581.0724
ล 712 ก
ฉ. 3

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่งเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นสภาพธรรมชาติ

ปริญญานิพนธ์

ของ

ลำเริง ทีเจริญ

6 พ.ค. 2535
ห้องสมุดบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2530

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178313

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่งเพื่อหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับต้นสภาพธรรมชาติ

บทคัดย่อ

ของ

สำเริง ทีเจริญ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2530

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและส่วนลำต้นของทองพันชั่ง (Rhinacanthus nasutus (Linn.) Kurz) บนสูตรอาหารแข็ง MS (Murashige and Skoog. 1962) และ MS ดัดแปลงที่เติม NAA (α-naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อของใบอ่อน เกิดแคลลัสได้ดี มีขนาดใหญ่และน้ำหนักสดมากที่สุด สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลำต้นอ่อนบนสูตรอาหารแข็ง MS ดัดแปลง ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อของลำต้นอ่อนเกิดแคลลัสได้ดีมีขนาดใหญ่และน้ำหนักสดมากที่สุด เมื่อนำแคลลัสของใบและแคลลัสของลำต้นไปสกัดหาปริมาณอัลคาลอยด์เปรียบเทียบกับใบสภาพธรรมชาติ ลำต้นสภาพธรรมชาติ และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ two-sample t-test พบว่าปริมาณอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสใบมากกว่าใบธรรมชาติและปริมาณอัลคาลอยด์จากแคลลัสลำต้นมากกว่าลำต้นธรรมชาติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

A COMPARISON OF ALKALOIDS QUANTITY IN *Rhinacanthus nasutus* (LINN.) KURZ. TISSUE CULTURE AND IN THE INTACT PLANT

AN ABSTRACT

BY

SOMROENG TEECHAREARN

Presented in partial fulfillment of the requirement

for the Master of Education degree

at Srinakharinwirot University

February 1987

The purpose of this investigation was to compare quantities of alkaloids obtained from cultured calluses and intact plants of Rhinacanthus nasutus (Linn.) Kurz. Plants tissue culture techniques were applied for callus formation. Sections of leaves and stems were aseptically cultured on the MS (Murashige and Skoog. 1962) medium and the modified MS media supplement with NAA and BA. The leaves and stems did not develope callus on the MS medium. The blade tissue most effective in callus formation was located on modified MS medium containing NAA at 1.0 mg/l and BA at 1.0 mg/l while best results of the stem tissue were obtained on the modified MS medium containing NAA at 1.0 mg/l and BA at 2.5 mg/l

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

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำนิสิตและกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธาน

..... กรรมการ

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

..... กรรมการ

..... กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยคำแนะนำ และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก อาจารย์อรพินท์ แก้วลาย ประธานกรรมการที่ปรึกษา ดร. สุนันท์ ชุนชาติประเสริฐ กรรมการที่ปรึกษา และอาจารย์อุรุพีร์ ปัญจะ ผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คุณอุษา สุนันทาโรจน์ และคุณผกามาศ เขมะจารี ที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างการทดลองและการถ่ายภาพ

ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้การสนับสนุนการศึกษามาตลอด ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ รวมทั้งคุณลักขณา อึ้งเจริญ ที่ให้กำลังใจและได้มีส่วนช่วยเหลือให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สำเริง ทีเจริญ

สารบาญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	3
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	3
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	4
	เวลาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า	4
2	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาค้นคว้า	5
	เอกสารที่เกี่ยวกับทองพันชั่งและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	5
	ปัจจัยสำคัญเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	6
	งานวิจัยเกี่ยวกับอัลคาลอยด์	9
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	12
	ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	12
	การทดลองที่ 1 การศึกษาชักนำให้ยอดส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัสเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม	15
	การทดลองที่ 2 การเพิ่มปริมาณแคลลัสใบและแคลลัสลำต้นให้มากเพื่อใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสม	15
	ตอนที่ 2 การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ	16

สารบาญ

บทที่		หน้า
	วิธีการสกัด	16
	การทดสอบอัลคาลอยด์	17
	การวิเคราะห์ข้อมูล	18
4	ผลการศึกษาค้นคว้า	19
	ผลการทดลองที่ 1 การศึกษายักนำให้ยิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัสเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม	19
	ผลการทดลองที่ 2 การเพิ่มปริมาณแคลลัสใบและแคลลัสลำต้นให้มากขึ้นเพื่อใช้สกัดสารอัลคาลอยด์	46
	ผลการหาปริมาณสารอัลคาลอยด์ของแคลลัสและต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ	47
5	สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	51
	จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	51
	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	51
	การวิเคราะห์ข้อมูล	52
	สรุป และอภิปรายผล	53
	ข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม		56
ภาคผนวก		60

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปริมาณของ NAA และ BA ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ดัดแปลง	13
2	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบ ในสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลงที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตในระดับต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 1 เดือนและ 2 เดือน	20
3	แสดงน้ำหนักสดแคลลัสใบเฉลี่ย เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน	29
4	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนสำต้นบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตในระดับต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 1 เดือนและ 2 เดือน	33
5	แสดงน้ำหนักสดแคลลัสสำต้นเฉลี่ย เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน	43
6	น้ำหนักของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสมเป็นเวลา 1 เดือน	46
7	ผลการทดสอบสารที่สกัดได้จากแคลลัสและต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ด้วยดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ และเมเยอร์ รีเอเจนต์	47
8	น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ	48
9	ค่าสถิติ t สำหรับน้ำหนักอัลคาลอยด์เฉลี่ยจากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ	49
10	น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสสำต้นกับสำต้นธรรมชาติ	50
11	ค่าสถิติ t สำหรับน้ำหนักอัลคาลอยด์เฉลี่ยจากแคลลัสสำต้นกับสำต้นธรรมชาติ	50

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

12 แสดงสารประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหาร Murashige and Skoog. (1962) 61

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS_1 เป็นเวลา 1 เดือน และ 2 เดือน 25

2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BA ในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน 26

3 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BA ในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน 27

4 แคลลัสใบที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและน้ำหนักสดมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บนสูตรอาหาร MS_8 28

5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดแคลลัสใบเฉลี่ยกับสารเร่งการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน 31

6 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS_1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และ 2 เดือน 39

7 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อลำต้นทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BA ในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน 40

8 การเจริญเติบโตยองเนื้อเยื่อทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BA ในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน 41

ปัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

9 แคลลัสใบที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและน้ำหนักสดมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บนสูตรอาหาร MS_{11} 42

10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดแคลลัสสำต้นเฉลี่ยกับสารเร่งการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน 45

11 แผนภูมิการสกัดสารอัลคาลอยด์ 64

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

มนุษย์รู้จักใช้พืชสมุนไพรบำบัดและรักษาโรคมาตั้งแต่สมัยโบราณ สมุนไพรมีแหล่งกำเนิดมาจากพืชและสัตว์ การนำมาใช้ยังมิได้มีการแปรสภาพ หรือสกัดเอาสารออกด้วยกรรมวิธีทางเคมี แต่เดิมมนุษย์รู้จักพืชที่เป็นยาจากการสังเกต ประสบการณ์แบบลองผิดลองถูก และการบอกเล่าต่อ ๆ กันมา เนื่องจากความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ในสมัยก่อนยังไม่เจริญ โดยเฉพาะด้านเคมี ทำให้ไม่ทราบมูลฐานทางเภสัชวิทยาอย่างแท้จริง ปัจจุบันวิชาการทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเทคโนโลยีได้เจริญก้าวหน้า สามารถสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ ได้รวดเร็วเป็นผลดีมาก แต่ยาประเภทสมุนไพรก็มิได้ลดความสำคัญลงไป เพราะเป็นการยอมรับโดยทั่วไปแล้วว่า ในบางกรณีโรคบางอย่างไม่อาจรักษาให้หายด้วยยาแผนปัจจุบัน แต่เมื่อทำการรักษาด้วยยาประเภทสมุนไพรตามตำรับยาแผนโบราณ ผู้ป่วยกลับหายเป็นปกติได้ ทั้งนี้เพราะว่าพืชสมุนไพรมีสารประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloid) กลูโคไซด์ (glucoside) เรซิน (resin) และแทนนิน (tannin) ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อร่างกายคน สัตว์ และพืช การใช้ในปริมาณที่เหมาะสมจะมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรคต่างๆ ได้ดี แต่ถ้าใช้ในปริมาณมากเกินไป อาจจะเป็นพิษหรือทำให้เสพติดได้ (พยอม ตันติวัฒน์ 2521: 202) พืชสมุนไพรมิได้มีประโยชน์ในการบำบัดโรคเท่านั้น แต่ยังมีประโยชน์เป็นยาบำรุงหัวใจ ยาอายุวัฒนะ และช่วยให้เจริญอาหารอีกด้วย

ในขณะนี้นักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยได้หันมาสนใจศึกษาพืชสมุนไพรกันมาก เพราะยังมีสารอื่นอีกเป็นจำนวนมาก ที่ยังไม่สามารถสังเคราะห์ได้หรือทำได้แต่ค่าใช้จ่ายสูง จึงนิยมสกัดสารจากพืชสมุนไพรเช่นเดิม เพราะนอกจากใช้สารที่สกัดได้จากพืชโดยตรงแล้ว ยังมีตัวยาชนิดอื่นอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สารที่ได้จากพืช เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ตามต้องการ

ฉะนั้นการเรียนรู้เกี่ยวกับสมุนไพรคงมีอยู่คู่ไปกับการแพทย์ปัจจุบัน (จำลอง เพ็งคล้าย 2516: 2)

ต้นทองพันชั่งเป็นพืชสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่นิยมใช้บำบัดรักษาโรคต่าง ๆ อาทิเช่น โรคปอดระยะเริ่มแรก โรคผิวหนัง กลากเกลื้อน (ชัยโย ชัยญาญทิพยุทธ 2522: 38) รักษาโรคเบาหวานตามตำรับของ เชษฐา พยากรณ์ (เชษฐา พยากรณ์ 2525: 71) และตามตำรับพระวัยวาตุตาลโย วัดเทพพนมยงค์ จังหวัดสระบุรี (นพรัตน์ พัฒนเงิน 2527 : 44) พรทิพา ทิชา และคนอื่น ๆ ได้รายงานผลวิจัยของสมุนไพร ในการต้านเซลมะเร็งทั้งในสัตว์ทดลองและหลอดทดลอง โดยใช้พืชสมุนไพรแต่ละชนิด ได้แก่ เจตมูลเพลิงขาว เจตมูลเพลิงแดง ฝาง ทองพันชั่ง ย่อย ชมันขัน โทงเทง ฟ้าทะลายโจร แพงพวยฝรั่ง ตองตึง รางจืด และโล่ติ้น (พรทิพา ทิชา และคนอื่น ๆ 2528: 10) จากการวิเคราะห์สารเคมีที่พบในต้นทองพันชั่งพบว่ามีสารอัลคาลอยด์ที่ใบและลำต้น (สุภาพ บุณยะรัตเวช และคนอื่น ๆ 2523: 157-196) ฟาร์นส์เวอร์ธได้รายงานว่าสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากพืชแหล่งต่าง ๆ นั้น เมื่อให้สารชนิดนี้ทางปากของหนูทดลอง พบว่าสามารถทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดต่ำลงได้ (Farnsworth, 1966: 240)

จากความสำคัญและประโยชน์ดังกล่าว ทองพันชั่งจึงเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจชนิดหนึ่งควรแก่การนำมาศึกษาวิจัย ประกอบกับยังไม่มีการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่ง เพื่อสกัดสารอัลคาลอยด์มาก่อน จึงเห็นสมควรนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ เพื่อการผลิตสารเคมีจากพืชที่ต้องการ ก่อให้เกิดประโยชน์ทางวิทยาศาสตร์สาขาอื่น ๆ เช่น วิทยาศาสตร์การแพทย์ เภสัชวิทยา ตลอดจนสามารถทำเป็นอุตสาหกรรมการผลิตสารเคมีจากพืช เป็นต้น นอกจากนี้ช่วยประหยัดพื้นที่และการดูแลรักษา ซึ่งต่างจากการปลูกในสภาพธรรมชาติ ต้องใช้พื้นที่มาก สิ้นเปลืองค่าดูแลรักษา

วัตถุประสงค์การทดลอง

จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนของทองพันชั่ง บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ MS ดัดแปลงที่มีประสิทธิภาพ ยักนำให้เนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดและน้ำหนักสดมากที่สุด

2. เปรียบเทียบปริมาณสารอัลคาลอยด์ จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกับทองพันชั่งที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำให้ทราบสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง ที่ยักนำเนื้อเยื่อของทองพันชั่งให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่และน้ำหนักสดมากที่สุด

2. เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อสกัดสารเคมีในเชิงอุตสาหกรรม

3. เพื่อประโยชน์ทางเภสัชวิทยา

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่งมีดังนี้

1.1 สูตรอาหาร MS

1.2 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตได้แก่ BA (6-benzyladenine) NAA (α-naphthalene acetic acid) ลงในสูตรอาหารในระดับความเข้มข้นเป็นอัตราส่วนต่างกัน

2. เนื้อเยื่อทองพันชั่งที่ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ ใบอ่อนและลำต้นอ่อน

3. การวิจัยนี้ส่กัดหาสารอัลคาลอยด์ในแคลสัส์ใบและแคลสัส์ลำต้นเปรียบเทียบกับใบธรรมชาติและลำต้นธรรมชาติ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. สูตรอาหาร MS หมายถึงสูตรอาหารแข็งมาตรฐานของมูราชิกิและส่กุก (Murashige and Skoog 1962: 473-497)

2. แคลสัส์ (callus) หมายถึงกลุ่มเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cell) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นหรือราก

3. แคลสัส์ใบ หมายถึงแคลสัส์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ

4. แคลสัส์ลำต้น หมายถึงแคลสัส์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้น

