581.0424
ผ 115 ก
ว 3

# การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ

ปริญญานิพนธ์
ของ
ผกามาศ เชมะจารี

ห้องสมุดวิทยาศาสตร์วิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

7 พ.ค 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต
กุมภาพันธ์ 2530

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178391

# การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเม็ดเกล็ดปลาเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ

บทคัดย่อ

ของ

สกามาศ เขมะจารี

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2530

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา (Phyla nodiflora Greene) โดยนำส่วนใบและลำต้นมาชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) และ MS ดัดแปลง ปรากฏว่า ส่วนใบและลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด สำหรับการเพิ่มปริมาณแคลลัสสามารถทำได้โดยการตัดแบ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงสูตรที่เหมาะสม กล่าวคือ แคลลัสใบเจริญเติบโตได้ดี มีน้ำหนักสามากที่สุด (7.06 กรัมต่อขวด) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสลำต้นเจริญเติบโตได้ดีมีน้ำหนักสดมากที่สุด (6.85 กรัมต่อขวด) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร การเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นธรรมชาติโดยใช้สถิติ t-test พบว่า สารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบมีน้ำหนักมากกว่าสารอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติ และสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสลำต้นมีน้ำหนักมากกว่าสารอัลคาลอยด์จากลำต้นธรรมชาติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

# A COMPARISON OF ALKALOIDS QUANTITY IN *Phyla nodiflora* Greene TISSUE CULTURE AND IN THE INTACT PLANT

AN ABSTRACT

BY

PAKAMAS KAMAJAREE

Presented inpartial fulfillment of the requirements

for the Master of Educucation degree

at Srinakharinwirot University

February 1986

The purpose of this investigation was to compare quantities of alkaloids obtained from cultured calluses and intact plants of Phyla nodiflora Greene. The Tissue culture techniques were applied for callus induction and propagation. Firstly, leaf discs and internode sections were aseptically cultured on the MS (Murashige and Skoog. 1962) medium and the modified MS media with either NAA or 2,4-D added in order to obtain original calluses. It was found that the medium containing 0.1 mg/1 of 2,4-D could induce largest leaf calluses as well as internode calluses. The original calluses were then subcultured on the modified MS media containing different amount of growth hormones. It was, however, found that leaf calluses grew best on the medium containing 1.0 mg/1 of NAA and 1.0 mg/1 of BA (average wet weight 7.06 g/bottle) while best results of internode calluses were obtained on the medium containing 2.0 mg/1 of NAA and 2.0 mg/1 of BA (average wet weight 6.85 g/bottle).

Extraction of alkaloids from leaf calluses, internode calluses and intact plants were 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.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

| คณะกรรมการที่ปรึกษา | | คณะกรรมการสอบ | |
|---|---|---|---|
| | ประธาน | | ประธาน |
| | กรรมการ | | กรรมการ |
| | | | กรรมการ |

# ประกาศคุณูปการ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อรพินท์ แก้วลาย ประธานกรรมการที่ปรึกษา ดร.สุนันท์ ศุนชาติประเสริฐ กรรมการที่ปรึกษา อาจารย์อุรุพีร์ ปัญจะ ที่ได้ช่วยกรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัยและตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณสำเริง ที่เจริญ และคุณอุษา สุนันทารอด ที่ช่วยเหลือระหว่างการทำการทดลองและการถ่ายภาพ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้อง ๆ ที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนทางด้านการศึกษาและการทำปริญญานิพนธ์ รวมทั้งที่ ๆ และคุณพรชัย บัวเรือง ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผกามาศ เขมะจารี

กุมภาพันธ์ 2530

สารบัญ


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | บทนำ | 1 |
| | คำนำ | 1 |
| | จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า | 2 |
| | ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า | 2 |
| | ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า | 3 |
| | นิยามศัพท์เฉพาะ | 3 |
| | เวลาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า | 3 |
| 2 | เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 4 |
| 3 | วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า | 10 |
| | การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาเพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส | 10 |
| | การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม | 13 |
| | การทดลองที่ 3 การเพิ่มปริมาณแคลลัสเพื่อการสกัดสารอัลคาลอยด์ | 15 |
| | การทดลองที่ 4 การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและหญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกตามธรรมชาติ | 15 |
| | การทดสอบสารอัลคาลอยด์ | 16 |
| | การเก็บรวบรวมข้อมูล | 17 |
| 4 | ผลการศึกษาค้นคว้า | 18 |
| | ผลการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาเพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส | 18 |

ผลการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงแกลลัสเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม . . . . . 29
ผลการทดลองที่ 3 การเพิ่มปริมาณแกลลัสเพื่อสกัดสารอัลคาลอยด์ . . 32
ผลการทดลองที่ 4 การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแกลลัสและพญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกตามธรรมชาติ . . . . . 32
5 สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ . . . . . 36
จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า . . . . . 36
วิธีการดำเนินการศึกษาค้นคว้า . . . . . 36
การวิเคราะห์ข้อมูล . . . . . 37
สรุปและอภิปรายผล . . . . . 37
ข้อเสนอแนะ . . . . . 40
บรรณานุกรม . . . . . 41
ภาคผนวก . . . . . 45

# สารบัญตาราง


| ตาราง | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ปริมาณ NAA และ 2,4-D ที่เติมลงในอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง จำนวน 9 สูตร (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 12 |
| 2 | ปริมาณ NAA , 2,4-D และ BA ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง จำนวน 24 สูตร (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 13 |
| 3 | การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบ และลำต้นบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ | 20 |
| 4 | ลักษณะของการเจริญเติบโต สี และน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นจากแคลลัสใบเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ | 24 |
| 5 | ลักษณะของการเจริญเติบโต สี และน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นจากแคลลัสลำต้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ | 28 |
| 6 | ผลการทดสอบสารที่สกัดได้จากเทคนิคโครมาโทกราฟีส่วนใบ ลำต้น และแคลลัสใบแคลลัสลำต้น | 33 |
| 7 | น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสใบและใบธรรมชาติ | 34 |
| 8 | ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์ แคลลัสใบและใบธรรมชาติ | 34 |
| 9 | น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสลำต้นและลำต้นธรรมชาติ | 35 |
| 10 | ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์ แคลลัสลำต้น และลำต้นธรรมชาติ | 35 |

# บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า


1 ใบอ่อนคู่ที่ 2 คู่ที่ 3 และลำต้นปล้องที่ 2 คู่ปล้องที่ 3 ของต้นกล้าแคลลัสลา 11

2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ..... ..... 19

3 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสใบ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ..... . ..... ..... 26

4 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2,4-D และ BA ในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ... 27

5 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสลำต้น เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ .. ..... ..... .... 30

6 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2,4-D และ BA ในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 31

# บทนำ

ปัจจุบันนี้พืชสมุนไพรกำลังเป็นที่สนใจในวงกว้างแพทย์แผนปัจจุบันซึ่งได้มีการทดลองนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยควบคู่ไปกับวิธีการของแพทย์ ปรากฏว่าได้ผลดี ทั้งนี้เพราะพืชสมุนไพรมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มสารอัลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์เป็นยา (นันทวัน บุณยะประภัศร 2525 : 5)

จากการศึกษาเกี่ยวกับประเภทของสารเคมีในพืช พบว่า พืชในวงศ์ และสกุลเดียวกันจะมีสารเคมีเป็นพวกเดียวกันหรือคล้ายคลึงกัน (วิเชียร จีรวงส์ และพยอม ตันติวัฒน์ 2520 : 39) เมื่อทำการศึกษาเพื่อทดสอบประเภทของสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคในพืชสมุนไพรวงศ์ Verbenaceae 9 สกุล พบว่า พืชทั้ง 9 สกุล มีสารอัลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ (สุภาพ บุณยะรัตเวช และคนอื่น ๆ 2523 : 173, 2526 : 107) หญ้าเกล็ดปลาเป็นพืชสมุนไพรมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Phyla nodiflora Greene ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Verbenaceae เช่นเดียวกันกับพืชทั้ง 9 สกุลที่ได้กล่าวมา ทั้งหญ้าเกล็ดปลายังมีคุณสมบัติในการรักษาโรคไว้หลายชนิด ได้แก่ รักษาอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น แก้ไอเป็นเลือด รักษาอาการทางระบบทางเดินปัสสาวะ เช่น แก้บวมน้ำ ขับปัสสาวะ (ชัยโย ชัยชาญทิพยุธ และคนอื่น ๆ 2526 : 213) รักษาโรคเบาหวานตามตำรับหมอพระวัยจตุตาลโย วัดเทพธิมยงค์ จังหวัดสระบุรี (มนรัตน์ พัฒนเงิน 2527 : 44) นอกจากนี้ยังรักษาอาการทางผิวหนังและแก้ไข้ตัวร้อนได้อีกด้วย (Pushpangadan and Atal. 1984 : 74) ดังนั้นจึงเชื่อว่าประสิทธิภาพในการรักษาโรคของหญ้าเกล็ดปลาเป็นผลมาจากสารอัลคาลอยด์ที่สะสมอยู่

การสกัดสารอัลคาลอยด์ จำเป็นต้องใช้ต้นพืชจำนวนมากซึ่งมีปัญหาในเรื่องเนื้อที่เพาะปลูกและการดูแลรักษาไม่ว่าจะเป็นการให้ปุ๋ย การควบคุมโรคและแมลง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ และหากสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากหญ้าเกล็ดปลามีฤทธิ์ในการรักษาจริงแล้ว ก็สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีปริมาณมากพอที่จะสกัดสารอัลคาลอยด์ในเชิงอุตสาหกรรมได้

การศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้กับหญ้าเกล็ดปลา เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณแคลลัสที่สามารถผลิตสารอัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นผลให้มีปริมาณสารอัลคาลอยด์จำหน่ายมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว แต่ในปัจจุบันการทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลานี้ยังไม่ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลานี้จะมีปริมาณสารอัลคาลอยด์สะสมอยู่มากน้อยเท่าใดเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ปลูกตามธรรมชาติดังนั้นจึงสมควรที่จะนำหญ้าเกล็ดปลามาเพาะเลี้ยงโดยศึกษาในแง่ทางสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นแคลลัส พร้อมทั้งทำการสกัดและทดสอบหาสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบปริมาณของสารดังกล่าวกับต้นที่ปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งผลการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยทางด้านเภสัชวิทยาและการแพทย์ต่อไป

<u>จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า</u>

1. เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้าเกล็ดปลาจากส่วนใบและลำต้นบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง

2. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสได้ดีและมีน้ำหนักมากที่สุด

3. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับหญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกตามธรรมชาติ

<u>ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า</u>

1. ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสได้ดีและมีน้ำหนักมากที่สุด

2. เพื่อการผลิตสารเคมีจากแคลลัสที่เป็นประโยชน์ต่อการอุตสาหกรรม

3. เพื่อประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยาและด้านการแพทย์

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. พืชทดลอง คือ หญ้าเกล็ดปลา (Phyla nodiflora Greene) เฉพาะส่วนใบและลำต้น

2. สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา

2.1 สูตร MS (Murashige and Skoog. 1962 : 473 - 497)

2.2 สูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตต่าง ๆ ได้แก่ NAA (α - naphthalene acetic acid), BA (6-benzyladenine) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

3. ส่วนที่นำมาหาปริมาณสารอัลคาลอยด์ คือ แคลลัสจากลำต้น แคลลัสจากใบ ลำต้นและใบของหญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกตามธรรมชาติ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์ที่เกาะรวมตัวกันอยู่โดยยังมิได้มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา 2523 10)

2. อัลคาลอยด์ (alkaloid) หมายถึง สารประกอบที่มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุลตั้งแต่หนึ่งอะตอมขึ้นไป มีสมบัติเป็นเบส มีรสขม และเป็นสารที่มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง (สุภาพ บุญยะรัตเวช 2523 . 160)

