

สีสกัดจากฝางและอัญชันสำหรับการย้อมสีเนื้อเยื่อพืชแบบย้อนทับ *Biancaea sappan* (L.) Tod. and *Clitoria ternatea* L. Dye Extracts for Plant Tissue Counterstaining

นภัสสรณ์ กุยวารี และ อรรวรรณ วนะชีวิน*

โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

Napatsorn Kuiwaree and Orawan Wanachewin*

Biology Program Faculty of Science and Technology, Chiang Rai Rajabhat University.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของสีสกัดธรรมชาติจากแก่นฝาง (*Biancaea sappan* (L.) Tod.) และดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) ในการย้อมสีเนื้อเยื่อพืชแบบควบคู่ ในตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชส่วนลำต้นของพืช 2 ชนิดคือหมอน้อย (*Cyathium cinereum* (L.) H. Rob.) และหญ้าขน (*Urochloa mutica* (Forssk.) T.Q.Nguyen) เป็นแนวทางในการใช้สีย้อมธรรมชาติในการทดแทนสีย้อมสังเคราะห์สำหรับการย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชทั้งรูปแบบตัวอย่างสด และตัวอย่างสไลด์ถาวร ในการศึกษาทำการสกัดสีจากแก่นฝางด้วยน้ำกลั่น และสีจากดอกอัญชันด้วย เอทานอลเข้มข้น 95% ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:10 (W/V) สีสกัดที่ได้จากฝาง และอัญชันมีค่าความเป็นกรด - ด่างอยู่ในช่วง 5.38 – 5.40 และ 7.03 – 7.19 ตามลำดับ ผลการทดสอบพบว่าสีสกัดจากฝางติดเนื้อเยื่อชัดเจนบริเวณไซเลม และสีของอัญชันติดชัดเจนบริเวณเนื้อเยื่อพื้น การย้อมสีสกัดจากธรรมชาติทั้ง 2 ชนิดควบคู่กันพบว่าสามารถใช้ควบคู่กันได้ดีในระดับปานกลาง เนื่องจากสีสกัดให้ผลการติดสีเนื้อเยื่อพืชในบริเวณที่แตกต่างกันทำให้สามารถมองเห็นความแตกต่างของเนื้อเยื่อได้ แต่ยังให้ความเข้มของสีอ่อนกว่าการย้อมด้วยสีซาฟรานินโอควบคู่กับฟาสต์กรีน

คำสำคัญ : สีย้อมธรรมชาติ , การย้อมสีควบคู่, ฝาง, อัญชัน, เนื้อเยื่อพืช

* Corresponding author : orawan.wan@crru.ac.th

Received : 10/02/2023

Revised : 03/05/2023

Accepted : 07/06/2023

Abstract

This research aimed to determine staining efficacy of natural dyed extract from Sappan tree wood (*Biancaea sappan* (L.) Tod.) and Asian pigeonwings (*Clitoria ternatea* L.) on 2 types of plant tissue; Little ironweed (*Cyathilium cinereum* L. H. Rob.) and Para Grass (*Urochloa mutica* (Forssk.) T.Q.Nguyen) in order to substitute synthetic dye for plant tissue staining both in form of fresh and permanent slide preparation. In the study, heartwood of Sappan tree and flower of Asian pigeonwings were extracted by using distilled water or 95% ethanol at ratio 1:10 (W/V). The dyes' pH was in range of 5.38 – 5.40 and 7.03 – 7.19, respectively. The result showed that Sappan tree dye extracts gave well staining intensity at xylem while Asian pigeonwings dyes extracts yield good stain capacity at ground tissue. Counterstain between the natural dyes gave moderate staining results on both plant tissues. The dyes gave contrast tissue observation because of different sites of staining but had lower intensity compared to safranin O and fast green counterstain.

Keywords : Natural dye, Counterstain, Sappan tree, Asian pigeonwings, Plant tissue

