581 807 ส
ส 265 ก
ฉ. 2

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหนวดแมวเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ

ปริญญานิพนธ์

ของ

อุษา สุนันทารอด

11 พ.ค. 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2530

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178789

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหมอนแมวเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ

บทคัดย่อ

ของ

อุษา สุนันทาโรจน์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2530

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนของหญ้าหนวดแมว Orthosiphon grandiflorus Boldingh บนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog 1962) และ MS ดัดแปลง โดยการเติม BA (6-benzyladenine) และ NAA (α-naphthalene acetic acid) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนสร้างแคลลัสได้ดีมีน้ำหนักลดเฉลี่ยมากที่สุด (6 60 กรัมต่อขวด) บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 12 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนสร้างแคลลัสได้ดีมีน้ำหนักลดเฉลี่ยมากที่สุด (8 45 กรัมต่อขวด) บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 10 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแคลลัสของใบอ่อนและลำต้นอ่อนจากสูตรดังกล่าวไปเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 1 เดือน แล้วนำแคลลัสที่ได้ไปย้อมสีด้วยอัลคาลอยด์ เปรียบเทียบกับใบและลำต้นธรรมชาติ จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ t-test พบว่าแคลลัสจากใบอ่อนและลำต้นอ่อนมีอัลคาลอยด์มากกว่าใบและต้นธรรมชาติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

A COMPARISON OF ALKALOID QUANTITY IN *Orthosiphon grandiflorus* Bolcingh TISSUE CULTURE AND IN THE INTACT PLANT

AN ABSTRACT

BY

USA SUNANTAROD

Presented in partial fulfillment of the requirment

for the Master of Education degree

at Srinakharinwirot University

February 1987

The purpose of the investigation was to compare quantities of alkaloids obtained from cultured calluses and intact plants of Orthosiphon grandiflorus Boldingh. Plant tissue culture techniques were applied for callus formation. Sections of leaves and internodes were aseptically cultured on the MS (Murashige and Skoog. 1962) medium and the modified MS media supplement with BA, NAA and 15% of coconut milk. The leaves and internodes did not develope callus on the MS medium. The blade tissue most effective in callus formation (average wet weight 6.60 g/bottle)was located on modified MS medium containing BA at 0.5 mg/l, NAA at 12.0 mg/l, and 15% of coconut milk while best results of the internode tissue (average wet weight 8.45 g/bottle) were obtained on the modified MS medium containing BA at 0.5 mg/l, NAA at 10.0 mg/l and 15% of coconut milk.

Extraction of alkaloids from leaf calluses, internode calluses and intact plants was performed. Callus weights from each source were compared by employing two-sample t-test statistics for data analysis. The results revealed that alkaloid quantity obtained from leaf calluses weighed more than that of the intact leaf and it was also the case for the internode calluses and the intact stem at 99% confidence level.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

. ประธาน

. กรรมการ

คณะกรรมการสอบ

ประธาน

กรรมการ

กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือและการให้คำแนะนำอย่างดียิ่งจาก อาจารย์อรพินท์ แก้วลาย ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์สุนันท์ ยุนชาติประเสริฐ กรรมการที่ปรึกษา และอาจารย์เรณู ศรีสำราญ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอน้อมระลึกถึงพระคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณ คุณสำเริง ทีเจริญ และ คุณผกามาศ เขมะจารี ที่ได้ช่วยเหลือในระหว่างทำการทดลองและขอบคุณผู้ ๆ ทุกคนที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

อุษา สุนันทารอด

สารบาญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	2
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
	คำนิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	5
	การวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสกัดอัลคาลอยด์	7
3	วิธีการดำเนินการศึกษาค้นคว้า	11
	วิธีทดลอง	11
	ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส	11
	ตอนที่ 2 การสกัดอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นธรรมชาติ	15
	การเตรียมสารที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์	16
	การทดสอบอัลคาลอยด์	17
	วิธีการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล	17
4	ผลการศึกษาค้นคว้า	18
	ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส	18
	การทดลองที่ 1 ศึกษาการชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัส	18
	การทดลองที่ 2 การเพิ่มแคลลัสให้มีปริมาณมากขึ้น	45
	ตอนที่ 2 การสกัดอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นธรรมชาติ	47

สารบาญ

บทที่		หน้า
5	สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ	52
	จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	52
	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	52
	สรุปและอภิปรายผล	53
	การยักนำให้ยีนส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัส	53
	การเพิ่มแคลลัสให้มีปริมาณมากขึ้น	55
	การสกัดอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นธรรมชาติ	55
	ข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม		57
ภาคผนวก		61

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงปริมาณของ NAA และ BA ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยทุกสูตรเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ .	12
2	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน	20
3	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน . .	35
4	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS และ MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน .	42
5	น้ำหนักสดของแคลลัสจากใบอ่อนและลำต้นอ่อนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมเป็นเวลา 1 เดือน	46
6	ผลการทดสอบอัลคาลอยด์ด้วย ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ และเมเยอร์ รีเอเจนต์	47
7	ปริมาณ (น้ำหนัก) ของอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสของใบอ่อนและใบธรรมชาติ . . .	48
8	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์จากแคลลัสของใบอ่อนและใบธรรมชาติ โดยใช้สถิติ t-test ..	49
9	ปริมาณ (น้ำหนัก) ของอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสของลำต้นอ่อนและลำต้นธรรมชาติ	50
10	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์จากแคลลัสของลำต้นอ่อนและลำต้นธรรมชาติ โดยใช้สถิติ t-test	51

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน และลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน 31

2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน . 32

3 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน . 33

4 ลักษณะของแคลลัสจากใบอ่อนที่มีน้ำหนักสดมากที่สุดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS_7 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 12 0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน . . . 34

5 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน . 37

6 ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน และลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน . . 38

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
7	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน . .	39
8	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน . . .	40
9	ลักษณะของแคลลัสจากลำต้นอ่อนที่มีน้ำหนักสดมากที่สุดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS_6 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 10 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน	41
10	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน	44

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

มนุษย์รู้จักใช้สมุนไพรในการบำบัดรักษาโรคมาตั้งแต่สมัยโบราณ โดยมีการทดลองใช้พืชชนิดต่าง ๆ เพื่อเยียวยาและบรรเทาความเจ็บไข้ เมื่อพืชชนิดใดใช้แล้วให้ผลดีหรือทำให้เกิดโทษก็ได้จดจำเอาไว้และความรู้ก็ได้ตกทอดมายังลูกหลานจนกระทั่งกลายเป็นความเคยชิน ถึงแม้ว่าในปัจจุบันนี้วิทยาศาสตร์การแพทย์และเทคโนโลยีได้เจริญก้าวหน้า มีการผลิตยาสำเร็จรูปขึ้นมาใช้รักษาโรคต่าง ๆ ได้รวดเร็วเป็นผลดีมากมาย ทั้งยังได้มีการค้นคว้าหาตัวยาชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมาใช้บำบัดโรคและความเจ็บป่วยให้มีประสิทธิภาพยิ่ง ๆ ขึ้นอยู่เรื่อย ๆ ก็ตาม แต่ยาประเภทสมุนไพรก็ไม่ได้ลดความสำคัญลงไป เพราะเป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบันแล้วว่ายาที่ได้จากสารสกัดจากพืชสมุนไพรนั้นให้คุณค่ากว่ายาที่ได้จากสารสังเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ (สมุทร์ มีวงค์อุโฆษ 2527 1204) และประชาชนจากทุกส่วนของโลกได้ใช้สมุนไพรในการบำบัดโรค จากการศึกษาพบว่าพืชสมุนไพรมีสารประกอบเคมีพวกอัลคาลอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต่อร่างกายคน สัตว์ และพืช การใช้ในปริมาณที่พอเหมาะจะมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ ได้ดี (พยอม ตันตวัฒน์ 2521. 202)

ปัจจุบันนี้มีการศึกษาค้นคว้าหาสารสำคัญจากพืชสมุนไพรอย่างกว้างขวางประกอบกับได้มีวิวัฒนาการเกี่ยวกับวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์และวิธีตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารทำให้การแยกสารต่าง ๆ ทำได้ถูกต้องและรวดเร็ว หลังจากแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเป็นจำนวนมากแล้วนำไปทดลองผลของการออกฤทธิ์ในสัตว์ทดลองและในคน เมื่อได้ผลเป็นที่น่าพอใจก็นำมาผลิตเป็นยาสำเร็จรูป เนื่องจากสามารถปรับขนาดได้ง่ายและแน่นอนกว่าการใช้ส่วนต่าง ๆ ของสมุนไพรทั้งหมดทั้งยังสามารถกำจัดอาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากสารอื่นที่มีอยู่ในสมุนไพรได้อีกด้วย

หญ้าหนวดแมวมีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะ รักษาโรคนิ่วในไต ช่วยทำให้ไม่มีการสะสมกรดยูริคและเกลือยูเรตที่ไต นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำสกัดจากใบหญ้าหนวดแมวทำให้ปริมาณน้ำตาลในเลือดลดลง และทำให้ความดันโลหิตต่ำลง (เกรียงศักดิ์ เตชะนันต์ 2528. 33, พยอม ตันติวัฒน์ 2521. 89, พาณี เตชะเส่น 2523: 77-78) จากการทดลองสกัดสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นยาจากหญ้าหนวดแมวพบว่ามีอัลคาลอยด์เป็นส่วนใหญ่โดยพบที่ใบและลำต้น (สุภาพ บุณยะรัตเวช และคนอื่น ๆ 2523. 168) ดังนั้นจึงควรได้มีการสกัดอัลคาลอยด์จากหญ้าหนวดแมวเพื่อเป็นแนวทางนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคต่อไป แต่ในการปลูกหญ้าหนวดแมวในปริมาณมาก เพื่อนำมาสกัดอัลคาลอยด์นั้นต้องใช้พื้นที่จำนวนมาก ทั้งยังต้องคอยดูแลรักษาให้ปลอดภัยจากโรคและแมลง จึงควรนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสได้รวดเร็วโดยใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ง่ายและละดวกกว่าในธรรมชาติอีกทั้งยังใช้แรงงานน้อยและปลอดภัยจากโรคและแมลง

<u>ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า</u>

1 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและคัดเลือกอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง

2 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสและต้นธรรมชาติ

<u>ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า</u>

1 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสาร เร่งการเจริญเติบโตที่สามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนของหญ้าหนวดแมวที่เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

2. เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อสกัดสารในเชิงอุตสาหกรรม

3 เป็นประโยชน์ทางด้านเภสัช โดยการสกัดตัวยาจากแคลลัสของพืชสมุนไพร ซึ่งอาจสร้างสารตัวยาได้มากกว่าในธรรมชาติ

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. อาหารสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหนวดแมว

1 1 อาหารสูตร MS

1 2 อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต ได้แก่ BA (6-benzyladenine)และ NAA (α-naphthalene acetic acid)ลงในสูตร MS ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

2 เนื้อเยื่อหญ้าหนวดแมวที่นำมาทดลองใช้ ได้แก่ ใบอ่อนคู่ที่ 2 ลำต้นอ่อนปล้องที่ 1 และ 2 ส่วนใบและลำต้นธรรมชาตินำมาสกัดอัลคาลอยด์เมื่ออายุ 2 เดือน

3 สกัดหาอัลคาลอยด์ในแคลลัสของใบอ่อนและลำต้นอ่อนเปรียบเทียบกับใบและลำต้นธรรมชาติ

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

1 อาหารสูตร MS หมายถึง อาหารสูตรมาตรฐานของมูราชิกิและสกูก (Murashige and Skoog. 1962: 473-497)

