สีย้อมจากรงควัตถุพืชสำหรับย้อมสีละอองเรณู
Plant pigment dyes for pollen staining

ชูเทพ พรรณศรี[1], ภาสกร บุญชาลี[2*]
Chuthep Phannasri[1], Pasakorn Bunchalee[2]

Received: 27 August 2021 ; **Revised**: 21 February 2022 ; **Accepted**: 5 May 2022

บทคัดย่อ
ที่ผ่านมาการศึกษาสีย้อมธรรมชาติเพื่อย้อมโครงสร้างต่าง ๆ ของพืช ยังจำกัดเฉพาะในเนื้อเยื่อและโครโมโซม ละอองเรณูประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่แตกต่างจากโครงสร้างของพืชที่กล่าวมา การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกพืชและตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัดสีย้อมธรรมชาติเพื่อใช้ย้อมละอองเรณู จากการสกัดสีย้อมในดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) ดอกหางนกยูงฝรั่ง (*Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.) เปลือกผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose) และเปลือกผลมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ด้วยอัตราส่วน พืช 1 กรัม ต่อน้ำหรือเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลาย และผ่านกระบวนการแช่เยือกแข็งแบบสุญญากาศ แล้วนำสีย้อมธรรมชาติย้อมละอองเรณูของชบา *(Hibiscus rosa-sinensis* L.) พบว่า สีย้อมที่สกัดจากดอกหางนกยูงฝรั่งและเปลือกผลแก้วมังกรด้วยน้ำกลั่น มีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกับสีย้อมซาฟรานิน โอ เนื่องจากย้อมละอองเรณูติดสีชมพู และสีย้อมมีความโปร่งแสง ซึ่งทำให้เห็นรูปร่างของหนาม ลวดลายบนผนังชั้นเอกซีน ความหนาของชั้นเอกซีน และลักษณะของช่องเปิดได้ชัดเจนกว่าละอองเรณูที่ไม่ย้อมสี ส่วนสีย้อมที่สกัดจากพืชทั้งสี่ชนิดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 มีประสิทธิภาพต่ำถึงพอใช้ในการย้อมสี ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้สกัดรงควัตถุเพื่อทำเป็นสีย้อมละอองเรณู

คำสำคัญ: สีย้อมธรรมชาติ การย้อมสีละอองเรณู ละอองเรณู การสกัดรงควัตถุ

Abstract
The pollen-staining efficiency of natural dyes has been tested only in plant tissues and chromosomes, but still has not been investigated in pollen. The organic compounds of pollen are different from those of other plant structures. Therefore, this research aims to select plants and solvents that are suitable for natural dye extraction for pollen staining. The flowers of *Clitoria ternatea* L. and *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. and pericarps of *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose, and *Garcinia mangostana* L. were extracted with distilled water or 95 percent ethyl alcohol at a ratio of 1:10 (weight/volume) and soaking for 72 h. Then the samples were filtered, evaporated, and vacuum freeze-dried. Pollen of *Hibiscus rosa-sinensis* L. was used to test the efficiency of natural dyes. The results showed that the natural dye extracted with distilled water from flowers of *D. regia* and pericarps of *H. undatus* had efficiency similar to safranin O for pollen staining, in regard to color of the stain and also transparency. In addition, the shape and size of exine sculpturing, ornamentation, aperture, and pollen wall thickness were seen more clearly than in unstained pollen. On the other hand, the natural dyes were extracted from these plants with 95 percent ethyl alcohol have low to moderate efficiency in pollen staining. Thus, it is not suitable for use as a solvent for pigment extraction.

Keywords: natural dyes, pollen staining, pollen, pigment extraction

[1] นักวิทยาศาสตร์, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150
[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150
[1] Scientist, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham, Thailand, 44150
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham, Thailand, 44150
[*] Corresponding author: e-mail: pasakorn.b@msu.ac.th