ที่มาและความสำคัญ

การศึกษาเนื้อเยื่อพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีการพื้นฐานรูปแบบหนึ่งที่มีความสำคัญ และเป็นประโยชน์ต่อการศึกษากลุ่มเซลล์ของพืชที่รวมกลุ่มกันเพื่อทำหน้าที่จำเพาะต่าง ๆ การศึกษาการเจริญเติบโต รวมถึงการจัดจำแนกพืชที่สามารถจัดจำแนกกลุ่มได้ยากโดยลักษณะภายนอก การศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชภาคตัดขวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง มีการเตรียมตัวอย่างให้มีลักษณะบาง แสงผ่านได้ ตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชมักมีสีอ่อนหรือมองเห็นส่วนประกอบต่าง ๆ ได้ยาก จึงนิยมใช้สีย้อมเพื่อทำให้สามารถมองเห็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น สีย้อมที่นิยมใช้ เช่น สีซาฟรานินโอ (Safranin O) และสีฟาสต์กรีน (Fast green) เป็นต้น อย่างไรก็ตามสีสังเคราะห์ที่ใช้ในการย้อมตัวอย่างเซลล์และเนื้อเยื่อเป็นสีที่ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ ในการซื้อแต่ละครั้งไม่มีการแบ่งจำหน่ายจึงทำให้สีที่ซื้อมามีปริมาณมาก และมักหมดอายุก่อนจะใช้ได้หมด อีกทั้งตัวสีเองเป็นสารเคมีที่อาจเป็นผลอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อมีการกำจัดหลังจากการใช้งานที่ไม่ถูกวิธี ด้วยเหตุนี้การใช้สารสีที่สกัดได้จากแหล่งวัตถุดิบตามธรรมชาติที่สามารถหาได้ในประเทศ หรือภายในท้องถิ่นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการย้อมเนื้อเยื่อพืชเพื่อการศึกษา ลักษณะโครงสร้างจึงเป็นทางเลือกที่เป็นการช่วยลดความอันตรายต่อผู้ทำการศึกษา อีกทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และยังช่วยประหยัดงบประมาณในการจัดซื้อสารเคมีให้แก่สถาบันการศึกษาอีกทาง จากรายงานการศึกษาต่าง ๆ พบข้อมูลการศึกษาสีสกัดธรรมชาติในการย้อมสีทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น การใช้สีจากสีสกัดผลของกระเจี๊ยบแดง หัวบีทรูท ผลมะเข่า ใบหูกวาง ใบฟ้าทะลายโจร ใบสาบเสือ [1] สีจากแก่นฝาง [2] ดอกอัญชัน เปลือกแก้วมังกร เปลือกมังคุด เปลือกมะเขือม่วง [3] อย่างไรก็ตามลักษณะการศึกษาสีย้อมเนื้อเยื่อพืชส่วนมากที่พบรายงานการศึกษาเป็นเพียงการย้อมสีเพียงชนิดเดียว ซึ่งสีที่ได้อาจไม่ติดจำเพาะหรือติดสีเข้มมากเกินไปซึ่งทำให้เห็นความแตกต่างของเนื้อเยื่อได้ไม่ชัดเจน ประกอบกับจากการทบทวนเอกสารพบว่าสารสีสกัดจากฝางมีคุณสมบัติในการติดส่วนของผนังเซลล์ทุกชนิดได้ดี [2] และสีสกัดจากอัญชันย้อมติดพารานโคมาซึ่งเป็นส่วนของเนื้อเยื่อพื้นได้ดี [4] ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงมีความสนใจ

ที่จะพัฒนาการย้อมสีเนื้อเยื่อพืชด้วยสีสกัดจากธรรมชาติจากพืชดังกล่าวโดยใช้การย้อมแบบควบคู่ (Counterstain) โดยใช้ตัวอย่างลำต้นของหมอน้อย และหญ้าขนเป็นตัวแทนของการศึกษาการย้อมเนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงคู่และเดี่ยวตามลำดับ

วิธีการดำเนินการวิจัย

การสกัดสีจากแก่นฝาง [2]

1. นำเนื้อแก่นฝางมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปต้มกับน้ำกลั่นให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้อัตราส่วนแก่นฝางต่อน้ำ 1:10 (W/V) จากนั้นพักสารสกัดให้เย็นตัวลง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายสีที่ได้เก็บไว้ในขวดกันแสงที่มีฝาปิดมิดชิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C
2. ทำการสกัดสีจำนวน 3 ครั้ง และวัดค่าความเป็น กรด-ด่าง ของสีสกัดด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)

การสกัดสีจากอัญชัน [4-5]

1. นำส่วนของกลีบดอกของอัญชัน ใส่ลงในเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:1 [น้ำหนักพืช (กรัม) : ตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)] จากนั้นคนตัวอย่างให้เข้ากันและทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองสารละลายสีด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายสีที่ได้เก็บไว้ในขวดกันแสงที่มีฝาปิดมิดชิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. ทำการสกัดสีจำนวน 3 ครั้ง และวัดค่าความเป็น กรด-ด่าง ของสีสกัดด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช

1. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้น ทำได้โดยการใช้ใบมีดโกนเริ่มตัดลำต้นหมอน้อยโดยตัดจากปลายยอดลงมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร (ซม.) ในส่วนของหญ้าขนทำการตัดเหนือโคนของข้อปล้องขึ้นไปประมาณ 0.5 ซม.
2. ทำการตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้นด้วยวิธีตัดด้วยมือ (Free hand section) นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตัดได้ลอยในน้ำ ทำการเลือกตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตัดได้สมบูรณ์ มีลักษณะบางใสและลอยเหนือน้ำ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ปรากฏชั้นเนื้อเยื่อเพียงหนึ่งชั้น ไปใช้ในการย้อมสีทดสอบในขั้นตอนถัดไป

การย้อมสีเนื้อเยื่อพืชสด

1. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้น ทำได้โดยการใช้ใบมีดโกนเริ่มตัดลำต้นหมอน้อยโดยตัดจากปลายยอดลงมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร (ซม.) ในส่วนของหญ้าขนทำการตัดเหนือโคนของข้อปล้องขึ้นไปประมาณ 0.5 ซม.
2. ทำการตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้นด้วยวิธีตัดด้วยมือ (Free hand section) นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตัดได้ลอยในน้ำ ทำการเลือกตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตัดได้สมบูรณ์ มีลักษณะบางใสและลอยเหนือน้ำ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ปรากฏชั้นเนื้อเยื่อเพียงหนึ่งชั้น ไปใช้ในการย้อมสีทดสอบในขั้นตอนถัดไป

ตารางที่ 1: ระยะเวลาการย้อมแบบย้อมสีเดียว

ชนิดสีย้อม	ระยะเวลาการย้อม	การล้าง
ชาฟรานินโอ	30 วินาที	น้ำกลั่น
ฟาสต์กรีน	15 วินาที	น้ำกลั่น
สีสกัดฝาง	20 วินาที	น้ำกลั่น
สีสกัดอัญชัน	30 วินาที	น้ำกลั่น