5. การส่กัด (extraction) หมายถึงการแยกส่ารออกจากของผสม โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะส่ม (สุภาพ บุณยะรัตเวช 2511 : 19)

6. อัลคาลอยด์ (alkaloid) โดยทั่วไปหมายถึงส่ารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic) ที่มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่หนึ่งอะตอมขึ้นไป มีส่มบัติเป็นเบส มีรส่ขมเป็นส่ารที่มีผลต่อระบบประส่าทส่วนกลาง อัลคาลอยด์หลายชนิดใช้ทำยารักษาโรค (Hegnauer. 1963: 389-425, Noller. 1957: 648-654)

เวลาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า

เริ่มทดลองเมื่อ 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2526

สิ้นสุดการทดลองเมื่อ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2529

สถานที่ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาค้นคว้า

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับทองพันชั่งและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทองพันชั่ง (Rhinacanthus nasutus (Linn.) Kurz) วงศ์ Acanthaceae (เต็ม สมิตินันท์ 2523 : 287) มีลักษณะทั่วไปดังนี้คือ

ลักษณะต้น เป็นไม้พุ่มตั้งเลื้อย ชอบความชื้น สูง 1-2 เมตร ลำต้นกลมมีขนสั้น ๆ บริเวณข้อพองเล็กน้อย ใบออกตรงข้ามกัน ลักษณะยาวรี ปลายมนฐานใบเรียวเล็ก ใบยาว 3-7 เซนติเมตร กว้าง 2-3 เซนติเมตร มีสีเขียวอมเหลือง และมักพบมีจุดด่างสีเหลือง ๆ ในใบตอนหน้าแล้ง ท้องใบมีเส้นใบเห็นชัดเจน ก้านใบสั้น ดอกอาจเป็นดอกเดียวหรือเป็นช่อ มี 2-3 ดอกก็ได้ ไม่มีก้านดอก กลีบเลี้ยงสีเขียวเล็กสั้น ๆ ติดกันเป็นหลอดสีเขียวอ่อน ปลายแยกออกเป็น 5 กลีบ สีขาว มี 2 กลีบติดกันชี้พุ่งขึ้น และอีกพวกหนึ่งมี 3 กลีบติดกันชี้ลง ทำให้ดูคล้ายกับนกกระยางสีขาวกำลังบิน เกสรตัวผู้มี 2 อัน อยู่ติดกับกลีบดอก รังไข่มี 2 อันติดกัน ก้านเกสรตัวเมียปลายแยก 2 เส้น ผลลักษณะกลมยาว เมล็ดมี 4 หรือน้อยกว่า (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ 2522: 37)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) เป็นการนำเอาอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งที่มีชีวิตของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล ไวตามิน และสารเร่งการเจริญเติบโต (plant growth regulator) ในสภาพปลอดเชื้อ และสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้แก่ แสงสว่าง ความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืช ชิ้นส่วนของพืชจะเจริญไปเป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์ หรือเป็นเอมบริออยด์ (embryoid) หรือแคลลัส แล้วกลายเป็นต้นในที่สุด (อรดี สหวัชรินทร์ 2522: 34-43)

ปัจจัยสำคัญเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ต้องพิจารณาเกี่ยวกับตำแหน่งของชิ้นส่วน อายุของพืช ขนาดของเนื้อเยื่อและความสมบูรณ์ของต้นพืช (Murashige. 1974: 170) ส่วนต่าง ๆ ที่นำมาเพาะเลี้ยงคือปลายยอด ปลายราก ตา ใบ สำต้น อับเรณู เมล็ดอ่อน รังไข่ และเนื้อเยื่อส่วนอื่นที่ยังอ่อนอยู่ (Meyer. 1976: 486)

2. อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนประกอบของอาหารเป็นตัวกำหนดอัตราการเจริญของเซลล์ในการเพาะเลี้ยง และอัตราส่วนของสารแต่ละอย่างจะแตกต่างกันตามชนิดของพืช สารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีดังนี้

2.1 สารอนินทรีย์ ประกอบด้วยแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แบ่งเป็นธาตุอาหารหลัก ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน โปตัสเซียม ฟอสฟอรัส กำมะถัน แคลเซียม และมักเนเซียม (Murashige. 1962: 476) ส่วนธาตุอาหารรองได้แก่ เหล็ก คลอรีน แมงกานีส สังกะสี ไอโอดีน ทองแดง โบรอน โมลิบดินัม และโคบอลท์ (Murashige and Skoog. 1962: 477)

2.2 สารอินทรีย์ ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรท ซึ่งเป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ ซูโครสและกลูโคส กลุ่มของไวตามินซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ไธอามิน (thyamine) ไนอาซิน (niacine) กรดนิโคทินิค (nicotinic acid) ไพรีดอกซิน (pyredoxine) ไบโอติน (biotin) กรดแพนโททินิค (panthothenic acid) และอินโนซิทอล (inositol) (White. 1951: 231-242) กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อและส่งเสริมการเกิดราก ได้แก่ ไกลซีน (glycine) อาร์จินิน (anginin) และกรดแอสพาติค (aspartic acid) (Murashige. 1974: 170) ส่วนสารที่เร่งการเจริญเติบโต ได้แก่ ออกซิน (auxin) มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดราก การแบ่งเซลล์ และการยืดตัวของเซลล์ สารกลุ่มนี้ที่นิยม

ใช้คือ 2, 4-D(2, 4-dichlorophenoxy acetic acid) NAA (α-naphthalene acetic acid), IAA (indole acetic acid), IBA (indole butyric acid) (Murashige. 1974: 135-166, Skoog and Miller. 1957: 118-131) ไซโตไคนิน (cytokinin) มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ สารกลุ่มนี้ที่นิยมใช้คือ BA (6-benzyladenine) และไคเนติน (Biale. 1978: 1-23) สำหรับความเข้มของสารเร่งการเจริญเติบโตที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ควรอยู่ในช่วง 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 น้ำมีความจำเป็นต่อระบบการทำงานต่าง ๆ ของเซลล์ที่มีชีวิต (Meyer. 1976: 485-487)

3. สภาพอาหาร เนื้อเยื่อพืชบางชนิดเจริญได้ดีในอาหารเหลว แต่บางชนิดเจริญได้ดีในอาหารแข็ง

4. การทำความสะอาดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงต้องปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นสิ่งจำเป็นมาก การทำทุกขั้นตอนและเครื่องมือที่ใช้จะต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

5. ความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยที่สำคัญมาก เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญเติบโตระหว่าง 5.0-6.5 (Puhan and Martin. 1967: 13)

6. สภาพแวดล้อม ได้แก่ แสงและอุณหภูมิ แสงช่วยเปลี่ยนแปลงทางกายภาพไม่ได้มีจุดมุ่งหมายเพื่อการสังเคราะห์แสง แต่ช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ (morphogenesis) ความเข้มของแสง 1,000 ลักซ์ เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อ ระยะเวลาให้แสงขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ปกตินิยมให้แสงแก่พืชประมาณ 16 ชั่วโมง หรือน้อยกว่า 16 ชั่วโมงกับพืชบางชนิด (Murashige. 1974: 135-166) ส่วนอุณหภูมิพืชแต่ละ

ชนิดต้องการอุณหภูมิต่างกันสำหรับพืชเมืองร้อน และพืชสัมลุกควรให้อุณหภูมิช่วง 25-27 องศาเซลเซียส (Murashige, 1914: 170)

ในต่างประเทศได้มีการขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ประเภทหัว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก่อน เช่น การขยายพันธุ์ต้น Hyacinths (Pierik and Ruibing. 1973: 129-138) ดันส์แตน และซอร์ท ทำการเพาะเลี้ยงส่วนล่างของหัว Allium porrum สูตรอาหารBDS ซึ่งเติม 2ip (N^6_{γ}, γ-Dimethylallylamino purine) ความเข้มข้น 6.0-8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1.0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าเกิดยอดจำนวนมาก (Dunstan and Short. 1979: 37-43)

ตากายามาและมิซาวา (Takayama and Misawa) ได้เพาะเลี้ยงส่วนกลีบของหัวลิลลี่บนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเนื้อเยื่อเกิดเป็นหัวและเจริญได้ดี (Takayama and Misawa. 1980: 121-125)

อัญชลี เต็มวิชชาการ ได้ทดลองเพาะเลี้ยงมันฝรั่งพันธุ์ C.V. Compagon และพันธุ์ C.V. Spunta โดยใช้ปลายยอดอ่อน ตาข้างและตายอด ในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรกับไคเนตินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าในเวลา 12 สัปดาห์ ปลายยอดอ่อนจะสร้างแคลลัส ส่วนตาข้างและตายอดจะเจริญไปเป็นต้นอ่อน (อัญชลี เต็มวิชชาการ 2521: 1)

ชุติมา คุณาไทย ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของบอนสี 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์รัวแดง พันธุ์พระเจ้าเดนมาร์ค พันธุ์นายทองแก้ว และพันธุ์พันเรือง บนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง 3 สูตรในที่มืด ปรากฏว่าอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใบมีการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีในเวลา 2 เดือน ยกเว้นพันธุ์พันเรืองพบว่าอาหารสูตรที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไคเนตินความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

(ชุติมา คุณาไทย 2526 : 50)

เกศรินทร์ ภูมิศรีแก้ว ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดหัวตองตึง (Coriosa superba Linn.) โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วน ก ข และ ค (ส่วน ก คือยอดส่วน 1 ยอดส่วน ซึ่งอยู่ตรงกลาง ส่วน ข ถัดจากส่วน ก ทั้งสองข้าง แต่ไม่รวมส่วน ค ส่วน ค คือปลายสุดทั้งสองข้าง) บนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าส่วน ก และ ข เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด มีน้ำหนักสดมากที่สุด และที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน ค เกิดยอด จำนวน 2 ยอด (เกศรินทร์ ภูมิศรีแก้ว 2527: 81-82)

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอัลคาลอยด์

เฮกเนอร์ (Hegnauer) ได้อธิบายเกี่ยวกับสารอัลคาลอยด์ไว้ว่าเป็นสารที่มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยเฮเทอร์โรไซคลิกไนโตรเจน (heterocyclic nitrogen) และพืชสังเคราะห์ขึ้นจากกรดอะมิโนหรืออนุพันธ์ที่ยังกลาง (immediate derivative) ส่วนมากจะพบสารอัลคาลอยด์ในพืชบางชนิดเท่านั้น (Hegnauer. 1963: 389) ในระยะ 10 ปีที่แล้วมาในประเทศอเมริกา สารจากพืชที่อยู่ในข่ายสนใจคือสารที่ใช้บำบัดรักษาโรคมะเร็ง มีนักวิจัยนำพืชประมาณ 7,500 ชนิดมาสกัด เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ในการบำบัดเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง การวิจัยครั้งนี้ได้รับแรงกระตุ้นจากการพบสารวินบลาสติน (Vinblastine) และสารวินคริสติน (Vincristine) จากต้นแพงพวยฝรั่ง (Vinca resea Linn.) ซึ่งสารทั้งสองเป็นอัลคาลอยด์ชนิดหนึ่ง// (วิเชียร สีรวงค์ และพยอม ตันติวัฒน์ 2520: 43)

เดลเฟล และรอทฟุส (Delfel and Rothfus) ได้ทดลองนำเอาใบและลำต้นของ Cephalotaxus harringtonia ไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมไฮโปแซนทิน (hypoxanthins) NAA และไคเนติน พบว่าจะเกิดแคลลัสภายใน 7-21 วัน

นำแคลลัสไปสกัดสารเพื่อวิเคราะห์ พบว่ามีสารซีฟาโลทาซีน (Cephalotaxine) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็งได้ อยู่ในแคลลัสที่ได้จากใบและแคลลัสที่ได้จากลำต้น แคลลัสเดือนที่ 6 มีอัลคาลอยด์มากกว่าเดือนที่ 3 ประมาณ 2-6 เท่า และมากกว่าต้นจากธรรมชาติซึ่งมีอัลคาลอยด์เพียง 1-3 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (Delfel and Rothful, 1977: 1595-1598)

ชินซุกิ และยาตาซาวา (Shinsuke and Yatazawa) ได้เพาะเลี้ยงลำต้นและรากของ Rauwolfia serpentina บนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนตินความเข้มข้น 0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเกิดแคลลัสภายใน 4 สัปดาห์ นำแคลลัสไปสกัดตรวจหาสารอัลคาลอยด์ พบว่าแคลลัสจากรากมีอัลคาลอยด์ชนิดแอจมาลิน (ajmaline) 10-20 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และแคลลัสจากต้นมีแอจมาลิน 1-10 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2, 4-D แต่ไม่เติมไคเนติน พบว่าจะทำให้แอจมาลินลดลง (Shinsuke and Yatazawa. 1979: 2297-2304)

เจน และซาฮู (Jain and Sahoo) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดของ Solanum verbascifolium Linn. เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 เดือน โดยมีการตัดแบ่งแคลลัสทุก 6-8 สัปดาห์ ในห้องที่มีอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส และมีแสงสว่าง จากนั้นนำแคลลัสที่มีอายุ 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ไปสกัดหาสารอัลคาลอยด์ พบว่าแคลลัสที่มีอายุ 6 สัปดาห์มีสารอัลคาลอยด์ไดออสจีนิน (diosgenin) มากที่สุด ส่วนแคลลัสอายุ 8 สัปดาห์ มีอัลคาลอยด์โซลาโซดีน (solasodine) มากที่สุด ส่วนแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์กับ 4 สัปดาห์ มีอัลคาลอยด์ไดออสจีนินและโซลาโซดีนน้อยกว่า (Jain and Sahoo. 1981: 1765-1767)

อิคูตา และอิโตกาวา (Ikuta and Itokawa) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัส Thalictrum minus บนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ

5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของสาร 2, 4-D มีความสัมพันธ์กับการผลิตอัลคาลอยด์ในแคลลัส โดย 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจพบอัลคาลอยด์ 8 ชนิด และ 2, 4-D ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจพบ 4 ชนิด โดยพบอัลคาลอยด์เบอร์เบอร์รีน (berberine) ในแคลลัส 0.67 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่ในใบและต้นธรรมชาติมี 0.0019 เปอร์เซ็นต์ (Ikuta and Itokawa. 1982: 1419-1421)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

วิธีทดลอง

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การเตรียมอาหาร

1.1 เตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) 6 stockของอาหารสูตร MS ดังตาราง 12 ภาคผนวก

1.2 เตรียมสารเร่งการเจริญเติบโต โดยชั่ง NAA 0.01 กรัมแล้วละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์จำนวนเล็กน้อย แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และชั่ง BA 0.01 กรัมละลายใน NaOH เล็กน้อยแล้วเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3 การเตรียมสูตรอาหาร MS

1.3.1 นำ stock 1-5 อย่างละ 10 มิลลิลิตร และ stock 6 จำนวน 5 มิลลิลิตรผสมกัน เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม ค่อย ๆ คนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 5.6 ด้วย 1N.HCl และ 1N.NaOH แล้วอุ่นให้ร้อน

1.3.2 นำวุ้น (agar) 8 กรัม เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร หลอมวุ้นให้ละลาย จากนั้นนำสารละลายจากข้อ 1.3.1 ผสมกับวุ้นให้เข้ากันในภาชนะขนาดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร

1.4 การเตรียมสูตรอาหาร MS ดัดแปลง วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.3 แต่เพิ่ม NAA และ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 25 สูตร (ตาราง 1)

1.5 นำสารละลายที่เตรียมบรรจุใส่ขวดเท่า ๆ กัน ขวดละ 15 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา

1.6 นึ่งฆ่าเชื้อขวดที่บรรจุอาหารด้วยเครื่องนึ่งอัด (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

1.7 ปล่อยให้อาหารเย็น อาหารจะแข็งตัว พร้อมที่จะนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป

ตาราง 1 ปริมาณของ NAA และ BA ที่เติมลงในสูตรอาหาร Modified Murashige and Skoog. (1962)

BA (mg/l) \ NAA (mg/l)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
0.5	MS_2	MS_7	MS_{12}	MS_{17}	MS_{22}
1.0	MS_3	MS_8	MS_{13}	MS_{18}	MS_{23}
1.5	MS_4	MS_9	MS_{14}	MS_{19}	MS_{24}
2.0	MS_5	MS_{10}	MS_{15}	MS_{20}	MS_{25}
2.5	MS_6	MS_{11}	MS_{16}	MS_{21}	MS_{26}

$MS_{2, 3, 4, \ldots 26}$ เป็นหมายเลขแสดงลำดับสูตรอาหารที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยให้ MS_1 เป็นสูตรที่ 1 และไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต

2. การเตรียมเครื่องมือ

2.1 ใช้อลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil) หุ้มเครื่องมือผ่าตัดและจานเพาะเชื้อให้มิดชิด ขวดบรรจุน้ำกลั่น ขวดเปล่าสำหรับบรรจุน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัดความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

2.2 เช็ดตะเกียงอัลกอฮอล์และขวดบรรจุอาหารด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ทุกครั้ง ก่อนนำเข้าตู้ถ่ายขวด

2.3 ทำความสะอาดมือผ่าตัด ปากคีบ ทุกครั้งในขณะที่ใช้โดยจุ่มในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วลนไฟทำซ้ำ 3 ครั้ง

3. การทำความสะอาดชิ้นส่วนเนื้อเยื่องทองพันชั่งที่ใช้เพาะเลี้ยง

3.1 นำใบคู่ที่ 2 ของทองพันชั่ง ล้างให้สะอาดด้วยผงซักฟอกและตัดบริเวณที่เป็นแผลหรือฝอกที่เป็นตำแหน่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ทิ้งไปแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ปราศจากเชื้อ

3.2 นำไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อลดแรงตึงผิว และเป็นการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นแรก นาน 1-2 นาที

3.3 นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พร้อมกับเขย่าเบา ๆ นาน 7-10 นาที

3.4 นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที กระบวนสุดท้ายนี้จะได้ชิ้นส่วนที่ปราศจากเชื้อพร้อมที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ต่อไป

3.5 นำลำต้นปล้องที่ 1 และ 2 ไปทำความสะอาดตามวิธีข้อ 3.1-3.4

4. การตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ปราศจากเชื้อ ทำภายในตู้ถ่ายขวดดังนี้ ใบอ่อนตัดให้มีขนาดประมาณ 7x7 ตารางมิลลิเมตร ลำต้นอ่อนตัดเป็นท่อนยาวขนาดประมาณ 7 มิลลิเมตร

5. นำเนื้อเยื่อข้อ 4 ใส่ในขวดอาหาร 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด ให้ส่วนของเนื้อเยื่อสัมผัสกับอาหาร ปิดฝาขวด ฆ่าเชื้อที่ผิวนอกขวดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำขวดอาหารที่มีเนื้อเยื่อไปวางบนชั้นวางขวด ให้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาด 40 วัตต์ ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นาน 12 ชั่วโมงต่อวันที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส แต่ละสูตรอาหาร ทำการทดลอง 10 ขวด

<u>ระยะการชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัสและการเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มีปริมาณมากขึ้น</u>

<u>การทดลองที่ 1</u> การศึกษาชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัส เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมมีขั้นตอนดังนี้

1. นำเนื้อเยื่อส่วนใบที่ตัดขนาดประมาณ 7x7 ตารางมิลลิเมตร ไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง

2. นำเนื้อเยื่อส่วนลำต้นที่ตัดขนาดยาวประมาณ 7 มิลลิเมตรไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลง โดยวางตามแนวนอน

การนำชิ้นส่วนใบและลำต้นไปเพาะเลี้ยงไม่ว่าจะเป็น ข้อ 1 หรือ 2 ต่างก็ใช้อาหารแข็ง 26 สูตร และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่

3. บรรยายการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่เกิดในเดือนที่ 1 และเดือนที่ 2

4. ถ่ายภาพแคลลัสเดือนที่ 1 และเดือนที่ 2 ชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสที่เกิดขึ้นทุกสูตรอาหาร เมื่อเลี้ยงได้ 2 เดือน

<u>การทดลองที่ 2</u> การเพิ่มปริมาณแคลลัสใบและแคลลัสลำต้นให้มากขึ้น เพื่อใช้ในการสกัดสารอัลคาลอยด์ โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสม

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอายุ 2 เดือน จากการทดลองที่ 1 มาตัดแบ่งขนาดประมาณ 7x7x7 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ชั่งน้ำหนักสดแล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสมสูตรเดิมเป็นเวลา 1 เดือน ชั่งแคลลัสหาน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น

ตอนที่ 2 การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

วิธีการสกัดสาร (Method of Extraction) มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมสิ่งที่จะนำมาสกัด โดยนำแคลลัสใบ แคลลัสลำต้น ใบธรรมชาติและลำต้นธรรมชาติมาอบแห้งแล้วบดให้ละเอียด

2. นำแคลลัสใบที่บดละเอียดหนัก 10 กรัม ไปสกัดในเครื่องสกัดซอกซ์เลต (soxhlet) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายที่ได้ไประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) จะได้สิ่งสกัดละลายสิ่งสกัดด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เจือจาง 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 150 มิลลิลิตร สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร เพื่อสกัดสารประกอบที่ไม่ใช่สารอัลคาลอยด์ออก นำชั้นน้ำไปปรับ pH เท่ากับ 2 ด้วยกรดซัลฟูริก แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ปล่อยให้สารละลายเย็น ปรับสารละลายให้เป็นเบสด้วยโซเดียมไฮโดรเจน คาร์บอเนต ($NaHCO_3$) แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดไปล้างด้วยน้ำ นำชั้นคลอโรฟอร์มมาเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เพื่อดูดซับน้ำส่วนที่เหลือ นำสารละลายมากรองแล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไประเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมดจะได้สารอัลคาลอยด์ลักษณะเหนียวข้น (ภาพประกอบ 11 ภาคผนวก) ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

3. นำแคลลัสลำต้นที่บดละเอียดหนัก 10 กรัม ไปสกัดสารอัลคาลอยด์ตามวิธีสกัดในข้อ 2

4. นำใบที่บดละเอียดหนัก 10 กรัม ไปสกัดสารอัลคาลอยด์ตามวิธีสกัดในข้อ 2

5. นำลำต้นที่บดละเอียดหนัก 10 กรัม ไปสกัดสารอัลคาลอยด์ตามวิธีสกัดในข้อ 2

การทดสอบอัลคาลอยด์ (Test for alkaloids)

1. การเตรียมสารที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์

1.1 ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ (Dragendorff's reagent) มีวิธีเตรียมสารละลายดังนี้

1.1.1 บิ่งบิสมัท ซับไนเตรต (bismuth subnitrate) 4 กรัม ละลายในสารละลายกรดไนตริก (30% W/V) 6 มิลลิลิตร

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

เมื่อต้องการใช้ ผสมสาร 2 ชนิดเข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะให้ตะกอนสีส้มกับสารอัลคาลอยด์

1.2 เมเยอร์ รีเอเจนต์ (Mayer's reagent) มีวิธีเตรียมสารละลายดังนี้

1.2.1 บิ่งเมอร์คิวริค คลอไรด์ (mercuric chloride) 0.68 กรัม ละลายในน้ำ 30 มิลลิลิตร

1.2.2 บิ่งโปตัสเซียม ไอโอไดด์ 2.5 กรัม ละลายในน้ำ 5 มิลลิลิตร

เมื่อต้องการใช้ผสมสาร 2 ชนิดเข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้ให้ตะกอนสีขาวกับสารอัลคาลอยด์

2. วิธีการทดสอบอัลคาลอยด์

ละลายอัลคาลอยด์ที่สกัดได้ ปริมาณเล็กน้อยในเอทานอล 2 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลายที่ใช้ทดสอบลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีของตะกอนจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. หาน้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากการสกัด

2. วิเคราะห์ข้อมูล ความแตกต่างของปริมาณอัลคาลอยด์ จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ โดยใช้ t-test (two sample t-test)

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

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า
ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผลการทดลองที่ 1 การศึกษายักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัส เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของใบ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของใบอ่อน พบว่าสูตรอาหาร MS_1 เนื้อเยื่อส่วนใบมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น มีสีเขียวแต่ไม่มีการสร้างแคลลัสขึ้นเลย (ภาพประกอบ 1) ส่วนสูตรอาหาร MS_2 MS_3 ... MS_{26} ทุกสูตรอาหารเนื้อเยื่อส่วนใบสามารถเจริญสร้างแคลลัสได้ดี แคลลัสทั้งหมดเจริญเติบโตจากบริเวณรอบ ๆ รอยตัดทั้ง 4 ด้านของเนื้อเยื่อ โดยในช่วงระยะเวลา 1 เดือนแรก ใบขยายขนาดใหญ่และมีแคลลัสเกิดขึ้น ขนาดแตกต่างกันตามความเข้มข้นของระดับสารเร่งการเจริญเติบโต (ตาราง 2 และภาพประกอบ 2) ในช่วงระยะเวลาเดือนที่ 2 แคลลัสมีการเจริญเติบโตมากขึ้น ขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดือนที่ 1 ลักษณะของแคลลัสมีสีเขียวตรงกลาง บริเวณรอบนอกมีสีน้ำตาลปนสีเหลืองอ่อน เป็นก้อนขรุขระเกาะตัวอัดแน่น (ตาราง 2 และภาพประกอบ 3)

สูตรอาหารที่ยักนำให้เนื้อเยื่อส่วนใบเจริญเติบโตเป็นแคลลัสมีขนาดใหญ่และน้ำหนักสดมากที่สุดคือ สูตรอาหาร MS_8 ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัม (ภาพประกอบ 4) อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงไปจนสิ้นสุดเดือนที่ 2 พบว่าการเพาะเลี้ยงส่วนใบบนทุกสูตรอาหาร แคลลัสไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอด ลำต้นหรือรากเลย น้ำหนักสดของแคลลัสขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต ที่เติมลงในสูตรอาหาร (ตาราง 3 และภาพประกอบ 5)

ตาราง 2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลงที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตในระดับต่าง ๆ กันเป็นเวลา 1 เดือน และ 2 เดือน

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ใบอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_1	-	-	1	มีสีเขียวไม่เกิดแคลลัส
			2	มีสีเขียวขยายขนาดเล็กน้อย ไม่เกิดแคลลัส
MS_2	0.5	0.5	1	ใบมีสีเขียวขยายขนาด เกิดแคลลัสเล็กน้อย
			2	ใบมีขนาดขยาย เกิดแคลลัสรอบรอยตัดเพิ่มขึ้น
MS_3	0.5	1.0	1	เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อนรอบรอยตัด
			2	แคลลัสเติบโตมากขึ้น ลักษณะเป็นก้อนอัดแน่น สีเขียวปนสีน้ำตาล
MS_4	0.5	1.5	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัสรอบรอยตัด สีเขียวปนสีน้ำตาล มีสีขาวฟูบางแห่ง
			2	เกิดแคลลัสปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นก้อนขรุขระ สีเขียวจางปนสีน้ำตาล
MS_5	0.5	2.0	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัสสีเขียวจางตรงกลางสีเข้ม
			2	ใบขยายขนาดเพิ่มขึ้น แคลลัสเติบโตมากขึ้น
MS_6	0.5	2.5	1	ใบขยายขนาดมีสีเขียวเข้ม เกิดแคลลัสเล็กน้อย
			2	เกิดแคลลัสขนาดเพิ่มขึ้น ลักษณะเป็นก้อนขรุขระ สีเขียวอมสีน้ำตาล

