อุปกรณ์และวิธีการ (MATERIALS AND METHODS)

ในการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลง (development) เริ่มตั้งแต่ระยะที่เป็น zygote จนถึงระยะที่เป็น embryo (คัพภะ) ที่เติบโตเต็มที่ในพุทธรักษา (Canna edulis Linn.) ได้เก็บ ovary จากดอกเกือบบานของพุทธรักษา ขนาดความสูงนับจากฐานถึงปลายยนของ ovary ประมาณ 5 มิลลิเมตร จากต้นในหมู่ที่จะทำการศึกษาต่อไปมา fix ทั้งที่ยังไม่ได้ทำการถ่ายละอองเรณู (pollination) จะเรียกพวกนี้ว่าพวกอายุหลังการถ่ายละอองเรณูศูนย์ (0) วัน คล้ายๆเป็น control(check) ในการทดลองเพื่อไว้เปรียบเทียบ เก็บจำนวน 3 ovary ในวันเดียวกันนั้นได้ทำการถ่ายละอองเรณูโดยนำเรณูหรือละอองเรณู (pollen) ป้ายลงบนยอดเกสรตัวเมีย (stigma) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใน embryo sac ใน ovule ของ ovary เหล่านี้ในลำดับวันต่อๆมา ได้ทำการถ่ายละอองเรณูด้วยมือ (hand pollination) โดยใช้ปากคีบดึงอับเรณู (anther) จากดอกๆหนึ่งออกเสีย (emasculation) เหลือเกสรตัวเมีย (pistil) ไว้กับส่วนอื่นๆของดอกเช่น petaloid staminode **กลีบดอกและกลีบเลี้ยง** ดอกที่อ่อนไปหรือแก่ไปจากขนาดที่ต้องการในช่อดอกหนึ่งๆได้ดึงทิ้งไป แล้วเอาเรณูจากอับเรณูที่กำลังสุกและผนังของอับเรณูแตกแล้วของอีกดอกหนึ่งป้ายบนยอดเกสรตัวเมีย ใช้ถุงผ้าโปร่งคลุมช่อดอกแต่ละช่อ ผูกปากถุงให้มิดชิดเพื่อจะได้ช่วยป้องกันมิให้มีการถ่ายละอองเรณูเพิ่มเติมอีกบางโดยแมลงหรือลมเป็นสื่อ และป้องกันแมลงบางชนิดที่ชอบกินดอกอ่อนๆไม่ให้ไปกัดกินดอกพุทธรักษาด้วย การถ่ายละอองเรณูเช่นนี้เป็นแบบ cross pollination เพราะได้นำมาจากต่างดอกกัน การที่ทำ cross pollination เนื่องจาก embryo sac และอับเรณูในดอกเดียวกันเจริญถึงขั้นเต็มที่ไม่พร้อมกัน ดังที่ ดำรงธรรม (1966) พบว่าขณะที่ดอกยังไม่บานและอับเรณูยังเจริญไม่เต็มที่นั้น embryo sac กลับเจริญเต็มที่พร้อมที่จะผสมได้แล้ว

ได้เก็บ ovary ที่มีอายุ[1] ตั้งแต่หนึ่งวันเป็นต้นไปทุกๆวันจนถึงสิบวัน หลังจากนั้นเก็บทุกๆสองวันจนถึง 22 วันและเก็บอายุ 25 วัน สรุปคือ 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,14,16,18,20,22, และ 25 วันตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อจะได้ทราบถึงการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงใน embryo sac ใน ovule เป็นระยะติดต่อกันไปและ ovary ที่นำมาศึกษามีจำนวน 3,6,4,3,4,31,24,20,5,19,7,25,23,2,6,5, และ 4 ovary ตามลำดับ Ovary หนึ่งๆมีประมาณ 18 ovule เมื่อตัด section จะมีโอกาสสังเกตดูได้หลายๆ ovule

