ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การผลิตเบตาเลนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสร้อยไก่

(Betalains production by tissue culture of *Celosia plumosa*)

T096675

จัดทำโดย

นายณัฐพงศ์ เกตุเพ็ชร รหัสนักศึกษา 46040192

นายสิทธิโชค บำเรอหน่อทหาร รหัสนักศึกษา 46040258

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ส/ร.
063367
2549

เลขหมู่ 96675
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี - 4 JUN 2009

b 11778271
i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การผลิตเบตาเลนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสร้อยไก่

(Betalains production by tissue culture of *Celosia plumosa*)

จัดทำโดย

นายณัฐพงศ์ เกตุเพ็ชร รหัสนักศึกษา 46040192

นายสิทธิโชค บำเรอหน่อทหาร รหัสนักศึกษา 46040258

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

....19.../...เมษ.../...2560... อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(อาจารย์อพัชชา จินดาประเสริฐ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นายณัฐพงศ์ เกตุเพ็ชร และนายสิทธิโชค บำเรอหน่อทหาร. 2549. การผลิตเบตาเลนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสร้อยไก่ (Betalains production by tissue culture of *Celosia plumosa*) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์อัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

เบตาเลนเป็นกลุ่มของรงควัตถุที่ให้สีเหลืองและสีแดง และนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร พบได้ในพืชหลายชนิด ได้แก่ บีท ผลกระบองเพชร ผักโขมแดง รวมทั้งสร้อยไก่ (*Celosia plumusa*) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสร้อยไก่เพื่อผลิตสารเบตาเลน พบว่าการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดโดยใช้สารละลายคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ การนำชิ้นส่วนใบและลำต้นจากต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาทำการศึกษาการเกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหรือแคลลัส (callus) พบว่าแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบมีปริมาณมากกว่าชิ้นส่วนของลำต้น จากนั้นนำชิ้นส่วนใบมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ 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 และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l ให้แคลลัสในปริมาณมาก 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 ให้แคลลัสที่มีสีแดง จากการตรวจวิเคราะห์เบตาเลนจากส่วนต่างๆของสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแคลลัส พบว่าส่วนต่างๆของพืชมีปริมาณเบตาเลนที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 0.32-27.87 nmol/g fr.wt โดยส่วนดอกจากธรรมชาติมีปริมาณเบตาเลนมากที่สุด คือ 27.87 nmol/g fr.wt ต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีปริมาณเบตาเลน 13.65 nmol/g fr.wt และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากสูตร MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l มีปริมาณเบตาเลนสูงที่สุด คือ 9.20 nmol/g fr.wt

.....	.....	19/เมษายน/50
ลายมือชื่อนักศึกษา	(อาจารย์อัชชา จินดาประเสริฐ)	วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำปัญหาพิเศษเรื่องการผลิตเบตาเลนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสร้อยไก่ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งในการจัดทำครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับเกียรติจาก อาจารย์อัชชา จินดาประเสริฐ เป็นที่ปรึกษาปัญหาพิเศษได้สละเวลาอันมีค่ามาแนะนำ มาให้คำปรึกษา เอาใจใส่ดูแลเป็นอย่างมาก รวมถึงการแก้ไขในส่วนที่บกพร่องทำให้เกิดการวางแผนเป็นขั้นเป็นตอน เพื่อทำให้ปัญหาพิเศษนี้สมบูรณ์

ณัฐพงศ์ เกตุเพ็ชร

สิทธิโชค บำเรอหน่อทหาร

19 เมษายน 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	2
2.1 สร้อยไก่	2
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	2
2.1.2 สารเคมีที่พบในสร้อยไก่	2
2.1.3 ประโยชน์ของสร้อยไก่	3
2.2 เบตาเลน	3
2.2.1 โครงสร้างทางเคมี	4
2.2.2 เบตาเลนในพืช	4
2.2.3 ชีวสังเคราะห์ของเบตาเลน	5
2.2.4 การสกัดและการวิเคราะห์เบตาเลน	6
2.2.5 ประโยชน์ของเบตาเลนในอุตสาหกรรมอาหาร	7
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.3.1 ความหมายและหลักการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.3.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	9
2.3.4 วิธีชักนำให้เกิดหรือเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือต้น	10
2.4 เอกสารการวิจัย	11
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
3.1 วัสดุอุปกรณ์	13
3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง	13
3.1.2 อุปกรณ์	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.3 สารเคมี	13
3.2 วิธีการทดลอง	15
3.2.1 การเตรียมเมล็ดสร้อยไก่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	15
3.2.2 การศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญของเมล็ดสร้อยไก่	15
3.2.3 การศึกษาผลของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสร้อยไก่	16
3.2.4 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบของสร้อยไก่	16
3.2.5 การตรวจวิเคราะห์เบตาเลน	17
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	19
4.1 การเพาะเมล็ดสร้อยไก่ในสภาพปลอดเชื้อและการเจริญเติบโตของต้นสร้อยไก่	19
4.2 ผลของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสร้อยไก่	21
4.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบของสร้อยไก่	23
4.4 การตรวจวิเคราะห์เบตาเลน	27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	33
ประวัติผู้เขียน	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณเบตาเลนที่พบในดอกสร้อยไก่	3
2.2	การกระจายตัวของเบตาเลนในส่วนต่างๆของพืช	5
3.1	ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหาร MS	16
4.1	การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ของเมล็ดสร้อยไก่ เมื่อทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย คลอรอกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และทำเพาะเมล็ดในอาหารแข็ง MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์	20
4.2	เปอร์เซ็นต์การงอกและความสูงเฉลี่ยของต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด บนอาหารแข็ง MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์	20
4.3	การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและลำต้นของสร้อยไก่ ที่เจริญบนอาหารแข็ง MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์	22
4.4	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ปริมาณแคลลัส และลักษณะของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช	23
4.5	หลักเกณฑ์การเปรียบเทียบปริมาณแคลลัส	26
4.6	ปริมาณเบตาเลนทั้งหมดในรูปของ amaranthin ในตัวอย่างพืช	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ต้นสร้อยไก่ (*Celosia plumosa*) สายพันธุ์กีโมโน	2
2.2	โครงสร้างของเบตาเลน	4
2.3	ชีวสังเคราะห์ของเบตาแซนทินในพืชตระกูล *Celosia*	6
4.1	ความสูงเฉลี่ยของต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MS ทุกๆ สัปดาห์	20
4.2	สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 4 สัปดาห์ (ก) และสร้อยไก่ที่ได้จากการเจริญของส่วนข้อที่มีตาข้างอายุ 6 สัปดาห์ (ข) บนอาหารแข็งสูตร	21
4.3	การเกิดแคลลัสจากส่วนใบ(ก) และลำต้น (ข) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 0.1 mg/l และ 2,4-D 1.0 mg/l	22
4.4	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA	25
4.5	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D	25
4.6	การตรวจสอบเบตาเลนจากส่วนต่างๆของสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ และเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงโดยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)	28
4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) และค่าดูดกลืนแสงจากการสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ของสารสกัดจากดอกสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ (ก) สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข) และแคลลัสที่ได้จากสวนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l (ค)	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

สร้อยไก่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Celosia plumosa* เป็นไม้ดอกที่มีสีสันสวยงาม และทนแล้งได้ดี พบสารกลุ่มเบตาเลน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีเหลืองและแดง สารกลุ่มนี้มีการนำมาใช้เป็นสารให้สีที่ใช้กันในอุตสาหกรรมอาหาร และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) อีกด้วย ในปัจจุบันการผลิตเบตาเลนได้จากบีท (red beet, *Beta vulgaris* L.) ซึ่งมีการเพาะปลูกน้อยในประเทศไทย จึงได้สนใจที่จะหาแหล่งของสารเบตาเลนจากต้นไม้ชนิดอื่นที่สามารถหาได้ในประเทศไทย ซึ่งต้นสร้อยไก่สามารถพบได้ในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเพาะปลูกได้ในประเทศไทย จึงได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสร้อยไก่ เพื่อผลิตสารเบตาเลนได้ในปริมาณที่มาก โดยทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญของพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้สารสีแดงของเบตาเลนในปริมาณมากที่สุด และนำเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่ได้มาผลิตเบตาเลน เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ดสร้อยไก่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสร้อยไก่
3. เพื่อศึกษาปริมาณเบตาเลนจากส่วนต่างๆ ของพืชและเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสร้อยไก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 สร้อยไก่

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สร้อยไก่ (Plumed Celosia หรือ feathered amaranth) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Celosia plumosa* หรือ *Celosia argentea ver. plumosa* อยู่ในวงศ์ Amaranthaceae เป็นไม้ดอกล้มลุก มีทั้งชนิดต้นเตี้ยและต้นสูง สูงประมาณ 1-3 ฟุต ใบเดี่ยว รูปไข่ ปลายใบเรียวแหลม ออกดอกเป็นช่อสีเหลือง แดง ชมพู ชมพูอมม่วง และสีส้ม ดอกย่อยรวมกันเป็นกลุ่ม ช่อดอกเรียวแหลม ช่อดอกที่เกิดตรงยอดกลางจะมีขนาดใหญ่ที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 2.1 สร้อยไก่ชอบแสงแดดจัด ทนแล้งได้ดี ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด พบบริเวณแอฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (สมสุข และอุดมลักษณ์, 2536)