ห้องสมุดบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ใบอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_7	1.0	0.5	1	เกิดแคลลัสรอบรอยตัด ลักษณะเป็นก้อนขรุขระ สีเขียว มีสีขาวฟู ๆ โดยรอบ
			2	ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นกว่าเดิม สีเขียวปนสีน้ำตาล
MS_8	1.0	1.0	1	ใบขยายขนาด เกิดแคลลัสรอบ ๆ รอยตัด ลักษณะเป็นก้อนขรุขระสีเขียวปนเหลืองอ่อน
			2	แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นมีขนาดใหญ่ที่สุด มีสีเขียวปนเหลือง ด้านบนมีสีขาว
MS_9	1.0	1.5	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัส มีสีเขียวจาง
			2	แคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม ลักษณะขรุขระชัดแน่น สีน้ำตาลอ่อน
MS_{10}	1.0	2.0	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัสรอบรอยตัดชัดแน่น มีสีเขียวปนเหลือง
			2	แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น มีสีเหลืองปนสีน้ำตาล
MS_{11}	1.0	2.5	1	เกิดแคลลัสเป็นก้อนขรุขระสีเขียวอ่อนปนสีน้ำตาล
			2	แคลลัสเติบโตมากขึ้นกว่าเดิม

178318

ตาราง 2 (ต่อ)

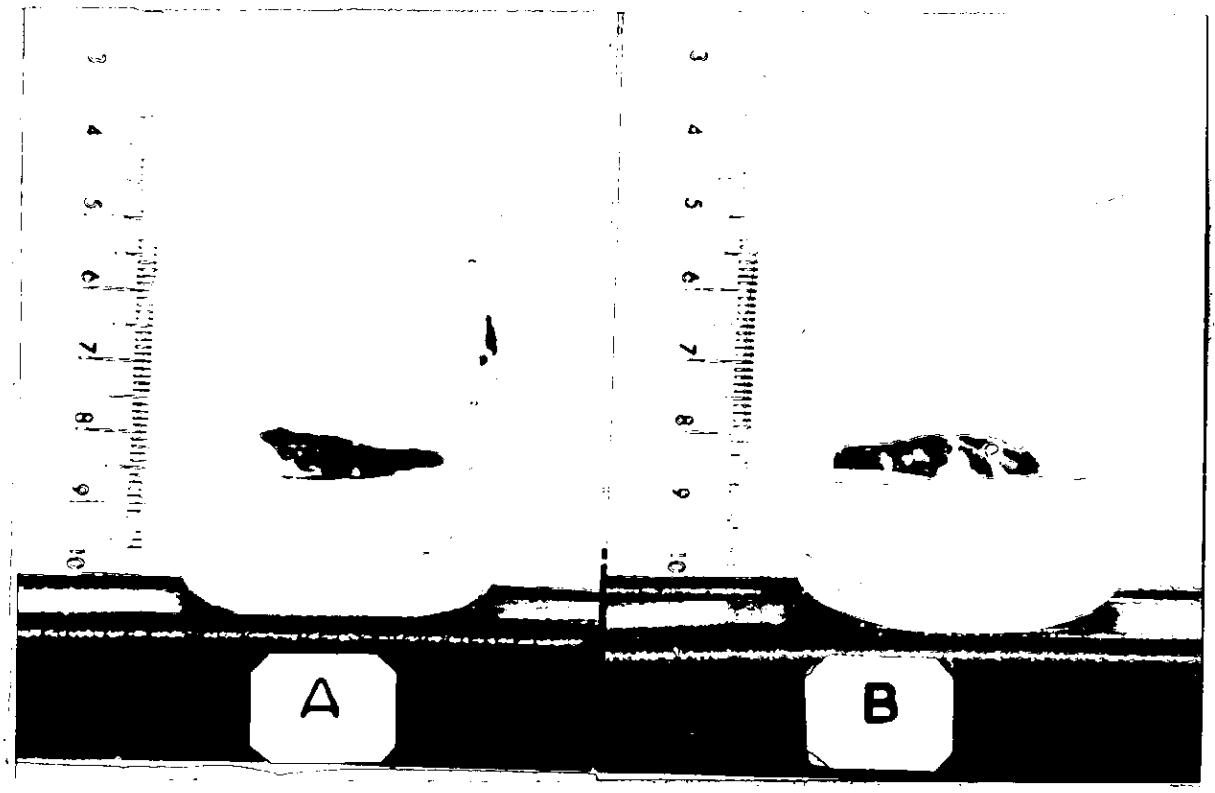
สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ใบอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_{12}	1.5	0.5	1	เกิดแคลลัสลักษณะขรุขระสีเขียว
			2	แคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม สีเขียวเข้ม
MS_{13}	1.5	1.0	1	เกิดแคลลัสลักษณะขรุขระมีสีเขียว
			2	แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มขนาดขึ้น มีสีเขียวปนเหลือง
MS_{14}	1.5	1.5	1	เกิดแคลลัสขนาดเล็กสีเขียว
			2	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น
MS_{15}	1.5	2.0	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัสขนาดเล็ก
			2	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากกว่าเดิม มีสีเหลืองอ่อน
MS_{16}	1.5	2.5	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัสเป็นก้อนขรุขระสีเขียวอ่อน
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากขึ้น ลักษณะขรุขระสีเขียวปนเหลือง มีสีขาวลักษณะฟูโดยรอบ
MS_{17}	2.0	0.5	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัส ลักษณะเป็นก้อนขรุขระสีเขียวอมเหลือง
			2	แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณมากขึ้น มีสีเขียวปนสีน้ำตาล

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ใบอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_{18}	2.0	1.0	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัสเล็กน้อย
			2	แคลลัสเพิ่มปริมาณจากเดิมเล็กน้อย
MS_{19}	2.0	1.5	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัสรอบรอยตัด สีเขียวปนเหลือง
			2	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น ลักษณะอัดแน่น มีสีเขียวอ่อน มีสีขาวลักษณะฟูล้อมรอบ
MS_{20}	2.0	2.0	1	ใบขยายขนาดเกิดแคลลัส สีเขียวอ่อนเป็นก้อนขรุขระ
			2	แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มขนาดขึ้น สีเขียวอมเหลือง เป็นก้อนขรุขระอัดแน่น
MS_{21}	2.0	2.5	1	เกิดแคลลัสลักษณะขรุขระ ตรงกลางมีสีเขียวเข้ม รอบ ๆ มีสีเขียวปนเหลืองอ่อน
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากขึ้น สีเขียวปนเหลือง
MS_{22}	2.5	0.5	1	ใบขยายขนาดเล็กน้อย เกิดแคลลัสตรงบริเวณรอยตัดน้อย
			2	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้นกว่าเดิม สีเขียวปนสีน้ำตาล

ตาราง 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ใบอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_{23}	2.5	1.0	1	เกิดแคลลัสรอบรอยตัด สีเขียวปนเหลือง
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากขึ้นเป็นก้อนขรุขระ สีเหลืองปนสีน้ำตาล
MS_{24}	2.5	1.5	1	เกิดแคลลัสปริมาณน้อยบริเวณรอยตัด
			2	แคลลัสเจริญเติบโตขยายขนาดเพิ่มขึ้น ขนาดใหญ่
MS_{25}	2.5	2.0	1	เกิดแคลลัสขนาดปานกลางสีเขียวอ่อน
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมีขนาดใหญ่ เป็นก้อนขรุขระสีเขียวปนสีน้ำตาล ลักษณะอัดแน่น
MS_{26}	2.5	2.5	1	เกิดแคลลัสรอบ ๆ รอยตัด มีสีเขียวจางปนเหลือง
			2	แคลลัสเติบโตเพิ่มปริมาณมาก มีขนาดใหญ่ มีลักษณะอัดแน่น

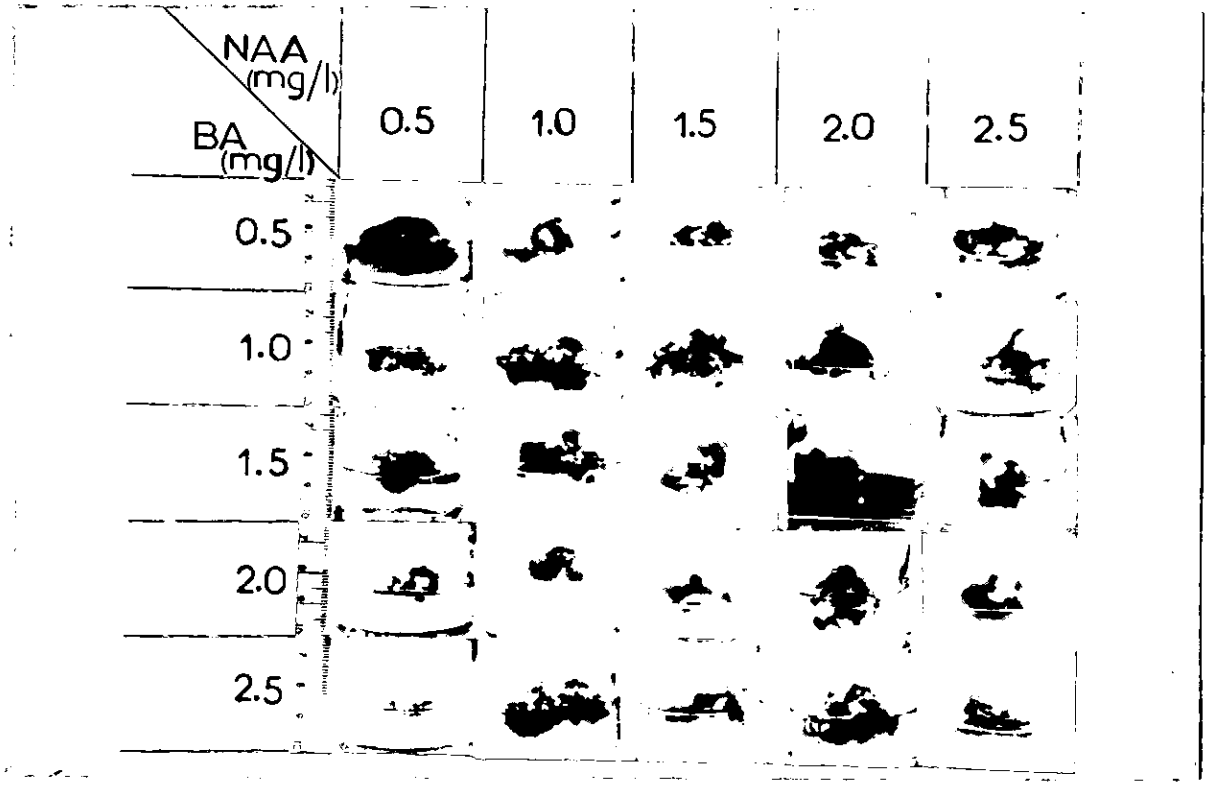


ภาพประกอบ 1 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS_1

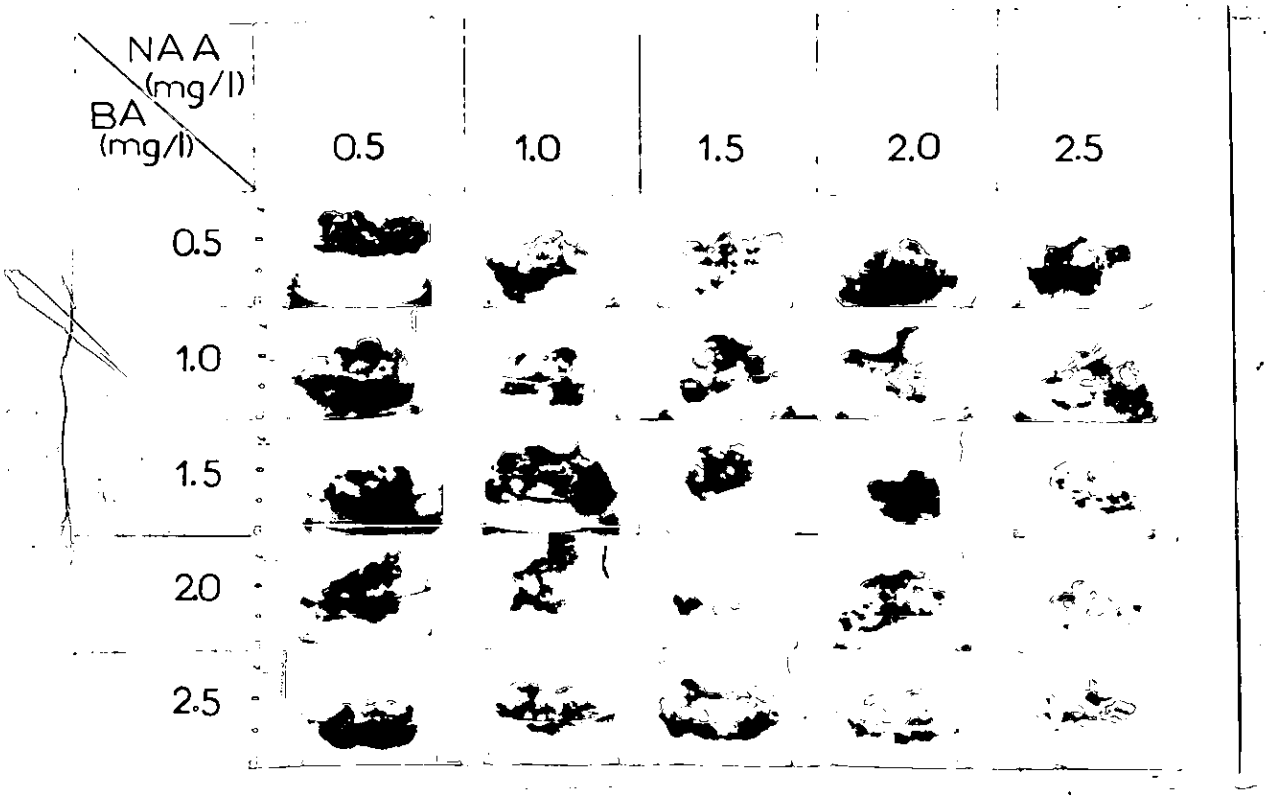
A เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

B เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

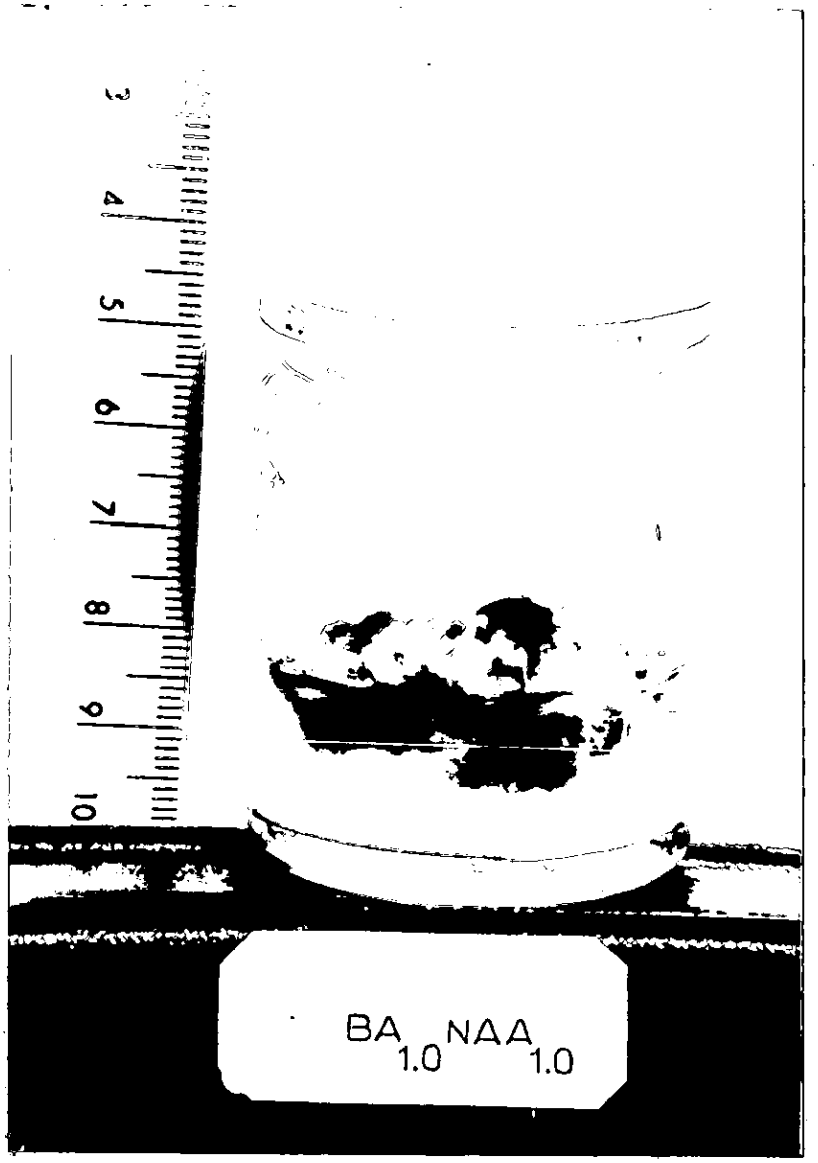
ยันส่วนใบอ่อน



ภาพประกอบ 2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BA ในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพประกอบ 3 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนใบทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BA ในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน



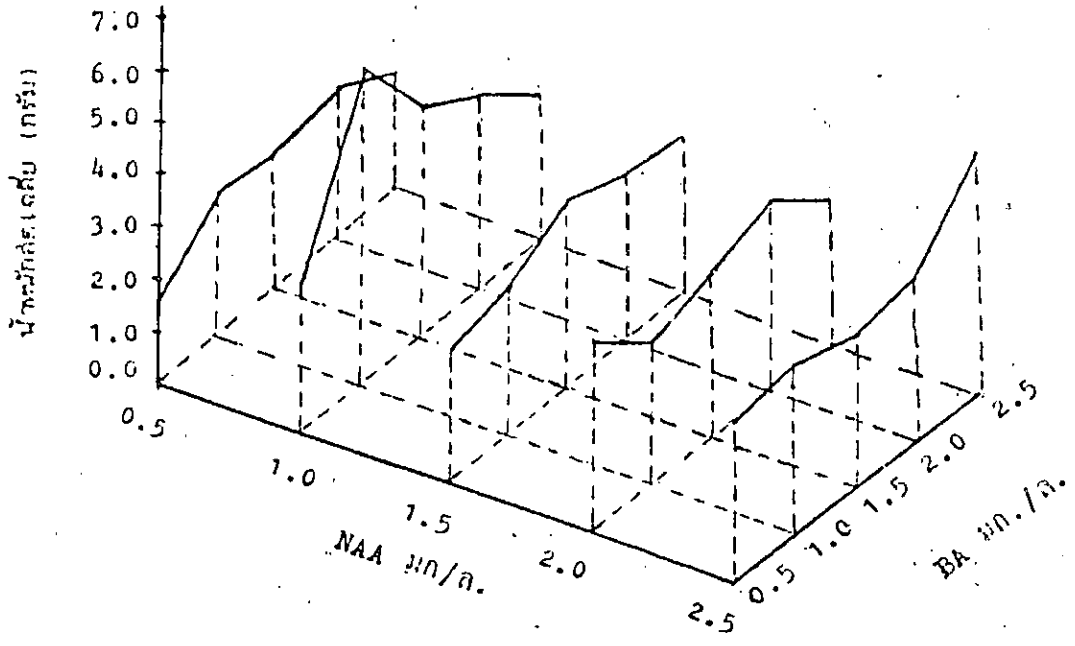
ภาพประกอบ 4 แคลลัสใบที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและน้ำหนักสดมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บนสูตรอาหาร MS_8

ตาราง 3 แสดงน้ำหนักสดแคลลัสใบเฉลี่ยเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	
MS_1	-	-	-
MS_2	0.5	0.5	1.67
MS_3	0.5	1.0	2.89
MS_4	0.5	1.5	2.54
MS_5	0.5	2.0	3.01
MS_6	0.5	2.5	2.38
MS_7	1.0	0.5	3.06
MS_8	1.0	1.0	6.01
MS_9	1.0	1.5	4.50
MS_{10}	1.0	2.0	3.71
MS_{11}	1.0	2.5	2.89
MS_{12}	1.5	0.5	2.78
MS_{13}	1.5	1.0	3.11
MS_{14}	1.5	1.5	3.70
MS_{15}	1.5	2.0	3.03
MS_{16}	1.5	2.5	3.21
MS_{17}	2.0	0.5	3.77
MS_{18}	2.0	1.0	2.98

ตาราง 3 (ต่อ)

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	
MS_{19}	2.0	1.5	3.56
MS_{20}	2.0	2.0	3.65
MS_{21}	2.0	2.5	2.89
MS_{22}	2.5	0.5	2.98
MS_{23}	2.5	1.0	3.20
MS_{24}	2.5	1.5	3.34
MS_{25}	2.5	2.0	3.40
MS_{26}	2.5	2.5	4.71



ภาพประกอบ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดแคลลัสใบเฉลี่ยกับสารเร่งการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลำต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้น พบว่าสูตรอาหาร MS_1 ในช่วงระยะเวลาเดือนที่ 1 เนื้อเยื่อของลำต้นขยายขนาด มีสีเขียวเข้ม ไม่มีการสร้างแคลลัส แต่ในช่วงระยะเวลาเดือนที่ 2 มีแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อย (ภาพประกอบ 6) ส่วนสูตรอาหาร MS_2, MS_3, ... MS_{26} ในช่วงระยะเวลาเดือนที่ 1 พบว่าทุกสูตรอาหาร เนื้อเยื่อส่วนลำต้นสามารถเจริญเติบโตเป็นแคลลัส แคลลัสเจริญเติบโตจากบริเวณตรงรอยตัดของเนื้อเยื่อทั้งสองข้าง ลักษณะของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นคือในช่วงระยะเวลาเดือนที่ 1 เนื้อเยื่อส่วนลำต้นมีการขยายขนาดใหญ่ และมีแคลลัสเกิดขึ้น ขนาดแตกต่างกัน ตามความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต ที่เติมลงในสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง (ตาราง 4 และภาพประกอบ 7) ส่วนช่วงระยะเวลาเดือนที่ 2 แคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ขนาดใหญ่กว่าเดือนที่ 1 ลักษณะเป็นก้อนขรุขระ เกาะตัวอัดแน่น มีสีเขียวอ่อนปนสีน้ำตาล และบางแคลลัสมีสีขาว ลักษณะฟูโดยรอบ (ตาราง 4 และภาพประกอบ 8)

สูตรอาหารที่ชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนลำต้น เจริญเติบโตเป็นแคลลัสที่มีขนาดใหญ่และน้ำหนักสดมากที่สุดคือสูตรอาหาร MS_{11} ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพประกอบ 9) ขนาดและน้ำหนักของแคลลัสขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต ที่เติมลงในสูตรอาหาร (ตาราง 5 และภาพประกอบ 10) เมื่อเพาะเลี้ยงไปจนสิ้นสุดเดือนที่ 2 แคลลัสไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอด ลำต้นหรือรากเลย

ตาราง 4 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตในระดับต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 1 เดือน และ 2 เดือน

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ลำต้นอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_1	-	-	1	เนื้อเยื่อมีสีเขียว ขยายขนาดเล็กน้อย
			2	เกิดแคลลัสตรงรอยตัดเล็กน้อย มีสีเขียว
MS_2	0.5	0.5	1	เกิดแคลลัสตรงรอยตัดสองข้าง เป็นก้อนขรุขระ มีสีเขียวจางปนสีน้ำตาล
			2	แคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น มีสีเขียวปนเหลือง
MS_3	0.5	1.0	1	เกิดแคลลัสตรงรอยตัด เป็นก้อนขรุขระ สีเขียวอ่อนปนเหลือง
			2	แคลลัสเพิ่มมากขึ้น มีสีเขียวปนสีน้ำตาล ลักษณะเป็นก้อนขรุขระอัดแน่น
MS_4	0.5	1.5	1	ลำต้นอ่อนมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น และเกิดแคลลัสตรงรอยตัด สีเขียวปนเหลือง
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากขึ้นกว่าเดิม มีขนาดใหญ่อัดแน่น
MS_5	0.5	2.0	1	เกิดแคลลัสเป็นก้อนขนาดเล็กสีเขียว
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมีขนาดใหญ่ มีสีเขียวอ่อนปนน้ำตาล มีลักษณะอัดแน่น

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ยืนส่วนเนื้อเยื่อ (สำต้นอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_6	0.5	2.5	1	เกิดแคลลัสที่รอยตัดทั้งสองข้าง ลักษณะอัดแน่น สีเขียวปนเหลือง
			2	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น ลักษณะเป็นก้อนขรุขระอัดแน่น มีสีเขียวจาง มีสีขาวฟู ๆ โดยรอบ
MS_7	1.0	0.5	1	ลำต้นขยายขนาดมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยตัด ลักษณะเป็นก้อน สีเขียวอ่อน
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากขึ้น มีสีเขียวปนสีน้ำตาล ลักษณะเกาะตัวกันแน่น
MS_8	1.0	1.0	1	เกิดแคลลัสเป็นก้อนขรุขระ มีสีเขียวปนเหลืองอ่อน
			2	แคลลัสมีขนาดใหญ่ ลักษณะอัดตัวกันแน่น มีสีเขียวจางปนสีน้ำตาล
MS_9	1.0	1.5	1	เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด ลักษณะอัดแน่นเป็นก้อน
			2	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้นกว่าเดิม ลักษณะขรุขระ สีเขียวปนสีน้ำตาล รอบ ๆ มีสีขาวลักษณะฟู

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (สำต้นอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_{10}	1.0	2.0	1	เกิดแคลลัส ลักษณะเป็นก้อน สีเขียวปนเหลือง
			2	แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย มีสีเขียวจางปนสีน้ำตาลอ่อน
MS_{11}	1.0	2.5	1	ขยายใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดเป็นก้อนขรุขระสีเขียวอ่อน มีสีขาวลักษณะฟู ๆ โดยรอบ
			2	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากและมีขนาดใหญ่ที่สุด เป็นก้อนขรุขระ เกาะตัวอัดแน่นสีเขียวจางปนเหลือง
MS_{12}	1.5	0.5	1	เกิดแคลลัสตรงรอยตัดทั้งสองข้างเล็กน้อย มีสีเขียว
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็นก้อนกลมขรุขระ มีสีเขียวปนเหลือง
MS_{13}	1.5	1.0	1	เกิดแคลลัสเป็นก้อน ลักษณะอัดแน่น สีเขียวปนเหลือง
			2	แคลลัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น ลักษณะอัดแน่น สีเขียวจาง มีสีขาวฟู ๆ โดยรอบ
MS_{14}	1.5	1.5	1	ขยายขนาด เกิดแคลลัสเป็นก้อนขรุขระอัดแน่น สีเขียวจางปนเหลืองเข้ม
			2	แคลลัสขยายขนาดเพิ่มขึ้น ลักษณะแน่น มีสีเขียวปนสีเหลืองอ่อน

ตาราง 4 (ต่อ)

