รายงานการวิจัย

การเพาะเลี้ยงแคลลัสหงอนไก่เพื่อสร้างสารเบตาเลน

(Callus culture of *Celosia argentea* L. for betalains production)

ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

RCH
QK
495
.A48
อ246ก
สถานที่....
เลขทะเบียน....115630
วัน,เดือน,ปี....24 มี.ค. 2554

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2550

คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

.b....12178652....
.i.....................

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้การสนับสนุนทุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2550 ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ระติพร หาเรือนกิจ คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้การสนับสนุนการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และอาจารย์ ดร. ประมวล ศรีกาหลง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ขอขอบคุณ นายสิทธิโชค บำเรอหน่อทหาร นักศึกษาสาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลงานวิจัย สุดท้ายนี้ขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัว ผศ. กรรณ จินดาประเสริฐ และเด็กชายกัณต์ณภัค จินดาประเสริฐ ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อพัชชา จินดาประเสริฐ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การเพาะเลี้ยงแคลลัสหงอนไก่เพื่อสร้างสารเบตาเลน

(ภาษาอังกฤษ) Callus culture of *Celosia argentea* L. for betalains production

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2550 **จำนวนเงิน** 32,000 บาท

ระยะเวลาการทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2549 ถึงกันยายน 2550

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัดและเลขหมายโทรศัพท์

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โทรศัพท์ 02-326-4112 หรือ 02-326-4091

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงแคลลัสหงอนไก่ ได้นำชิ้นส่วนใบจากหงอนไก่ที่ได้การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ มาทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบนอาหาร Murashige และ Skoog (MS) ที่มีการ 6-benzyladenine (BA) ร่วมกับ 1-napthaleneacetic acid (NAA) และ BA ร่วมกับ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้น 0, 1.0 และ 2.0 mg/l พบว่าอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่น และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l ทำให้เกิดแคลลัสที่มีสีแดง จากนั้นนำหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดและแคลลัสทั้ง 3 สูตร มาทำการตรวจวิเคราะห์เบตาเลนโดยใช้เทคนิค thin layer chromatography และ spectrophotometer พบว่าหงอนไก่มีการสร้างเบตาเลนในปริมาณที่สูงถึง 13.65 nmol g^{-1}FW ขณะที่แคลลัสมีการสร้างเบตาเลนอยู่ในช่วง 3.19-9.21 nmol g^{-1} FW

Abstract

Callus cultures were established from leaf explants of *Celosia argentea* L. seedlings in aseptic conditions. Leaf explants were studied the effect of plant growth regulators on Murashige and Skoog (MS) medium containing at 6-benzyladenine (BA) and 1-napthaleneacetic acid (NAA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at the concentration 0,1.0 and 2.0 mg/l. It was found that MS medium containing BA 1.0 mg/l and 2,4-D 2.0 mg/l could induced the highest callus yield. The red callus formation was observed on both MS medium containing BA 2.0 mg/l and NAA 1.0 mg/l and MS containing BA 2.0 mg/l and NAA 2.0 mg/l. Then, plantlets and three types of callus were examined for their ability to produced betalains by using thin layer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

chromatography and spectrophotometer. Plantets from seedlings appeared to accumulate betalains to the level of as high as 13.65 nmol g^{-1}FW while callus cultures contained betalains in the range of 3.19-9.21 nmol g^{-1} FW.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
2.1 หงอนไก่	3
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	3
2.1.2 สารเคมีที่พบในหงอนไก่	4
2.1.3 ประโยชน์ทางสมุนไพรของหงอนไก่	7
2.2 เบตาเลน	7
2.2.1 โครงสร้างทางเคมี	7
2.2.2 เบตาเลนในพืช	8
2.2.3 ชีวสังเคราะห์ของเบตาเลน	9
2.3.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเบตาเลน	9
2.2.5 ประโยชน์ของเบตาเลนในอุตสาหกรรมอาหาร	11
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	11
2.3.1 ความหมายและหลักการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	11
2.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	11
2.3.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	13
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเบตาเลนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	14
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย	17
3.1 วัสดุอุปกรณ์	17
3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง	17
3.1.2 อุปกรณ์	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.3 สารเคมี	17
3.2 วิธีการทดลอง	18
3.2.1 การเพาะเมล็ดหงอนไก่ในสภาพปลอดเชื้อ	19
3.2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบของสร้อยไก่	19
3.2.3 การตรวจวิเคราะห์เบตาเลน	19
3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	21
บทที่ 4 ผลการทดลอง	22
4.1 การเพาะเมล็ดหงอนไก่ในสภาพปลอดเชื้อและการเจริญเติบโตของหงอนไก่	22
4.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบของหงอนไก่	23
4.3 การตรวจวิเคราะห์เบตาเลนจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของหงอนไก่	26
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	30
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	32
บรรณานุกรม	33
ภาคผนวก	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณเบตาเลนที่พบในดอกและเนื้อเยื่อของ *Celosia argentea* สายพันธุ์ต่างๆ	5
2.2	การกระจายตัวของเบตาเลนในส่วนต่างๆของพืช	9
2.4	การเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อผลิตสารเบตาเลน	16
4.1	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบหงอนไก่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์	24
4.2	ปริมาณเบตาเลนทั้งหมดในรูปของ amaranthin ที่พบในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของหงอนไก่	29

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ก. ต้นหงอนไก่ไทย (*Celosia argentea* Linn) และ ข. หงอนไก่ฝรั่ง (*C. argentea* L. var. *cristata* Ktze)	4
2.2	โครงสร้างของเบตาเลนที่พบในหงอนไก่	6
2.3	โครสร้างพื้นฐานของเบตาเลน	8
2.4	ชีวสังเคราะห์ของเบตาแซนทินในพืชตระกูล *Celosia*	10
4.1	หงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสง 16 ชั่งโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์	22
4.2	แคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ก. BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l (สูตร 8) ข. BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l (สูตร 9) และ ค. BA 1.0 mg/l และ2,4-D 2.0 mg/l (สูตร 13)	25
4.3	รากที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ก. ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (สูตร 1) ข. NAA 1.0 mg/l (สูตร 4) และ ค. NAA 2.0 mg/l (สูตร 5)	25
4.4	การตรวจสอบเบตาเลนจากต้นหงอนไก่และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค TLC	27
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) และค่าดูดกลืนแสงจากการสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ของสารสกัดจากต้นหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 6 สัปดาห์	28
4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) และค่าดูดกลืนแสงจากการสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ของสารสกัดแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

หงอนไก่ (*Celosia argentea* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Amaranthaceae เป็นไม้พุ่มอายุปีเดียว สูงประมาณ 60-80 เซนติเมตร ใบเรียวแหลมออกสลับกัน ดอกออกเป็นช่อที่ยอดหรือง่ามใบ หงอนไก่ไทย มีก้านช่อดอกกลมยาว 3-10 เซนติเมตร ดอกย่อยอยู่ติดๆกัน ส่วนปลายเป็นสีชมพู ส่วนล่างลงมามีสีขาว หงอนไก่ฝรั่ง (*C. argentea* L. var. *cristata* Ktze.) ดอกบิดจีบม้วนไปมาอยู่ในช่อคล้ายหงอนไก่ มีทั้งสีแดง เหลือง ขาว ชมพู ผลเมล็ดกลมแบนสีดำ แข็งเป็นมัน ขยายพันธุ์โดยเพาะเมล็ด (คมสัน หุตะแพทย์, 2546) ส่วนของราก ลำต้น ก้านและใบ ดอก และเมล็ดใช้เป็นยา มีสรรพคุณเป็นแก้ไอ ยาระบายแก้ท้องเสียและแก้บิด รักษาริดสีดวงทวารมีเลือดออก อาเจียนเป็นเลือด ตกเลือด และแก้ผดผื่นคันอักเสบ รักษาความดันโลหิต เป็นต้น (นันทวัน บุญยะประภัศรและอรนุช โชคเจริญพร, 2543) จากการศึกษาทางพฤกษเคมีของหงอนไก่ฝรั่ง ดอกสีแดง พบรงควัตถุเบตาเลน (betalains) ได้แก่ amaranthin, isoamaranthin, betalamic acid และ miraxanthin V เป็นต้น โดยเฉพาะ amaranthin และ isoamaranthin เป็นสารกลุ่มเบตาไซยานิน (betacyanin) และพบมากในส่วนของใบ ดอก และบริเวณผิวของลำต้น (Schliemann et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าเบตาเลนจากพืชสายพันธุ์ต่างๆในวงศ์ Amaranthaceae รวมทั้งหงอนไก่มีสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Cai et al., 2003; 2005)

ในอุตสาหกรรมอาหารเบตาเลน เป็นสารให้สีจากธรรมชาติและนำมาใช้เป็นสีผสมอาหารได้ สารนี้พบกระจายในส่วนต่างๆของพืชหลายชนิด (Strack et al., 2003) ในทางการค้าเบตาเลนหรือเบตาไซยานินสกัดได้จากจากหัวเรทบีท (red beet, *Beta vulgaris* L.) ในรูปของสารสกัดเข้มข้น และในรูปผง โดยนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์นม เนื้อสัตว์ และเครื่องดื่มต่างๆ (Delgado-Vargas and Paredes-López, 2003) จากความต้องการใช้สีธรรมชาติทนแทนสีสังเคราะห์มีเพิ่มสูงขึ้น จึงได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัส เซลล์และรากเพาะเลี้ยงของพืชหลายชนิดเพื่อสร้างเบตาเลน (Girod and Zryd, 1987; 1991; Pavlov et al, 2005; Georgiev et al, 2008) ซึ่งสามารถสร้างสารได้ในปริมาณมากและยังเป็นการประหยัดเนื้อที่ในการปลูกเพาะปลูกพืชได้อีกด้วย งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหงอนไก่ โดยทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหรือแคลลัส (callus) จากหงอนไก่ ที่มีความสามารถในการสร้างเบตาเลน เพื่อเป็นแหล่งทางเลือกใหม่ในการผลิตสารให้สีเบตาเลนในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหรือแคลลัสของหงอนไก่

2. เพื่อตรวจสอบการสร้างเบตาเลนจากแคลลัสของหงอนไก่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหรือแคลลัสจากหงอนไก่ ที่มีความสามารถในการสร้างเบตาเลนในปริมาณสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 หงอนไก่

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หงอนไก่ (Cockcomb) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Celosia argentea* Linn. (หงอนไก่ไทย) และ *C. argentea* L. var. *cristata* Ktze. (หงอนไก่ฝรั่ง) จัดอยู่ในวงศ์ Amaranthaceae (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527; นันทวัน บุญยะประภัศรและอรนุช โชคเจริญพร, 2543; คมสัน หุตะแพทย์, 2546)

ลักษณะหงอนไก่ไทย (ภาพที่ 2.1ก.) เป็นพืชปีเดียวตาย สูงประมาณ 60-80 เซนติเมตร ลำต้นไม่มีขนตั้งตรงสีเขียวถึงม่วงแดงมักแตกกิ่งก้านสาขา ใบออกสลับกัน ตัวใบลักษณะเรียวแหลมหรือกลมรีปลายแหลม ยาว 5-9 เซนติเมตร กว้าง 1-3 เซนติเมตร ฐานใบค่อยๆเรียวเล็กลงจนติดก้านใบ ขอบใบเรียบ ดอกออกเป็นช่อที่ยอดหรือง่ามใบ ก้านช่อดอกกลมยาว 3-10 เซนติเมตร ดอกย่อยอยู่ติดๆกัน ส่วนปลายสีชมพู ส่วนล่างลงมาสีขาว ดอกย่อยแต่ละดอกมีกลีบเลี้ยงผอมบาง 3 กลีบ กลีบดอก 5 กลีบ มีเกสรตัวผู้ 5 อัน อับเรณูสีแดง รังไข่กลมยาว ก้านเกสรตัวเมียเป็นเส้นยาวสีแดง ส่วนปลายแยกเป็น 2 รอยตื้นๆ ผลทรงกลม ภายในมีเมล็ดหลายเม็ด เมล็ดลักษณะกลมแบนเปลือกนอกแข็งสีดำเป็นมัน ออกดอกในช่วงฤดูร้อน ติดผลในช่วงฤดูฝนเข้าฤดูหนาว พบขึ้นเองตามป่าโปร่ง บนภูเขา ริมน้ำ และชายทะเล (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527)

ลักษณะหงอนไก่ฝรั่ง (ภาพที่ 2.1ข.) เป็นพืชปีเดียวตาย สูงประมาณ 60-90 เซนติเมตร ลำต้นไม่มีขนตั้งตรง ใบออกสลับกัน ตัวใบเรียวยาว ปลายแหลม ยาว 5-12 เซนติเมตร กว้าง 3.5-6.5 เซนติเมตร ฐานใบค่อยๆเรียวเล็กลงจนติดก้านใบ ขอบใบเรียบ ดอกออกเป็นช่อที่ยอด ลักษณะคล้ายหงอนไก่มีสีแดงเข้ม ส้ม ชมพู ขาวและเหลืองหรือหลายสีผสมกัน ดอกย่อยอยู่ติดกันแน่น แต่ละดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ กลีบดอก 5 กลีบปลายแหลม ยาว 5-8 มิลลิเมตร มีเกสรตัวผู้ 5 อัน ก้านเกสรตัวผู้ด้านล่างติดกัน ก้านเกสรตัวเมียมี 1 อัน ส่วนปลายมีรอยแยกเป็น 2 รอยตื้นๆ ผลทรงกลม แก่แล้วแตกออกตามขวาง ภายในมีเมล็ดสีดำ 2 ถึงหลายเม็ด เมล็ดออกดอกในช่วงฤดูฝน ติดผลในช่วงฤดูหนาว พบเป็นไม้ประดับกันทั่วไป (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527)

การขยายพันธุ์โดยเพาะเมล็ด เป็นไม้ชอบกลางแจ้ง ชอบแดดจัด ปลูกในดินที่ร่วนซุย (คมสัน หุตะแพทย์, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ข.

ภาพที่ 2.1 ก. ต้นหงอนไก่ไทย (*Celosia argentea* Linn) และ ข. หงอนไก่ฝรั่ง (*C. argentea* L. var. *cristata* Ktze)
ที่มา: คณิตา เลขะกุล (2536)

2.1.2 สารเคมีที่พบในหงอนไก่

ต้นหงอนไก่ มีกรดออกซาลิค (oxalic acid) จำนวนมาก ต้นที่มีอายุ 2 สัปดาห์ จะมีมากที่สุดถึง 12.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นปริมาณกรดจะค่อยๆลดลงเหลือประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527)

เมล็ด มีกรดไขมัน และโปแตสเซียมไนเตรตมาก นอกจากนี้ยังมีกรดนิโคตินิค (nicotinic acid) ด้วย (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527)

ดอกหงอนไก่สีแดง มีรงควัตถุเบตาเลนในกลุ่มเบตาไซยานิน (betacyanin) ได้แก่ amaranthin, isoamaranthin และ betalamic acid ในปริมาณมาก ขณะที่สารกลุ่มเบตาแซนทิน (betaxanthin) พบในปริมาณที่น้อย ในทางตรงกันข้ามกับดอกหงอนไก่สีเหลืองและส้ม พบมี miraxanthin V, 3-methoxytyramine และ (s)-trytophan betaxanthin ในปริมาณมาก ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (Schliemann et al., 2001)

ใบสีแดงของหงอนไก่ มีเบตาเลนในกลุ่มเบตาไซยานินและเบตาแซนทินเช่นเดียวกับที่พบในดอก (ตารางที่ 2.1) (Schliemann et al., 2001) โครงสร้างทางเคมีของเบตาเลนที่พบในหงอนไก่ แสดงในภาพที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารเบตาเลนที่พบในดอกและเนื้อเยื่อของ *Celosia argentea* สายพันธุ์ต่างๆ

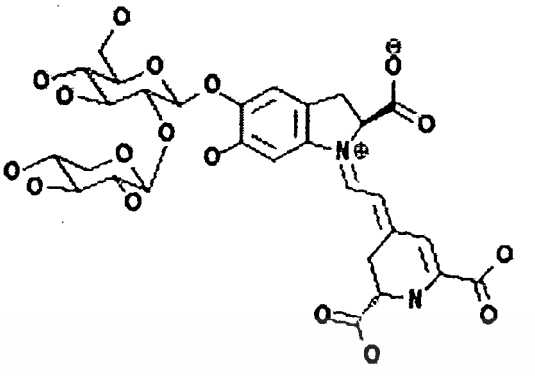
ส่วนต่างๆพืช	ปริมาณเบตาเลนทั้งหมด [nmol (g fr:wt)$^{-1}$]	ปริมาณเบตาเลน [nmol (g fr.wt)$^{-1}$]				
		1/1'	2	3	4	5
Celosia argentea var. *cristata*						
ดอกสีเหลือง	92.1	3.5	12.1	58.0	16.1	2.4
ดอกสีส้ม	228.2	96.8	35.0	80.8	12.2	3.4
ดอกสีแดง	396.0	373.6	10.2	10.2	1.8	0.2
ใบสีแดง	493.5	480.8	10.5	2.0	0.2	Trace
Epidermal layer ของลำต้นสีแดง	230.3	213.0	15.7	1.6	n.d.[a]	Teace
Celosia argentea var. *plumose*						
ดอกสีเหลือง	456.5	Trace	19.6	364.4	59.2	13.3
ดอกสีส้มแดง	621.5	208.3	11.0	330.3	62.5	9.4

[a]n.d., Not detected

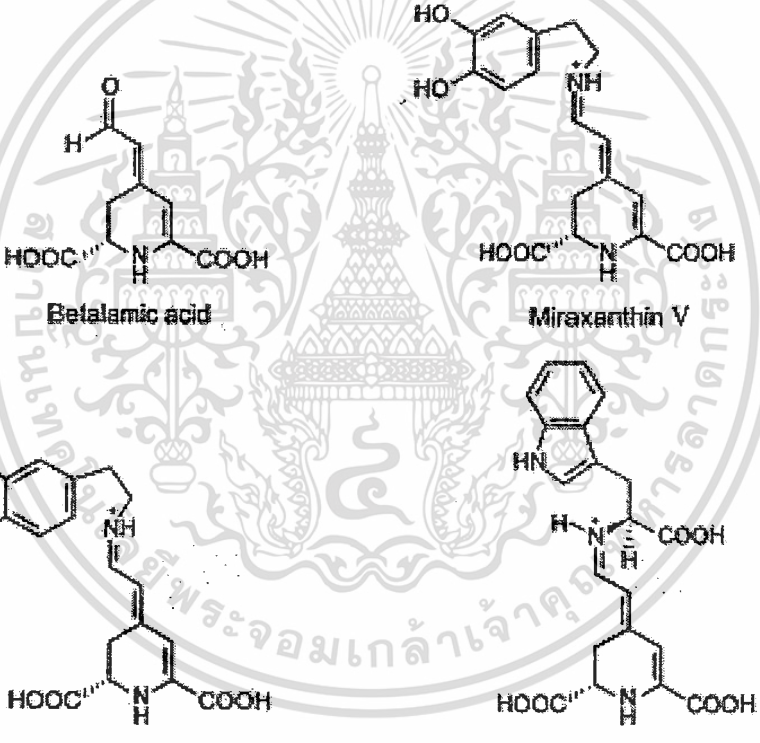
Amaranthin (1), isoamaranthin (1'), betalamic acid (2), miraxanthin V (3), 3-methoxytyramine-betaxanthin (4), (s)- trytophan- betaxanthin (5)

ที่มา : Schliemann et al. (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Amaranthin



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของเบตาเลนที่พบในหงอนไก่

ที่มา : http://en.wiktionary.org/wiki/betalain และ Schliemann et al. (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ประโยชน์ทางสมุนไพรของหงอนไก่

หงอนไก่ใช้เป็นไม้กระถาง ไม้ประดับแปลง ไม้ตัดดอก ดอกไม้แห้ง (คณิตา เลขกุล, 2536) ก้านและใบ ต้นอ่อน ดอกและเมล็ด ใช้เป็นยา ประโยชน์ทางสมุนไพรของหงอนไก่ มีดังนี้ (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527; นันทวัน บุญยะประภัศรและอรนุช โชคเจริญพร, 2543; ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ, ม.ป.ป.)

