

บทความวิจัย (Research Article)**การเตรียมสีธรรมชาติอย่างง่ายจากผลสุกมะม่วงหาวมะนาวโห่สำหรับการย้อมโครโมโซมพืช**

เนรฐชลา สุวรรณคอนธ์^{1*}, กรรณิกา ทองพูล¹, ศิริพร ไส้เขียว¹, สิริมา เก้าหลิม¹ และ เสาวลักษณ์ บุญมา¹

Simple preparation of natural dye from *Carissa caranda* L. for plant chromosome staining

Narutchala Suwannakhon^{1*}, Kannika Thongphul¹, Siriporn Laikhia¹, Sirima Kaolim¹ and Saowalak Bunma¹

¹ Biology Program, School of Science, University of Phayao, Phayao, 56000

* Corresponding author: narutchala@gmail.com

Naresuan Phayao J. 2022;15(1):90-98

Received: 29 January 2021; Revised: 4 April 2021; Accepted: 30 September 2021

บทคัดย่อ

สีย้อมสังเคราะห์มีราคาแพง เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ กระบวนการผลิตสีย้อมสังเคราะห์ยังมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นความปลอดภัย ความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การลดต้นทุนและหาได้ง่ายในท้องถิ่นเป็นแรงจูงใจในการหาสีย้อมธรรมชาติจากพืชท้องถิ่น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการเตรียมสีย้อมอย่างง่ายและขั้นตอนในการย้อมโครโมโซมของหอม (*Allium ascalonicum* L.) ด้วยสีย้อมจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa caranda* L.) โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ทุกขั้นตอนในการเตรียมสีย้อมจากผลสุกมะม่วงหาวมะนาวโห่มีความเหมาะสมต่อการย้อมปลายรากหอม นอกจากนี้ไม่มีตัวทำลายที่เป็นพิษในการเตรียมสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่ วิธีมาตรฐาน คือวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการย้อมสีปลายรากหอม เมื่อย้อมปลายรากหอมที่เวลา 30-150 นาที ยังคงไม่มีการติดสีส่วนไซโทพลาสซึม สีย้อมคงสภาพเป็นระยะเวลา 2 เดือน หลังจากการเตรียม ช่วง pH 1-3 ของสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส อัตราส่วนของสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อน้ำที่สามารถย้อมสีโครโมโซมรากหอมได้ดี คืออัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:5 วิธีการเตรียมสีย้อมที่ดีที่สุดคือการกรองจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 rpm และ 1,400 rpm นาน 20 นาที สีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่สามารถใช้ในการย้อมสีโครโมโซมพืชได้ นอกจากนี้สีย้อมนี้ยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ปลอดภัย และต้นทุนต่ำ

คำสำคัญ: สีธรรมชาติ, การย้อมสีโครโมโซม, มะม่วงหาวมะนาวโห่

¹ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

Abstract

Synthetic dyes are expensive and hazardous to human and animal health. The production processes of synthetic dyes have the toxicity for environment. Thus, eco-friendliness, personal safety, cost reduction, and local availability are motivation to find natural dyes from local plant resources. This study aims to determine simple procedures for preparing dye and staining procedures of shallot (*Allium ascalonicum* L.) chromosomes by using Karanda (*Carissa caranda* L.) dye comparing with standard methods. All preparation procedures of ripe Karanda dye were suitable for staining shallot root tip. Moreover, toxic solvent was not added in Karanda dye preparation methods. The standard staining procedures were the best for staining shallot root tip. The color of cytoplasm did not change even when the shallot root tip samples were stained for 30–150 minutes. The dye stability was two months after preparation. The pH ranges from 1 to 3 of karanda dye was suitable for mitotic study. The good ratios of Karanda dye to water for staining shallot chromosomes were 1:1, 1:2, and 1:5. We suggested that the best procedures for preparing dye was to filter the dye through straining cloth and then centrifuge at 5200 rpm and 14000 rpm for 20 minutes. Karanda dye could be used for staining plant chromosomes. In addition, the dye was eco-friendly, non-toxic, and inexpensive.

Keywords: Natural dye, Chromosome staining, *Carissa caranda*

บทนำ

ในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาทางด้านชีววิทยา โดยเฉพาะการศึกษาเพื่อสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมภายในเซลล์ สีสั่งเคราะห์ที่นิยมใช้ศึกษาโครโมโซม เช่น aceto-carmin, aceto-orcin และ Giemsa's เนื่องจากสีสังเคราะห์มีความเสถียร มีการติดสีได้ดี มีความคงทน การใช้งานมีความสะดวก รวดเร็ว แต่สีสังเคราะห์มีขั้นตอนการผลิตและการเตรียมสีที่มีการเติมสารที่ก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพ สิ่งแวดล้อม และราคาแพง จึงมีการนำสีธรรมชาติมาใช้มากขึ้น เช่น ใช้ทำสีผสมอาหาร ยา เครื่องสำอาง สิ่งทอ และการย้อมสีเพื่อศึกษาด้านชีววิทยา อาทิ การใช้สีธรรมชาติจากขิงในการย้อมเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ การใช้สีธรรมชาติจากพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำในการย้อมสีเพื่อศึกษากายวิภาคของอสุจิมนุษย์ [1-5] สำหรับการย้อมสีโครโมโซมพืชด้วยสีธรรมชาติที่สกัดแอนโทไซยานินจากข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* L.) ครั้ง (*Kerria lacca* Kerr) และผลหม่อน (*Morus alba* L.) นำมาใช้เป็นสีย้อมโครโมโซมเพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์ในรากหอมได้ โดยใช้สารสกัด 45% acetic acid และ 95% ethanol [2,6,7] สารแอนโทไซยานิน ของผลหม่อนที่