บทนำ

โดยทั่วไปแล้วเซลล์เนื้อเยื่อ และโครงสร้างขนาดเล็กของพืชไม่มีสี ดังนั้นการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้การย้อมสี เพื่อให้สามารถสังเกตเห็นโครงสร้างต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจนมากขึ้น (วันเพ็ญ แก้วพุก, 2015) แต่เนื่องจากเซลล์พืชแต่ละชนิดประกอบด้วยสารประกอบที่แตกต่างกัน เช่น เซลล์พาเรงคิมาประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน เป็นหลัก เซลล์คอลเลนคิมาประกอบด้วยเซลลูโลส และเพคตินเป็นหลัก ส่วนเซลล์สเคอเรนคิมานั้นผนังเซลล์ปฐมภูมิประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน ส่วนผนังเซลล์ทุติยภูมิประกอบด้วยเซลลูโลส และอาจมีหรือไม่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ (เทียมใจ คมกฤส, 2542) จึงทำให้สีย้อมแต่ละชนิดย้อมติดเซลล์และเนื้อเยื่อพืชได้แตกต่างกัน เช่น สีซาฟรานิน โอ (Safranin O) ย้อมติดสารประกอบพวกลิกนิน ซูเบอริน คิวติน และนิวเคลียส สีฟาสกรีน เอฟซีเอฟ (Fast Green FCF) ย้อมติดโครงสร้างพืชที่มีเซลลูโลส เพคติน และไซโทพลาสซึม เป็นต้น โดยทั่วไปสีย้อมทางชีวภาพถูกแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ สีย้อมธรรมชาติ (natural dye) ซึ่งสกัดได้จากสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ จุลินทรีย์ และแร่ธาตุ และสีย้อมสังเคราะห์ (synthetic dye) ซึ่งเกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมีและนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น สีซาฟรานิน โอ (Johansen, 1940) เนื่องจากมีความจำเพาะต่อผนังเซลล์ทุติยภูมิ และนิวเคลียส (มานิต คิดอยู่, 2552) อย่างไรก็ตามสีชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง การก่อให้เกิดโรคมะเร็ง และการกลายพันธุ์ (Robinson *et al*., 2001 ; Azimvand *et al*., 2018) นอกจากนี้ยังมีราคาแพงและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม หากมีการทิ้งแบบผิดวิธี (มานิต คิดอยู่, 2552 ; จินตรา เล็กประยูร และคณะ, 2553 ; รุจิรา ทองศรีสุข และคณะ, 2560) จากผลกระทบที่เกิดขึ้นปัจจุบันจึงมีการศึกษาสีย้อมธรรมชาติและวิธีสกัดที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ทดแทนสีสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้น เช่น จินตรา เล็กประยูร และคณะ (2553) ศึกษาการสกัดแอนโทไซยานินจากผลหม่อน ผลหว้า ผลแก้วมังกร และใบกะหล่ำปลีม่วงด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด พบว่าผลของหม่อนสดที่นำมาสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 0.1 ในเมทานอลอัตราส่วน 1:1 สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ดีที่สุด วันเพ็ญ แก้วพุก (2558) ทำการศึกษาสารสกัดและการเตรียมสีย้อมธรรมชาติจากดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน เปลือกแก้วมังกร เปลือกมังคุด และเปลือกมะเขือม่วง เพื่อใช้ย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอมและเปรียบเทียบกับสีย้อมคาร์บอลฟุกซิน พบว่าสีย้อมที่สกัดจากดอกกระเจี๊ยบด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:2 (กรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ติดสีโครโมโซมได้ดีและมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสีคาร์บอลฟุกซิน นอกจากนี้ รุจิรา ทองศรีสุข และคณะ (2560) ศึกษาการสกัดสีย้อมจากข้าวโพดหวานสีม่วง ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด เพื่อนำมาใช้ศึกษาการแบ่งเซลล์ไมโทซิสของเซลล์รากหอม โดยนำข้าวโพดหวานสีม่วงมาสกัดด้วยน้ำอัตราส่วน 1:1 และอบให้แห้ง และเมื่อนำมาละลายด้วยกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 45 (pH 2) สามารถย้อมสีโครโมโซมของเซลล์รากหอมได้ดีที่สุด และสามารถใช้ทดแทนสีออร์ซีนได้ เช่นเดียวกันกับ จิดาภา บุญพันธ์ และคณะ (2562) ศึกษาการสกัดสารแอนโทไซยานินจาก เปลือกมังคุด อัญชัน กะหล่ำปลีม่วง และมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด เพื่อใช้ในการย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม พบว่าสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ทั้งแบบสดและแห้ง ที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 มีค่าเฉลี่ยความพึงพอใจสูงสุด ไม่เพียงเท่านี้ สุกัญญา แย้มสรวล (2558) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติสีย้อมธรรมชาติจากพืชกลุ่มที่ให้สารแอนโทไซยานิน คือ ข้าวเหนียวดำ และกะหล่ำปลีม่วง และกลุ่มที่ให้สารเบทาเลน คือ เปลือกแก้วมังกรและผลผักปลัง โดยสกัดด้วยตัวทำละลายคือน้ำในอัตราส่วน 1:1 (กรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ารงควัตถุจากข้าวเหนียวดำและเปลือกแก้วมังกรสามารถนำมาใช้ย้อมเนื้อเยื่อพืชทั้งของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ได้ โดยมีค่าความพึงพอใจไม่แตกต่างจากการใช้สีซาฟรานิน โอ เพื่อให้เห็นประสิทธิภาพของสารสีจากพืชที่ใช้เป็นสีย้อม ฉันทนา รุ่งพิทักษ์ไชย และคณะ (2555) ได้รวบรวมรายชื่อพืชที่ให้สีย้อมและส่วนของพืชที่นำมาสกัดสีย้อม ดังนี้ สารสีที่สกัดได้จากใบอีนา ดอกอัญชัน เหง้าขมิ้น ใบกระท้อน กลีบดอกเข็มแดง ใบประดับเฟื่องฟ้าสีชมพู ใบมังคุด ผลหว้า เยื่อหุ้มเมล็ดคำแสด และกลีบดอกเทียนบ้าน สามารถย้อมสีเนื้อเยื่อส่วนลำต้นและกิ่งกระสังได้ ส่วนสารสีที่สกัดได้จากผลหว้า ผลหม่อน ดอกคำฝอย ดอกชบา และใบเตยหอม สามารถย้อมสีโครโมโซมในเซลล์รากหอมได้ จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า รอบตัวเรามีพืชหลายชนิดที่มีสารสีและสามารถนำมาสกัดเป็นสีย้อมได้ และยังมีอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่มีการศึกษาประสิทธิภาพในการใช้เป็นสีย้อม เช่นเดียวกันกับการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมที่จะนำไปย้อมโครงสร้างต่าง ๆ ของพืช ซึ่งยังจำกัดอยู่เฉพาะในส่วนของเนื้อเยื่อและโครโมโซม แต่ยังขาดในส่วนของละอองเรณู ซึ่งจำเป็นต้องใช้สีย้อมในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานเช่นกัน ละอองเรณูเป็นเซลล์ที่มีโครงสร้างและสารประกอบที่แตกต่างจากโครงสร้างอื่นๆ ของพืช กล่าวคือมีผนัง 2 ชั้น ได้แก่ ผนังชั้นนอกหรือชั้นเอกซีน (exine) ประกอบด้วยสารสปอโรพอลเลนิน (sporopollenin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังชั้นนี้ และสารพอลีแซคาไรด์ (polysaccharids) นอกจากนี้ละอองเรณูของพืชบางชนิดยังมีสารไกลโคคาลิก (glycocalyx) เป็นส่วนประกอบเช่นกัน ส่วนผนังชั้นใน หรือชั้นอินทีน (intine) ประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นหลัก (Moore *et al*., 1991)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกพืชที่มีรงควัตถุซึ่งมีประสิทธิภาพในการย้อมละอองเรณู และตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดรงควัตถุจากพืชสำหรับใช้เป็นสีย้อมในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของละอองเรณู นอกจากนี้ยังเป็นการลดการใช้สีย้อมสังเคราะห์ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม และลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสีสังเคราะห์ที่มีราคาแพง