ตารางที่ 2: ระยะเวลาการย้อมแบบย้อมสีทับ

ชนิดสี	ระยะเวลาการย้อมสี	การล้าง	ระยะเวลาการย้อมสี	การล้าง
ชาฟรานินโอ/ฟาสต์กรีน	ชาฟรานิน 30 วินาที	น้ำกลั่น	ฟาสต์กรีน 30 วินาที	น้ำกลั่น
ฝาง/อัญชัน	ฝาง 20 นาที	น้ำกลั่น	อัญชัน 20 นาที	น้ำกลั่น

การย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อการทำสไลด์ถาวร

1. นำตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วมาตรึงด้วยน้ำยาฟิกเซทีฟเอฟเอเอ (Formalin acetic alcohol, FAA) ล้างด้วยน้ำกลั่น และเข้าสู่กระบวนการกำจัดน้ำโดยใช้เอทานอล 10 – 95 % ซึ่งการย้อมสีจะทำการย้อมคั่นในช่วงที่ตัวอย่างอยู่ในตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสีย้อมชนิดนั้น ๆ ดังรายละเอียดในตารางที่ 3

2. จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการทำสไลด์และหยดสารเพอร์เมาท์ (Permount) ลงบนตัวอย่าง จากนั้นใช้กระจกปิดสไลด์ค่อย ๆ ปิดทับลงไปบริเวณตัวอย่าง โดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศ

การให้คะแนนความเข้มการติดสีของเนื้อเยื่อ

เปรียบเทียบการย้อมติดสีระหว่างอย่างสไลด์ที่ได้จากการย้อมสีสกัดจากฝางและอัญชันกับสไลด์ที่ย้อมด้วยสีชาฟรานินโอ และสีฟาสต์กรีน โดยพิจารณาดำเนินการติดสีของเนื้อเยื่อพืช และระดับความเข้มของการติดสี ซึ่งมีเกณฑ์การพิจารณาระดับความเข้มของการติดสีดังนี้

- ไม่ติดสี + ติดสีอ่อน ++ ติดสีเข้มปานกลาง +++ ติดสีเข้มมาก

ตารางที่ 3: ขั้นตอนระหว่างกระบวนการกำจัดน้ำที่ทำการย้อมสี

สีย้อม	ขั้นตอนที่ทำการย้อม	ระยะเวลาย้อมสี	สารล้างสีส่วนเกิน
ชาฟรานินโอ	50 % เอทานอล	30 วินาที	50 % เอทานอล
ฟาสต์กรีน	95 % เอทานอล	15 วินาที	95 % เอทานอล
ฝาง	น้ำกลั่น	20 นาที	น้ำกลั่น
อัญชัน	95 % เอทานอล	30 นาที	95 % เอทานอล

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ค่าความเป็นกรด-ด่างของสีสกัด

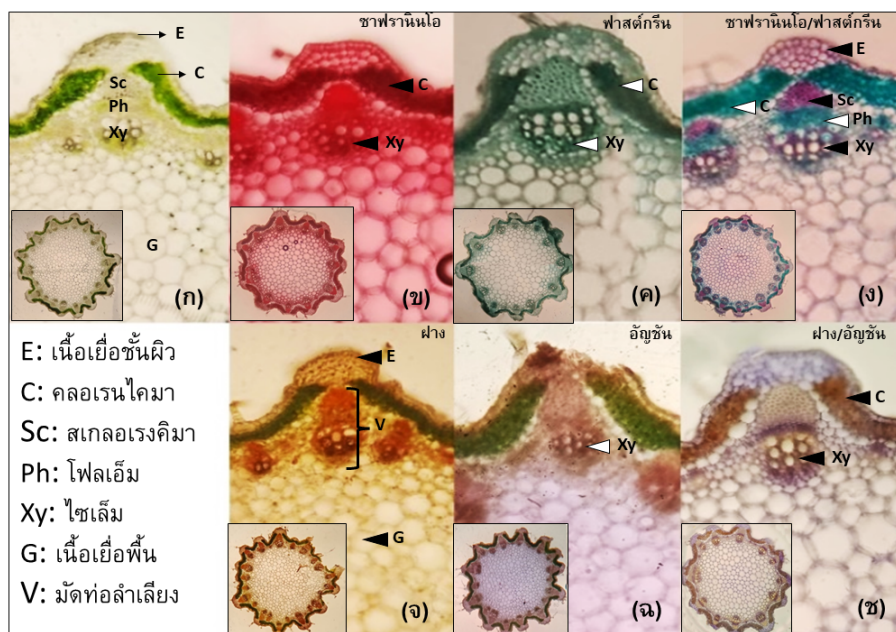
จากการวัดความเป็นกรด - ด่างพบว่าจากการสกัดจำนวน 3 ครั้ง สีสกัดจากฝางมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.38 – 5.40 และสีสกัดจากอัญชันมีค่าความเป็นกรด - ด่างอยู่ในช่วง 7.03 – 7.19 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4: ค่าความเป็นกรด - ด่าง ของสีสกัด

สีสกัดธรรมชาติ	สีสกัดครั้งที่ 1	สีสกัดครั้งที่ 2	สีสกัดครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
ฝาง	5.40	5.40	5.38	5.39 ± 0.01
อัญชัน	7.19	7.12	7.03	7.11 ± 0.08