ภาพที่ 2.1 ต้นสร้อยไก่ (*Celosia plumosa*) สายพันธุ์ กีโมโน

2.1.2 สารเคมีที่พบในสร้อยไก่

ดอกสร้อยไก่พบสารในกลุ่มเบตาเลน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีแดงและสีเหลือง พบมีโครงสร้างหลัก 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ เบตาไซยานิน (betacyanin) ที่ให้สีแดง ได้แก่ amaranthin, isoamaranthin และ betalamic acid ส่วนเบตาแซนทิน (betaxanthin) ที่ให้สีเหลือง ได้แก่ miraxanthin V, 3-methoxytyramine และ (s)-trytophan betaxanthin ปริมาณเบตาเลนใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอกสร้อยไก่ (*Celosia argentea* var. *plumosa*) พบว่าในส่วนของดอกสีแดงมีเบตาเลนมากกว่าดอกสีเหลือง ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (Schliemann et al., 2001)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารเบตาเลนที่พบในดอกของสร้อยไก่ (*Celosia argentea* var. *Plumosa* (Burvenich) Voss

ส่วนต่างๆ ของสร้อยไก่	ปริมาณเบตาเลนทั้งหมด (nmol (g fr.wt)$^{-1}$)	ปริมาณเบตาเลน (nmol(g fr.wt)$^{-1}$)				
		1,1'	2	3	4	5
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

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

ที่มา : ดัดแปลงจาก Schliemann et al. (2001)

2.1.3 ประโยชน์ของสร้อยไก่

สร้อยไก่ใช้เป็นไม้ประดับหรือเป็นไม้กระถางในการตกแต่งสวน (นันทิยา, 2545) ในเมืองจีนนำส่วน ดอก ใบ และเมล็ด มาทำเป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน (Schliemann et al., 2001 อ้างถึง Wong, 1994; Xu, 1996) นอกจากนี้มีรายงานว่าสารเบตาเลน โดยเฉพาะเบตาแซนทินที่ได้จากสร้อยไก่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Cai, Sun and Corke, 2005)

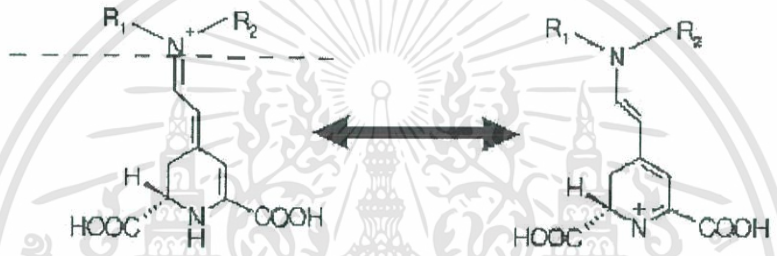
2.2 เบตาเลน

เบตาเลน (Betalains) เป็นอนุพันธ์ immonium ของกรดเบตาลามิก สูตรทั่วไปมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นประจุบวก 1,2,4,7,7-pentasubstituted 1,7-diazaheptamethin ดังแสดงในภาพที่ 2.2 เบตาเลนแต่เดิมเรียกชื่อว่า caryophyllinenroth, rubenroth และ chromoalkaloids ชื่อที่ใช้ในปัจจุบันนี้ถูกนำเสนอโดย Mabry และ Dreiding ชื่อทั่วไปของเบตาเลนกำหนดให้มีความเกี่ยวเนื่องกับพืชที่แยกและค้นพบสารนี้เป็นครั้งแรก เช่น สารกลุ่มเบตาไซยานิน (betacyanins) amaranthine-I แยกได้จาก *Amaranthus tricolor*, betanin แยกได้จาก *Beta vulgaris*, และ gomphrenin-I แยกได้จาก *Gomphrena globosa*, และสารกลุ่มเบตาแซนทิน (betaxanthins) miraxanthin แยกได้จากดอก *Mirabilis jalapa*, vulgaxanthin-I และ -II แยกได้จากรากของบีท (*B. vulgaris*) และ portulaxanthin แยกได้จากกลีบดอกของ *Portulaca grandiflora* (Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 โครงสร้างทางเคมี

เบตาเลนแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี เป็น 2 กลุ่ม คือ เบตาไซยานิน และเบตาแซนทิน โดยเบตาไซยานินให้สีม่วงแดง ส่วนเบตาแซนทินให้สีเหลือง ตามลำดับ เบตาเลนมากกว่า 50 ชนิดมีลักษณะโครงสร้างหลักที่คล้ายกัน และหมู่ R1 และ R2 เป็นหมู่ที่สามารถมาเกาะกับโครงสร้างหลักได้ คือ หมู่ไฮโดรเจน หมู่อะโรมาติก (วงแหวน) และหมู่อื่นๆ สีของเบตาเลนเกิดจากการเรโซแนน (resonance) ของพันธะคู่ ดังแสดงในภาพที่ 2.2 การดูดกลืนแสงสูงสุดของสารในกลุ่มเบตาไซยานินที่ให้สีม่วงแดง พบว่ามีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และสารในกลุ่มเบตาแซนทินที่ให้สีเหลือง พบว่ามีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร (Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2002)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของเบตาเลน
ที่มา : Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez (2002)

2.2.2 เบตาเลนในพืช

เบตาเลนพบกระจายตัวในพืชชั้นสูงใน order Caryophyllales โดยมีการค้นพบพืชที่มีการสร้างเบตาเลน 10 วงศ์ (family) คือ Aizoacea, Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didieraceae, Holophytaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae และ Portulacaceae เบตาเลนพบในส่วนต่างๆของพืช (plant organs) และมีการสะสมของสารอยู่ในแวคิวโอลโดยเฉพาะในบริเวณของเนื้อเยื่อผิวชั้นนอกและผิวชั้นกลาง ดังแสดงในตารางที่ 2.2 นอกจากนี้ยังมีการเก็บสะสมเบตาเลนในส่วนที่อยู่ใต้ดินของบีท (red beet) (Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การกระจายตัวของเบตาเลนในส่วนต่างๆของพืช

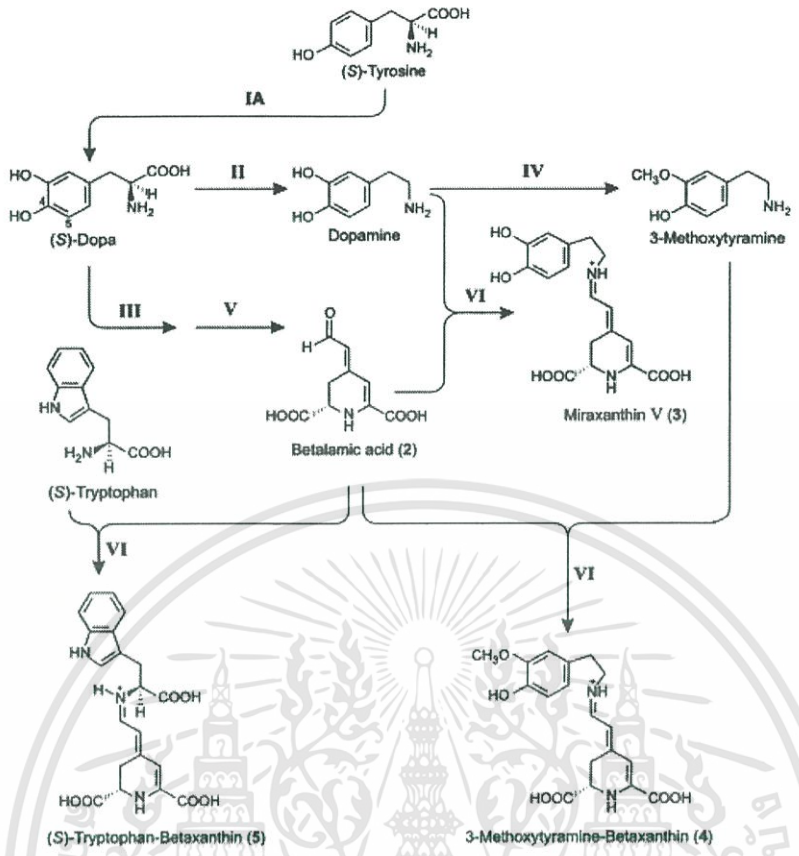
ส่วนต่างๆของพืช	สารให้สีที่พบ	ตัวอย่างพืช
ดอก	สีแดง, ชมพู, เหลือง และส้ม	พืชในวงศ์ Aizoaceae และ portulacaceae
ผล	สีเหลือง ,แดง และม่วง	ผลกระบองเพชร
ราก	สีม่วงแดง	รากของบีท
กลีบใบประดับ	ช่วงสีหลายสี	*Bougainvillea* spp.
เมล็ด	สีเหลือง และแดง	*Amaranthus* spp
ใบและลำต้น	ช่วงสีเดียว	*Teloxis* spp.