ลำต้น ใช้ต้นสดต้มเอาน้ำดื่มแก้ท้องเสีย รักษาริดสีดวงทวารมีเลือดออก แก้อาเจียนเป็นเลือด ตกเลือด ใช้ต้นอ่อนตำพอกแก้พิษตะขาบกัด

ก้านและใบ ใช้ใบสดประมาณ 30-60 กรัม ต้มหรือคั้นเอาน้ำดื่มเป็นยาระบาย แก้บิด อาเจียรเป็นเลือด ตกเลือด รักษาริดสีดวงทวารมีเลือดออก ใช้ตำพอกแก้ผื่นคัน แผลมีเลือดออก

ดอก ใช้ดอกสดประมาณ 30-60 กรัม หรือดอกแห้งประมาณ 15-30 กรัม ต้มเอาน้ำดื่มแก้บิด แก้ไอ อาเจียนเป็นเลือด เลือดไหลไม่หยุด เลือดกำเดาออก ตกเลือดตกขาว ถ่ายเป็นมูกเลือด ปวดศีรษะ โรคตาแดง เยื่อตาอักเสบ แก้ผดผื่นคัน

เมล็ด ใช้เมล็ดแห้งประมาณ 4-5 กรัม ต้มน้ำหรือบดเป็นยาเม็ด รับประทานลดความดันโลหิต แก้อุจจาระเป็นเลือด บิดมีมูกเลือด ห้ามเลือด เลือดกำเดาไหล แก้ตาฟางในเวลากลางคืน

ราก แก้หืด แก้ไข้เพื่อลม แก้อัมพฤกษ์ แก้โลหิตพิการ

หญิงที่อยู่ในระหว่างการมีประจำเดือนไม่ควรใช้ยานี้

2.2 เบตาเลน (Betalains)

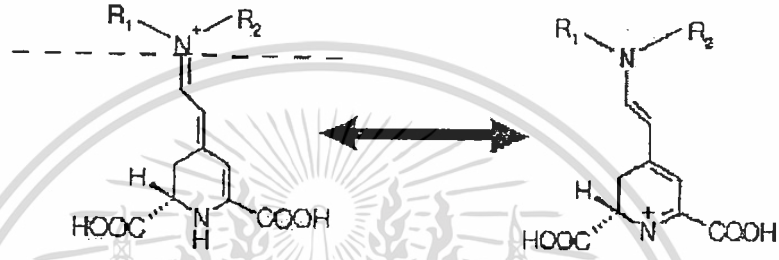
เบตาเลนเป็นอนุพันธ์ immonium ของกรดเบตาลามิก (betalamic acid) สูตรทั่วไปมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นประจุบวก 1,2,4,7,7-pentasubstituted 1,7-diazaheptamethin ดังแสดงในภาพที่ 2.3 การเรียกชื่อทั่วไปของเบตาเลน มีความเกี่ยวข้องกับชนิดของพืชที่มีการค้นพบสารนี้เป็นครั้งแรก เช่น สารกลุ่มเบตาไซยานิน amaranthine-I แยกได้จาก *Amaranthus tricolor*, betanin แยกได้จาก *Beta vulgaris*, และ gomphrenin-I แยกได้จาก *Gomphrena globosa*, และสารกลุ่มเบตาแซนทิน miraxanthin แยกได้จากดอก *Mirabilis jalapa*, vulgaxanthin-I และ II แยกได้จากรากของบีท (*B. vulgaris*) และ portulaxanthin แยกได้จากกลีบดอกของ *Portulaca grandiflora* เป็นต้น (Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2003)

2.2.1 โครงสร้างทางเคมี

เบตาเลนเป็นกลุ่มรงควัตถุที่ให้สีแดงและสีเหลือง สมัยก่อนเรียกว่า nitrogeneous anthocyanins (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539) แบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี เป็น 2 กลุ่ม คือ เบตาไซยานิน (betacyanin) และเบตาแซนทิน (betaxanthin) โดยเบตาไซยานินให้สีม่วงแดง ส่วนเบตาแซนทินให้สีเหลือง เบตาเลนมากกว่า 50 ชนิดมีลักษณะโครงสร้างหลักที่คล้ายกันและหมู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R_1 และ R_2 เป็นหมู่ที่สามารถมาเกาะกับโครงสร้างหลักได้ คือ หมู่ไฮโดรเจน หมู่อะโรมาติก และหมู่อื่นๆ สีของเบตาเลนเกิดจากการเรโซแนน (resonance) ของพันธะคู่ (ภาพที่ 2.3) การดูดกลืนแสงของเบตาเลน พบว่าสารในกลุ่มเบตาไซยานินที่ให้สีม่วงแดงมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และสารในกลุ่มเบตาแซนทินที่ให้สีเหลืองมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ((นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539; Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2003)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างพื้นฐานของเบตาเลน
ที่มา : Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez (2003)

2.2.2 การกระจายของเบตาเลนในพืช

เบตาเลนพบกระจายตัวในพืชชั้นสูงใน order Caryophyllales โดยพืชที่การสร้างเบตาเลนมีจำนวน 10 วงศ์ (family) คือ Aizoacea, Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didieraceae, Holophytaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae และ Portulacaceae (Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2003; Strack et al., 2003) เบตาเลนพบในส่วนต่างๆของพืช (plant organs) ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และแหล่งสะสมสารพบอยู่ในแวคิวโอล โดยเฉพาะในบริเวณของเนื้อเยื่อผิวชั้นนอกและผิวชั้นกลาง นอกจากนี้ยังมีการเก็บสะสมเบตาเลนในหัวใต้ดินของบีท (red beet) ด้วย (Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 การกระจายตัวของเบตาเลนในส่วนต่างๆของพืช

ส่วนต่างๆของพืช	สารให้สีที่พบ	ตัวอย่างพืช
ดอก	สีแดง, ชมพู, เหลือง และส้ม	พืชในวงศ์ Aizoaceae และ Portulacaceae
ผล	สีเหลือง ,แดง และม่วง	ผลกระบองเพชร
ราก	สีม่วงแดง	รากของบีท
กลีบใบประดับ	ช่วงสีหลายสี	*Bougainvillea* spp.
เมล็ด	สีเหลือง และแดง	*Amaranthus* spp
ใบและลำต้น	ช่วงสีเดียว	*Teloxis* spp.

ที่มา : Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez (2003)

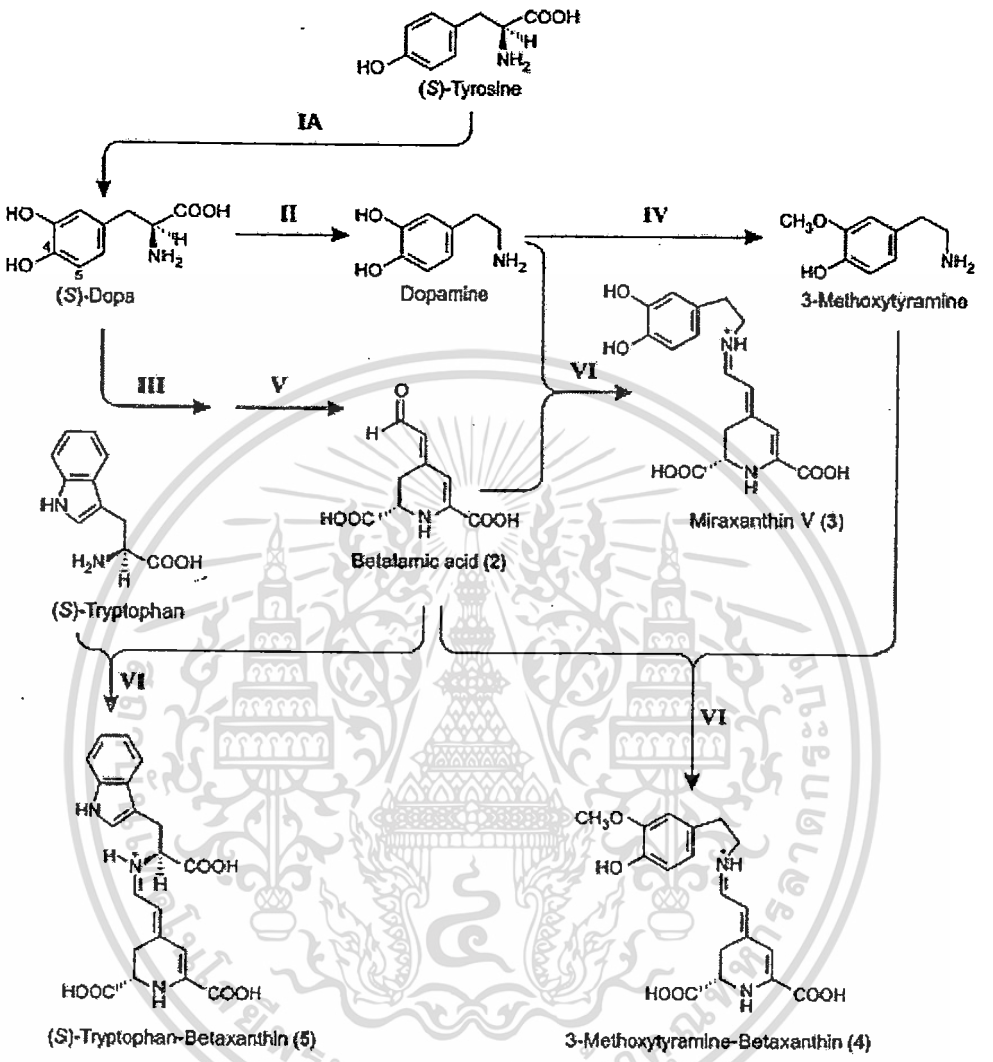
2.2.3 ชีวสังเคราะห์ของเบตาเลน

Schliemann et al. (2001) ได้มีการนำเสนอวิถีชีวสังเคราะห์ของเบตาเลนในกลุ่มของเบตาแซนทินที่พบอยู่ในพืชตระกูล *Celosia* โดยเกิดจากสารตั้งต้น คือ (S)-tyrosine อาศัยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดเกิดเป็น 3-methoxytyramine-betaxanthin, (S)- trytophan-betaxanthin และ miraxanthin V ดังแสดงในภาพที่ 2.4

