วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.2) May – August 2021 บทความวิจัย

การพัฒนาสีย้อมโครโมโซมจากสารสกัดข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* var. indica)

Development of Chromosome Staining Dye Extracted from Black Glutinous Rice (*Oryza sativa* var. indica)

ศิริรัตน์ พักปากน้ำ*, น้ำฝน วรรณศิริ และ มนัสวี เดชกล้า

Sirirat Phakpaknam*, Namphon Wannasiri and Manussawee Dechkla

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University

Received : 22 May 2020

Revised : 17 October 2020

Accepted : 29 October 2020

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสีธรรมชาติจากข้าวเหนียวดำ เพื่อใช้ทดแทนสีย้อมเซลล์สังเคราะห์ ที่มีราคาสูงและอาจเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสีย้อมสกัดจากข้าวเหนียวดำกับสีย้อมสำเร็จรูปในการศึกษาโครโมโซมปลายรากหอมด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยทดลองสกัดสีจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี เป็นพืชที่ให้สีกลุ่มของแอนโทไซยานิน โดยเปรียบเทียบสีสกัดจากตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เมทานอล และเอทานอล โดยใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลาย 50%, 70%, 100% ที่อัตราส่วนระหว่างข้าวเหนียวดำต่อตัวทำละลาย 1 : 1 สกัดแบบแช่ในตัวทำละลาย (Maceration) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และใช้เวลาในการย้อมสีโครโมโซม <1, 3, 5 และ 7 นาที พบว่าสีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเมทานอลความเข้มข้น 50% สามารถย้อมติดโครโมโซมปลายรากหอมได้ชัดเจนเทียบเท่าสีอะซิโตคาร์มีน และเนื่องจากการใช้ตัวทำละลายเมทานอลมีอันตรายมากกว่าตัวทำละลายเอทานอล ดังนั้น ตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสีจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี คือตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50% และใช้เวลาในการย้อมสีโครโมโซม <1, 3, 5 และ 7 นาที โดยสามารถย้อมติดสีโครโมโซม และสังเกตเห็นพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะการแบ่งเซลล์ไมโทซิสได้ชัดเจนที่สุด จึงสามารถใช้ทดแทนสีอะซิโตคาร์มีนได้

คำสำคัญ : ข้าวเหนียวดำ ; สีย้อมโครโมโซม ; แอนโทไซยานิน

Abstract

The aim of this study is to extract the chromosome staining dye from Black Glutinous Rice which can be replaced the expensive and hazardous chemical synthetic dye. Comparative study of chromosome staining efficiency between two natural dyes extracted from Black Glutinous Rice and aceto-carmine solution was examined in an onion root tip through microscopic observation. Two Black Glutinous Rice Khao samples, Rai Leum Pua Petchaboon and Mae Jan Pun Dee, were selected for the extraction of two natural red dyes as the anthocyanin-containing materials. Dye extracts from Rai Leum Pua Petchaboon and Mae Jan Pun Dee of Black Glutinous Rice Khao using different composition of methanol and ethanol as solvents were established. Two natural dye solutions were prepared in difference of solvent concentrations (50%, 70% and 100% methanol or ethanol) at the ratio 1:1 of plant per solvent and stained in different time periods (<1, 3, 5 and 7 minutes) for 24 hours at room temperature. The results showed that the Mae Jan Pun Dee dye extracted with 50% ethanol and 50% methanol distinctly stained the chromosomes of an onion root tip as effective as aceto-carmine solution. In conclusions, the Mae Jan Pun Dee dye extracted from 50% ethanol solution at the ration of 1:1 and stained for <1, 3, 5 and 7 minutes was the most effective dye as non-toxic substances with natural counterpart, obviously suitable for examination of the chromosomal characteristics in mitosis division and producing comparable results to synthetic dye staining.

