



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การผลิต CURCUMINOIDS จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสมันชั้น
PRODUCTION OF CURCUMINOIDS FROM CALLUS CULTURE OF
TURMERIC (CURCUMA LONGA LINN.)

ภายใต้โครงการชุด : ศักยภาพและประสิทธิภาพของพืชในพื้นที่โครงการอนุรักษ์
พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2545
จำนวนเงิน 301,700 บาท

หัวหน้าโครงการ	นางสาวปวีณา	นวมเจริญ
ผู้ร่วมโครงการ	นางนพมณี	โทบุญญานนท์
	นางสาวศรีกาญจนา	คล้ายเรือง

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30 ธันวาคม 2547

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักวิจัยและส่งเสริม
วิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณการวิจัย ประจำปี พ.ศ.
2544 - 2545 และขอขอบคุณ คุณรังสิมา อัมพวัน คุณอรุณรัตน์ เงินวัน คุณธานี ต้นประยูร คุณ
วันทนา บุตรสาดี คุณลิณีธร สมสืบ คุณจิราพร พงษ์โนรี คุณปานจรรย์ อินทราวุธ คุณสุกัญญา ทิพย์
ประยูร และคุณนิวัติ ช่างขอ ที่ช่วยในการจัดทำรายงานการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งทุกท่านที่มีส่วน
สนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ในทุกๆ ด้าน

คณะผู้วิจัย

กองห้องสมุด
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
อักษรย่อ	5
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	13
ผลการวิจัย	18
วิจารณ์ผลการวิจัย	39
สรุปผลการวิจัย	43
เอกสารอ้างอิง	44

(ก)

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม curcuminoids ด้วยเทคนิค HPLC	12
2	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเนื้อเยื่อไขมันชั้นแหล่งต่างๆ ทดสอบโดย วิธี paper disc diffusion	37

กองห้องสมุด
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ต้นอ่อนขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 30, 60 และ 90 วัน (A, B และ C ตามลำดับ) (bar = 1.2 เซนติเมตร)	15
2	ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน (A และ B ตามลำดับ) (bar = 5 มิลลิเมตร)	16
3	วันที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่มีแสง	19
4	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่มีแสงเป็นเวลา 60 วัน	19
5	แคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 ต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 60 วัน (bar = 2 มิลลิเมตร)	20
6	วันที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 30, 60 และ 90 วัน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืด	21
7	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 30, 60 และ 90 วัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 60 วัน	21
8	ลักษณะแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 30, 60 และ 90 วัน (A, B และ C ตามลำดับ) หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 60 วัน (bar = 1 มิลลิเมตร)	22
9	วันที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน ที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืด	23

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน ที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน หลังเพาะเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มีดเป็นเวลา 60 วัน	24
11	การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน ที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน (A และ B ตามลำดับ) หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มีดเป็นเวลา 60 วัน (bar = 4 มิลลิเมตร)	24
12	การเกิดแคลลัส ยอด และรากของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน (bar = 1 เซนติเมตร)	25
13	วันที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มีด	27
14	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ยอด และรากของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มีดเป็นเวลา 60 วัน	27
15	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสขมิ้นชันหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครสความเข้มข้นต่างๆ ในที่มีดและมีแสงเป็นเวลา 30 วัน	29
16	น้ำหนักแห้งของแคลลัสขมิ้นชันหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครสความเข้มข้นต่างๆ ในที่มีดและมีแสงเป็นเวลา 30 วัน	29

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ลักษณะแคลลัสไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครสความเข้มข้นต่างๆ ในที่มีดและมีแสงเป็นเวลา 30 วัน (bar = 5 มิลลิเมตร)	30
18	ลักษณะแคลลัสของไขมันชั้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี 2,4-D หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (bar = 5 มิลลิเมตร)	31
19	น้ำหนักแห้งของแคลลัสไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	32
20	ปริมาณสาร curcumin ของแคลลัสไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	32
21	น้ำหนักแห้งของแคลลัสไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี ชูโครสระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	34
22	ปริมาณสาร curcumin ของแคลลัสไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีชูโครสระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	34
23	น้ำหนักแห้งของแคลลัสไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี ระดับความเป็นกรดเป็นด่างต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	36
24	ปริมาณสาร curcumin ของแคลลัสไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีระดับความเป็นกรดเป็นด่างต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	36
25	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 008 (A), <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 029 (B) และ TISTR 885 (C) ของสารสกัดหยาบจากไขมันชั้น 4 แหล่ง ได้แก่ เหง้าธรรมชาติ (1) แคลลัสเลี้ยงที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.2 (2) และ 5.8 (3) และใบของต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (4)	38

การผลิต CURCUMINOIDS จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสขมิ้นชัน
PRODUCTION OF CURCUMINOIDS FROM CALLUS OF
TURMERIC (*CURCUMA LONGA* LINN.)