2.2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเบตาเลน

เบตาเลนที่แยกได้จากพืชหลายชนิดมีสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant activity) Cai et al. (2003) ได้ทำการแยกสารเบตาเลนจากพืชวงศ์ Amaranthaceae (*Amaranthus* และ *Celosia*) 19 ชนิด ได้แก่ สารกลุ่มเบตาไซยานิน amaranthin, gomphrenin และ betanin และเบตาแซนทินหลายชนิดจากพืชสกุล *Celosia* มาทำการศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่าเบตาเลนทุกชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 3.4-8.4 μM และสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของเบตาเลนมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมี ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl groups) และไอมิโน (imino groups) ในโครงสร้างของโมเลกุล นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล และการเกิดปฏิกริยา glycosylation ของอะไกลโคนในโมเลกุลของเบตาเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 ชีวสังเคราะห์ของเบตาแซนทินในพืชตระกูล *Celosia*
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง คือ tyrosinase (IA), Dopa decarboxylase (II), Dopa dioxygenase (III), *O*-methyltransferase (IV), ปฏิกิริยา cyclization (V) และปฏิกิริยาการรวมตัว (VI)
ที่มา : Schliemann et al. (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 ประโยชน์ของเบตาเลนในอุตสาหกรรมอาหาร

เบตาเลนถูกนำมาใช้เป็นสารให้สีในอาหารเมื่อ 20 ปีที่ผ่านมา โดยนำมาใช้กับน้ำผลไม้จำพวกพอดเบอรี่ (pokeberry) หรือใช้ในการปรับปรุงสีแดงในไวน์ ในทางการค้าเบตาเลนจะถูกนำมาใช้ในน้ำผลไม้เท่านั้นในรูปของสารสกัดชนิดผง และสารสกัดซึ่งได้จากผลเรดบีท ซึ่งผ่านกรรมวิธีทำแห้งแบบสุญญากาศ หรือวิธีการทำแห้งแบบใช้ลมร้อนเป่าละอองฝอยให้แห้งเป็นผง และมีการใช้เอนไซม์เพื่อช่วยทำให้สารให้สีมีลักษณะดีขึ้น การใช้สารสกัดที่ได้จากบีทประสบปัญหาความไม่คงตัวของสี กลิ่นและรสชาติ และสารสกัดที่ได้มีปริมาณน้อย นอกจากนี้พบว่าสารสกัดเบตาเลนจากบีทมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆได้ เช่น ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ไขมันและน้ำมัน สารเคลือบผิวในผักและผลไม้ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และอาหารทะเล เป็นต้น (Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2003) และจากสมบัติการละลายน้ำและความคงตัวของเบตาเลนที่ความเป็นกรดด่าง 3-7 จึงน่าสนใจที่จะใช้เป็นสารให้สีในอาหารประเภทที่มีกรดต่ำ (low acid food) (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539; Strack et al., 2003)

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.3.1 ความหมายและหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (สุภาพ สุนทรนนท์, 2546)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) หมายถึง เทคนิคการนำเอาโปรโตพลาสต์ (protoplast), เซลล์ (cell), เนื้อเยื่อ (tissue) หรืออวัยวะ (organ) ของพืช มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น แสง และปริมาณและการถ่ายเทของก๊าซ ส่วนของพืชเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบ แต่ไม่ว่าจะเป็นแบบใดก็ตาม ในที่สุดก็สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้เป็นจำนวนมาก หลักการสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อตัดเอาชิ้นส่วนของพืชที่สะอาด มาเลี้ยงในขวดแก้วที่บรรจุอาหารวิทยาศาสตร์ ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาเรียบร้อยแล้ว เมื่อเซลล์จากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเลี้ยงได้รับแร่ธาตุ วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาลจากอาหารวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในสภาพปลอดเชื้อ จะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นโดยตรง หรือเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เรียกว่าแคลลัส หรือเกิดเป็นคัพภะที่เรียกว่า โซมาติกเอมบริโอ หรือเอมบริออยด์ และเมื่อตัดแบ่งเป็นชิ้นๆ แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่บ่อยๆ ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด ผลสุดท้ายจะได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการเป็นจำนวนมาก

2.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (สุภาพ สุนทรนนท์, 2546)

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสำคัญมากที่จะทำให้งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะแตกต่างกันตามวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชแต่ละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด หรือต่างกันตามแต่ละระยะการเจริญของพืช แต่อย่างไรก็ตามอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วๆไปจะประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน คือประกอบด้วยธาตุอาหารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช น้ำตาล วิตามิน คาร์โบไฮเดรต รวมทั้งพวกกรดอะมิโน และสารประกอบอื่นที่ได้จากสารสกัดธรรมชาติ

1. ธาตุอาหารอนินทรีย์

ปริมาณธาตุอนินทรีย์ในสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถปรับให้มากน้อยได้ตามความเหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด สูตรที่ใช้เป็นพื้นฐานทั่วไปได้แก่สูตรของ Murashige และ Skoog (MS) สารละลายเข้มข้นของสารเหล่านี้ควรเก็บในตู้เย็นซึ่งสามารถเก็บได้เป็นเวลาหลายเดือน การเตรียมสารละลายเข้มข้นควรใช้น้ำกลั่นและเครื่องแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้ว หากสังเกตุพบว่าสารละลายเข้มข้นที่เตรียมไว้เริ่มขุ่นควรกำจัดทิ้ง ไม่ควรนำมาใช้อีก

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต

2.1 ออกซิน ได้แก่ indol-3-acetic acid (IAA), 1-napthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ 3-indolebutyric acid (IBA) เป็นสารช่วยเร่งการเจริญเติบโตพืชโดยช่วยในการแบ่งเซลล์ และเร่งการเกิดราก สารนี้จะยับยั้งการเจริญเมื่อมีความเข้มข้นสูง สาร 2,4-D จะช่วยกระตุ้นให้พืชสร้างแคลลัส ส่วน IAA, NAA และ IBA จะช่วยกระตุ้นการเกิดราก

2.2 ไซโตไคนิน ได้แก่ 6-furfurylaminopurine (kinetin), 6-benzyladenine (BA), Zeatin และ N-isopentenylaminopurine (2iP) ช่วยเร่งการแบ่งตัวของเซลล์ การยืดส่วนยอด และการสร้างยอด

2.3 วิตามิน เป็นสารช่วยเร่งปฏิกิริยาในการทำงานของเอนไซม์ วิตามินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ thiamine (B1), nicotinic acid, pyridoxine, panthothenic acid, biotin, folic acid และ ascorbic acid เป็นต้น สารละลายเข้มข้นของวิตามินควรเก็บไว้ในช่องแข็ง

2.4. สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ปกติเซลล์เนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารจะยังไม่มีการสังเคราะห์แสง ดังนั้นจึงต้องการสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเติมกลูโคส แซคคาร์โรส ฟรุคโตส หรือซูโครส ประมาณ 2-5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน

2.5 Hexitols Myo-inositol เป็นสาร hexitols ที่พบว่ามีความสำคัญมากกับการเจริญของเซลล์ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอาจจะเป็นสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน สารพวก hexitols มีปฏิกิริยาคล้ายพวกวิตามิน

2.6 สารช่วยให้อาหารแข็ง อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่เป็นอาหารแข็ง วัสดุที่นิยมนำมาใช้เพื่อให้อาหารแข็งตัวและสะดวกต่อการเพาะเลี้ยงคือวุ้น วุ้นที่นิยมใช้เป็นอาหารทั่วๆ ไป คือ granulated agar หรือ gelrite agar ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง ส่วนวุ้นทำขนมก็สามารถใช้ได้แต่ไม่ค่อยบริสุทธิ์ อาจมีผลต่อเนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 กรดอะมิโน เป็นสารที่สำคัญต่อขบวนการ morphogenesis L-tyrosine ช่วยในการกระตุ้นให้สร้างยอด L-arginine ช่วยสร้างรากในบางครั้งพบว่า L-glutamine และ asparagine จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพใน somtic embryogenesis

2.8 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆส่วนใหญ่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติใช้ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากมอลท์ น้ำมะเขือเทศ น้ำต้มมันฝรั่ง เป็นต้น

2.3.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (สุภาพ สุนทรนนท์, 2546)

1. การขยายพันธุ์พืช เป็นการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศแบบหนึ่ง จากชิ้นส่วนใดชิ้นส่วนหนึ่งของพืชทำให้ได้ต้นพืชที่ตรงตามพันธุ์เดิมทุกประการและปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยอาหารสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นได้เป็นทวีคูณ

2. การผลิตพืชปราศจากไวรัส โดยปกติพืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย การรักษาและกำจัดเป็นไปได้ยาก เนื่องจากไวรัสมีอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก และสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ก็ต่อเมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์ชนิดอื่นๆ ดังนั้นต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของไวรัส จึงไม่แสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อให้เห็น จะทราบได้ก็เมื่อเกิดอาการบนต้นพืช ทำให้พืชอ่อนแอ ผลผลิตลดลงและอื่นๆ