Keywords : black glutinous rice (*Oryza sativa* var. indica.) ; chromosome staining dye ; anthocyanin

* **Corresponding author . E-mail** : sirirat.ph@ssru.ac.th

บทนำ

ในปัจจุบันมีการศึกษาทางพันธุศาสตร์เกี่ยวกับเซลล์และโครโมโซม รวมถึงการแบ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยการศึกษาในเซลล์ปลายรากหอม (Jintara *et al*., 2010) และนิยมใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการย้อมสีโครโมโซม เพื่อให้เห็นองค์ประกอบต่าง ๆ ได้ชัดเจน สีย้อมโครโมโซมจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาระยะการแบ่งเซลล์หรือใช้ตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบต่าง ๆ โดยสารเคมีสังเคราะห์ที่นิยมในการย้อมสี คือ สีอะซิโตคาร์มีน ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง และอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อผู้ทำการทดลองจากส่วนประกอบของกรดอะซิติกหรือกรดกลาเซียลอะซิติกที่ผสมกับสีคาร์มีนซึ่งเป็นอันตรายต่อร่างกาย โดยการสูดดม การระคายเคืองต่อเยื่อบุตา หรือการสัมผัส (Brawijaya, 2018) จึงได้มีการศึกษา และทำการทดลองเพื่อสกัดสีจากพืชธรรมชาติแทนสีอะซิโตคาร์มีน ซึ่งมีราคาถูก สามารถหาได้ง่าย และมีความปลอดภัยต่อผู้ศึกษา

การนำสารสกัดจากธรรมชาติมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปเพื่อใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ได้มีการพัฒนาขึ้นหลาย ด้าน เช่น การย้อมกระดาษ (Seri, 2001) การใช้สีธรรมชาติย้อมเส้นด้าย และเส้นไหมเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ โดยการนำสีย้อมธรรมชาติมาใช้ในการศึกษาทางชีววิทยาสามารถลดการใช้สารเคมีในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ (Weeranuch *et al*., 2014) เนื่องจากสีธรรมชาติสามารถละลายน้ำได้ จะช่วยลดภาวะแวดล้อมเป็นพิษ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การพัฒนาสีย้อมจากธรรมชาติพืชที่ให้สีแดงและพืชที่ให้สีเขียวหลายชนิด มาใช้ในการย้อมสีและศึกษาเนื้อเยื่อพืช (Mayuree *et al*., 2018) พบว่าสีแดงจากดอกกระเจี๊ยบ และสีเขียวจากใบหูกวาง สามารถย้อมติดสีเนื้อเยื่อภายในโครงสร้างลำต้นพืชได้อย่างชัดเจน

ในการสกัดสีย้อมโครโมโซมนั้น พบว่าสารให้สีจากพืชธรรมชาติที่สามารถย้อมติดสีโครโมโซม คือ กลุ่มของแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ สีคาร์มีน พบได้ในพืช ผัก ผลไม้ และดอกไม้หลายชนิด เช่น การสกัดสีจากข้าวเหนียวดำ ผลหนามแดง กระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน เป็นกลุ่มที่ให้สารสีม่วงแดง และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ย้อมโครโมโซม (Sawate, 2006; Unyalug, 2006) ย้อมกระดาษ (Seri, 2001) และใช้เป็นสีผสมอาหาร (Pazmino-Duran *et al*., 2001) เป็นต้น โดยสามารถสกัดสีย้อมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดไฮโดรคลอริก, กรดอะซิติก และสารละลายเมทานอล (Nurainee *et al*., 2018) โดยการทดลองใช้สีสกัดจากกระเจี๊ยบแดงสดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 70% และ 95% สามารถย้อมติดสีเซลล์อสุจิได้ (Amornwadee, 2012) รวมถึงการทดลองใช้สีสกัดจากข้าวโพดหวานสีม่วง ในการย้อมสีโครโมโซมเพื่อศึกษาระยะต่างๆของการแบ่งเซลล์ (Jintara *et al*., 2010; Rujira *et al*., 2017) ซึ่งทำให้พบว่าการติดสีของโครโมโซมพืชมักติดสารสกัดสีแดง หรือสีม่วงแดง นอกจากนี้ การย้อมเซลล์รากพลับพลึงด้วยสีย้อมธรรมชาติ โดยเปรียบเทียบกับการย้อมด้วยสีอะซีโตออร์ซีน พบว่าสามารถใช้ติดตามการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่าง ๆ ได้