2 แคลลัส หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cell) ที่ยังไม่เปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นหรือราก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หญ้าหนวดแมวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Orthosiphon grandiflorus Boldingh มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย พม่า จีน และแถบแหลมอินโดจีน รวมทั้งอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ จัดอยู่ในตระกูล Labiatae มีชื่อสามัญว่า Java Tea หรือ Kidney Tea Plant เพราะสามารถใช้รักษาโรคไตได้ดี (พยอม ตันติวัฒน์ 2521. 87) หญ้าหนวดแมวพบบริเวณภาคเหนือและภาคกลางของไทย มีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น พยัพเมฆ หญ้าหนวดแมว หญ้าหนวดเสือ มีลักษณะทั่วไปดังนี้คือ เป็นไม้ล้มลุก ขนาดเล็กจัดพวกหญ้า มีอายุหลายปี ต้นสูงประมาณ 50-100 เซนติเมตร รูปของลำต้นและกิ่งก้านเป็นสี่เหลี่ยมคล้ายต้นกะเพราหรือแมงลัก มีสีเขียวทอดยาว ลักษณะของใบ โคนใบสอบแหลม กลางกว้าง ปลายใบสอบเรียวแหลม ริมใบเป็นจักโดยรอบ ก้านกิ่งและใบ ไม่มีขน ใบมีขนาดยาว 40-60 มิลลิเมตร ก้านใบยาว 10-15 มิลลิเมตร มีใบข้อละ 1 คู่ห่าง ๆ กัน ดอกมีสียาวหรือยาวอมม่วง เป็นรูปกระบอก ปลายแยกเป็น 2 กลีบ กลีบบนกว้างแยกเป็น 3 แฉก กลีบล่างเป็นรูปช้อนยาวรี ดอกออกที่ยอดต้นคล้ายฉัตร เป็นชั้น ๆ ยาว 20-25 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้มี 4 อัน ยื่นออกมาเป็นฝอยพันกับดอกคล้ายกับหนวดแมวหรือหนวดเสือ เกสรตัวเมียมี 1 อัน ยาวกว่าเกสรตัวผู้ ดอกออกเป็นชั้น ๆ ตามข้อก้านดอกชั้นละ 6 ดอก ก้านช่อดอกยาวเรียวอยู่ปลายกิ่งคล้ายช่อดอกกะเพรายาวราว 20 เซนติเมตร ทั้งใบและต้นมีกลิ่นฉุน (เกรียงศักดิ์ เดชอนันต์ 2528 33, สายสมร กิตติขจร 2526 165)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) เป็นการนำเอาอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งที่มีชีวิตของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามินและสารเร่งการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อรา แบคทีเรียและสาหร่าย ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้แก่ แสงสว่าง ความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืช

ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้จะเจริญไปเป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์โดยตรงหรือเป็นเอมบริออยด์ (embryoid) หรือแคลลัสแล้วกลายเป็นต้นในที่สุด (อรดี สหวัชรินทร์ 2522 : 34-43)

<u>ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ประสบผลสำเร็จมีปัจจัยหลายประการดังนี้

1 อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยสารประกอบต่าง ๆ คือ

1 1 สารอนินทรีย์ ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปตัสเซียม แคลเซียม มักนีเซียม เหล็ก กำมะถัน มังกานีส โคบอลท์ สังกะสี ทองแดง โมลิบดินัม โบรอน คาร์บอน ไฮโดรเจน

1 2 สารอินทรีย์ ได้แก่

1 2 1 น้ำตาล เป็นสารที่ให้พลังงาน น้ำตาลที่ใช้ส่วนใหญ่ได้แก่ น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ปกติใช้น้ำตาลในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 20-40 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

1 2 2 วิตามิน โดยมากมักใช้วิตามินบี วิตามินที่ใช้มากได้แก่ ไทอามีน (thiamine) ไนอาซีน (niacine) ไพริดอกซีน (pyridoxine)

1 2 3 สารเร่งการเจริญเติบโต กลุ่มสารเร่งการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ ออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) สำหรับสารกลุ่มออกซินนั้น ตัวที่นิยมใช้ได้แก่ IAA (indole acetic acid) NAA, 2,4-D (2, 4-dichlorophenoxy acetic acid) ส่วนกลุ่มไซโตไคนินที่นิยมใช้ได้แก่ BA, Kinetin (6-furfurylamino purine) (ไพบูลย์ กวินเสถียรวัฒนา 2524 37-39)

1.2.4 กรดอะมิโน ตัวที่นิยมใช้มากคือ ไกลซีน (Murashige. 1974 170)

1.2.5 สารอินทรียัอื่น ๆ สารเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะเขือเทศ มันฝรั่ง กล้วย ส่วนสกัดจากยีสต์ (yeast) (White. 1951. 241) โอเวอร์บีคและคณะ (Overbeek and others. 1941. 351) ได้รายงานว่าการเติมน้ำมะพร้าวลงไปในอาหารจะทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ผลมากขึ้น เพราะมีสารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต ต่อมาสเตาเดนและดรีเวส (Staden and Drewes. 1974 347-352, 1975 106-109, 1976 123-126) พบว่าสารเหล่านั้นอยู่ในกลุ่มของไซโตไคนินได้แก่ ซีติน (zeatin) ซีตินไรโบไซด์ (zeatinriboside) และซีตินกลูโคไซด์ (zeatin glucoside) ซึ่งช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์

สภาพอาหาร เนื้อเยื่อบางชนิดเจริญได้ดีในอาหารเหลว ส่วนการเพิ่มปริมาณพืชบางชนิดจะให้ผลดีเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง (Murashige. 1974 154)

2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยง

2.1 ระดับความเป็นกรด-เป็นด่าง โดยทั่ว ๆ ไปมักอยู่ในช่วง 5.0-6.5 (Puhan and Martin. 1963 13)

2.2 อุณหภูมิ โดยทั่วๆ ไปแล้วเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงจะเก็บไว้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส การเพาะเลี้ยงพืชสัมลูกและพืชเมืองร้อนมักใช้อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส (Murashige. 1974 170)

2.3 แสง ระยะเวลาในการให้แสงขึ้นกับชนิดของพืช โดยทั่วไปมักให้แสงแก่พืชประมาณ 16 ชั่วโมง แต่พืชบางชนิดต้องการแสงน้อยกว่า (Murashige 1974 135-166)

3 ปัจจัยภายในพืช ได้แก่

3 1 ลักษณะทางพันธุกรรม พืชบางชนิดเจริญได้ง่าย บางชนิดเจริญยากหรือมีขบวนการเจริญต่างกัน

3 2 ระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตในพืช (ไพบูลย์ กวินเสถียรวัฒนา 2524 71)

4 ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่

4 1 การทำความสะอาดชิ้นส่วน ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงต้องปราศจากจุลินทรีย์

4 2 การเลือกเนื้อเยื่อของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงควรใช้เนื้อเยื่อที่อ่อนและคงมีการแบ่งเซลล์อยู่ตลอดเวลา เช่น ที่ปลายยอด ปลายราก ใบอ่อน ตาอ่อน เพราะเนื้อเยื่อเหล่านี้จะมีการตอบสนองกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี และมีโอกาสที่จะพัฒนารูปร่างได้มากกว่าส่วนที่แก่หรือส่วนที่อยู่ในระหว่างพักตัว (เยาวนุช หงษรานนท์และเสงี่ยม พริยพฤนต์ 2528 108)

<u>การวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสกัดอัลคาลอยด์</u>

เกลเฟลและรอธฟัส (Delfel and Rothfus 1977. 1595-1598) ได้ทำการเพาะเลี้ยงใบและลำต้นของ <u>Cephalotaxus harringtonia</u> บนอาหาร MS ที่เติมไฮโปแซนธีน (hypoxanthine) 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไรโบฟลาวิน (riboflavin) 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วิตามิน บี12 0 5 ไมโครกรัมต่อลิตร ไบโอทิน (biotin) 10 ไมโครกรัมต่อลิตร กรดโฟลิก (folic acid) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแพนโทธีนิก (pantothenic acid) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมทั้ง NAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และเคเซติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มีแสงและอุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า

2 ปี และมีการตัดแบ่งทุก 3 เดือน พบว่าแคลลัสที่ได้จากใบเจริญเติบโตได้เร็วกว่าแคลลัสที่ได้จากต้น จากการสกัดสารจากแคลลัสพบว่ามีอัลคาลอยด์ 3 ชนิดคือ อาร์ริงโทนีน (harringtonine) ไอโซอาร์ริงโทนีน (isoharringtonine) และโฮโมอาร์ริงโทนีน (homoharringtonine)

ชินสุกีและยาตาซาวา (Shinsuke and Yatazawa. 1974. 2297-2304) เพาะเลี้ยงลำต้นและรากของระย่อม (Rauwolfia serpentina) บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 0.5-1 ppm ไคเนติน 0.2-0 5 ppm. และสารสกัดจากยีสต์ 0 1-0 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากรากจะมีอัลคาลอยด์ แอจมาลีน (ajmaline) 10-20 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากต้นมีอัลคาลอยด์ แอจมาลีน 1-10 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D และไม่เติมไคเนตินจะทำให้แอจมาลีนลดลง

เจนและซาฮู (Jain and Sahoo. 1981 1765-1766) เพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดของ Solanum verbascifolium Linn. บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 ppm. และวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 เดือน โดยมีการตัดแบ่งทุก 6-9 สัปดาห์ ในที่อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียสในห้องที่มีแสงสว่าง แล้วนำแคลลัสหลังการตัดแบ่งที่มีอายุ 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ไปสกัดหาอัลคาลอยด์ พบว่าแคลลัสที่มีอายุ 6 สัปดาห์ มีอัลคาลอยด์ ไดออสจีนิน (diosgenin) มากที่สุด และแคลลัสที่มีอายุ 8 สัปดาห์ มีอัลคาลอยด์ โซลาโซดีน (solasodine) มากที่สุด แต่เมื่อเปรียบเทียบกับไดออสจีนินแล้ว โซลาโซดีนมีปริมาณน้อยกว่า

อิคูตะและอิโตคาวา (Ikuta and Itokawa. 1982. 1419-1421) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นของ Thalictrum minus บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 1.0 และ 5 0 ppm. กับไคเนติน 0 1 ppm. พบว่าความเข้มข้นของ 2,4-D มีความสัมพันธ์กับการผลิตอัลคาลอยด์ในแคลลัส โดย 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 ppm.พบอัลคาลอยด์ 8 ชนิด

และ 2,4-D ความเข้มข้น 5.0 ppm. พบอัลคาลอยด์ 4 ชนิด และพบว่าอัลคาลอยด์เบอร์เบอรน (berberine) ในแคลลัสมี 0 67 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่ในใบและต้นธรรมชาติมีเพียง 0 0019 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ไกรเกอร์และคนอื่น ๆ (Krieger and others. 1983· 1671-1673) เพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นของ Cinchona pubescens เป็นเวลา 1 ปี โดยมีการตัดแบ่งทุก 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 5 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 8.1 ไมโครโมลาร์ โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส แล้วเลี้ยงไว้ในที่มืดเปรียบเทียบกับการให้แสง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในที่มืดมีน้ำหนักสดน้อยกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในที่ให้แสง 12 ชั่วโมง และแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IBA 1 0 ไมโครโมลาร์ ซีติน (zeatin) 1 0 ไมโครโมลาร์มีอัลคาลอยด์สูง

ฟูรูยาและคนอื่น ๆ (Furuya and others. 1983: 1671-1673) นำเซลล์จากลำต้นของ Dioscoreophyllum cumminsii มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรMS ซึ่งเติม IAA 1 ppm. ไคเนติน 0.1 ppm. เป็นเวลา 5 เดือน แล้วนำมาตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 ppm. ไคเนติน 0 1 ppm. และน้ำมะพร้าว 7 เปอร์เซ็นในที่มืด อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร RT (revised tobacco medium) พบว่าแคลลัสที่ได้จากการทดลองทั้งหมดจะพบอัลคาลอยด์ 3 ชนิด คือ จาโทรร์ไรซีน (jatrorrhizine) แมกโนโฟลรีน (magnoflorine) และพัลมาตีน (palmatine) แต่ไม่พบโคลัมบามีน (columbamine) ซึ่งพบในต้นพืช แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีอัลคาลอยด์มากกว่าในต้นพืชธรรมชาติ กล่าวคือในแคลลัสพบอัลคาลอยด์ 0 3-0 9 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนในต้นพืชธรรมชาติพบเพียง 0 02-0 03 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และพบว่าอัลคาลอยด์จาโทรร์ไรซีนที่พบในแคลลัสมากกว่าในต้นพืชธรรมชาติ 40-100 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างฮอร์โมน 2,4-D IAA และ NAA พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D มีการเจริญเติบโตดีกว่า แต่แคลลัสที่เลี้ยงบน