3. การปรับปรุงพันธุ์พืช การนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชนั้น ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของผู้ปฏิบัติว่าต้องการในด้านใด และจะช่วยแก้ปัญหาอย่างไร

4. การเก็บรักษาพันธุ์ ปัจจุบันพืชพันธุ์หลายชนิดได้ สูญพันธุ์ หรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปอย่างน่าเป็นห่วง อาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์

5. การศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและใกล้ชิด เช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช หรือต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการควบคุมตัวแปรต่างๆ ในหลอดทดลองกระทำได้ง่ายกว่าในแปลงทดลอง

6. การผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยา หรือมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม สารเหล่านี้ ได้แก่ สารสี สารอัลคาลอยด์จากยาสมุนไพร สารหอมระเหย เป็นต้น แต่ในบางครั้งปริมาณเนื้อสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก จะต้องใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากนำมาสกัดแยก การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชเหล่านั้นในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสม อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่ต้องการได้มากขึ้น ซึ่งวิธีการนี้ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการรอเก็บผลผลิตจากต้นไม้แล้วนำมาสกัด ทั้งประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายอีกด้วย

7. การทำ artificial seeds ปัจจุบันการผลิตเมล็ดพันธ์ทางการค้า เสียค่าใช้จ่ายสูงทั้งในด้านแรงงานและใช้พื้นที่จำนวนมาก ดังนั้นการสร้างเมล็ดพันธ์พืชในห้องปฏิบัติการ โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการสร้าง somatic embryo แล้วนำเอา embryo เหล่านั้นไปทำ encapsulation เพื่อให้ได้ artificial seeds พบว่าประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาลงได้มาก

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเบตาเลนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ดังได้กล่าวมาแล้วว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช ซึ่งมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมได้ ในการผลิตสารเบตาเลนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น ประสบความสำเร็จได้ในพืชหลายชนิด ได้แก่ บีท (*Beta vulgaris* L.), *Portulaca* sp., *Phytolacca americana* และ *Mammillaria candida* เป็นต้น โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัส (callus culture) การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell suspension) และการเพาะเลี้ยงรากลอย (hairy root) นอกจากนี้มีการพัฒนาระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor systems) เพื่อปรับปรุงและเพิ่มปริมาณการผลิตสารเบตาเลน (Georgiev et al., 2008) ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสเพื่อผลิตสารเบตาเลน มีรายงานดังนี้

Girod and Zryd, 1987 ศึกษาแสงมีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อแคลลัสสีเขียวจากต้นเรดบีท (*B. vugaris* L.) ในอาหาร Linsmaier and Skoog (LS) โดยทำการเพาะเลี้ยงแคลลัส ภายใต้แสงที่มีความเข้มแตกต่างกัน พบว่าการให้แสงที่มีความเข้มสูงมีผลต่ออัตราการเจริญของเนื้อเยื่อแคลลัสในการเพิ่มขนาดมากกว่าการใช้แสงที่มีความเข้มต่ำ และเมื่อให้แสงที่มีความเข้มสูง (18 W/m^2) สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสีแดงที่บริเวณผิวของแคลลัสได้

Girod and Zryd (1991) ศึกษาผลของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช 2 ชนิด คือ 2,4-D และ BA ที่ความเข้มข้น 50, 100, 300 µg/l ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเรดบีท ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และให้แสงที่ความเข้มต่ำ พบว่าอัตราส่วนของ 2,4-D และ BA เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการควบคุมการเกิดสีของแคลลัส โดยแบ่งแคลลัสออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ 1 แคลลัสสีเหลือง-แดง และกลุ่มที่ 2 แคลลัสสีส้ม-ม่วง จากการศึกษาชนิดและปริมาณของสารเบตาเลนในแคลลัส พบสารกลุ่มเบตาแซนทินโดยเฉพาะ vulgaxanthin II ในปริมาณมากกว่าสารอื่นๆในแคลลัสสีเหลืองและส้ม ขณะที่แคลลัสสีแดงและม่วง พบการสร้างสารกลุ่มเบตาไซยานิน โดยเฉพาะ betanin ในปริมาณมาก

Vieira et al. (1995) ทำการศึกษาการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ และส่วนลำต้นของ *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. บนอาหาร MS ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิน NAA และไซโตไคนิน BA พบว่าส่วนลำต้นชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบ แคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบและลำต้นมีลักษณะและสีของแคลลัสที่แตกต่างกัน แคลลัสมีสีม่วงแดงอ่อนจนถึงสีม่วงแดงเข้ม และมีการสร้างสารเบตาเลน นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสมีการสร้างสารฟรุกแทน (fructans) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kishima et al. (1995) ศึกษาผลของความยาวคลื่นของแสงต่อการกระตุ้นการสร้างสารเบตาเลนจากแคลลัสของ *Portulaca* sp. 'Jewel' จากการใช้แสงที่มีความยาวคลื่นหรือช่วงแสงที่แตกต่างกัน พบว่าแสงสีฟ้า (blue light) สามารถกระตุ้นให้เกิดมีการสร้างเบตาเลนในแคลลัสได้ และการใช้แสง UV (ultra violet) ร่วมกับแสงสีฟ้า พบแคลลัสบางส่วนมีการสร้างเซลล์ที่มีปริมาณเบตาเลนสูง

Santos-Díaz et al. (2005) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่มีการสร้างสารให้สี (pigment) จากกระบองเพชร *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae) บนอาหารแข็ง MS ที่มีและไม่มีการเติม 2,4-D, NAA หรือ chlorophenoxiacetic acid ความเข้มข้น 3.0 mg/l และ kinetin, kinetin riboside หรือ BA ความเข้มข้น 1.0 mg/l พบว่าประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีการสร้างสารให้สีในอาหาร MS ที่มีการเติม auxins และ 50 เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมออกซินร่วมกับไซโคนินมีการสร้างให้สีเช่นกัน นอกจากนี้พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสและซูโครสลงไปในอาหาร 50 และ 100 g/l และการเติมสารสกัดจากเซลล์เชื้อรา (biotic stress) สามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อพืชให้มีการสร้างเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า

Georgiev et al. (2008) ได้รวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองมาใช้ในการผลิตสารเบตาเลนในพืชหลายชนิด โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากพืชเพื่อผลิตสารเบตาเลน แสดงในตารางที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus culture) เพื่อผลิตสารเบตาเลน

สายพันธุ์พืช	ชนิด	รงควัตถุที่พบ	ปริมาณ	เอกสารอ้างอิง
Beta vulgaris var.	การเพาะเลี้ยง			Girod and Zryd
Bikores Monogerm	แคลลัส			(1991)
	- สีเหลือง	Vulgaxanthin-II	1.813 μmol g^{-1} DW	
		Miraxanthin-V	1.177 μmol g^{-1} DW	
		Total betaxanthin	4.278 μmol g^{-1} DW	
	- สีส้ม	Vulgaxanthin-II	5.519 μmol g^{-1} DW	
		Miraxanthin-V	3.061 μmol g^{-1} DW	
		Total betaxanthin	12.210 μmol g^{-1} DW	
	- สีแดง	Betanin	8.688 μmol g^{-1} DW	
		Isobetanin	0.721 μmol g^{-1} DW	
		Total betacyanin	11.222 μmol g^{-1} DW	
	- สีม่วง	Betanin	22.629 μmol g^{-1} DW	
		Isobetanin	2.903 μmol g^{-1} DW	
		Total betacyanin	28.016 μmol g^{-1} DW	
Gomphrena	การเพาะเลี้ยง		-	Vieira et al.
macrocephala St.-Hil.	แคลลัส	Betanins		(1995)
Mammillaria candida	การเพาะเลี้ยง	Modified	-	Santos-Díaz
	แคลลัส	bataxanthins		et al. (2005)
Portulaca sp. 'Jewel'	การเพาะเลี้ยง			Kishima et al.
	แคลลัส	Betalains	8.5 ng g^{-1} FW	(1995)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Georgiev et al. (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดหงอนไก่ฝรั่ง ตรางอบทอง ของบริษัท ที เอส เอ จำกัด กรุงเทพฯ

3.1.2 อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ
2. มีดผ่าตัด
3. ปากคีบ
4. โกร่งบดยา
5. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
7. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง (Balance)
9. เครื่องวัดกรด-ด่าง (pH meter)
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectophotometer)
11. ไมโครเวฟ (Microwave)
12. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
13. กระดาษอะลูมิเนียมฟลอยด์
14. กระดาษกรอง (Whatman No.1, USA)
15. แผ่น aluminium sheets silica gel 60 F_{254} (Merck, Germany)
16. โถแก้ว สำหรับทำ thin layer chromatography (TLC)

3.1.3 สารเคมี

1. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (1969) หรือ MS ประกอบด้วย

1.1 Ammonium nitrate (NH_4NO_3) (Merck, Germany)

1.2 Potassium nitrate (KNO_3) (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
115630

1.3 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) (Anelar, England)

1.4 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Univar, Australia)

1.5 Boric acid (H_3BO_3) (Fisher Chemicals, UK)

1.6 Manganese (II) sulfate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$) (Univar, Australia)

1.7 Zine sulphate ($ZnSO_4.H_2O$) (Merck, Germany)

1.8 Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$) (Carlo Erba, Germany)

1.9 Cupper (II) sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) (Carlo Erba, Germany)

1.10 Cobalt (II) Chloride ($CoCl_2.6H_2O$) (Fisher Chemicals, UK)

1.11 Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$) (Univar, Australia)

1.12 Potassium iodide (KI) (Carlo Erba, Germany)

1.13 Thiamine HCl (Fluka, Germany)

1.14 Myo-Inositol (Fluka, Japan)

1.15 Sodium EDTA (Na_2EDTA) (Univar, Australia)

1.16 Iron (II) sulfate heptahydrate ($Fe_2SO_4.7H_2O$) (Carlo Erba, Germany)

2. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ สารกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน

2.1 ออกซิน (Auxins)

- 1-napthaleneacetic acid (NAA) (Gibco,USA)
- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Fluka, USA)

2.2 ไซโตไคนิน (Cytokinins)

- 6-benzyladenine (BA) (Fluka, Hungary)

3. Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Germany)

4. Hydrochloric acid (HCl) (Merck, Germany)

5. Methanol (CH_3OH) (Merck, Germany)

6. Ethyl acetate ($C_4H_8O_2$) (Anelar, England)

7. Tween 20 (Merck, Germany)

8. Clorox® (Bleach, Malaysia)

9. 95% Ethanol

10. น้ำตาลทราย (วังขนาย, สุพรรณบุรี)

11. วุ้นผง (agar) (SP Science, กรุงเทพฯ)

12. น้ำกลั่น

3.2 วิธีการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1 การเพาะเมล็ดหงอนไก่ในสภาพปลอดเชื้อ

1. นำเมล็ดหงอนไก่ฝรั่งจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ (Clorox®) ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเติม tween 20 ลงไป 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที

2. ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง เขย่าครั้งละ 5-10 นาที

3. วางเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงบน plate ที่มีกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

4.ใช้ปากคีบปลอดเชื้อย้ายเมล็ดหงอนไก่ นำไปวางลงบนอาหารแข็ง Murashige และ Skoog (1962) หรือ MS ดังแสดงในภาคผนวก ก.

5. ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ด ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง 16 ชั่งโมงต่อวัน

6. ตรวจผลการงอกของเมล็ดไปเป็นต้น บันทึกการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเมล็ดทุกๆ สัปดาห์ จนครบ 6 สัปดาห์

3.2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบของหงอนไก่

1. เตรียมอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 6-benzyladenine (BA) ร่วมกับ 1-napthaleneacetic acid (NAA) และ BA ร่วมกับ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0.0, 1.0 และ 2.0 mg/l รวม 15 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1

2. ตัดชิ้นส่วนของใบหงอนไก่ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร จากต้นที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS อายุ 6 สัปดาห์ (จากข้อ 3.2.1) นำมาวางลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 15 สูตร โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆละ 5 ชิ้นส่วนต่อสูตรอาหาร

3. นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง 16 ชั่งโมงต่อวัน

4. ตรวจผลการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนใบไปเป็นแคลลัส (callus) ทุกๆ 1 สัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ และให้คะแนนการเกิดแคลลัสตามเกณฑ์ในภาคผนวก ข. และทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดและให้แคลลัสที่มีสีแดง

3.2.3 การตรวจวิเคราะห์เบตาเลน

1. การเตรียมสารสกัดเบตาเลนจากตัวอย่างพืช (ดัดแปลงจาก Schliemann et al., 2001)

1.1 นำต้นหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (จากข้อ 3.2.1) และแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบ (จากข้อ 3.2.2) โดยชั่งตัวอย่างพืช 2.0 กรัม เติมเมธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยโกร่งที่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 นำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10,000x*g* เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

1.3 นำส่วนใสหรือสารสกัดเมธานอลที่ได้มาตรวจวิเคราะห์เบตาเลน โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC) และ spectrophotometer

2. การตรวจสอบการสร้างสารเบตาเลนโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

2.1 นำสารสกัดเมธานอลที่ได้จากข้อ 1 มาจุดลงบนแผ่น aluminium sheets silica gel 60 F_{254} ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำให้แห้ง

2.2 นำแผ่น TLC ไปจุ่มในโถที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายเมธานอล : เอธิลอะซิเตท : น้ำ อัตราส่วน 3 : 4 : 4 และปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นระยะทาง 8 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น

2.3 นำแผ่นโครมาโตแกรมที่ได้ไปทำให้แห้ง ทำการตรวจดูการสร้างสารสีชมพูอมแดงของเบตาเลน และหาค่า Rf จากสูตร

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณเบตาเลนด้วยเทคนิค Spectrophotometer ตามวิธีของ Schliemann et al. (2001)

3.1 นำสารสกัดเมธานอลที่ได้จากข้อ 1 ทำการสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสง โดยกำหนดช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร บันทึกค่าความยาวคลื่นที่ตัวอย่างมีค่าการดูดกลืนสูงสุด จากนั้นนำสารสกัดของตัวอย่างพืชมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 และ 540 นาโนเมตร

3.2 คำนวณหาปริมาณเบตาเลนในสารสกัดจากตัวอย่างพืช โดยใช้ค่า ε (molar extinction coefficients) ของความยาวคลื่น 540 มีค่า 56.6×10^6 $cm^2 mol^{-1}$ จากสูตร

$$A = \varepsilon bc$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากต้นหงอนไก่ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ε = ค่า molar extriction coefficient ของ amaranthin ที่ 540 นาโนเมตร เท่ากับ 56.6×10^6 cm^2 mol^{-1} (Schliemann et al., 2001 อ้างถึง Piattelli et al., 1969)

b = ค่าความกว้างเซลล์ (คิวเวต) 1 เซนติเมตร

c = ปริมาณสารเบต้าแซนทินในสารสกัดตัวอย่าง (mol/l)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเพาะเมล็ดหงอนไก่ในสภาพปลอดเชื้อและการเจริญเติบโตของต้นหงอนไก่

จากการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดหงอนไก่ โดยใช้สารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง 16 ชั่งโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเมล็ด ส่วนการเจริญของเมล็ดไปเป็นต้นหงอนไก่นั้น พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 เมล็ดเริ่มมีการงอกของรากสีขาวและมีการเจริญของยอดเกิดขึ้น ในสัปดาห์ที่ 2 มีการแตกของใบอ่อนสีแดงเข้มเกิดขึ้น 1 คู่และลำต้นมีสีแดงเข้ม ความสูงประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร สัปดาห์ที่ 3 ลำต้นมีความสูงเพิ่มขึ้น พบมีใบผลิออกมาอีกเพิ่มอีก 1 คู่ ใบมีสีเขียวอมแดง ในสัปดาห์ที่ 4 ลำต้นสีแดงอมเขียว มีความสูงประมาณ 3.0 เซนติเมตร และใบที่เจริญเต็มที่แล้วมีสีเขียวเข้ม พบมีสีแดงที่บริเวณเส้นกลางใบ ในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ลำต้นมีสีเขียวบริเวณส่วนยอด และพบสีแดงที่บริเวณโคนต้น มีความสูงเพิ่มขึ้น มีการแตกของใบอ่อนเพิ่มขึ้นเป็น 4-6 คู่ ใบสีเขียวเข้ม มีสีแดงที่บริเวณเส้นกลางในและก้านใบ ดังแสดงในภาพที่ 4.1 จากนั้นนำใบหงอนไก่ที่ได้จากต้นในสภาพปลอดเชื้อ มาศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในขั้นตอนต่อไป

ภาพที่ 4.1 หงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสง 16 ชั่งโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบของหงอนไก่

นำชิ้นส่วนใบจากต้นหงอนไก่ในสภาพปลอดเชื้ออายุ 6 สัปดาห์ มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่มีการสารควบคุมการเจริญเติบโต รวม 15 สูตร เพื่อชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าชิ้นส่วนใบมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสและเกิดรากได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 และ 4.3 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบมีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้นจากบริเวณรอยตัดชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS 3 สูตร คือ สูตรที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l (สูตร 9), BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 1.0 mg/l (สูตร 12) และ BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l (สูตร 13) ตามลำดับ ต่อมาพบมีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้นบนสูตรอาหารอื่น ๆ แคลลัสประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กหลายเซลล์เกาะกลุ่มกันเป็นก้อน ลักษณะอุ่มน้ำ ส่วนมากมีสีเหลืองอมเขียว และมีสีแดงอมชมพูเกิดขึ้นที่บริเวณผิวด้านบนของแคลลัส (ภาพที่ 4.2) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l (สูตร 13) มีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้นในปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่น โดยมีคะแนนการเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 3.27$\pm$1.30 (ตารางที่ 4.1) และอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l (สูตร 8) และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l (สูตร 9) ชักนำให้เกิดแคลลัสสีแดงมากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ นอกจากนี้พบว่าอาหารแข็ง MS (สูตร 1) และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม NAA 1.0 และ 2.0 mg/l (สูตร 4 และ 5) สามารถชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนใบได้ (ภาพที่ 4.3) จึงได้ทำการคัดเลือกแคลลัสที่เกิดขึ้นทั้ง 3 สูตร ได้แก่ สูตร 8, 9 และสูตร 13 มาทำการตรวจสอบการสร้างสารเบตาเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบหงอนไก่ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรที่	สารควบคุมการเจริญเติบโต (mg/l)			เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส	คะแนนการเกิดแคลลัส*
	BA	NAA	2,4-D		
1	0			66.67	1.00 ± 0.92^{ab}
2	1.0			6.67	1.67 ± 0.76^{abc}
3	2.0			53.33	1.80 ± 1.39^{abc}
4	0	1.0		33.33	0.47 ± 0.64^{a}
5	0	2.0		6.67	0.33 ± 0.58^{a}
6	1.0	1.0		66.67	2.95 ± 0.33^{bc}
7	1.0	2.0		66.67	2.93 ± 0.90^{bc}
8	2.0	1.0		86.67	2.29 ± 1.31^{abc}
9	2.0	2.0		86.67	2.82 ± 1.00^{bc}
10	0		1.0	93.33	2.07 ± 1.01^{abc}
11	0		2.0	80.00	1.80 ± 1.39^{abc}
12	1.0		1.0	100.00	3.07 ± 0.90^{c}
13	1.0		2.0	100.00	3.27 ± 1.30^{c}
14	2.0		1.0	100.00	3.00 ± 1.25^{bc}
15	2.0		2.0	93.33	2.27 ± 1.37^{abc}

หมายเหตุ ตัวอักษรในแนวนอนหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

*คะแนนการเกิดแคลลัส (ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ) ตามเกณฑ์ในภาคผนวก ข.