ดังนั้น การพัฒนาวิธีการสกัดสีย้อมโครโมโซมในด้านการสกัดสีย้อมจากธรรมชาติ จะช่วยลดอันตรายจากการใช้สารเคมีและใช้ทดแทนสีสังเคราะห์ที่มีตามท้องตลาด เป็นการนำพืชมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านการศึกษาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิต โดยพืชที่นำมาสกัดสีเพื่อย้อมโครโมโซม คือ ข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* var. indica) ซึ่งหาได้ง่าย และราคาไม่สูงมากนัก เป็นการส่งเสริมพืชท้องถิ่น และรายได้ของเกษตรกร รวมถึงเป็นการอนุรักษ์พันธุ์พืชที่มีคุณค่าและเห็นความสำคัญของภูมิปัญญาในการใช้ประโยชน์จากสีธรรมชาติ อีกทั้งยังสามารถส่งเสริมการเรียนรู้ของผู้ที่สนใจศึกษา

ในด้านพันธุศาสตร์ได้อีกด้วย ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้คือ ศึกษาวิธีการสกัดสีย้อมโครโมโซมจากข้าวเหนียวดำ และศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการย้อมสีโครโมโซมด้วยสีย้อมที่สกัดจากข้าวเหนียวดำ เพื่อใช้ศึกษาในกระบวนการแบ่งเซลล์ทางชีววิทยา

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดสีย้อมโครโมโซมจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ (ดัดแปลงจากวิธีของ Weeranuch *et al*., 2014)

นำเมล็ดข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี 40 กรัม แช่ในตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้น 50%, 70% และ 100% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลาย 1:1 กรัม/มิลลิลิตร) และ ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 50%, 70% และ 100% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลาย 1:1 กรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก แล้วเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่ได้ และคำนวณร้อยละผลผลิตของปริมาณสารสกัด (% yield)

การย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอมด้วยสีสกัดธรรมชาติจากข้าวเหนียวดำ

นำปลายรากหอมที่เตรียมไว้ในน้ำยาคงสภาพ ตัดเฉพาะส่วนปลายรากสีขาวขุ่นยาวประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร วางบนสไลด์ที่สะอาด 1 - 2 ราก ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้ง หยดกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10% ไปบนชิ้นส่วนของราก 1 - 2 หยด ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นหยดสีสกัดจากข้าวเหนียวดำไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดีด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอล ความเข้มข้น 50%, 70% และ 100% ใช้ด้ามเข็มเขี่ยกด จากนั้นทำการขยี้เซลล์ให้กระจาย (Squash Technique) ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง สังเกตการติดสีของโครโมโซม ถ่ายภาพและบันทึกผล โดยทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย้อมสีโครโมโซมของสีย้อมสกัดจากข้าวเหนียวดำกับสีย้อมสังเคราะห์อะซิโตคาร์มีน และตรวจสอบคุณภาพของสีสกัดในการย้อมโครโมโซมภายหลังการเก็บรักษาที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

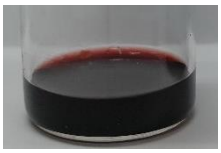
วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Science of windows) Version 23 โดยวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดสีย้อมโครโมโซมจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี

ผลการวิจัย

การสกัดสีย้อมโครโมโซมจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ

ลักษณะของสีที่ได้จากการสกัดของข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 50% และ 70% ตัวละลายเมทานอลความเข้มข้น 50%, 70% และ 100% มีสีม่วงเข้ม ส่วนลักษณะของสีที่ได้จากการสกัดของข้าวเหนียวดำทั้งสองสายพันธุ์ ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 100% มีสีม่วงใส ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะสีของสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอล

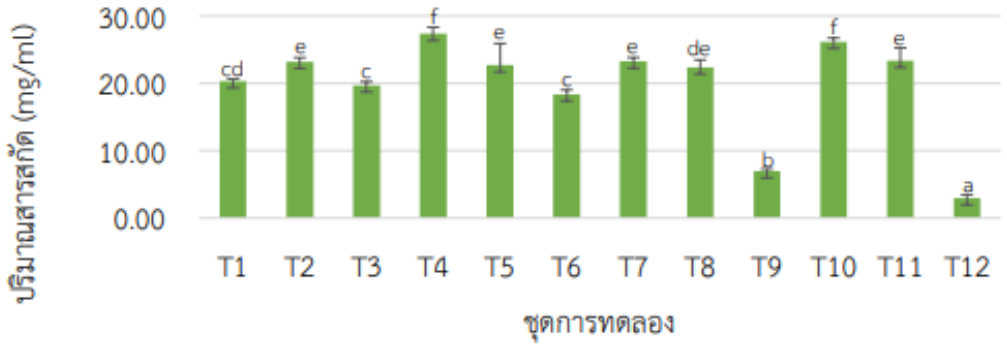
สารสกัดสีย้อมโครโมโซม	ลักษณะสีของสารสกัด	สารสกัดสีย้อมโครโมโซม	ลักษณะสีของสารสกัด	สารสกัดสีย้อมโครโมโซม	ลักษณะสีของสารสกัด
T1		T5		T9	
T2		T6		T10	
T3		T7		T11	
T4		T8		T12	

การวัดปริมาณสารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์

น้ำหนักเฉลี่ยของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล ความเข้มข้น 50% มีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด คือ 27.33 ± 0.98 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 26.17 ± 0.55 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมา คือ สารสกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 70% มีน้ำหนักเฉลี่ย 23.33 ± 1.91 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 50% มีน้ำหนักเฉลี่ย 23.23 ± 0.60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ด้วยตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 70% มีน้ำหนักเฉลี่ย 23.20 ± 0.61 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 22.67 ± 3.23 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 70% มีน้ำหนักเฉลี่ย 22.37 ± 1.11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ ด้วยตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 50% มีน้ำหนักเฉลี่ย 20.30 ± 0.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และน้ำหนักเฉลี่ยน้อยจนถึงน้อยที่สุด คือ สารสกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอล ความเข้มข้น 100% มีน้ำหนักเฉลี่ย 19.70 ± 0.53, 18.37 ± 0.65, 6.97 ± 0.32 และ 2.97 ± 0.49 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 1

ตารางที่ 2 สารสกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และแม่จันพันธุ์ดี

สารสกัดสีย้อมโครโมโซม	สัญลักษณ์
Methanol 50% ข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์	T1
Methanol 70% ข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์	T2
Methanol 100% ข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์	T3
Methanol 50% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี	T4
Methanol 70% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี	T5
Methanol 100% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี	T6
Ethanol 50% ข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์	T7
Ethanol 70% ข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์	T8
Ethanol 100% ข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์	T9
Ethanol 50% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี	T10
Ethanol 70% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี	T11
Ethanol 100% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี	T12



ภาพที่ 1 การวิเคราะห์น้ำหนักเฉลี่ยของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และแม่จันพันธุ์ดี

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b, c, d, e และ f หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอมด้วยสีสกัดธรรมชาติจากข้าวเหนียวดำ

นำสีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำทั้งสองสายพันธุ์ด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล ความเข้มข้น 50%, 70% และ 100% ย้อมโครโมโซมปลายรากหอมโดยใช้เวลาในการย้อม <1, 3, 5 และ 7 นาที ด้วยวิธี squash technique เพื่อศึกษาการติดสีของโครโมโซม ดังตารางที่ 3 พบว่าสีของสกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ที่สกัดด้วยเมทานอลและ