สกัดด้วย 0.1% HCl ใน methanol และมะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa caranda* L.) ที่สกัดด้วย 95% ethanol สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้อย่างชัดเจน [8] มะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae ผลในแต่ละระยะมีการสกัดได้ปริมาณแอนโทไซยานินต่างกัน โดยในผลสุกงอมพบปริมาณแอนโทไซยานินชนิดไซยานิดิน (Cyanidin) และเพลาโกรีนิดิน (Pelargonidin) รวมกันปริมาณมากถึง 338 มิลลิกรัมต่อ 50 กรัมของน้ำหนักแห้ง [9]

สำหรับการย้อมสีโครโมโซมพืชจากสีย้อมธรรมชาติจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการย้อมสีและการย้อมติดสีของโครโมโซมที่ดี เห็นได้ว่าขั้นตอนในการย้อมสียังคงมีการใช้สารที่เป็นพิษเป็นส่วนประกอบในการเตรียมสี ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญของการใช้สีย้อมจากธรรมชาติโดยมีวิธีเตรียมที่ง่าย รวดเร็วและลดการใช้สารที่เป็นพิษในการเตรียมสีย้อมมาใช้ในการย้อมเซลล์เพื่อศึกษาพฤติกรรมของโครโมโซมในการแบ่งเซลล์ของรากหอมโดยใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่เป็นพืชที่ปลูกในท้องถิ่นของประเทศไทยมาย้อมเซลล์รากหอม

วัสดุและวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างพืช

หอมแดง: ตัดรากเก่าทิ้งแล้วแช่น้ำเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นตัดปลายรากหอมยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ล้างน้ำก่อนนำไปกองสภาพด้วยสารละลายคาร์โนย (Carnoy's solution) และเก็บรากไว้ใน 70 % ethanol

มะม่วงหาวมะนาวโห่: เก็บผลสุกแล้วล้างด้วยน้ำประปาเพื่อล้างสิ่งสกปรกออก เช็ดให้แห้งจากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาเตรียมสีย้อม ก่อนนำมาเตรียมสีย้อมให้นำเมล็ดออกและบดให้ละเอียด

2. การย้อมสีรากหอมด้วย aceto-carmin (C)

แช่รากหอมใน 1 N HCl เป็นเวลา 5-10 นาที ตูบกรดทั้ง แช่รากหอมในสี aceto-carmin เป็นเวลา 15-30 นาที จนรากหอมติดสีดี นำรากหอมมาเตรียมสไลด์ด้วยเทคนิค squash นำสไลด์ที่ได้ตรวจสอบการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Olympus) และถ่ายภาพที่กำลังขยาย 10x และ 40x ของเลนส์ใกล้วัตถุ ให้คะแนนการย้อมสีโดยผู้ทดสอบ 3 คน

3. การย้อมสีรากหอมด้วย Feulgen staining

ใส่ 10% HCl ที่เย็นลงในรากหอม แช่ทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที แล้วนำปลายรากมาแช่ใน 10% HCl ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3-5 นาที จากนั้นล้างปลายรากด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วแช่ปลายรากในสี Feulgen เป็นเวลา 30 นาทีแล้วตัดปลายรากบริเวณที่ติดสีเข้มกว่าส่วนอื่นวางบนสไลด์ เตรียมสไลด์ด้วยเทคนิค squash นำสไลด์ที่ได้ตรวจสอบการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Olympus) และถ่ายภาพที่กำลังขยาย 100x ของเลนส์ใกล้วัตถุ ให้คะแนนการย้อมสีโดยผู้ทดสอบ 3 คน

4. การเตรียมสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่

นำมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่เก็บไว้ มาเตรียมสีย้อมตามวิธีการต่าง ๆ ดังนี้ (1) กรองด้วยผ้าขาวบาง (2) กรองด้วยผ้าขาวบางและกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (3) กรองด้วยผ้าขาวบางและปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 RPM นาน 20 นาที (4) กรองด้วยผ้าขาวบางและปั่น

เหวี่ยงที่ 14,000 RPM นาน 20 นาที (5) กรองด้วยผ้าขาวบางปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 RPM 20 นาที และ 14,000 RPM นาน 20 นาที จากนั้นเก็บสีย้อมที่เตรียมได้ไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะนำมาย้อมรากหอมตามขั้นตอนการย้อมสี aceto-carmin ทำการย้อมสีซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และเตรียมสไลด์รากหอมโดยเทคนิค squash นำสไลด์ที่ได้ตรวจสอบการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Olympus) และถ่ายภาพที่กำลังขยาย 10x และ 40x ของเลนส์ใกล้วัตถุให้คะแนนการย้อมสีโดยผู้ทดสอบ 3 คน เพื่อทำการคิดเป็นค่าเฉลี่ยคะแนนการย้อมติดสี เทียบกับสีย้อม aceto-carmin