เพื่อความสะดวกในการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้นำ ovary ที่จัดเป็นพวกตามอายุหลังการถ่ายละอองเรณูไปเตรียมทำ section และทำเป็นสไลด์ถาวร (permanent slide) ตามวิธี paraffin method เริ่มด้วยการตัดแต่ง (trim) ovary เหล่านี้ก่อน fix ในน้ำยา คือ ovary ที่มีอายุหลังการถ่ายละอองเรณูน้อยวันคือตั้งแต่อายุศูนย์วันเป็นต้นไปจนถึงเจ็ดวัน ได้ตัดส่วนที่อยู่เหนือ ovary ซึ่งยังไม่หลุดร่วงไปคือ petaloid staminode กลีบดอกและกลีบเลี้ยงทิ้งเสีย และบางอันตัดส่วนฐานและปลายของ ovary บริเวณที่ไม่มี ovule เกาะติดอยู่ทิ้งเสียบ้าง เพื่อว่าจะได้ไม่เปลืองเวลาในการทำ section สำหรับ ovary ที่มีอายุหลังการถ่ายละอองเรณูตั้งแต่แปดวันเป็นต้นไปจนถึงสิบวัน ส่วน petaloid staminode และกลีบดอกหลุดร่วงไปเหลือแต่กลีบเลี้ยง ได้ตัดส่วนกลีบเลี้ยงทิ้งเสียและบางอันตัดส่วนฐานและปลายของ ovary บริเวณที่ไม่มี ovule เกาะติดอยู่ทิ้งเสียเช่นเดียวกัน แล้วนำ ovary เหล่านี้ไป fix ในน้ำยาจำพวก fixative โดยแยก fix ในน้ำยาสองชนิดคือ FAA[2] และ

---

[1] อายุในที่นี้และที่จะใช้ต่อๆไปบางตอนหมายถึงจำนวนวันที่นับหลังจากทำการถ่ายละอองเรณู

[2] FAA (Formalin-Aceto-Alcohol) เตรียมตาม Johansen (1940,p.41) ดังนี้ :- 70%ethyl alcohol 90 cc., glacial acetic acid 5 cc., formalin 5 cc.

Petrunkevitsch's Fluid[1] เพื่อเปรียบเทียบกัน สำหรับ ovary ที่มีอายุหลังการถ่ายละอองเรณูมากวันขึ้นคืออายุ 12 และ 14 วัน มีขนาดของ ovary ค่อนข้างใหญ่ บางอันก็ตัด ovary wall บางส่วนคือส่วนฐาน ส่วนปลาย และ ด้านข้างของ ovary ทิ้งไปบ้าง เพื่อจะได้ส่งวนเนื้อที่บนสไลด์แต่ละแผ่นให้ติด section ได้หลายๆ section ได้ fix ovary เหล่านี้ในน้ำยา Petrunkevitsch's Fluid สำหรับ ovary ที่มีอายุหลังการถ่ายละอองเรณูนานวันคือที่มีอายุตั้งแต่ 16, 18 และ 20 วัน ได้แยกเอาแต่ส่วน ovule[2] ออกมาเป็นอันๆ ใน ovule ที่ยังเห็น integument หรือเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) เป็นสีขาว ได้ตัด integument หรือเปลือกหุ้มเมล็ดออกบ้างบางส่วนเพื่อช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปยังเนื้อเยื่อชั้นที่อยู่ถัดเข้าไปข้างในได้ดีขึ้น นำ ovule เหล่านี้ไป fix ในน้ำยา Petrunkevitsch's Fluid ในเมล็ด (seed) ที่เจริญเต็มที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดเริ่มเป็นสีน้ำตาลซึ่งอยู่ใน ovary ที่มีอายุหลังการถ่ายละอองเรณูตั้งแต่ 22 และ 25 วัน ได้ทำเช่นเดียวกันกับพวกที่มีอายุ 16 ถึง 20 วันบ้าง และได้แกะเอาแต่ส่วน embryo มา fix ต่างหากบ้าง ได้แยกทดลอง fix embryo ในน้ำยาสองชนิดคือ

---

[1]Petrunkevitsch's Fluid เตรียมตาม Johansen (1940, p.41) ดังนี้:-

40% ethyl alcohol	125.0	cc.
Glacial acetic acid	27.5	cc.
Concentrated nitric acid	2.5	cc.
Mercuric chloride	To saturation	

[2]ovule ในที่นี้ถูกผสมแล้ว แต่ยังไม่ได้เจริญเติบโตเต็มที่เป็นเมล็ด (seed) จึงเรียก ovule ไปก่อน