อาหารที่เติม IAA และ NAA มีอัลคาลอยด์ในปริมาณมากกว่า

คาร์ดนาส (Cardenas 1985: 375-384) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนกลีบดอกของต้นแพงพวยฝรั่ง (Catharanthus roseus (L.) Don) บนอาหารของวูดและบรัน (Woon and Braun) โดยใช้ NAA 1 ppm. ไคเนติน 0.5 ppm. และทริพตามินไฮโดรคลอไรด์ (tryptamine-HCl) โดยใช้แสงธรรมชาติและอุณหภูมิห้อง พบว่าแคลลัสมีการผลิตอัลคาลอยด์สูงสุดเมื่ออายุ 1 เดือน และเมื่ออายุ 2 เดือน แคลลัสจะเกิดรากและอัลคาลอยด์จากแคลลัสจะถูกลำเลียงไปสู่ราก

เอนโดและยามาดา (Endo and Yamada 1985 1233-1236) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสจากรากของ Duboisia leichhardtii D. myoporoides และ D hopwoodii ในอาหารของแกมบอร์ก (Gamborg) โดยใช้ IBA 10^{-5} โมลาร์ พบว่าแคลลัสของ Duboisia ทั้ง 3 ชนิด มีการผลิตอัลคาลอยด์ 2 ชนิด คือ โทรเปน (tropane) และไพริดน (pyridine) แคลลัสของ D. leichhardtii มีการเจริญดีที่สุดและผลิตอัลคาลอยด์โทรเปนมากที่สุด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการศึกษาค้นคว้า

วิธีทดลอง

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

1 การเตรียมอาหาร

1 1 เตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของอาหารมูราชิกิและสกูก (MS) จำนวน 6 stocks (ภาคผนวก)

1.2 เตรียมสารเร่งการเจริญเติบโตคือ NAA, BA ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว (Co)

1 3 เตรียมอาหารสูตร MS มีขั้นตอนดังนี้

1 3 1 นำ stock 1-5 stock ละ 10 มิลลิลิตร รวมกับ stock 6 จำนวน 5 มิลลิลิตรเติมน้ำตาล 30 กรัม คนให้เข้ากัน (ถ้าใช้สารเร่งการเจริญเติบโตในสูตร MS ดัดแปลงให้ใส่ตอนนี้) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ให้ได้ 5 6 แล้วอุ่นให้ร้อน

1 3 2 ชั่งวุ้น 8 กรัม ใส่รวมกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปหลอมให้ละลาย แล้วผสมกับสารละลายที่ได้จากข้อ 1 3 1 คนให้เข้ากัน

1 3 3 นำไปบรรจุลงขวดอาหารในปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา

1.3 4 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัด (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1 3.5 ปล่อยให้อาหารเย็นแล้วนำไปเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

1.4 เตรียมอาหารสูตร MS ดัดแปลง

ทำเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร MS แต่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตลงในอาหารตามความเข้มข้นที่ต้องการ (ตาราง 1)

ตาราง 1 แสดงปริมาณของ NAA และ BA ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยทุกสูตรเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

NAA (mg/l) / BA (mg/l)	2.0	4.0	6.0	8 0	10 0	12.0
0 5	MS_2	MS_3	MS_4	MS_5	MS_6	MS_7
1.0	MS_8	MS_9	MS_{10}	MS_{11}	MS_{12}	MS_{13}
1.5	MS_{14}	MS_{15}	MS_{16}	MS_{17}	MS_{18}	MS_{19}
2 0	MS_{20}	MS_{21}	MS_{22}	MS_{23}	MS_{24}	MS_{25}
2.5	MS_{26}	MS_{27}	MS_{28}	MS_{29}	MS_{30}	MS_{31}

MS_2, MS_3, MS_4, ... MS_{31} เป็นอาหารสูตรที่มี NAA และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยให้สูตร MS เป็น MS_1

2. การเตรียมเครื่องมือ

2 1 ใช้อลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil) หุ้มมีดผ่าตัด ปากคีบ ฉาน เพาะเชื้อและปิดภาชนะใส่น้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัด

2 2 ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในตู้ถ่ายขวดแบบที่มีอากาศบริสุทธิ์เป่าออกจากภายใน โดยใช้ผ้าชุบอัลกอฮอล์เช็ดภายในให้ทั่ว แล้วเปิดเครื่องเป่าอากาศบริสุทธิ์ทิ้งไว้ 10 นาที

2 3 อุปกรณ์ที่จะต้องนำเข้าตู้ถ่ายขวดต้องเช็ดด้วยเอทานอลให้ทั่ว โดยเฉพาะจุกขวดอาหาร อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ต้องนำเข้าตู้ถ่ายขวดมีดังนี้

2 3 1 มีดผ่าตัด

2 3 2 ปากคีบ

2 3 3 ฉานเพาะเชื้อ

2 3 4 ตะเกียงอัลกอฮอล์

2 3 5 ขวดอาหาร

2.3 6 ขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2 3 7 ขวดน้ำยาฆ่าเชื้อ

2 3.8 ขวดอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

2.3.9 ขวดอัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

2 4 มีดผ่าตัดและปากคีบภายในตู้ถ่ายขวดเมื่อใช้แล้วต้องฆ่าเชื้อ โดยแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาไฟทำซ้ำ 3 ครั้ง

3 ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยง

3 1 ล้างใบอ่อนและลำต้นของหน่อหน่วดแมวด้วยผงซักฟอก แล้วล้างด้วยน้ำประปา ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ แล้วนำเข้าตู้ถ่ายขวด

3.2 นำลำต้นอ่อนและใบอ่อนแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที

3 3 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 และ 10 นาที ตามลำดับ

3 4 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

3 5 นำชิ้นส่วนพืชที่ฆ่าเชื้อแล้วออกวางบนจานเพาะเชื้อ

3 6 ใช้มีดที่เตรียมไว้ตัดชิ้นส่วนพืชออกเป็นชิ้นโดย

3 6 1 ส่วนใบตัดให้มีขนาด 7x7 ตารางมิลลิเมตร

3 6 2 ลำต้นตัดออกเป็นท่อนยาว 7 มิลลิเมตร

3 7 นำชิ้นส่วนพืชที่ตัดไว้วางบนอาหาร

3 8 นำขวดอาหารที่ใส่ชิ้นส่วนพืชวางบนชั้นและให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหนวดแมว

4 1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัส โดยมีวิธีการดังนี้

4 1 1 เพาะเลี้ยงส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนในอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง สูตรที่ 1-31 แต่ละสูตรทำการทดลอง 5 ขวด เป็นเวลา 2 เดือน โดยเมื่อครบ 1 เดือน จะทำการย้ายพืชลงในอาหารชุดใหม่สูตรเดิม โดยไม่มีการตัดแบ่ง

4 1 2 บันทึกการเจริญของแคลลัสในเดือนที่ 1 และ 2

4 1 3 ถ่ายภาพแคลลัสในเดือนที่ 1 และ 2

4 1 4 ชั่งน้ำหนักสดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน

4.2 การทดลองที่ 2 การเพิ่มแคลลัสให้มีปริมาณมากขึ้น มีวิธีการดังนี้

4 2 1 นำแคลลัสในสูตรที่มีน้ำหนักสดมากที่สุดจากการทดลองที่ 1 มาตัดแบ่งขนาดประมาณ 7x7x7 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นำไปชั่งน้ำหนัก แล้ววางลงบนอาหารชุดใหม่สูตรเดิม เป็นเวลา 1 เดือน

4 2 2 ชั่งน้ำหนักสดของเนื้อเยื่อที่เพิ่มขึ้น

4 2 3 อบให้แห้งแล้วนำไปสกัดสารต่อไป

ตอนที่ 2 การสกัดอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นธรรมชาติ

วิธีการสกัดอัลคาลอยด์ มีขั้นตอนดังนี้ (ภาคผนวก ภาพประกอบ 1)

1 นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนและลำต้นอ่อนไปอบแห้งแล้วบดให้ละเอียด

2 นำแคลลัสที่บดละเอียดหนัก 10 กรัม ไปสกัดในเครื่องสกัดซอกซ์เลต เป็นเวลา 27 ชั่วโมง โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายที่ได้ไประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) จะให้สิ่งสกัดละลายสิ่งสกัดด้วยกรดซัลฟูริคเจือจาง 2 เปอร์เซ็นต์ 150 มิลลิลิตร สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร เพื่อสกัดสารประกอบอื่นออก นำชั้นน้ำไปปรับ pH เท่ากับ 2 ด้วยกรดซัลฟูริคแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ปล่อยให้สารละลายเย็น ปรับสารละลายให้เป็นเบสด้วยโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดไปล้างด้วยน้ำ นำชั้นคลอโรฟอร์มมาเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เพื่อดูดซับน้ำส่วนที่เหลือ นำสารละลาย

มากรองแล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไประเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมดจะได้อัลคาลอยด์เป็นสารเหนียวข้นเหลืออยู่ ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

3 การสกัดอัลคาลอยด์จากใบและลำต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ทำเช่นเดียวกับแคลลัส

การเตรียมสารที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์

สารละลายที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์ได้แก่

1 ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ (dragendorff's reagent)

เตรียมสารละลาย 2 ชนิดดังนี้

1 1 ซับบิสมัท ซับไนเตรต (bismuth subnitrate) 4 กรัม ละลายในสารละลายกรดไนตริก (nitric acid) (30% W/V) 6 มิลลิลิตร

1 2 ซับโปตัสเซียม ไอโอไดด์ (potassium iodide) 6 8 กรัม ละลายในน้ำ 25 มิลลิลิตร

เมื่อต้องการใช้ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้ให้ตะกอนสีส้มกับอัลคาลอยด์

2. เมเยอร์ รีเอเจนต์ (Mayer's reagent)

ละลายเมอคิวริค คลอไรด์ (mercuric chloride) 0 68 กรัม ในน้ำ 30 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารละลายของโปตัสเซียม ไอโอไดด์ 2 5 กรัม ในน้ำ 5 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไปอีกจนปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้ให้ตะกอนสีขาวกับอัลคาลอยด์

การทดสอบอัลคาลอยด์

ละลายอัลคาลอยด์ที่สกัดได้ในปริมาณเล็กน้อยในเอทานอล 2 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลายที่ใช้ทดสอบลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน

วิธีการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

1 ชั่งอัลคาลอยด์ที่ได้จากการสกัดจากแคลลัสและต้นธรรมชาติ

2 วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ และวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณอัลคาลอยด์จากแคลลัสต้นกับต้นธรรมชาติ โดยใช้ t-test (ภาคผนวก)

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

การทดลองที่ 1 ศึกษาการชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัส

เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงสูตรที่ 1-31 พบว่าบนอาหารสูตร MS_1 ซึ่งไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตไม่มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัส แต่ขยายขนาดเล็กน้อยโดยเนื้อเยื่อมีสีเหลืองแกมน้ำตาลในเดือนที่ 1 และมีสีน้ำตาลขนาดเล็กลงและตายในที่สุดในเดือนที่ 2 (ตาราง 2 ภาพประกอบ 1) การเติม NAA และ BA ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อจะมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสในทุกสูตรอาหาร เนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงจะสร้างแคลลัสสีเขียวบริเวณรอบรอยตัดและบริเวณที่สัมผัสกับอาหารในเดือนที่ 1 (ภาพประกอบ 2) ในเดือนที่ 2 แคลลัสจะมีขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล แคลลัสมีลักษณะอัดแน่นและพบว่าในอาหารสูตร MS_6 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 10 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และสูตร MS_{12} ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 10 0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีรากเกิดขึ้น (ภาพประกอบ 3) อาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดคือสูตร MS_7 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ (ภาพประกอบ 4) ดังนั้นอาหารสูตรนี้จึงเป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสจากใบอ่อน นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้นต่ำ (0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะมีการสร้างแคลลัสมากขึ้นตามความเข้มข้นของ NAA ที่สูงขึ้น (ตาราง 3 ภาพประกอบ 5)

