581.19242
ม514ก
ฯ.3

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวร้อยรูเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ

ปริญญานิพนธ์

ของ

น้ำค้าง สาคร

26 ส.ค. 2534

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา

กรกฎาคม 2533

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

173242

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธาน

(อ.อรพินท์ แก้วลาย) กรรมการ

..... กรรมการ

(รศ.เกษร พะลัง)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

(อ.อรพินท์ แก้วลาย) กรรมการ

..... กรรมการ

(รศ.เกษร พะลัง) กรรมการ

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รศ.ดร.เสนาะ บุญมี)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศ.ดร.สมพร บัวทอง)

วันที่ 14 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2533

ประกาศคุณูปการ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อรพินท์ แก้วลาย ประธานกรรมการที่ปรึกษา รศ.เกษร พะลัง กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัย และตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์นี้จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ เรืออากาศโทประคอง สาคร ที่ช่วยเหลือในการให้คำแนะนำและปรึกษาในระหว่างการทดลอง และขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนทุนการศึกษาในการทำปริญญานิพนธ์ รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

น้ำค้าง สาคร

กรกฎาคม 2533

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	คำนำ	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	3
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	9
	อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า	9
	การเตรียมอาหาร	10
	การทำความสะอาดเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและส่วนหัวของหัวร้อยรู	10
	การศึกษาผลของสารกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคนิน เพื่อชักนำชิ้นส่วนพัฒนาเป็นแคลลัส	11
	การเพิ่มปริมาณแคลลัสเพื่อสกัดสารอัลคาลลอยด์	13
	การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบ แคลลัสหัว ใบธรรมชาติ และหัวร้อยรูจากสภาพธรรมชาติ	13
	การเก็บรวบรวมข้อมูล	16

บทที่ หน้า

4 ผลการศึกษาค้นคว้า 17
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวร้อยรูเพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ 17
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนหัว 17
การทดสอบและหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงและหัวร้อยรู
ที่เก็บจากธรรมชาติ 41

5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ 49
การชักนำให้ขึ้นส่วนเจริญเป็นแคลลัส 49
ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและหัวร้อยรูที่เก็บจากธรรมชาติ 50
ข้อเสนอแนะ 51

บรรณานุกรม 52

ภาคผนวก 56

ประวัติย่อของผู้วิจัย 61

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1 อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร) 11

2 อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับไคเนติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) 12

3 อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับไคเนติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) 13

4 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบ บนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 18

5 น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) ของแคลลัสใบ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 28

6 น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) ของแคลลัสใบ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 29

7 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนหัว บนอาหาร MS ดัดแปลง สูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ 33

8 น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) ของแคลลัสหัว เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับไคเนติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ 38

9 ผลการทดสอบสารที่สกัดได้จากส่วนใบ หัว แคลลัสใบ แคลลัสใบที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 แคลลัสหัวและแคลลัสหัวที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 41

10 น้ำหนักของอัลคาลอยด์ที่สกัดจากใบธรรมชาติ (ก) และแคลลัสใบ (ค) 42

11 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติ (ก) และแคลลัสใบ (ค) 43

ตาราง หน้า

12 น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสใบ (ค) และแคลลัสใบที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ง) 44

13 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบ (ค) และแคลลัสใบที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ง) 44

14 น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากหัวธรรมชาติ (ข) และแคลลัสหัว (จ) 45

15 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากหัวธรรมชาติ (ข) และแคลลัสหัว (จ) 46

16 น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสหัว (จ) และแคลลัสหัวที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ฉ) 47

17 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสหัว (จ) และแคลลัสหัวที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ฉ) 47

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 ต้นหัวร้อยรูที่เก็บมาจากธรรมชาติ 5

2 แผนภูมิการสกัดสารอัลคาลอยด์ 15

3 แคลลัสและรากที่เกิดจากเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 10 สัปดาห์ 30

4 แคลลัสและรากที่เกิดจากเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ ไคเนติน ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 10 สัปดาห์ 31

5 แคลลัสใบและรากที่เจริญได้ดีและมีน้ำหนักสดมากที่สุดบนอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA 1.0 ppm. ร่วมกับ BA 3.0 ppm. 32

6 เนื้อเยื่อหัวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับไคเนติน ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ 39

7 แคลลัสหัวที่เจริญได้ดีและมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA 1.0 ppm. ร่วมกับ ไคเนติน 2.0 ppm. 40

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

เมื่อกล่าวถึงเรื่องสมุนไพร มักจะทำให้นึกถึงแต่เรื่องของยาแผนโบราณ ตำรับยาที่ประกอบด้วยรากไม้ ใบหญ้ากองโตต้องนำมาต้มรับประทานหรือนำมาดองเหล้า ความจริงแล้วสมุนไพร อาจใช้เป็นยาได้ทั้งยาแผนโบราณและแผนปัจจุบัน ต่างกันตรงวิธีการที่จะนำมาประกอบเป็นยา ยาแผนโบราณจะใช้ในสภาพเป็นยาหม้อ ยาดองเหล้า ยาลูกกลอน ส่วนยาแผนปัจจุบันจะนำเอาสมุนไพรมาสกัดเอาเฉพาะสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ โดยนำมาทำเป็นยาเม็ดหรือยาฉีด และใช้ในปริมาณที่น้อยเป็นมิลลิกรัมเท่านั้น

หัวร้อยรู (Hydnophytum formicarum Jack) เป็นสมุนไพรที่แพทย์แผนโบราณใช้หัวปรุงเป็นยารักษาโรค เช่น บำรุงหัวใจ ช่วยขับเส้นชีพจร ขับพยาธิในท้อง ปรุงเป็นยาแก้พิษในข้อในกระดูก เช่น พิษประดง และปรุงเป็นยาแก้ข้อเท้าปวดบวม ผสมกับตัวยาชนิดอื่น แก้โรคมะเร็งต่าง ๆ (ปราโมทย์ ศรีอภิรมย์. 2524 : 92; พัฒน์ สุจำนงค์. 2524 : 89 - 101) และตามตำรับยาของพระวัย จตุตาลโย แห่งวัดเทพพนมยงค์ จังหวัดสระบุรี ใช้หัวร้อยรูร่วมกับข้าวเย็นเหนือ ข้าวเย็นใต้ เชือกเขาหนัง ทองพันชั่ง แก่นไม้สัก หญ้าเกล็ดปลาและพญารากดำรักษาโรคเบาหวาน จากรายงานการทดลองของสมบัติ พุ่มสาขา (2530) พบว่าถ้าทำให้หนูเป็นโรคเบาหวานแล้วใช้ยาตำรับนี้บำบัดรักษา ปรากฏว่ายาตำรับดังกล่าวสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูได้อย่างมีผล

สาเหตุที่สมุนไพร มีผลในการบำบัดรักษาได้ เนื่องจากสมุนไพรต่าง ๆ มักมีสารเคมีเป็นองค์ประกอบ เช่น นิโคติน (nicotine) ใช้เป็นยากระตุ้นระบบประสาท โคเคน (cocaine) ใช้เป็นยาชา อะโทรปีน (atropine) ใช้ขยายรูม่านตาในการตรวจวัดสายตา มอร์ฟีน (morphine) ใช้เป็นยาระงับปวดที่รุนแรง รีเซอร์ปีน (reserpine) ใช้เป็นยากล่อมประสาทและลดความดัน สตริคนิน (strychnine) เป็นยากระตุ้นประสาทส่วนกลาง ซึ่งสารดังกล่าวนี้ ล้วนแต่เป็นสารจำพวกอัลคาลอยด์ทั้งสิ้น (ศศิเกษม ทองยงค์. 2526 : 405 - 417)

อัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสมุนไพรหลายชนิด และสามารถผลิตได้จากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงได้ เช่น โทรปีน (tropine) จากพืชในวงศ์ Solanaceae มอร์ฟีน (morphine) จากเนื้อเยื่อฝิ่น เบอร์เบอร์ริน (berberine) จากเนื้อเยื่อ Coptis japonica แอจมาลีน (ajmaline) จากเนื้อเยื่อระย่อมน้อยและแพงพวยฝรั่ง (พรรณิภา ชุมศรี. 2529 : 167 - 168)

การสกัดสารอัลคาลอยด์ต้องใช้พืชจำนวนมาก ซึ่งมีปัญหาในเรื่องเนื้อที่เพาะปลูกและการดูแลรักษา การควบคุมโรคและแมลง ประกอบกับหัวร้อยรูเป็นพืชที่หายากมีปริมาณน้อย และยังพบในป่าลึกทำให้ยากต่อการเก็บรวบรวม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงอาจช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ และหากสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากหัวร้อยรูมีฤทธิ์ในการบำบัดโรคจริง ก็สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีปริมาณมากพอที่จะสกัดสารอัลคาลอยด์ในเชิงอุตสาหกรรมได้

การศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวร้อยรูเป็นการเพิ่มปริมาณแคลลัสที่สามารถผลิตสารอัลคาลอยด์ ให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว ประกอบกับยังไม่มีการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวร้อยรูเพื่อสกัดสารอัลคาลอยด์มาก่อน จึงเห็นสมควรนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ ในการผลิตสารเคมีจากพืชที่ต้องการ ซึ่งผลวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยด้านเภสัชวิทยาต่อไป

<u>จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า</u>

1. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสได้ดีและมีน้ำหนักสดมากที่สุด
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวร้อยรูกับหัวร้อยรูที่เก็บมาจากธรรมชาติ

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อไปเป็นแคลลัสได้ดีและมีน้ำหนักสดมากที่สุด

2. การศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการผลิตสารเคมีจากแคลลัสของหัวร้อยรู ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมยา

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. พืชทดลองคือ หัวร้อยรู (Hydnophytum formicarum Jack)