5. การศึกษาการย้อมสีมะม่วงหาวมะนาวโห่

ใช้สีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่ตามวิธีการที่มีคะแนนเฉลี่ยมากสุดในข้อ 4 มาทำการศึกษาค้นคว้าขั้นตอนการย้อมสีโดยมีชุดการทดสอบดังนี้ 1) ขั้นตอนมาตรฐาน คือ การย้อมสีโดยแช่กรดและให้ความร้อน ใส่สไลด์แต่ไม่ให้ความร้อน 2) การย้อมสีโดยแช่กรดแต่ไม่ให้ความร้อน ใส่สไลด์และให้ความร้อน 3) การย้อมสีโดยแช่กรดแต่ไม่ให้ความร้อน ใส่สไลด์แต่ไม่ให้ความร้อน 4) การย้อมสีโดยไม่แช่กรด ใส่สไลด์และให้ความร้อน 5) การย้อมสีโดยไม่แช่กรด ใส่สไลด์แต่ไม่ให้ความร้อน เตรียมสไลด์ด้วยเทคนิค squash ในการศึกษาผลระยะเวลาของเซลล์รากหอมหลังจากการย้อมสีโดยเมื่อทำการย้อมตามวิธีมาตรฐาน จากนั้นทำการทิ้งให้รากหอมอยู่ในสีย้อมเป็นเวลาดังนี้ 30 นาที 90 นาที 150 นาที 210 นาที 270 นาที และค้างคืน เมื่อครบแต่ละช่วงเวลานำรากหอมมาทำการเตรียมสไลด์ ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาสีต่อการย้อมด้วยสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่โดยทำการย้อมเซลล์รากหอมและเตรียมสไลด์ต่อเนื่องทุกสัปดาห์จนครบเวลา 4 เดือน สีที่ใช้ถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลของ pH ต่อการย้อมสีทำได้โดยนำสีที่เตรียมมาทำการวัดค่า pH ของสี จากนั้นทำการปรับค่า pH ตั้งแต่ 1-8 ด้วยกระดาษวัดค่า pH แล้วนำมาย้อมสีตามวิธีมาตรฐาน เตรียมสไลด์ และการศึกษาปริมาณของสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อการติดสีของเซลล์รากหอม เตรียมสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่ในชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ตามข้อ 4 พร้อมกับน้ำในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน คือ 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยทุก

การศึกษาทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับสีย้อม aceto-carmin โดยทำการให้คะแนนการย้อมสีจากผู้ทดสอบที่มีความชำนาญ 3 ท่าน โดยดัดแปลงจาก Bondoc ในปี ค.ศ. 2018 [10] โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนการย้อมสี aceto-carmin ดังนี้

- 4 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซมชัดเจน
ติดสีไซโตพลาสซึมจาง
- 3 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซมชัดเจน
ติดสีไซโตพลาสซึมเข้ม
- 2 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซม
ค่อนข้างชัดเจน
- 1 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซม
ไม่ชัดเจน
- 0 คะแนน หมายถึง ไม่ติดสีโครโมโซม
ไม่ติดสีไซโตพลาสซึม

6. การใช้สีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่สำหรับการศึกษาแคโรไทป์ (Karyotype)

นำรากหอมที่เตรียมโดยการใช้ 0.2% w/v colchicine ย้อมด้วยสีมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยสีย้อมของชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยเปรียบเทียบการย้อมกับสี aceto-carmin และสี Feulgen โดยทำการย้อมสีตามข้อ 2 และ 3 ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และให้คะแนนการย้อมสี โดยผู้ทดสอบที่มี

ความชำนาญ 3 ท่าน โดยดัดแปลงจาก Bondoc ในปี ค.ศ. 2018 [10] เพื่อทำการคิดเป็นค่าเฉลี่ยคะแนนการย้อมติดสี โดยใช้เกณฑ์การให้คะแนนตามการย้อมสี Feulgen ดังนี้

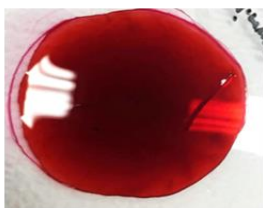
- 3 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซมชัดเจน
ติดสีไซโตพลาสซึมใส
- 2 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซมชัดเจน
ติดสีไซโตพลาสซึมเข้ม
- 1 คะแนน หมายถึง ไม่ติดสีโครโมโซม
ไม่ติดสีไซโตพลาสซึม

ผลการศึกษา

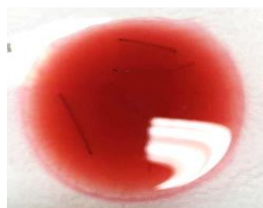
1. วิธีการเตรียมสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่

ลักษณะของสีย้อมที่ได้จากผลสุกมะม่วงหาวมะนาวโห่จะได้สารที่มีสีแดงถึงชมพูเข้ม สีที่ได้มีลักษณะคล้ายกับสี aceto-carmin ซึ่งมีสีส้มถึงสีแดงเข้ม ดังภาพ 1 ก ในวิธีการเตรียมสีย้อมที่ทำการทดสอบทุกวิธีการสามารถให้ผลการติดสีย้อมได้ โดยการเตรียมสีด้วยการกรองด้วยผ้าขาวบางตามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,200 RPM นาน 20 นาที และ 14,000 RPM นาน 20 นาที มีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 3 ± 0 ซึ่งใกล้เคียงการย้อมสี aceto-carmin (4 ± 0) โดยการเตรียมสีด้วยวิธีการที่เหลื่อมมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากัน (2 ± 0) คะแนนเฉลี่ยการติดสีของวิธีการต่าง ๆ (ภาพ 1ข)