วิธีดำเนินการวิจัย

นำดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) ดอกหางนกยูงฝรั่ง (*Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.) เปลือกผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose) และเปลือกผลมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) มาอบให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างแห้งสนิท จากนั้นนำตัวอย่างพืชแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วนำไปทำการสกัดรงควัตถุจากพืชทั้งสี่ชนิดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:10 (พืช 1 กรัม: น้ำหรือเอทิลแอลกอฮอร์ 10 มิลลิลิตร) โดยการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลายเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทำการกรองรงควัตถุที่สกัดได้ด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรองเบอร์ 1 ตามลำดับ ทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) แล้วนำรงควัตถุที่สกัดได้ผ่านขั้นตอนการทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็งแบบสุญญากาศ (vacuum freeze dry) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อรักษาคุณสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี โดยขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้นนี้ดัดแปลงจากวิธีการของจิดาภา บุญพันธ์ และคณะ (2562) จากนั้นทำการเตรียมสีย้อมจากรงควัตถุที่สกัดได้ด้วยการละลายในน้ำกลั่น หรือเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:1 (ผงรงควัตถุ 1 กรัม: ตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร) เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย้อมสีละอองเรณูของชบา *(Hibiscus rosa-sinensis* L.) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับละอองเรณูที่ไม่ได้ย้อมสี และละอองเรณูที่ย้อมด้วยสีซาฟรานิน โอ ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสีย้อมจากพืชทั้งสี่

ชบาเป็นพืชที่ไม่ทราบแน่ชัดเรื่องถิ่นกำเนิดว่ามาจากที่ใด (Khan *et al.*, 2017) แต่ด้วยการที่พืชถูกนำมาปลูกเป็นไม้ประดับและพบเห็นได้โดยทั่วไป มีละอองเรณูขนาดใหญ่มาก คือ 135-170 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลม มีช่องเปิดแบบรูกระจายรอบละอองเรณู และมีหนามยื่นออกมาจากชั้นหลังคารอบละอองเรณู (Hayat, 2009) ด้วยลักษณะทางสัณฐานที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าละอองเรณูของพืชชนิดนี้มีความเหมาะสำหรับการนำมาทดสอบการย้อมสี เนื่องจากทำให้ผู้วิจัยสามารถสังเกตและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการติดสีย้อมของโครงสร้างต่างๆ ตั้งแต่ส่วนของหนาม ผนังละอองเรณู ไปจนถึงช่องเปิด ได้เป็นอย่างดี

โดยทั่วไปสีที่นิยมใช้ย้อมเพื่อศึกษาโครงสร้างของละอองเรณูคือ ซาฟรานิน โอ เนื่องจากเมื่อนำมาย้อมละอองเรณูแล้ว สีมีความโปร่งแสง ไม่มีตะกอน และทำให้เห็นโครงสร้างต่างๆ ได้ชัดเจนขึ้น แต่เนื่องด้วยสีย้อมที่ใช้ในการย้อมละอองเรณูครั้งนี้สกัดจากพืช จึงมีความแตกต่างจากสีย้อมสังเคราะห์ ผู้วิจัยจึงได้กำหนดเกณฑ์เปรียบเทียบประสิทธิภาพ ดังนี้ 1. ความโปร่งแสงหรือทึบแสงของสีย้อมเมื่อเปรียบเทียบกับละอองเรณูที่ไม่ย้อมสี และละอองเรณูที่ย้อมด้วยสีซาฟรานิน โอ 2. ความชัดเจนของโครงสร้างต่างๆ ของละอองเรณู เมื่อเปรียบเทียบกับละอองเรณูที่ไม่ย้อมสี และละอองเรณูที่ย้อมด้วยสีซาฟรานิน โอ [โดยเกณฑ์ในข้อนี้จะถูกแบ่งออกเป็น 4 ระดับ คือ ระดับดี (มีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือใกล้เคียงกับสีซาฟรานิน โอ) ระดับพอใช้ (มีประสิทธิภาพด้อยกว่าสีซาฟรานิน โอ แต่ดีกว่าการไม่ย้อมสี) ระดับต่ำ (มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการไม่ย้อมสี) และระดับไม่ดี (มีประสิทธิภาพด้อยกว่าการไม่ย้อมสี)] และ 3. ตะกอนที่แขวนลอยอยู่ในสีย้อม