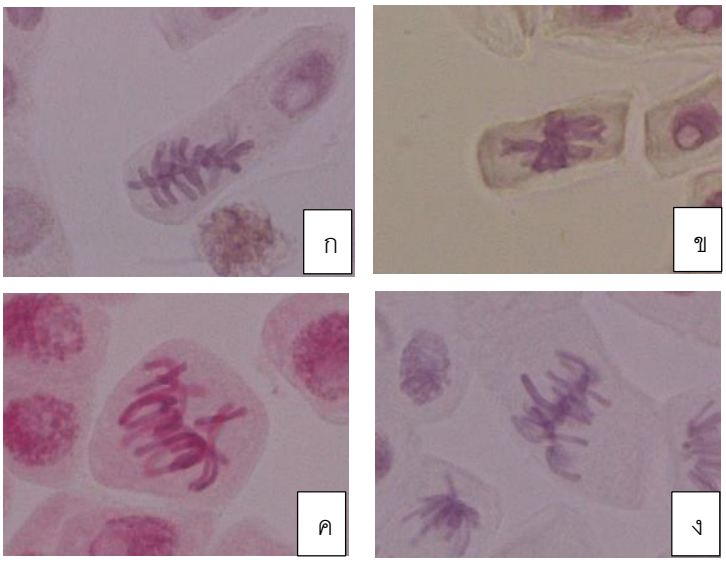
เอทานอล ความเข้มข้น 50% ใช้เวลาในการย้อมโครโมโซม <1, 3, 5 และ 7 นาที สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ชัดเจน ส่วนสีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ ด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 50% และสีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 70% ใช้เวลาในการย้อม 3, 5 และ 7 นาที และข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ ด้วย เอทานอล ความเข้มข้น 50% ใช้เวลาในการย้อม 7 นาที สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ชัดเจนเช่นกัน สีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 70% ใช้เวลาในการย้อม <1 นาที และความเข้มข้น 100% ใช้เวลาในการย้อม <1, 3, 5 และ 7 นาที สีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ที่สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 50% ใช้เวลาในการย้อม <1, 3 และ 5 นาที สีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ที่สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70% ใช้เวลาในการย้อม <1, 3, 5 และ 7 นาที และสีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ที่สกัดด้วย เอทานอล ความเข้มข้น 70% ใช้เวลาในการย้อม <1, 3, 5 และ 7 นาที สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ปานกลางจนถึงเล็กน้อย ส่วนสีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอล ความเข้มข้น 100 % ไม่สามารถย้อมติดสีโครโมโซม ดังภาพที่ 2

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลการติดสีเมื่อย้อมด้วยสีสกัดจาก ข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ที่สกัดสีย้อมด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เมทานอล ความเข้มข้น 50%, 70% และ 100% และเอทานอล ความเข้มข้น 50%, 70% และ 100% ที่เวลาในการย้อมสี <1, 3, 5 และ 7 นาที

เวลา (นาที) / สีย้อมโครโมโซม	<1	3	5	7
T1	++	+++	+++	+++
T2	++	++	++	++
T3	+	++	++	++
T4	+++	+++	+++	+++
T5	++	+++	+++	+++
T6	+	+	++	++
T7	++	++	++	+++
T8	+	+	+	+
T9	—	—	—	—
T10	+++	+++	+++	+++
T11	+	+	++	++
T12	—	—	—	—

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่ติดสีโครโมโซม + หมายถึง ติดสีโครโมโซมเล็กน้อย
++ หมายถึง ติดสีโครโมโซมปานกลาง +++ หมายถึง ติดสีโครโมโซมชัดเจน

เมื่อเปรียบเทียบสีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอล ความเข้มข้น 50% และสีอะซีโตคาร์มีน โดยใช้ระยะเวลาในการย้อม <1 นาที มาเปรียบเทียบผลการติดสีของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ได้แก่ ระยะโปรเฟส ระยะเมทาเฟส ระยะแอนาเฟส และระยะเทโลเฟส ได้ผลดังตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าสีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี T4 และT10 และสีอะซิโตคาร์มีน มีประสิทธิภาพในการย้อมติดสีโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่างๆ ใกล้เคียงกัน และมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยโดยใช้ระยะเวลาในการย้อมน้อยกว่า 1 นาที



ภาพที่ 2 การติดสีโครโมโซมปลายรากหอมที่ย้อมด้วยสีสกัดจากข้าวเหนียวทั้งสองสายพันธุ์ด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอล ความเข้มข้น 50% เวลาย้อมโครโมโซมปลายรากหอมน้อยกว่า 1 นาที