2. สูตรอาหารที่ใช้คือ สูตรของ Murashige and Skoog (MS) ดัดแปลง โดยการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต ได้แก่ NAA (α - napthalene acetic acid), BA (6 - benzyladenine) และ kinetin

3. สถานที่ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์ พาเรนไคมา (parenchyma cell) ที่เกาะรวมตัวกันอยู่ โดยยังมิได้มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง

2. อัลคาลอยด์ (alkaloids) หมายถึง สารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compound) ที่มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่หนึ่งอะตอมขึ้นไป มีสมบัติเป็นเบส มีรสขม และเป็นสารที่มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หัวร้อยรูเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Hydnophytum formicarum Jack จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae มีชื่อเรียกอย่างอื่นว่า ร้อยรู (ปัตตานี) ปุ่มเป้า (ตราด) คาลูปูตาลิมา (มาเลย์ - ปัตตานี) กระเช้าผีมด (สุราษฎร์ธานี) เป็นพืชที่ต้องอาศัยเกาะอยู่กับต้นไม้อื่น (epiphytes) จึงจะเจริญได้ มองดูมีลักษณะเหมือนคนเป็นคอพอก มีหัวขนาดใหญ่กลมมีลักษณะตะปุ่มตะป่ำเล็กน้อยและมีมดอาศัยอยู่เต็มไปหมด ด้านบนของหัวมีกิ่งงอกออกไป 2 - 3 กิ่ง ใบมีลักษณะกลมมน ยาวประมาณ 2 - 6 นิ้ว กว้าง 1 - 1.5 นิ้ว ก้านใบอวบสั้น จัดเรียงตัวแบบ opposite มีดอกสีขาวขนาดเล็กจับกันเป็นกลุ่มอยู่ที่ซอกใบ ผลสีส้มแดงมีเนื้อนุ่มแบบ berry เมล็ดเล็กรูปร่างคล้ายกระสวย หัวร้อยรูเป็นพืชที่ชอบขึ้นอยู่ในบริเวณที่มีความชื้นสูง เช่น ใกล้ทะเล บนภูเขาในป่าลึก ประเทศที่มีรายงานการค้นพบ ได้แก่ สิงคโปร์ พม่า ไทย อินโดนีเซีย เป็นต้น (ปราโมทย์ ศีรอภิรมย์. 2524 : 91 - 92; Kurz. 1974 : 8)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้เจริญเป็นแคลลัส

เนื้อเยื่อพืชไม่ว่าจะมาจากอวัยวะใด สามารถนำมาชักนำให้เจริญเป็นแคลลัสได้ แต่การชักนำจะง่ายหรือยากขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง และเซลล์ที่ได้มาอยู่ในระยะการเจริญเติบโตหรือเจริญเต็มที่แล้ว ซึ่งเกี่ยวข้องกับระดับฮอร์โมนภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อาหารที่ใช้เลี้ยง สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และสารต่าง ๆ ที่เติมลงไปในอาหาร รวมทั้งสารเร่งการเจริญเติบโตด้วย สารเร่งการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเป็นแคลลัสได้นั้น คือ ออกซินและไซโตไคนิน พืชบางชนิดโดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงเดี่ยวต้องการออกซินเพียงอย่างเดียว พืชบางชนิดต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว และพืชบางชนิดต้องการทั้งออกซินและไซโตไคนิน ในการชักนำเนื้อเยื่อให้เจริญเป็นแคลลัส(Pierik . 1987 : 215 - 216)

ภาพประกอบ 1 ต้นหัวร้อยรูที่เก็บมาจากธรรมชาติ

พืชต้องการออกซินในการชักนำเนื้อเยื่อให้เจริญเป็นแคลลัส ตัวอย่างเช่น ตัวภะปาล์มน้ำมัน พันธุ์เทเนรา (Elaeis guineensis Jacg. var. tenera) เจริญเป็นแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 5.0 - 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ถิรพงศ์ ญานิสราพันธ์. 2528) เนื้อเยื่อส่วนใบของบัวแก้ว (Hawarthia cooperi) เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ประยุทธ สุพรรณวิบูล. 2524) และเนื้อเยื่อของลำต้นมะละกอบนอาหารสูตร LS ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดแคลลัสได้ดีมีน้ำหนักสดมากที่สุด (Arora and Singh. 1978 : 357 - 361)

การเจริญเป็นแคลลัสของพืชบางชนิดต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว เช่น ตัวภะของทุเรียนนก (Durio lowianus. Scort. ecking) เจริญเป็นแคลลัสได้ดีบนอาหาร Woody Plant Medium (WPM) ที่เติม BA 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือบนอาหารสูตร Vieitez and Vieitez (1980) ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ประยงค์ ดงนคร. 2528) และเนื้อเยื่อส่วนใบของกาแฟเจริญเป็นแคลลัสได้ดี ก็ต่อเมื่อเติมไซโตไคนินลงไปในอาหารเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ถ้าเติมในปริมาณที่มากแคลลัสจะเจริญได้ดีกว่าปริมาณที่น้อย และถ้าเติมออกซินลงไปด้วยจะทำให้การเจริญของแคลลัสลดลง (Ammirato and others. 1984 : 569; citing Dublin. 1980 : unpaged)

การเจริญเป็นแคลลัสของพืชบางชนิดต้องการทั้งออกซินและไซโตไคนิน เช่น เนื้อเยื่อส่วนพิธ (pith) ของยาสูบเจริญเป็นแคลลัสได้ดีมีลักษณะแน่น เมื่อความเข้มข้นของไคเนตินเป็น 1.0 ppm. และความเข้มข้นของ IAA อยู่ในช่วง 1.0 - 10.0 ppm. (Skoog and Miller. 1957 : 118 - 131) เนื้อเยื่อส่วนใบกาแฟเจริญเป็นแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ไทอามีน (thiamine) 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ (Sharp and others. 1973 : 67 - 74) เนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นของทองพันชั่งเจริญเป็นแคลลัสได้ดี มีน้ำหนักสดมากที่สุด บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 ppm. ร่วมกับ BA 1.0 ppm. และ MS ที่เติม NAA 1.0 ppm. ร่วมกับ BA 2.5 ppm. ตามลำดับ (สำเริง ทีเจริญ. 2530)

อัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสอาจมีปริมาณมากกว่าอัลคาลอยด์จากสภาพธรรมชาติ เช่น แคลลัสใบและแคลลัสลำต้นทองพันชั่ง (สำเริง ทีเจริญ. 2530) แคลลัสใบและแคลลัสลำต้นของหญ้าหนวดแมว (อุษา สุนันทารอด. 2530) แคลลัสใบและแคลลัสลำต้นของหญ้าเกล็ดปลา (ผกามาศ เขมะจารี. 2530)

ปริมาณของอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสของพืชบางชนิดมีปริมาณน้อยกว่าในสภาพธรรมชาติ เช่น อิคูตา ไซโอโน และฟูรูยา (Ikuta , Syono and Furuya . 1975 : 1209 - 1210) พบว่าในเหง้าของ Coptis japonica มีอัลคาลอยด์ berberine และ jatrorhizine อยู่ และสามารถพบได้ในแคลลัสของ Coptis japonica เช่นกันแต่ปริมาณที่พบในแคลลัสน้อยกว่าในธรรมชาติมาก สำหรับต้นที่เจริญจากแคลลัสจะมีอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่อยู่ที่เหง้าเช่นเดียวกับต้นในธรรมชาติ ทาบาตาและคนอื่น ๆ (Tabata and others . 1972 : 949 - 955) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสลำต้น และส่วนเหง้าของ Scopolia parviflover พบว่าแคลลัสมีการเจริญเป็นรากจำนวนมากในอาหารที่เติมออกซิน และพบว่าปริมาณอัลคาลอยด์จากแคลลัสมีน้อยกว่าจากเหง้าในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มปริมาณอัลคาลอยด์ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้อีก 0.12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใส่ tropic acid ลงไป ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ hyoscyamine และ scopolamine

ปริมาณของอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสบางครั้งขึ้นอยู่กับอายุของแคลลัสด้วย เช่น เดลเฟล และลอธฟัส (Delfel and Rothfus . 1977 : 1595 - 1598) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสของ Cephalotaxus harringtonia จากใบและลำต้นบนอาหารสูตร MS โดยใส่ วิตามิน ไฮโปแซนทิน (hypoxanthins) NAA และไคเนติน พบว่าเกิดแคลลัสขึ้นภายใน 7 - 21 วัน นำแคลลัสไปวิเคราะห์ พบว่ามีสารซีฟาโลทาซีน (cephalotaxine) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็งได้ อยู่ในแคลลัสที่ได้จากใบและแคลลัสที่ได้จากลำต้น แคลลัสอายุ 6 เดือน มีอัลคาลอยด์มากกว่าแคลลัสอายุ 3 เดือน ประมาณ 2 - 6 เท่า และมากกว่าต้นจากธรรมชาติ ซึ่งมีอัลคาลอยด์เพียง 1 - 3 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น นอกจากนี้ปริมาณของอัลคาลอยด์อาจขึ้นอยู่กับฮอร์โมนที่เติมลงไป

ในอาหารด้วย เช่น ดูท และเฮนชอว์ (Dhoot and Henshaw. 1977 : 943 - 949) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสของ Hyoscyomus niger จากส่วนของต้นกล้า ในอาหารที่ปราศจากออกซิน พบว่าปริมาณอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า มีปริมาณไม่แตกต่างกัน และยังพบว่าปริมาณอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากออกซิน มีระดับสูงกว่าในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีออกซินเล็กน้อย