ผลการย้อมสีเนื้อเยื่อลำต้นหมอน้อยตัวอย่างสดและสไลด์ถาวร

ในตัวอย่างลำต้นหมอน้อยสดที่ไม่ย้อมสี สามารถสังเกตเห็นส่วนของเนื้อเยื่อคลอเรนโคมา (Chlorenchyma) ได้ชัดเจน (ภาพ 1ก) ซึ่งความชัดเจนของเนื้อเยื่อส่วนดังกล่าวจะลดลงไปเมื่อมีการเตรียมเนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนกำจัดน้ำและทำให้สไลด์ถาวร (ภาพ 2ก) ในตัวอย่างสดที่ย้อมด้วยสีชาฟรานินหรือฟาสต์กรีนเกิดการติดสีในเนื้อเยื่อทุกบริเวณของตัวอย่างและมีการติดสีเข้มตรงกันในบริเวณคลอเรนโคมา และไซเลม (ภาพ 1ข-ค) ในขณะที่ผลการย้อมในสไลด์ถาวรด้วยสีชาฟรานินโอมีการติดสีในบริเวณที่จำเพาะมากขึ้นโดยติดสีชัดเจนเฉพาะบริเวณสเกลอเรนคิมา และไซเลม (ภาพ 2ข) การย้อมสีควบคู่ระหว่างสีชาฟรานินโอและฟาสต์กรีนในตัวอย่างสด และสไลด์ถาวร (ภาพ 1ง และ 2ง) ทำให้สามารถแยกแยะเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจนมากขึ้นโดยสีชาฟรานินโอติดชัดเจนบริเวณเนื้อเยื่อชั้นผิว สเกลอเรนคิมา และไซเลม ส่วนสีฟาสต์กรีนติดสีในบริเวณเนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่เหลือ สำหรับการย้อมด้วยสีสกัดจากฝางหรืออัญชันเพียงอย่างเดียวในตัวอย่างสด สีฝางให้ผลการติดสีเนื้อเยื่อชัดเจนในบริเวณมัดท่อลำเลียง เนื้อเยื่อชั้นผิว และเนื้อเยื่อพื้น (ภาพ 1จ) ส่วนสีสกัดอัญชันติดสีในส่วนของไซเลม และเนื้อเยื่อพื้น (ภาพ 1ด) ในสไลด์ถาวรที่ย้อมด้วยสีสกัดจากฝางให้ผลการติดสีน้ำตาลอ่อนในบริเวณมัดท่อลำเลียง (ภาพ 2จ) ส่วนการย้อมสีจากอัญชันให้สีม่วงเข้มในบริเวณเนื้อเยื่อพื้น (ภาพ 2ด) การย้อมสีควบคู่ระหว่างสีสกัดจากฝางและอัญชันพบว่าสีทั้งสองชนิดสามารถใช้ย้อมควบคู่กันได้



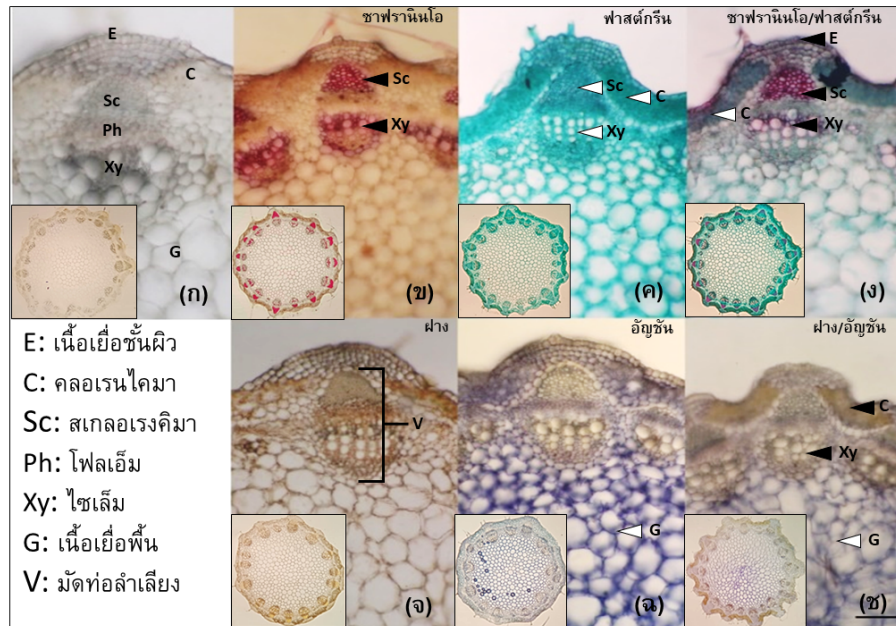
ภาพที่ 1: ผลการย้อมสีลำต้นหอยตัวอย่างสด (ก) ไม่ย้อมสี (ข) สีชาฟรานินโอ (ค) สีฟาสต์กรีน (ง) สีชาฟรานินโอควบคู่กับสีฟาสต์กรีน (จ) สีฝาง (ฉ) สีอัญชัน (ช) สีสกัดฝางควบคู่กับสีสกัดอัญชัน

หมายเหตุ: หัวลูกศรสีดำ/ขาว ในภาพ ข, ค, จ, ฉ แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีย้อมชนิดต่าง ๆ ตามระบุในภาพ
หัวลูกศรสีดำในภาพ ง และ ช แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีชาฟรานินโอ หรือ ฝาง ตามลำดับ
หัวลูกศรสีขาวในภาพ ง แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีฟาสต์กรีน

ทั้งในการย้อมตัวอย่างสดและสไลด์ถาวร เนื่องจากเกิดการติดสีได้ในตำแหน่งที่ต่างกัน แต่สีที่ได้จากฝางมีความเข้มลดลงเมื่อเทียบกับการย้อมเพียงสีเดียว โดยสีสกัดฝางติดสีในบริเวณคลอเรนโคมา และไซเลม ในขณะที่สีสกัดจากอัญชันติดในเนื้อเยื่อบริเวณอื่น ๆ ที่เหลือทั้งหมด (ภาพ 1ข และ 2ข) ทั้งนี้ความชัดเจนจากการย้อมทับด้วยสีสกัดจากฝางให้ความชัดเจนของเนื้อเยื่อน้อยกว่าการย้อมด้วยสีชาฟรานินโอควบคู่กับสีฟาสต์กรีน