Petrunkevitsch's Fluid และ Modified Navashin Fluid[1] เพื่อเปรียบเทียบกัน การที่ศึกษาในเมล็ดที่เจริญเต็มที่ก็เพื่อต้องการศึกษา embryo ระยะที่เจริญเต็มที่แล้ว

นอกจากนี้ได้แกะเมล็ดที่แก่เต็มที่ซึ่งมีเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีดำจาก ovary ของดอกที่มีอายุหลังการถ่ายละอองเรณูนานวันมากเกินกว่า 25 วันคือประมาณ 38 วัน ซึ่งขณะนี้ได้กลายเป็นผล (fruit) ที่เจริญเต็มที่แล้วจนแห้งเหี่ยวติดกับต้น เปลือกหุ้มเมล็ดในระยะนี้แข็งมากจนไม่อาจกระเทาะเปลือกนี้ออกเพื่อแกะ embryo ที่เติบโตเต็มที่ออกจากเมล็ดได้ จึงนำเมล็ดเหล่านี้มาล้างด้วยน้ำยา mercuric chloride[2] แช่ในน้ำยานี้เป็นเวลาหนึ่งนาทีเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้งๆละหนึ่งนาทีเพื่อล้างน้ำยาฆ่าเชื้อออกให้หมด ฝานเปลือกหุ้มเมล็ดให้หลุดออกไปเป็นเศษเล็กๆสักหนึ่งแห่ง เพื่อเป็นทางให้น้ำซึมเข้าในเนื้อเยื่อชั้นที่อยู่ถัดเข้าไปข้างในของเมล็ดได้ดีขึ้น นำเมล็ดนี้แช่ในน้ำ วางไว้บนภาชนะที่อุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซนติเกรดเป็นเวลาหนึ่งคืน (overnight) ดึงเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกซึ่งเปื่อยยุ่ยออกแล้วแกะเอาแต่ส่วนที่เป็น embryo ออกมาจากเมล็ดสองเมล็ดด้วยกัน ตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้อง binocular microscope เพื่อศึกษาเกี่ยวกับ embryo ที่เจริญเต็มที่อยู่กับต้น อีกสองเมล็ดได้แช่น้ำต่อไป

---

[1] Modified Navashin Fluid เตรียมดังนี้ :-

Solution A:	Chromic acid	1.5	g.
	Glacial acetic acid	10	cc.
	Distilled water	90	cc.
Solution B:	Neutral formalin	40	cc.
	Distilled water	60	cc.

[2] Mercuric chloride (1:1000) เตรียมดังนี้ :-

Mercuric chloride 1 g. ต่อน้ำกลั่น 1000 cc.

แต่ได้ผ่านเปลือกหุ้มเมล็ดที่เหลือออกให้เป็นแผลหลายๆแห่งอย่างที่เห็นที่เปลือกหุ้มเมล็ดของภาพที่ 43 เพื่อช่วยให้น้ำซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อชั้นที่อยู่ถัดเข้าไปข้างในของเมล็ดได้ดีและเร็วยิ่งขึ้น ตัดเนื้อเยื่อของเมล็ดส่วนที่อยู่ตรง micropyle ออกเสียบ้างเพื่อช่วยให้ embryo งอกออกมาจากเมล็ดได้เร็วขึ้น นำเมล็ดเหล่านี้แช่ในน้ำอุ่นวางบนภาชนะที่มีอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซนติเกรดต่อไปอีกสี่วัน เมื่อ embryo เริ่มงอกและโผลออกมานอกเมล็ดประมาณ 5 มิลลิเมตร ได้แกะเอาเฉพาะ embryo ในระยะนี้ทั้งอันออกมาจากเมล็ด วัดความยาวทั้ง embryo ที่กำลังงอก (germinating embryo) ได้ยาว 1.2 เซนติเมตร นำไป fix ในน้ำยา Modified Navashin Fluid เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงบางอย่างและตรวจสอบส่วน organ บางอย่าง ในตอนบรรยายผลจากการสังเกตจะเรียกระยะนี้ว่า embryo ที่กำลังงอกยาว 1.2 เซนติเมตร