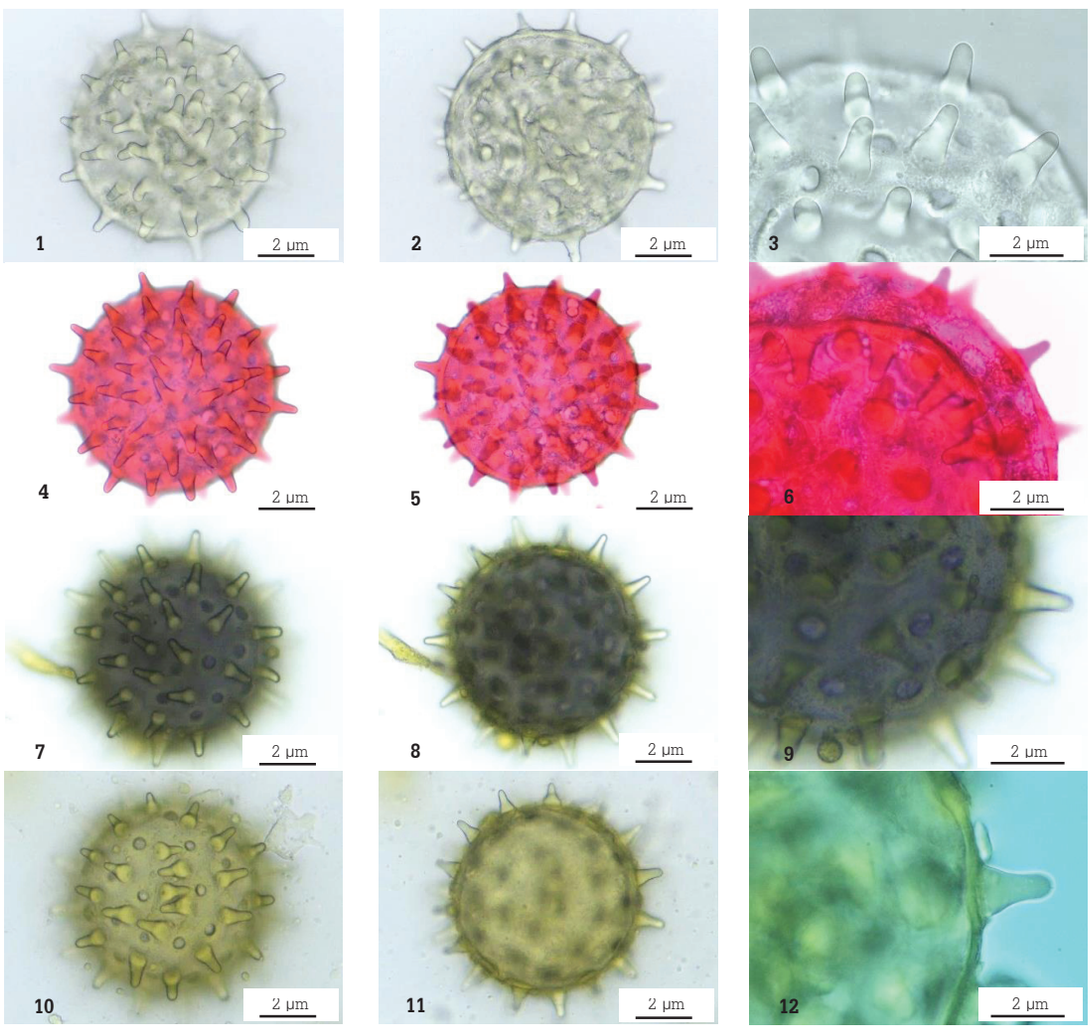
ผลการวิจัย

จากการสกัดรงควัตถุในดอกอัญชัน ดอกหางนกยูงฝรั่ง เปลือกผลมังคุด และเปลือกผลแก้วมังกร ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 พบว่าสีย้อมที่ได้มีสีแตกต่างกัน และเมื่อนำไปย้อมละอองเรณูชบา เพื่อเปรียบเทียบกับละอองเรณูที่ไม่ย้อมสี (Figure 1.1-1.3) และละอองเรณูที่ย้อมด้วยสีซาฟรานิน โอ (Figure 1.4-1.6) ให้ผลดังนี้ 1. สีย้อมจากดอกอัญชันที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีสีม่วง ย้อมละอองเรณูติดสีม่วงอ่อน และละอองเรณูมีลักษณะทึบแสง สามารถสังเกตโครงสร้างต่างๆ ได้ในระดับต่ำ (Figure 1.7-1.9) ส่วนสีย้อมที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 มีสีเขียวเหลือง ย้อมละอองเรณูติดสีเหลืองอำพันและละอองเรณูมีลักษณะขุ่นมัว สามารถสังเกตโครงสร้างต่างๆ ได้ในระดับไม่ดี (Figure 1.10-1.12) 2. สีย้อมจากดอกหางนกยูงฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีสีแดงเข้ม ย้อมละอองเรณูติดสีชมพูและละอองเรณูมีลักษณะโปร่งแสง สามารถสังเกตโครงสร้างต่างๆ ได้ในระดับดี (Figure 1.13-1.15) ส่วนสีย้อมที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 มีสีเหลือง ย้อมละอองเรณูติดสีเหลืองอำพันอ่อน ละอองเรณูมีลักษณะโปร่งแสง สามารถสังเกตโครงสร้างต่างๆ ได้ในระดับพอใช้ (Figure 1.16-1.18) 3. สีย้อมจากเปลือกผลแก้วมังกรที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีสีชมพูม่วง ย้อมละอองเรณูติดสีชมพู และละอองเรณูมีลักษณะโปร่งแสง สามารถสังเกตโครงสร้างต่างๆ ได้ในระดับดี (Figure 1.19-1.21) ส่วนสีย้อมที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95

มีสีน้ำตาลแดง และย้อมละอองเรณูติดสีชมพูจางมาก สามารถสังเกตโครงสร้างต่างๆ ได้ในระดับต่ำถึงพอใช้ (Figure 1.22-1.24) และ 4. สีย้อมจากเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีสีม่วงชมพู ย้อมละอองเรณูติดสีเหลืองอำพัน และละอองเรณูมีลักษณะขุ่นมัว สามารถสังเกตโครงสร้างต่างๆ ได้ในระดับไม่ดี (Figure 1.25-1.27) ส่วนสีย้อมที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 มีสีน้ำตาลแดง ย้อมละอองเรณูติดสีเหลืองอำพันอ่อน และละอองเรณูมีลักษณะโปร่งแสง สามารถสังเกตโครงสร้างต่างๆ ได้ในระดับพอใช้ (Figure 1.28-1.30) (Table 1)