ส่วนในการเพาะเลี้ยงลำต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงสูตรที่ 1-31 พบว่าบนอาหารสูตร MS_1 ไม่มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสแต่มีการขยายขนาดเล็กน้อย เนื้อเยื่อมีสีเขียวในเดือนที่ 1 มีสีเขียวจางขนาดเล็กลงในเดือนที่ 2 (ภาพประกอบ 6) การเติม NAA และ BA ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ทำให้เนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนเจริญเป็นแคลลัสในทุกสูตรอาหารในเดือนที่ 1 จะเกิดแคลลัสสีเขียวแกมเหลืองและสีเขียวปนน้ำตาลเพียงเล็กน้อยบริเวณรอบรอยตัดและส่วนที่สัมผัสกับอาหาร (ภาพประกอบ 7) ในเดือนที่ 2 แคลลัสจะมีขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาลเข้มแคลลัสลักษณะหลวมและพบว่าอาหารสูตร MS_4 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 6 0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร MS_9 ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 4 0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS_{17} ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีรากเกิดขึ้น (ภาพประกอบ 8) อาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีน้ำหนักสดมากที่สุด คืออาหารสูตร MS_6 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ (ภาพประกอบ 9) ดังนั้นอาหารสูตรนี้จึงเป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสจากลำต้นอ่อน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้นสูงจะสร้างแคลลัสได้ดีกว่า NAA ความเข้มข้นต่ำ (ตาราง 4 ภาพประกอบ 10)

ตาราง 2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง* เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
MS_1	-	-	1	ขยายขนาดเล็กน้อย ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น ใบมีสีเหลืองแกมน้ำตาล	ขยายขนาดเล็กน้อย ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น ลำต้นมีสีเขียว
			2	มีขนาดเล็กลง ใบมีสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น	มีขนาดเล็กลง ลำต้นมีสีเขียวจาง ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น
MS_2	0.5	2	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น และมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยตัด แคลลัสมีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดและส่วนที่สัมผัสกับอาหาร แคลลัสมีสีเขียว
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาลเข้ม ลักษณะหลวม
MS_3	0.5	2	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นและมีแคลลัสเกิดขึ้น แคลลัสมีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นมีแคลลัสสีเขียวแกมเหลือง

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
MS_4	0.5	6	2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวบนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาลเข้ม ลักษณะหลวม
			1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นมีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นมีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาลเข้ม ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาลเข้ม มีรากสีเขียวเกิดขึ้นเล็กน้อย ลักษณะหลวม
MS_5	0.5	8.0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเกิดแคลลัสสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเกิดแคลลัสสีเขียวแกมเหลือง
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล

178780

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก /ล)	BA (มก./ล)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
MS_6	0 5	10 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเกิดแคลลัสสีมีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเกิดแคลลัสบริเวณที่สัมผัสกับอาหาร มีสีเขียวแกมเหลือง
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น มีรากเกิดขึ้น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_7	0 5	12 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดแคลลัสขึ้นมาก มีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวแกมเหลือง
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาลเข้มลักษณะหลวม
MS_8	1 0	2 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเกิดแคลลัสขึ้นเล็กน้อยมีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสเล็กน้อย สีเขียวแกมเหลือง

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก /ล)	BA (มก /ล)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_9	1 0	4 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเกิดแคลลัสสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล มีรากเกิดขึ้น
MS_{10}	1 0	6 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{11}	1 0	8 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นมาก มีแคลลัสเกิดขึ้น มีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสสีเขียนปนน้ำตาล

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต NAA (มก./ล.)	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต BA (มก./ล.)	ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน ใบอ่อน	ชิ้นส่วน ลำต้นอ่อน
MS_{12}	1 0	10 0	2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
			1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นมาก มีแคลลัสเกิดขึ้น มีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น มีรากเกิดขึ้น	แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{13}	1 0	12 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{14}	1 5	2.0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเกิดแคลลัสเล็กน้อยมีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสเล็กน้อย สีเขียวปนน้ำตาล

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{15}	1.5	4.0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสมีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{15}	1.5	6.0	1	ขยายขนาดและมีแคลลัสเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย แคลลัสมีสีเขียว	ขยายขนาดและมีแคลลัสเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเพียงเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก /ล)	BA (มก /ล.)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
MS_{17}	1 5	8 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นมีแคลลัสเกิดขึ้น มีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม มีรากเกิดขึ้นเล็กน้อย
MS_{18}	1 5	10 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเพียงเล็กน้อย สีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{19}	1 5	12 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น แคลลัสมีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว มีสีเขียวปนน้ำตาลเข้ม ลักษณะหลวม

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
MS_{20}	2 0	2 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเพียงเล็กน้อย แคลลัสมีสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียว ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{21}	2 0	4 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเพียงเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{22}	2 0	6 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเพียงเล็กน้อย มีสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาลและยาว
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเพียงเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว มีสีเขียวปนน้ำตาลและยาว ลักษณะหลวม

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
MS_{23}	2 0	8 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียว ปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{24}	2 0	10 0	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเกิดแคลลัสสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS 25	2 0	12 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสมีสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาลและขาว
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม

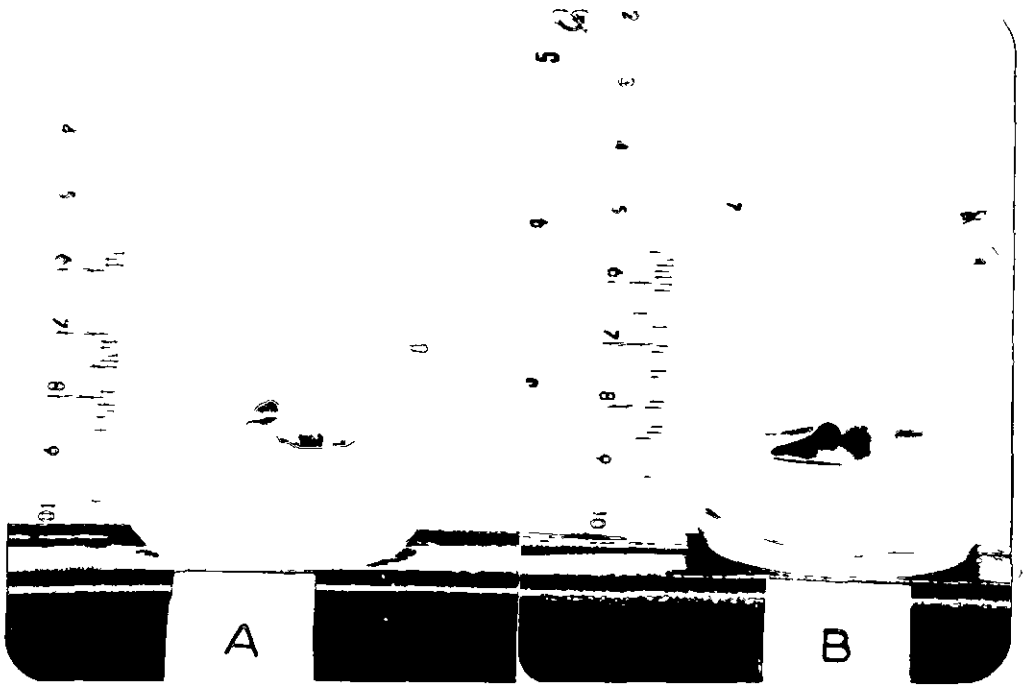
ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
MS_{26}	2 5	2 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเพียงเล็กน้อย มีสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{27}	2 5	4 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียว	ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวปนน้ำตาล
MS_{28}	2 5	6 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อย มีสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัส มีสีเขียวปนน้ำตาลและยาว
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม

ตาราง 2 (ต่อ)

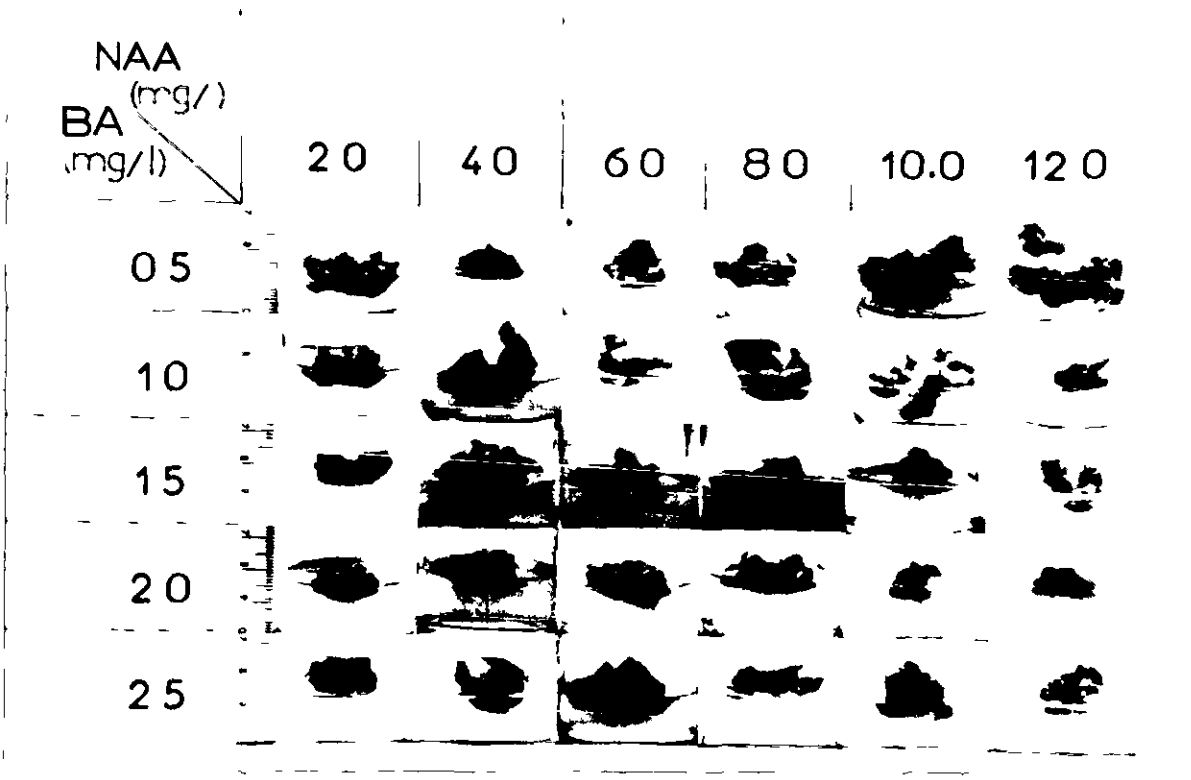
สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วน	
	NAA (มก /ล)	BA (มก /ล)		ใบอ่อน	ลำต้นอ่อน
MS_{29}	2.5	8 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อยมีสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อยสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะวัดแน่น	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว สีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{30}	2 5	10 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อยสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม
MS_{31}	2 5	12 0	1	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสมีสีเขียว	ขยายขนาดและเกิดแคลลัสเล็กน้อยมีสีเขียวปนน้ำตาล
			2	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น	แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะหลวม

อาหารสูตร MS ถ้าแปลงทุกสูตร เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