ก) Methanol 50% ข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์

ข) Ethanol 50% ข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์

ค) Methanol 50% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี

ง) Ethanol 50% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี

วิจารณ์ผลการวิจัย

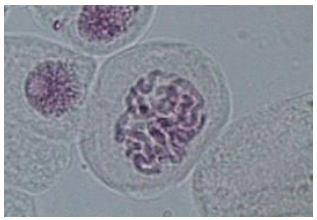
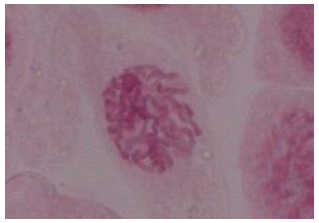
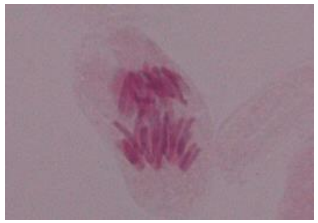
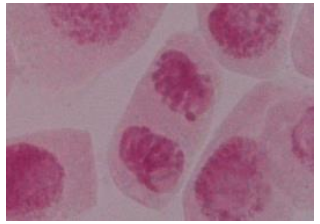
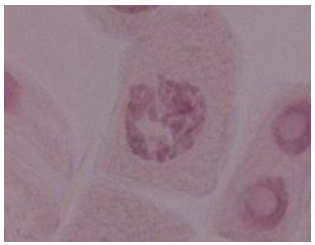
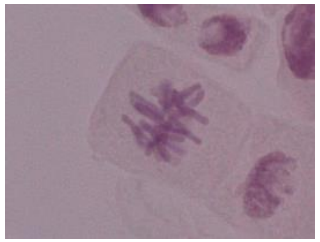
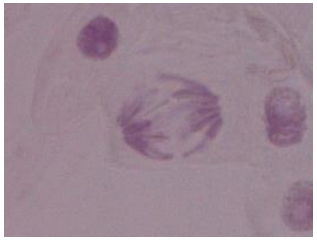
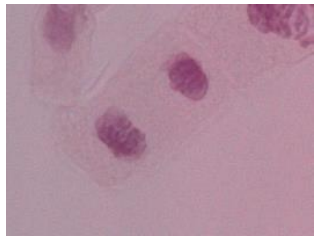
จากการศึกษาการสกัดสีย้อมโครโมโซมปลายรากหอมจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล สามารถให้สารสกัดที่ใช้ในการย้อมติดสีโครโมโซมตรวจสอบโครงสร้างของเซลล์ และพฤติกรรมของโครโมโซมจากการแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ ได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Samret *et al*. (2009) รายงานว่าข้าวเหนียวดำสามารถย้อมสีโครโมโซมได้เช่นกัน จากผลการทดลองพบว่าข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี สามารถให้สีย้อมที่ชัดเจน อีกทั้งราคาถูกกว่าข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ ส่วนการเลือกตัวทำละลายพบว่า ตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลในแต่ละความเข้มข้นมีผลต่อการติดสีของโครโมโซมต่างกัน เมื่อย้อมสีในระยะเวลา <1, 3, 5 และ 7 นาที โดยสีที่สกัดจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 100% พบว่ามีการ

ระเหยค่อนข้างเร็วและไม่ติดสีทุกระยะเวลา ตัวทำละลายที่ติดสีได้ชัดเจน คือ เมทานอลและเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50% ซึ่งติดสีทุกระยะเวลา และติดได้ชัดเจนกว่าตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลความเข้มข้น 70% และ 100% เนื่องจากตัวทำละลายเมทานอลมีความเป็นพิษต่อร่างกายและระบบทางเดินหายใจ รวมถึงอาจมีผลกระทบจากสภาพสารเคมีตกค้างและปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม ดังนั้นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการใช้สกัดสี คือ เอทานอล ที่ความเข้มข้น 50% ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้เอทานอล ความเข้มข้น 60% ในการสกัดสีจากครั่งเพื่อการย้อมโครโมโซมปลายรากหอม (Praween *et al*., 2010) สีสกัดจากธรรมชาติ ฝางเสน ลูกหม่อน จันทน์แดง และอัญชัน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และทดลองย้อมโครโมโซมของพลับพลึง พบว่าสีจากลูกหม่อนสามารถย้อมติดโครโมโซมของพลับพลึงดอกขาวได้