ก



คาร์มิน



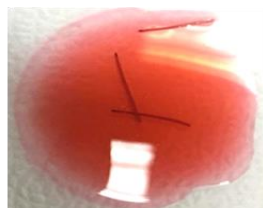
กรองด้วยผ้าขาวบาง (D)



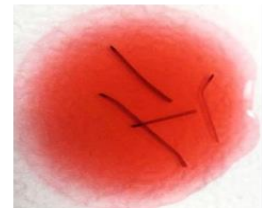
กรองด้วยผ้าขาวบางและกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1



กรองด้วยผ้าขาวบาง และปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 RPM นาน 20 นาที

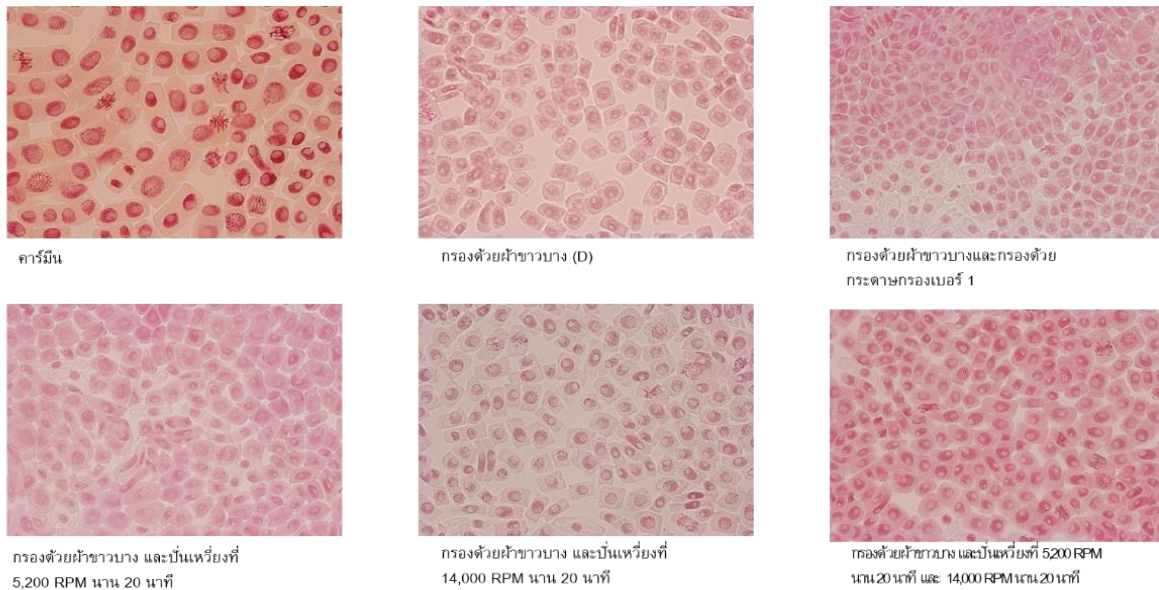


กรองด้วยผ้าขาวบาง และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 RPM นาน 20 นาที



กรองด้วยผ้าขาวบาง และปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 RPM นาน 20 นาที และ 14,000 RPM นาน 20 นาที

ข



ภาพ 1 ลักษณะของสีย้อมที่ได้จากการเตรียมแต่ละวิธี (ก)

ลักษณะการติดสีย้อมของรากหอมจากการเตรียมสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่ตามวิธีการต่าง ๆ (ข)

2. การศึกษาการย้อมสีมะม่วงหาวมะนาวโห่

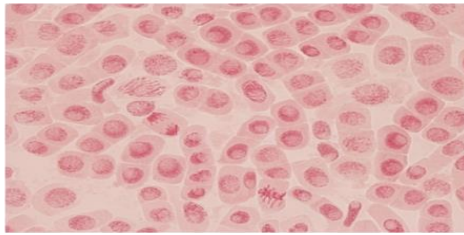
วิธีการย้อมสีมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ให้ผลดี คือ ย้อมตามวิธีการมาตรฐาน (3.33 ± 0.58) และย้อมด้วยการแช่กรดให้ความร้อน ใส่สีแต่ไม่ให้ความร้อนมีคะแนนใกล้เคียงกับการย้อมด้วยสี aceto-carmine (4.00 ± 0.00) มีการติดสีย้อมที่ชัดเจนสามารถจำแนกระยะของการแบ่งเซลล์ได้ ขณะที่เมื่อไม่แช่รากหอมในการดกก่อนการย้อมสีมีคะแนนการติดสีต่ำสุดทั้งที่ย้อมด้วยสี aceto-carmine และสีมะม่วงหาวมะนาวโห่ มีคะแนนเฉลี่ย เท่ากับ 1.00 ± 0.00 ทั้งคู่ เซลล์รากหอมมีการติดสีย้อมไม่ดีและมีการซ้อนทับกันไม่สามารถจำแนกระยะได้ (ภาพ 2 ก) หลังจากย้อมสีเมื่อทิ้งให้รากหอมแช่ในสีย้อมเป็นระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าในการแช่สีก่อนนำมาเตรียมสไลด์สำหรับสี aceto-carmine และสีมะม่วงหาวมะนาวโห่ คือตั้งแต่เวลาที่ 30 นาที ถึง 4 ชั่วโมง มีการติดสีโครโมโซมชัดเจน และจะเริ่มติดสีส่วนไซโตพลาสซึมเข้มมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยมีคะแนนการติดสี aceto-carmine สูงสุด คือ 3.67 ± 0.50 ต่ำสุด คือ 3.00 ± 0.33 ในส่วนของสีมะม่วง