3. แคลลัสใบ หมายถึง แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ

4. แคลลัสลำต้น หมายถึง แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้น

เวลาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า

เริ่มทดลองเมื่อวันที่ 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2528

สิ้นสุดการทดลองเมื่อวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2529

สถานที่ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

# บทที่ 2

## เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หญ้าเกล็ดลาเป็นพืชสมุนไพรมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น ฟันกระต่าย ก้อยกังตั้ง ไก่หยิ่งหนึ่งจี้ หญ้าเกล็ดลาเป็นไม้ล้มลุกขึ้นเลื้อยคลุมดินแตกกิ่งก้านสาขามาก ข้อที่แตะดินจะงอกรากออกมายึดเกาะดินไว้ ทั้งต้นมีขนสั้น ๆ ต้นยาว 15 - 90 เซนติเมตร ใบออกตรงกันข้ามก้านใบสั้น ตัวใบยาว 1.0 - 2 5 เซนติเมตร เนื้อใบค่อนข้างหนา ปลายใบมน ขอบใบมีรอยหยักกลับ [illegible] ตั้งแต่กลางใบขึ้นมาถึงปลายใบ ฐานใบเรียวเล็ก ดอกออกเป็นช่อจากง่ามใบ มีดอกย่อยจำนวนมากติดอยู่กับช่อดอกเป็นทรงกระบอกยาว 1.0 - 2.0 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางยาวประมาณ 6 มิลลิเมตร ก้านช่อดอกยาว 2.0 - 6.0 เซนติเมตร กลีบดอกสีม่วงแดงอ่อนโคนกลีบติดกันเป็นหลอดแคบ ๆ ส่วนปลายเปิดลักษณะคล้ายปาก เกสรตัวผู้มี 4 อัน สั้น 2 ยาว 2 ติดกับกลีบดอก รังไข่ภายในแบ่งเป็น 2 ห้อง ผลมีกลีบเลี้ยงห่อหุ้มอยู่เมื่อแก่จะแยกเป็นเมล็ดแข็ง 2 เมล็ด ส่วนที่ใช้เป็นยา คือ ทั้งต้น ยอด และใบ (ชัยโย ชัยชาญพิเชษฐ และคนอื่น ๆ 2523 : 213, อุไรวรรณ ประยูรรัตน์ และคนอื่น ๆ 2524 : 193)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เจสวอลและนารายัน (Jaiswal and Narayan. 1985 : 256 - 258) ได้ศึกษาการพัฒนาของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนลำต้นของ Ficus religiosa Linn. โดยนำเอากิ่งอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม BAP (6-benzylaminopurine), NAA และ 2,4-D ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส มีความเข้มของแสง 4000 ลักซ์ ผลปรากฏว่า ส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสเจริญเติบโตเต็มที่ในสัปดาห์ที่ 5 ส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.05 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเริ่มเกิดรากในสัปดาห์ที่ 4 ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากสูงสุด (45.8 ± 6.7%) ถ้า NAA ความเข้มข้นสูงกว่านี้เปอร์เซนต์การเกิดรากจะลดลง ในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.05 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้แคลลัส

เจริญได้เร็วและจะเริ่มเป็นยอดอ่อนในสัปดาห์ที่ 4 อาหารที่เติม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซนต์การเกิดต้นอ่อนสูงที่สุด (50.0 ± 6.2%) ถ้าเติม BAP สูงกว่านี้จะยับยั้งการเกิดต้น ในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP และ NAA พบว่า เปอร์เซนต์การเกิดต้นอ่อนจะลดลง และส่งเสริมการสร้างแคลลัสเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า NAA จะมีผลไปขัดขวางการทำงานของ BAP

มาทรี และคนอื่น ๆ (Mhatre and others. 1985 : 78 - 80) ได้เพาะเลี้ยงส่วนของใบและตาข้างของ Morus indica Linn. บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ไคเนติน (kinetin) และซีติน (zeatin) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีส่วนประกอบเหมือนเดิม ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 - 60 เปอร์เซนต์ และมีความเข้มแสง 950 ลักซ์ ผลปรากฏว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้างบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA จะเกิดต้นเล็ก ๆ จำนวนมากที่สุด (6 - 8 ต้นต่อ 1 ตา) ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสใบ พบว่า มีการชักนำให้เกิดต้นมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้นได้มากที่สุด ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากต้นพบว่า เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่แคลลัสไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้น

ในการศึกษาชนิดของสารอัลคาลอยด์ในพืชสมุนไพรวงศ์ Verbenaceae พบว่า ในพืชสกุลที่มีสารนี้ได้แก่ สกุล Lantana มีสารแลนทานีน (lantanine) สกุล Prema มีสารกาเนียรีน (ganiarine) และสารพรีมนีน (premnine) สกุล Vitex มีสารนิชินดีน (nishindine) และวิไทรซีน (vitricine) และสกุล Porphyla มีสารสเตไชดีน (stachydrine) (Raffauf. 1970 306, Williaman and Hul - Lin Li. 1970 . 220)

ลภาพ บุณยะรัตเวช และคณะ (สุภาพ บุณยะรัตเวช และคณะ 2524 17 - 2526 107) ได้ทดสอบประเภทของสารเคมีในพืชสมุนไพรวงศ์ Verbenaceae พบว่ามีสารเคมีในพืชต่อไปนี้ แสมทะเล (Avicennia officinalis Linn.) ในมะกรูด (C orodenuron sp.) ไม้เท้ายายม่อม (C indicum Kuze.) ตีนเป็ดงา (C inerme Gaerth) ช้องแมว (Gmelina arborea Roxb) สัก(Tectona grandis Linn.f.) ไข่เน่า (Vitex glabrata R Br.) กาสามปี (V peduncularia Wall. ex Schauer) และหนามคอม (V. trifolia Linn.)

ไอวาดาเร และคณะ ๆ (Ivadare and others. 1975 170/79 m) ได้รายงานการสกัดอัลคาลอยด์จากผลของ Clerodendron trichotomum (Verbenaceae) พบว่ามีอัลคาลอยด์ ไตรโคโทมีน (trichotomine) และไตรโคโทมีน จี 1 (trichotomine G 1)

แกสตัปตา และคณะ ๆ (Dasgupta and others. 1984 281) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกลำต้นของ Premna integrifolia Linn. (Verbenaceae) พบว่ามีสารอัลคาลอยด์ที่แยกได้เป็นสารในกลุ่ม สเปอร์มีน อัลคาลอยด์ (Spermine alkaloids) และได้ทำการสังเคราะห์โดยจะเรียกชื่อว่าเป็นสารอะฟีแลนดรีน (apheleandrine N N O Dibenzoyl - apheleandrine)

ไอโนะ และคณะ ได้สกัดสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใบ ราก และยอดอ่อน (Inouke and Yatazawa 1979 2297 - 2304) ได้ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้นของ Duvalia serpentina บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 0.2 - 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากมันฝรั่ง 0.1 - 0.2 เปอร์เซ็นต์ ย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะได้แคลลัส น้ำหนักแคลลัสที่เกิดขึ้นไปสกัดหาสารอัลคาลอยด์ พบว่า แคลลัสจากรากมีสารอัลคาลอยด์รีนิดยอจมาลีน (ajmaline) 10 - 20 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ส่วนแคลลัสจากต้นมีสารอัลคาลอยด์ซนิดแอจมาลีน 1 - 10 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงจากแคลลัสของ 2,4-D แต่ไม่มีไคเนติน จะทำให้สารแอจมาลีนลดลง

คอนสตาเบล และคณะ ๆ (Constabel and others. 1982 139 - 142) ได้ทำการเลี้ยงแคลลัสจากส่วนไฮโปโคทิล (hypocotyls) จากต้นและใบของ Catharanthus

roseus ในอาหารเหลวสูตร B5 ของแกมบอร์ก (Gamberg's medium) ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กาเซอีนไฮโดรไลเซท (casein hydrolysate) 1.0 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.6 เปอร์เซนต์ เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เมื่อแคลลัสอายุ 2 - 3 เดือน จึงนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ที่เติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และคาเซอีนไฮโดรไลเซท 1 0 กรัมต่อลิตร นำแคลลัสที่ได้อายุ 3 - 5 สัปดาห์ มาสกัดหาสารอัลคาลอยด์ พบว่า ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงทุกส่วนของต้น ให้ปริมาณอัลคาลอยด์มากหอ ๆ กัน และยังพบว่าอายุของแคลลัสไม่มีผลต่อปริมาณสารอัลคาลอยด์ เมื่อวิเคราะห์ชนิดของสารอัลคาลอยด์พบว่าเป็นสารสตริคโตไซดีน แลคตัม (strictosidine lectum) สารแอจมาลิซีน (ajmalicine) สารฮอร์แฮมเมอรินีน (horhammerinine) สารฮอร์แฮมเมอริซีน (horhammericine) และสารวินโดลินีน (vindolinine)

อิกูตา และอิโตกาวา (Ikuta and Itokawa. 1982 1419 - 1421) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นของ Thalictrum minus บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2.4-D 0.1, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับไกเนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 26 -1 องศาเซลเซียส ในที่มืด จากการนำแคลลัสมาสกัดสารอัลคาลอยด์ พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจพบสารอัลคาลอยด์ 8 ชนิด อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจพบสารอัลคาลอยด์ 7 ชนิด และอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจพบสารอัลคาลอยด์เพียง 4 ชนิด โดยพบว่า สารอัลคาลอยด์ชนิดเบอร์เบอรีน (berberine) มีมากที่สุด และมีมากกว่าในใบและลำต้นที่เกิดตามธรรมชาติ

ยามาดา และฮาชิโมโต (Yamada and Hashimoto. 1982 : 101 - 103) ได้เพาะเลี้ยงส่วนของใบของ Atropa belladonna, Batura stramonium และ Hyoscyamus niger บนอาหารสูตร LS (Linsmaier - Skoog agar medium) ที่เติม NAA 5 x $10^{-6}$ โมลาร์ BA 5 x $10^{-6}$ โมลาร์ และซูโครส 3 เปอร์เซนต์ เมื่อเกิดแคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเบื้องต้นอาหารใหม่และเพาะเลี้ยงต่อไป 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 22 ± 4 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของแสง 300 - 5000 ลักซ์ แล้วนำแคลลัสที่ได้มาสกัดสารอัลคาลอยด์ และวิเคราะห์ชนิดของสารอัลคาลอยด์ ผลปรากฏว่า แคลลัสของ Hyoscyamus niger มีปริมาณสาร

อัลคาลอยด์บางชนิด และจากการวิเคราะห์ชนิดของสารอัลคาลอยด์ พบว่า เป็นโปรเพนอัลคาลอยด์ (propane alkaloids) 2 ชนิด คือ สารไฮโอสไซอามีน (hyoscyamine) และสาร สโคโปลามีน (scopolamine)

ฟูรูยา โยชิกาวา และกิโยฮารา (Furuya, Yoshikawa and Kiyohara 1983 : 1871 - 1673) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นของ Dioscorcophyllum cumminsii บนอาหารสูตรต่าง ๆ 6 สูตร พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร RT (Revised Tobacco medium) ที่เติม IAA (indoleacetic acid) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดกาสอะมิโน (casamino acid) 0.1 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำแคลลัสมาสกัดสาร ผลปรากฏว่า มีสารอัลคาลอยด์ 2 ชนิด คือ จาโทรร์ไรซีน (jatrorrhizine) และแมกโนโฟลรีน (magnoflorine) อยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะสารจาโทรร์ไรซีนจากแคลลัสนั้นมีมากกว่าพืชที่ปลูกตามธรรมชาติถึง 40 - 100 เท่า

คัทชาน และคนอื่น ๆ (Kutchan and others. 1983 281 - 284) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดของ Papaver bracteatum บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม ไคเนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 1 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศา เซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงนำแคลลัสที่ได้มาสกัดสารอัลคาลอยด์ พบว่า มีสารอัลคาลอยด์ 3 ชนิด คือ โดพามีน (dopamine) ทีบาอีน (thebaine) และแซนกีนาวีน (sanguinarine) และยังพบว่ามีการสะสมสารโดพามีนมากกว่าสารตัวอื่น (0.1 - 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม)