จากผลการทดลองการสกัดสีย้อมจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ด้วยตัวทำละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้น 50% พบว่ามีปริมาณสารสกัด 27.33 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ ตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50% มีปริมาณสารสกัด 26.17 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ พบว่าการสกัดสีย้อมโดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักข้าวเหนียวดำต่อปริมาตรของตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลที่ 1:1 (กรัม/มิลลิลิตร) มีประสิทธิภาพต่อการสกัดสีและการติดสีย้อมของโครโมโซมที่เหมาะสมและชัดเจน เนื่องจากการใช้อัตราส่วนของน้ำหนักตัวอย่างพืชต่อปริมาตรของตัวทำละลายที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลถึงการเจือจางของสีสกัดและทำให้มีการติดสีของโครโมโซมลดน้อยลง (Wanpen, 2015) ดังนั้นสีย้อมสกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50% ในอัตราส่วน 1:1 (กรัม/มิลลิลิตร) จึงเป็นสีย้อมที่เหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษากระบวนการแบ่งเซลล์ทางชีววิทยา โดยสามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้อย่างชัดเจน เนื่องจากสีย้อมสกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี มีสารในกลุ่มแอนโทไซยานินซึ่งมีความสามารถในการย้อมติดสีของโครโมโซมได้เป็นอย่างดี (Duangkamol *et al*., 2008) อีกทั้งยังมีราคาถูก ปลอดภัย สามารถสกัดได้ง่าย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สามารถใช้ทดแทนสีสังเคราะห์ได้ โดยการเก็บรักษาสีย้อมไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะช่วยยืดอายุการใช้งานของสีย้อมและความคงตัวของปริมาณแอนโทไซยานินในสารสีสกัดได้นานอย่างน้อย 1 เดือน (Rujira *et al*., 2017)

ทั้งนี้ เทคนิคการสกัดสีย้อมโครโมโซม เป็นเทคนิคเบื้องต้นสำหรับผู้ที่ต้องการศึกษา เพื่อใช้สีจากธรรมชาติทดแทนสีสังเคราะห์ในการย้อมโครโมโซม และการติดสีของโครโมโซมนั้นก็ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น เทคนิคความชำนาญของผู้ทำการทดลอง ลักษณะของรากหอมที่นำมาใช้ในการศึกษา และคุณภาพของข้าวเหนียวดำที่นำมาใช้ในการสกัดสีย้อม รวมถึงปัจจัยด้านอื่น ๆ

ตารางที่ 4 การติดสีโครโมโซมที่ย้อมด้วยการสกัดข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดีด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล ความเข้มข้น 50% เปรียบเทียบกับการติดสีย้อมโครโมโซมที่ย้อมด้วยสีอะซิโตคาร์มีน และใช้เวลาในการย้อมน้อยกว่า 1 นาที ในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

ระยะการแบ่งเซลล์ / สีย้อม	โปรเฟส (prophase)	เมทาเฟส (metaphase)	แอนาเฟส (anaphase)	เทโลเฟส (telophase)
สีอะซิโตคาร์มีน				
Methanol 50% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี				
Ethanol 50% ข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี				

สรุปผลการวิจัย

วิธีการสกัดสีย้อมโครโมโซมจากข้าวเหนียวดำ (Black Glutinous Rice) โดยใช้สีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำข้าวไร่ลืมผัวเพชรบูรณ์ และข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี สกัดสีย้อมด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เมทานอล ความเข้มข้น 50%, 70% และ 100% และเอทานอล ความเข้มข้น 50%, 70% และ 100% ย้อมโครโมโซมปลายรากหอมโดยใช้เวลาในการย้อม <1, 3, 5 และ 7 นาที ด้วยวิธี squash technique สีย้อมที่ติดสีโครโมโซมปลายรากหอมได้อย่างชัดเจน และมีประสิทธิภาพคือ สีที่สกัดจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดี โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่อัตราส่วน 1:1 (กรัม/มิลลิลิตร) ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม (ความเข้มข้น 50%) และใช้เวลาในการย้อม <1, 3, 5 และ 7 นาท ซึ่งสามารถพบการติดสีโครโมโซมชัดเจน ได้ตั้งแต่เวลา <1 นาที และสามารถย้อมติดสีโครโมโซม ตรวจสอบขอบเขตของเซลล์ และลักษณะของเซลล์ที่อยู่ในขั้นตอนของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้อย่างชัดเจนเทียบเท่าสีอะซิโตคาร์มีน โดยจัดเป็นสีย้อมสกัดจากธรรมชาติที่ปราศจากสารช่วยติดสีโดยยังมีความคงตัว ให้คุณภาพการติดสีที่ดี และมีคุณสมบัติในการรักษาสภาพสีได้ดีโดยเก็บรักษาที่อุณภูมิต่ำได้นานอย่างน้อย 1 เดือน

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชิราภรณ์ พิกุลทอง ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

Amornwadee Chudaeng. (2012), *The Development of Semem Staining Method by Using Natural Herbs*. Degree Master of Science Z Forensic Science), Silpakorn University. Thailand. 100 P. (in Thai)

Brawijaya, J.I. (2018). Extract of dragon fruit pulp (*Hylocereus polyrhizus*) potentially stain chromosomes of red onion (*Allium ascalonicum*). *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, *2*, 93-97.