นอกจากนั้นยังได้เพาะเมล็ดพุทธรักษาให้เจริญจนเป็น seedling (ต้นอ่อน) เล็กๆ โดยทำเหมือนข้างบนจน embryo ที่กำลังงอกยื่นบางส่วนโผล่พ้นออกมาจากเมล็ดได้ประมาณ 5 มิลลิเมตรแล้วนั้นไปวางบนสำลีบน petridish คอยระวังให้สำลีอิ่มตัวด้วยน้ำอยู่เสมอ เปิดฝา petridish ไว้และวางไว้ในที่มีแสงสว่างคอยสังเกตส่วนที่งอกออกมาของ seedling (ภาพที่ 43-46) เมื่อมีรากงอกออกมาหลายๆอัน ได้ใช้สำลีคลุมทับรากไว้เพื่อไม่ให้รากเหี่ยวแห้งไป ได้ลองเพาะอย่างนี้สามครั้งรวม 34 เมล็ด

Material ที่fix ในน้ำยา FAA หลังจากแช่ไว้ 48 ชั่วโมง นำมา dehydrate (ดูดน้ำออก)ด้วย Ethyl-Butyl Alcohol Series[1] เปลี่ยน material จาก dehydrant(น้ำยาดูดน้ำ)แต่ละอย่างเป็นขั้นๆ เริ่มจาก dehydrant หมายเลขห้าถึงหมายเลข 12 โดยแช่ material ใน dehydrant ขั้นละสองชั่วโมงแล้ว embedใน tissuemat

Material ที่ fixในน้ำยา Petrunkevitsch's Fluid หลังจาก แช่ไว้ 16 ชั่วโมง นำมา dehydrateด้วย Ethyl-Butyl Alcohol Series

---

[1]Ethyl-Butyl Alcohol Series เตรียมตามสัดส่วนต่างๆกัน 12 อย่าง ดังนี้:-

Dehydrant number	Distilled water(cc.)	95%EtOH (cc.)	Butyl alc. (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

โดยเริ่มจาก dehydrant หมายเลขหนึ่งถึงหมายเลข 12 เปลี่ยน material จาก dehydrant แต่ละอย่างเป็นขั้นๆโดยแช่material ใน dehydrant ขั้นละสองชั่วโมงแล้ว embed ใน tissuemat

Material ที่ fix ในน้ำยาModified Navashin Fluid แล้วประมาณ 16 ชั่วโมง Dehydrate ด้วยEthyl-Butly Alcohol Series ทำเช่นเดียวกับ material ที่แช่ในน้ำยาFAA ทุกประการและ embed ใน tissuemat เช่นกัน

ในการเตรียมsection ได้ทำเป็น serial sectionทั้งหมด ได้ตัด ovary ของพุทธรักษาตามขวาง (transverse section) ความหนาที่ตัดแล้วแต่อายุของ ovary คือ ovaryที่มีอายุหลังการถ่ายละอองเรณูตั้งแต่หนึ่งวันเป็นต้นไปจนถึงสิบวัน ตัดตามขวางหนา 15 μ (micron) ovary ที่มีอายุหลังการถ่ายละอองเรณูตั้งแต่ 12 วันถึง 14 วัน ตัดตามขวางหนา 18 μ Ovule ที่ได้แยกออกมาจาก ovary อายุหลังการถ่ายละอองเรณู 16 ถึง 20 วัน ได้ตัดตามยาว (longitudinal section) ของovule หนาประมาณ 18-20 μ ตามความแกออนของ ovule Embryo ที่ถูกแยกออกมาเป็นอันๆจาก seed ใน ovary ที่มีอายุหลังการถ่ายละอองเรณูตั้งแต่22 วันถึง25 วัน นั้นได้ตัดตามยาวของ embryo หนา 15 μ Embryoจากเมล็ดในผลที่มีอายุประมาณ38 วันซึ่งได้เจริญเต็มที่จนแห้งติดกับต้นซึ่งฝานเปลือกหุ้มเมล็ดออกแช่น้ำ 1 คืน และเพาะจนมีส่วนยื่นพ้นเมล็ดไป5 มิลลิเมตร วัดระเพาะ embryo ที่กำลังงอก ได้ยาว 1.2 เซนติเมตรนั้นได้ตัดตามยาวของ embryo หนา 10 μ ติด section เหล่านี้ลงบนแผ่นสไลด์เป็นลำดับ (series) โดยใช้Haupt's adhesive[1] แล้วนำไปย้อมสีสามวิธี คือ

---

[1]Haupt's adhesive เตรียมตาม Johansen(1940,p.20) ดังนี้:- Knox gelatin 1g., phenol crystal 2g., glycerin c.p. 15 cc. และน้ำกลั่น 100 cc.