ที่มา : Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez (2002)

2.2.3 ชีวสังเคราะห์ของเบตาแซนทิน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 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)

2.2.4 การสกัดและการวิเคราะห์เบตาเลน

เบตาเลนสามารถสกัดโดยทำการ เตรียมตัวอย่างในสารละลายเมทานอล เอทานอล หรือน้ำ โดยการควบคุมอุณหภูมิต่ำ และในที่มืด พบว่าสารสกัดที่ได้ประกอบด้วยน้ำตาลในปริมาณมาก พบว่ากระบวนการหมักสามารถปริมาณน้ำตาล และปริมาณสารให้สีในการสกัดได้ แลอาจมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ความร้อนด้วย สารเบตาเลนทำให้บริสุทธิ์ได้ในสภาวะกรดอ่อน โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ หรือในสารละลายเมธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่เป็นกรด (0.4-1 เปอร์กรดไฮโดรคลอริก) ส่วนการวิเคราะห์เบตาเลนทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้ eletrophoresis, thin layer chromatography(TLC) และ high performance liquid chromatography (HPLC) (Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 ประโยชน์ของเบตาเลนในอุตสาหกรรมอาหาร

เบตาเลนถูกนำมาใช้เป็นสารให้สีในอาหารเมื่อ 20 ปีที่ผ่านมา โดยนำมาใช้กับน้ำผลไม้จำพวกพอคเบอรี่ (pokeberry) หรือใช้ในการปรับปรุงสีแดงในไวน์ของเบตานิน ในทางการค้าเบตาเลนจะถูกนำมาใช้จำกัดแค่ใช้ในน้ำผลไม้ในรูปของสารสกัดชนิดผง และสารสกัดชนิดน้ำผลไม้ซึ่งได้จากผลเรดบีท โดยผ่านกรรมวิธีทำแห้งแบบสุญญากาศ หรือวิธีการทำแห้งแบบใช้ลมร้อนเป่าละอองฝอยให้แห้งเป็นผง และมีการใช้เอนไซม์เพื่อช่วยทำให้สารให้สีมีลักษณะดีขึ้น การใช้สารสกัดที่ได้จากบีทประสบปัญหาความไม่คงตัวของสี กลิ่นและรสชาติ และสารสกัดที่ได้มีปริมาณน้อย นอกจากนี้พบว่าสารสกัดเบตาเลนจากบีทมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้ เช่น ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ไขมันและน้ำมัน สารเคลือบผิวในผักและผลไม้ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และอาหารทะเล เป็นต้น (Delgado-Vasgas and Paredes-Lopez, 2002)

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (สุภาพ, 2546)

2.3.1 ความหมายและหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

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 แล้ว เปลี่ยนอาหารใหม่บ่อยๆ ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด ผลสุดท้ายจะได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการเป็นจำนวนมาก

2.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสำคัญมากที่จะทำให้งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะแตกต่างกันตามวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ของพืชแต่ละชนิด หรือต่างกันตามแต่ละระยะการเจริญของพืช แต่อย่างไรก็ตามอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วๆ ไปจะประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน คือประกอบด้วยธาตุอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช hexitols 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 ไซโคไคนิน 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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 กรดอะมิโน เป็นสารที่สำคัญต่อขบวนการ morphogenesis L-tyrosine ช่วยในการกระตุ้นให้สร้างยอด L-arginine ช่วยสร้างรากในบางครั้งพบว่า L-glutamine และasparagineจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพใน somtic embryogenesis

2.8 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆส่วนใหญ่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติใช้ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากมอลท์ น้ำมะเขือเทศ น้ำต้มมันฝรั่ง เป็นต้น

2.3.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การทำ artificial seeds ปัจจุบันการผลิตเมล็ดพันธ์ทางการค้า เสียค่าใช้จ่ายสูงทั้งในด้านแรงงานและใช้พื้นที่จำนวนมาก ดังนั้นการสร้างเมล็ดพันธ์พืชในห้องปฏิบัติการ โดยใช้วิธีการสร้าง samatic embryo แล้วนำเอา embryo เหล่านั้นไปทำ encapsulation เพื่อให้ได้ artificial seeds พบว่าประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาลงได้มาก

2.3.4 วิธีการชักนำให้เกิดหรือเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือต้น

แคลลัส หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรนไคมา ที่มีการรวมตัวและการเจริญที่ผิดปกติ ตัวกระตุ้นที่สำคัญในการเกิดแคลลัสคือ ออกซินและไซโตไคนิน แคลลัสมีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน มีทั้งการรวมรวมตัวกันแบบแน่นและหลวม พบรงควัตถุที่ทำให้เกิดสี โดยปริมาณรงควัตถุในแคลลัสขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะปัจจัยของแสง ซึ่งแคลลัสเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปเป็นราก ต้น และ embryoid ได้ ในทางปฏิบัติสามารถชักนำให้เกิดต้น และเพิ่มปริมาณต้นได้ 3 วิธี คือ

1. แคลลัส โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ได้จำนวนมาก แต่การชักนำต้นโดยผ่านแคลลัสในบางครั้งอาจพบปัญหาว่าเซลล์แคลลัสเกิดความไม่คงตัวขึ้น การพัฒนาไปเป็นต้นจะลดประสิทธิภาพลงเมื่อเวลาผ่านไปนาน ๆ ในบางพืช โดยเฉพาะไม้เนื้อแข็ง การพัฒนาเป็นต้นผ่านทางแคลลัสยากกว่าไม้เนื้ออ่อน อาจต้องตัดแคลลัสเป็นชิ้นเล็ก ๆ และเปลี่ยนอาหารใหม่บ่อย ๆ ซึ่งอาจทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น

2. การเกิดตาวิสามัญ คือ ตาที่เกิดจากส่วนใดส่วนหนึ่งที่นอกเหนือจากที่ซอกใบ หรือปลายยอด โดยบางพืชเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เนื้อเยื่อสามารถพัฒนาเกิดตาจำนวนมากขึ้น ตามบริเวณแนวของรอยตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อนั้น และตานั้นจะพัฒนาต่อไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

3. การส่งเสริมให้เกิดตาข้าง เป็นการเลี้ยงตาข้างในอาหารสังเคราะห์ โดยให้มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน อาจไม่มีออกซินก็ได้ จากนั้นตัดต้นเล็กที่เกิดจากตาข้างไปเพิ่มจำนวนต่อไป สามารถทำซ้ำ ๆ ได้ แต่วิธีนี้อาจเพิ่มปริมาณต้นได้จำนวนน้อยกว่าชักนำต้นโดยผ่านแคลลัส

ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องในการชักนำแคลลัสและต้น มีดังต่อไปนี้ คือ

1. ชนิดชิ้นส่วนพืช ถ้าเนื้อเยื่อที่ใช้นำมาเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่ เป็นแคมเบียมเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เนื้อเยื่อมักจะเจริญไปเป็นแคลลัสได้เร็ว และเนื้อเยื่อต้องอยู่ในช่วงกำลังเจริญ และถ้าภายในเนื้อเยื่อมีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินหรือไซโตไคนิน ที่สมดุล กับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ได้รับจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็จะพัฒนาเกิดแคลลัส

2. ขนาดของชิ้นส่วน ขนาดของชิ้นส่วนที่เริ่มเลี้ยง โดยทั่วไปใช้ชิ้นส่วนขนาดเล็ก แต่ต้องไม่เล็กเกินไป ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดชิ้นส่วนและชนิดพืชเนื่องจากชิ้นส่วนขนาดเล็กสามารถที่จะดูดซับอาหารได้เร็วและผิวสัมผัสกับอาหารมีมาก การพัฒนาจะไปได้เร็วกว่าชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต ถ้าเนื้อเยื่อได้รับออกซินมากกว่าไซโตไคนิน เนื้อเยื่อจะพัฒนาเกิดเป็นราก ถ้ามีปริมาณออกซินน้อยกว่าไซโตไคนิน เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นยอด ถ้าสารดังกล่าวสมดุลทั้ง 2 ชนิด เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นแคลลัส ในรายงานหลายแหล่งสรุปไว้ว่า ระดับความเข้มข้นที่สามารถพัฒนาเนื้อเยื่อได้นั้น จะใช้ออกซิน ในช่วง 0.01-10 ppm และไคเนติน (เป็นสารกลุ่มไซโตไคนิน) ในช่วงความเข้มข้น 0.01-10 ppm และส่วนใหญ่ถ้าต้องการชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนาเกิดลักษณะ embryoid นิยมใช้ 2,4-D (เป็นสารในกลุ่มออกซิน) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดพืช ชิ้นส่วนพืช และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช

4. แร่ธาตุอาหาร นอกจากแร่ธาตุอาหารหลัก ที่มีอยู่ในสูตรอาหารสังเคราะห์ทั่วไป สารอาหารบางชนิดที่เติมลงไปเป็นพิเศษ สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนาเกิดเป็นแคลลัส และต้นได้ดี เช่น กลุ่มของกรดอะมิโน สารสกัดจากมอลท์ น้ำมะพร้าว และสารคาร์เซอีนไฮโดรไลซิส เป็นต้น

5. แหล่งของคาร์บอน ที่สำคัญ คือ จากน้ำตาลต่าง ๆ นอกเหนือจากซูโครสที่ใช้อยู่ทั่วไป ในหลายงานทดลองพบว่าน้ำตาลกลูโคส แซคคาโลส และกาแลคโตส ที่ระดับความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำเนื้อเยื่อให้พัฒนาเป็นต้นได้ดี และในบางพืชสามารถชักนำให้เกิดขบวนการ embryogenesis ได้

6. ปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจน โดยเฉพาะแหล่งสำคัญ คือ กลุ่มของไนเตรด ซึ่งมีผลต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อให้เกิดแคลลัสและต้นจำนวนมากได้ ที่สำคัญไนเตรดจะมีผลต่อการเพาะเลี้ยงในระดับเซลล์และโปรโตพลาสต์

7. ปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ความต้องการแสงต่ำหรือไม่ใช้แสงในหลายพืช ถ้าต้องการให้เนื้อเยื่อพัฒนาเกิดแคลลัสขึ้นจะต้องเก็บเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงไว้ในที่มืด และเมื่อต้องการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเกิดเป็นต้น ต้องนำหลับมาเพาะเลี้ยงในสภาพปกติ

8. สภาพอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง บางครั้งแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง การเจริญอาจจะน้อยกว่าในอาหารเหลว

2.4 เอกสารการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อสร้างสารเบตาเลนในพืช มีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus) เซลล์ (cell) และรากลอย (hairy root) ของพืชดังนี้

Girod and Zryd, 1987 ศึกษาแสงมีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อแคลลัสสีเขียวจากต้นบีทในอาหาร Linsmaier and Skoog (LS) พบว่าปริมาณแสงมากมีผลต่ออัตราการเจริญของเนื้อเยื่อแคลลัสในการเพิ่มขนาดมากกว่าการใช้ปริมาณแสงน้อย

Girod and Zryd, 1991 ศึกษาผลของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช 2 ชนิด คือ 2,4-D และ BA ที่ความเข้มข้น 50, 100, 300 µg/l ต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบีท (red beet) ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และให้แสงที่ความเข้มต่ำ พบว่าอัตราส่วนของ 2,4-D และ BA เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการควบคุมการเกิดสีของแคลลัส โดยแบ่งแคลลัสออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ แคลลัสที่ให้สีเหลืองแดงและแคลลัสที่ให้สีส้มม่วง

Pavlov, Georgiev and Ilieva, 2005 ทำการศึกษาการเจริญและการสังเคราะห์เบตาเลนจากเพาะเลี้ยงรากลอย (hairy root culture) ของบีทในสูตรอาหาร MS พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน มีการสังเคราะห์เบตาเลนถึง 42.2 mg/flasks โดยคิดเป็นปริมาณเบตาแซนทิน 26.2 mg/flasks และ เบตาไซยานิน 16.0 mg/flasks

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

1. เมล็ดสร้อยไก่ ตรางอบทอง (บริษัท ที เอส เอ จำกัด, กรุงเทพฯ)
2. ต้นสร้อยไก่ พันธ์กีโมโน อายุ 3 เดือน ออกดอกสีแดงอมชมพู

3.1.2 อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ
2. มีดผ่าตัด
3. ปากคีบ
4. โกร่งบดยา
5. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
6. เครื่องกวนสาร (Sterrier)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Backman, Germany)
8. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) (Hirayama HVE-25, Japan)
9. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
10. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Jewery, USA)
11. เครื่องวัดกรด-ด่าง (pH meter) (WTW/InoLab Level 1, Germany)
12. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectophotometer) (UV-1601 SHIMADZU, Japan)
13. ไมโครเวฟ (Microwave) (LG intellowave, Thailand)
14. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memert, Germany)
15. กระดาษอะลูมิเนียมฟลอยด์ (ซีอาร์ซี เฮโรลด์ จำกัด, Bangkok)
16. กระดาษกรอง (Whatman, USA)
17. แผ่น aluminium sheets silica gel 60 F_{254} (Merck, Germany)

3.1.3 สารเคมี

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 Ammonium nitrate (NH_4NO_3) (Merck, Germany)

1.2 Potassium nitrate (KNO_3) (Merck, Germany)

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. น้ำตาลทราย (วังขนาย, สุพรรณบุรี)

4. วุ้นผง (agar)

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

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

7. Ethanol (CH_3CH_2OH)

8. Clorox (Bleach, Malaysia)

9. Methanol (CH_3OH) (Merck, Germany)

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

11. Tween 20 (Merck, Germany)

12. น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมเมล็ดสร้อยไก่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

1. นำเมล็ดสร้อยไก่ตรางอบทองจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ (Clorox) ที่ความเข้มข้น 10, 30, 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเติม tween 20 ลงไป 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที

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

3. วางเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบน plate ที่มีกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งเมล็ดไว้ให้แห้ง

4. ใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเมล็ดที่ฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลอดทดลอง ที่มีอาหารแข็ง Murashige และ Skoog (1962) หรือ MS ดังแสดงในภาคผนวก ก. หลอดละ 1 เมล็ด โดยใช้ความเข้มข้นละ 10 เมล็ด และทำการทดลอง 2 ซ้ำ

5. นำหลอดทดลองมาวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง 16 ชั่งโมงต่อวัน

6. ทำการตรวจผลการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และทำการคัดเลือกความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์ที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด

3.2.2 การศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญของเมล็ดสร้อยไก่

1. นำเมล็ดสร้อยไก่จุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาแช่ในคลอรอกซ์ (Clorox) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเติม tween 20 ลงไป 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที

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

3. วางเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบน plate ที่มีกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งเมล็ดไว้ให้แห้ง

4. ใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วย้ายเมล็ดลงในหลอดทดลอง ที่มีอาหารแข็ง MS หลอดละ 1 เมล็ด จำนวน 10 เมล็ด และทำการทดลอง 2 ซ้ำ

5. นำหลอดทดลองมาวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง 16 ชั่งโมงต่อวัน

6. ทำการตรวจผลการงอกของเมล็ดไปเป็นต้น บันทึกการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเมล็ด และวัดความสูงของต้นสร้อยไก่ทุกๆ สัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาผลของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสร้อยไก่

1. นำต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารแข็ง MS อายุ 6 สัปดาห์ ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดชิ้นส่วนของใบขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร และส่วนของลำต้นความยาว 1 เซนติเมตร นำมาวางลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม 6-benzyladenine (BA) 0.1 mg/l และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1 mg/l ที่เตรียมไว้ ขวดละ 1 ชิ้น จำนวน 5 ขวด และทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2. นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง 16 ชั่งโมงต่อวัน

3. ตรวจผลการเจริญของชิ้นส่วนใบและลำต้นไปเป็นแคลลัสทุกๆ 1 สัปดาห์ และทำการคัดเลือกชิ้นส่วนของพืชที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

3.2.4 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบของสร้อยไก่

1. เตรียมอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช BA ร่วมกับ 1-napthaleneacetic acid (NAA) และ BA ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.0, 1.0 และ 2.0 mg/l รวม 18 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหาร MS

สารควบคุมการเจริญเติบโต		BA (mg/l)		
		0.0	1.0	2.0
NAA (mg/l)	0.0	1	2	3
	1.0	4	5	6
	2.0	7	8	9
2,4-D (mg/l)	0.0	10	11	12
	1.0	13	14	15
	2.0	16	17	18

หมายเหตุ ตัวเลขในแนวนอน หมายถึงสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2. ตัดชิ้นส่วนของใบขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร จากต้นสร้อยไก่ที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS อายุ 6 สัปดาห์ นำมาวางลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 3.1) ขวดละ 1 ชิ้น โดยใช้สูตรอาหารละ 5 ขวด และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง 16 ชั่งโมงต่อวัน

4. ตรวจผลการเจริญของชิ้นส่วนใบไปเป็นแคลลัสทุกๆ 1 สัปดาห์ และทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และให้แคลลัสที่มีสีแดง

3.2.5 การตรวจวิเคราะห์เบตาเลน

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

1.1 นำส่วนต่างๆของสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ ได้แก่ ลำต้น ใบ และดอก สร้อยไก่ที่ได้จาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบ โดยชั่งตัวอย่างพืช 2 กรัม เติมเมธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยโกร่งที่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

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

1.3 นำส่วนใสหรือสารสกัดเมธานอลที่ได้ มาตรวจวิเคราะห์เบตาเลน โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC) และ spectrophotometer

2. การตรวจสอบการสร้างสารเบตาเลนโดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC)

2.1 สารสกัดเมธานอลที่ได้จากข้อ 1.3 มาจุดลงบนแผ่น aluminium sheets silica gel 60 F_{254} ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำให้แห้ง

2.2 นำไปจุ่มในโถที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายเมธานอล : เอธิลอะซิเตท : น้ำ อัตราส่วน 3 : 4 : 4 และปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นระยะทาง 8 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น

2.3 นำแผ่นโครมาโตแกรมที่ได้ไปทำให้แห้ง ทำการตรวจดูการสร้างสารสีชมพูอมแดงของเบตาเลน และหาค่า Rf

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

3.1 นำสารสกัดเมธานอลที่ได้จากข้อ 1.3 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$A = \varepsilon bc$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากต้นสร้อยไก่ 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)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเพาะเมล็ดสร้อยไก่ในสภาพปลอดเชื้อและการเจริญเติบโตของต้นสร้อยไก่

จากการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดสร้อยไก่ โดยใช้สารละลายคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้น 10, 30, 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ในสภาพปลอดเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง 16 ชั่งโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยตรวจดูการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้น ขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นของคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้น 30, 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เนื่องมาจากคลอรอกซ์ประกอบด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5.25 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์มีสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์อยู่ 1.575 เปอร์เซนต์ ซึ่งสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ มีรายงานว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อที่ผิวของพืชอยู่ในช่วง 0.25-2.65 เปอร์เซ็นต์ (สุภาพ, 2546) จากนั้นทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเมล็ดสร้อยไก่ไปเป็นต้น โดยทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยใช้สารละลายคลอรอกซ์ 30 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเมล็ดในอาหารแข็ง MS ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.1ก พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 เมล็ดเริ่มมีการงอกของรากสีขาวเกิดขึ้นออกมาให้เห็นเป็นสีขาว จากนั้นมีการเจริญของยอกออกมา ในสัปดาห์ที่ 2 มีการแตกของใบอ่อนเกิดขึ้น 2 ใบและลำต้นเป็นสีขาว สัปดาห์ที่ 3 เมล็ดสร้อยไก่มีการงอกไปเป็นต้นทั้งหมด ลำต้นมีความสูงเพิ่มขึ้นและเริ่มมีการเปลี่ยนเป็นสีเขียว อาจพบมีใบผลิออกมาอีกเพิ่มอีก 1 คู่ และในสัปดาห์ที่ 4 ลำต้นมีสีเขียวอย่างชัดเจนและมีความสูงเพิ่มขึ้น จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณของต้นสร้อยไก่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยตัดส่วนข้อที่มีตาข้างความยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร มาเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิและแสง และทำการย้ายลงในอาหารใหม่ทุกๆ 6 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 4. 1ข

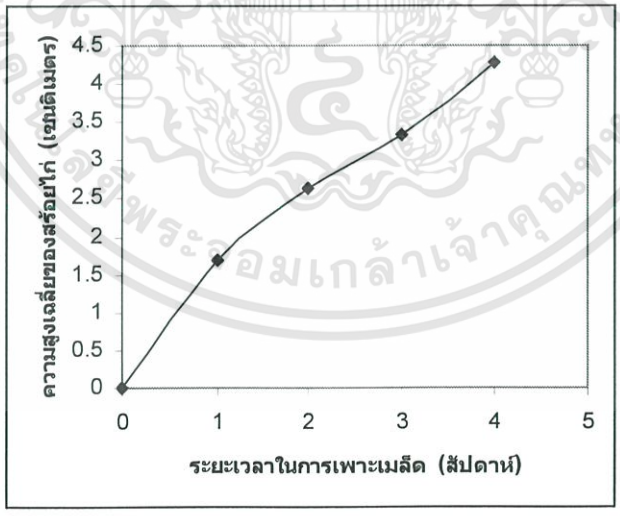
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ของเมล็ดสร้อยไก่ เมื่อทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และทำเพาะเมล็ดในอาหารแข็ง MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์ (เปอร์เซนต์)	การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ผิวเมล็ดสร้อยไก่ (เปอร์เซนต์)
10	5.0 ± 3.5
30	0.0
50	0.0
70	0.0

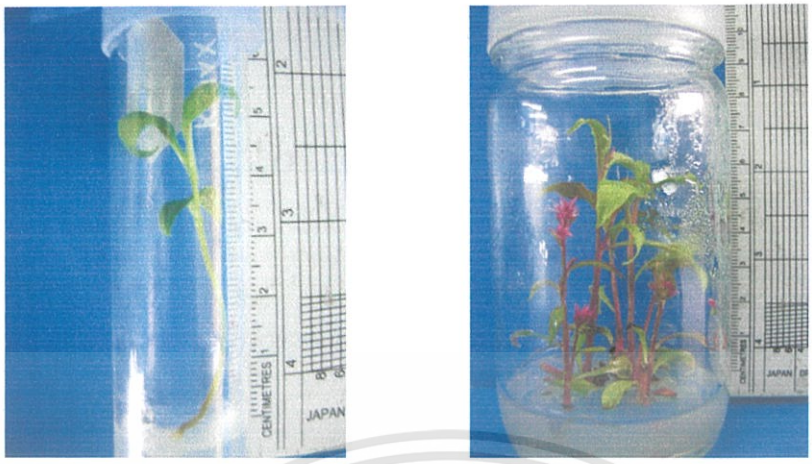
ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การงอกและความสูงเฉลี่ยของต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด บนอาหารแข็ง MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	การงอกของเมล็ด (เปอร์เซนต์)	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)
1	84.21	1.69±0.93
2	94.73	2.64±0.96
3	100	3.34±0.83
4	100	4.27±0.84



ภาพที่ 4.1 ความสูงเฉลี่ยของต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MS ทุกๆ สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.2 สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 4 สัปดาห์ (ก) และสร้อยไก่ที่ได้จากการเจริญของส่วนข้อที่มีตาข้างอายุ 6 สัปดาห์ (ข) บนอาหารแข็งสูตร MS

4.2 ผลของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสร้อยไก่

นำต้นสร้อยไก่ที่เลี้ยงจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อในอาหารแข็ง MS อายุ 6 สัปดาห์ มาชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและลำต้น นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 0.1 mg/l และ 2,4-D 1.0 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าชิ้นส่วนใบและลำต้นทำให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสที่ได้จากส่วนใบเกิดตรงบริเวณรอยตัด ส่วนแคลลัสจากลำต้นเกิดตรงบริเวณรอยตัด และปริออกตามส่วนของลำต้น ลักษณะแคลลัสมีสีชมพูและพบมีสีเขียวเกิดขึ้นเล็กน้อย เซลล์อยู่กันอย่างหลวมๆ เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมากขึ้นแคลลัสที่เกิดจากส่วนใบและลำต้นพบมีขนาดใหญ่ขึ้น และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบสร้อยไก่ให้ปริมาณแคลลัสมากกว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนของลำต้น เนื่องมาจากชิ้นส่วนใบมีพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับอาหารได้มากกว่าชิ้นส่วนลำต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและลำต้นของสร้อยไก่ ที่เจริญบนอาหารแข็ง MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	ชิ้นส่วนใบ		ชิ้นส่วนลำต้น	
	การเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณแคลลัส	การเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณแคลลัส
1	90	+	0	-
2	100	+	40	-
3	100	++	80	+
4	100	++++	100	+++

หมายเหตุ – หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส

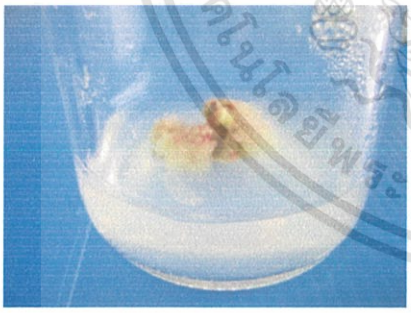
+ หมายถึง เกิดแคลลัสน้อยที่สุด

++ หมายถึง เกิดแคลลัสน้อย

+++ หมายถึง เกิดแคลลัสปานกลาง

++++ หมายถึง เกิดแคลลัสมาก

+++++ หมายถึง เกิดแคลลัสมากที่สุด



(ก)

(ข)

ภาพที่ 4.3 การเกิดแคลลัสจากส่วนใบ(ก) และลำต้น (ข) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 0.1 mg/l และ 2,4-D 1.0 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนใบของสร้อยไก่

นำต้นสร้อยไก่ที่เลี้ยงจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อในอาหารแข็ง MS อายุ 6 สัปดาห์ มาชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ โดยนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่มีการสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 3.1) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าการเติม BA ช่วยเร่งการแบ่งตัวของเซลล์ 2,4-D ช่วยกระตุ้นให้พืชสร้างแคลลัส ทำให้ได้แคลลัสในปริมาณมาก และ NAA ช่วยกระตุ้นการเกิดราก (สุภาพ, 2546) จากผลการทดลอง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ที่ พบมีแคลลัสเกิดขึ้นจากบริเวณรอยตัดชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS 3 สูตร คือ สูตรที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และNAA 2.0 mg/l (สูตร 9), BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 1.0 mg/l (สูตร 14) และ BA 1.0 mg/l และ2,4-D 2.0 mg/l (สูตร 17) ต่อมาพบมีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้นบนสูตรอาหารอื่น ๆ ดังแสดงในภาพที่ 4.4 และ 4.5 ในสัปดาห์ที่ 4 ได้ทำการคัดเลือกอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l (สูตร 12) และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l (สูตร 17) ซึ่งให้แคลลัสในปริมาณมากกว่าสูตรอื่น ๆ และคัดเลือกอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l (สูตร 6) และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l (สูตร 9) ซึ่งให้แคลลัสที่มีสีแดงมากกว่าสูตรอื่น ๆ

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ปริมาณแคลลัส และลักษณะของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

สูตรที่	การเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณแคลลัส	ลักษณะของแคลลัส
1	66.66	++,ร	แคลลัสมีสีเขียวมีชมพูปนเล็กน้อย และมีรากสีขาวเกิดขึ้นสั้นๆ
2	6.66	-,ร	มีรากสีขาวเกิดขึ้น
3	13.33	+	เกิดแคลลัสเพียงเล็กน้อย
4	33.33	+,ร	มีรากเกิดขึ้นมีสีชมพูปนเล็กน้อย แคลลัสเกิดขึ้นในปริมาณน้อย
5	66.66	+++	แคลลัสมีสีเขียวปนเหลือง
6	86.66	+	แคลลัสมีสีแดงและสีเขียว ไม่เกาะกลุ่มกัน
7	6.66	+,ร	มีรากเกิดขึ้นมีสีชมพูปนเล็กน้อย แคลลัสมีปริมาณน้อย
8	66.66	++	แคลลัสมีสีเขียวปนเหลืองมีสีชมพูด้านบนของแคลลัส แคลลัสเกาะกันเป็นกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ปริมาณแคลลัส และลักษณะของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