Table 1 Color and efficiency of natural dyes from 4 plants by using 2 solvents for extraction

Plants & part for extraction	Color of natural dyes by using 2 solvents for extraction		Color & appearance of stained pollen and efficiency of natural dyes			
			Pollen stain with natural dyes & dissolve in distilled water		Pollen stain with natural dyes & dissolve in 95% ethyl alcohol	
	Distilled water	95% ethyl alcohol	Color of pollen	Efficiency of natural dyes	Color of pollen	Efficiency of natural dyes
Clitoria ternatea (flower)	light purple	yellowish-green	light purple, opaque color	bad	amber color, turbidity	low
Delonix regia (flower)	deep red	yellow	pink, transparency	high	amber color, transparency	moderate
Hylocereus undatus (pericarp)	purple-pink	reddish brown	pink, transparency	high	very light amber color	low-moderate
Garcinia mangostana (pericarp)	pinkish-purple	reddish brown	amber color, turbidity	bad	light amber color, transparency	moderate



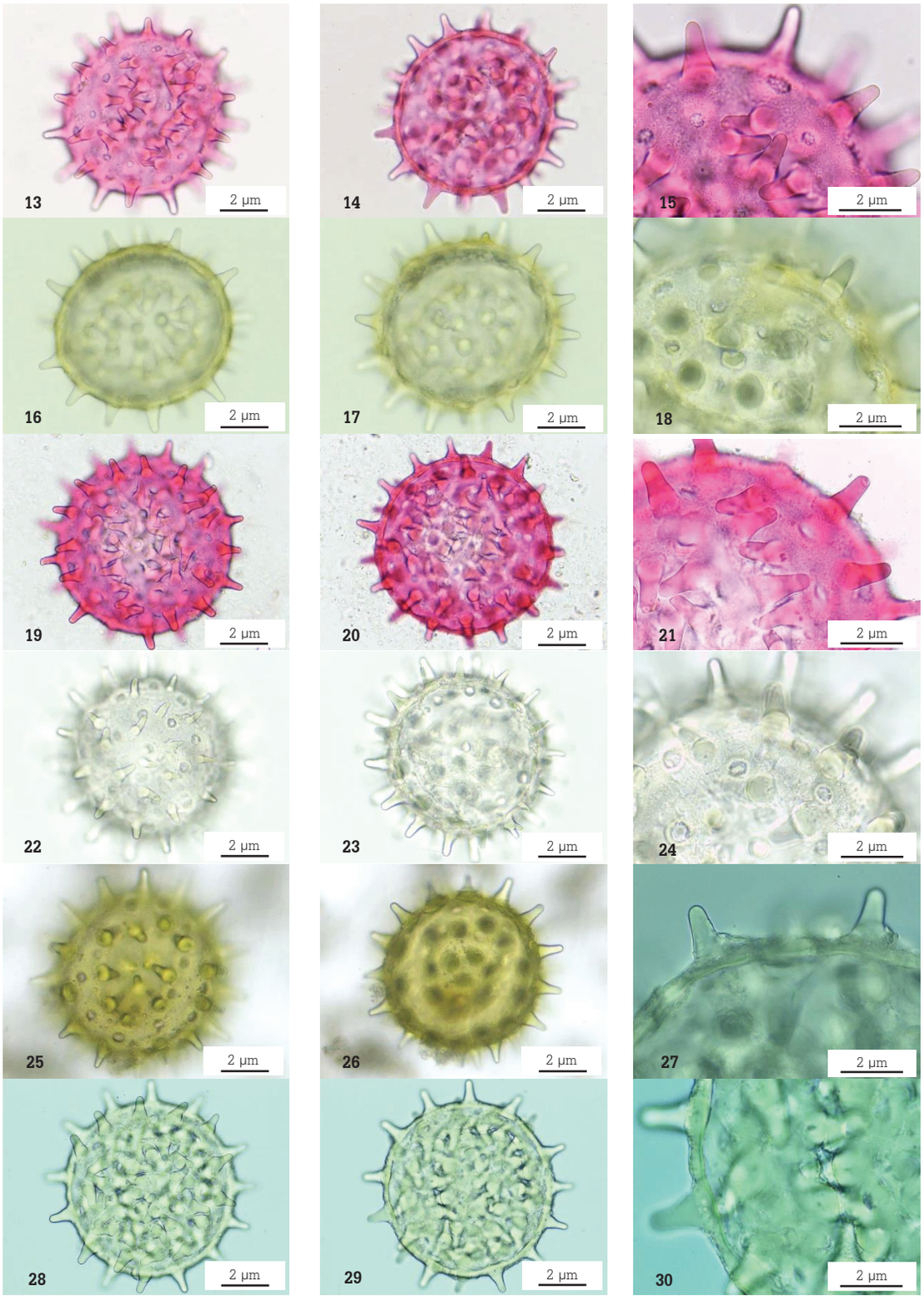


Figure 1 Pollens of *Hibiscus rosa-sinensis*: (1-3) unstained pollens, (4-6) stain with safranin O, (7-9) stain with natural dye from flower of *C. ternatea* and dissolve in distilled water, (10-12) stain with natural dye from flower of *C. ternatea* and dissolve in 95% ethyl alcohol, (13-15) stain with natural dye from flower of *D. regia* and dissolve in distilled water, (16-18) stain with natural dye from flower of *D. regia* and dissolve in 95% ethyl alcohol, (19-21) stain with natural dye from pericarp of *H. undatus* and dissolve in distilled water, (22-24) stain with natural dye from pericarp of *H. undatus* and dissolve in 95% ethyl alcohol, (25-27) stain with natural dye from pericarp of *G. mangostana* and dissolve in distilled water, (28-30) stain with natural dye from pericarp of *G. mangostana* and dissolve in 95% ethyl alcohol (magnification of figures 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 28 & 29 are 100 times, and figure 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 & 30 are 400 times).