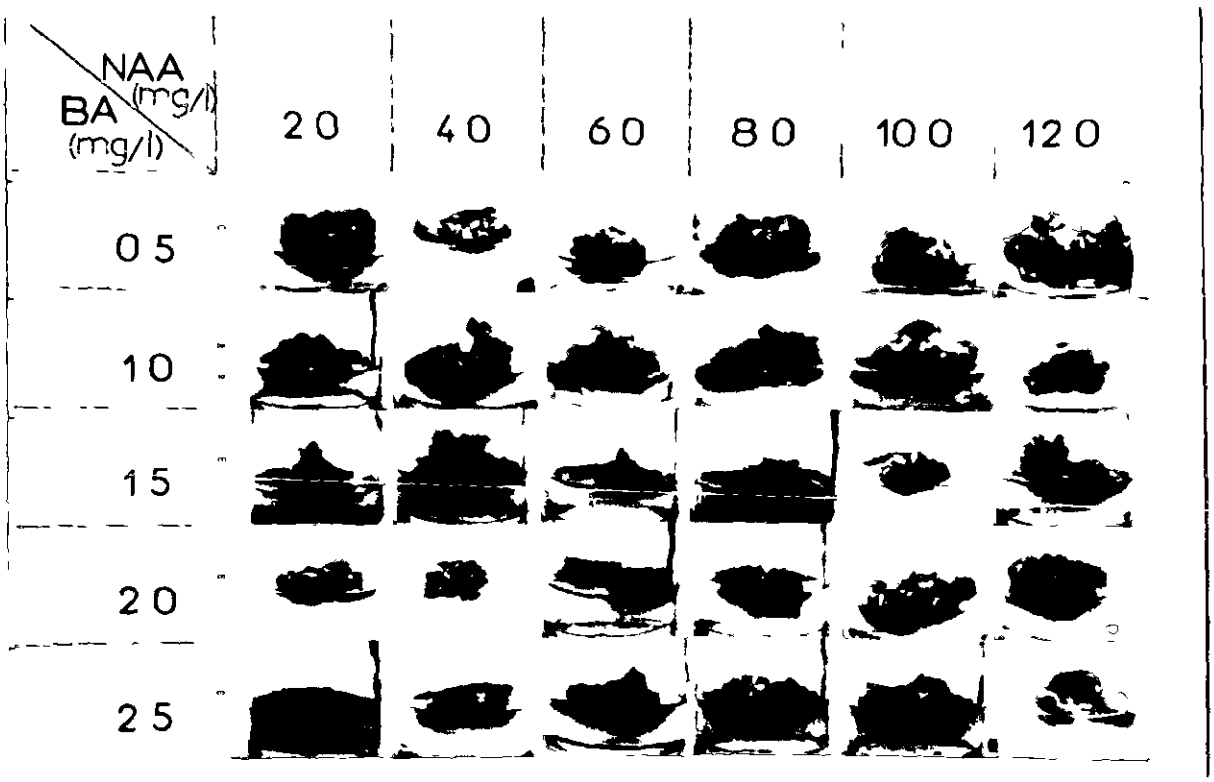


ภาพประกอบ 1 A ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน

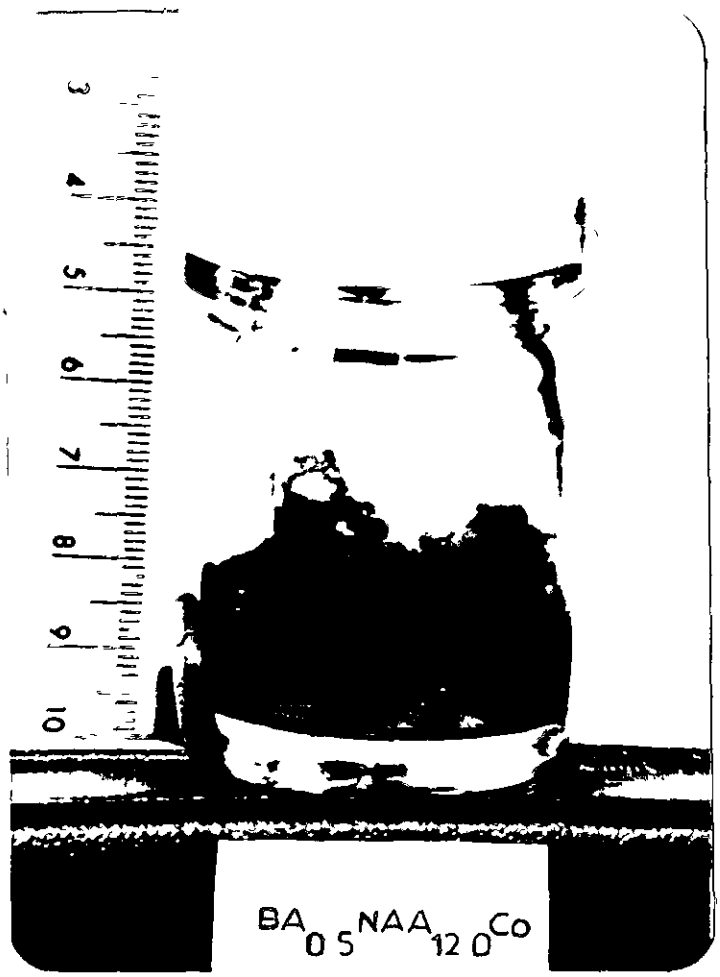
B ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน



ภาพประกอบ 2 การเสริมเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน



ภาพประกอบ 3 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน



ภาพประกอบ 4 ลักษณะของแคลลัสจากใบอ่อนที่มีน้ำหนักสดมากที่สุดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS_7 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 12 0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน

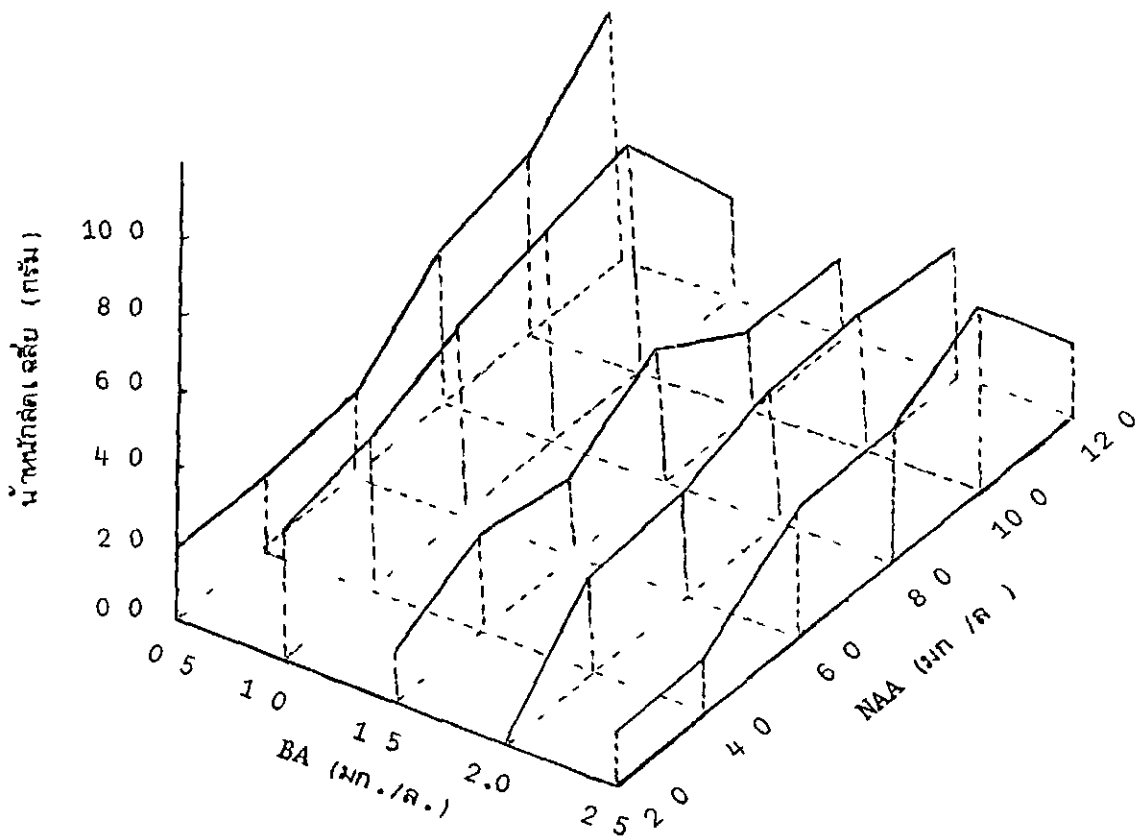
ตาราง 3 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง* เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากใบอ่อน (กรัม)
	BA (มก./ล)	NAA (มก /ล)	
MS_1	-	-	-
MS_2	0.5	2.0	2 02
MS_3	0.5	4 0	2.03
MS_4	0 5	6.0	2.18
MS_5	0.5	8 0	4 06
MS_6	0.5	10 0	4.58
MS_7	0.5	12.0	6.60
MS_8	1.0	2.0	3.52
MS_9	1.0	4.0	4.15
MS_{10}	1.0	6.0	5 08
MS_{11}	1.0	8.0	5.50
MS_{12}	1.0	10.0	6.02
MS_{13}	1.0	12.0	2 69
MS_{14}	1.5	2.0	1.60
MS_{15}	1.5	4.0	2.48
MS_{16}	1.5	6 0	1.95
MS_{17}	1.5	8.0	3 76
MS_{18}	1.5	10.0	2.12

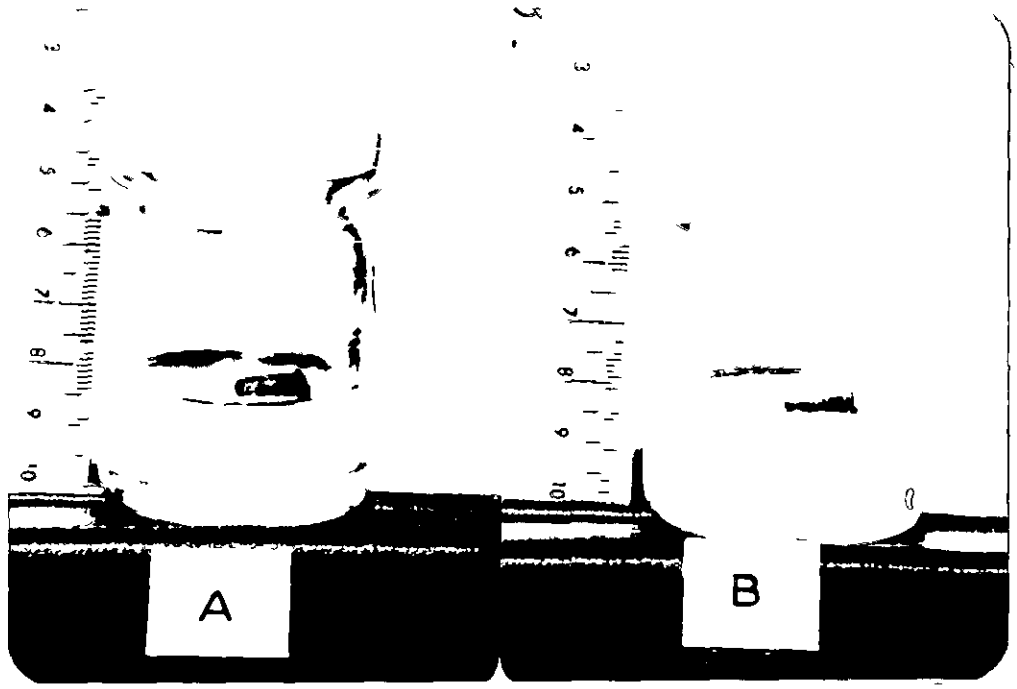
ตาราง 3 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากใบอ่อน (กรัม)
	BA (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)	
MS_{19}	1.5	12.0	2.00
MS_{20}	2.0	2.0	0.28
MS_{21}	2.0	4.0	2.62
MS_{22}	2.0	6.0	2.80
MS_{23}	2.0	8.0	3.50
MS_{24}	2.0	10.0	3.85
MS_{25}	2.0	12.0	3.68
MS_{26}	2.5	2.0	1.40
MS_{27}	2.5	4.0	1.44
MS_{28}	2.5	6.0	3.38
MS_{29}	2.5	8.0	3.50
MS_{30}	2.5	10.0	4.85
MS_{31}	2.5	12.0	2.03

* อาหารสูตร MS ดัดแปลงทุกสูตรเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