ในการหาอัลคาลอยด์สามารถแยกและวิเคราะห์อัลคาลอยด์ได้หลายชนิด เช่น ฟูรูยา, อิคูตา และไซโอโน (Furuya, Ikuta and Syono. 1972 : 3041 - 3044) รายงานว่าพบอัลคาลอยด์ 7 ชนิด ในแคลลัสของฝิ่น (Papaver somniferum) คือ sanguinarine, dihydrosanguinarine, oxysanguinarine, protopine, crytopine, magnoflorine และ choline ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ที่พบตามปกติในพืชชนิดนี้ตามสภาพธรรมชาติ นอกจากนี้ในแคลลัสยังพบอัลคาลอยด์อีก 2 ชนิด คือ norsanguinarine และ 6 - acetonyldihydrosanguinarine ซึ่งไม่พบในพืชสภาพธรรมชาติ นอกจากนี้ คามิมูรา และนิชิคาวา (Kamimura and Nishikawa. 1976 : 907 - 911) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสของ Papaver bracteatum ในอาหารวุ้นเป็นเวลา 2 ปี จึงนำแคลลัสมาสกัดอัลคาลอยด์แล้วนำไปแยกและวิเคราะห์ด้วยวิธี GLC (gas layer chromatography) และ TLC (thin layer chromatography) จากนั้นตรวจสอบอัลคาลอยด์ด้วยวิธี gas - chromatographic mass spectrometry พบว่าอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่ที่ผลิตคือ L - stytopine และ protopine ส่วน thebaine พบว่า มีน้อยมาก

บทที่ 3

วิธีดำเนินการค้นคว้า

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า

1. พืชทดลอง คือ หัวร้อยรู

2. เครื่องมือที่ใช้เตรียมอาหารประกอบด้วย บิกเกอร์ขนาดต่าง ๆ ปิเปตต์ ขวดแก้ว กระบอกตวง เครื่องชั่ง เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นเบส (pH meter)

3. เครื่องมือที่ใช้ในการตัดและถ่ายเนื้อเยื่อพืชได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (transfer cabinet) ขวดอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) (ภาคผนวก)

5. สารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ NAA และกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA และไคเนติน

6. สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เอทานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

7. ทวีน 20 (Tween 20)

8. วุ้นและน้ำตาลซูโครส

9. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควบคุมอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส มีชั้นวางขวดช่วงแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

10. สารเคมีใช้สำหรับสกัดอัลคาลอยด์ ได้แก่ เอทานอล คลอโรฟอร์ม กรดอะซิติกล้วน แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

11. เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) กรวยแยก (separatory funnel)

วิธีทดลอง

1. การเตรียมอาหาร (ภาคผนวก)

1.1 ชั่งสารเคมีต่าง ๆ ตามสูตรอาหาร MS ทำเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution)

1.2 ดูดสารละลายจากสารละลายเข้มข้นที่ 1 - 5 มา 10 มิลลิลิตร และจากสารละลายเข้มข้นที่ 6 มา 5 มิลลิลิตร

1.3 เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์

1.4 เติมสารเร่งการเจริญเติบโตตามต้องการ

1.5 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

1.6 ปรับ pH ของอาหารให้เป็น 5.6 - 5.8 ด้วย NaOH 1 N. หรือ HCl 1 N.

1.7 เติมวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ต้มให้ร้อนจนวุ้นละลายวัดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ถ้าไม่ครบเติมน้ำกลั่นที่ร้อนให้ครบ

1.8 บรรจุอาหารจำนวน 15 มิลลิลิตร ลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.9 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

2. การทำความสะอาดเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและส่วนหัวของหัวร้อยรู

2.1 นำใบอ่อนของหัวร้อยรูล้างด้วย ไลปอน วี (lipon V) ให้สะอาด แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง นำไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 - 1 1/2 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 15 เปอร์เซ็นต์ที่เติมทวีน 20 (tween 20) 2 - 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมทวีน 20 ประมาณ 2 - 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 25 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

2.2 นำส่วนหัวของหัวร้อยรูมาปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นขนาดพอประมาณ ล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง ล้างด้วยไลปอน วี ล้างน้ำให้สะอาด แล้วแช่ในสารละลายคลีนาไซด์ (kleenacide) 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง นำไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 - 1 1/2 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมทวีน 20 ประมาณ 2 - 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมทวีน 20 ประมาณ 2 - 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 30 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

3. การศึกษาผลของสารกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคนิน เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนพัฒนาเป็นแคลลัส

3.1 การศึกษาผลของ NAA ร่วมกับ BA ต่อการเจริญของชิ้นส่วนใบเป็นแคลลัส

นำชิ้นส่วนใบหัวร้อยรูที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 7 X 7 ตารางมิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 1-25 ตาราง 1) ทดลองทำสูตรละ 10 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

ตาราง 1 อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)

NAA \ BA		0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
0.5	สูตรที่	1	6	11	16	21
1.0		2	7	12	17	22
2.0		3	8	13	18	23
3.0		4	9	14	19	24
4.0		5	10	15	20	25

3.2 การศึกษาผลของ NAA ร่วมกับไคเนติน ต่อการเจริญของชิ้นส่วนใบเป็นแคลลัส

นำชิ้นส่วนใบหัวร้อยรูที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 7 X 7 ตารางมิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ไคเนติน ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 26 - 50 ตาราง 2) ทดลองทำสูตรละ 10 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

ตาราง 2 อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับไคเนติน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

kinetin / NAA		0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
0.5	สูตรที่	26	31	36	41	46
1.0		27	32	37	42	47
2.0		28	33	38	43	48
3.0		29	34	39	44	49
4.0		30	35	40	45	50

3.3 การศึกษาผลของ NAA ร่วมกับไคเนตินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อหัวเป็นแคลลัส

นำชิ้นส่วนของหัวร้อยรูที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเป็นรูปเหลี่ยมขนาด 5x5x5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ไคเนติน ความเข้มข้น 0.5 , 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 51 - 75 ตาราง 3) ทดลองทำสูตรละ 10 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

ตาราง 3 อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับไคเนติน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

NAA \ kinetin		0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
1.0	สูตรที่	51	56	61	66	71
2.0		52	57	62	67	72
3.0		53	58	63	68	73
4.0		54	59	64	69	74
5.0		55	60	65	70	75

4. การเพิ่มปริมาณแคลลัสเพื่อสกัดสารอัลคาลอยด์

4.1 คัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม ซึ่งทำให้แคลลัสใบและแคลลัสหัวเจริญได้ดี มีน้ำหนักสดมากที่สุด (จากตาราง 1, 2, 3)

4.2 นำส่วนใบอ่อนที่ฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมเป็นเวลา 10 สัปดาห์ จากนั้นตัดแคลลัสเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ให้มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 0.5 กรัม เลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมอย่างเดิม และสูตรที่เหมาะสมแต่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ภาคผนวก) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

4.3 นำเนื้อเยื่อส่วนหัวที่ฆ่าเชื้อแล้วเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมเป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ให้มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.5 กรัม เลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมอย่างเดิมและสูตรที่เหมาะสมแต่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ภาคผนวก) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

5. การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบ แคลลัสหัว ใบธรรมชาติ และหัวร้อยรู จากสภาพธรรมชาติ

5.1 นำแคลลัสใบ แคลลัสหัว ใบธรรมชาติและหัวธรรมชาติของหัวร้อยรูแต่ละส่วน มาอบแห้งบดให้ละเอียด

5.2 นำแต่ละส่วนของพืชที่บดละเอียดน้ำหนักแห้ง 10 กรัม มาสกัด โดยแช่ไว้ใน เอทานอลประมาณ 2 สัปดาห์ นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมากรอง ทดสอบกับสารทดสอบ อัลคาลอยด์คือ ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ (Dragendorf's reagent) และ เมเยอร์ รีเอเจนต์ (Mayer's reagent) แล้วทำให้เข้มข้นโดยระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้ผลสกัดด้วยเอทานอล