สชูชแมน และเวลแมน (Schuchmann and Wellmann. 1985 · 88 - 91) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงส่วนไฮโปโคทิลของ Papaver somniferum และ P. oriental บนอาหารแข็งสูตร B5 ของแกมบอร์ก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 เพาะเลี้ยงไว้ในที่มืดและเปลี่ยนอาหารทุก 1 สัปดาห์ เมื่อแคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีน้ำหนักประมาณ 4 กรัม แล้วจึงนำ

แคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ที่ไม่เติม 2,4-D จากนั้นนำแคลลัสมาสกัดสาร อัลคาลอยด์ พบว่า แคลลัสของพืชทั้งสองจะมีสารแซนทีนาร์นในปริมาณมาก ส่วนแคลลัส P somniferum ที่มีอายุ 45 วัน จะพบสารโปรโทพีน (protopine) และมอร์ฟีน (mophine) ส่วนสารพีบาอีนซึ่งจัดว่าเป็นสารอัลคาลอยด์หลักในเอมบริออยด์ของ P. somniferum พบว่ามีการสะสมถึง 0.2 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง

เอนโด และยามาดา (Endo and Yamada. 1985 · 1233 - 1236) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสจากรากของ Duboisia leichhardtii, D. myoporoides และ D. hopwoodii บนอาหารสูตรแกมบอร์กที่เติม IBA $10^{-5}$ โมลาร์จึงเกิดแคลลัสขึ้น แล้วนำแคลลัสที่ได้ไปสกัดสารพบว่า แคลลัสของ Duboisia ทั้ง 3 ชนิด มีการผลิตสารอัลคาลอยด์ชนิดโทรเปน (tropane) และไฮดีน (hyoscine) จากการเปรียบเทียบปริมาณสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้พบว่า แคลลัสของ D leichhardtii ผลิตสารอัลคาลอยด์ชนิดโทรเปนได้มากที่สุด

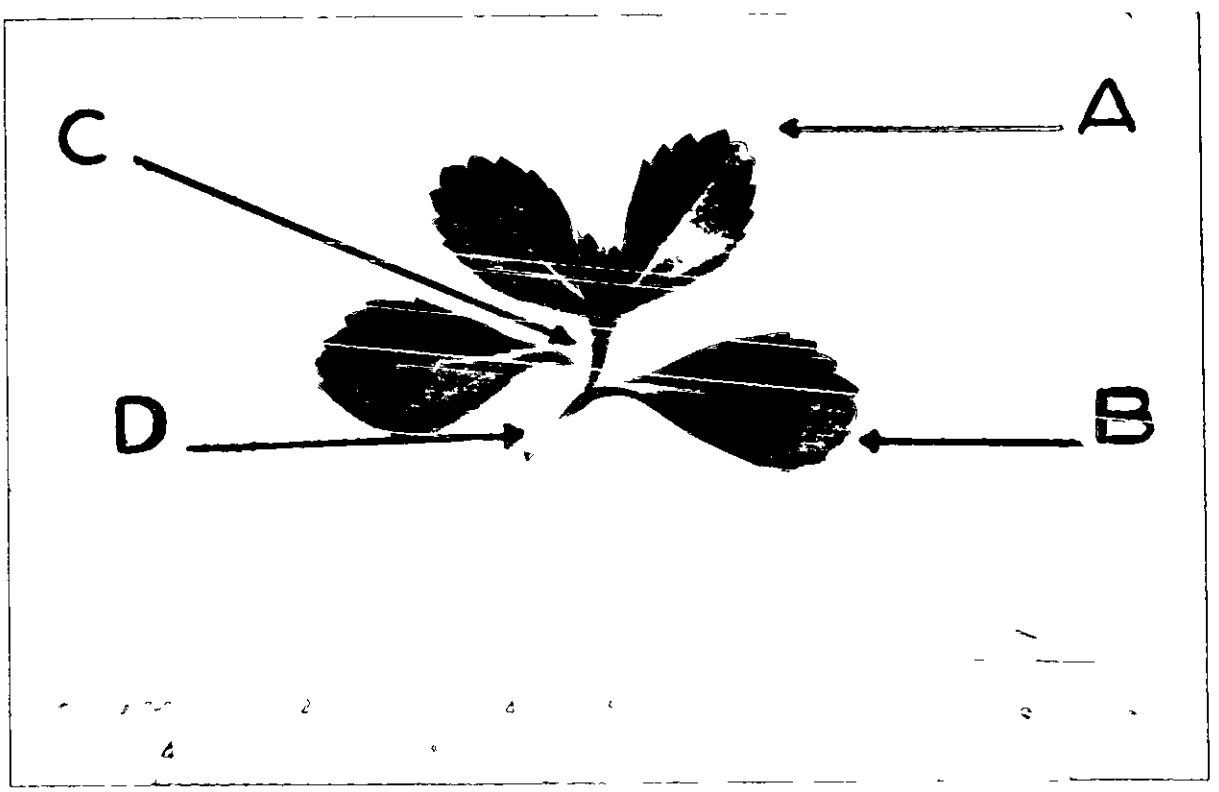
# บทที่ 3

## วิธีการดำเนินการศึกษาค้นคว้า

**วิธีการทดลอง**

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาเพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส

1.1 ทำความสะอาดเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้น โดยนำส่วนของใบอ่อนคู่ที่ 2 กับคู่ที่ 3 และลำต้นส่วนปล้องที่ 2 กับปล้องที่ 3 จากยอด (ภาพประกอบ 1) มาล้างด้วยผงซักฟอกให้สะอาด ทิ้งให้แห้ง นำไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซนต์ เขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซนต์ เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง




ภาพประกอบ 1 A ใบอ่อนคู่ที่ 2

B ใบอ่อนคู่ที่ 3

C ลำต้นปล้องที่ 2

D ลำต้นปล้องที่ 3

1.2 นำใบอ่อนที่ทำความสะอาดแล้วมาตัดออกเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5 × 5 ตารางมิลลิเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงจำนวน 9 สูตร (ตาราง 1) โดยนำชิ้นส่วนแต่ละชิ้นชิ้นวางลงบนอาหาร สูตรละ 5 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้น

1.3 นำลำต้นที่ทำความสะอาดแล้วมาตัดเป็นชิ้นยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงจำนวน 9 สูตร (ตาราง 1) โดยนำชิ้นส่วนแต่ละชิ้นวางลงบนอาหาร สูตรละ 5 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้น

1.4 นำขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงในที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ วันละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่

1.5 เก็บรวบรวมข้อมูลโดยบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วน เช่น สีและและสีของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 แล้วบันทึกภาพในสัปดาห์ที่ 4

ตาราง 1 ปริมาณ NAA และ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่เติมลงในอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง จำนวน 9 สูตร

| สูตรที่ | ชื่อสูตรอาหาร | NAA (N) | 2,4-D (D) |
|---|---|---|---|
| 1 | MS | - | - |
| 2 | $MSN_{0.1}$ | 0.1 | |
| 3 | $MSN_{1.0}$ | 1.0 | - |
| 4 | $MSN_{2.0}$ | 2.0 | - |
| 5 | $MSN_{3.0}$ | 3.0 | - |
| 6 | $MSD_{0.1}$ | - | 0.1 |
| 7 | $MSD_{1.0}$ | - | 1.0 |
| 8 | $MSD_{2.0}$ | - | 2.0 |
| 9 | $MSD_{3.0}$ | - | 3.0 |

2. การเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม

2.1 นำแคลลัสที่เกิดขึ้นจากส่วนของใบและลำต้นจากสูตรที่เหมาะสมในการทดลองที่ 1 มาตัดเป็นชิ้นมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1 กรัม นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 24 สูตร (ตาราง 2) โดยใช้ 1 ชิ้น ต่อ 1 ขวด ทำการทดลองสูตรละ 5 ขวด

2.2 นำขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนของแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ วันละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่

2.3 เก็บรวบรวมข้อมูลโดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์

2.3.1 บันทึกลักษณะและสีของแคลลัส

2.3.2 บันทึกน้ำหนักของแคลลัส

2.3.3 บันทึกภาพแคลลัส

ตาราง 2 ปริมาณ NAA, 2,4-D และ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง จำนวน 24 สูตร

| สูตรที่ | ชื่อสูตรอาหาร | NAA (N) | 2,4-D (D) | BA (B) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | $MSN_{0.1}B_{0.1}$ | 0.1 | - | 0.1 |
| 2 | $MSN_{0.1}B_{1.0}$ | 0.1 | - | 1.0 |
| 3 | $MSN_{0.1}B_{2.0}$ | 0.1 | - | 2.0 |
| 4 | $MSN_{1.0}B_{0.1}$ | 1.0 | - | 0.1 |
| 5 | $MSN_{1.0}B_{1.0}$ | 1.0 | - | 1.0 |
| 6 | $MSN_{1.0}B_{2.0}$ | 1.0 | - | 2.0 |

ตาราง 2 (ต่อ)

| สูตรที่ | ชื่อสูตรอาหาร | NAA (N) | 2,4-D (D) | BA (B) |
|---|---|---|---|---|
| 7 | $MSN_{2.0}B_{0.1}$ | 2.0 | - | 0.1 |
| 8 | $MSN_{2.0}B_{1.0}$ | 2.0 | - | 1.0 |
| 9 | $MSN_{2.0}B_{2.0}$ | 2.0 | - | 2.0 |
| 10 | $MSN_{3.0}B_{0.1}$ | 3.0 | - | 0.1 |
| 11 | $MSN_{3.0}B_{1.0}$ | 3.0 | - | 1.0 |
| 12 | $MSN_{3.0}B_{2.0}$ | 3.0 | - | 2.0 |
| 13 | $MSD_{0\ 1}B_{0.1}$ | - | 0.1 | 0.1 |
| 14 | $MSD_{0.1}B_{1.0}$ | - | 0.1 | 1.0 |
| 15 | $MSD_{0.1}B_{2.0}$ | - | 0.1 | 2.0 |
| 16 | $MSD_{1.0}B_{0.1}$ | - | 1.0 | 0.1 |
| 17 | $MSD_{1.0}B_{1.0}$ | - | 1.0 | 1.0 |
| 18 | $MSD_{1.0}B_{2.0}$ | - | 1.0 | 2.0 |
| 19 | $MSD_{2.0}B_{0.1}$ | - | 2.0 | 0.1 |
| 20 | $MSD_{2.0}B_{1.0}$ | - | 2.0 | 1.0 |
| 21 | $MSD_{2.0}B_{2.0}$ | - | 2.0 | 2.0 |
| 22 | $MSD_{3.0}B_{0.1}$ | - | 3.0 | 0.1 |
| 23 | $MSD_{3.0}B_{1.0}$ | - | 3.0 | 1 0 |
| 24 | $MSD_{3.0}B_{2.0}$ | - | 3.0 | 2.0 |

3. การเพิ่มปริมาณแคลลัสเพื่อการสกัดสารอัลคาลอยด์

3.1 นำแคลลัสจากสูตรอาหารที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2 มาตัดแบ่งแคลลัสมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1 กรัม นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมใช้ 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด

3.2 นำขวดอาหารที่มีชิ้นส่วนของแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ วันละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.3 นำแคลลัสที่ได้มาชั่งหาน้ำหนักและอบให้แห้งเพื่อใช้ในการสกัดสารอัลคาลอยด์

4. การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและหญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกตามธรรมชาติ

วิธีการสกัดสารอัลคาลอยด์มีขั้นตอนดังนี้

4.1 การเตรียมสิ่งที่จะนำมาสกัด โดยนำแคลลัสใบ แคลลัสลำต้น ใบธรรมชาติ และลำต้นธรรมชาติมาอบแห้งแล้วบดให้ละเอียด