ผลการย้อมสีเนื้อเยื่อลำต้นหอยาชนตัวอย่างสดและสไลด์ถาวร

ผลการทดลองการย้อมสีลำต้นหอยาชน ในตัวอย่างที่ยังไม่ผ่านการย้อมสีสามารถสังเกตเห็นส่วนของเนื้อเยื่อชั้นผิว และมัดท่อลำเลียงได้บางส่วน (ภาพ 3ก และ 4ก) โดยผลการย้อมในตัวอย่างสดให้ผลการย้อมสีที่คล้ายกันในการย้อมสีชนิดเดียวซึ่งให้ผลการติดสีชัดเจนในส่วนมัดท่อลำเลียง โดยให้สีแดงอมชมพู เขียว สีนํ้าตาล และสีม่วง จากการย้อมด้วยสีชาฟรานินโอ ฟาสต์กรีน สีสกัดฝาง และสีสกัดอัญชันตามลำดับ (ภาพ 3ข,ค,จ,ฉ และ 4ข,ค,จ,ฉ) ในการย้อมสีควบคู่ระหว่างสีสกัดจากฝางและอัญชันพบว่าการติดสีจางลงเมื่อเทียบกับการย้อมสีเดียวแต่ยังสามารถมองเห็นเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ที่แตกต่างกันได้ทั้งในตัวอย่างสด และสไลด์ถาวร โดยสีฝางติดสีในส่วนของเนื้อเยื่อสเกลอเรนโคมาที่อยู่ล้อมรอบมัดท่อลำเลียง และสีอัญชันติดในบริเวณมัดท่อลำเลียง และเนื้อเยื่อพื้น อย่างไรก็ตามในการย้อมสีควบคู่ที่ได้ยังให้ความเข้มสีที่อ่อนกว่าการย้อมด้วยสีชาฟรานินโอควบคู่กับสีฟาสต์กรีน (ภาพที่ 3ช และ 4ช)



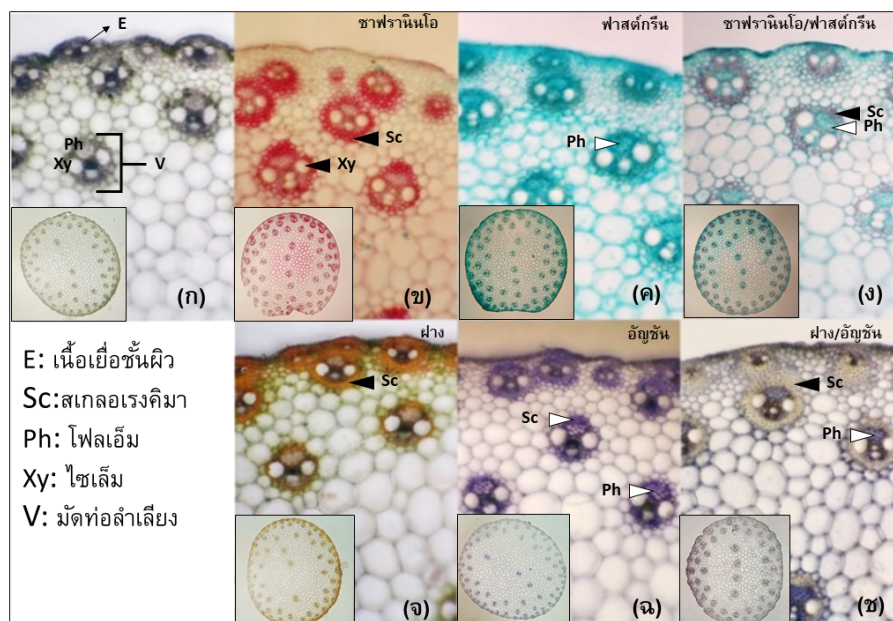
ภาพที่ 2: ผลการย้อมสีลำต้นหอมตัวอย่างสไลด์ถาวร (ก) ไม่ย้อมสี (ข) สีชาฟรานินโอ (ค) สีฟาสต์กรีน (ง) สีชาฟรานินโอควบคู่กับสีฟาสต์กรีน (จ) สีฝาง (ฉ) สีอัญชัน (ช) สีสกัดฝางควบคู่กับสีสกัดอัญชัน

หมายเหตุ: หัวลูกศรสีดำ/ขาว ในภาพ ข, ค, จ, ฉ แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีย้อมชนิดต่าง ๆ ตามระบุในภาพ หัวลูกศรสีดำในภาพ ง และ ช แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีชาฟรานินโอ หรือ ฝาง ตามลำดับ หัวลูกศรสีขาวในภาพ ง และ ช แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีฟาสต์กรีน หรือ อัญชัน ตามลำดับ