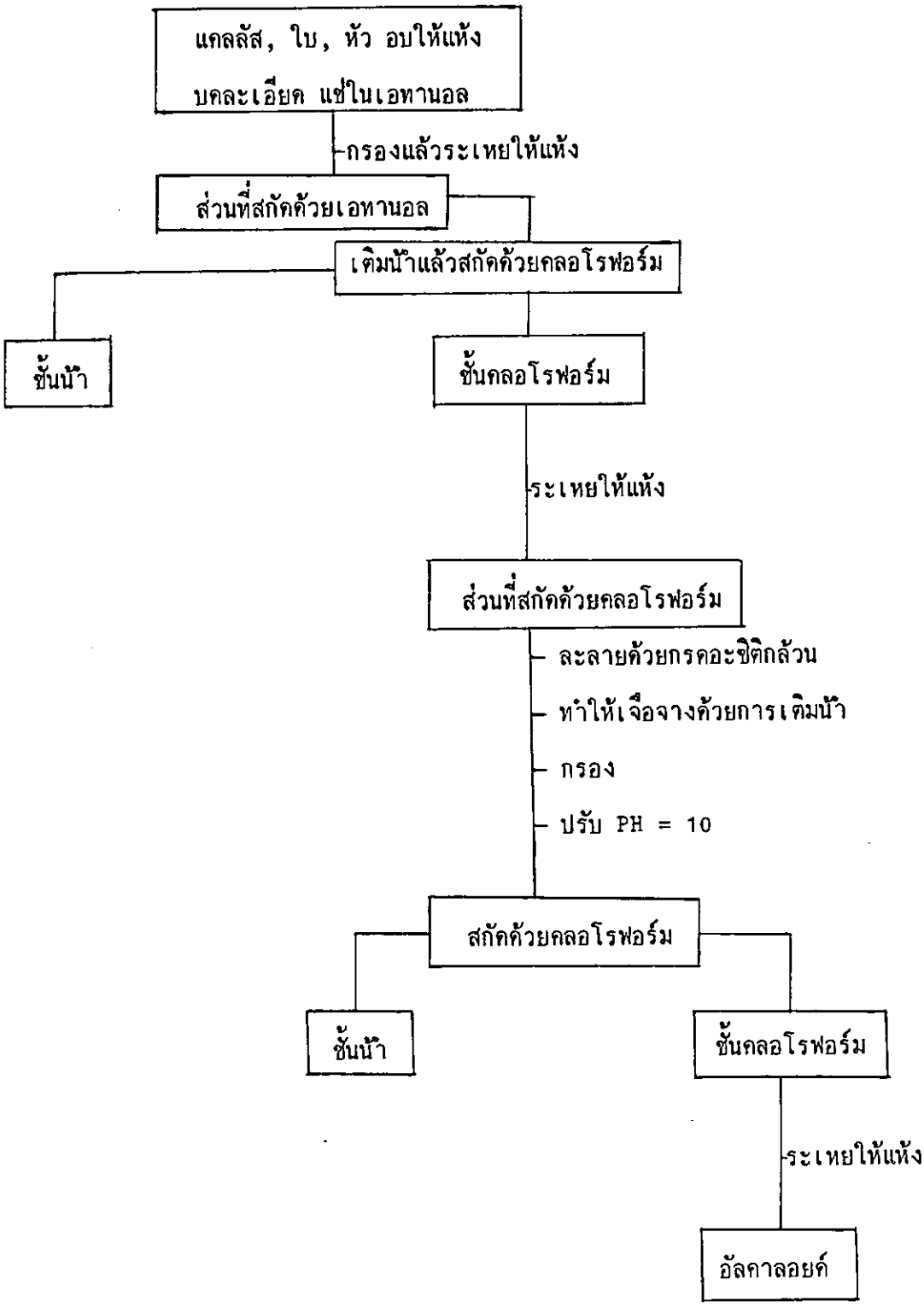
5.3 นำผลสกัดในข้อ 5.2 ที่ระเหยแห้งมาเติมน้ำ แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม นำชั้น คลอโรฟอร์ม มาระเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน

5.4 นำผลสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมาละลายในกรดอะซิติกล้วน (glacial acetic acid) ทำให้เจือจางโดยการเติมน้ำ แล้วแยกตะกอนด้วยการกรอง

5.5 นำสารละลายที่ได้จากการกรอง มาทำให้เป็นเบสด้วยสารละลายแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 28 จนสารละลายที่ได้มี pH เท่ากับ 10

5.6 นำสารละลายในข้อ 5.5 มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วระเหยคลอโรฟอร์มออก ด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จนได้ผลสกัดคือสารอัลคาลอยด์

5.7 ชั่งน้ำหนักสารอัลคาลอยด์



ภาพประกอบ 2 แผนภูมิการสกัดสารอัลคาลอยด์

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสใบเมื่อทดลองเลี้ยงได้ 10 สัปดาห์ และชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสหัวเมื่อเลี้ยงได้ 12 สัปดาห์

2. บรรยายลักษณะของแคลลัส

3. ถ่ายภาพลักษณะของแคลลัส

4. ชั่งน้ำหนักของสารอัลคาลอยด์

5. วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณอัลคาลอยด์ จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ และจากแคลลัสหัวกับหัวธรรมชาติโดยใช้ T - test (two sample t - test)

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวร้อยรูเพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 50 สูตร (ตาราง 1 และ 2) พบว่าชิ้นส่วนใบสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ทุกสูตร โดยแคลลัสทั้งหมดเจริญจากรอยตัดทั้ง 4 ด้านของใบและจากส่วนของเส้นกลางใบ ในช่วง 2 สัปดาห์แรกใบจะขยายใหญ่ขึ้นและความหนาของใบก็เพิ่มขึ้นจากเดิม โดยเฉพาะบริเวณรอบรอยตัดและเส้นกลางใบเริ่มเกิดแคลลัสสีขาวขึ้นเล็กน้อย ในสัปดาห์ที่ 4 - 10 แคลลัสมีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ มีรากเกิดขึ้นในทุกสูตรอาหาร เมื่อความเข้มข้นของ NAA สูงขึ้นคือ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนรากจะมากขึ้นตามลำดับ สำหรับสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ทำให้ชิ้นส่วนใบเจริญเติบโตได้ดีและมีน้ำหนักสดมากที่สุดคือสูตรที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัว

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนหัวบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงสูตรที่ 51 - 75 (ตาราง 3) พบว่าชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อหัวสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ทุกสูตร โดยแคลลัสเจริญจากบริเวณรอยตัดทั้งหมด ในช่วง 1 - 4 สัปดาห์แรกชิ้นส่วนหัวจะเปลี่ยนสีเขียวสดเป็นน้ำตาลอ่อน แต่ยังมีลักษณะสดอยู่ ในสัปดาห์ที่ 6 เริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้นรอบรอยตัด บางสูตรเกิดเฉพาะด้านใดด้านหนึ่ง สัปดาห์ที่ 8 - 10 แคลลัสเจริญเติบโตขึ้นตามลำดับ บางสูตรมีรากเกิดขึ้น สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ทำให้ชิ้นส่วนหัวเจริญได้ดีและมีน้ำหนักสดมากที่สุด คือสูตรที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไคเนติน 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตาราง 4 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบ บนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
1	2	ใบเขียวสดขยายใหญ่และหนาขึ้นกว่าเดิม
	4	เกิดแคลลัสสีขาวที่บริเวณรอบรอยตัดและเส้นกลางใบเล็กน้อย
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นตามลำดับ และมีรากเกิดขึ้นเล็กน้อย
2	2	ใบขยายใหญ่ โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	ใบหนาขึ้นเกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ เกิดราก 2 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นมีราก 10 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิม จำนวนรากมากกว่า 30 ราก
3	2	ใบขยายใหญ่และโค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวบริเวณรอบรอยตัดเล็กน้อย
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น เกิดราก 15 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นกว่าเดิม จำนวนรากมากกว่า 30 ราก และยาวขึ้นกว่าเดิม
4	2	ใบขยายใหญ่และโค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด และเส้นกลางใบเล็กน้อย มีรากสั้น ๆ 20 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิม รากมีจำนวนมากกว่า 30 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นกว่าเดิม

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
5	2	ใบเขียวสดขยายใหญ่ขึ้นและโค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	ใบหนาขึ้น เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีรากเกิดขึ้น 25 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นสีเขียวสด จำนวนราก 30 ราก
	8 – 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นสีเขียวปนเหลือง จำนวนรากเพิ่มขึ้น
6	2	ใบขยายใหญ่ขึ้นโค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	ใบหนาขึ้นเกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด มีรากเกิดขึ้น 10 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 23 ราก
	8 – 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
7	2	ใบขยายใหญ่โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย และหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีรากเกิดขึ้น 7 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 18 ราก
	8 – 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
8	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	ใบหนาขึ้นเกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 10 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นสีขาวปนเหลือง มีราก 19 ราก
	8 – 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเหลืองอ่อน จำนวนรากเพิ่มขึ้น

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
9	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอ ขอบใบหนามีตุ่มเล็กเกิดขึ้นรอบรอยตัด
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 10 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 20 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น จำนวนรากเพิ่มขึ้น
10	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอ ขอบใบหนามีตุ่มเล็กเกิดขึ้นรอบรอยตัด
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 15 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 25 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
11	2	ใบเขียวสดขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวที่บริเวณส่วนหัวและท้ายของรอยตัดเล็กน้อย
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น และเกิดตุ่มเล็กขึ้นที่บริเวณส่วนหัวและท้ายของรอยตัด
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 18 ราก
12	2	ใบเขียวสดขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด มีราก 10 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น มีราก 30 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น จำนวนรากเพิ่มขึ้น
13	2	ใบเขียวสดขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด มีราก 13 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 20 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
14	2	ใบเขียวสดขยายใหญ่ขึ้น ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 15 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 30 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
15	2	ใบเขียวสดขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีรากมากกว่า 30 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
16	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบเล็กน้อย
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น มีราก 10 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 10 ราก
17	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น มีราก 10 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น จำนวนรากเพิ่มขึ้น
18	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 12 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 20 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น

173242

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
19	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีรากมากกว่า 30 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
20	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีรากมากกว่า 30 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
21	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น ขอบใบหนาขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 10 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น มีราก 17 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น ขอบใบหนาขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
22	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น ขอบใบหนาขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 12 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 19 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
23	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย และหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีรากมากกว่า 30 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิม สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
24	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 15 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
25	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีรากมากกว่า 30 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
26	2	ใบเขียวสดขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดเล็กน้อย
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 5 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
27	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดเล็กน้อย มีราก 10 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 15 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีรากมากกว่า 30 ราก
28	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 14 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 20 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
29	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวทั้งใบ มีราก 18 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 25 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
30	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 28 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
31	2	ใบขยายใหญ่ขึ้นโค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบเล็กน้อย
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 4 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 20 ราก
32	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด มีราก 10 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 17 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
33	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 12 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 20 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
34	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 25 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
35	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 29 ราก
	6 – 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
36	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย และหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด มีราก 5 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
37	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย และหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด มีราก 8 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 18 ราก
	8 – 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
38	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย และหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวทั้งใบ มีราก 17 ราก
	6 – 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีรากมากกว่า 30 ราก
39	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวเล็กน้อย และหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวทั้งใบ มีราก 22 ราก
	6 – 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีรากมากกว่า 30 ราก
40	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 28 ราก
	6 – 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด รากมากกว่า 30 ราก