4.2 นำแคลลัสใบที่บดละเอียดหนัก 10 กรัม ไปสกัดในเครื่องสกัดซอกซ์เลต (soxhlet) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายที่ได้ไประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) จะได้สิ่งสกัด ละลายสิ่งสกัดด้วยกรดซัลฟูริก ($H_2SO_4$) เจือจาง 2 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร เพื่อสกัดสารประกอบที่ไม่ใช่สารอัลคาลอยด์ออก นำชั้นน้ำไปปรับ pH เท่ากับ 2 ด้วยกรดซัลฟูริก แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ปล่อยให้สารละลายเย็น ปรับสารละลายให้เป็นเบสด้วยโซเดียมไฮโดรเจน คาร์บอเนต ($NaHCO_3$) แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดไปล้างด้วยน้ำ นำชั้นคลอโรฟอร์มมาเติมโซเดียมซัลเฟต ($Na_2SO_4$) เพื่อดูดซับน้ำส่วนที่เหลือ นำสารละลายมากรองแล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไประเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด จะได้สารอัลคาลอยด์มีลักษณะเหนียวข้น (ภาพประกอบ 1 ภาคผนวก) ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

4.3 นำแคลลัสลำต้นพืชละเอียดหนัก 10 กรัม ไปสกัดสารอัลคาลอยด์ตามวิธีสกัดในข้อ 4.2

4.4 นำใบพืชละเอียดหนัก 10 กรัม ไปสกัดสารอัลคาลอยด์ตามวิธีสกัดในข้อ 4.2

4.5 นำลำต้นพืชละเอียดหนัก 10 กรัม ไปสกัดสารอัลคาลอยด์ตามวิธีสกัดในข้อ 4.2

การทดสอบสารอัลคาลอยด์

1. การเตรียมสารที่ใช้ทดสอบสารอัลคาลอยด์

1.1 ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ (Dragendorff's reagent) มีวิธีเตรียมสารละลายดังนี้

1.1.1 ชั่งบิสมัท ซับไนเตรท (bismuth subnitrate) 4 กรัม ละลายในสารละลายกรดไนตริก (30% W/V) 6 มิลลิลิตร

1.1.2 ชั่งโปตัสเซียม ไอโอไดด์ (potassium iodide) 6.8 กรัม ละลายในน้ำ 25 มิลลิลิตร

นำสารทั้ง 2 ชนิดผสมเข้าด้วยกัน เติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะให้ตะกอนสีส้มกับสารอัลคาลอยด์

1.2 เมเยอร์ รีเอเจนต์ (Mayer's reagent) มีวิธีเตรียมสารละลายดังนี้

1.2.1 ชั่งเมอร์คิวริก คลอไรท์ (mercuric chloride) 0.68 กรัม ละลายในน้ำ 30 มิลลิลิตร

1.2.2 ชั่งโปตัสเซียม ไอโอไดด์ 2.5 กรัม ละลายในน้ำ 5 มิลลิลิตร

นำสารทั้ง 2 ชนิดผสมเข้าด้วยกัน เติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะให้ตะกอนสีขาวขุ่นกับสารอัลคาลอยด์

2. วิธีการทดสอบสารอัลคาลอยด์

นำสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้ปริมาณเล็กน้อยละลายในเอทานอล 2 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลายที่ใช้ทดสอบลงไป 2 – 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีของตะกอนที่เกิดขึ้น

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ชั่งน้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากการสกัด

2. วิเคราะห์ข้อมูล ความแตกต่างของปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบและในธรรมชาติ โดยใช้สถิติ t-test (two-sample t-test)

3. วิเคราะห์ข้อมูล ความแตกต่างของปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสลำต้น และลำต้นธรรมชาติ โดยใช้ t-test เช่นเดียวกับข้อ 2 (ภาคผนวก)

# บทที่ 4

## ผลการศึกษาค้นคว้า

### การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาเพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส

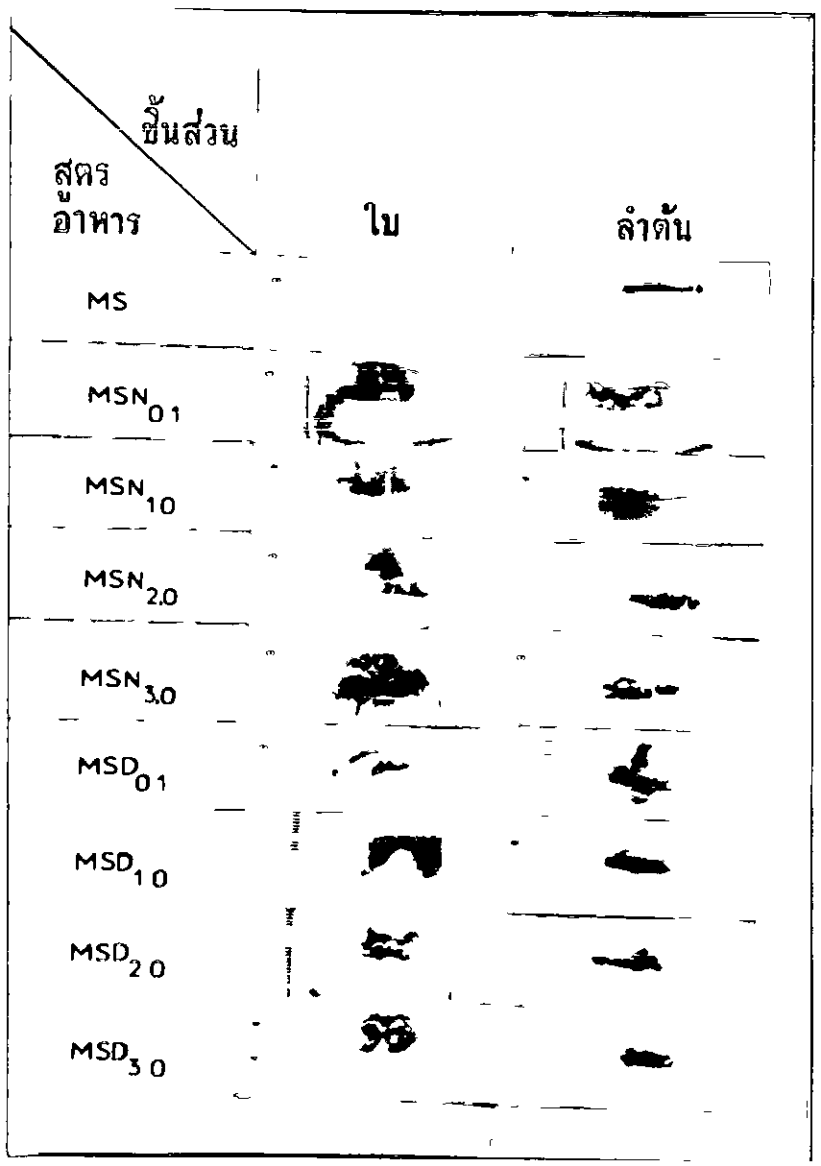
#### การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ

จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ พบว่า ในอาหารสูตร MS ใบไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ ส่วนในอาหารสูตร MS ดัดแปลงทุกสูตรใบสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ แคลลัสทั้งหมดเจริญจากรอยตัดทั้ง 4 ด้านของส่วนใบ โดยในช่วงระยะเวลา 2 สัปดาห์แรกใบจะขยายขนาดใหญ่และมีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย ในสัปดาห์ที่ 4 แคลลัสมีการเจริญเติบโตมากขึ้น อาหารสูตร MS ที่เติม NAA แคลลัสส่วนใหญ่มีลักษณะค่อนข้างอัดแน่น มีสีเขียวปนน้ำตาล และมีรากเจริญขึ้นจำนวนมาก ส่วนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D แคลลัสส่วนใหญ่มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ มีสีน้ำตาล ยกเว้นในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้นที่แคลลัสมีลักษณะค่อนข้างอัดแน่น มีสีเขียวจางไม่มีรากเกิดขึ้น (ตาราง 3 และภาพประกอบ 2) สูตรอาหารที่ชักนำให้เจริญเป็นแคลลัสมากที่สุด คือ MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1มิลลิกรัมต่อลิตร

#### การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้น

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้น พบว่า ในอาหารสูตร MS ลำต้นไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ แต่มีรากเกิดขึ้น ส่วนในอาหารสูตร MS ดัดแปลงทุกสูตรลำต้นสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ โดยในช่วงระยะเวลา 2 สัปดาห์แรก ลำต้นจะขยายขนาดใหญ่และเกิดแคลลัสขึ้นตรงบริเวณรอยตัดทั้งสองด้านของลำต้นเล็กน้อย ในสัปดาห์ที่ 4 แคลลัสมีการเจริญเติบโตขึ้น อาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA แคลลัสส่วนใหญ่มีลักษณะค่อนข้างอัดแน่น มีสีเขียวปนน้ำตาล และมีรากเจริญขึ้นจำนวนมาก ส่วนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D แคลลัสส่วนใหญ่มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ มีสีน้ำตาล ยกเว้นในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D

ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีลักษณะค่อนข้างแน่น มีสีเขียวจาง ไม่มีรากเกิดขึ้น สูตรอาหารที่ชักนำให้เจริญเป็นแคลลัสมากที่สุด คือ MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตาราง 3 และภาพประกอบ 2)




ภาพประกอบ 2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนในและลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 3 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบ และลำต้นบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา (สัปดาห์) | ชิ้นส่วน | |
|---|---|---|---|
| | | ใบ | ลำต้น |
| 1. MS | 2 | ใบมีสีเขียว | ลำต้นมีสีเขียว บริเวณรอยตัดขยายขนาดขึ้นเล็กน้อย มีปมรากเกิดขึ้น 2 – 4 ปม |
| | 4 | ใบมีสีเขียวอ่อนลง ขอบใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล | ลำต้นมีสีเขียวเหมือนเดิม รากเจริญยาวขึ้น |
| 2. $MSN_{0.1}$ | 2 | ใบขยายขนาดขึ้นและมีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย รากเกิดขึ้นจำนวนมาก มีลักษณะเป็นกระจุก เส้นสั้น ๆ | บริเวณรอยตัดขยายขนาดมีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย มีปมรากเกิดขึ้นเล็กน้อย |
| | 4 | แคลลัสเจริญมากกว่าเดิมเล็กน้อย มีลักษณะอัดแน่น มีสีเขียวปนน้ำตาล และรากเจริญยาวขึ้นมาก | แคลลัสเจริญมากกว่าเดิมเล็กน้อย มีลักษณะอัดแน่น มีสีเขียวปนน้ำตาล รากเจริญยาวขึ้น |
| 3. $MSN_{1.0}$ | 2 | ใบขยายขนาดขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย มีลักษณะอัดแน่น และรากเกิดขึ้นจำนวนมาก มีลักษณะเป็นกระจุกเส้นสั้น ๆ | ลำต้นขยายขนาดขึ้น เกิดแคลลัสรอบบริเวณรอยตัดเล็กน้อย มีปมรากเกิดขึ้นจำนวนมาก |

ห้องสมุดบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



ตาราง 3 (ต่อ)

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา (สัปดาห์) | ชิ้นส่วน | |
|---|---|---|---|
| | | ใบ | ลำต้น |
| | 4 | แคลลัสเจริญมากขึ้น มีลักษณะอัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาลอ่อน รากเจริญมากขึ้น | แคลลัสเจริญมากกว่าเดิม เล็กน้อย สีเขียวปนน้ำตาล มีรากเจริญจำนวนมาก มีลักษณะเป็นเส้นสั้น ๆ และเป็นกระจุก |
| 4 $MSN_{2.0}$ | 2 | ใบขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย | ลำต้นขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นรอบรอยตัดเล็กน้อย |
| | 4 | แคลลัสเจริญมากขึ้น มีลักษณะอัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล มีรากเกิดขึ้นจำนวนมาก มีลักษณะเป็นเส้นสั้น ๆ | แคลลัสเจริญมากขึ้น มีลักษณะอัดแน่น สีเขียวจางปนน้ำตาล มีรากเกิดขึ้นจำนวนมาก มีลักษณะเป็นเส้นสั้น ๆ |
| 5. $MSN_{3.0}$ | 2 | ใบขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย มีรากเกิดขึ้นจำนวนมาก มีลักษณะเป็นเส้นสั้น ๆ | ลำต้นขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นรอยรอยตัดเล็กน้อย มีรากเกิดขึ้นจำนวนมากเป็นกระจุกเส้นสั้น ๆ |

178391

ตาราง 3 (ต่อ)