หาวมะนาวโห่มีคะแนนการติดสีสูงสุด 3.56 ± 0.88 ต่ำสุด 2.11 ± 0.33 (ภาพ 2 ข) สำหรับระยะเวลาในการเก็บรักษาสีย้อมหลังจากการเตรียมสี พบว่าสีย้อมมีประสิทธิภาพในการติดสีโครโมโซมที่ดีจะอยู่ในช่วงระยะเวลาในการเก็บ 2 เดือน ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นสีมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปเกิดเชื้อราและตะกอนขึ้น สำหรับผลค่า pH ต่อการติดสีย้อมพบว่า ที่ pH เป็นกรดสีมะม่วงหาวมะนาวโห่มีสีแดงเข้มและที่ pH เป็นด่างจะค่อยเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือน้ำเงินเข้ม โดย pH 1, 2 และ 3 เซลล์รากหอมมีการติดสีที่ใกล้เคียงกับสี aceto-carmine มีคะแนนการติดสี 4.00 ± 0.00 , 3.56 ± 0.88 และ 3.00 ± 0.33 ตามลำดับ (ภาพ 3) สำหรับการศึกษาการเจือจางของสีย้อม (1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20) พบว่าสี aceto-carmine มีการติดสีย้อมที่ชัดเจน (4.00 ± 0.00) ทุกอัตราส่วน ส่วนสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่มีการติดสีที่ชัดเจนในสีที่มีการเจือจางในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:5 (4.00 ± 0.00) ในอัตราส่วนที่เจือจางมากสีย้อมมีการติดสีโครโมโซมไม่ชัดเจน จนไม่ติดสีย้อมเลย

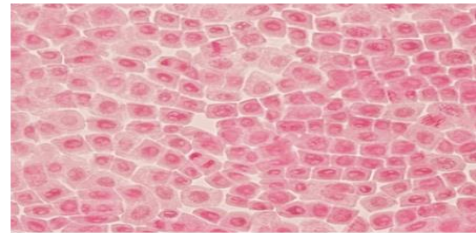
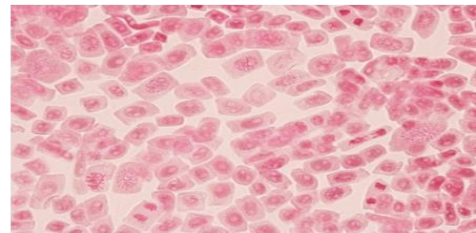
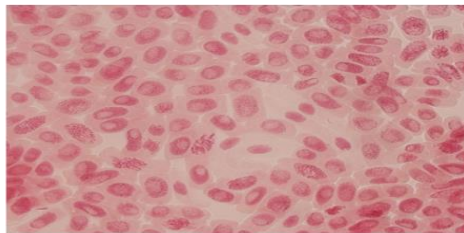
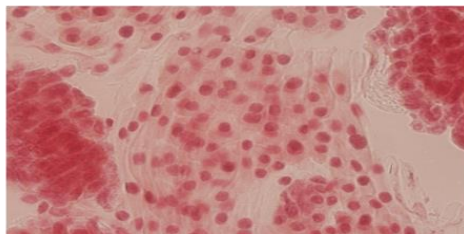
ก