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
41	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด มีราก 3 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 7 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
42	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 15 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีรากมากกว่า 30 ราก
43	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 20 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
44	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบใบหนาขึ้น
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีราก 28 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีรากมากกว่า 30 ราก
45	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีรากมากกว่า 30 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
46	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด มีราก 10 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์ที่	ลักษณะการเจริญของชิ้นส่วนใบ
47	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัด มีราก 10 ราก
	6	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 18 ราก
	8 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
48	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวทั้งใบ มีราก 15 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
49	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบ มีรากมากกว่า 30 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น
50	2	ใบขยายใหญ่ขึ้น โค้งงอตัวขึ้นเล็กน้อย
	4	เกิดแคลลัสสีขาวทั้งใบ มีรากมากกว่า 30 ราก
	6 - 10	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด จำนวนรากเพิ่มขึ้น

ตาราง 5 น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) ของแคลลัสใบหัวร้อยรู เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

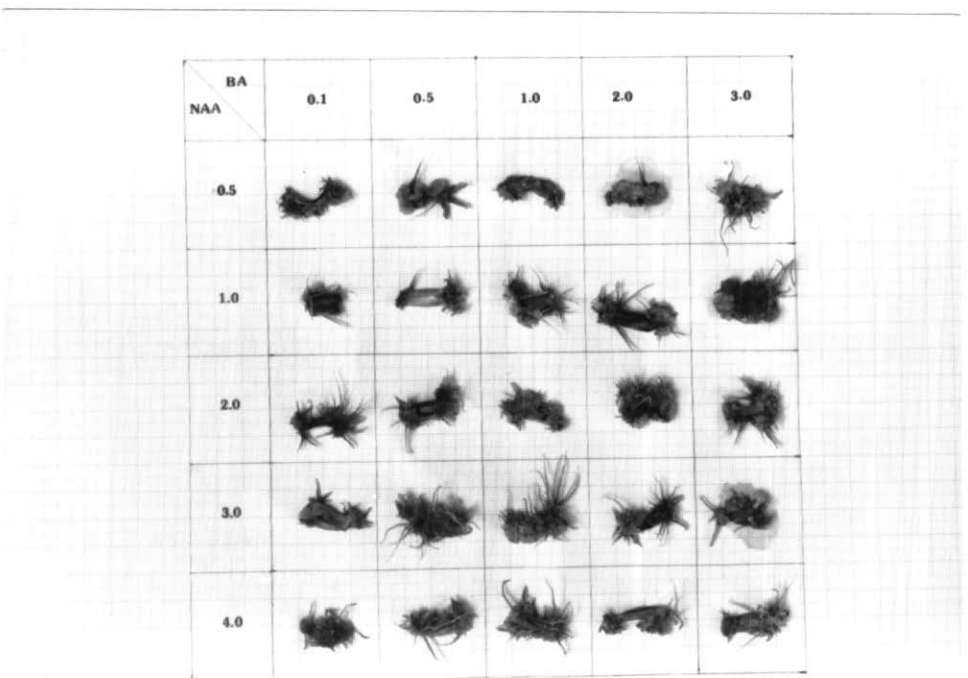
NAA (ppm) \ BA (ppm)	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
0.5	(1) 0.92	(6) 1.30	(11) 1.68	(16) 1.98	(21) 2.57
1.0	(2) 1.17	(7) 1.43	(12) 2.04	(17) 1.94	(22) 3.04
2.0	(3) 1.06	(8) 1.52	(13) 2.02	(18) 2.75	(23) 1.84
3.0	(4) 1.33	(9) 1.69	(14) 1.88	(19) 2.46	(24) 2.37
4.0	(5) 1.16	(10) 1.76	(15) 2.07	(20) 2.38	(25) 2.26

หมายเหตุ ( ) หมายถึงอาหารสูตรที่ 1 - 25

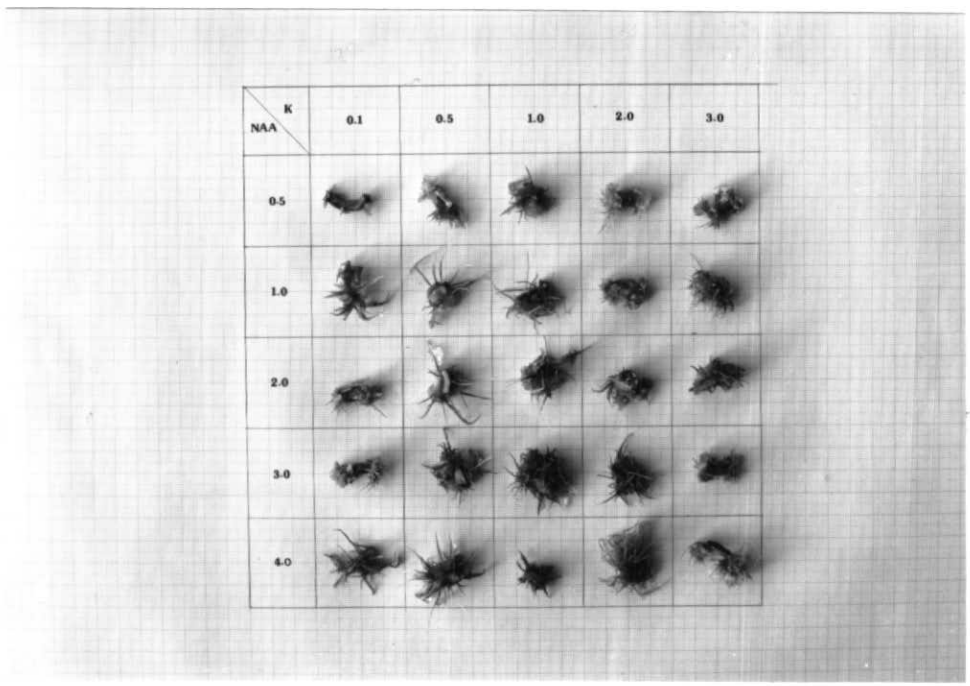
ตาราง 6 น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) ของแคลลัสใบ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์

NAA (ppm.) \ kinetin (ppm.)	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
0.5	(26) 1.19	(31) 0.92	(36) 0.94	(41) 1.59	(46) 1.87
1.0	(27) 1.01	(32) 1.47	(37) 1.39	(42) 1.67	(47) 1.82
2.0	(28) 1.14	(33) 1.82	(38) 1.83	(43) 1.76	(48) 1.96
3.0	(29) 1.40	(34) 1.58	(39) 1.66	(44) 2.17	(49) 1.71
4.0	(30) 1.57	(35) 1.74	(40) 2.12	(45) 1.81	(50) 2.04

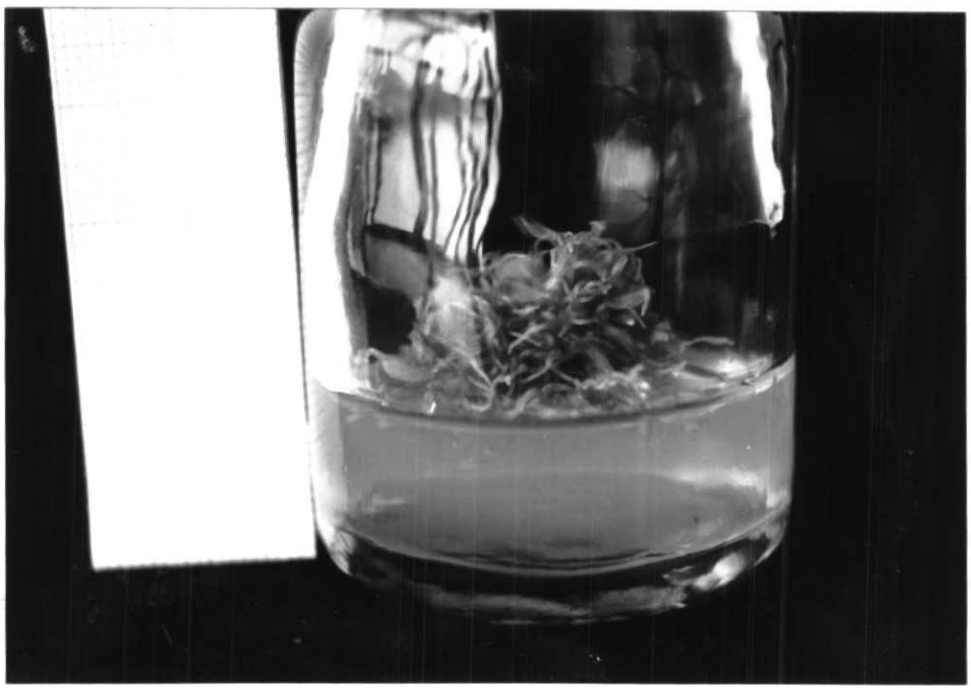
หมายเหตุ ( ) หมายถึงอาหารสูตรที่ 26 - 50



ภาพประกอบ 3 แคลลัสและรากที่เกิดจากเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 10 สัปดาห์



ภาพประกอบ 4 แคลลัสและรากที่เกิดจากเนื้อเยื่อส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ ไคเนติน ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 10 สัปดาห์



ภาพประกอบ 5 แคลลัสใบและรากที่เจริญได้ดีและมีน้ำหนักสดมากที่สุดบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA 1.0 ppm. ร่วมกับ BA 3.0 ppm.

