

## อุปกรณ์และวิธีการ (MATERIALS AND METHODS)

ระย้อม (Rauwolfia serpentina Benth.) ที่ใช้ศึกษา ได้นำมาจากสามแห่งด้วยกันคือ ตำบลทุ่งแสงหลวง จังหวัดพิษณุโลก ตำบลท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี และตำบลขลุง จังหวัดกำแพงเพชร การปลูกโคทำโดยนำต้นสดมาปลูกทั้งต้น หรือนำ rhizome มาตัดให้ยาวทอนละ 3 ถึง 5 เซนติเมตร มาชำในดินร่วนปนทรายเล็กน้อย ประมาณ 2 ถึง 3 สัปดาห์ จะมีต้นอ่อนเจริญขึ้นมาเหนือดิน ประมาณ 2 ถึง 3 เดือนต้นจะโตเต็มที่ ต้นระย้อมพวกเดียวกันที่ได้อาศัยศึกษา laticifer นี้ โคทำเป็น herbarium specimen เก็บไว้ที่ herbarium ของแผนกวิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจดู laticifer โคตรวจดูจากลำต้นที่ไม่ใช่ส่วนของดอก (vegetative stem) ใบ ระยะต่าง ๆ กันคือบริเวณที่ยังอ่อนและบริเวณที่เจริญเต็มที่แล้ว และตรวจดูในเมล็ด การตรวจโคใช้การทำ section เป็น serial section เตรียมเป็น permanent slide และทำ whole mount

ในการทำ section เป็นแบบ permanent slide โคที่ดูส่วนที่จะศึกษา คือส่วนลำต้นตั้งแต่ยอดลงมา ส่วนใบที่เจริญเต็มที่แล้ว ตัดให้ยาวประมาณครึ่งนิ้ว การใช้แคลเซียมยวเช่นนี้ เพื่อกันไม่ให้ latex ไหลออกมา มิฉะนั้นจะสังเกต laticifer ใน section ได้ยาก ถ้าเป็นใบอ่อนขนาดเล็กมาก โคใช้จากส่วนที่ตัดมากับยอด ส่วนเมล็ดโคนำมาเช่นว่าประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้เปลือกเมล็ดที่ค่อนข้างแข็งอ่อนตัวลง แล้วแกะเปลือกออก นำส่วนต่าง ๆ เหล่านี้ไป fix ด้วย FAA<sup>1</sup> ซึ่งเตรียมตาม Johansen (1940) कुछอากาศที่อาจจะติดมา ทำให้ material จมในน้ำยาโคได้ แชไว้ในน้ำยานานประมาณ 1 อาทิตย์ การที่ใช้เวลานานเพราะส่วนต่าง ๆ ที่นำมา fix มีขนาดยาว

<sup>1</sup> Formalin-aceto-alcohol ประกอบด้วย 50% ethyl alcohol 90 cc., glacial acetic acid 5 cc., formalin 5 cc.

นำยาจะโคกระจายโคทั่วถึง Dehydrate ด้วย Ethyl-butyl alcohol series<sup>1</sup> Dehydrate ชั้นละประมาณหนึ่งวัน โคใช้เวลานานเนื่องจากเหตุผลเช่นเดียวกับการ fix Embed ใน tissue mat นำ tissue mat ที่มี material ยาวถึงหนึ่งนิ้วมั้งอยู่ มาตัดแบ่งออกเป็นห้าส่วน ทั้งส่วนหัวและท้าย ซึ่งอาจจะมี latex อยู่นอยเสี่ย ถ้าเป็น material ส่วนปลายสุด เช่นปลายยอดของลำต้น ก็ทั้งแต่ส่วนที่ไกลจากปลาย ส่วนที่เหลือตัดด้วย microtome ทั้งตามขวาง (transverse section) และตามยาว (longitudinal section) เพื่อคุดำแหน่ง รูปร่างการเจริญเติบโตและชนิดของ laticifer ส่วนโคตัดตามขวางและคักขนานกับผิวของโค (paradermal section) ทั้งหมคโคคักหนา 10  $\mu$