วิธีมาตรฐาน

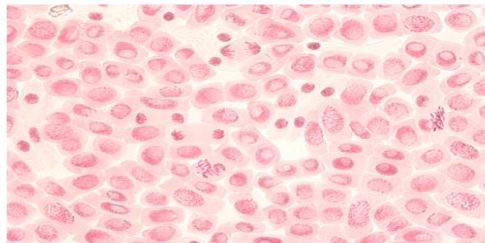
คาร์มิน



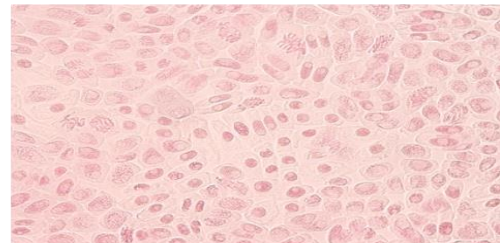
มะม่วงหาวมะนาวโห่

แช่กรดให้ความร้อน
ใส่สีไม่ให้ความร้อนไม่ใส่กรด
ใส่สีไม่ให้ความร้อน

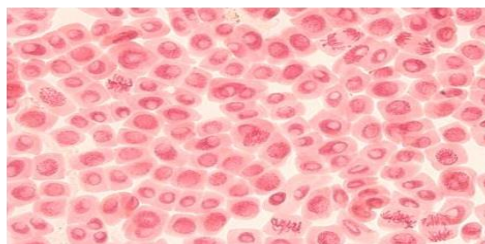
ข



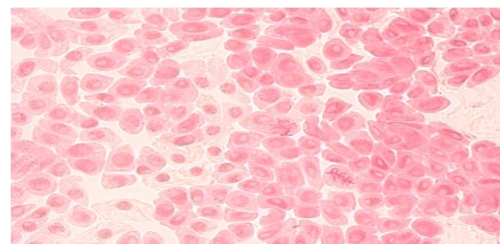
คาร์มิน 30 นาที



มะม่วงหาวมะนาวโห่ 30 นาที

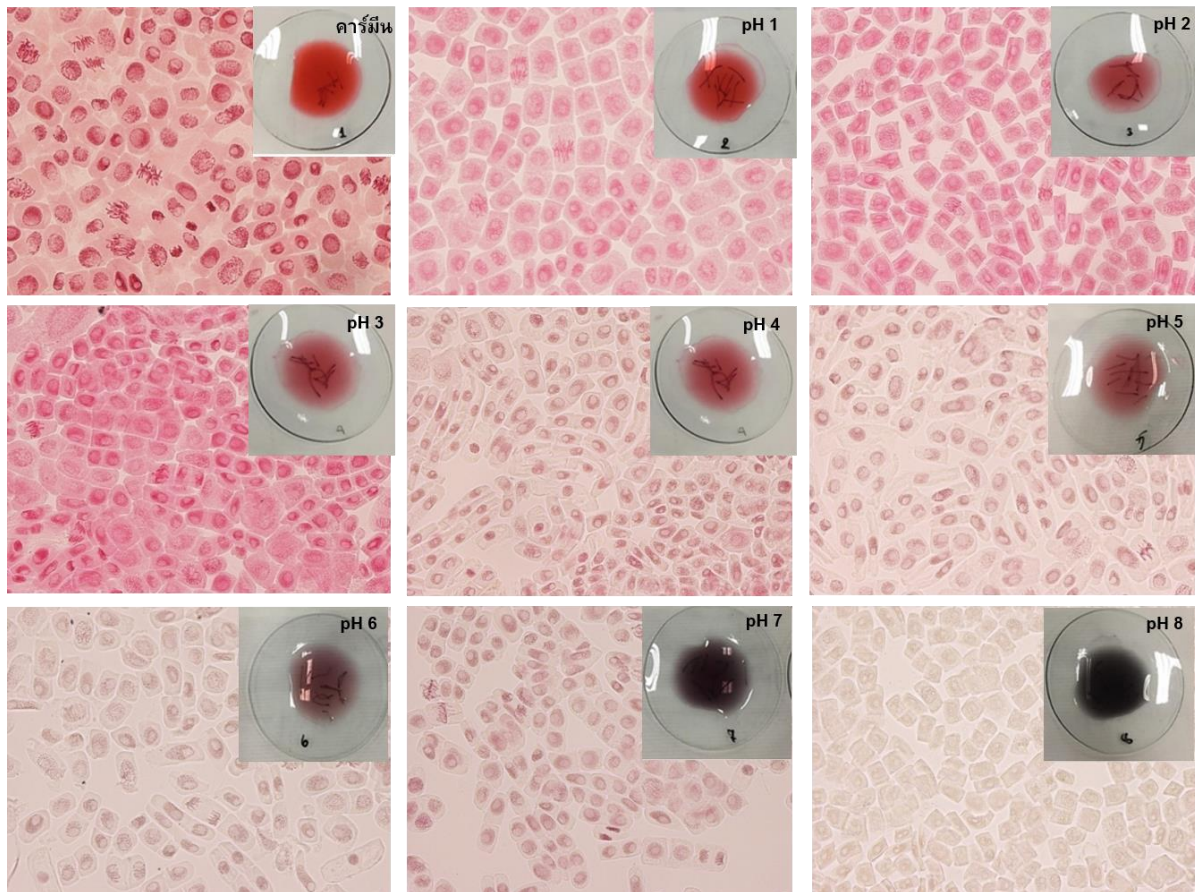


คาร์มิน ค้างคืน



มะม่วงหาวมะนาวโห่ ค้างคืน

ภาพ 2 ผลการศึกษาขั้นตอนการย้อมสีมะม่วงหาวมะนาวโห่ (ก)
ผลของระยะเวลาที่รากหอมแช่ในสีย้อมหลังจากผ่านขั้นตอนการย้อมสี (ข)

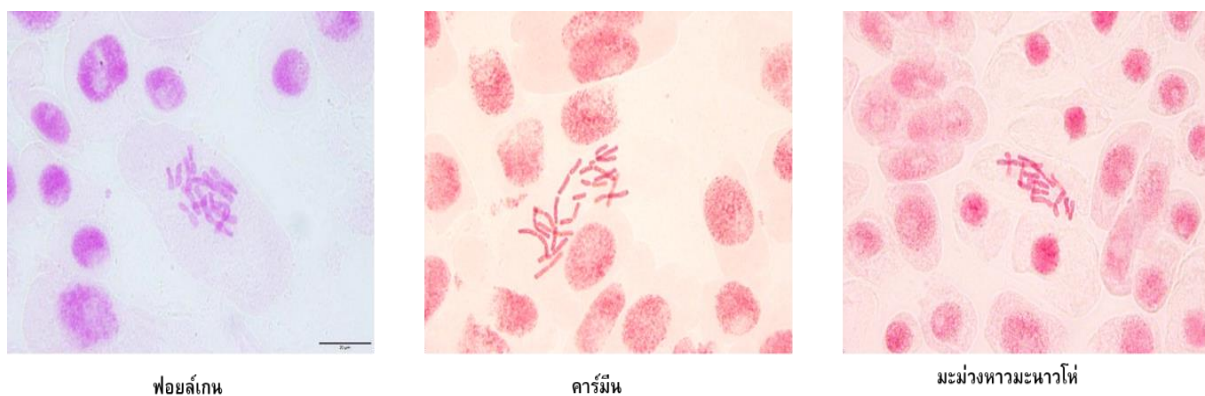


ภาพ 3 ลักษณะการติดสีย้อมของเซลล์รากหอมในค่า pH ต่าง ๆ

3. การใช้สีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่สำหรับการศึกษาแคโรไทป์ (Karyotype)