สูตรที่	การเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณแคลลัส	ลักษณะของแคลลัส
9	86.66	+++	แคลลัสมีสีชมพูและมีสีเขียวเหลืองปน แคลลัสเกิดรวมกันเป็นก้อน อุ้มน้ำ
10	66.66	++	แคลลัสมีสีเขียวมีชมพูปนเล็กน้อย และมีรากเกิดขึ้นสั้นๆ
11	60.00	+++	แคลลัสมีสีเขียวปนเหลืองมีสีชมพูด้านบนของแคลลัส
12	53.00	++++	แคลลัสมีสีแดง
13	93.33	+++	แคลลัสมีสีเขียวปนเหลืองมีสีชมพูด้านบนของแคลลัส
14	100.00	++++	แคลลัสมีสีเขียวปนเหลืองมีสีชมพูด้านบนของแคลลัส แคลลัสเกาะกันเป็นกลุ่ม
15	100.00	++++	แคลลัสมีสีเขียวปนเหลืองมีสีชมพูด้านบนของแคลลัส แคลลัสเกาะกันเป็นกลุ่ม
16	80.00	++	แคลลัสมีสีเขียวปนเหลืองมีสีชมพูด้านบนของแคลลัส
17	100.00	++++	แคลลัสมีสีเขียวปนเหลืองมีสีชมพูด้านบนของแคลลัส แคลลัสเกาะกันเป็นกลุ่ม
18	93.33	+++	แคลลัสมีสีเขียวปนเหลืองมีสีชมพูด้านบนของแคลลัส

หมายเหตุ – หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส

\+ หมายถึง เกิดแคลลัสน้อยที่สุด

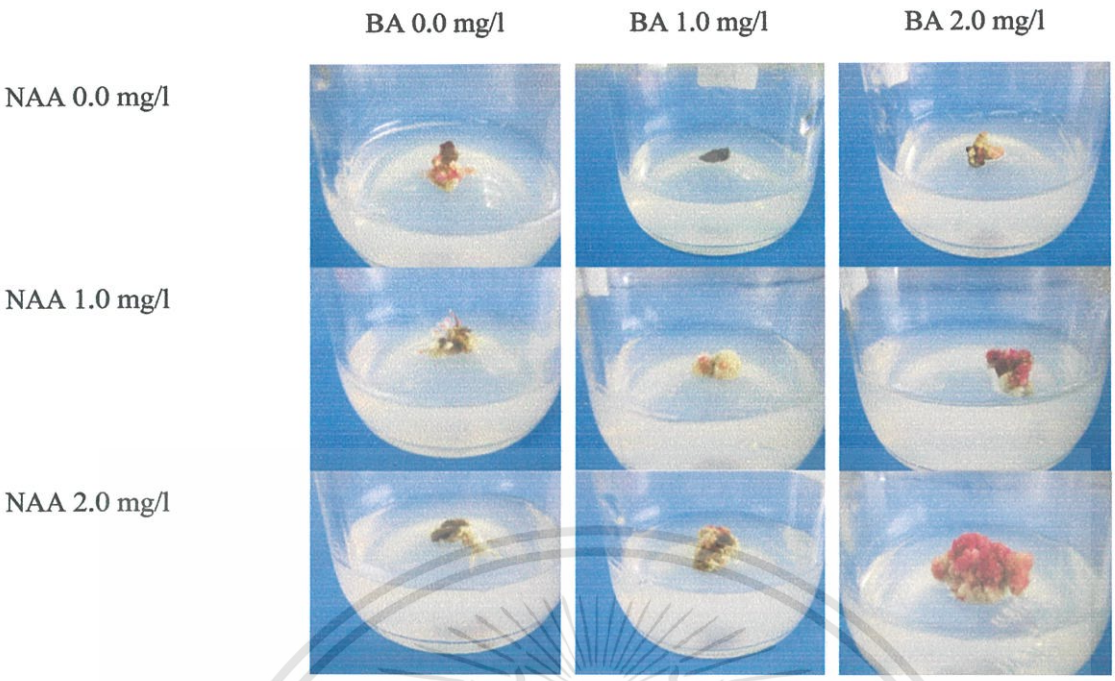
++ หมายถึง เกิดแคลลัสน้อย

+++ หมายถึง เกิดแคลลัสปานกลาง

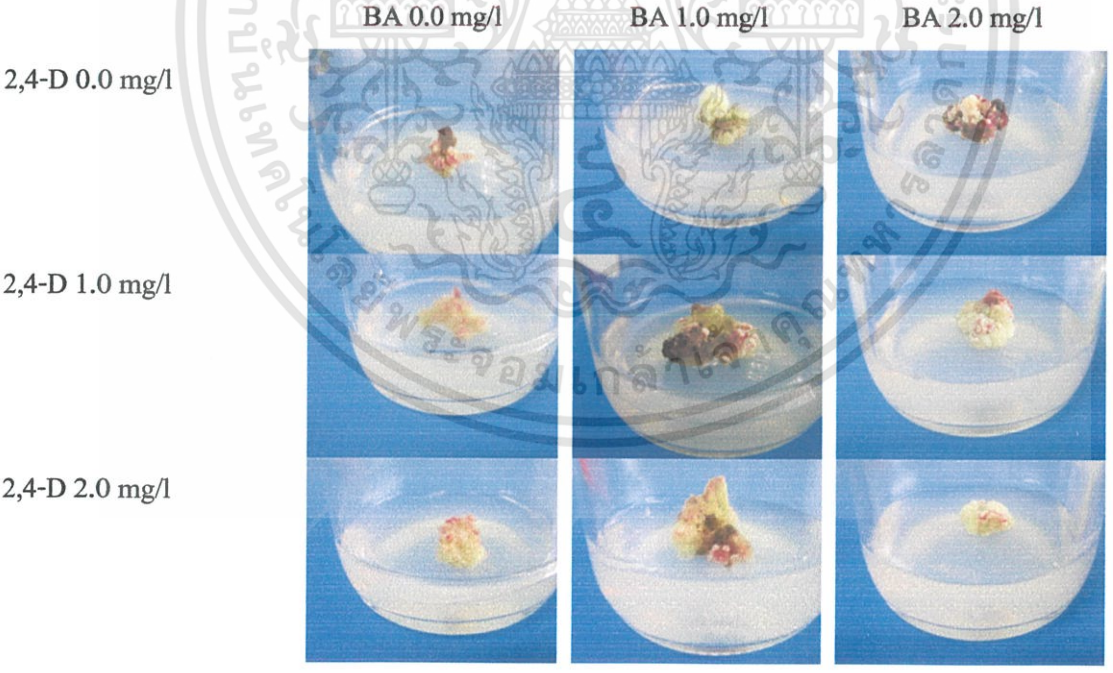
++++ หมายถึง เกิดแคลลัสมาก

+++++ หมายถึง เกิดแคลลัสมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



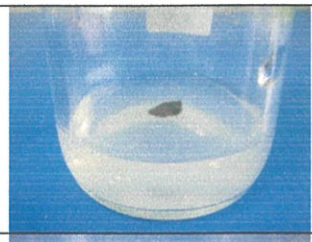
ภาพที่ 4.4 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA



ภาพที่ 4.5 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 หลักเกณฑ์การเปรียบเทียบปริมาณแคลลัส

สัญลักษณ์	หมายถึง	ลักษณะของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ
-	ไม่เกิดแคลลัส	
+	เกิดแคลลัสน้อยที่สุด	
++	เกิดแคลลัสน้อย	
+++	เกิดแคลลัสปานกลาง	
++++	เกิดแคลลัสมาก	
+++++	เกิดแคลลัสมากที่สุด	
ร	เกิดราก	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

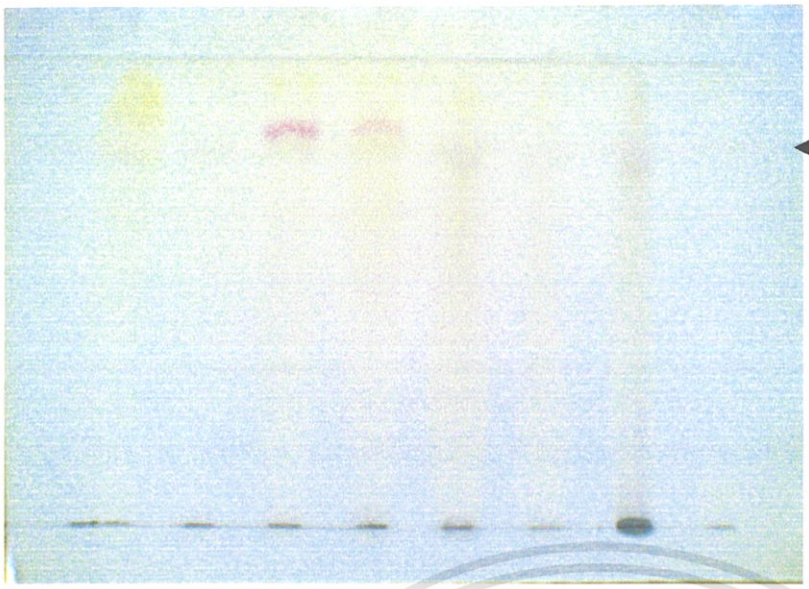
4.4 การตรวจวิเคราะห์เบตาเลน

จากการตรวจสอบการสร้างสารเบตาเลนจากส่วนต่างๆ ของต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบบนอาหารทั้ง 4 สูตรที่ได้ทำการคัดเลือกไว้จากข้อ 4.3 โดยสกัดด้วยเมธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบการสร้างสาร โดยใช้เทคนิค TLC พบว่าดอกสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l พบมีการสร้างสารสีชมพูอมแดง มีค่า Rf เท่ากับ 0.8125 ขณะที่ส่วนใบและลำต้นของสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ และแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารอื่นๆ ไม่พบมีการสร้างสารชมพูอมแดง ดังแสดงในภาพที่ 4.6