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา | ชิ้นส่วน | |
|---|---|---|---|
| | | ใบ | ลำต้น |
| | 4 | แคลลัสเจริญมากขึ้น มีลักษณะอัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล รากเจริญยาวมากขึ้น | แคลลัสเจริญมากขึ้น มีลักษณะอัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล รากเจริญยาวขึ้น |
| 6 $MSD_{0.1}$ | 2 | ใบขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย | ลำต้นขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นรอบรอยตัดเล็กน้อย |
| | 4 | แคลลัสเจริญมากขึ้น มีลักษณะอัดแน่นสีเขียวจาง ไม่มีรากเกิดขึ้น | แคลลัสเจริญมากขึ้น มีลักษณะอัดแน่นสีเขียวจาง ไม่มีรากเกิดขึ้น |
| 7. $MSD_{1.0}$ | 2 | ใบขยายขนาดขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย | ลำต้นขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย |
| | 4 | แคลลัสเจริญขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย มีลักษณะหลวม มีสีน้ำตาลปนขาว ไม่มีรากเกิดขึ้น | แคลลัสเจริญขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย มีลักษณะหลวม สีน้ำตาล ไม่มีรากเกิดขึ้น |
| 8. $MSD_{2.0}$ | 2 | ใบขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย | ลำต้นขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย |

ตาราง 3 (ต่อ)

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา (สัปดาห์) | ชิ้นส่วน | |
|---|---|---|---|
| | | ใบ | ลำต้น |
| 9 $MSD_{30}$ | 4 | แคลลัสเจริญขึ้นกว่าเดิม เล็กน้อย มีลักษณะหลวม สีเขียวจางปนน้ำตาล ไม่มีรากเกิดขึ้น | แคลลัสเจริญขึ้นกว่าเดิม เล็กน้อย มีลักษณะหลวม สีน้ำตาล ไม่มีรากเกิดขึ้น |
| | 2 | ใบขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย | ลำต้นขยายขนาดขึ้น มีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอบรอยตัด เล็กน้อย |
| | 4 | แคลลัสเจริญขึ้นกว่าเดิม เล็กน้อย มีลักษณะหลวม สีน้ำตาล ไม่มีรากเกิดขึ้น | แคลลัสเจริญกว่าเดิมเล็กน้อย มีลักษณะหลวม สีน้ำตาล ไม่มีรากเกิดขึ้น |

## การเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม

### การเพาะเลี้ยงแคลลัสใบ

การทดลองนำแคลลัสที่เจริญขึ้นจากการเพาะเลี้ยงส่วนใบบนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ซึ่งเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์ ลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA, 2,4-D และ BA ในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 5

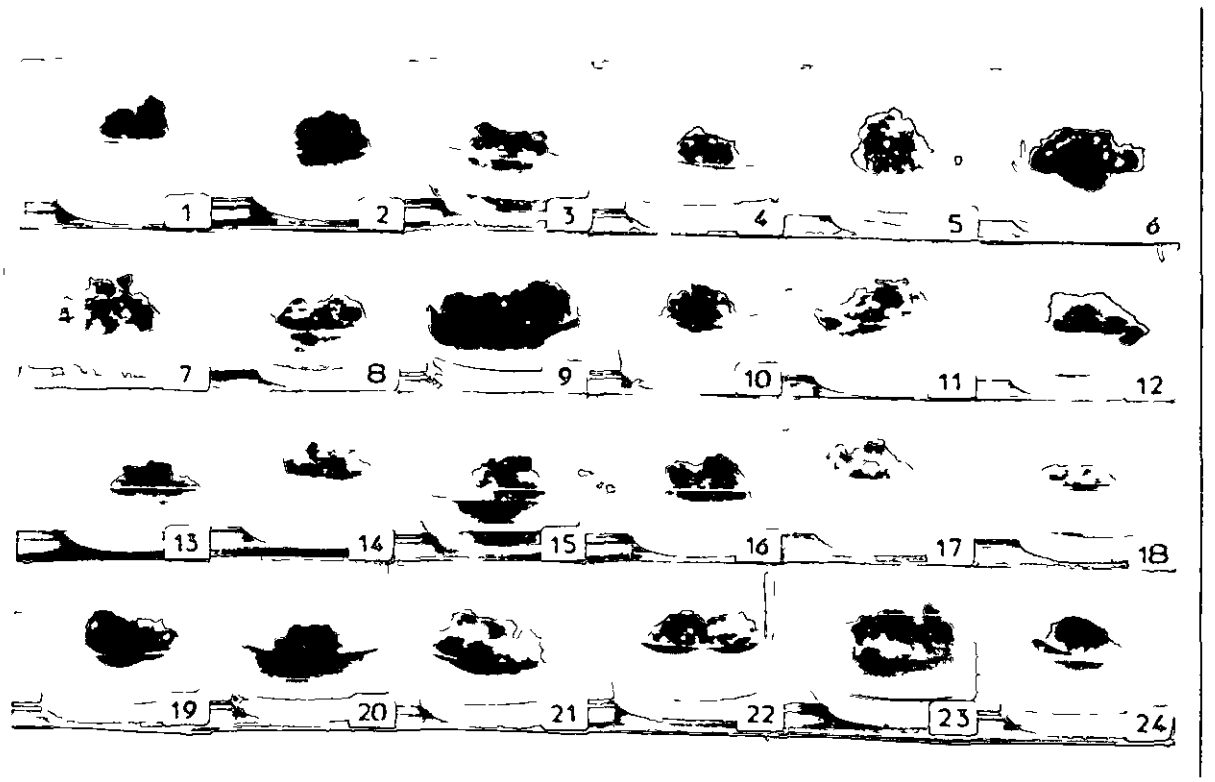
คือ MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด คือ 7.06 กรัม เมื่อถูกน้ำหนักสดเป็นค่าเฉลี่ยจาก 5 ซาก แคลลัสที่ได้มีลักษณะอัดแน่นสีเขียวเข้ม นอกจากนั้นยังพบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1, 1.0, 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 10, 11 และ 12) มีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยลดลง และสำหรับอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ทุกระดับความเข้มข้น (สูตรที่ 13 - 24) พบว่า มีการเจริญเติบโตของแคลลัสเพียงเล็กน้อย และมีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.22 - 1.98 กรัมเท่านั้น (ตาราง 4 และภาพประกอบ 3, 4) จากการสังเกตพบว่า แคลลัสที่ไม่มีการเจริญเติบโตขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

ตาราง 4 ลักษณะของการเจริญเติบโต สี และน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นจากแคลลัสใบ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

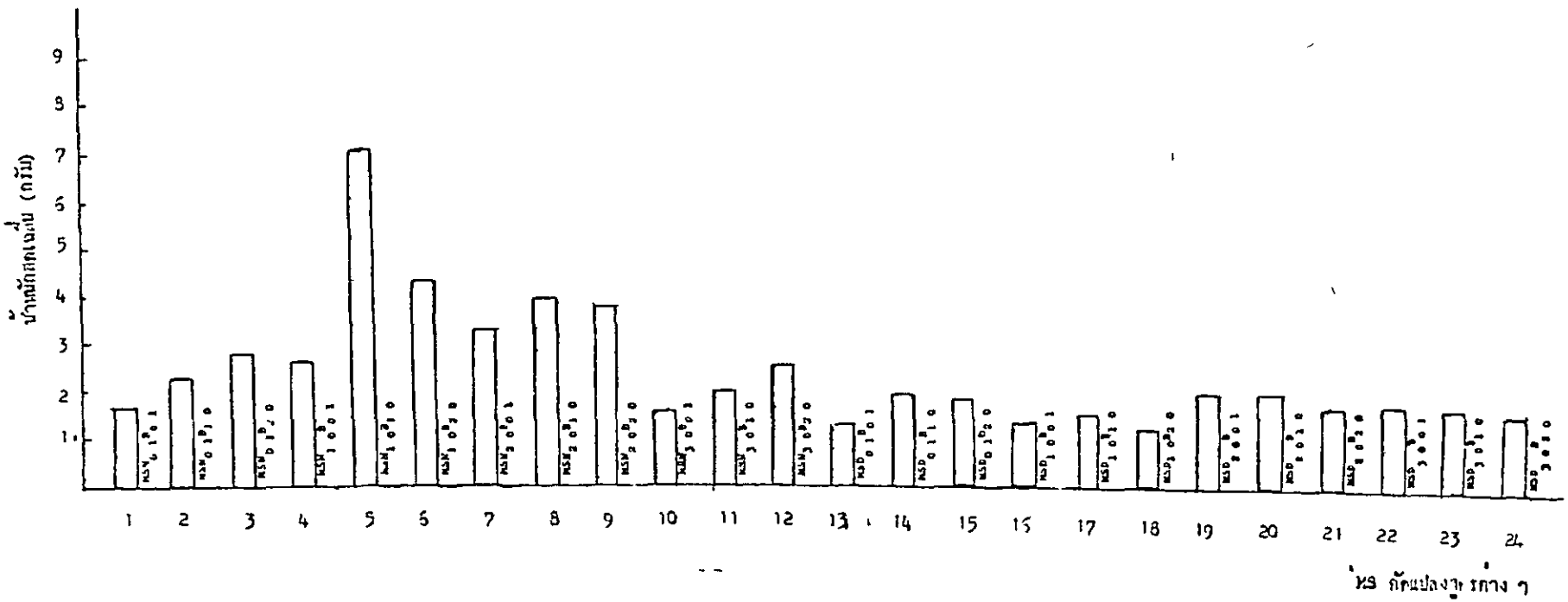
| สูตรอาหาร | ลักษณะของการเจริญเติบโตของแคลลัส | น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) |
|---|---|---|
| 1. $MSN_{0.1}B_{0.1}$ | อัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล | 1.71 |
| 2. $MSN_{0.1}B_{1.0}$ | อัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล | 2.38 |
| 3. $MSN_{0.1}B_{2.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 2.88 |
| 4. $MSN_{1.0}B_{0.1}$ | อัดแน่น สีเขียวจางปนน้ำตาล | 2.67 |
| 5. $MSN_{1.0}B_{1.0}$ | อัดแน่น สีเขียวเข้ม | 7.06 |
| 6. $MSN_{1.0}B_{2.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 4.38 |
| 7. $MSN_{2.0}B_{0.1}$ | อัดแน่น สีเขียวจางปนน้ำตาล | 3.34 |
| 8. $MSN_{2.0}B_{1.0}$ | อัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล | 3.92 |
| 9. $MSN_{2.0}B_{2.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวปนน้ำตาล | 3.72 |

ตาราง 4 (ต่อ)

| สูตรอาหาร | ลักษณะของการเจริญเติบโตของแคลลัส | น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) |
|---|---|---|
| 10. $MSN_{3.0}B_{0\ 1}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวปนน้ำตาล | 1.68 |
| 11. $MSN_{3.0}B_{1.0}$ | อัดแน่น สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1.99 |
| 12. $MSN_{3.0}B_{2\ 0}$ | อัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล | 2.57 |
| 13. $MSD_{0.1}B_{0.1}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีน้ำตาล | 1.29 |
| 14. $MSD_{0.1}B_{1\ 0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวปนน้ำตาล | 1.99 |
| 15. $MSD_{0.1}B_{2\ 0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1 87 |
| 16. $MSD_{1.0}B_{0.1}$ | อัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล | 1.38 |
| 17. $MSD_{1.0}B_{1\ 0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1.58 |
| 18. $MSD_{1.0}B_{2.0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1.22 |
| 19. $MSD_{2.0}B_{0\ 1}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1.94 |
| 20. $MSD_{2.0}B_{1\ 0}$ | เกาะตัวอย่างหลวม ๆ สีเขียวปนน้ำตาล | 1.98 |
| 21. $MSD_{2.0}B_{2.0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1.73 |
| 22. $MSD_{3.0}B_{0.1}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1.87 |
| 23. $MSD_{3.0}B_{1.0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1.72 |
| 24. $MSD_{3.0}B_{2\ 0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1.62 |




ภาพประกอบ 3 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสใบ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์