ระดับความเข้มของเนื้อเยื่อในการย้อมติดสี

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติการย้อมสีแบบควบคู่ระหว่างการย้อมด้วยสีชาฟรานินโอควบคู่กับฟาสต์กรีน กับ การย้อมด้วยสีฝางควบคู่กับสีอัญชัน หากพิจารณาความเข้มของการติดสีด้วยการให้เครื่องหมาย + ในระดับต่าง ๆ (ตารางที่ 5) พบว่าการย้อมควบคู่ด้วยสีจากธรรมชาติให้การติดสีที่อ่อนกว่าการย้อมด้วยสีสังเคราะห์ทั้งในตัวอย่างสด และตัวอย่างสไลด์ถาวรถึงแม้จะย้อมในระยะเวลาที่นานกว่า (20-30 นาที) แต่หากพิจารณาถึงการติดสีเนื้อเยื่อแต่ละ ส่วนจากการไม่เกิดการติดสีในตำแหน่งเดียวกัน เช่น การย้อมเนื้อเยื่อหอมอ่อนบริเวณคอลเรนโคมา มีการติดสีฝางแต่ ไม่ติดสีอัญชัน (++) จะเห็นได้ว่าการย้อมสีควบคู่ด้วยสีฝางและอัญชันในลำต้นหอมอ่อนทั้งในตัวอย่างสด และสไลด์ ถาวรให้ความแตกต่างของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าการย้อมแบบควบคู่ในลำต้นหญ้าขน อย่างไรก็ตามการย้อมสีควบคู่จากสีจาก ธรรมชาติในตัวอย่างพืชทั้ง 2 ชนิดในการศึกษานี้ยังให้ความชัดเจนกว่าการย้อมด้วยสีสังเคราะห์ (ตารางที่ 5)

การย้อมสีโดยใช้สีย้อมเนื้อเยื่อพืชมาตรฐานที่นิยมใช้ในการย้อมควบคู่ในการย้อมเนื้อเยื่อพืชคือ สีชาฟรานิน นโอ และสีฟาสต์กรีน โดยสีชาฟรานินโอมีคุณสมบัติในการติดเนื้อเยื่อที่มีสารประกอบลิกนิน คิวทิน ซูเบอร์ริน ซึ่งพบ ได้มากในบริเวณ โฟเบอร์ สเคอริดและเวสเซล และสีฟาสต์กรีน มีคุณสมบัติในการติดเนื้อเยื่อในส่วนของผนังเซลล์ที่มี เซลลูโลส และเพกติน ซึ่งพบได้มากบริเวณ เนื้อเยื่อชั้นผิว เนื้อเยื่อพิน (พาเรนไคมา) และคอลเลงคิมา [6] ซึ่งผลจากการ ย้อมด้วยสีสกัดจากแก่นฝางเพียงชนิดเดียวก่อให้เกิดการติดสีเนื้อเยื่อในบริเวณที่คล้ายกันกับการย้อมด้วย สีชาฟรา- นินโอซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าสีย้อมจากแก่นฝางจะย้อมติดส่วนผนังทุติยภูมิ [2, 7]



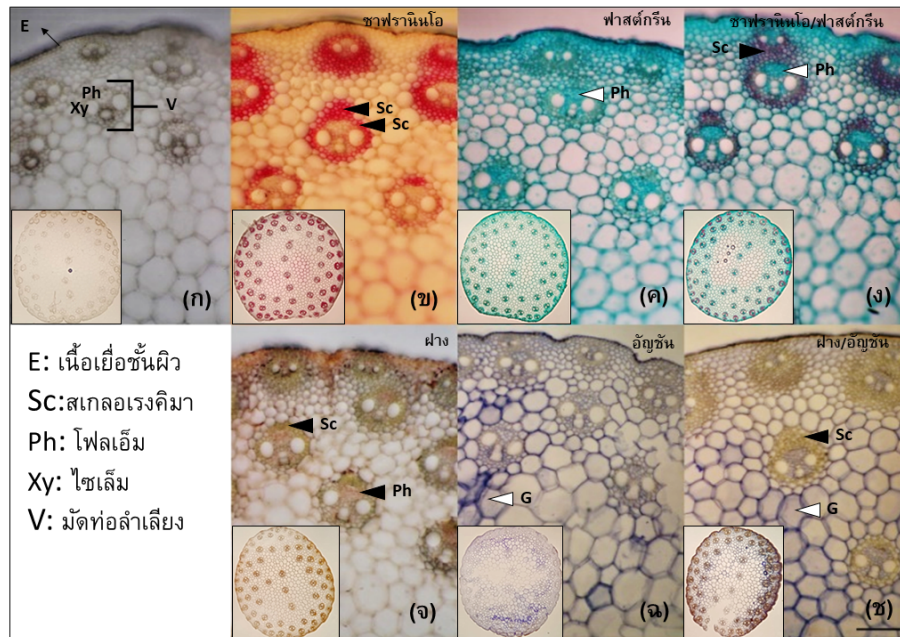
ภาพที่ 3: ผลการย้อมสีลำต้นหญ้าขนตัวอย่างสด (ก) ไม่ย้อมสี (ข) สีชาฟรานินโอ (ค) สีฟาสต์กรีน (ง) สีชาฟรานินโอ ควบคู่กับสีฟาสต์กรีน (จ) สีฝาง (ฉ) สีอัญชัน (ช) สีสกัดฝางควบคู่กับสีสกัดอัญชัน

หมายเหตุ: หัวลูกศรสีดำ/ขาว ในภาพ ข, ค, จ, ฉ แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีย้อมชนิดต่าง ๆ ตามระบุในภาพ หัวลูกศรสีดำในภาพ ง และ ช แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีชาฟรานินโอ หรือ ฝาง ตามลำดับ หัวลูกศรสีขาวในภาพ ง และ ช แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีฟาสต์กรีน หรือ อัญชัน ตามลำดับ