Duangkamol Luemchan, Withida Chantrapornchai, Vichai Haruthaithanasan. (2008). Extraction of Anthocyanin from Black Glutinous Rice (*Oryza sativa* L.) . Proceeding of 46th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry (pp. 320-327). Thailand. Kasetsart University. *29 January-1 February 2008*.

Jintara Lakprayoon, Nuanchan mutchariyakul and Siriluck Iamtham. (2010). Anthocyanins Extract from Plants for Staining Chromosome: Sources, Concentration and Chemical Structure. In *The 7th KU-KPS conference* (pp. 1615-1623). Thailand. Kasetsart University Press. *7-8 December 2010*.

Mayuree Kunirat, Prawpran Dungkae, Suchaya Wiriyakarun and Siaporn Homhuan. (2018). Extraction and Application of Natural Dyes from Indigenous Plants for Plant Histological Staining. In 3rd *North Eastern Science and Technology conference*. Thailand. Ubonratchathani University. *12 February 2018*.

Nurainee Mamah, Pawika Mahasawat and Oranut Sukanan. (2018).The Effects of Shelf Life and Mordants on Efficiency of The Chromosome Staining Dye Extracted from Fresh Black-Honey Shrub (*Phyllanthus reticulatus* Poir.) Fruits. In *The 2nd Botancial Conference of Thailand (BCT2, 20MFU2018)* (pp. PC-08;1-8). Thailand. Khon Kaen University. *3-5 April 2018*.

Pazmino-Duran, A.E., Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. and Gloria, M.B.A. (2001). Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as Potential Food Colorants. *Journal of Food Chemistry*, *75,* 211-216.

Praween, S., A. Tanomtong, S. Thiprautree, S. Sikhruadong and B. Gomontean. (2010). Chromosomal staining comparison of plant cells with black glutinous rice *(Oryza sativa* L.) and lac (*Laccifer lacca* Kerr). *The Japan Mendel Society*, *75*, 89–97.

Rujira Tongsrisuk, Yodchai Chuaynkern, Alongklod Tanomtong, and Sayan Punsoomboon. (2017). Application of a Natural Dye from Purple Sweet Corn (*Zea mays* saccharata) for Plant Cell Mitosis Studies, *Koch Cha Sarn Journal of Science*. 39 (2), 34-44. (in Thai)

Samret, S., A. Tanomtong, W. Wonkaonoi and B. Gomontean. (2009). Chromosome staining of crinum lily (*Crinum asiaticum* L.) using natural dyes. *The Japan Mendel Society*, *74*, 17–22.

Sawate Vannarattanarat. (2006). *Effect of chitosan on chromosome staining with the pigment extraction from plant*. Bachelor degree of science (General science),Kasetsart University. Bangkok . Thailand. 44 P. (in Thai)

Seri Sukumalaphun. (2001). *Development of Roselle Natural Color Powder for Saa Paper Dye*. Master. Science (Agro-Industrial Product Development), Kasetsart University. Bangkok. Thailand. 202 P. (in Thai)

Unyalug Wachirachaiyakarn, Nuanchan mutchariyakul and Siriluck Iamtham. (2006). Study on chemical structure and quality of chromosomal staining extracted from plants. *Agricultural Science Journal*, *37*, 37-44. (in Thai)

Wanpen Kaewpuk. (2015). Study of The Natural Dyes from Plants for Chromosome Staining in A Biological Laboratory. In *The 7th NPRU National Academic Conference* (pp. 1434-1442). Thailand. Nakhon Pathom Rajabhat University. *30-31 March 2015*.

Weeranuch Wonkaonoi , Puntiva Keawmad , Alongkoad Tanomtong and Pornnarong Siripiyasing. (2014). Selection of Dyes Extracted from Natural of Northeast Thailand for Chromosome staining, *Journal of Research for Development Social and Community*. *2*(1), 42-52. (in Thai)