การวิเคราะห์สารเบตาเลนโดยใช้เทคนิค spectrophotometer พบว่าจากการสแกนสเปกตรัมสารสกัดเมธานอลของดอกสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4.6 พบว่าลักษณะสเปกตรัมของสารกดัมีความคล้ายคลึงกัน โดยค่าความยาวคลื่นสูงสุดของดอกสร้อยไก่ และสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีค่า 534 และ 524.5 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับของ Schliemann et al. (2001) อ้างถึง Piattelli et al. (1969) รายงานว่าค่า ε (molar extinction coefficients) ของ amaranthin ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 56.6×10^6 $cm^2 mol^{-1}$ ขณะที่แคลลัสมีค่าความยาวคลื่นสูงสุด 477 นาโนเมตร และค่า ε ของ betaxanthins ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 48×10^6 $cm^2 mol^{-1}$ (Schliemann et al., 2001 อ้างถึง Girog and Zryd, 1991)

จากการหาปริมาณเบตาเลนในสารสกัดเมธานอล ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าส่วนต่างๆ ของพืชมีปริมาณเบตาเลนที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 0.32-27.87 nmol/g fr.wt โดยส่วนดอกจากธรรมชาติมีปริมาณเบตาเลนมากที่สุด คือ 27.87 nmol/g fr.wt ขณะที่ต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแคลลัสทุกสูตรที่ได้จากการคัดเลือก มีการสร้างเบตาเลนในปริมาณที่น้อยกว่าดอกสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ โดยต้นสร้อยไก่ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีปริมาณเบตาเลน 13.65 nmol/g fr.wt และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีปริมาณเบตาเลนอยู่ในช่วง 0.32-9.20 nmol/g fr.wt และแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l มีปริมาณเบตาเลนมากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารอื่นๆ คือ 9.20 nmol/g fr.wt ซึ่งเบตาเลนที่ได้มีปริมาณน้อยกว่าการศึกษาของ Schliemann et al. (2001) รายงานว่าดอกสีส้มแดงของสร้อยไก่มีปริมาณเบตาเลน 621.5 nmol/g fr.wt

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 การตรวจสอบเบตาเลนจากส่วนต่างๆของสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติและเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงโดยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)

กำหนดให้ ก คือ สารสกัดจากใบของสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ อายุ 3 เดือน

ข คือ สารสกัดจากลำต้นของสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ อายุ 3 เดือน

ค คือ สารสกัดจากดอกของสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ อายุ 3 เดือน

ง คือ สารสกัดจากสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 6 สัปดาห์

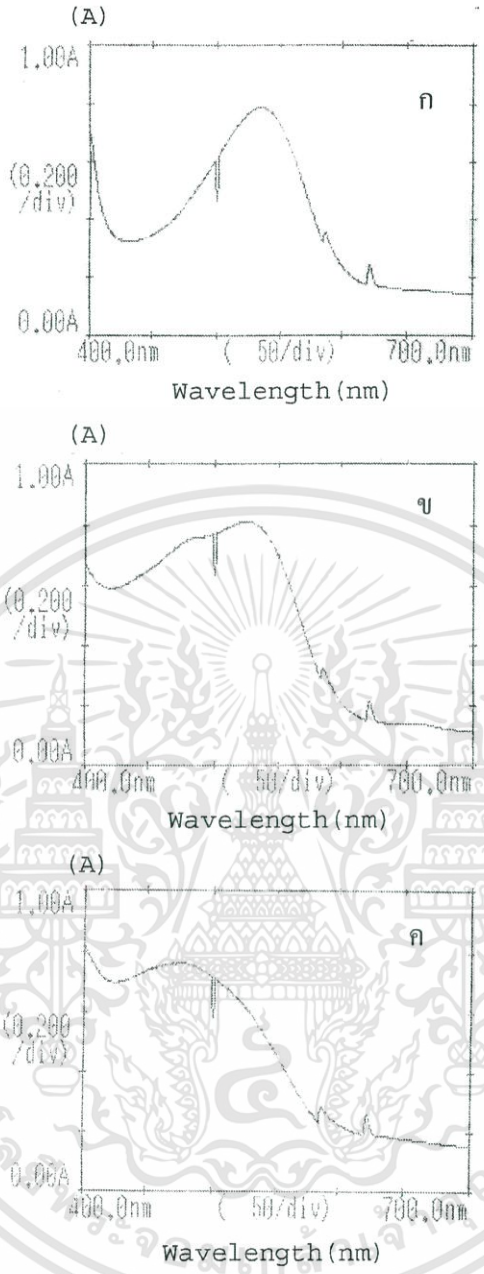
จ คือ สารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

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

ช คือ สารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) และค่าดูดกลืนแสงจากการสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ของสารสกัดจากดอกสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ (ก) สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข) และแคลลัสที่ได้จากสวนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ปริมาณเบตาเลนทั้งหมดในรูปของ amaranthin ในตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืช	ปริมาณเบตาเลนทั้งหมดในรูปของ amaranthin (nmol/g fr.wt)
สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ	
- ใบ	3.37±0.02[c]
- ลำต้น	4.29±0.36[d]
- ดอก	27.87±0.16[a]
สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	
- ต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	13.65±0.02[b]
- แคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l	9.21±0.04[c]
- แคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l	3.29±0.03[c]
- แคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l	0.32±0.005[f]
- แคลลัสที่ได้จากส่วนใบบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l	3.19±0.01[c]

หมายเหตุ ตัวอักษรในแนวนแนหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสร้อยไก่เพื่อผลิตสารเบตาเลน พบว่าการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดโดยใช้สารละลายคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ การนำชิ้นส่วนใบและลำต้นที่ได้จากต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาทำการศึกษาการเกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหรือแคลลัส พบว่าชิ้นส่วนใบมีปริมาณแคลลัสมากกว่าส่วนของลำต้น จากนั้นนำชิ้นส่วนใบมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ 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 และอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l ให้แคลลัสในปริมาณมาก 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 ให้แคลลัสที่มีสีแดง จากการตรวจวิเคราะห์เบตาเลนจากส่วนต่างๆของสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ สร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแคลลัส พบว่าส่วนต่างๆของพืชมีปริมาณเบตาเลนที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 0.32-27.87 nmol/g fr.wt โดยส่วนดอกจากธรรมชาติมีปริมาณเบตาเลนมากที่สุด คือ 27.87 nmol/g fr.wt ต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีปริมาณเบตาเลน 13.65 nmol/g fr.wt และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีปริมาณเบตาเลนอยู่ในช่วง 0.32-9.20 nmol/g fr.wt

ข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์เบตาเลนในตัวอย่างพืช พบมีปริมาณน้อยกว่าที่มีในรายงานการศึกษาของ Schliemann et al. (2001) ดังนั้นควรมีการเติมสารแอสคอเบท (ascorbate) ลงในเมธานอลที่ใช้ในการสกัดสาร เพื่อให้เบตาเลนมีความคงตัว และในขั้นตอนการสกัดควรมีการสกัดทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อให้สารเบตาเลนสกัดออกมาได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2543. **สมุนไพรไม้พื้นบ้าน**. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

สมสุข มัจฉาชีพ และอุดมลักษณ์ มัจฉาชีพ. 2536. **ไม้ดอกไม้ประดับ.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน และคณะเกษตรศาสตร์ บางพระ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

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

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

Delgado-Vasgas, F., and Paredes-Lopez, O. 2002. **Natural colorances for food and nutraceutical uses.** Boca Raton : CRC Press

Girod, P., and Zryd, J. 1987. Clonal variability and light induction of betalain synthesis in red beet cell cultures. **Plant Cell Reports** 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.

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 Biochemistry** 40: 1531-1533.

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

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

Wong, K.-Y. 1994. **Chinese herbal medicine**. Wokman Press: Hong Kong.