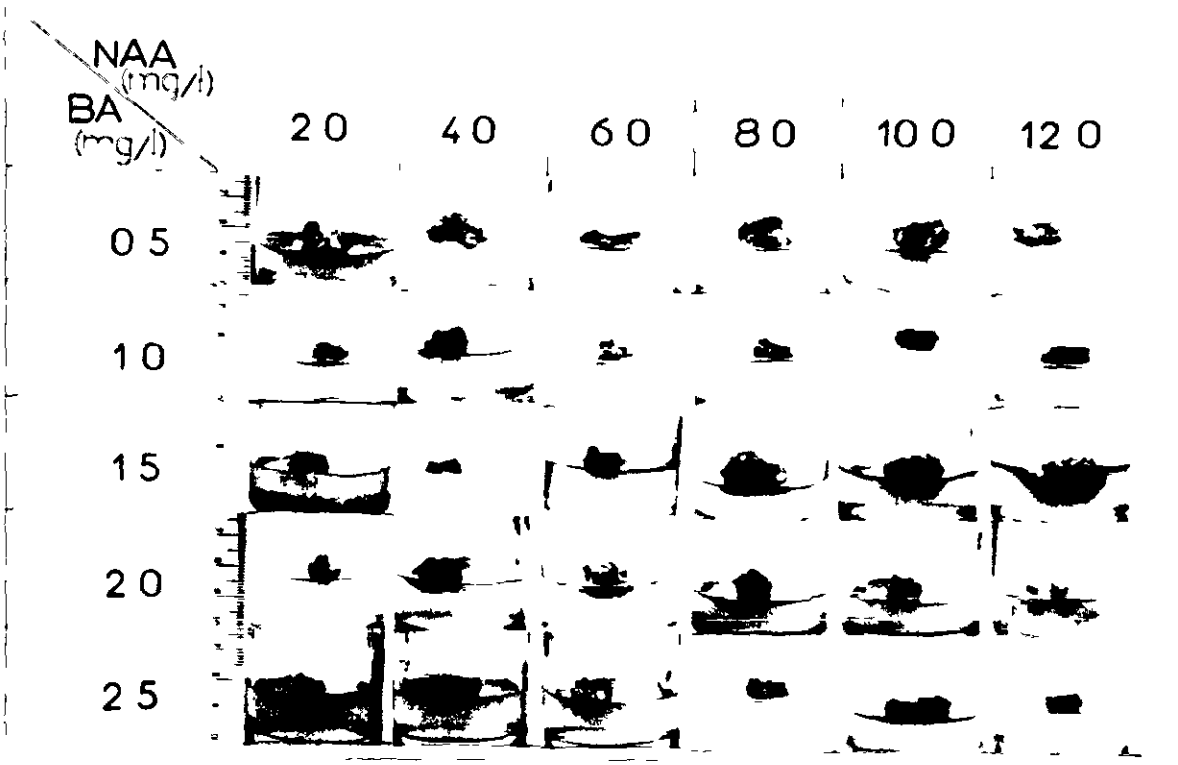


ภาพประกอบ 5 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน

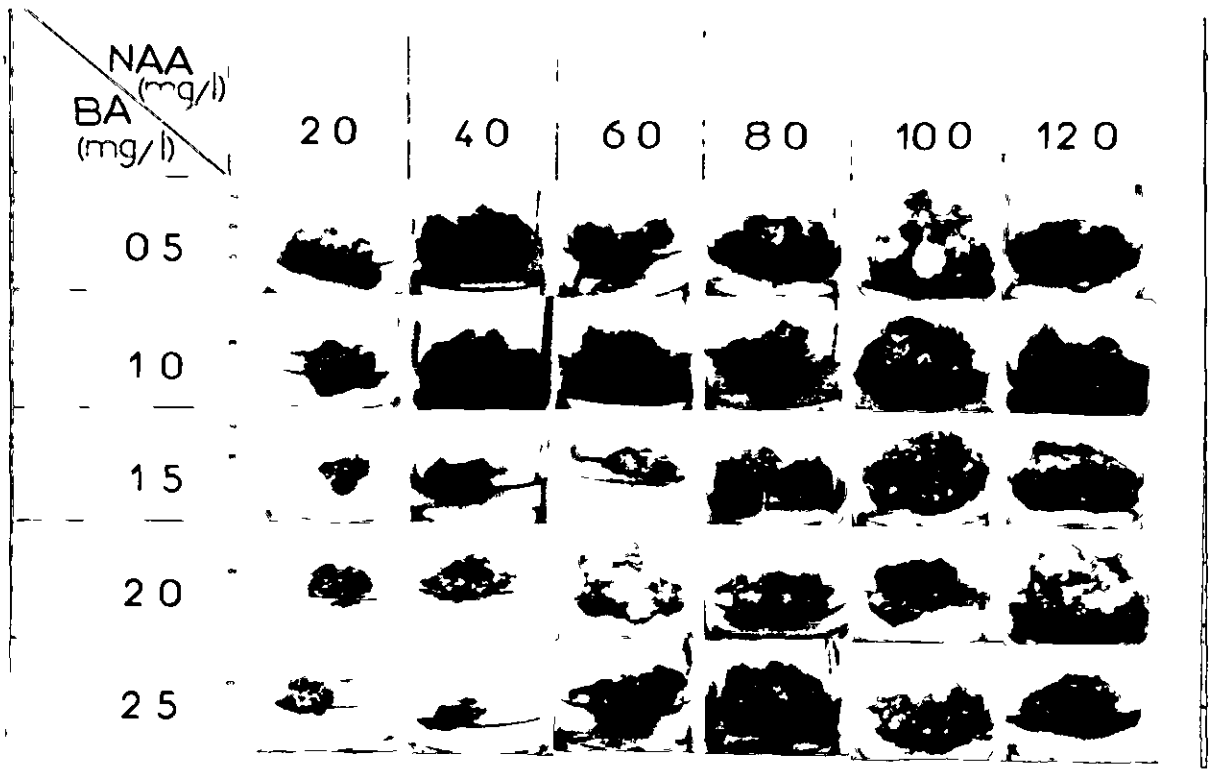


าพประกอบ 6 A ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน

B ลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน



ภาพประกอบ 7 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อลิ่งนลาตันอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน



ภาพประกอบ 8 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน

ภาพประกอบ 9 ลักษณะของแคลลัสจากลาตันอ่อนที่มีน้ำหนักสดมากที่สุดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS_6 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 10 0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน

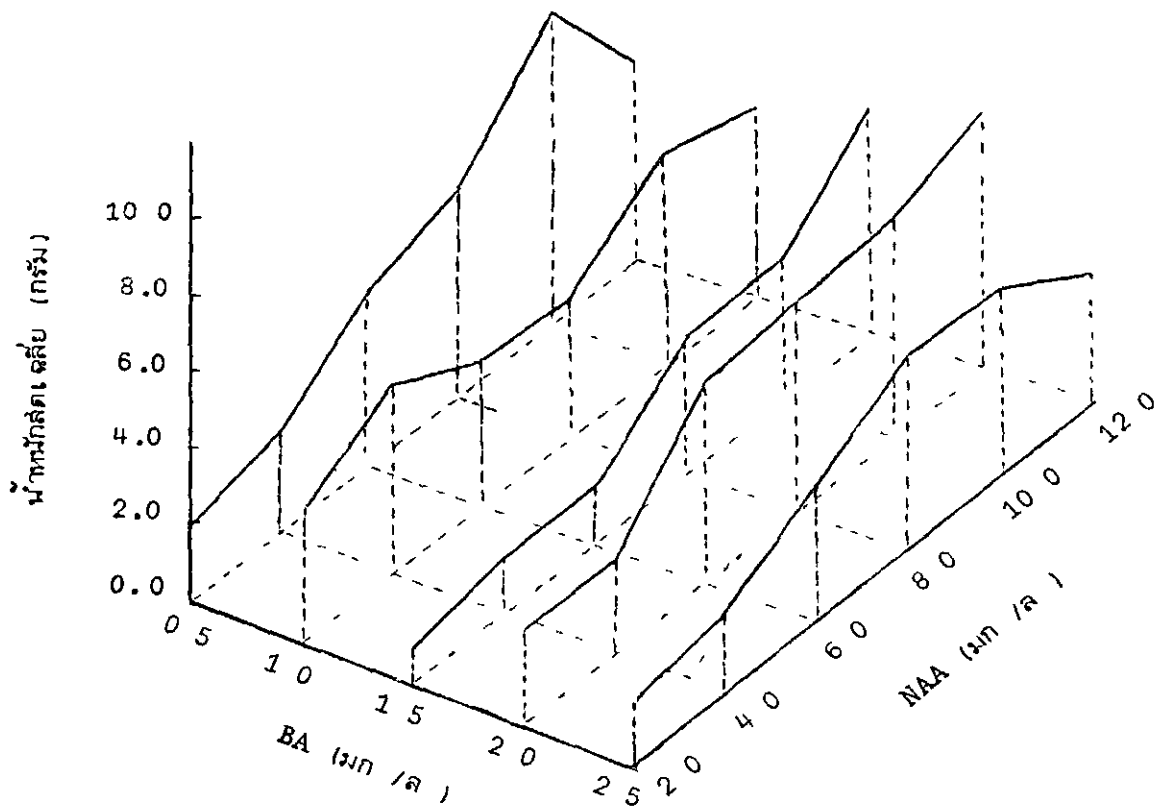
ตาราง 4 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นอ่อน (กรัม)
	BA (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)	
MS_1	-	-	-
MS_2	0.5	2.0	2.50
MS_3	0.5	4.0	2.77
MS_4	0.5	6.0	4.96
MS_5	0.5	8.0	5.64
MS_6	0.5	10.0	8.45
MS_7	0.5	12.0	5.38
MS_8	1.0	2.0	3.55
MS_9	1.0	4.0	5.04
MS_{10}	1.0	6.0	3.92
MS_{11}	1.0	8.0	3.79
MS_{12}	1.0	10.0	5.75
MS_{13}	1.0	12.0	5.50
MS_{14}	1.5	2.0	1.20
MS_{15}	1.5	4.0	1.61
MS_{16}	1.5	6.0	1.75
MS_{17}	1.5	8.0	3.77
MS_{18}	1.5	10.0	3.90

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส จากลำต้นอ่อน (กรัม)
	BA (มก /ล)	NAA (มก /ล)	
MS_{19}	1 5	12 0	6 16
MS_{20}	2 0	2.0	2.53
MS_{21}	2 0	4.0	2 61
MS_{22}	2 0	6 0	5 25
MS_{23}	2 0	8.0	5.58
MS_{24}	2.0	10 0	5 84
MS_{25}	2 0	12 0	6 85
MS_{26}	2 5	2.0	1 69
MS_{27}	2.5	4.0	2 00
MS_{28}	2 5	6.0	3 56
MS_{29}	2.5	8 0	5 00
MS_{30}	2.5	10.0	4 97
MS_{31}	2 5	12.0	3.42

* อาหารสูตร MS ดัดแปลงทุกสูตรเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์



ภาพประกอบ 10 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากกลาดัมอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน

การทดลองที่ 2 การเพิ่มแคลลัสให้มีปริมาณมากขึ้น

นำแคลลัสที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงส่วนใบอ่อนบนอาหารสูตร MS_7 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองที่ 1) ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด มาตัดแบ่งแล้วเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม แคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นในเวลา 1 เดือน มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 7.22 กรัมต่อขวด (ตาราง 5) เมื่อนำไปอบแห้ง น้ำหนักสดลดลงประมาณ 15 เท่า คือเหลือน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 0.48 กรัมต่อขวด ส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงลำต้นอ่อน ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดจากสูตร MS_6 ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองที่ 1) นำมาตัดแบ่งแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม แคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นในเวลา 1 เดือน มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 8.14 กรัมต่อขวด (ตาราง 5) เมื่อนำไปอบแห้งน้ำหนักสดลดลงประมาณ 16 เท่า คือเหลือน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 0.50 กรัมต่อขวด

ตาราง 5 น้ำหนักสดของแคลลัสจากใบอ่อนและลำต้นอ่อนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมเป็นเวลา 1 เดือน