0 หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส

1 หมายถึง เกิดแคลลัสน้อยที่สุด (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร)

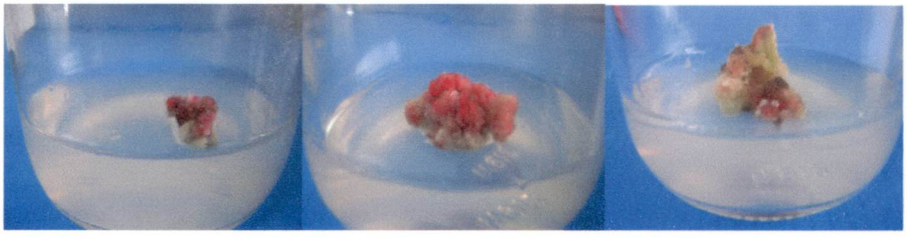
2 หมายถึง เกิดแคลลัสน้อย (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 เซนติเมตร)

3 หมายถึง เกิดแคลลัสปานกลาง (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-1.5 เซนติเมตร)

4 หมายถึง เกิดแคลลัสมาก (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 2.0 เซนติเมตร)

5 หมายถึง เกิดแคลลัสมากที่สุด (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2.0 เซนติเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข. ค.

ภาพที่ 4.2 แคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ก. BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l (สูตร 8) ข. BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l (สูตร 9) และ ค. BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l (สูตร 13)

ก. ข. ค.

ภาพที่ 4.3 รากที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ก. ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (สูตร 1) ข. NAA 1.0 mg/l (สูตร 4) และ ค. NAA 2.0 mg/l (สูตร 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

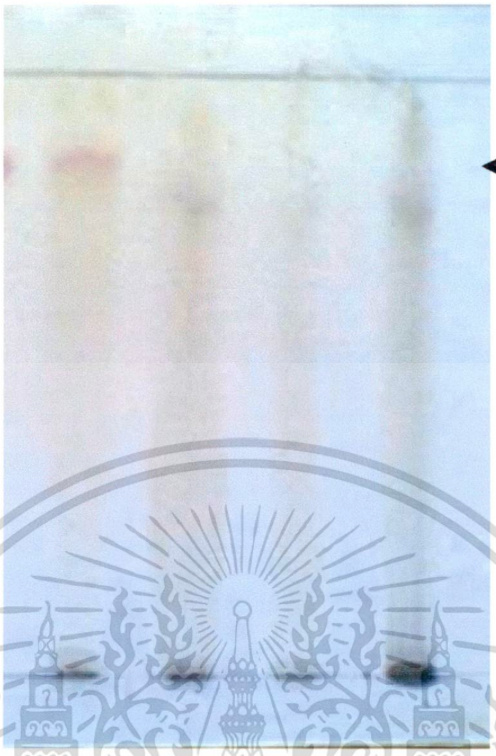
4.3 การวิเคราะห์สารเบตาเลนจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของหงอนไก่

การตรวจสอบการสร้างสารเบตาเลนของหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด และแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารทั้ง 3 สูตรที่ได้ทำการคัดเลือกไว้จากข้อ 4.2 มาสกัดด้วยเมธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบการสร้างสารโดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC) พบว่าต้นหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด และแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l ตรวจพบการสร้างสารสีชมพูอมแดงบนแผ่น TLC และมีค่า Rf เท่ากับ 0.8125 ขณะที่แคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารอื่นๆ ไม่พบมีการสร้างสารชมพูอมแดงบนแผ่น TLC ดังแสดงในภาพที่ 4.4

การวิเคราะห์สารเบตาเลนโดยใช้เทคนิค spectrophotometer พบว่าจากการสแกนสเปกตรัมสารสกัดเมธานอลของหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด และแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และ 4.6 พบว่าลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดที่ได้จากต้นหงอนไก่ มีค่าความยาวคลื่นสูงสุด มีค่า 524.5 นาโนเมตร ขณะที่แคลลัสมีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 477 นาโนเมตร ตามลำดับ

จากการหาปริมาณเบตาเลนในสารสกัดเมธานอล ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด มีการสร้างเบตาเลน (13.65 nmol g^{-1} FW) ในปริมาณที่มากกว่าแคลลัสทุกสูตรที่ได้จากการคัดเลือก โดยแคลลัสพบมีการสร้างเบตาเลนในช่วง 3.19-9.21 nmol g^{-1} FW โดยแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l มีปริมาณเบตาเลนมากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 การตรวจสอบเบตาเลนจากต้นหงอนไก่และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค TLC

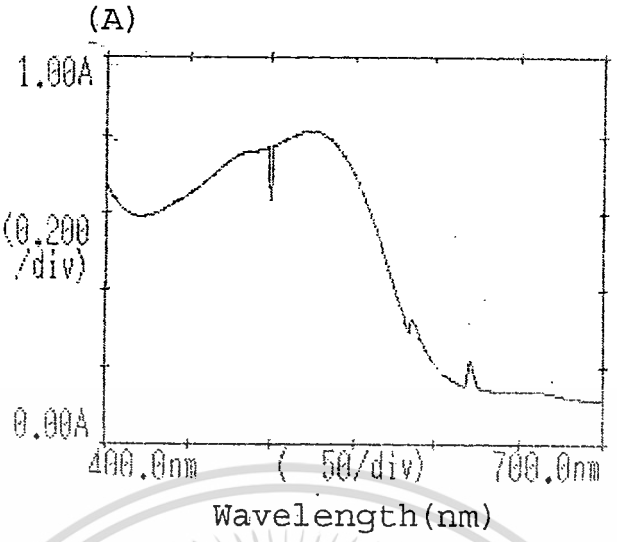
กำหนดให้ ก คือ สารสกัดจากหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด อายุ 6 สัปดาห์

ข คือ สารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

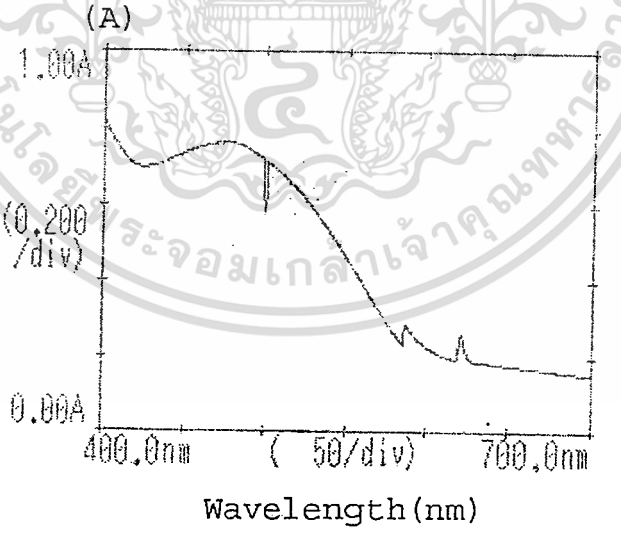
ค คือ สารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ง คือ สารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) และค่าดูดกลืนแสงจากการสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ของสารสกัดจากต้นหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 6 สัปดาห์



ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) และค่าดูดกลืนแสงจากการสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ของสารสกัดแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเบตาเลนทั้งหมดในรูปของ amaranthin ที่พบในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของหงอนไก่

ตัวอย่างพืช	ปริมาณเบตาเลนทั้งหมดในรูปของ amaranthin (nmol g^{-1}FW)
ต้นหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด	13.65±0.02[a]
แคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l	9.21±0.04[b]
แคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l	3.29±0.03[c]
แคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l	3.19±0.01[c]

หมายเหตุ ตัวอักษรในแนวนอนหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การเพาะเมล็ดต้นหงอนไก่ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นเนื้อเยื่อพืชเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ได้ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 30 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้สภาวะดังกล่าว ไม่ตรวจพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในระหว่างการเพาะเมล็ด แสดงให้เห็นว่าคลอรอกซ์ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5.25 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ มีโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1.575 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดได้

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนใบ พบว่าชิ้นส่วนใบมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสและเกิดรากได้ พบว่าอาหารแข็งทุกสูตรสามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ในปริมาณแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.1) ขณะที่อาหารแข็ง MS (สูตร 1) และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม NAA 1.0 และ 2.0 mg/l (สูตร 4 และ 5) สามารถชักนำให้เกิดราก (ภาพที่ 4.3) ซึ่งการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสและรากของชิ้นส่วนใบเป็นผลมาจากชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญพืช สุภาพ สุนทรนนท์ (2546) รายงานว่าออกซิน ได้แก่ NAA และ 2,4-D เป็นสารช่วยเร่งการเจริญเติบโตพืชโดยช่วยในการแบ่งเซลล์และเร่งการเกิดราก สารนี้จะยับยั้งการเจริญเมื่อมีความเข้มข้นสูง สาร 2,4-D จะช่วยกระตุ้นให้พืชสร้างแคลลัส ส่วน NAA จะช่วยกระตุ้นการเกิดราก ขณะที่ไซโคไคนิน BA ช่วยเร่งการแบ่งตัวของเซลล์ ในส่วนของการเกิดแคลลัสพบมีการสร้างสารสีแดงจากชิ้นส่วนใบ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l (สูตร 8) และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l (สูตร 9) สร้างแคลลัสสีแดงมากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ (ภาพที่ 4.2) สอดคล้องกับรายงานของ Santos-Díaz et al. (2005) ได้ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสกระบองเพชร *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae) บนอาหารแข็ง MS ที่มีและไม่มีการเติม 2,4-D, NAA หรือ chlorophenoxiacetic acid ความเข้มข้น 3.0 mg/l และ kinetin, kinetin riboside หรือ BA ความเข้มข้น 1.0 mg/l พบมีการสร้างสารให้สีในกลุ่มของเบตาเลนเกิดขึ้น