ตารางที่ 5: ระดับการติดสีของตัวอย่างแต่ละชนิดในการย้อมสีแบบควบคู่

	ลำต้นหมอน้อย				ลำต้นหญ้าขน			
	ตัวอย่างสด	ตัวอย่างถาวร	ตัวอย่างสด	ตัวอย่างถาวร	ตัวอย่างสด	ตัวอย่างถาวร	ตัวอย่างสด	ตัวอย่างถาวร
	ชาฟรานิน โอ/ ฟาสต์กรีน	ฝาง/ อัญชัน	ชาฟรานิน โอ/ ฟาสต์กรีน	ฝาง/ อัญชัน	ชาฟรานิน โอ/ ฟาสต์กรีน	ฝาง/ อัญชัน	ชาฟรานิน โอ/ ฟาสต์กรีน	ฝาง/ อัญชัน
เนื้อเยื่อชั้นผิว	+++/-	-/+	++/-	-/+	-/+	+++	-/+	+++
คอลเรนโคมา	++/-	++/-	-/+	++/-	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
เนื้อเยื่อพื้น	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
โพลีเอม	-/+	+/+	+++/-	+/+	+/+	+++	+++	+++
ไซเลม	-/+	++/-	+++	+/+	+/+	+++	+++	+++

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ + / - แสดงระดับการติดสีของเนื้อเยื่อพืชแต่ละบริเวณโดยระดับการติดสีประกอบด้วย - : ไม่ติดสี + : ติดสีอ่อน ++ : ติดสีปานกลาง +++ : ติดสีเข้มมาก และไม่พบ หมายถึงไม่สามารถระบุตำแหน่งเนื้อเยื่อส่วนดังกล่าวได้อย่างชัดเจนในตัวอย่าง



ภาพที่ 4: ผลการย้อมสีลำต้นหญ้าขนตัวอย่างสไลด์ถาวร (ก) ไม่ย้อมสี (ข) สีชาฟรานินโอ (ค) สีชาฟรานินโอ (ง) สีชาฟรานินโอควบคู่กับสีฟาสต์กรีน (จ) สีฝาง (ฉ) สีอัญชัน (ช) สีสกัดฝางควบคู่กับสีสกัดอัญชัน

หมายเหตุ: หัวลูกศรสีดำ/ขาว ในภาพ ข, ค, จ, ฉ แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีย้อมชนิดต่าง ๆ ตามระบุในภาพ

หัวลูกศรสีดำในภาพ ง และ ช แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีชาฟรานินโอ หรือ ฝาง ตามลำดับ

หัวลูกศรสีขาวในภาพ ง และ ช แสดงบริเวณที่ติดสีชัดเจนด้วยสีฟาสต์กรีน หรือ อัญชัน ตามลำดับ

จากการศึกษาก่อนหน้าโดยพิมพ์ชนก [4] พบว่าสีสกัดจากอัญชันด้วยเอทานอลเมื่อนำไปย้อมในลำต้นหมอน้อยเป็นเวลา 30 นาที จะเกิดการติดสีเฉพาะส่วนของพารินโคมา ในขณะที่ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสีสกัดจากอัญชันด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันนอกจากจะย้อมติดในส่วนของพารินโคมาหรือเนื้อเยื่อพื้นแล้ว ยังย้อมติดในส่วนมัดท่อลำเลียงของพืชตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดในการย้อมตัวอย่างสดอีกด้วย จากผลระดับความเข้มการติดสีของเนื้อเยื่อจากการย้อมด้วยสีฝางควบคู่กับสีอัญชัน ทั้งในตัวอย่างสด และสไลด์ถาวรที่พบว่ามีความเข้มการติดสีที่อ่อนกว่าสีสังเคราะห์ แต่สามารถใช้ในการย้อมควบคู่กันได้ สาเหตุที่คาดว่าส่งผลต่อคุณภาพการติดสีฝางและอัญชัน ได้แก่ ระยะเวลาในการย้อมสี และค่าความเป็นกรด - ด่าง โดยจากรายงานการศึกษาของ มานิต คัดอยู่ [2] ที่ศึกษาสีสกัดจากฝางในการย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมสด และสไลด์ถาวรพบว่าระยะเวลาการย้อมสีที่เหมาะสมต่างกัน โดยการย้อมสไลด์ชั่วคราวใช้เวลาเพียง 2 - 3 นาที แต่การย้อมสไลด์แบบถาวรย้อมใช้เวลานานมากกว่า (5 - 30 นาที) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าหากมีการใช้ระยะเวลาการย้อมที่นานมากขึ้นก็จะทำให้สีที่ได้มีความชัดเจนมากขึ้น และจากขั้นตอนในการย้อมสีควบคู่ในการศึกษาครั้งนี้ สีสกัดจากฝางมีค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 5.39 แต่สีสกัดจากอัญชันที่ทำการย้อมในขั้นตอนถัดไปมีค่าความเป็นกรด - ด่างอยู่ในช่วง 7.03-7.19 สารสีในฝางคือสีบราซิลิน (Brazilin) เป็นสารที่ไม่มีสี ที่เมื่อสัมผัสกับอากาศจะถูกออกซิไดส์เป็นสารบราซีลีน (Brazelein) ที่มีสีแดง สารสีทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันในด้านคุณสมบัติเคมี ฟิสิกส์ คือเมื่ออยู่ในช่วงค่าความเป็นกรดต่ำกว่า 3.2 จะไม่มีประจุ และไม่ชอบน้ำ และเมื่ออยู่ในสภาวะที่ค่าความเป็นกรด - ด่างสูงกว่า 7.2 โมเลกุลจะมีประจุ โดยสีบราซิลินมีกลไกในการจับติดบนสัตว์ด้วยพันธะไฮโดรเจน และพันธะไอออนิก ในขณะที่การจับกับเซลล์ใช้พันธะ แวนเดอร์ วาลส์ [8] ด้วยเหตุนี้คุณสมบัติของสารสีจากฝางในสภาวะค่า