ขวดที่	น้ำหนักสดของแคลลัสจากใบอ่อน (กรัม)	น้ำหนักสดของแคลลัสจากลำต้นอ่อน (กรัม)
1	6 88	8 87
2	7 67	8 50
3	7 29	9 59
4	7 56	7 76
5	8 15	7 07
6	6 56	7 74
7	7 67	8 47
8	7 04	8 40
9	6 69	7 39
10	6 69	7 60
เฉลี่ย	7 22	8 14

ตอนที่ 2 การสกัดอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นธรรมชาติ

เมื่อนำแคลลัสของใบอ่อน แคลลัสของลำต้นอ่อนจากการทดลองที่ 2 ใบธรรมชาติและลำต้นธรรมชาติท่อนแห้งพร้อมทั้งบดละเอียดอย่างละ 10 กรัม ไปสกัดอัลคาลอยด์ โดยนำสารที่สกัดได้ปริมาตรเสีกน้อยละลายในเอทานอล 2 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลายที่ใช้ทดสอบลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน ผลปรากฏว่าสารละลายให้ตะกอนสีส้มกับตราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ และให้ตะกอนสีขาวขุ่นกับเมเยอร์ รีเอเจนต์ แสดงว่าสารที่นำมาทดสอบเป็นอัลคาลอยด์ (ตาราง 6)

ตาราง 6 ผลการทดสอบอัลคาลอยด์ด้วยตราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ และเมเยอร์ รีเอเจนต์

สารสกัดจาก	ผลการทดสอบ	
	ตราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์	เมเยอร์ รีเอเจนต์
1. แคลลัสของใบอ่อน	ตะกอนสีส้ม	ตะกอนสีขาว
2 ใบธรรมชาติ	ตะกอนสีส้ม	ตะกอนสีขาว
3. แคลลัสของลำต้นอ่อน	ตะกอนสีส้ม	ตะกอนสีขาว
4. ลำต้นธรรมชาติ	ตะกอนสีส้ม	ตะกอนสีขาว

การเปรียบเทียบอัลคาลอยด์จากแคลลัสของใบอ่อนและใบธรรมชาติ

นำแคลลัสของใบอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 และใบธรรมชาติที่อบแห้งและบดละเอียดอย่างละ 10 กรัม ไปสกัดหาอัลคาลอยด์แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยที่ได้ (ตาราง 7 และ 8)

ตาราง 7 ปริมาณ (น้ำหนัก) ของอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสของใบอ่อนและใบธรรมชาติ

ครั้งที่	น้ำหนักอัลคาลอยด์จากแคลลัสของใบอ่อน (กรัม)	น้ำหนักอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติ (กรัม)
1	0 04	0 02
2	0 04	0 04
3	0 05	0 03
4	0 06	0 04
5	0 06	0 03
$\bar{X}$	0 05	0 032

เมื่อนำข้อมูลจากตาราง 7 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของอัลคาลอยด์พบว่าแคลลัสของใบอ่อนมีอัลคาลอยด์ 0 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ใบธรรมชาติมีอัลคาลอยด์ 0 32 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ตาราง 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์จากแคลลัสของใบอ่อน และใบธรรมชาติ โดยใช้สถิติ t-test

ตัวสถิติ / กลุ่มตัวอย่าง	n	X	S	t
อัลคาลอยด์จากแคลลัสของใบอ่อน	5	0 05	0.01	3.333
อัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติ	5	0 032	0 009	

$$t_{0.01,8} = 2.896$$

จากตาราง 7 และ 8 ปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์จากแคลลัสของใบอ่อนมากกว่าอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติเมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนและใบธรรมชาติโดยใช้สถิติ t-test พบว่าปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์จากแคลลัสของใบอ่อนมากกว่าอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

การเปรียบเทียบอัลคาลอยด์จากแคลลัสของลำต้นอ่อนและลำต้นธรรมชาติ

นำแคลลัสของลำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสม จากการทดลองที่ 2 และใบธรรมชาติที่อบแห้ง และบดละเอียดอย่างละ 10 กรัม ไปสกัดหาอัลคาลอยด์แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยที่ได้ (ตาราง 9 และ 10)

ตาราง 9 ปริมาณ (น้ำหนัก) ของอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสของลำต้นอ่อนและลำต้นธรรมชาติ

ครั้งที่	น้ำหนักอัลคาลอยด์จากแคลลัสของลำต้นอ่อน (กรัม)	น้ำหนักอัลคาลอยด์จากลำต้นธรรมชาติ (กรัม)
1	0 04	0 02
2	0 04	0 04
3	0 05	0 03
4	0 06	0 04
5	0.06	0 03
$\bar{X}$	0 05	0 022

เมื่อนำข้อมูลจากตาราง 7 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของอัลคาลอยด์พบว่า แคลลัสลำต้นอ่อนมีอัลคาลอยด์ 0 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ลำต้นธรรมชาติมีอัลคาลอยด์ 0 22 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ตาราง 10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์จากแคลลัสของลำต้นอ่อน และลำต้นธรรมชาติ โดยใช้สถิติ t-test

ตัวสถิติ / กลุ่มตัวอย่าง	n	$\bar{X}$	S	t
อัลคาลอยด์จากแคลลัสของลำต้นอ่อน	5	0.05	0.10	5.00
อัลคาลอยด์จากลำต้นธรรมชาติ	5	0.022	0.009	

$$t_{0\ 01,8} = 2.896$$

จากตาราง 9 และ 10 ปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์จากแคลลัสของลำต้นอ่อนมากกว่าอัลคาลอยด์จากลำต้นธรรมชาติ เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสของลำต้นอ่อนและลำต้นธรรมชาติ โดยใช้สถิติ t-test พบว่าปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์จากแคลลัสของลำต้นอ่อนมากกว่าอัลคาลอยด์จากลำต้นธรรมชาติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของการศึกษาครั้งนี้

1 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและคัดเลือกอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง

2 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสและต้นธรรมชาติ

วิธีดำเนินการศึกษาครั้งนี้

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

การทดลองที่ 1 ศึกษาการชักนำให้เนื้อส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัส โดยนำเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนคู่ที่ 2 และเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนปล้องที่ 1 และ 2 ของหญ้าหนวดแมวมาฆ่าเชื้อโดยแช่ในไฮโปคลอไรท์ 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 และ 10 นาทีตามลำดับ ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดแบ่งเป็นชิ้นและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง โดยการเติม NAA BA และน้ำมะพร้าว รวมทั้งสิ้น 31 สูตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงภายในห้องที่มีอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

การทดลองที่ 2 การเพิ่มแคลลัสให้มีปริมาณมากขึ้น นำแคลลัสของใบอ่อนและลำต้นอ่อนบนอาหารสูตรที่เหมาะสม (มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด) จากการทดลองที่ 1 มาตัดแบ่งแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมในสภาพห้องเหมือนการทดลองที่ 1

ตอนที่ 2 การสกัดอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นธรรมชาติ

นำแคลลัสของใบอ่อน แคลลัสของลำต้นอ่อนจากการทดลองที่ 2 ใบธรรมชาติและลำต้นธรรมชาติไปอบแห้งพร้อมทั้งบดละเอียดอย่างละ 10 กรัม ไปสกัดอัลคาลอยด์

สรุปผลและอภิปรายผล

การชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัส

เมื่อนำชิ้นส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS_1 ซึ่งเป็นอาหารสูตรที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต พบว่าไม่มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสเพียงแต่ขยายขนาดเล็กน้อยและตายในที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนมีปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโตไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสได้ ส่วนในอาหารสูตร MS ดัดแปลงซึ่งเติมสารเร่งการเจริญเติบโตลงไปมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสทุกสูตรอาหาร ดังนั้นในการชักนำให้ใบอ่อนและลำต้นอ่อนเกิดแคลลัสจึงต้องเติมสารเร่งการเจริญเติบโตลงไปในอาหารด้วย ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงนั้นพบว่าจะมีการสร้างแคลลัสได้ดีในอาหารสูตรที่ใช้ BA ความเข้มข้นต่ำ NAA ความเข้มข้นสูง อาหารสูตรที่ชักนำให้ใบอ่อนเกิดแคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดคืออาหารสูตร MS_7 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารสูตรที่ชักนำให้ลำต้นอ่อนเกิดแคลลัสน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดคืออาหารสูตร MS_6 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าในการเพาะเลี้ยงใบอ่อนนั้นเมื่อใช้ BA ความเข้มข้นต่ำ (0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะมีการสร้างแคลลัสมากขึ้นตามความเข้มข้นของ NAA ที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของโอคาซาวาและคนอื่น ๆ (Okazawa and others. 1966. 862-869) ได้อธิบายว่าการเสริมปริมาณออกซินเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจะช่วยกระตุ้นให้

เกิดแคลลัส และยังช่วยให้แคลลัสนั้นมีการเจริญเติบโตอีกด้วย อัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินในระดับต่าง ๆ กัน ทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อแตกต่างกันไป คือถ้าใช้ออกซิน (NAA) ความเข้มข้นสูงร่วมกับไซโตไคนิน (BA) ความเข้มข้นต่ำจะช่วยให้เนื้อเยื่อมีการสร้างแคลลัสและมีรากเจริญขึ้นมา

การทดลองครั้งนี้ไม่มีการสร้างรากในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสน้ำหนักสดมากที่สุดดังกล่าวข้างต้น อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของ NAA ที่สูงเกินไปจึงไปยับยั้งการเกิดราก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสกูกและมิลเลอร์ (Skoog and Miller 1957 118-131) ที่รายงานไว้ว่า NAA ชักนำให้เกิดจุดกำเนิดราก แต่ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงเกินไปก็จะยับยั้งการเกิดรากได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA เป็น 1 5 /2.0 /2 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสน้อยถึงที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของ BA ที่เพิ่มขึ้นนี้ไม่เหมาะสมต่อการขยายของเนื้อเยื่อไปเป็นแคลลัส แคลลัสจึงเกิดน้อย

จากการทดลองพบว่าแคลลัสเกิดรากในอาหารสูตร MS ดัดแปลงบางสูตรคือ แคลลัสของใบอ่อนมีรากเกิดขึ้นในอาหารสูตร MS_6 ที่เติม BA ความเข้มข้น /0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS_{12} ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแคลลัสของลำต้นอ่อนจะมีรากเกิดขึ้นในอาหารสูตรต่าง ๆ ดังนี้ อาหารสูตร MS_4 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น /6 0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร MS_9 ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS_{17} ที่เติม BA ความเข้มข้น /1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นเช่นนี้ สกูกและมิลเลอร์ (Skoog and Miller. 1957 118-131) ได้อธิบายไว้ว่าถ้าอัตราส่วนของ

ออกซินต่อไซโตไคนินสูงกว่าอัตราส่วนสมดุลเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นแคลลัสและราก

การเพิ่มแคลลัสให้มีปริมาณมากขึ้น

จากการทดลองพบว่า แคลลัสของใบอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS_7 ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด ส่วนแคลลัสของลำต้นอ่อนมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดในอาหารสูตร MS_6 ซึ่งเติม BA ความเข้มข้น 0 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 10 0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสูตรอาหารทั้ง 2 สูตรนี้จึงเหมาะสมสำหรับการเพิ่มแคลลัสจากใบอ่อนและลำต้นอ่อนให้มีปริมาณมากขึ้น

การสกัดอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นธรรมชาติ

เมื่อนำแคลลัสของใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS_7 และแคลลัสของลำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS_6 ไปอบแห้งพร้อมทั้งบดละเอียดอย่างละ 10 กรัม แล้วนำไปสกัดอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับใบและลำต้นธรรมชาติซึ่งใช้ในปริมาณที่เท่ากัน พบว่าอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสของใบอ่อนและลำต้นอ่อนมีปริมาณมากกว่าอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากใบและลำต้นธรรมชาติ กล่าวคือในแคลลัสของใบอ่อนพบอัลคาลอยด์ 0 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนในใบธรรมชาติพบอัลคาลอยด์ 0 32 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และในแคลลัสของลำต้นอ่อนพบอัลคาลอยด์ 0 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนในลำต้นธรรมชาติพบอัลคาลอยด์ 0 22 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อนำปริมาณอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสของใบอ่อนและลำต้นอ่อนไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ t-test เปรียบเทียบกับใบและลำต้นธรรมชาติ พบว่าอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสของใบอ่อนและลำต้นอ่อนมีปริมาณมากกว่าอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากใบและลำต้นธรรมชาติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของฟูรุยาและคนอื่น ๆ (Furuya and others. 1983 1671-1673) ที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของลำต้น *Diascoreophyllum cumminsii* แล้วนำไปสกัดอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้น

ธรรมชาติพบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีอัลคาลอยด์มากกว่าในต้นพืชธรรมชาติ กล่าวคือ ในแคลลัสพบอัลคาลอยด์ 0 3-0 9 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนในต้นพืชธรรมชาติพบเพียง 0 02-0 03 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ข้อเสนอแนะ

1 ควรทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของออกซินและไซโตไคนินชนิดอื่น ๆ ในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสน้ำหนักสดมากที่สุด

2 ควรศึกษาชนิดของอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสของหญ้าหนวดแมวเปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ

3 ควรศึกษาระดับความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินกับการผลิตอัลคาลอยด์

4 ควรศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอายุของแคลลัสกับความสามารถในการผลิตอัลคาลอยด์

5 ควรมีการนำอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสของหญ้าหนวดแมวไปทดลองการออกฤทธิ์ทางด้านเภสัช

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

เกรียงศักดิ์ เตชอนันต์ "พยัพเมฆหรือหญ้าหนวดแมว" วนสาร 42(1). 33-35, 2528.