สรุปและวิจารณ์ผล

ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า รงควัตถุจากดอกอัญชัน ดอกหางนกยูงฝรั่ง เปลือกผลมังคุด และเปลือกผลแก้วมังกร ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 มีประสิทธิภาพในการย้อมสีละอองเรณูได้แตกต่างกัน ดังนี้ 1. สีย้อมที่สกัดด้วยน้ำกลั่น พบว่า 1.1 สีย้อมจากดอกหางนกยูงฝรั่งและเปลือกผลแก้วมังกรมีประสิทธิภาพในระดับดี ใกล้เคียงกับการย้อมละอองเรณูด้วยสีย้อมซาฟรานิน โอ เนื่องจากละอองเรณูติดสีชมพู และยังคงความโปร่งแสงทำให้สามารถศึกษาโครงสร้างต่างๆ ซึ่งรวมถึงรูปร่างของหนาม ลวดลายบนผนังชั้นเอกซีน ความหนาของชั้นเอกซีน และลักษณะของช่องเปิดได้ชัดเจนกว่าละอองเรณูที่ไม่ได้ย้อมสีอย่างชัดเจน 1.2 สีย้อมจากดอกอัญชันมีประสิทธิภาพในระดับไม่ดี เนื่องจากละอองเรณูติดสีม่วงอ่อนและมีลักษณะทึบแสง จึงทำให้การสังเกตโครงสร้างต่างๆ ของละอองเรณูได้ต่ำกว่าละอองเรณูที่ไม่ย้อมสี 1.3 สีย้อมจากเปลือกผลมังคุดมีประสิทธิภาพในระดับไม่ดี เนื่องจากละอองเรณูติดสีเหลืองอำพัน และมีลักษณะขุ่นมัวและมีตะกอนในสีย้อม จึงทำให้การสังเกตโครงสร้างต่างๆ ของละอองเรณูได้ต่ำกว่าละอองเรณูที่ไม่ย้อมสี 2. สีย้อมที่สกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 มีผลการทดสอบประสิทธิภาพอยู่ในระดับต่ำถึงพอใช้ ดังนี้ 2.1 สีย้อมจากดอกอัญชันมีประสิทธิภาพในระดับต่ำ เนื่องจากละอองเรณูติดเหลืองอำพัน และมีลักษณะขุ่นมัว จึงทำให้การสังเกตโครงสร้างต่างๆ ของละอองเรณูได้ต่ำกว่าละอองเรณูที่ไม่ย้อมสี 2.2 สีย้อมจากดอกหางนกยูงฝรั่งมีประสิทธิภาพในระดับพอใช้ เนื่องจากละอองเรณูติดเหลืองอำพันอ่อน และมีลักษณะโปร่งแสง จึงทำให้การสังเกตโครงสร้างต่างๆ ของละอองเรณูได้ชัดเจนกว่าละอองเรณูที่ไม่ย้อมสีเพียงเล็กน้อย 2.3 สีย้อมจากเปลือกผลแก้วมังกรมีประสิทธิภาพในการย้อมในระดับต่ำถึงพอใช้ เนื่องจากละอองเรณูติดสีน้อยมาก จนแทบไม่แตกต่างจากละอองเรณูที่ไม่ย้อมสี จึงทำให้การสังเกตโครงสร้างต่างๆ ของละอองเรณูไม่ชัดเจน 2.4 สีย้อมจากเปลือกผลมังคุดมีประสิทธิภาพในการย้อมในระดับพอใช้ เนื่องจากละอองเรณูติดสีเหลืองอำพันอ่อน และมีลักษณะโปร่งแสง แตกต่างจากละอองเรณูที่ไม่ย้อมสีเพียงเล็กน้อย จึงทำให้การสังเกตโครงสร้างต่างๆ ของละอองเรณูชัดเจนกว่าละอองเรณูที่ไม่ย้อมสีเพียงเล็กน้อย

หากสังเกตสีย้อมจากพืชทั้ง 4 ชนิด ที่สกัดได้จากตัวทำละลายน้ำกลั่นและเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 พบว่ามีสีต่างกัน ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น ประสิทธิภาพในการสกัดสารของตัวทำละลาย ความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างพืชที่นำมาสกัด อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (Yoshikazu *et al.*, 2008) เป็นต้น และเนื่องด้วยการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาตัวแปรเหล่านี้ จึงไม่สามารถระบุได้ว่าสีย้อมที่สกัดได้จากพืชและตัวทำละลายที่ต่างกัน เกิดจากปัจจัยใด ซึ่งเป็นประเด็นหนึ่งที่มีความน่าสนใจสำหรับการต่อยอดงานวิจัยในอนาคต เพราะข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาประสิทธิภาพของสีย้อมธรรมชาติ เพื่อย้อมละอองเรณูต่อไป

หากเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา ผลการทดลองครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่า สารสีที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เป็นสีย้อมละอองเรณู ประกอบด้วยรงควัตถุ 2 กลุ่ม ได้แก่ สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) และสารเบทาเลน (betalain) โดยสารแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในพืชที่มีสีม่วง แดง ไปจนถึงสีน้ำเงิน ซึ่งพบได้ทั้งในดอกอัญชัน เปลือกผลมังคุด (ยุพาพร ผลขจรศักดิ์, 2547 ; จิดาภา บุญพันธ์ และคณะ, 2562) และดอกหางนกยูงฝรั่ง (Felix *et al.*, 2008) ซึ่งละลายได้ดีในเมทิลแอลกอฮอล์ เอทิลแอลกอฮอล์ และน้ำตามลำดับ (ยุพาพร ผลขจรศักดิ์, 2547 ; จิดาภา บุญพันธ์ และคณะ, 2562) และปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารแอนโทไซยานิน คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ แสง และเวลาการเก็บ (ยุพาพร ผลขจรศักดิ์, 2547 ; Yoshikazu *et al.*, 2008) ส่วนสารเบทาเลนเป็นรงควัตถุที่มีสีสดใส พบในพืชที่มีสีแดงและสีเหลือง และเป็นสารที่มีความคงตัวมากกว่าสารแอนโทไซยานิน โดยสีของสารเบทาเลนจะไม่เปลี่ยนแปลงตามความเป็นกรด-ด่าง (Yoshikazu *et al.*, 2008) ซึ่งสารเบทาเลนสามารถพบได้ในพืชกลุ่มบานไม่รู้โรย (amaranth) และกระบองเพชร (cactus) เช่น พบในเปลือกผลแก้วมังกร (วิภาดา สนองราษฎร์ และคณะ, 2552 ; สุกัญญา แย้มสรวล, 2558) ผลการศึกษาครั้งนี้ยังเป็นการรายงานเพื่อเพิ่มเติมข้อมูลจากการศึกษาที่ว่า สีย้อมที่ได้จากเปลือกผลแก้วมังกรที่สกัดด้วยน้ำกลั่น สามารถใช้ย้อมสีเนื้อเยื่อพืชทั้งใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (สุกัญญา แย้มสรวล, 2558) ได้แล้ว ยังสามารถใช้ย้อมสีละอองเรณูได้ด้วยเช่นกัน

จากข้อมูลข้างต้น หากเปรียบเทียบเฉพาะสีย้อมที่สกัดจากดอกหางนกยูงฝรั่งและเปลือกผลแก้วมังกร ด้วยตัวทำละลายคือน้ำกลั่นและเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เพื่อทำสีย้อมละอองเรณูชบาพบว่า น้ำกลั่นมีคุณสมบัติที่เหมาะสมกว่าเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 อย่างชัดเจน เนื่องจากละอองเรณูติดสีได้ดีกว่า (Table 1) ซึ่งน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว ต่างจากเอทิลแอลกอฮอล์ที่เป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (Pandey & Tripathi, 2014) ยิ่งไปกว่านั้นการทดลองครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่า สีย้อมธรรมชาติที่เหมาะสมในการนำมาสกัดด้วยน้ำกลั่น เพื่อย้อมสีละอองเรณูชบาคือรงควัตถุจากเปลือกผลแก้วมังกร ซึ่งอยู่ในกลุ่มสารเบทาเลน โดยมีความคงตัวกว่ารงควัตถุจากดอกหางนกยูงฝรั่ง ซึ่งมีสารแอนโทไซยานิน

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าสีย้อมจากดอกหางนกยูงฝรั่งและเปลือกผลแก้วมังกรที่สกัดด้วยน้ำกลั่น จะมีประสิทธิภาพในการย้อมละอองเรณูอยู่ในระดับดีเหมือนกัน แต่การสกัดสารสีจากดอกหางนกยูงฝรั่งนั้นทำได้ง่ายกว่าเปลือกผลแก้วมังกร เนื่องจากกลีบดอกของดอกหางนกยูงฝรั่งเมื่อนำมาบด จะไม่ยุ่ยจนยากต่อการกรองเหมือนกับเปลือกผลแก้วมังกร ซึ่งตะกอนจากเปลือกผลแก้วมังกรจะทำให้ประสิทธิภาพในการสังเกตโครงสร้างต่าง ๆ ของละอองเรณูลดลง ดังนั้นพืชที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดเป็นสีย้อมธรรมชาติ สำหรับใช้ย้อมละอองเรณูของชบาในการวิจัยครั้งนี้คือ ดอกหางนกยูงฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่น

จากข้อมูลที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่า พืชหลายชนิดที่มีสารแอนโทไซยานิน และสารเบทาเลน สามารถนำมาใช้ทำเป็นสีย้อมละอองเรณูได้ ถึงแม้จะมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปบ้าง ซึ่งอาจเกิดจากชนิดพืชที่นำมาสกัดสีย้อม กระบวนการเตรียม และตัวทำละลายที่ใช้ก็ตาม และที่ผ่านมายังไม่มีรายงานการศึกษา ทั้งในเรื่องของชนิดพืชและชนิดของรงควัตถุที่นำมาสกัดเป็นสีย้อมละอองเรณู รวมถึงตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสีย้อมละอองเรณู งานวิจัยนี้จึงเปรียบเสมือนเป็นจุดเริ่มต้น เพื่อพัฒนาการสกัดสารสีจากพืชในการย้อมสีละอองเรณูสำหรับผู้สนใจในอนาคต ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้ เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาชนิดของพืช และชนิดของตัวทำละลายรงควัตถุจากพืชที่เหมาะสม ในการนำมาทำสีย้อมละอองเรณู และเนื่องด้วยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการใช้สีย้อมธรรมชาติในการย้อมสีละอองเรณู ดังนั้นจึงขาดข้อมูลที่จะใช้อ้างอิงในการวางแผนการทดลอง และงานวิจัยที่ใกล้เคียงที่สุดคือ การศึกษาการย้อมสีโครงสร้างอื่น ๆ ของพืช ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีต่างจากละอองเรณู ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ตัวทำละลายเพียงสองชนิด คือ น้ำกลั่น และเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับความเป็นไปได้ของงานวิจัยการย้อมสีละอองเรณูด้วยสีย้อมจากธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยมีข้อคิดเห็นว่า ควรมีการศึกษาตัวทำละลายที่หลากหลายมากขึ้น ทั้งในเชิงชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลาย นอกจากนี้ควรมีการศึกษาผลของอุณหภูมิในขั้นตอนการสกัดสีย้อม ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสีย้อม เพื่อทำให้ได้สีย้อมที่มีความเหมาะสมกับการย้อมละอองเรณูของพืช และช่วยอธิบายการติดสีของละอองเรณูได้ และควรมีการใช้ตัวอย่างสปอร์และละอองเรณูจากพืชหลากหลายกลุ่ม เช่น พืชไม่มีท่อลำเลียง พืชไม่มีเมล็ด พืชเมล็ดเปลือย เป็นต้น นอกจากนี้ยังควรใช้ละอองเรณูที่มีลวดลายบนผนังที่แตกต่างกัน เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสีย้อมที่ได้จากพืชและตัวทำละลายแต่ละชนิดได้ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ภายใต้โครงการทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาองค์กรและพัฒนาบุคลากร ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และศูนย์วิจัยและการศึกษาบรรพชีวินวิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เป็นอย่างยิ่งที่สนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการสำหรับงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