ภาพประกอบ 4 น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสในเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA 2,4-D และ BA ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงแคลลัสลำต้น

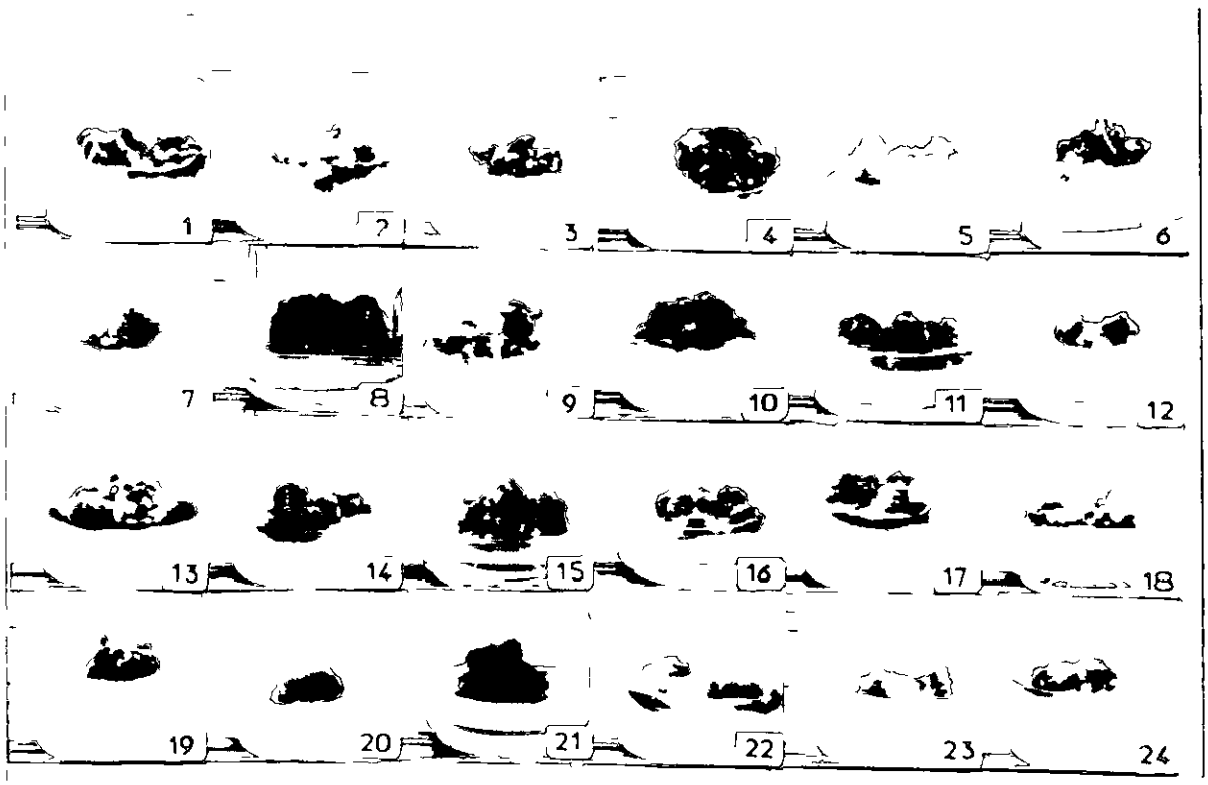
การทดลองนำแคลลัสที่เจริญขึ้นจากการเพาะเลี้ยงส่วนลำต้นบนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ซึ่งเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA, 2,4-D และ BA ในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 9 คือ MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด คือ 6 85 กรัม เมื่อคิดน้ำหนักสดเป็นค่าเฉลี่ยจาก 5 ขวด แคลลัสที่ได้มีลักษณะอัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่มีสีเขียว สำหรับอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ทุกระดับความเข้มข้น (สูตรที่ 13 - 20) แคลลัสที่ได้มีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.21 - 2.12 กรัมเท่านั้น แม้ว่าจะมีการเจริญของแคลลัสขนาดใหญ่ ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ (ตาราง 5 และภาพประกอบ 5, 6) ส่วนแคลลัสที่ไม่มีการเจริญเติบโตขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

ตาราง 5 ลักษณะของการเจริญเติบโต สี และน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นจากแคลลัสลำต้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

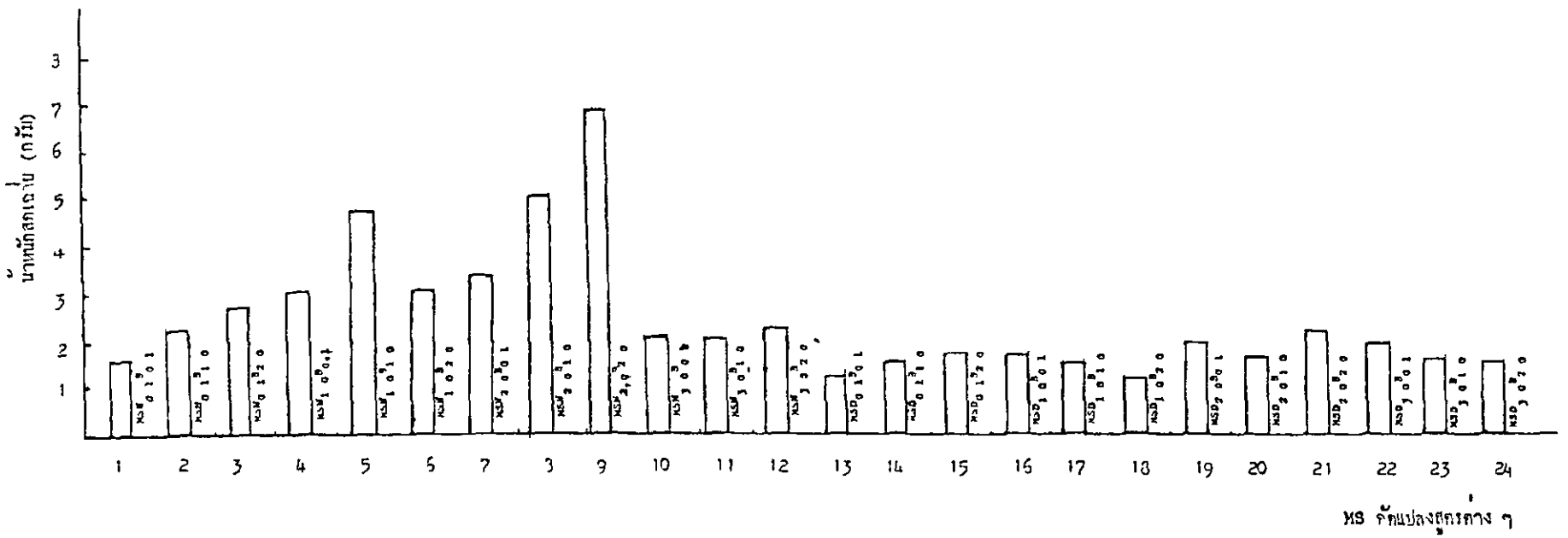
| สูตรอาหาร | ลักษณะของการเจริญเติบโตของแคลลัส | น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) |
|---|---|---|
| 1 $MSN_{0.1}B_{0.1}$ | อัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล | 1.67 |
| 2. $MSN_{0.1}B_{1.0}$ | อัดแน่น สีเขียวจางปนน้ำตาล | 2.22 |
| 3. $MSN_{0.1}B_{2.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 2.74 |
| 4. $MSN_{1.0}B_{0.1}$ | อัดแน่น สีเขียวจางปนน้ำตาล | 2 99 |
| 5. $MSN_{1.0}B_{1.0}$ | อัดแน่น สีเขียวปนน้ำตาล | 4.69 |
| 6. $MSN_{1.0}B_{2.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 2 90 |

ตาราง 5 (ต่อ)

| สูตรอาหาร | ลักษณะของการเจริญเติบโตของแคลลัส | น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) |
|---|---|---|
| 7 $MSN_{2.0}B_{0.1}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 3.36 |
| 8. $MSN_{2.0}B_{1.0}$ | อัดแน่น สีเขียว | 5.09 |
| 9. $MSN_{2.0}B_{2.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียว | 6.85 |
| 10. $MSN_{3.0}B_{0.1}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 2.08 |
| 11. $MSN_{3.0}B_{1.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1 98 |
| 12. $MSN_{3.0}B_{2.0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวปนน้ำตาล | 2.24 |
| 13. $MSD_{0.1}B_{0\ 1}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีน้ำตาลปนขาว | 1.21 |
| 14. $MSD_{0.1}B_{1.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีน้ำตาลอ่อน | 1.55 |
| 15 $MSD_{0.1}B_{2.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 1.78 |
| 16 $MSD_{1\ 0}B_{0\ 1}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีน้ำตาลปนขาว | 1.71 |
| 17. $MSD_{1\ 0}B_{1.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีน้ำตาลอ่อนปนขาว | 1.61 |
| 18. $MSD_{1\ 0}B_{2.0}$ | อัดแน่นและหลวมรวมกันอยู่ สีน้ำตาลอ่อนปนขาว | 1.26 |
| 19. $MSD_{2.0}B_{0.1}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีน้ำตาลปนขาว | 1 92 |
| 20. $MSD_{2.0}B_{1\ 0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีน้ำตาลปนขาว | 1.77 |
| 21. $MSD_{2.0}B_{2.0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวจางปนน้ำตาล | 2 12 |
| 22. $MSD_{3.0}B_{0.1}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีน้ำตาลอ่อนปนขาว | 1.90 |
| 23. $MSD_{3.0}B_{1.0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีน้ำตาลอ่อนปนขาว | 1 61 |
| 24. $MSD_{3\ 0}B_{2\ 0}$ | เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีน้ำตาลปนขาว | 1.54 |




ภาพประกอบ 5 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสลำต้น เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์




ภาพประกอบ 6 น้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA 2,4-D และ BA ในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

**การเพิ่มปริมาณแคลลัสเพื่อการสกัดสารอัลคาลอยด์**

นำแคลลัสใบที่ได้คัดเลือกจากอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะได้น้ำหนักสดเฉลี่ย / 06 กรัมต่อขวด และเมื่อนำแคลลัสไปอบแห้งแล้ว น้ำหนักลดลงประมาณ 5 เท่าของน้ำหนักสดเฉลี่ย คือ ได้น้ำหนักแห้งประมาณ 1.412 กรัมต่อขวด ส่วนแคลลัสลำต้นที่ได้คัดเลือกจากอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะได้น้ำหนักสดเฉลี่ย 6.85 กรัมต่อขวด และเมื่อนำแคลลัสไปอบแห้งแล้วน้ำหนักลดลงประมาณ 4.5 เท่าของน้ำหนักสดเฉลี่ย คือ ได้น้ำหนักแห้งประมาณ 1.52 กรัมต่อขวด

**การหาปริมาณและการทดสอบสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและหญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกตามธรรมชาติ**

การทดสอบสารที่สกัดได้จากหญ้าเกล็ดปลาส่วนใบ ส่วนลำต้น แคลลัสใบและแคลลัสลำต้น ผลปรากฏว่า สารที่สกัดได้จาก 4 ส่วน เมื่อหยดดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ ลงในสารละลายเกิดตะกอนสีส้ม และเมื่อหยดเมเยอร์ รีเอเจนต์ ลงในสารละลายเกิดตะกอนสีขาวขุ่นแสดงว่าสารที่สกัดได้จาก 4 ส่วนนั้น เป็นสารอัลคาลอยด์ (ตาราง 6)

ตาราง 6 ผลการทดสอบสารที่สกัดได้จากหญ้าเกล็ดปลาส่วนใบ ส่วนลำต้น แคลลัสใบ และแคลลัสลำต้น

| สารที่สกัดจาก | ผลของการทดสอบ | |
|---|---|---|
| | ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ | เมเยอร์ รีเอเจนต์ |
| 1. ส่วนใบ | เกิดตะกอนสีส้ม | เกิดตะกอนสีขาวขุ่น |
| 2. ส่วนลำต้น | เกิดตะกอนสีส้ม | เกิดตะกอนสีขาวขุ่น |
| 3. แคลลัสใบ | เกิดตะกอนสีส้ม | เกิดตะกอนสีขาวขุ่น |
| 4. แคลลัสลำต้น | เกิดตะกอนสีส้ม | เกิดตะกอนสีขาวขุ่น |

