลด์ออกโดยใช้น้ำที่มีการถ่ายเทตลอดเวลา (Running water) ประมาณ 20 นาที

9. ล้างในน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง

10. แช่ในสี Haidenhain's Iron Hematoxylin ตามสูตรที่กล่าวแล้ว ใช้เวลาประมาณเท่า ๆ กับที่แช่ใน mordant

11. นำสไลด์มา differentiate ด้วย 2 % ferric alum ขณะที่ differentiate ต้องตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

12. เมื่อ differentiate ได้สีขนาดพอดีแล้ว ก็แช่สไลด์ในน้ำที่มีการถ่ายเทตลอดเวลาอีกประมาณ 1 ชั่วโมง

13. แช่ในสี Safranin O ตามสูตรที่กล่าวแล้วเป็นเวลาประมาณ 72 ชั่วโมง (Johansen, 1940 ระบุว่าประมาณ 12 – 15 ชั่วโมง แต่จากการทดลองย้อม ovule

---

[8] สี Orange G เตรียมตาม Johansen (1940) ดังนี้

1% of dye in clove oil

ของคนทิสอทะเล พบว่าใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง จึงติดสีดี)

14. นำสไลด์มา differentiate ด้วย 70 % alcohol ซึ่งทำให้เป็นกรดด้วยกรดเกลือ ซึ่งปกติเวลาที่ใช้ differentiate ไม่เกิน 10 วินาที

15. แช่ใน 50 % alcohol 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

16. แช่ใน 70 % alcohol 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

17. แช่ใน 95 % alcohol 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

18. แช่ใน 100 % alcohol 3 – 4 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

19. เอาสไลด์ขึ้นจาก 100 % alcohol แล้วใช้หลอดหยด (Dropper) หยดสี Orange G บนสไลด์ให้ท่วม sections ทั้งหมด ทิ้งไว้ประมาณไม่เกิน 10 วินาที เทสี Orange G กลับเข้าขวด

20. หยด used clove oil บนสไลด์ เพื่อล้างสี Orange G ที่เกาะอยู่บนสไลด์และผิว ๆ ของ sectionsออกไป แล้วเทกลับที่เดิม

21. หยด pure clove oil บนสไลด์ให้ท่วม sections ให้ทั่ว แล้วเทกลับที่เดิม

22. แช่สไลด์ใน xylol 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

23. Mount สไลด์ด้วย piccolyte

เมื่อเตรียมสไลด์ถาวร (Permanent slides) โดยทำเป็น sections ต่อเนื่อง (Serial sections) เรียบร้อยแล้ว ก็นำเอาสไลด์ไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อติดตามการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลง (Development) ของ embryo sacs และบางส่วนของ ovule