ความเป็นกรด – ต่างที่เปลี่ยนแปลงไปในการย้อมสีแบบควบคุมจึงน่าจะมีผลอย่างมากต่อคุณสมบัติในการติดสี ทั้งนี้ในการศึกษานี้ศึกษาเฉพาะการย้อมสีควบคุมที่ย้อมสีฝางก่อนการย้อมด้วยสีอัญชัน ดังนั้นการสลับลำดับการย้อมสีรวมถึงการใช้ตัวเปลี่ยนท่าละลายที่ใช้ในการสกัดสีจึงเป็นส่วนที่มีความน่าสนใจในการศึกษาต่อไปเพราะอาจจะให้คุณสมบัติการย้อมที่แตกต่าง นอกจากนี้การใช้สีสกัดฝางร่วมกับสารมอร์แดนต์ เช่น CuSO_4 อาจจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพในการติดสี [7] สำหรับปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลกระทบต่อสีสกัดจากฝางมีสีอ่อนลงในการย้อมสีแบบควบคุมได้แก่กระบวนการกำจัดน้ำเพื่อทำสไลด์ถาวร ที่ประกอบด้วยกระบวนการตรึงเนื้อเยื่อ กระบวนการกำจัดน้ำ และการทำใส อาจส่งผลกระทบต่อระดับความเข้มของการติดสีซึ่งสอดคล้องกับ พงศ์พันธุ์ กองทอง [9] ที่กล่าวว่าคุณสมบัติการเป็นสีย้อมและการย้อมสีขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ความแรงของสีย้อม อัตราการแตกตัวของไอออนของในเนื้อเยื่อและของสีย้อม รวมไปถึงค่าความเป็นกรด - ด่างของสารละลายสีย้อม และการย้อมสียังได้รับอิทธิพลมาจากสิ่งแวดล้อมอื่น เช่น สีย้อมที่ใช้เป็นชนิดเดียวหรือเป็นสีย้อมผสม สีย้อมอยู่ในสารละลายที่เป็นน้ำหรือแอลกอฮอล์ขณะที่ย้อม อุณหภูมิขณะที่ย้อมต่ำหรือสูง รวมไปถึงความเข้มข้นของสีย้อม เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

สีสกัดจากฝางและอัญชัน เมื่อนำมาย้อมเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เพียงสีเดียว มีประสิทธิภาพในการติดสีใกล้เคียงกันและมีการติดสีอยู่ในระดับที่ทำให้สามารถมองเห็นโครงสร้างส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ชัดเจน และสีทั้ง 2 ชนิดสามารถนำมาใช้ย้อมควบคู่กันได้ทั้งในตัวอย่างสดและสไลด์ถาวร อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มของสีจากการย้อมด้วยสีสกัดจากฝางและอัญชันมีการติดสีที่ค่อนข้างอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับ การย้อมด้วยสีชาฟรานีโอ และฟาสต์กรีน

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีจากการได้รับความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการศึกษา โดยโปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

เอกสารอ้างอิง

- [1] มยุรี คุณิรัตน์ แพรวพรรณ ดวงไข สุขยา วิริยะการุณย์ และศิวพร หอมหวล. (2557). การสกัดและประยุกต์ใช้สีย้อมธรรมชาติจากพืชในท้องถิ่นสำหรับย้อมเนื้อเยื่อพืช. [โปสเตอร์นำเสนอ] การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 12 กุมภาพันธ์ 2557, อุบลราชธานี
- [2] มานิต คัดอยู่. (2552). สีย้อมธรรมชาติจากฝางสำหรับการศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย, 1(2), 61-70.

- [3] วันเพ็ญ แก้วพุก. (2558). การศึกษาสารสกัดสีธรรมชาติจากพืชเพื่อการย้อมสีโครโมโซม สำหรับห้องปฏิบัติการ การชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ครั้งที่ 7, 30 – 31 มีนาคม 2558, นครปฐม.
- [4] พิมพ์ชนก สำเร็จเวทย์ และวรพันธ์ อินตารักษา. (2555). การศึกษาสีย้อมเนื้อเยื่อตัดตามขวางของลำต้นหญ้า ละเอียดที่สกัดจากพืชธรรมชาติที่หาได้ในท้องถิ่น. (โครงการวิทยาศาสตร์). โรงเรียนจักรคำคณาทร. ลำพูน
- [5] จิตภา บุญพัทธ์ อีสริย์ ปั่นก้อง และธีรรัตน์ แซ่มชัยพร. (2562). การสกัดสีธรรมชาติจากพืชกลุ่มแอนโทไซยานิน เพื่อใช้ในการย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม. งานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ครั้งที่ 11, 11 - 12 กรกฎาคม 2562, นครปฐม
- [6] นฤมล อัสวเกศมณี. (2549). การเก็บรักษาตัวอย่างพืชและสัตว์. สงขลา: คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
- [7] พรณวิภา แพงศรี และลัดดาวัลย์ กงพลี. (2564). การพัฒนาสีย้อมธรรมชาติจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินเพื่อ ใช้สำหรับย้อมเนื้อเยื่อพืช. วารสารวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ศึกษา, 5(1), 1-11.
- [8] Dapson, R. W., & Bain, C. L. (2015). Brazilwood, sappanwood, brazilin and the red dye brazilin: from textile dyeing and folk medicine to biological staining and musical instruments. *Biotechnic & Histochemistry*, 90(6), 401-423.
- [9] พงศ์พันธุ์ กองทอง. (2538). ไมโครเทคนิค. กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัดแสงจันทร์การพิมพ์