พยอม ตันติวัฒน์ สมุนไพร จัดพิมพ์โดยสมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย 2521, 202 หน้า

_____ สมุนไพร โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2521, 142 หน้า

พาณี เตชะเส่น "ยาพื้นบ้านและสมุนไพรที่มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ" ใกล้หมอ 4(2) 77-78, 2523

ไพบูลย์ กวินเสถียรวัฒนา หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2524, 109 หน้า

เยาวนุช หงษรานนท์ และ เสียงใส พิริยพฤนต์ "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ" กสิกร 58(2) 105-103, 2528

สัมฤทธิ์ มีวงศ์อุโฆษ "สมุนไพร" สยามจดหมายเหตุ 8(43) 1023-1024, 2526

สายสมร กิตติยจร ตารางสรรพคุณสมุนไพรยาไทยแผนโบราณ อักษรไทย 2526, 330 หน้า

สุภาพ บุณยะรัตเวช และคนอื่น ๆ "การทดสอบประเภทสารเคมีในพืชสมุนไพร" รายงานผลการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เล่ม 5, 2523, 430 หน้า

อรถ สหวัชรินทร "ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทางด้านการเกษตร" วารสารพืชสวน 14(4) 34-43, 2522

Cardenas, L B. "Alkaloid Production in Intact Parts and Floral Tissue Culture of Catharanthus roseus (L) Don "Kalikasan, Phillipp. J. Biol. 12(3) 375-384, 1983.

Delfel, N E and J A. Rothfus "Antitumor Alkaloids in Callus Cultures of Cephalotaxus harlingtonia" Phytochemistry 16 1595-1598, 1977

Endo, T and Y Yamada "Alkaloid Production in Cultured Roots of Three Species of Duboisia" Phytochemistry 24(6). 1233-1236, 1985

Furuya, T. and others "Alkaloid Production in Cultured Cells of Dioscoreophyllum cumminsii" Phytochemistry 22(7) 1671-1673, 1983.

Ikuta, A. and H. Itokawa "Berberine and other Protoberberine Alkaloids in Callus Tissue of Thalictrum minus" Phytochemistry 21(6) 1419-1421, 1982

Jain, S. C and S. Sahoo 'Isolation and Characterization of Steroidal Sapogenins and Glycoalkaloids from Tissue Cultures of Solanum verbascifolium Linn". Chem Pharm Bull. 29(6) 1765-1767, 1981

Krieger, T M. and others "The effects of Plant Growth Regulators and Cultures of Cinchona pubescens" Planta Medica. 46. 15-18, 1982

Murashige, T. "Plant Propagation Through Tissue Culture". Ann. Rev Plant Physiol. 25 135-166, 1974.

_____. Current Status of Plant Cell and Organ Culture" Horticultural Science. 2 127-130, 1977

Murashige, T and F Skoog "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobaccao Tissue Culture". Physiologia Plantarum. 15 473-493, 1962

Okazawa, Y. and others. "Effects of Auxin and Kinetin on the Development and Differentiation of Potata Tissue Culture In Vitro". Physiologia Plantarum 20 862-869, 1966

Overbeek, V J and others. "Factors in Coconut Milk Essential for Growth and Development of Very Young Datura Embryos" Science. 94 351, 1941

Puhan, Z and S M Martin "The Industrial of Plant Cell Culture". In Hockenhull, D J.D. Progress in Industrial Microbiology London, J & A Churchill. 9 13, 1966.

Shinsuke, O. and M. Yatazawa "Growth and Alkaloid Production in Callus of Rauwolfia serpentina" Agric. Biol Chem 43(11). 2297-2304, 1979.

Skoog, F. and C. O Miller "Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Culture In Vitro" Symposium Society Experimental biology. 11 118-131, 1957.

Staden, J. V and S E. Drewes "Identification of Cell Division Inducing Compounds from Coconut Milk". Physiologia Plantarum

_____. "Identification of Zeatin and Zeatinriboside in Coconut Milk". Physiologia Plantarum. 34 106-109, 1975.

Staden, J V and S E Drewes "The Identification of Zeatin Glucoside from Coconut Milk" Physiologia Plantarum. 36 123-126, 1976.

White, P R. "Nutritional Requirement of Isolated Plant Tissue and Organ" Annual Review Plant Physiology 2 231-242, 1951.

ภาคผนวก

องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง

1 เตรียมสารละลายเข้มข้น 100 เท่าของความเข้มข้นในอาหาร

1.1. stock 1

NH_4NO_3	165	กรัม
KNO_3	190	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

1.2 stock 2

$MgSO_4.7H_2O$	37	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	1,690	กรัม
$ZnSO_4\ 7H_2O$	0.860	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0 0025	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

1.3 stock 3

$CaCl_2.2H_2O$	44	กรัม
KI	0.083	กรัม
$CoCl_2\ 6H_2O$	0 0025	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

1.4 stock 4

KH_2PO_4	17	กรัม
H_3BO_3	0.620	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

1 5 stock 5

$FeSO_4$ $7H_2O$	2,784	กรัม
Na_2 LDTA	3.724	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

2 เตรียมสารละลายเข้มข้น 200 เท่าของความเข้มข้นในอาหาร

2 1 stock 6

Inositol	2.0	กรัม
Nicotinic acid	0.01	กรัม
Pyridoxine HCl	0.01	กรัม
Thiamine HCl	0.002	กรัม
Glycine	0 04	กรัม
H_2O (distilled)	100	มิลลิลิตร

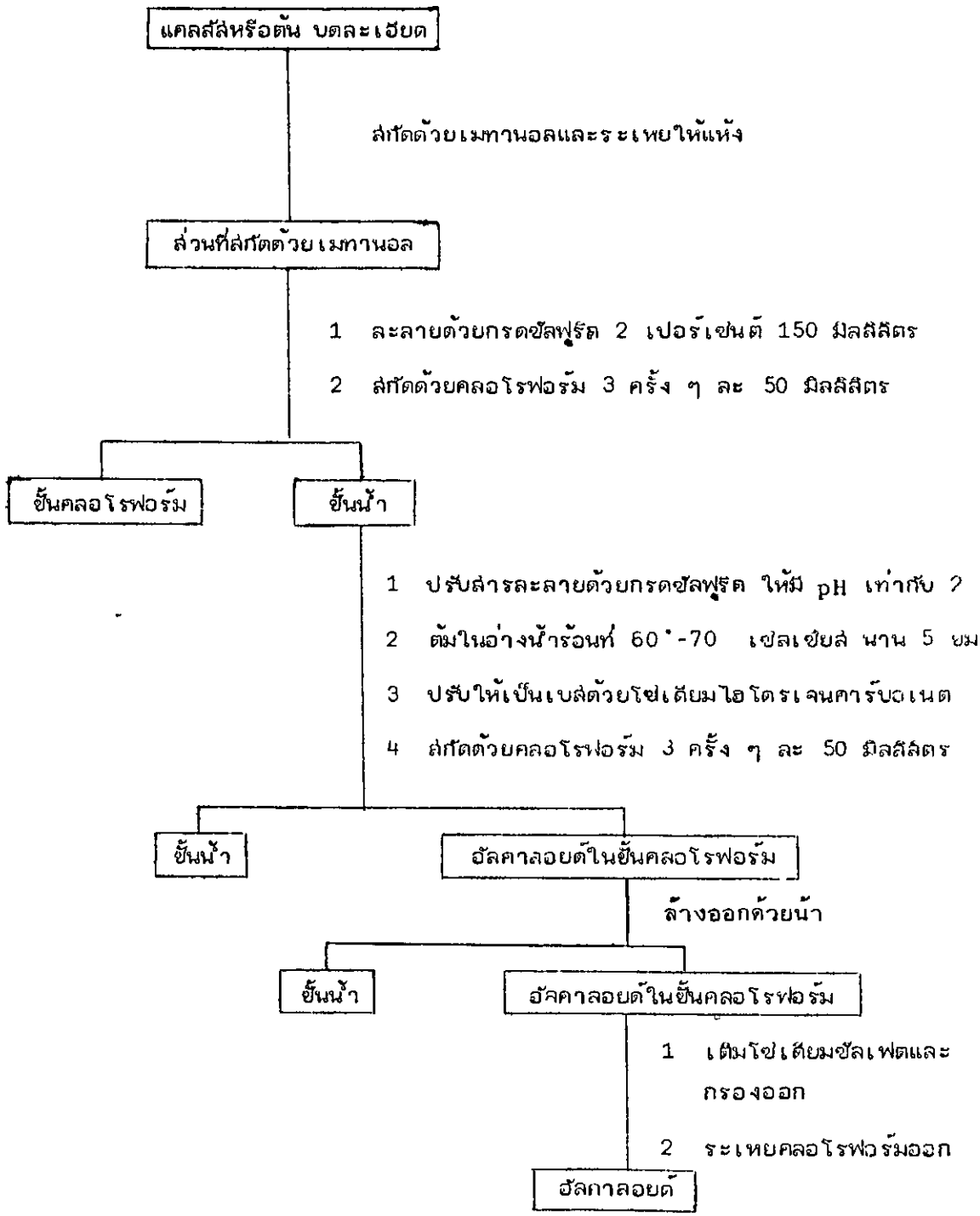
3	sucrose	30	
4	agar	8	กรัม

การเตรียมอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยการเติม

น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

สารเร่งการเจริญเติบโต ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเตรียมดังนี้

1.	NAA	0.01	กรัม
	H_2O (distilled)	100	มิลลิลิตร
2	BA	0.01	กรัม
	H_2O (distilled)	100	มิลลิลิตร



ภาพประกอบ 1 แผนภูมิการสกัดสารอัลคาลอยด์

การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์จากแกลลัสกับต้นธรรมชาติ จากสูตร

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2}\left(\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}\right)}}$$

$$\text{degree of freedom} = n_1 + n_2 - 2$$

เมื่อ t แทน ตัวสถิติทดสอบซึ่งมีการแจกแจง t

$\bar{X}_1$ และ $\bar{X}_2$ แทน ค่าเฉลี่ยเลขคณิตของปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์ของกลุ่มตัวอย่างที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ตามลำดับ

S_1^2 และ S_2^2 แทน ความแปรปรวนของปริมาณ (น้ำหนัก) อัลคาลอยด์ของกลุ่มตัวอย่างที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ตามลำดับ

n_1 และ n_2 แทน จำนวนตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ตามลำดับ