สี Feulgen ให้การติดสีโครโมโซมชัดเจนดี เป็นสีม่วง และติดสีบริเวณไซโทพลาสซึมใส มีคะแนนการติดสีเท่ากับ 3.00 ± 0.00 ส่วนสีคาร์มีนให้การติดสี

โครโมโซมชัดเจนให้สีแดง-ส้ม และติดสีบริเวณไซโทพลาสซึมจาง มีคะแนนการติดสีเท่ากับ 2.00 ± 0.00 และสีมะม่วงหาวมะนาวโห่มีการติดสีโครโมโซมชัดเจนให้สีแดง-ชมพู และติดสีบริเวณของไซโทพลาสซึมจาง มีคะแนนการติดสีเท่ากับ 2.00 ± 0.00 (ภาพ 4)



ฟอยล์เกน

คาร์มีน

มะม่วงหาวมะนาวโห่

ภาพ 4 ลักษณะของโครโมโซมของหอมที่ย้อมด้วยสีต่างกัน

วิจารณ์

ในวิธีการเตรียมสีย้อมด้วยวิธีการต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการทดสอบเพื่อให้ทราบวิธีการเตรียมสีย้อมเพื่อใช้สำหรับการย้อมสีโครโมโซมพืชให้ประสิทธิภาพดี มีขั้นตอนที่สะดวกและไม่ยุ่งยากในการเตรียมสีสำหรับศึกษาเรื่องการแบ่งเซลล์ในห้องเรียนหรือห้องปฏิบัติการที่ไม่มีความพร้อมในด้านเครื่องมือและสารเคมี โดยพบว่าผลสูกมะม่วงหาวมะนาวโห่เมื่อนำมาเตรียมสีย้อมด้วยวิธีต่าง ๆ ให้สีแดง-ชมพู สีที่เตรียมจากทุกวิธีการสามารถนำมาย้อมสีโครโมโซมของรากหอมได้ โดยวิธีที่ง่ายที่สุด คือ กรองด้วยผ้าขาวบาง แต่มีระยะเวลาในการเก็บรักษาที่สั้นเมื่อเตรียมแล้วควรใช้ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับวิธีการที่ดีที่สุด คือ การกรองด้วยผ้าขาวบาง บันเหวี่ยงที่ 5,200 RPM 20 นาที และ 14,000 RPM นาน 20 นาที ให้ผลการติดสีย้อมของโครโมโซมใกล้เคียงกับสี aceto-carmine โดยมีผลการทดสอบเช่นเดียวกับการรายงานการใช้สีย้อมธรรมชาติจากข้าวเหนียวดำและลูกหม่อน ที่สกัดด้วย 45% acetic acid และ 95% ethanol [2] และการใช้สารสกัดแอนโทไซยานินจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วย 95% ethanol [8] และสามารถเก็บสีไว้ได้นานสองเดือนในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้มีวิธีการเตรียมสีย้อมที่มีการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายในขั้นตอนการเตรียมสีย้อม เช่น การใช้ acetic acid ในขั้นตอนการสกัดสีย้อมธรรมชาติ หรือแม้แต่สี aceto-carmine ในขั้นตอนการเตรียมยังคงต้องมีการใช้ acetic acid ซึ่งเป็นอันตรายต่อเยื่อเมือก ระบบทางเดินหายใจส่วนบน ดวงตา และผิวหนัง [11] แต่ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการเตรียมสีย้อมโดยใช้วิธีการกรองและการปั่นเหวี่ยง ซึ่งไม่มีขั้นตอนการสกัดด้วยสารเคมีที่เป็นอันตราย สีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่ควรเก็บไว้ที่เย็นเพื่อยืดอายุในการเก็บรักษา เนื่องจากสารแอนโทไซยานินเสถียรภาพได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส [12] ใน การทดสอบการเจือจางสีในอัตราส่วนต่าง ๆ ก่อนนำมาย้อมสีโครโมโซมเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสีในการย้อมโครโมโซมได้ โดยเทียบกับการติดสีโครโมโซมของ aceto-carmine เห็นได้ว่าการเจือ

จางสีย้อมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5 ในขั้นตอนการเตรียมสีนั้น สีย้อมจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ยังคงให้ประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับการใช้สี aceto-carmine ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของสีที่มากกว่า ฉะนั้นการใช้สีย้อมที่เจือจางลงจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเตรียมสีได้ สำหรับขั้นตอนในการย้อมสีรากหอมนั้นจำเป็นต้องมีการบ่มใน 1N HCl ก่อนขั้นตอนในการใส่สีย้อมเพื่อเป็นการเตรียมรากให้เหมาะสมต่อการย้อมสีและการเตรียมสไลด์ด้วยเทคนิค squash เนื่องจาก HCl จะทำลายส่วนของผนังเซลล์ที่ติดกันซึ่งประกอบด้วยเพกตินและเซลลูโลส ทำให้เซลล์อ่อนนุ่มง่ายต่อการขยี้ให้เซลล์หลุดออกจากกันและเซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และควรแช่รากหอมในสีย้อมอย่างน้อย 30 นาที เพื่อการติดสีย้อมได้ดี รากหอมที่แช่ในสีย้อมค้างคืนสามารถนำมาเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์ได้ โดยค่า pH ที่เหมาะสมของสีย้อม คือ pH 1-3 เมื่อมีค่า pH เป็นด่างสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่ไม่สามารถย้อมติดโครโมโซมได้ โดยค่า pH เป็นกรดแก่ (pH 1-3) แอนโทไซยานินที่อยู่ในรูปของ flavylium cation มีประจุบวกเป็นสารละลายที่มีสีแดง เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นเป็นกลางหรือเบสสารแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ carbinol pseudobase และ chalcone ซึ่งมีประจุของ anionic quinonoid species [12] เมื่อนำไปย้อมสีเซลล์รากหอมจะทำให้ไม่สามารถจับโครโมโซมได้ เซลล์รากหอมจึงติดสีจางลงและมองเห็นโครโมโซมไม่ชัดเจน สีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่ยังสามารถนำมาย้อมโครโมโซมเพื่อศึกษาคาริโอไทป์ได้ชัดเจนเทียบเคียงกับสี Feulgen ที่มีขั้นตอนการเตรียมสีย้อมที่ยุ่งยากและมีการเติมสารเคมีที่เป็นอันตราย