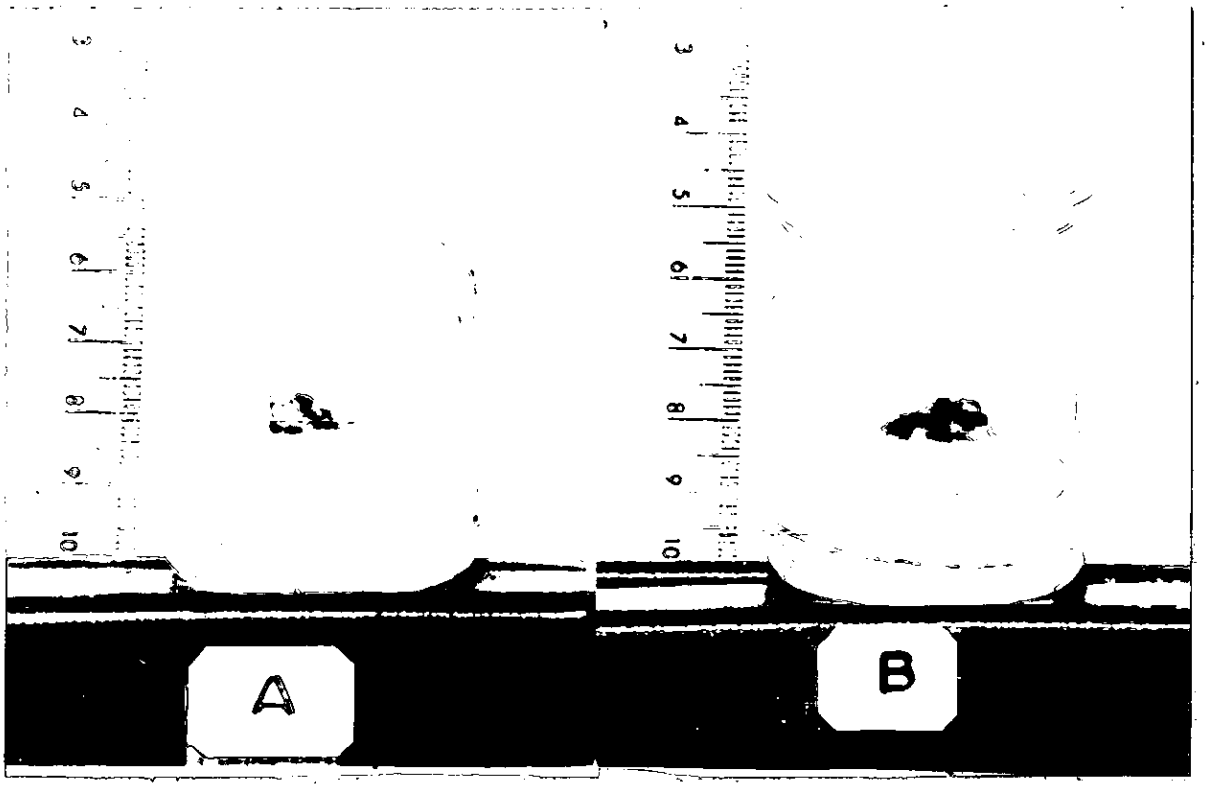
สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (สำต้นอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_{15}	1.5	2.0	1	เกิดแคลลัสขนาดเล็ก เป็นก้อนขรุขระ สีเขียวอ่อนรอบ ๆ มีสีขาวฟูล้อมรอบ
			2	แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม สีเขียวจาง
MS_{16}	1.5	2.5	1	ขยายขนาดใหญ่ เกิดแคลลัสเป็นก้อนขรุขระ สีเขียวปนสีน้ำตาลขนาดเล็ก
			2	แคลลัสขนาดเพิ่มขึ้น มีสีเขียวอ่อนปนสีน้ำตาล
MS_{17}	2.0	0.5	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัส ลักษณะอัดแน่นและขรุขระ สีเขียวปนสีน้ำตาล
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากขึ้นขนาดใหญ่ สีเขียวปนสีน้ำตาล
MS_{18}	2.0	1.0	1	ขยายขนาดและยาว เกิดแคลลัสลักษณะเป็นก้อนขรุขระสีเขียวปนสีน้ำตาล มีสีขาวลักษณะฟู ๆ อยู่ด้านบน
			2	แคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นลักษณะอัดตัวแน่น มีสีเขียวปนสีน้ำตาลขนาดใหญ่

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ลำดับอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_{19}	2.0	1.5	1	เกิดแคลลัสขนาดเล็ก เป็นกลุ่มก้อนขรุขระ สีเขียวจาง มีสีขาวฟู ๆ โดยรอบ
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากกว่าเดิมเล็กน้อย
MS_{20}	2.0	2.0	1	เกิดแคลลัสขนาดเล็กตรงบริเวณรอยตัด มีสีเขียว
			2	แคลลัสเพิ่มมากกว่าเดิม ลักษณะอัดแน่น สีเขียวจาง
MS_{21}	2.0	2.5	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสมีลักษณะเป็นก้อน สีเขียวจาง
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากขึ้น ลักษณะอัดแน่น สีเขียวแกมสีน้ำตาล ขนาดใหญ่
MS_{22}	2.5	0.5	1	ขยายขนาด มีแคลลัสเกิดบริเวณรอยตัดทั้งสองข้าง สีเขียวจางปนสีน้ำตาล
			2	เจริญเติบโตขนาดเพิ่มขึ้นกว่าเดิม ลักษณะเกาะตัวแน่น สีเขียวจางแกมสีน้ำตาล
MS_{23}	2.5	1.0	1	เกิดแคลลัสตรงรอยตัดทั้งสองข้าง ลักษณะเป็นก้อนขรุขระ อัดแน่น สีเขียวปนเหลือง
			2	เจริญเป็นแคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะเกาะกันแน่น สีเขียวจางแกมสีน้ำตาล ด้านบนมีสีขาวลักษณะฟู ๆ โดยรอบ

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		ระยะเวลา (เดือน)	ยันส่วนเนื้อเยื่อ (สำต้นอ่อน)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)		
MS_{24}	2.5	1.5	1	เกิดแคลลัสตรงรอยตัดทั้งสองข้าง ลักษณะเป็นก้อนขรุขระ สีเขียวจางแกมสีน้ำตาล
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากกว่าเดิม ลักษณะเป็นก้อนขรุขระอัดตัวแน่น สีเขียวแกมสีน้ำตาล
MS_{25}	2.5	2.0	1	เกิดแคลลัสตรงรอยตัด มีสีเขียวแกมเหลือง และสีขาวฟูอยู่ด้านบน
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมากขึ้น ลักษณะอัดแน่นขนาดใหญ่ สีเขียวแกมสีน้ำตาล
MS_{26}	2.5	2.5	1	ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสมากตรงบริเวณรอยตัดทั้งสองข้าง
			2	แคลลัสเจริญเติบโตมาก มีขนาดใหญ่ ลักษณะเป็นก้อนขรุขระอัดแน่น สีเขียวแกมสีน้ำตาล และสีขาวลักษณะฟูโดยรอบ

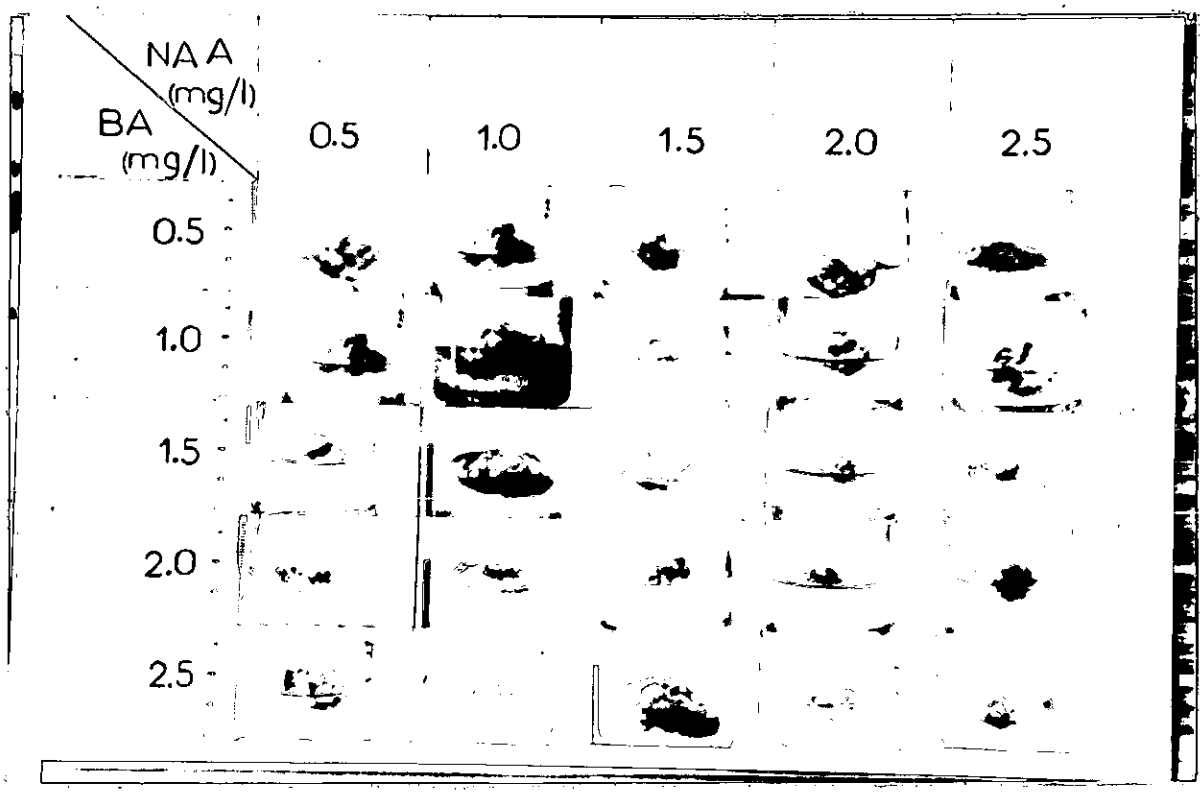


ภาพประกอบ 6 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อส่วนลำต้นทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS_1

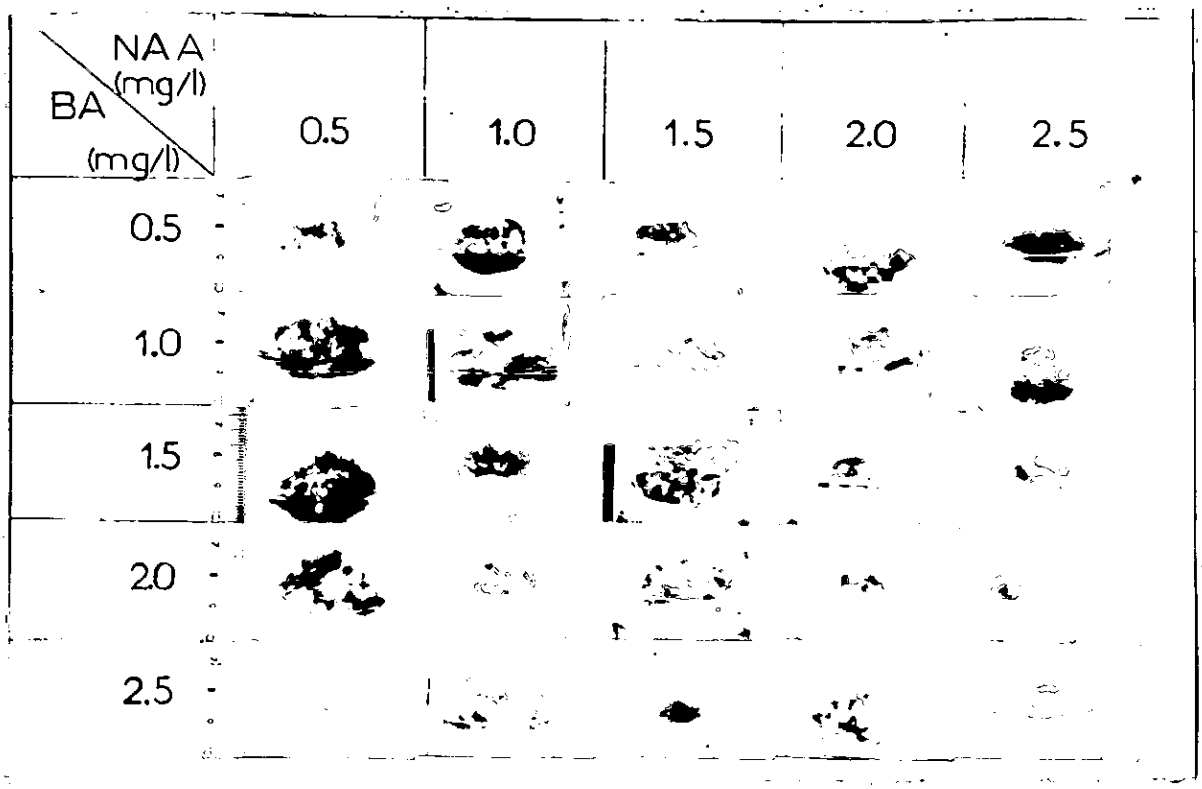
A เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

B เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

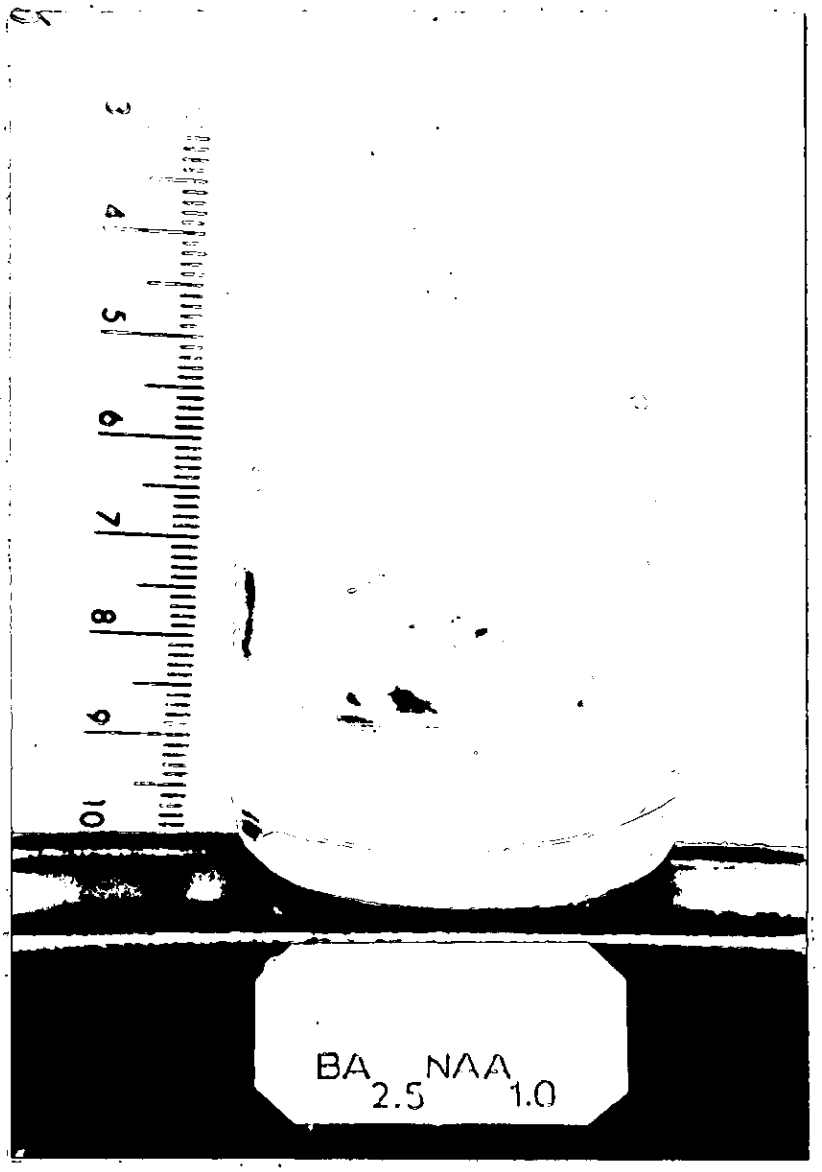
ยันล่วนลำต้นอ่อน



ภาพประกอบ 7 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อลำต้นทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BA ในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพประกอบ 8 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อลำต้นทองพันชั่งบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BA ในระดับต่าง ๆ กันเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน



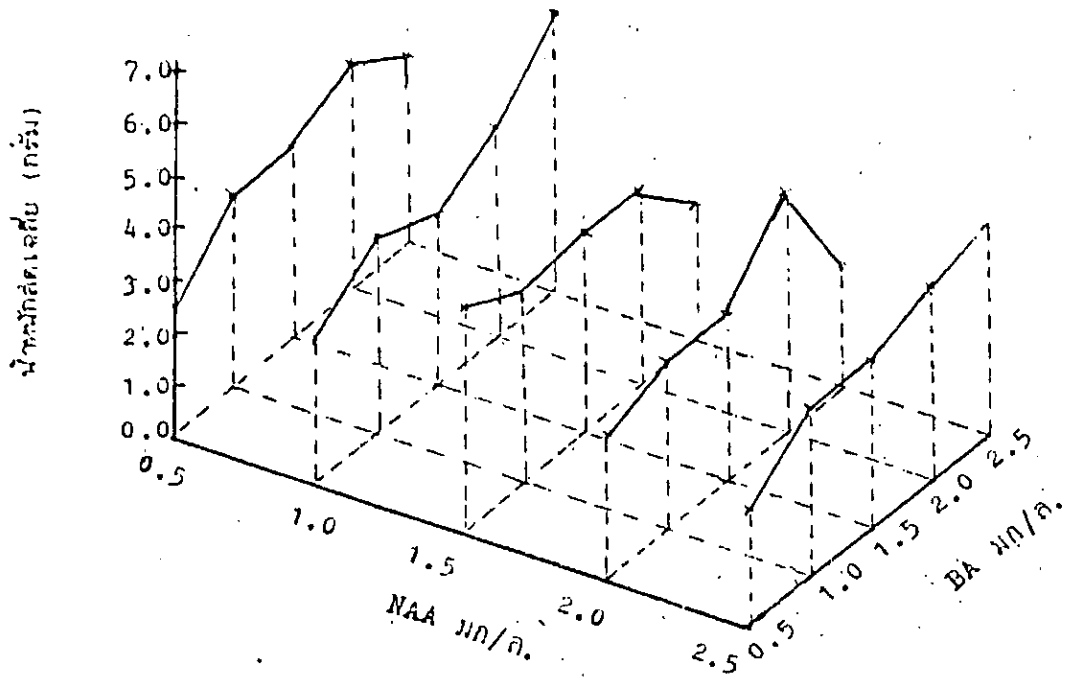
ภาพประกอบ 9 แคลลัสใบที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและน้ำหนักสดมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บนสูตรอาหาร MS_{11}

ตาราง 5 แสดงน้ำหนักแคลลัสสำต้นเฉลี่ยเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	
MS_1	-	-	0.21
MS_2	0.5	0.5	2.62
MS_3	0.5	1.0	3.77
MS_4	0.5	1.5	3.43
MS_5	0.5	2.0	4.31
MS_6	0.5	2.5	3.75
MS_7	1.0	0.5	2.88
MS_8	1.0	1.0	3.78
MS_9	1.0	1.5	3.30
MS_{10}	1.0	2.0	3.97
MS_{11}	1.0	2.5	5.52
MS_{12}	1.5	0.5	4.37
MS_{13}	1.5	1.0	3.80
MS_{14}	1.5	1.5	3.98
MS_{15}	1.5	2.0	3.83
MS_{16}	1.5	2.5	2.45
MS_{17}	2.0	0.5	2.92
MS_{18}	2.0	1.0	3.19

ตาราง 5 (ต่อ)

สูตรอาหาร	สารเร่งการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	
MS_{19}	2.0	1.5	3.20
MS_{20}	2.0	2.0	4.61
MS_{21}	2.0	2.5	2.14
MS_{22}	2.5	0.5	2.15
MS_{23}	2.5	1.0	3.22
MS_{24}	2.5	1.5	3.25
MS_{25}	2.5	2.0	3.76
MS_{26}	2.5	2.5	4.01



ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดแคลลัสสำต้นเฉลี่ยกับสารเร่งการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 เดือน

ผลการทดลองที่ 2 การเพิ่มปริมาณแคลลัสใบและแคลลัสลำต้นให้มากขึ้น เพื่อใช้สกัดอัลคาลอยด์

จากการตัดชิ้นส่วนแคลลัสใบที่ได้จากสูตรอาหาร MS_8 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเติมเป็นเวลา 1 เดือน จะได้น้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ย 6.34 กรัมต่อขวด และเมื่อนำไปอบแห้งน้ำหนักลดลงประมาณ 10 เท่าของน้ำหนักสดเฉลี่ย คือได้น้ำหนักแห้งประมาณ 0.61 กรัมต่อขวด ส่วนแคลลัสลำต้นที่ได้จากสูตรอาหาร MS_{11} ไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเติมเป็นเวลา 1 เดือน จะได้น้ำหนักสดเฉลี่ย 5.53 กรัมต่อขวด และเมื่อนำไปอบแห้งน้ำหนักสดลงประมาณ 10 เท่า คือได้น้ำหนักแห้งประมาณ 0.47 กรัมต่อขวด (ตาราง 6)

ตาราง 6 น้ำหนักของแคลลัสใบและแคลลัสลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสมเป็นเวลา 1 เดือน

ชนิดแคลลัส \ น้ำหนักเฉลี่ย	น้ำหนักสดเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสดอายุ 1 เดือน (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
แคลลัสใบ	0.71	6.34	0.61
แคลลัสลำต้น	0.70	5.53	0.47

ตอนที่ 2 การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์ของแคลลัสและต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำแคลลัสใบ แคลลัสลำต้น ใบธรรมชาติและลำต้นธรรมชาติที่อบแห้งพร้อมทั้งบดละเอียดอย่างละ 10 กรัม ไปสกัด 5 ครั้ง เพื่อหาปริมาณสารอัลคาลอยด์พร้อมทั้งทำการทดสอบสารที่สกัดได้

ผลการทดลองตอนที่ 2 การทดสอบสารที่สกัดได้จากแคลลัสใบ แคลลัสลำต้น ใบธรรมชาติ และลำต้นธรรมชาติ

ผลปรากฏว่าเมื่อหยดดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์ลงไปในสารละลายที่สกัดได้เกิดตะกอนสีส้ม และเมื่อหยดเมเยอร์ รีเอเจนต์ในสารละลายที่สกัดได้เกิดตะกอนสีขาวขุ่น แสดงว่าสารสกัดนั้นเป็นสารอัลคาลอยด์ (ตาราง 7)

ตาราง 7 ผลการทดสอบสารที่สกัดได้จากแคลลัสและต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ด้วยดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์และเมเยอร์ รีเอเจนต์

สารสกัดที่ได้จาก	ผลการทดสอบ	
	ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนต์	เมเยอร์ รีเอเจนต์
แคลลัสใบ	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น
แคลลัสลำต้น	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น
ใบธรรมชาติ	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น
ลำต้นธรรมชาติ	เกิดตะกอนสีส้ม	เกิดตะกอนสีขาวขุ่น

การเปรียบเทียบน้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ

น้ำหนักอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบมากกว่าใบธรรมชาติ (ตาราง 8) เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติโดยใช้สถิติ t-test พบว่าอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสใบมากกว่าใบธรรมชาติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 9)

ตาราง 6 น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ

ครั้งที่	น้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ (กรัม)	
	แคลลัสใบ	ใบธรรมชาติ
1	0.03	0.03
2	0.04	0.02
3	0.04	0.03
4	0.05	0.02
5	0.05	0.02
เฉลี่ย	0.04	0.02

ตาราง 9 ค่าสถิติ t สำหรับน้ำหนักอัลคาลอยด์เฉลี่ยจากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ

ค่าสถิติ / กลุ่มตัวอย่าง	n	$\bar{X}$	S	t
แคลลัสใบ	5	0.04	0.008	4.73
ใบธรรมชาติ	5	0.02	0.005	

$t_{(8,0.01_{(2)}} = 3.336$

การเปรียบเทียบน้ำหนักของสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากแคลลัสลำต้นกับลำต้นธรรมชาติ

น้ำหนักอัลคาลอยด์จากแคลลัสลำต้นมากกว่าลำต้นธรรมชาติ (ตาราง 10) เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสลำต้นกับลำต้นธรรมชาติ โดยใช้สถิติ t-test พบว่าอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสลำต้นมากกว่าลำต้นธรรมชาติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 11)

ตาราง 10 น้ำหนักของแคลสัล่ที่ล่กัดได้จากแคลสัล่ลำต้นกับลำต้นธรรมชาติ

ครั้งที่	น้ำหนักของล่ารอัลคาลอยด์ (กรัม)	
	แคลสัล่ลำต้น	ลำต้นธรรมชาติ
1	0.04	0.02
2	0.05	0.02
3	0.04	0.03
4	0.05	0.02
5	0.04	0.03
เฉลี่ย	0.044	0.024

ตาราง 11 ค่าล่ถิติ t ล้ำหรับน้ำหนักเฉลี่ยของแคลสัล่ลำต้นกับลำต้นธรรมชาติ

ค่าล่ถิติ / กลุ่มตัวอย่าง	n	$\bar{X}$	S	t
แคลสัล่ลำต้น	5	0.044	0.005	6.66
ลำต้นธรรมชาติ	5	0.024	0.005	

$t_{(8,0.01_{(2)})} = 3.335$

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อนของทองพันชั่งในอาหารสังเคราะห์ MS และ MS ดัดแปลงที่มีประสิทธิภาพชักนำเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน และลำต้นอ่อนให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดและน้ำหนักสดมากที่สุด

2. เปรียบเทียบปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกับทองพันชั่งที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

การทดลองแบ่งเป็น 2 ตอนดังนี้

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบ่งเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาชักนำให้ยั้นส่วนเริ่มต้นเกิดแคลลัส เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม

นำเนื้อเยื่อของใบอ่อนคู่ที่2 และเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนปล้องที่ 1 และ 2 ของทองพันชั่ง ล้างให้สะอาดด้วยผงซักฟอกและตัดบริเวณที่เป็นแผลหรือฉีกที่เป็นตำแหน่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ทั้งไป ซับน้ำให้แห้ง นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นาน 7-10 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที ขั้นตอนสุดท้ายนี้จะได้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่ปราศจากเชื้อ นำไป

เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS และ MS ดัดแปลง 26 สูตร แล้วนำขวดอาหารที่มีเนื้อเยื่อไปวางบนชั้นวางขวดภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ให้รับแสงนาน 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่

การทดลองที่ 2 การเพิ่มปริมาณแคลลัสใบและแคลลัสลำต้นให้มากขึ้นเพื่อใช้ในการสกัดสารอัลคาลอยด์

นำแคลลัสใบและแคลลัสลำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอายุ 2 เดือนของการทดลองที่ 1 มาตัดแบ่งเป็นชิ้นมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.70 กรัม แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสมสูตรเดิมของเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและลำต้นอ่อน เป็นเวลา 1 เดือน

ตอนที่ 2 การหาปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสและต้นทองพันชั่งที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำแคลลัสใบ แคลลัสลำต้น ใบธรรมชาติ และลำต้นธรรมชาติ ไปสกัดหาสารอัลคาลอยด์และเปรียบเทียบปริมาณสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ แคลลัสลำต้นกับลำต้นธรรมชาติ

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. บรรยายการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในเดือนที่ 1 และเดือนที่ 2

2. หาค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจากสูตรอาหารที่เหมาะสม

3. หาค่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากการสกัดแคลลัสและทองพันชั่งที่ปลูกสภาพธรรมชาติ

4. วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของปริมาณสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบกับใบธรรมชาติ และแคลลัสลำต้นกับลำต้นธรรมชาติโดยใช้ t-test