ตาราง 7 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนหัวบนอาหาร MS ดัดแปลงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

สูตรที่	สัปดาห์	การเจริญของเนื้อเยื่อส่วนหัว
51	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่กว่าเดิมเล็กน้อย
	8 - 12	เกิดแคลลัสสีน้ำตาลอ่อนเล็กน้อยและเจริญเติบโตเรื่อย ๆ แต่อัตราการเจริญค่อนข้างช้า
52	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่กว่าเดิมเล็กน้อย
	8	เกิดแคลลัสสีเขียวสดบริเวณรอยตัดด้านข้างทั้ง 4 ด้านเล็กน้อย
	10 - 12	แคลลัสเพิ่มขึ้นจากเดิม สีเขียวสด
53	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีขาวด้านบนของเนื้อเยื่อเล็กน้อย
	8 - 12	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิมเล็กน้อย สีเหลืองอ่อน
54	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่กว่าเดิมเล็กน้อย
	8	เกิดแคลลัสสีเขียวสดปนขาวจากรอยตัดด้านข้างทั้ง 4 ด้าน
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิม สีเขียวสด และเกิดรากสั้น 4 ราก
55	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีขาวเล็กน้อยด้านบนของเนื้อเยื่อ
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย เกิดรากสั้น 15 ราก
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิมสีเขียวปนเหลือง มีรากมากกว่า 30 ราก

ตาราง 7 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์	การเจริญของเนื้อเยื่อส่วนหัว
56	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่ขึ้น และเกิดแคลลัสสีขาวด้านข้างเล็กน้อย
	8	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิมเล็กน้อย เกิดราก 2 ราก
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย สีน้ำตาลอ่อน มีราก 6 ราก
57	2	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่กว่าเดิมเล็กน้อย
	8	เกิดแคลลัสสีเขียวสดรอบรอยตัดทั้ง 4 ด้าน
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสดปนน้ำตาลอ่อน
58	2	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีขาวปนเหลืองเล็กน้อย เกิดราก 5 ราก
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีราก 13 ราก
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น จำนวนรากเพิ่มขึ้น
59	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีขาวเล็กน้อยด้านบนของเนื้อเยื่อ เกิดราก 3 ราก
	8	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิมเล็กน้อย มีราก 10 ราก
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวปนน้ำตาล จำนวนรากเพิ่มขึ้น
60	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่กว่าเดิมเกิดแคลลัสสีเขียวเล็กน้อยรอบรอยตัดทั้ง 4 ด้าน
	8 - 12	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิม สีเขียวสด เกิดรากสั้น ๆ 5 ราก

ตาราง 7 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์	การเจริญของเนื้อเยื่อส่วนหัว
61	2 – 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสสีขาวปนน้ำตาลรอบรอยตัด
	8 – 10	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิมประมาณ 2 เท่า มีสีน้ำตาลอ่อนและอัดแน่น
62	2 – 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีขาวปนเหลืองเล็กน้อยด้านบนของเนื้อเยื่อ มีราก 10 ราก
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีราก 20 ราก
	10 – 12	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิม สีน้ำตาลอ่อน จำนวนรากเพิ่มขึ้น
63	2 – 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีขาวปนเหลืองรอบเนื้อเยื่อ เกิดราก 8 ราก
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น มีราก 10 – 12 ราก
	10 – 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีน้ำตาลอ่อน มีรากมากกว่า 30 ราก
64	2 – 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีน้ำตาลอ่อนเล็กน้อย เกิดราก 15 ราก
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น มีราก 25 ราก
	10 – 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีน้ำตาลอ่อน มีรากมากกว่า 30 ราก
65	2 – 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีขาวเล็กน้อย รอบเนื้อเยื่อทั้ง 4 ด้าน เกิดราก 5 ราก
	8	แคลลัสเจริญมากขึ้น มีราก 10 ราก
	10 – 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น จำนวนรากเพิ่มขึ้น

ตาราง 7 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์	การเจริญของเนื้อเยื่อส่วนหัว
66	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีเขียวสดรอบเนื้อเยื่อ
	8 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด
67	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีขาวปนเหลืองเล็กน้อย มีราก 3 ราก
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น มีราก 10 ราก
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิม สีน้ำตาลอ่อน มีราก 25 ราก
68	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีเขียวรอบเนื้อเยื่อเล็กน้อย มีราก 10 ราก
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 20 ราก
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น จำนวนรากเพิ่มขึ้น
69	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีเขียวสดรอบเนื้อเยื่อเล็กน้อย
	8 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น จำนวนรากเพิ่มขึ้น
70	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เกิดแคลลัสสีเขียวรอบเนื้อเยื่อเล็กน้อย
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวสด มีราก 3 ราก
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น มีราก 5 ราก

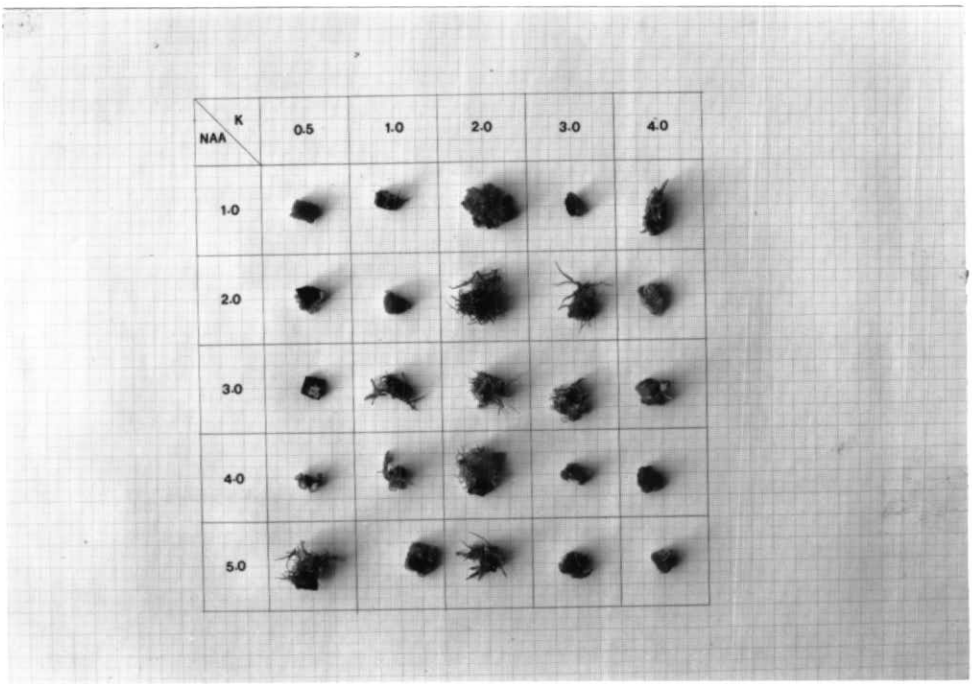
ตาราง 7 (ต่อ)

สูตรที่	สัปดาห์	การเจริญของเนื้อเยื่อส่วนหัว
71	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย เกิดแคลลัสสีขาวปนเหลืองเล็กน้อย
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย มีราก 5 ราก
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีน้ำตาลอ่อน มีราก 13 ราก
72	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย เกิดแคลลัสสีขาวปนเหลืองเล็กน้อย
	8 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวปนเหลือง
73	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย เกิดแคลลัสสีเขียวรอบเนื้อเยื่อเล็กน้อย
	8	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น มีราก 1 ราก
	10 - 12	แคลลัสขยายใหญ่กว่าเดิม สีเขียวสด มีราก 4 ราก
74	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสสีเขียวรอบรอยตัดเล็กน้อย
	8 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้น แต่อัตราการเจริญค่อนข้างช้า สีเขียวสด
75	2 - 4	เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาลอ่อน
	6	เนื้อเยื่อขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย เกิดแคลลัสสีเขียวรอบเนื้อเยื่อเล็กน้อย
	8 - 12	แคลลัสขยายใหญ่ขึ้นอย่างช้า ๆ สีเขียวสด มีรากสั้น 13 ราก

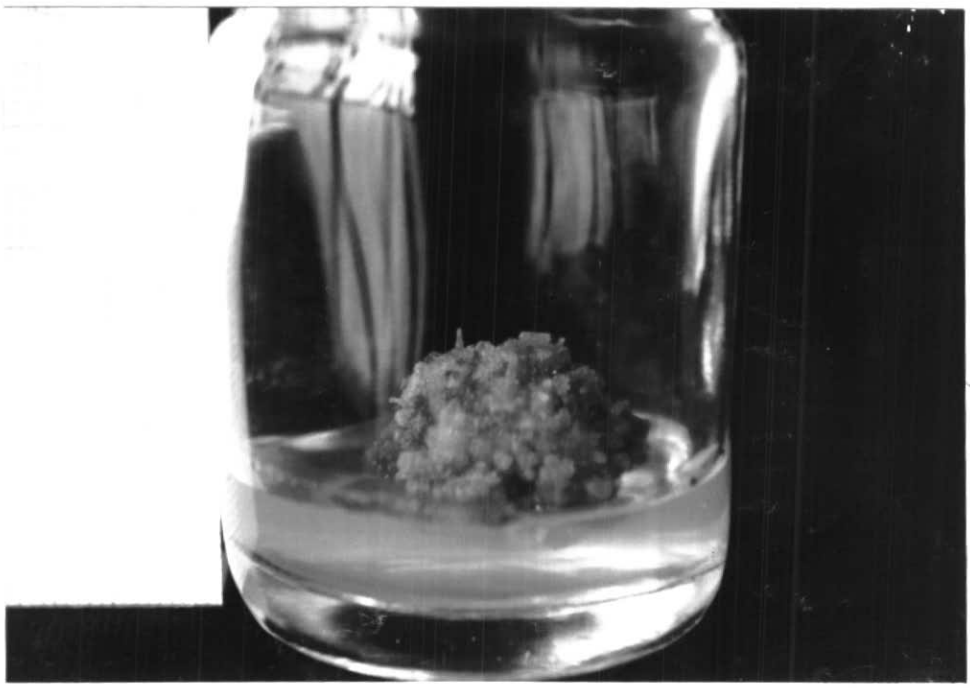
ตาราง 8 น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) ของแคลลัสหัว เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับ ไคเนติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 12 สัปดาห์

NAA (ppm) \ kinetin (ppm)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
1.0	(51) 1.17	(56) 1.87	(61) 3.07	(66) 1.48	(71) 2.05
2.0	(52) 1.59	(57) 1.48	(62) 2.55	(67) 1.68	(72) 1.95
3.0	(53) 0.85	(58) 1.54	(63) 1.90	(68) 2.28	(73) 1.80
4.0	(54) 1.31	(59) 1.24	(64) 2.23	(69) 1.38	(74) 1.74
5.0	(55) 1.68	(60) 2.24	(65) 1.87	(70) 2.18	(75) 1.64

หมายเหตุ ( ) หมายถึงอาหารสูตรที่ 51 - 75



ภาพประกอบ 6 เนื้อเยื่อหัวที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ร่วมกับไคเนติน ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์



ภาพประกอบ 7 แคลลัสหัวที่เจริญได้ดีและมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด บนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA 1.0 ppm. ร่วมกับ ไคเนติน 2.0 ppm.

การทดสอบหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงและหัวร้อยรูที่เก็บจากธรรมชาติ

การทดสอบสารที่สกัดได้จากหัวร้อยรู ส่วนใบ (สารสกัด ก.) ส่วนหัว (สารสกัด ข.) แคลลัสใบ (สารสกัด ค.) แคลลัสใบที่เลี้ยงในอาหารโดยไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (สารสกัด ง.) แคลลัสหัว (สารสกัด จ.) และแคลลัสหัวที่เลี้ยงโดยไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (สารสกัด ฉ.) ผลปรากฏว่า สารที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ เมื่อหยด ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ ลงในสารละลายเกิดตะกอนสีส้ม และเมื่อหยดเมเยอร์ รีเอเจนต์ ลงในสารละลายเกิดตะกอนสีขาวขุ่นแสดงว่าสารที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ นั้น เป็นสารอัลคาลอยด์ (ตาราง 9)

ตาราง 9 ผลการทดสอบสารที่สกัดได้จากส่วนใบ หัว แคลลัสใบ แคลลัสใบที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 แคลลัสหัวและแคลลัสหัวที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6

สารละลาย	ผลการทดสอบ	
	ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์	เมเยอร์ รีเอเจนต์
สารสกัด ก.	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น
สารสกัด ข.	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น
สารสกัด ค.	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น
สารสกัด ง.	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น
สารสกัด จ.	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น
สารสกัด ฉ.	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น

ตาราง 11 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติ (ก) และแคลลัสใบ (ค)

กลุ่มตัวอย่าง	n	$\bar{X}$	S	t
สารสกัด ก.	5	0.13	0.01	22.6027
สารสกัด ค.	5	0.262	0.0084	

$t\ (8,\ 0.01_{(2)}) = 3.355$

จากตาราง 10 และ 11 จะเห็นว่า น้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบมากกว่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้สถิติ t-test แสดงว่า ปริมาณของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 12 น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสใบ (ค) และแคลลัสใบที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ง)

ครั้งที่	น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ (กรัม)	
	สารสกัด ค.	สารสกัด ง.
1	0.26	0.24
2	0.25	0.23
3	0.27	0.25
4	0.26	0.26
5	0.27	0.27

ตาราง 13 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบ (ค) และแคลลัสใบที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ง)

กลุ่มตัวอย่าง	n	$\bar{X}$	S	t
สารสกัด ค.	5	0.262	0.0084	1.4996
สารสกัด ง.	5	0.25	0.0158	

$$t(8,\ 0.01_{(2)}) = 3.355$$

จากตาราง 12 และ 13 จะเห็นว่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบแตกต่างกับน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้สถิติ t-test แสดงว่า ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบกับแคลลัสใบที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 14 น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากหัวธรรมชาติ (ข) และแคลลัสหัว (จ)

ครั้งที่	น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ (กรัม)	
	สารสกัด ข.	สารสกัด จ.
1	0.10	0.21
2	0.12	0.24
3	0.11	0.22
4	0.09	0.23
5	0.10	0.24

ตาราง 15 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากหัวธรรมชาติ (ข) และแคลลัสหัว (จ)

กลุ่มตัวอย่าง	n	$\bar{X}$	S	t
สารสกัด ข.	5	0.104	0.0114	16.0362
สารสกัด จ.	5	0.228	0.0130	

$$t(8,\ 0.01_{(2)}) = 3.355$$

จากตาราง 14 และ 15 จะเห็นว่า น้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสหัวมากกว่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากหัวธรรมชาติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้สถิติ t-test แสดงว่า ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสหัวกับหัวธรรมชาติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 16 น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสหัว (จ) และแคลลัสหัวที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ฉ)

ครั้งที่	น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ (กรัม)	
	สารสกัด จ.	สารสกัด ฉ.
1	0.21	0.20
2	0.24	0.22
3	0.22	0.23
4	0.23	0.21
5	0.24	0.19

ตาราง 17 ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสหัว (จ) และแคลลัสหัวที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 (ฉ)

กลุ่มตัวอย่าง	n	$\bar{X}$	S	t
สารสกัด จ.	5	0.228	0.0130	1.9672
สารสกัด ฉ.	5	0.21	0.0158	

$t(8,\ 0.01_{(2)}) = 3.355$

จากตาราง 16 และ 17 จะเห็นว่า น้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสหัวแตกต่างกับน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสหัวที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้สถิติ t-test แสดงว่า ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสหัวกับแคลลัสหัวที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5

สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

การชักนำให้ชิ้นส่วนเจริญเป็นแคลลัส

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและส่วนหัวของหัวร้อยรู บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงพบว่า เนื้อเยื่อใบและเนื้อเยื่อหัวสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ในอาหารทุกสูตร เนื้อเยื่อใบเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 1 - 50 (ตาราง 1, 2) ในช่วง 2 สัปดาห์แรกใบขยายใหญ่และหนาขึ้น สัปดาห์ที่ 4 เกิดแคลลัสสีขาวรอบรอยตัดและเส้นกลางใบและเกิดรากจากนั้นแคลลัสขยายใหญ่ขึ้นตามลำดับ เนื้อเยื่อหัวเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 51 - 75 (ตาราง 3) เริ่มเกิดแคลลัสรอบรอยตัดในสัปดาห์ที่ 5 - 6 จากนั้นก็ขยายใหญ่ขึ้นตามลำดับ และบางสูตรมีรากเกิดขึ้น สตรีท (Street. 1977 : 271) ได้อธิบายว่าบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืชจะมีสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นสารที่ชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ขึ้น และการแบ่งเซลล์จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องได้ เนื่องจากมีสารเร่งการเจริญเติบโตมาช่วยส่งเสริมการทำงานจนกระทั่งได้เป็นแคลลัส ฉะนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและส่วนหัวของหัวร้อยรูสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ เพราะสารเร่งการเจริญเติบโตบริเวณรอยแผลที่ถูกตัดและสารเร่งการเจริญเติบโต ที่เติมลงไปในอาหาร

แคลลัสใบเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสหัวเจริญได้ดีมีน้ำหนักสดมากที่สุดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าการเจริญของเนื้อเยื่อหัวและใบเป็นแคลลัสนั้น เนื้อเยื่อต่างชนิดกันในพืชชนิดเดียวกัน ต้องการออกซินทั้งชนิดและความเข้มข้นที่เหมือนกัน แต่ต้องการไซโตไคนินทั้งชนิดและความเข้มข้นที่ต่างกัน มีรายงานของสกุกและมิลเลอร์ (Skoog and Miller. 1975 : 116 - 131) ว่าการเกิดเป็นต้น ราก หรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณออกซินและไซโตไคนินที่เติมลงในอาหาร และรายงานของโอคาซาวา และคนอื่น ๆ (Okazawa and others. 1966 : 866 - 869) ว่า

การเติมออกซินและไซโตไคนินลงในอาหาร ไซโตไคนินจะช่วยส่งเสริมปฏิกิริยาในการทำงานของออกซิน และทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตดีขึ้น ทำให้แคลลัสเจริญมากขึ้น อัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินในระดับต่าง ๆ ทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อแตกต่างกันออกไป

ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและหัวร้อยรูที่เก็บจากธรรมชาติ

เมื่อนำหัวร้อยรูส่วนใบ ส่วนหัว แคลลัสใบและแคลลัสหัวไปสกัดหาปริมาณสารอัลคาลอยด์ ปรากฏว่า อัลคาลอยด์จากแคลลัสใบและแคลลัสหัวมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าจากใบธรรมชาติและหัวธรรมชาติตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้สถิติ t-test แสดงว่า ปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสหัวกับหัวธรรมชาติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและส่วนหัว มีมากกว่าสารอัลคาลอยด์จากใบและหัวที่เก็บจากธรรมชาติ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อครั้งนี้ได้ใช้อาหารสูตร MS ซึ่งประกอบด้วยสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ดังแสดงในภาคผนวก เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของอาหารแล้วจะเห็นได้ว่า สารละลายเข้มข้นที่ 6 เช่น ไธอะมีน กรดนิโคตินิค ไพริดอกซิน อินอซิทอล เป็นสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นเบส สารดังกล่าวอาจจะเป็นสารตั้งต้นของสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นเบสชนิดอื่นที่ไม่ใช่สารอัลคาลอยด์ และจะถูกสกัดออกมาพร้อมกับสารอัลคาลอยด์ได้ เช่น ไนอะซีนเป็นสารตั้งต้นของ NAD และ NADP ไธอะมีนเป็นสารตั้งต้นของ thiamine pyrophosphate, thiamine triphosphate, thiamine monophosphate ไพริดอกซินเป็นสารตั้งต้นของ pyridoxal phosphate อินอซิทอลรวมตัวกับไดกลีเซอไรด์กลายเป็นฟอสโฟกลีเซอร์ไรด์ได้ (มนตรี จุฬาวัฒนพล และคณะ; 2530 : 403 - 414) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เพาะเลี้ยงแคลลัสใบและแคลลัสหัวบนอาหารสูตร MS และ MS ที่ไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 แล้วหาปริมาณสารอัลคาลอยด์ของแคลลัสที่มีอายุ