ย้อมสองสี[1] ด้วย Safranin และ Fast green ซึ่งพบว่าไม่ดีจึงเลิกใช้แล้วได้ใช้สามสี[2] คือ Heidenhain's Iron Hematoxylin, Safranin และ Orange G แทน ใน ovary อายุศูนย์ (0) วันถึง 12 วันหลังจากนั้น

---

[1]สองสี (Safranin-Fast green สีที่ใช้เตรียมดังนี้ :-

Safranin เตรียมตามวิธีของ Johansen(1940,p.62) ประกอบด้วย safranin O 4 g. , methyl cellosolve 200cc. , 95%ethyl alcohol 100 cc. , sodium acetate 4 g. และ formalin 8 cc.

Fast green เตรียมตามวิธีของ Johansen (1940, p.59) ประกอบด้วย methyl cellosolve 1 ส่วน , absolute alcohol 1 ส่วน, clove oil 1 ส่วน และ fast green 0.5%

[2]สามสี (Heidenhain's Iron Hematoxylin, Safranin, Orange G) สีที่ใช้เตรียมดังนี้ :-

Heidenhain's Iron Hematoxylin ประกอบด้วยสี hematoxylin พวกหนึ่งและ alum เป็น mordant อีกพวกหนึ่ง เตรียมดังนี้:-

Hematoxylin เตรียมตามสูตรของ Johansen (1940,p.51) ประกอบด้วย 10% hematoxylin in absolute alcohol 5 g. , methyl cellosolve 100 cc. , distilled water 50 cc. , tap water 50 cc. และ sodium bicarbonate crystal จำนวนเล็กน้อย (small amount)

Alum ใช้ 4% ferric alum เป็น mordant เตรียมตามสูตรของ Lang(Lang's modification) ตาม Sass(1958,p.58) ประกอบด้วย 4% iron alum 500 cc. ,acetic acid(glacial) 5 cc. และ 10% sulfuric acid 6 cc. และได้เตรียม 2% ferric alum ไว้ destain สีที่แก่เกินไป

Safranin เตรียมเหมือนที่กล่าวในตอนต้น

Orange G เตรียมตาม Johansen(1940,p.61) ประกอบด้วย 1% of dye in clove oil

ใช้ย้อมสองสี[1] แต่ใช้สีอื่นคือ Heidenhain's Iron Hematoxylin และ Safranin Mount ใน piccolyte ที่ละลายใน xylene ตรวจดู section ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สำหรับ embryo ที่ต้องการศึกษาเกี่ยวกับส่วนต่างๆที่กำลังงอกออกมาจากต้นอ่อนนั้น ไม่ได้ทำเป็น section แต่ได้สังเกตส่วนต่างๆของต้นอ่อนด้วยตาเปล่า และได้ศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงของ embryo เป็นต้นอ่อนโดยบันทึกเป็นจำนวนวันของระยะการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไว้ด้วย

นอกจากนี้ได้แกะ embryo จากเมล็ดอายุ 22และ 25 วันหลังการถ่ายละอองเรณู โดยใช้ใบมีดโกนค่อยๆผ่าเมล็ดทางด้าน chalazal end ซึ่งเป็นด้านที่โป่งเป็นสัน ให้ลึกพอที่จะใช้ใบมีดงัดเนื้อของเมล็ดออกได้ แต่ต้องไม่ให้ลึกมากเพื่อไม่ให้ใบมีดผ่าเอา embryo เข้า เขี่ยเอา embryo ออกมาทั้งอัน ดูส่วนต่างๆของ embryo ภายใต้กล้องสองตา (binocular microscope)

---

[1] สองสี (Heidenhain's Iron Hematoxylin-Safranin) สีที่ใช้เตรียมได้ดังนี้ :-

Heidenhain's Iron Hematoxylin เตรียมเหมือนที่ใช้ย้อมสามสี

Safranin เตรียมเหมือนที่กล่าวถึงในตอนต้น