การตรวจสอบการสร้างสารเบตาเลนของหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด และแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบ แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของหงอนไก่มีศักยภาพในการผลิตสารเบตาเลน และจากการสแกนสเปกตรัมสารสกัดเมธานอลของต้นหงอนไก่และแคลลัส ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ 524.5 และ 477 นาโนเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5 และ 4.6) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า ε (molar extinction coefficients) ของ amaranthin ที่ความยาวคลื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

540 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 56.6×10^6 cm^2mol^{-1} และค่า ε ของ betaxanthins ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 48×10^6 cm^2mol^{-1} (Schliemann et al., 2001 อ้างถึง Girog and Zryd, 1991) ในการวิเคราะห์ปริมาณเบตาเลนในสารสกัดจากเมธานอล (ตารางที่ 4.2) พบว่าแคลลัสมีการสร้างเบตาเลนในปริมาณที่น้อยกว่าหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสูญเสียความสามารถในการสะสมสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite)ของเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้พัฒนาเป็นอวัยวะ (unorganized tissues) ซึ่งเป็นผลมาจาก 1) การสูญเสียการแสดงออกของเซลล์หรือยีนที่ควบคุมกระบวนการชีวสังเคราะห์; 2) ขาดบริเวณหรือแหล่งในการเก็บและสะสมสาร; 3) เกิดกระบวนการคะตาบอลิสึมของสาร (Charlwood and Rhodes, 1990) อย่างไรก็ตามจากความสามารถของแคลลัสหงอนไก่ในการสร้างสารเบตาเลนได้ สามารถใช้เป็นแหล่งทางเลือกใหม่ในการผลิตสารให้สีเบตาเลนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลัสจากชิ้นส่วนใบของหงอนไก่เพื่อผลิตสารเบตาเลน พบว่าอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบในปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่นๆ เมื่อนำชิ้นส่วนใบมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l มีการสร้างแคลลัสสีแดงเกิดขึ้น จากการตรวจวิเคราะห์เบตาเลนจากหงอนไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดและแคลลัส พบว่าต้นหงอนไก่มีปริมาณเบตาเลน 13.65 nmol g^{-1} FW และแคลลัสมีการผลิตสารเบตาเลนอยู่ในช่วง 3.19 - 9.21 nmol g^{-1} FW แคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถนำใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) หรือชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยง (hairy root culture) เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตเบตาเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

คณิตา เลขะกูล, บรรณาธิการ. 2536. **ไม้ดอกและไม้ประดับเฉลิมพระเกียรติ.** กรุงเทพฯ: ด่านสุทธาการพิมพ์

คมสัน หุตะแพทย์, บรรณาธิการ. 2546. **ดอกไม้กินได้คุณค่าที่มากกว่าความงาม.** กรุงเทพฯ: รุ่งเรืองสาสน์การพิมพ์.

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธและคณะ, บรรณาธิการ. 2527. **สมุนไพร อันดับที่ 03.** กรุงเทพฯ: สารมวลชน.

นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคเจริญพร บรรณาธิการ. 2543. **สมุนไพร..ไม้พื้นบ้าน. เล่ม 5.** กรุงเทพฯ: ประชาชน.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2539. **เคมีอาหาร.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุภาพ สุนทรนนท์. 2546. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน.** กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ. ม.ป.ป. **พืชสมุนไพรใช้เป็นยา. เล่ม 6.** กรุงเทพฯ: อักษราพิพัฒน์.

Cai, Y., Sun, M. and Corke, H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. **J. Agric. Food Chem.** 51: 2288-2294.

Cai, Y.-Z., San, M., and Corke, H. 2005. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthacae. **Trends Food Sci. Technol.** 16: 370-376.

Charlwood, V. B. and Rhodes, M. J. C. 1990. **Physiology of secondary product formation in Plants.** Oxford: Clarendon Press.

Delgado-Vasgas, F., and Paredes-Lopez, O. 2003. **Natural colorances for food and nutraceutical uses.** Boca Raton : CRC Press

Georgier, V., Ilieva, M., Bley, T., and Pavlov, A. 2008. Betalain production in plant *in vitro* system. **Acta Physiol Plant.** 30: 581-593.

Girod, P., and Zryd, J. 1987. Clonal variability and light induction of betalain synthesis in red beet cell cultures. **Plant Cell Rep.** 6: 27-30.

Girod, P.-A., Zryd, J.-P., 1991. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cell: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 25: 1-12.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kistima, Y., Shimaya, A. and Adachi, T. 1995. Evidance that blue light induces betalain pigmentation in Portulaca callus. . **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 43: 67-70.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant** 15: 473-497.

Pavlov, A., Georgiev, V., and Iliera, M. 2005. Betalain biosynthesis by red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy root culture. **Process Biochem.** 40: 1531-1533.

Piattelli, M., Giudici de Nicola, M., and Castrogiovanni, V. 1969. Photocontrol of amaranthin synthesis in *Amaranthus tricolor*. **Phytochemistry** 8: 731-736.

Santos-Diaz, M., Velasquez-Garcia, Y., and Gonzalez-Chaves, M. M. 2005. Pigment production by callus of Mammillaria candida Scheldweiler (Cactaceae). **Agrociencia.** 39: 619-626.

Schliemann, W., Cai., Y., Degenkolb, T., Schmidt, J. and Corke, H. 2001. Betalains of *Celosia argentea*. **Phytochemistry** 58: 159-165.

Strack, D., Vogt, T. and Schliemann, W. 2003. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry** 62: 247-269.

Vieira, C. C. J., Braga, M. R, and Fingueiredo-Ribeiro, R. C. L. Fructans in callus of Gomphrena macrocephala St.-Hill. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 42:233-238.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การเตรียมอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) หรือ MS

1. สารเคมีและการเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของอาหาร MS แสดงในตาราง ภาคผนวก ก.

ตารางภาคผนวก ก.สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS)

สารเคมี	ปริมาณสารเคมีใน สารละลายเข้มข้น	ปริมาณที่ใช้ (ml/l)	การเก็บสารละลาย เข้มข้น
Stock 1 (Macronutrients)	g/1000ml	50	เก็บในตู้เย็น 4 องศา
NH_4NO_3	33.0		เซลเซียส
KNO_3	38.0		
$MgSO_4.7H_2O$	7.4		
KH_2PO_4	3.4		
Stock 2 (Micronutrients)	mg/100ml	1	เก็บในตู้เย็น 4 องศา
H_3BO_3	620		เซลเซียส
$MnSO_4.H_2O$	2230		
$ZnSO_4.H_2O$	860		
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25		
$CuSO_4.5H_2O$	2.5		
$CoCl_2.6H_2O$	2.5		
Stock 3 (Ca stock)	g/100ml	5	เก็บในตู้เย็น 4 องศา
$CaCl_2.2H_2O$	8.7		เซลเซียส
Stock 4 (KI stock)	mg/100ml	1	ใส่ขวดสีชาและเก็บใน
KI	75		ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
Stock 5 (Vitamins)	mg/100ml	10	ใส่ขวด (ปริมาตร 10
Thiamine HCl	8		ml) เก็บในห้องแช่แข็ง
i-Inositol	10000		
Stock 6 (Fe-EDTA stock)	g/500ml	5	เก็บในตู้เย็น 4 องศา
Na_2EDTA	3.73		เซลเซียส
$Fe_2SO_4.7H_2O$	2.78		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร MS

2..1 ใส่น้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ครึ่งหนึ่งของอาหารที่จะเตรียม

2.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายจากตาราง ลงในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการในสูตรอาหาร

2.3 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

2.4 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.5 ปรับปริมาตรสารละลายอาหาร MS ด้วยน้ำกลั่นตามปริมาตรที่ต้องการเตรียม

2.6 ปรับค่าความเป็นกรดและด่าง ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ให้ได้พีเอชประมาณ 5.8

2.7 เติมวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร แล้วหลอมละลายวุ้นโดยใช้เตาไมโครเวฟ

2.8 เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยง คือ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเล็ก ขวดละประมาณ 30 มิลลิลิตร และขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ขนาดละประมาณ 50 มิลลิลิตร

2.9 นำภาชนะอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

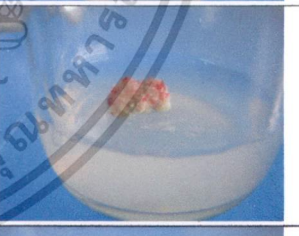
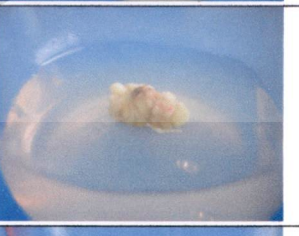
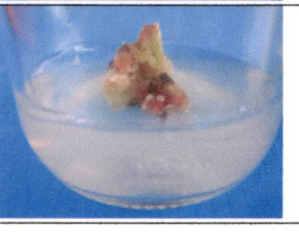
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การให้คะแนนการเกิดแคลลัส

การให้คะแนนปริมาณแคลลัสที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนใบ ดังแสดงในตารางภาคผนวก ข.

ตารางภาคผนวก ข. หลักเกณฑ์การเปรียบเทียบปริมาณแคลลัส

คะแนนการเกิดแคลลัส	หมายถึง	ลักษณะของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ
0	ไม่เกิดแคลลัส	
1	เกิดแคลลัสน้อยที่สุด (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร)	
2	เกิดแคลลัสน้อย (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 เซนติเมตร)	
3	เกิดแคลลัสปานกลาง (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-1.5 เซนติเมตร)	
4	เกิดแคลลัสมาก (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-2.0 เซนติเมตร)	
5	เกิดแคลลัสมากที่สุด (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2.0 เซนติเมตร)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้