เท่ากัน พบว่าปริมาณสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากแคลลัสใบและแคลลัสหัว เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสใบและแคลลัสหัวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 มีปริมาณแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารละลายเข้มข้นที่ 6 ไม่มีผลต่อการสร้างสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นเบสชนิดอื่นที่ไม่ใช่สารอัลคาลอยด์ทั้งในแคลลัสใบและแคลลัสหัว แต่จากการทดลองพบว่าการเลี้ยงแคลลัสโดยไม่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6 มีผลต่อการเจริญของแคลลัสเล็กน้อยกล่าวคือต้องใช้เวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้นอีก 2 สัปดาห์แคลลัสจึงจะมีขนาดใหญ่พอกันกับแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารละลายเข้มข้นที่ 6

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาชนิดของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสและหัวร้อยรูที่ปลูกตามธรรมชาติ

2. ควรศึกษาเกี่ยวกับความแก่อ่อนของเนื้อเยื่อหัวในการเจริญเป็นแคลลัส เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้เนื้อเยื่อหัวมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นแคลลัสไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งขึ้นอยู่กับตัวแปรบางประการ เช่น ความแก่อ่อนของเนื้อเยื่อ ซึ่งมีส่วนสัมพันธ์กับการขับสารประกอบฟีนอลิกและตำแหน่งของเนื้อเยื่อซึ่งมีผลต่อการเจริญเป็นแคลลัส

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ถิรพงศ์ ญานิสราพงธ์. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2528. อัดสำเนา.

ประยงค์ ดงนคร. การเพาะเมล็ดและการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดทุเรียนนก. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2528. อัดสำเนา.

ประยุทธ สุพรรณวิบูล. ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสบัวแก้ว. ปัญหาพิเศษ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2524. อัดสำเนา.

ปราโมทย์ ศรีอภิรมย์. ชุมนุมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์หอสมุดกลาง, 2524.

ผกามาศ เขมะจารี. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเกล็ดปลาเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.

พัฒน์ สุจำนงค์. ตำราไทย – จีน ยากลางบ้าน ยาสมุนไพรยาแผนโบราณ. กรุงเทพฯ : กรุงสยามการพิมพ์, 2524.

พรรณภา ชุมศรี. เภสัชวินิจฉัยเล่ม 2. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529.

มนตรี จุฬาวัฒนชล และคนอื่น ๆ. ชีวเคมี. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัด ค.ส., 2530.

ศศิเกษม ทองยงค์. เคมีอินทรีย์เล่ม 2. กรุงเทพฯ : วิทยาลัยครูจันทรเกษม, 2526.

สำเริง ทีเจริญ. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่งเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นสภาพธรรมชาติ. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.

สมบัติ พุ่มสาขา. การศึกษาผลของสมุนไพรต่อหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยแอลลอกแซน. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.

อุษา สุนันทารอด. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหนวดแมวเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.

Ammirato, P.V. and others. Hand Book of Plant Cell Culture V.3. London : Collier Macmillan. 1984.

Arora, I.K. and R.N. Singh. "Growth Hormone and in Vitro Callus Formation of Papaya," Scientia Horticulture. 8 : 357 - 361, 1978.

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

Dhoot G. K. and G.G. Henshaw. "Organization and Alkaloids Production in Tissue Cultures of Hyoscyamus niger," Annals of Botany. 41 : 943 - 949, 1977.

Furuya, T., A. Ikuta and K. Syono. "Alkaloids form Callus Tissue of Papaver somniferum," Phytochemistry. 11 : 3041 - 3044, 1975.

Ikuta, A., K. Syono and T. Furaya. "Alkaloids in Plants Regenerated form Coptis Callus Culture," Phytochemistry. 14 : 1209 - 1210, 1975.

Kamimura, S. and M. Nishikawa. "Growth and Alkaloids Production of the Cultured Cell of Papaver bracteatum," Agricaltural and Biological Chemistry," 40 (5) : 907 - 911, 1976.

Kurz , S. Forest Flora of British Burma V.2. Dehra Dun : New Connaught Press. 1974.

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

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

Pierik, R.L.M. In Vitro Culture of Higher Plants. Dordrecht : Martinus Nijhoff, 1987.

Sharp, W.R. and others. "Production of Coffea arabica Callus of Three Ploidy Levels and subsequent Morphogenesis," Phyton. 31 : 67 - 74, 1973.

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

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

Tabata M. and others "Organization and Alkaloid Production in Tissue Cultures of Scopolia parviflora," Phytochemistry. 11 : 949 - 955, 1972.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS ดัดแปลง

1. เตรียมสารละลายเข้มข้น 100 เท่าของความเข้มข้นในอาหาร

1.1 สารละลายเข้มข้นที่ 1

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

1.2 สารละลายเข้มข้นที่ 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 สารละลายเข้มข้นที่ 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 สารละลายเข้มข้นที่ 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 สารละลายเข้มข้นที่ 5

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.784	กรัม
Na_2 EDTA	2.724	กรัม
H_2O (distilled)	1000	มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายเข้มข้น 200 เท่าของความเข้มข้นในอาหาร

สารละลายเข้มข้นที่ 6

Inositol	2.0	กรัม
Nicotinic acid	0.01	กรัม
Pyridoxin HCl	0.01	กรัม
Thiamine HCl	0.002	กรัม
Glycine	0.04	กรัม
H_2O (distilled)	100	มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารเร่งการเจริญเติบโต ทำเป็น สารละลายเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารเร่งการเจริญเติบโต คือ NAA, BA, kinetin อย่างละ 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์

1. ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ (Dragendorf's reagent)

มีวิธีเตรียมสารละลายดังนี้

1.1 ชั่งบิสมัส ซับไนเตรท (bismuth subnitrate) 4 กรัม ละลายในสารละลายกรดไนตริก (30% w/v) 6 มิลลิลิตร

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

นำสารละลายทั้ง 2 ชนิด ผสมเข้าด้วยกัน เติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะให้ตะกอนสีส้มกับสารอัลคาลอยด์

2. เมเยอร์ รีเอเจนต์ (Mayer's reagent) มีวิธีเตรียมสารดังนี้

2.1 ชั่งเมอร์คิวริค คลอไรด์ (mercuric chloride) 0.68 กรัมละลายในน้ำ 30 มิลลิลิตร

2.2 ชั่งโปตัสเซี่ยม ไอโอไดด์ 2.5 กรัม ละลายในน้ำ 30 มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้ง 2 ชนิด ผสมเข้าด้วยกัน เติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะให้ตะกอนสีขาวขุ่นกับสารอัลคาลอยด์

การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณ (น้ำหนัก) สารอัลคาลอยด์จากแคลลัสกับต้นธรรมชาติ

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

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวน้ำค้าง ชื่อสกุล สาคร

เกิดวันที่ 5 เดือนกรกฎาคม	พุทธศักราช 2505
สถานที่เกิด	อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 3/1978 ซอยทหารอากาศ ถนนพหลโยธิน 52
	ตำบลคลองถนน เขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์ 1 ระดับ 3
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนสามแยกคลองหลอแหล ถนนรามคำแหง
	ตำบลสะพานสูง เขตบึงกุ่ม กรุงเทพฯ

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2523 เตรียมอุดมศึกษา จากโรงเรียนธรรมโชติศึกษาลัย

พ.ศ. 2525 ป.กศ.สูง (วิทยาศาสตร์) จากวิทยาลัยครูกาญจนบุรี

พ.ศ. 2528 กศ.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน

พ.ศ. 2533 กศ.ม. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวร้อยรูเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นธรรมชาติ

บทคัดย่อ

ของ

น้ำค้าง สาคร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา

กรกฎาคม 2533

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวร้อยรู (Hydnophytum formicarum Jack) โดยนำส่วนใบและส่วนหัวมาชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) ดัดแปลงโดยการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อใบสร้างแคลลัสได้ดีและมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด (3.04 กรัมต่อขวด) สำหรับเนื้อเยื่อหัวเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างแคลลัสได้ดีและมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด (3.07 กรัมต่อขวด)

จากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารอัลคาลอยด์ระหว่างใบธรรมชาติกับแคลลัสใบและหัวธรรมชาติกับแคลลัสหัว พบว่าในแคลลัสใบและแคลลัสหัวจะมีปริมาณมากกว่าที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

A COMPARISON OF ALKALOIDS QUANTITY IN *Hydnophytum formicarum* JACK CULTURE AND IN THE INTACT PLANT.

AN ABSTRACT

BY

NAMKANG SAKORN

A disseration submitted in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Eduction degree in Biology

at Srinakharinwirot University

July 1990

Calluses of Hydnophytum formicarum Jack were cultured from tubers and leaves in modified MS (Murashige and Skoog. 1962) medium. The highest average fresh weight of calluses from cultured leaves (3.04 g/ bottle) were produced on the modified MS medium with 1.0 and 3.0 milligrams per liter of NAA and BA respectively. For the cultured tubers, the highest average fresh weight (3.07 g/bottle) were produced in the medium with 1.0 and 2.0 milligrams per liter of NAA and kinetin respectively.

The amount of alkaloids from leave calluses were weighed more than that obtained from natural leaves. Tuber calluses also produced more alkaloids than natural tubers at 99% confidence level.