จิดาภา บุญพันธ์, อิสรีย์ ปั้นก้อง และธีรารัตน์ แช่มชัยพร. (2562). การสกัดสีธรรมชาติจากพืชกลุ่มแอนโทไซยานินเพื่อใช้ในการย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม. *งานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 11 ประจำปี พ.ศ. 2562* (หน้า 28-33). มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

จินตรา เล็กประยูร, นวลจันทร์ มัจฉริยกุล และศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม. (2553). สารสกัดแอนโทไซยานินจากพืชเพื่อใช้เป็นสีย้อมโครโมโซม: แหล่งที่มา ความเข้มข้น และโครงสร้างทางเคมี. *การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7 ประจำปี พ.ศ.2553* (หน้า 1615-1623). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฉันทนา รุ่งพิทักษ์ไชย, ลักขณา รักขพันธ์ และอลภา ทองไชย. (2555). สีย้อมเซลล์ที่สกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.). *รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ประจำปีงบประมาณ 2555*. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

เทียมใจ คมกฤส. (2555). *กายวิภาคของพฤกษ์* (พิมพ์ครั้งที่ 4). สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มานิต คิดอยู่. (2552). สีย้อมธรรมชาติจากฝางสำหรับการศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, *1* (2), 61-69.

ยุพาพร ผลาขจรศักดิ์. (2547). *การสกัดและความคงตัวของแอนโธไซยานินส์ที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

รุจิรา ทองศรีสุข, ยอดชาย ช่วยเงิน, อลงกลด แทนออมทอง และสายัญ พันธ์สมบูรณ์. (2560). การประยุกต์ใช้สีธรรมชาติจากข้าวโพดหวานสีม่วง (*Zea mays saccharata*) ในการศึกษาการแบ่งเซลล์ไมโทซิสของพืช. *วารสารวิทยาศาสตร์ คชสาส์น*, *39*(2), 34-44.

ลาวัลย์ รักสัตย์. (2539). *ละอองเรณู*. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

วันเพ็ญ แก้วพุก. (2558). การศึกษาสารสกัดสีธรรมชาติจากพืชเพื่อการย้อมสีโครโมโซม สำหรับห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม. *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ครั้งที่ 7 ประจำปี พ.ศ.2558 (หน้า 1434-1442).* มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

วิภาดา สนองราษฎร์, วิภาวี ขำวิจิตร, วารินทร์ ยางเดิม, ปริยาภัทร เชาว์ชาญ และพัชราภรณ์ สารเสนา. (2552). การสกัดสีจากเปลือกแก้วมังกร. *วารสารวิชาการวิศวกรรมศาสตร์ ม.อบ.*, *2*(1), 9-16.

สุกัญญา แย้มสรวล. (2558). การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสีย้อมธรรมชาติจากพืชเพื่อการย้อมสีเนื้อเยื่อพืชสำหรับห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม. *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ครั้งที่ 7 ประจำปี พ.ศ.2558* (หน้า 1425-1433). มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

Azimvand, J., Didehban, Kh. & Mirshokraie, S.A. (2018). Safranin-O removal from aqueous solutions using lignin nanoparticle-g-polyacrylic acid adsorbent: Synthesis, properties, and application. *Adsorption Science & Technology*, *36*(7-8), 1422-1440.

Cooper-Driver, G.A. (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Journal of Phytochemistry*, *56*(3), 229-236.

Felix, A., Yves, F.L., Emmanuelle, M., Paul, L., Augustin, A., Georges, A. N'zi & Emile, M.G. (2008). Anthocyanin Characterization of Pilot Plant Water Extracts of *Delonix regia* Flowers. *Molecules*, *13*, 1238-1245.

Hayat, M.Q. (2009). Pollen morphology of 14 species of *Abutilon* and *Hibiscus* of the family Malvaceae (sensu stricto). *Journal of Medicinal Plants Research*, *3*(11), 921-929.

Khan, I.M., Rahman, R., Mushtaq, A. & Rezui, M. (2017). *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae) : Distribution, Chemistry and Uses. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, *12*, 147-151.

Johansen, D.A. (1940). *Plant microtechnique.* McGraw-Hill Book Company Inc.

Moore, P.D., Webb, J.A. & Collinson, M.E. (1991). *Pollen analysis. (*2nd ed.). Blackwell Scientific Publications.

Pandey, A. & Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *2*(5), 115-119.

Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. & Nigam, P. (2001). Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative. *Bioresource Technology*, *77*, 247-255.

Yoshikazu, T., Nobuhiro, S. & Akemi, O. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, *54*, 733-749.