Xu, G.J. 1996. Ji Guan Zi (No. 12769) and Ji Guan Miao (No. 12770). In: Yan, Y.Q., Yu, C.L., Huang, T.K. (Eds.), **Encyclopedia of Chinese medicine**, Vol. 2. China Medicine Sci. Technol., Beijing, pp. 509-511.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การเตรียมอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) หรือ MS

1. สารเคมีและการเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของสูตรอาหาร MS แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS)

สารเคมี	ปริมาณสารเคมีในสารละลายเข้มข้น	ปริมาณที่ใช้ (ml/l)	การเก็บสารละลายเข้มข้น
Stock 1 (Macronutrients)	g/1000ml	50	เก็บในตู้เย็น 4 °C
NH_4NO_3	33.0		
KNO_3	38.0		
$MgSO_4.7H_2O$	7.4		
KH_2PO_4	3.4		
Stock 2 (Micronutrients)	mg/100ml	1	เก็บในตู้เย็น 4 °C
H_3BO_3	620		
$MnSO_4.H_2O$	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 °C
$CaCl_2.2H_2O$	8.7		
Stock 4 (KI stock)	mg/100ml	1	ใส่ขวดสีชาและเก็บในตู้เย็น 4 °C
KI	75		
Stock 5 (Vitamins)	mg/100ml	10	ใส่ขวด (ปริมาตร 10 ml) เก็บในห้องแช่แข็ง
Thiamine HCl	8		
i-Inositol	10000		
Stock 6 (Fe-EDTA stock)	g/500ml	5	เก็บในตู้เย็น 4 °C
Na_2EDTA	3.73		
$Fe_2SO_4.7H_2O$	2.78		

ที่มา : Murashige and Skoog (1962)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ผลการเจริญเติบโตของเมล็ดสร้อยไก่

ตารางที่ 2 ความสูงของต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารแข็ง MS ทุกๆ สัปดาห์

สัปดาห์	ครั้งที่	ความสูงของต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด จำนวนครั้งละ 10 เมล็ด (เซนติเมตร)										ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	1	2.30	2.25	2.10	2.20	-	1.98	2.13	1.95	2.25	2.3	1.69 ± 0.936
	2	1.60	1.10	0.00	1.50	0.30	0.00	0.00	0.20	1.30	-	
2	1	2.80	2.62	2.96	3.10	-	2.94	-	3.00	2.73	2.80	2.64 ± 0.964
	2	2.50	2.30	0.00	3.00	2.00	1.00	0.30	2.50	3.00	-	
3	1	3.20	3.43	4.10	3.70	-	3.63	-	3.50	4.23	-	3.34 ± 0.836
	2	3.80	3.20	1.60	4.10	3.10	2.10	1.80	3.90	4.20	-	
4	1	4.80	4.40	3.80	5.30	-	4.40	-	4.80	5.20	-	4.27 ± 0.840
	2	4.50	3.90	2.80	4.90	3.80	3.20	2.80	5.00	5.30	-	

หมายเหตุ - หมายถึง มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนใบของสร้อยไก่

ตารางที่ 3 ปริมาณแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบของสร้อยไก่ บนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA, NAA และ2,4-D ทีความเข้มข้น 0.0, 1.0 และ2.0 mg/l ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ และแสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ครั้งที่	BA 0.0 mg/l	BA 1.0 mg/l	BA 2.0 mg/l
NAA 0.0 mg/l	1	+2,+1,+1,+1,+1	- , - , - , - , -	- , - , - , - , -
	2	- , - , - , - , -	- , - ,+1, - , -	+1, - , - , - , -
	3	+1,+2,+2,+3,+1	- , - , - , - , -	- , - , - , - ,+1
NAA 1.0 mg/l	1	+2,+2,+1 , - ,+1	+3,+3+3,+2,+2	+1+1,+1,+2,+2
	2	- , - , - , - , -	+4,+3 - ,+2,+4	+5+5,+1,+3,+5
	3	- , - , - , - ,+1	+3, - , - , - , -	+3,+1, - , - ,+1
NAA 2.0 mg/l	1	- , - , - , - , -	+3, - ,+2,+3,+2	+4,+1,+3,+4,+5
	2	- , - , - , - , -	+4,+2,+3,+5,+5	+4,+5,+3,+2,+3
	3	- , - , - , - ,+1	+3, - , - , - , -	+2,+1, - , - ,+2
2,4-D 0.0 mg/l	1	+2,+1,+1,+1,+1	+2,+2, - ,+1,+1	+1, - , - , - ,+1
	2	- , - , - , - , -	- , - ,+1, - , -	+1, - , - , - , -
	3	+1,+2,+2,+3,+1	+2,+3, - ,+3,+2	+4,+4,+3,+4,+4
2,4-D 1.0 mg/l	1	+3,+3,+3, - ,+2	+3,+3,+3,+3,+3	+4,+3,+3,+3,+4
	2	+1,+1,+1,+1,+1	+2,+2,+2,+3,+2	+1,+2,+2,+2,+1
	3	+4,+1,+3,+3,+4	+4,+5,+4,+3,+4	+4,+4,+3,+5,+4
2,4-D 2.0 mg/l	1	+1, - , - , - ,+1	+4,+3,+3,+3,+3	+3,+3,+3,+1,+3
	2	+1,+1,+1,+1,+1	+2,+2,+2,+2,+2	+1,+1, - ,+1,+1
	3	+4,+4,+2,+3,+4	+5,+5,+5,+3,+5	+4,+3,+2,+3,+4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

ผลการตรวจวิเคราะห์เบตาเลนในสารสกัดเมธานอล จากส่วนต่างๆของสร้อยไก่และเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสร้อยไก่

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวิเคราะห์เบตาเลนในสารสกัดเมธานอลจากส่วนต่างๆ ของสร้อยไก่และเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของสร้อยไก่

ตัวอย่างพืช	ความยาวคลื่นสูงสุด (นาโนเมตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร			ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร		
		ครั้งที่			ครั้งที่		
		1	2	3	1	2	3
ใบ	-	0.380	0.382	0.384	0.686	0.688	0.690
ลำต้น	497.0	0.493	0.510	0.511	0.565	0.573	0.573
ดอก	534.0	3.136	3.172	3.160	1.808	1.840	1.848
ต้นสร้อยไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	524.5	1.544	1.546	1.548	1.492	1.496	1.596
แคลลัสที่ได้จากอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 1.0 mg/l	477.0	1.050	1.040	1.042	1.524	1.526	1.538
แคลลัสที่ได้จากอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l และ NAA 2.0 mg/l	477.0	0.370	0.375	0.376	0.538	0.540	0.540
แคลลัสที่ได้จากอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 2.0 mg/l	-	0.038	0.037	0.038	0.080	0.077	0.078
แคลลัสที่ได้จากอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม BA 1.0 mg/l และ 2,4-D 2.0 mg/l	-	0.360	0.362	0.363	0.521	0.528	0.527

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณปริมาณเบตาเลน

สูตรการคำนวณปริมาณเบตาเลนในรูปของ amaranthin

$$A = \varepsilon bc$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากต้นสร้อยไก่ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ε = ค่า molar extriction coefficient ของ amaranthin ที่ 540 นาโนเมตร เท่ากับ 56.6×10^6 cm^2 mol^{-1}

b = ค่าความกว้างเซลล์ (คิวเวต) 1 เซนติเมตร

c = ปริมาณสารเบต้าแซนทินในสารสกัดตัวอย่าง (mol)

ตัวอย่างการคำนวณ

น้ำหนักดอกสร้อยไก่ 2 กรัมน้ำหนักสดในสารละลายในเมธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 6 มิลลิลิตร ค่าการดูดกลืนแสงสารสกัดเมธานอลที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ครั้งที่ 1 เท่ากับ 3.136

แทนค่าสูตร $3.136 = 56.6 \times 10^6 \times 1 \times c$

$c = 55.40 \times 10^{-9}$ mol

สารสกัดเมธานอลได้จากตัวอย่างดอก 2 กรัม คิดเป็นปริมาณเบตาเลนในรูปของ amaranthin ในตัวอย่าง 1 กรัม $= 55.40 \times 10^{-9}$ mol / 2 g

$= 27.70$ nmol/g fr.wt

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเบตาเลน

Descriptives
VAR00002

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	3	3.3700	.02000	.01155	3.3203	3.4197	3.35	3.39
ลำต้น	3	4.2933	.36665	.21169	3.3825	5.2041	3.87	4.51
ดอก	3	27.8767	.16258	.09387	27.4728	28.2805	27.70	28.02
ต้นสร้อยไก่	3	13.6500	.02000	.01155	13.6003	13.6997	13.63	13.67
MS+2BA+1NAA	3	9.2167	.04726	.02728	9.0993	9.3341	9.18	9.27
MS+2BA+2NAA	3	3.2967	.03215	.01856	3.2168	3.3765	3.26	3.32
MS+1BA+2D	3	.3267	.00577	.00333	.3123	.3410	.32	.33
MS+2BA	3	3.1900	.01000	.00577	3.1652	3.2148	3.18	3.20
Total	24	8.1525	8.60527	1.75654	4.5188	11.7862	.32	28.02

VAR00002
Duncan

	N	Subset for alpha = .05					
VAR00001		1	2	3	4	5	6
MS+1BA+2D	3	.3267					
MS+2BA	3		3.1900				
MS+2BA+2NAA	3		3.2967				
ใบ	3		3.3700				
ลำต้น	3			4.2933			
MS+2BA+1NAA	3				9.2167		
ต้นสร้อยไก่	3					13.6500	
ดอก	3						27.8767
Sig.		1.000	.164	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายสิทธิโชค บำเรอหน่อทหาร

- เกิดวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2528
- สำเร็จการศึกษาชั้นประถมจากโรงเรียนวัดอมรินทราราม พ.ศ. 2539
- สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนทวีธาภิเศก พ.ศ. 2545
- จบการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้