การนำหญ้าเกล็ดปลาส่วนใบ ส่วนลำต้น แคลลัสใบ และแคลลัสลำต้น ไปสกัดสารอัลคาลอยด์ ซึ่งทำการทดลองซ้ำส่วนละ 5 ครั้ง ได้ชั่งน้ำหนักสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้หาน้ำหนักเฉลี่ย และเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้สถิติ t-test (ตาราง 7, 8, 9 และ 10)

ตาราง 7 น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสใบและใบธรรมชาติ

| ครั้งที่ | น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ (กรัม) | |
|---|---|---|
| | แคลลัสใบ | ใบธรรมชาติ |
| 1 | 0.06 | 0.04 |
| 2 | 0.10 | 0.03 |
| 3 | 0.07 | 0.02 |
| 4 | 0.08 | 0.05 |
| 5 | 0.09 | 0.04 |

ตาราง 8 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบและใบธรรมชาติ

| กลุ่มตัวอย่าง | n | $\bar{X}$ | S | t |
|---|---|---|---|---|
| แคลลัสใบ | 5 | 0.076 | 0.0152 | 4.4722 |
| ใบธรรมชาติ | 5 | 0.036 | 0.013 | |

$$t_{(8,\ 0.001_{(2)})} = 3.355$$

จากตาราง 7 และ 8 จะเห็นว่า น้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบมากกว่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้สถิติ t-test แสดงว่า ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบมากกว่าปริมาณสารอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตาราง 9 น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสลำต้นและลำต้นธรรมชาติ

| ครั้งที่ | น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ (กรัม) | |
|---|---|---|
| | แคลลัสลำต้น | ลำต้นธรรมชาติ |
| 1 | 0.09 | 0.02 |
| 2 | 0.10 | 0 04 |
| 3 | 0.07 | 0.05 |
| 4 | 0.05 | 0.03 |
| 5 | 0 06 | 0.03 |

ตาราง 10 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสลำต้นและลำต้นธรรมชาติ

| กลุ่มตัวอย่าง | n | $\bar{X}$ | S | t |
|---|---|---|---|---|
| แคลลัสลำต้น | 5 | 0 074 | 0.02074 | 3.7797 |
| ลำต้น | 5 | 0.034 | 0.0114 | |

$$t_{(8,\ 0\ 01_{(2)})} = 3.355$$

จากตาราง 9 และ 10 จะเห็นได้ว่า น้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสลำต้นมากกว่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากลำต้นธรรมชาติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้สถิติ t-test แสดงว่า ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสลำต้นมากกว่าปริมาณสารอัลคาลอยด์จากลำต้นธรรมชาติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

# บทที่ 5

## สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

### จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้าเกล็ดปลาจากส่วนใบ และลำต้นบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง

2. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เหมาะสมต่อการเกิดแกลลัสได้ดี และมีน้ำหนักมากที่สุด

3. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับหญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกธรรมชาติ

### วิธีการดำเนินการศึกษาค้นคว้า

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลา เพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส โดยนำส่วนของใบคู่ที่ 2 กับคู่ที่ 3 และลำต้นปล้องที่ 2 และปล้องที่ 3 จากยอดมาล้างด้วยผงซักฟอกให้สะอาดทิ้งให้แห้ง นำมาฟอกฆ่าเชื้อโดยนำใบและลำต้น แช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 นาที แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซนต์ เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แช่ให้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซนต์ เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำใบอ่อนมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมประมาณ 5 × 5 ตารางมิลลิเมตร และนำลำต้นมาตัดเป็นชิ้นยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS, MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน ภายในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์วันละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่

2. การเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยนำแคลลัสที่เกิดขึ้นจากส่วนของใบและลำต้นจากสูตรอาหารที่เหมาะสมในการทดลองที่ 1 มาตัดเป็นชิ้น

มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1 กรัม นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA, 2 4-D และ BA ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน ทั้งหมด 24 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3 การเพิ่มปริมาณแคลลัสเพื่อการสกัดอัลคาลอยด์ โดยนำแคลลัสจากสูตรที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2 มาตัดแบ่งให้มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1 กรัม นำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์

4. การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและหญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกตามธรรมชาติ โดยนำแคลลัสใบ แคลลัสลำต้น และหญ้าเกล็ดปลาส่วนใบ และลำต้น ไปสกัดหาปริมาณสารอัลคาลอยด์ และเปรียบเทียบปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ และจากแคลลัสลำต้นกับลำต้นธรรมชาติ

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. บรรยายลักษณะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช
2. หาค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสม
3. หาค่าเฉลี่ยน้ำหนักสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากการสกัด
4. วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณสารอัลคาลอยด์จาก
   4.1 แคลลัสใบและใบธรรมชาติ โดยใช้สถิติ t-test
   4.2 แคลลัสลำต้นและลำต้นธรรมชาติ โดยใช้สถิติ t-test

สรุปและอภิปรายผล

การชักนำให้ชิ้นส่วนเจริญเป็นแคลลัส

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นของหญ้าเกล็ดปลา บนอาหารสูตร MS ใบและลำต้นไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ ส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงทุกสูตร ใบและลำต้นสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ สำหรับอาหารสูตรที่ชักนำให้ชิ้นส่วนของใบและลำต้นเจริญเป็นแคลลัสได้มากที่สุดเป็นสูตรเดียวกัน คือ MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นบนอาหารสูตร MS

ดัดแปลงที่เติม NAA หรือ 2,4-D พบว่า สามารถชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสขึ้นได้ตามรอยตัด เมื่อถูกกระตุ้นโดย NAA และ 2,4-D ซึ่งเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มออกซิน เซลล์บริเวณรอยตัดของใบและลำต้นจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนได้แคลลัสซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นนี้สอดคล้องกับรายงานของ สตรีท (Street. 1977 271) ที่ได้อธิบายว่า บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืชจะสร้างสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นสารที่ชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ขึ้น การแบ่งเซลล์จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องได้โดยมีสารเร่งการเจริญเติบโตมาช่วยส่งเสริมการทำงานจนกระทั่งได้เป็นแคลลัส ฉะนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นของหญ้าเกล็ดปลาสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ เพราะสารเร่งการเจริญเติบโตบริเวณรอยแผลที่ถูกตัด และจากการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต คือ NAA หรือ 2,4-D ลงไป การทดลองนี้พบว่า อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของใบและลำต้นเจริญเป็นแคลลัสได้ดี แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดหรือรากเลย และสอดคล้องกับรายงานของสตีมาร์ท และคนอื่น ๆ (Stimart and others. 1980 : 313 - 315) ที่ได้รายงานว่า การเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.05 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อมีการสร้างแคลลัสโดยแคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด และ 2,4-D ไม่สามารถกระตุ้นการเกิดยอดและราก

<u>การเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม</u>

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ BA กับอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA จากผลการทดลองปรากฏว่า แคลลัสใบมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 7.06 กรัมต่อขวด เมื่อนำแคลลัสใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสลำต้นมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 6.85 กรัมต่อขวด เมื่อนำแคลลัสลำต้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นการเติม BA ความเข้มข้น 1.0 - 2 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสใบและ

แคลลัสลำต้นได้มากเมื่อใช้ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ถ้าใช้ร่วมกับ 2,4 D ไม่ว่าความเข้มข้นใด (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ก็มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้น้อย และได้น้ำหนักสดเฉลี่ยใกล้เคียงกับการใช้ NAA ความเข้มข้นต่ำและสูง (0.1, 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่ำและสูง (0.1 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนการเติม 2,4-D ร่วมกับ BA มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้โดยการทดลองนี้พบว่า NAA และ BA สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแคลลัสได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสไปเป็นหน่อหรือราก มีแต่การเพิ่มปริมาณแคลลัสไปเรื่อย ๆ ซึ่งตรงกับรายงานของ สกูก และมิลเลอร์ (Skoog and Miller. 1975 116 - 131) ได้รายงานว่า การเกิดเป็นต้น ราก หรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณไซโตไคนิน และออกซินในอาหาร และยังสอดคล้องกับรายงานของ โอคาซาวา และคนอื่น ๆ (Okazawa and others 1966 862 - 869) ที่ได้อธิบายว่า การเสริมปริมาณออกซินจะช่วยกระตุ้นให้เกิดแคลลัสและช่วยให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตอีกด้วย แต่ถ้าต้องการให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตดีกว่าเดิม ควรเติมออกซินและไซโตไคนินลงในอาหาร เนื่องจากไซโตไคนินช่วยส่งเสริมปฏิกิริยาในการทำงานของออกซิน ซึ่งทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญโตดีขึ้น ทำให้แคลลัสเจริญมากขึ้น อัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินในระดับต่าง ๆ ทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อแตกต่างกันออกไป

<u>การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและหน้าเกล็ดปลาที่ปลูกตามธรรมชาติ</u>

เมื่อนำหน้าเกล็ดปลาส่วนใน ส่วนลำต้น แคลลัสใบและแคลลัสลำต้นที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ไปสกัดหาปริมาณสารอัลคาลอยด์ พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบและแคลลัสลำต้นมากกว่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติและลำต้นธรรมชาติตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้สถิติ t-test แสดงว่า ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบมากกว่าปริมาณสารอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ และปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสลำต้นมากกว่าปริมาณสารอัลคาลอยด์จากลำต้นธรรมชาติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์เช่นกัน จากผลการทดลองดังกล่าวได้ว่าสารอัลคาลอยด์

ที่สกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นมีมากกว่าปริมาณสารอัลคาลอยด์จากใบและลำต้นของหญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของฟูรูยา, โยชิกาวา และกิโยฮารา (Furuya, Yoshikana and Kiyohara. 1983 · 1671 - 1673) ซึ่งได้เพาะเลี้ยงแคลลัสลำต้นของ Dioscoreophyllum cumminsii บนอาหารสูตรต่าง ๆ 6 สูตร พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร RT (Revised Tobacco medium) ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดคาสอะมิโน 0.1 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีสารอัลคาลอยด์ 2 ชนิด คือ จาโทรร์ไรซิน (jatrorrhizine) และแมกโนโฟลรีน (magnoflorine) อยู่เป็นจำนวนมาก และอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสนั้นมีมากกว่าอัลคาลอยด์ที่ได้จากพืชที่ปลูกตามธรรมชาติถึง 40 - 100 เท่า

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองอัตราส่วนที่เหมาะสมของออกซินและไซโตไคนินชนิดอื่น ที่กระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ดี และมีน้ำหนักสดมากที่สุด

2. ควรศึกษาชนิดของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสและหญ้าเกล็ดปลาที่ปลูกตามธรรมชาติ

3. ควรศึกษาอิทธิพลของน้ำตาล และค่า pH ที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัส

# บรรณานุกรม

# บรรณานุกรม


ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคนอื่น ๆ สมุนไพร โครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2523, 256 หน้า

เต็ม สมิตินันท์ ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์ - ชื่อพื้นเมือง) พิมพ์ครั้งที่สอง 2523, 379 หน้า

นันทวัน บุณยะประภัศร ก้าวไปกับสมุนไพร ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล มปป., 243 หน้า

นพรัตน์ พัฒนเงิน การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสมุนไพรบางชนิด มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร 2527, 51 หน้า

ไพบูลย์ กวินเสถียรวัฒนา หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ 2524, 133 หน้า

วิเชียร จีรวงส์ และพยอม ตันติวัฒน์ "สมุนไพร" วิทยาศาสตร์ 31(11) : 39, 2520

สุภาพ บุญยะรัตเวช และคนอื่น ๆ "การทดสอบประเภทสารเคมีในพืชสมุนไพรไทย" รายงานผลการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เล่ม 5 2523, 430 หน้า

อุไรวรรณ ประยูรรัตน์ และคนอื่น ๆ การสำรวจวัชพืชสมุนไพรในจังหวัดชลบุรี โครงการวิจัยสภาวะแวดล้อมในอ่าวไทยและภาคตะวันออก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน 2524 236 หน้า

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

Furuya, T. Yoshikawa, T and Kiyohara, H. "Alkaloid Production in Cultured Cell of Dioscoreophyllum cumminsii," Phytochemistry. 22(7) : 1671 - 1673, 1983.