สรุป และอภิปรายผล

เมื่อนำชิ้นส่วนของใบอ่อนและลำต้นอ่อนทองพันชั่งมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน รวม 26 สูตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ชักนำให้เนื้อเยื่อใบอ่อนทองพันชั่งมีการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด และมีน้ำหนักสดมากที่สุด คือสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักแคลลัสสดเฉลี่ย 6.01 กรัมต่อขวด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ ยุติมา คุณาไทย ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนยองบอนสี 4 พันธุ์ บนสูตรอาหารแข็ง MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนมีการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด ซึ่ง NAA เป็นสารออร์โมนกลุ่มออกซิน มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ (ยุติมา คุณาไทย 2526: 50)+

ส่วนเนื้อเยื่อของลำต้นอ่อนทองพันชั่ง เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันรวม 26 สูตร เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสม และชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนทองพันชั่งมีการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดและน้ำหนักสดมากที่สุด คือสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักแคลลัสสดเฉลี่ย 5.52 กรัมต่อขวด ทั้งนี้เพราะปริมาณ NAA และ BA อยู่ในอัตราส่วนที่สมดุลเหมาะสมกับเนื้อเยื่อของลำต้นทองพันชั่ง จึงมีการสร้างแคลลัสได้มากกว่าความเข้มข้นระดับอื่น ทั้งนี้เพราะ BA ความเข้มข้นมากที่ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ การทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ อัสเซย์ที่รายงานว่าการใช้ BA ที่มีความเข้มข้นมากจะชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสได้ เนื่องจากไซโตไคนินจะส่งเสริมปฏิกิริยาในการทำงานของออกซินซึ่งทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตดีขึ้น (Hussey. 1976: 1323-1325)

สำหรับสูตรอาหาร MS เนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนและส่วนลำต้นอ่อนทองพันชั่งที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และ 2 เดือน ไม่มีการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสทั้งนี้เพราะเป็นสูตรอาหารที่ไม่ได้เติมสารเร่งการเจริญเติบโต NAA และ BA ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้ช่วยกระตุ้นและส่งเสริมการแบ่งเซลล์

ส่วนผลการทดลองสกัดหาปริมาณสารอัลคาลอยด์ โดยนำแคลลัสใบที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเหมาะสม ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเหมาะสม ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีอายุ 1 เดือน ไปสกัดหาปริมาณอัลคาลอยด์เพื่อเปรียบเทียบกับใบธรรมชาติและลำต้นธรรมชาติ ผลของการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสใบแตกต่างกันกับน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากใบธรรมชาติ และน้ำหนักเฉลี่ยของสารอัลคาลอยด์จากแคลลัสลำต้นมากกว่าน้ำหนักของสารอัลคาลอยด์จากลำต้นธรรมชาติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อิคูตาและอิโตกาวา ซึ่งได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัส Thalitrum minus บนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนตินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของ 2, 4-D มีความสัมพันธ์กับการผลิตอัลคาลอยด์ในแคลลัส โดย 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจพบอัลคาลอยด์ 8 ชนิด และความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจพบอัลคาลอยด์ 4 ชนิด และพบอัลคาลอยด์เบอร์เบอรีนในแคลลัส 0.67 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าใบธรรมชาติและลำต้นธรรมชาติ ที่ตรวจพบเบอร์เบอรีนเพียง 0.0019 เปอร์เซ็นต์ (Ikuta and Itokawa. 1982: 1419-1421)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของออกซินและไซโตไคนินชนิดอื่น ในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด และน้ำหนักสดมากที่สุด

2. ควรศึกษาอิทธิพลของค่า pH ระดับอื่นที่มีผลต่อการเกิดแคลลัส การทดลองนี้ใช้ pH 5.6 ทุกสูตรอาหาร

3. ควรศึกษาชนิดของสารอัลคาลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่งเปรียบเทียบกับต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

4. ควรศึกษาเกี่ยวกับอายุของแคลลัสกับการผลิตสารอัลคาลอยด์

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

เกศรินทร์ ภูมิศรีแก้ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร 2527, 67 หน้า อัดสำเนา

จำลอง เพ็งคล้าย และคนอื่น ๆ พฤกษศาสตร์ป่าไม้เบื้องต้น โรงพิมพ์การศาสนา กรุงเทพฯ 2516, 250 หน้า

1 ✓ ชัยโย ชัยชาญศิพยุทธ และคนอื่น ๆ. การใช้สมุนไพร เล่ม 1, บริษัทสารมวลชน จำกัด 2522, 178 หน้า

2 ✓ เชษฐา พยากรณ์, สมุนไพรในชีวิตประจำวัน, พี.เอส.การพิมพ์ กรุงเทพฯ, 2525, 119 หน้า

เต็ม สมิตินันท์ ชื่อพรรณไม้ประเทศไทย พิมพ์ครั้งที่พันเก้าร้อยเจ็ดสิบเจ็ด กรุงเทพฯ 2518, 379 หน้า

บุญยืน กิจวิจารณ์ การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดแก้ว วรุณสาร วารสารทางวิชาการของวิทยาลัยครูมหาสารคาม ปีที่ 1 ฉบับที่ 1: 66-74 มกราคม-มิถุนายน 2528

นพรัตน์ พัฒนเจริน การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสมุนไพรบางชนิด มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร 2527, 51 หน้า

✗ พยอม ตันติวัฒน์ สมุนไพร โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 2521, 202 หน้า

พรทิพา ทิชา และคนอื่น ๆ โครงการศูนย์ข้อมูลสมุนไพร มหาวิทยาลัยมหิดล ปีที่ 2 ฉบับที่ 4 2528, ไม่มีเลขหน้า

วิเชียร ศิรวงศ์ และพยอม ตันติวัฒน์ "สมุนไพร" วิทยาศาสตร์ 31(11): 35-45 พฤศจิกายน 2520

สุภาพ บุณยะรัตเวช ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ ไทยวัฒนาพานิช กรุงเทพฯ 2511, 163 หน้า

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

อรดี สหวัชชรินทร์ "ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทางการเกษตร" วารสารพืชสวน 14(4): 34-43, 2522

อัญชลี เตียวิชชากาล การขยายพันธุ์มันฝรั่งด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิทยานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2525 อัดสำเนา

Biale, J. B. "On the Interface of Horticulture and Plant," Ann. Rev. Plant Phisiol. 29: 1-23, 1978.

Dunstan, D. I. and Short, K. C. "Shoot Production form Cultured Allium porrum Tissue," Scientia Horticulturae. 11: 37-43, 1979.

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

Farnsworth, N. R. "Biological and Phytochemical Screening of Plants," J. Pharm Sci. 55(3): 240-245, 1966.

Harbone, J. B. "Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapman and Hall, London, 43, 52-80, 113, 182-185, 1973.

Hegnauer, R. Chemical Plant Taxonomy. Academic Press, New York, N.Y.: 389-425, 1963.

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

Meyer, Jr. M. M. "Propagation of Daylilies by Tissue Culture," Horticultural Science. 11(5): 485-487, 1976.

Murashige, To. "Plant Propagation Through Tissue Culture," Annual Review Plant Phisiology. 25: 135-166, 1974.

_____. "Current Status of Plant Cell and Organ Culture," Horticulture Science. 12(2): 127-130, 1977.

_____. "Plant Cell and Organ Culture as Horticultural Practice," Symposium on Tissue Culture of Horticultural Purpose. 17-30, 1977.

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

Noller, C. R. Chemistry of Organic Compounds. Saunders, Philadelphia, 648-654, 1957.

Pierik, R.L.M. and Ruibing, M. A. "Regeneration of Bulblets on Bulbscale Segments of Hyacinth In Vitro," Netherland Journal Agriculture Science. 21: 129-138, 1973.

Puhan, Z. and Martin, S. M. The Industrail Potential of Plant Cell Culture. In Hockenhull, D.J.D. Progress in Industrial Microbiology. London, J & A. Churchill, 9: 13, 1967.

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

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

Takayama, S. and Misawa, M. "Differentiation in Lilium Bulbscales Growth In Vitro Effect of Actived Charcoal Physiological Age of Bulbs and Sucrose Concentration on Differentiation and Scale Leaf Formation In Vitro, Physiologia Plantarum. 48: 121-125, 1980.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ตาราง 12 แสดงสารประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)

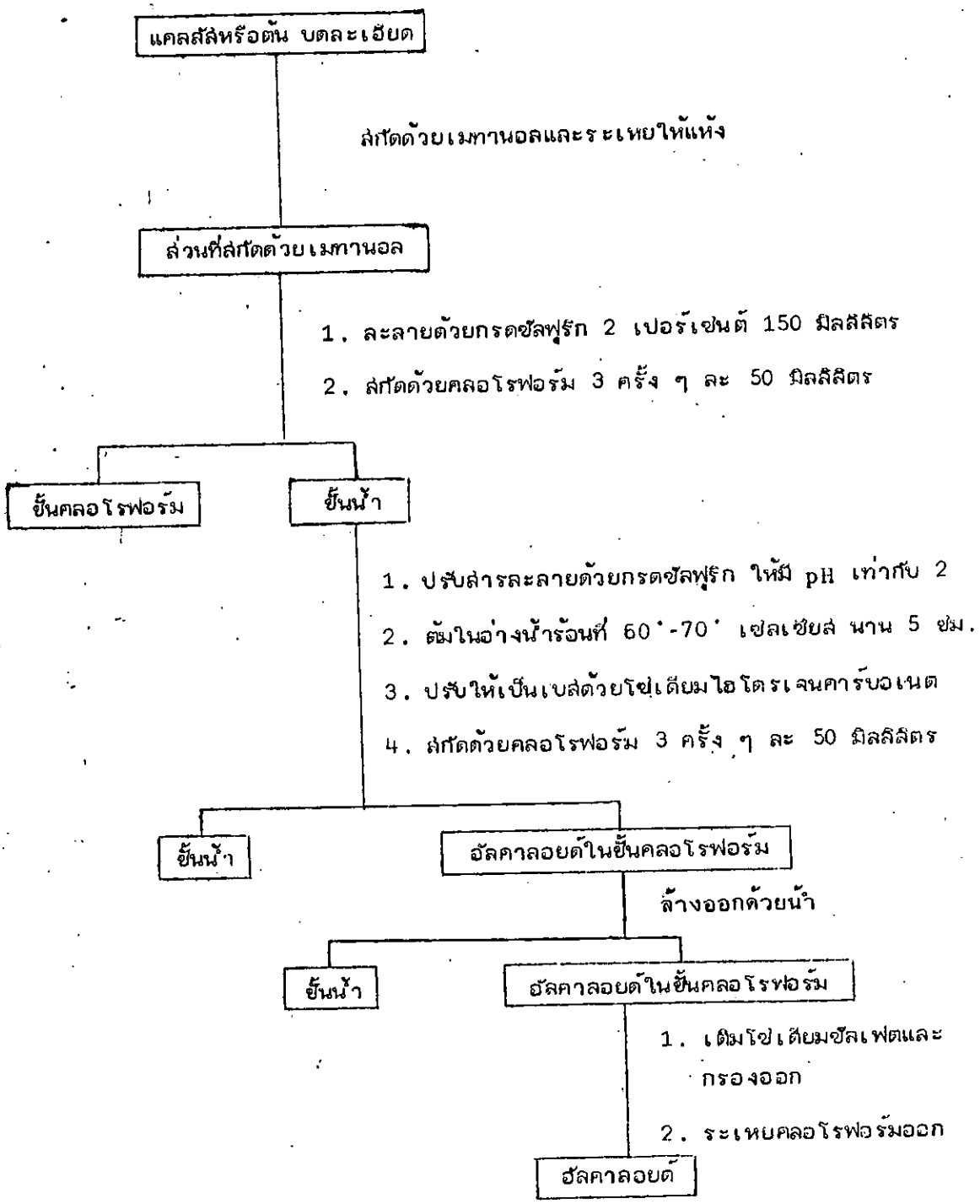
สารเคมี	กรัม	มิลลิลิตร
สารพวกเกลือแร่ (organic salt) เตรียมสารละลาย 100 เท่าของความเข้มข้นในอาหาร		
Stock 1		
NH_4NO_3 (Amonium nitrate)	165	-
KNO_3 (Potassium nitrate)	190	
H_2O (distill)	-	1,000
Stock 2		
$MgSO_4.H_2O$ (Magnesium sulfate)	37	-
$MnSO_4.H_2O$ (Manganese sulfate)	1.690	-
$ZnSO_4.H_2O$ (Zinc sulfate)	0.860	-
$CuSO_4.5H_2O$ (Copper sulfate)	0.0025	-
H_2O (distill)	-	1,000
Stock 3		
$CaCl_2.H_2O$ (Calcium chloride)	4.0	-
KI (Potassium iodide)	0.083	-
$CoCl_2.6H_2O$ (Cobalt chloride)	0.0025	-
H_2O (distill)	-	1,000

ตาราง 12 (ต่อ)

สารเคมี	กรัม	มิลลิลิตร
Stock 4		
KH_2PO_4 (Monopotassium acid phosphate)	20	-
H_3BO_3 (Boric acid)	0.620	-
$Na_2MoO_4.2H_2O$ (Sodium molybdate)	0.025	-
H_2O (distill)	-	1,000
Stock 5		
$FeSO_4.7H_2O$ (Ferric sulfate)	2.784	-
Na_2EDTA (Disodium ethylene diamine tetra acetic acid)	3.724	-
H_2O (distill)	-	1,000
สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds) ความเข้มข้น 200 เท่าของความเข้มข้นในอาหาร		
Stock 6		
Inosital	2.0	-
Nicotinic acid	0.01	-
Pyridoxine HCl	0.01	-
Thiamine HCl	0.002	-
Glycine	0.04	-
H_2O (distill)	-	100

ตาราง 12 (ต่อ)

สารเคมี	กรัม	มิลลิลิตร
Sucrose	30	-
Agar	8	-
สูตร MS ดัดแปลงได้จากการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต NAA กับ BA ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีวิธีเตรียมดังนี้		
NAA	0.01	-
H_2O (distill)	-	100
BA	0.01	-
H_2O (distill)	-	100



ภาพประกอบ 11 แผนภูมิการสกัดสารอัลคาลอยด์

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