การ ยอมสีในลำคานที่คักตามยาวโคยอมสองสี<sup>2</sup> ด้วย safranin

---

	Ethyl-butyl alcohol series <sup>1</sup> ประกอบด้วย							
	Dehydrant number							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Distilled water (cc.)	50	30	15	5	-	-	-	-
95% Ethyl alcohol (cc.)	40	50	50	40	25	-	-	-
Butyl alcohol (cc.)	10	20	35	55	75	100	100	50
Eosin (small amount)	-	-	-	-	-	eosin	-	-
Paraffin oil (cc.)	-	-	-	-	-	-	-	50

<sup>2</sup> สองสีที่โคใช้เตรียมคั้งนี้  
 Safranin: โคใช้ safranin 0.4 กรัม methyl cellosolve 200 cc. ethyl alcohol 200 cc., sodium acetate 4 กรัม, formalin 8 cc.  
 Fast green: โคใช้ methyl cellosolve 1 ส่วน, absolute alcohol 1 ส่วน, clove oil 1 ส่วน แล้วใส่สีโคให้คั้น 0.5 %

และ fast green เติรียมตามวิธีของ Johansen (1940), บาง section  
 ขอมสามสี (Triple stains) ตามวิธีที่เรียกว่า Flemming's triple  
 stains<sup>1</sup> และขอมวิธีอื่นอีก คือขอมสี่สีตามวิธีของ Conant's quadruple  
 stains<sup>2</sup> ขอมควาย methyl violet<sup>3</sup> และขอมควาย orange G<sup>4</sup> อย่าง  
 เดียว ส่วนลำดับที่คคตามขวางขอมสองสีคือ safranin และ fast green  
 และขอมควาย orange G อย่างเดียว ส่วนในไมโคขอมสองสีคือ Safranin  
 และ fast green และไมออนที่คคมากับขคขงขอมควาย orange G ก็มี  
 เมล็ดโคลงขอมสามวิธีคคกันคือ Safranin และ fast green Orange G

---

<sup>1</sup> Flemming's triple stain: สามสีที่ใช่ไคแก safranin,  
 crystal violet และ orange G Safranin เติรียมตามวิธีข้างตน  
 Crystal violet เติรียมตามวิธีของ Johansen (1940) คังนี้ 1%  
 ในน้ำกลั่น  
 Orange G เติรียมตามวิธีของ Johansen(1940) คังนี้ 1% ใน clove oil

<sup>2</sup> สี่สีที่ใช่ไคแก safranin, crystal violet, orange G และ  
 fast green. Safranin, crystal violet, orange G และ fast  
 green เติรียมตามวิธีข้างตน

<sup>3</sup> Methyl violet ใช 1% ในน้ำกลั่น

<sup>4</sup> Orange G เติรียมตามวิธีข้างตน

อย่างเคียว และอีกแบบหนึ่งย้อมด้วย Haidenhain's iron haematoxylin<sup>1</sup>

การทำ whole mount เพื่อคุณลักษณะรูปร่างและขนาด laticifer ไคน์ล่าตัน ไบออน ไบเจริธเต็มที มาตัดเป็นท่อน ๆ ให้ยาวท่อนละประมาณ 1 นิ้ว ส่วนไบออนและต้นอ่อนขนาดเล็ก นำมาทั้งต้นและใบ เมล็ดแกะเปลือก นอกที่แข็งออกก่อน นำส่วนที่ต้องการศึกษาเหล่านี้มาตัดกับค่างโปแตสเชื่อมไฮ-คร็อกไซค์เข้มข้น 10% ทมให้เดือดประมาณ 5 ถึง 10 นาที พอให้เนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่ผนังเซลล์บอบบางยุ่ยไป รินค่างออก ล้างน้ำ ย้อมด้วยสี safranin จะเห็น laticifer ชัดเจนขึ้นและทึบสีแดง สำหรับไบออน (young leaf) ไคน์ล่าโตขนาดตั้งแต่ 6 มิลลิเมตร ถึง 15 เซนติเมตร ตัด freehand section ตามขวางควย




---

<sup>1</sup> Haematoxylin เปรียบตามสูตร Johansen (1940) ดังนี้	
10% of haematoxylin in absolute alcohol	5 cc.
Methyl cellosolve	100 cc.
Distilled water	50 cc.
Tap water	50 cc.
Sodium bicarbonate small amount	

ส่วน iron alum ใช้ตาม Lang's modification คือ 4% iron alum 500 cc., glacial acetic acid 5 cc., 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 cc. เมื่อใช้เป็น mordant ตอนแรกใช้ 4% แต่ตอนสำหรับ destaining ใช้ 2%