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

Iwadare, S and others. "Isolation and Structure of Trichotomine Gl." Tetrahedrone. 30 4105 - 4111, 1974.

Jaiswal, V.S. and Narayan P. "Regeneration of Plantlets from the Callus of Stem Segments of Adult Plants of Ficus religiosa L." Plant Cell Reports. 4 . 256 - 258, 1985

Kutchan, T.M and other. "Cytodifferentiation and Alkaloid Accumulation in Cultured Cell of Papaver bractratum," Plant Cell Reports. 2 : 281 - 284, 1983.

Mhatre, M. and others. "Regeneration of Plant from the Culture of Leaves and Axillary Buds in Mulberry (Morus indica)," Plant Cell Reports. 4 : 78 - 80, 1985.

Murashige, T. and Skoog, F. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture," Physiology Plantarum. 15 473 - 497, 1962.

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

Pushpangadan, P. and Atal, CK. "Ethno - Medico - Botanical Investigation in Kerala I. Some Primitive Tribals of Western Ghats and Their Herbal Medicine," Journal of Ethnopharmacology. 11 : 74, 1984.

Raffauf, R.F. A Handbook of Alkaloids and Alkaloid Containning Plants. John Wiley and Sons Inc., USA, 1970.

Schuchmann, R and Wellmann, E. "Somatic Embryogenesis of Tissue Cultures of Papaver orientale and Its Relationship to Alkaloid and Lipid Metabolism " Plant Cell Reports, 2 : 88 - 91,1983.

Shinsuke. O and Watazawa, M. "Growth and Alkaloid Production in Callus Tissue of Rauwolfia serpentina," Agriculture Biology Chemistry 43(11) 2297 - 2397, 1979.

Skoog, F. and Miller, C.O. "Chemical Regalation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Culture In Vitro," Symposium Society Experimental Biology. 11 - 118 131, 1975.

Stimart, D.P. and others. "Plants from Callus of the Interspecific Hybrid Lilium Black beauty,' Horticulture Science. 15(3) : 313 - 315, 1980.

Street, H.E. Plant Tissue and Cell Culture. 2nd Edition Berkley and Los Angeles, University of California Press, 1977. 614 p.

Willaman, J.J and Li, H.L. "Alkaloid - Bearing Plant and Their Contained Alkaloids," Lloydia 33(3A) : 220, 1970.

Yamada, Y and Hashimoto, T. "Production of Tropane Alkaloids in Cultured Cells of Hyoscyamus niger," Plant Cell Reports. 1 - 101 - 103, 1982

# ภาคผนวก

## การเตรียมอาหารและการเตรียมเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

### การเตรียมอาหาร

1. เตรียมสารละลายเข้มข้นสูตร Murashige and Skoog ซึ่งมีสารละลายเข้มข้น 6 stock stock ที่ 1 ถึง stock ที่ 5 เป็นสารอนินทรีย์ ส่วน stock ที่ 6 เป็นสารอินทรีย์ (ภาคผนวก ตาราง 1)

การเตรียมอาหารสูตร MS ปริมาณ 1 ลิตร มีขั้นตอนตามลำดับดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | ชั่งน้ำตาลซูโครส | 30 | กรัม |
| 2. | เติม stock ที่ 1 | 10 | มิลลิลิตร |
| 3. | เติม stock ที่ 2 | 10 | มิลลิลิตร |
| 4. | เติม stock ที่ 3 | 10 | มิลลิลิตร |
| 5. | เติม stock ที่ 4 | 10 | มิลลิลิตร |
| 6. | เติม stock ที่ 5 | 10 | มิลลิลิตร |
| 7. | เติม stock ที่ 6 | 5 | มิลลิลิตร |
| | เขย่าสารละลายแต่ละ stock ลงไปก่อน ๆ คนให้เข้ากันดี | | |
| 8 | เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 500 | มิลลิลิตร |
| 9. | ปรับ pH ให้ได้ | 5.6 | แล้วอุ่นให้ร้อน |

10 นำวุ้น 8 กรัมกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ตอมให้ละลาย นำสารละลายที่ปรับ pH แล้วผสมกับวุ้นที่ตอมคนให้เข้ากัน

11. บรรจุอาหารที่เตรียมไว้ลงในขวดแก้วปริมาตร 15 มิลลิลิตรแล้วเปิดฝาขวด

13. นำขวดอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัด (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้เย็นจึงนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. เตรียมสารเร่งการเจริญเติบโต ชั่งสารและละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ ชั่ง NAA และ 2,4-D 0.01 มิลลิกรัม นำไป

ละลายในเอทานอลเล็กน้อยแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ชั่ง BA 0.01 มิลลิกรัม นำไปละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เล็กน้อยแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงนำสารเร่งการเจริญเติบโตที่ได้ไปเตรียมอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA, 2,4-D และ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

## การเตรียมเครื่องมือ

1. ก่อนนำเครื่องมือมาตัดเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ ใช้สูตรเนียมฟอร์เมชัน ผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว และขวดบรรจุน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัดที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที สำหรับกระเจี๊ยบ และขวดอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำเข้าตู้ถ่ายชื้อต้องเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

2. มีดและเครื่องมือมาตัดเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ ต้องทำความสะอาดก่อน มีดผ่าตัดทุกครั้งที่ใช้โดยจุ่มลงในเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ แล้วลนไฟทำซ้ำ 3 ครั้ง จึงใช้เย็นแล้วจึงนำมาตัด

ตาราง 1 ส่วนประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)

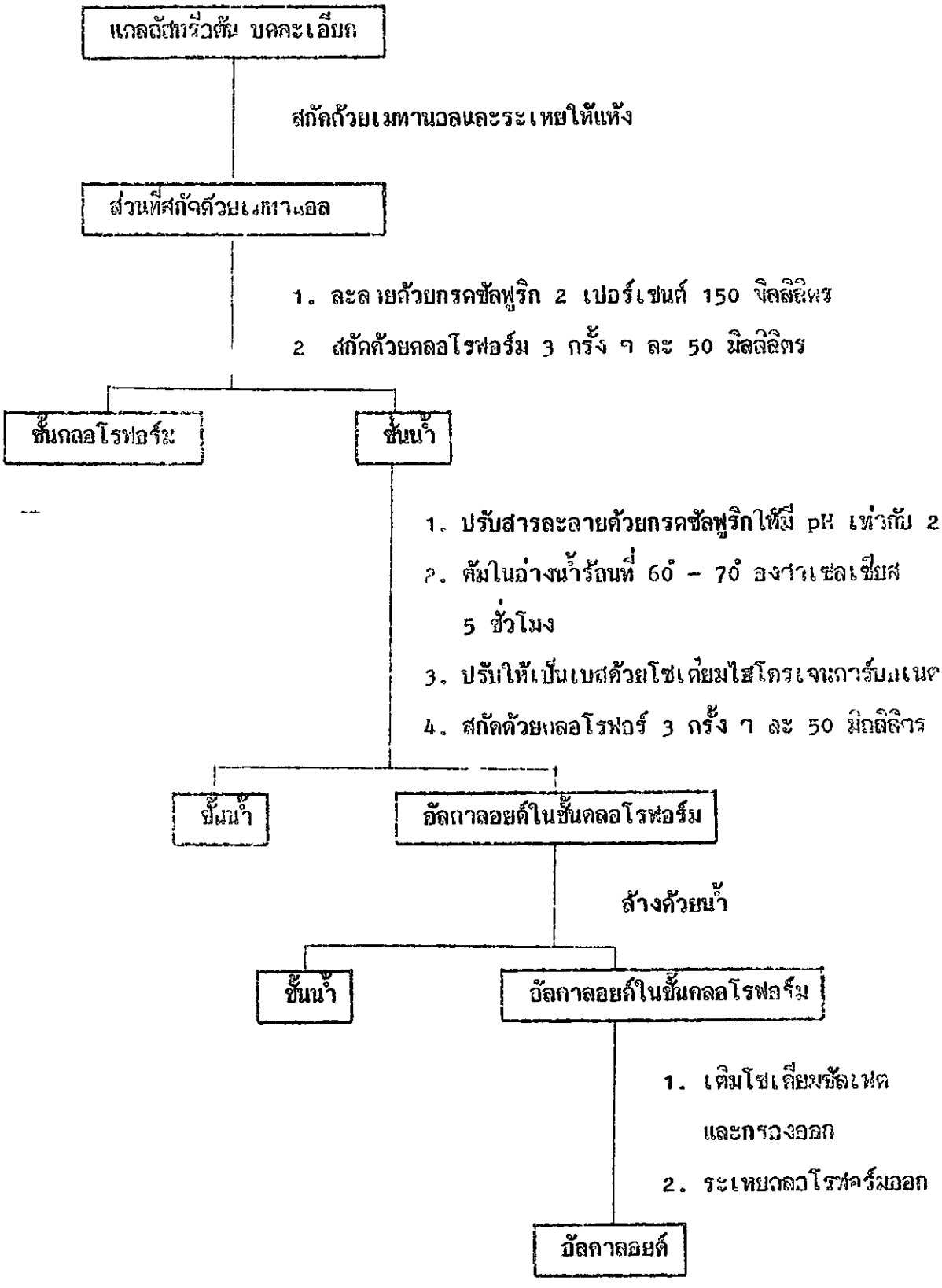
| Stock Solution | สารเคมี | กรัม | มิลลิลิตร |
|---|---|---|---|
| 1 | แอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4NO_3$) | 165 | |
| | โพแทสเซียมไนเตรต ($KNO_3$) | 190 | |
| | น้ำกลั่น | | 1000 |

ตาราง 1 (ต่อ)

| Stock Solution | สารเคมี | กรัม | ลิตร |
|---|---|---|---|
| 2 | แมกเนเซียมซัลเฟต($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 37 | |
| | แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) | 1.690 | |
| | ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4\ 7H_2O$) | 0.860 | |
| | คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) | 0.0025 | |
| | น้ำกลั่น | | 1000 |
| 3 | แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) | 44 | |
| | โพแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) | 0.083 | |
| | โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2\ 6H_2O$) | 0.0025 | |
| | น้ำกลั่น | | 1000 |
| 4 | โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) | 17 | |
| | กรดบอริก ($H_3BO_3$) | 0.620 | |
| | โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) | 0.025 | |
| | น้ำกลั่น | | 1000 |
| 5 | เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) | 2.784 | |
| | ไดโซเดียมอีดีทีเอ ($Na_2EDTA$) | 3.724 | |
| | น้ำกลั่น | | 1000 |

ตาราง 1 (ต่อ)

| Stock Solution | สารเคมี | กรัม | มิลลิลิตร |
|---|---|---|---|
| 6 | อินโนซิทอล (inositol) | 2.0 | |
| | กรดนิโคทินิค (nicotinic acid) | 0 01 | |
| | ไพริดอกซิน (pyridoxin HCl) | 0.01 | |
| | ไทเอมีน (thiamine HCl) | 0.002 | |
| | ไกลซีน (glycine) | 0.04 | |
| | น้ำกลั่น | | 100 |
| | ซูโครส | 30 | |




ภาพประกอบ 1 แผนภูมิการสกัดสารอัลคาลอยด์

การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณ (น้ำหนัก) สารอัลกาลอยด์จากแคลลัสกับต้นธรรมชาติ

คำนวณจากสูตร

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

$$df = n_1 + n_2 - 2$$

เมื่อ $t$ แทน ค่าสถิติในการแจกแจงแบบที

$\bar{X}_1$, $\bar{X}_2$ แทน ค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างทั้งสอง

$S_1^2$, $S_2^2$ แทน ความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่างทั้งสอง

$n_1$, $n_2$ แทน จำนวนกลุ่มตัวอย่างทั้งสอง