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถเตรียมสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่อย่างง่ายด้วยการกรองและการปั่นเหวี่ยงโดยไม่จำเป็นต้องใช้สารสกัดที่เป็นพิษในการเตรียมสีย้อม สำหรับขั้นตอนการย้อมสีนั้นยังคงจำเป็นต้องมีการใช้ 1N HCl สำหรับการเตรียมรากหอมเช่นเดียวกับวิธีมาตรฐาน จึงทำให้มีประสิทธิภาพการใช้สีย้อมธรรมชาติจากผลสูกของมะม่วงหาวมะนาวโห่ในการย้อมโครโมโซมในการศึกษาการแบ่งเซลล์ใน

รากหอมที่เทียบเคียงได้กับสีย้อมสังเคราะห์ ผลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบศักยภาพของสีย้อมจากมะม่วงหาวมะนาวโห่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการย้อมสีโครโมโซมของพืช โดยที่มีขั้นตอนการเตรียมที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องมีเครื่องมือที่ซับซ้อนและไม่ใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม ควรเก็บสีที่เตรียมแล้วที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้สีย้อมยังคงมีประสิทธิภาพที่ดีในการย้อมสีโครโมโซม การเจือจางสีย้อมช่วยในการประหยัดวัตถุดิบ คือ ผลสุกมะม่วงหาวมะนาวโห่ได้ นอกจากนี้มะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นพืชที่สามารถปลูกได้โดยทั่วไปราคาไม่แพง ในห้องเรียนหรือห้องปฏิบัติการที่ขาดความพร้อมสามารถนำวิธีการนี้ไปใช้ได้ โดยถ้าสามารถนำสีย้อมมะม่วงหาวมะนาวโห่มาเตรียมเป็นผงสีได้จะมีความสะดวกสบายในการใช้งานมากกว่านี้ ซึ่งจะได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียมที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Kaveewong H, Chaisomparn W. Preparation of chromosome stain from local Thai plants for classroom learning. J Sci 2003;57:35–39.
2. Sikhruadong S, Tanomtong A, Wonkaonoi W, Gomontean B. Chromosome staining of crinum lily (*Crinum asiaticum* L.) using natural dyes. Cytologia 2009;74(1):17-22.
3. Ajileye AB, Iteire AK, Arigi QB. *Zingiber officinale* (ginger) extract as a histological dye for muscle fibers and cytoplasm. Int J Med Sci Public Health 2015;4(10):1145-8.
4. Elgubbi H, Asayh E. Chromosome Staining with Natural Dyes from *Punica granatum* and *Beta vulgaris*. EC Nutrition 2017;11(4):142-6.
5. Ebrahimi M, Parham A. Using Herbal dyes as an alternative staining method for sperm evaluation. Vet Med Sci 2020;6:441-6.
6. Supanuam P, Tanomtong A, Thiprautree S, Sikhruadong S, Gomontean B. Chromosomal Staining Comparison of Plant Cells with Black Glutinous Rice (*Oryza sativa* L.) and Lac (*Laccifer lacca* Kerr). Cytologia 2010;75(1):89–97.
7. Tongsrisk R, Chuaynker Y, Tanomtong A, Punsomboon S. Application of a Natural Dye from Purple Sweet Corn (*Zea mays saccharata*) for Plant Cell Mitosis Studies. Koch Cha Sam Journal of Science 2017;39(2):34-44.
8. Boonphan J, Pankong I, Chamchaiyaporn T. Anthocyanin Extract from Natural Plants for Staining Chromosome. Proceeding of the 11th NPRU National Academic Conference Nakhon Pathom Rajabhat University; 2019 July 11-12; Nakhon Pathom, Thailand. 2019.
9. Fakngoen S, Meerod S. Extraction and Separation of Anthocyanins from *Carissa carandas* L. Proceeding of the 4th National Conference KPRU; 2017 December 22; Kamphaengphet, Thailand. 2017.
10. Bondoc CC. Curcuma longa Linn rhizome extract as an alternative stain for histological studies. J of Pharmacogn and Phytochem 2018;7(5):3010-7.
11. Global Chemie ASCC. Safety data sheet; Acetic acid [Internet]. 2018 [cited 2021 April 1]. Available from: https://www.gcascc.com/wp-content/uploads/2018/09/Aceticacid_TH.pdf.
12. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food Nutr Res. 2017;61(1):1361779.