ปวีณา นวมเจริญ นพมณี โทโปญญานนท์ ศรีกาญจนา คล้ายเรือง
PAWEENA NUAMJAROEN NOPMANEE TOPOONYANONT
SRIKANJANA KLAYRAUNG

ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 50290

บทคัดย่อ

ในศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ได้ทำการชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเกิดแคลลัสโดยผ่านแปรสภาพแสง (ที่มีมืดและมีแสง) อายุของชิ้นส่วนตั้งต้น (30, 60 และ 90 วัน) ลักษณะการตัดแบ่งชิ้นส่วนตั้งต้น (2 และ 4 ส่วนตามยาว) และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BA (0 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า วิธีการที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ การใช้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน ที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 ส่วน และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้รวดเร็ว มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง และแคลลัสมีการเจริญเติบโตดี ส่วนในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ชักนำได้ด้วยการผ่านแปรระดับความเข้มข้นของซูโครส (20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสภาพแสง (ที่มีมืดและมีแสง) ปรากฏว่า แคลลัสที่ได้รับซูโครส 50 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงในที่มืดมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีน้ำหนักแห้งสูงสุด 51.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด

เมื่อทำการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ แยกกัน ได้แก่ 2,4-D ซูโครส และระดับความเป็นกรดเป็นด่างในอาหารต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารกลุ่ม curcuminoids ของแคลลัสขมิ้นชัน ในด้านการเจริญเติบโต พบว่า แคลลัสที่ได้รับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงในระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีน้ำหนักแห้งสูงสุด

41.9, 6.83 และ 6.75 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ส่วนด้านการผลิตสารกลุ่ม curcuminoids พบสารหลัก คือ curcumin ซึ่งแคลลัสที่ไม่ได้รับ 2,4-D (2,4-D 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้รับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงที่ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8 มีปริมาณสาร curcumin สูงที่สุด 0.47, 0.47 และ 0.67% น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

สำหรับการนำสารสกัดหยาบจากแคลลัสมีนชันมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากเหง้าที่ปลูกในสภาพธรรมชาติและใบของต้น เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า สารสกัดหยาบทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้ทั้งหมด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* O157:H7 แต่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ ยกเว้นสารสกัดจากใบ โดยสารสกัดจากแคลลัสสามารถยับยั้งได้เฉพาะ *Bacillus subtilis* TISTR 008 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 029 สารสกัดจากเหง้าธรรมชาติสามารถยับยั้งได้ทั้งหมด คือ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 029 และ TISTR 885

ABSTRACT

In the study of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) tissue culture, factors related to callus initiation from young stem explants were investigated included light conditions (dark and light), ages of explants (30, 60 and 90 days), excision of explants (2- and 4-longitudinal cut) and growth regulators (0, 0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 mg/L 2,4-D and 0 and 1.0 mg/L BA). Results showed that the most appropriate method for callus induction was the use of 60 days old stem explants which were cut longitudinally into 2 parts and cultured on the medium containing 0.5 mg/L 2,4-D in the dark. These explants produced callus at the fastest rate with highest percentage of callus induction that showed good growth. On callus multiplication using varying amounts of sucrose (20,30, 40 and 50 mg/L) and light conditions (dark and light), results indicated that callus that received sucrose at 50 mg/L in the dark gave the best growth rate with highest weight of 51.1 mg/g fresh weight.

The experiment also studied the individual factors, e.g. 2,4-D, sucrose and pH level, in relation to the growth and production of curcuminoids from turmeric callus. In terms of growth, results showed that callus that received 2,4-D at 1.0 mg/L, sucrose at

30 mg/L and a pH level of 5.8, had the highest growth as indicated by its highest dry weight of 41.9, 6.83 and 6.67 mg/g fresh weight, respectively. On the production of curcuminoids, results indicated that callus that did not receive any 2,4-D (0 mg/L) but received sucrose at 30 mg/L and cultured under pH 5.8, were able to give highest amount of major curcuminoid, curcumin, at 0.47, 0.47 and 0.67% dry weight, respectively.

Comparison of the ability for bacterial growth inhibition of crude extracts from turmeric callus with naturally grown rhizomes and leaves from in vitro grown plants, results showed that all types of crude extracts were not able to inhibit bacterial growth of gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* 0157:H7. However, they were shown to inhibit the growth of gram-positive bacteria except the crude leaf extracts. Callus crude extracts were able to inhibit particularly *Bacillus subtilis* TISTR 008 and *Staphylococcus aureus* TISTR 029. While crude extract from naturally grown rhizome was also able to inhibit the growth of *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 029 and TISTR 885.

คำนำ

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการเพาะปลูกกันมากในประเทศแถบทวีปเอเชียเพื่อใช้เป็นเครื่องเทศประกอบอาหารและสมุนไพรพื้นบ้าน ได้แก่ ศรีลังกา อินเดีย จีน อินโดนีเซีย มาเลเซีย ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และไทย มีผลผลิตทั่วโลกประมาณ 160,000 ตัน โดยอินเดียมีการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลก ส่วนไทยตลาดการค้าภายในประเทศและการส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ประเทศที่นำเข้าขมิ้นชันจากไทยที่สำคัญ คือ ญี่ปุ่น แต่ผลผลิตที่ได้ยังไม่เพียงพอต่อการส่งออก ขมิ้นชันเป็นพืชที่มีคุณประโยชน์มากมาย ทางการแพทย์ใช้เป็นสมุนไพรมีสรรพคุณในการบำบัดรักษาโรคต่างๆ เช่น แผลในลำไส้ ขับลม ช่วยให้อาหาร แก้อาการวิงเวียน ระบายท้อง ขับน้ำ ระบายลม และแก้ท้องมาน เป็นต้น ด้านอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็นเครื่องเทศเพราะมีน้ำมันหอมระเหยและรงควัตถุที่มีความปลอดภัย จึงใช้แต่งกลิ่นและสีของอาหารได้หลายชนิด เช่น เครื่องแกง มัสตาร์ด ผักดอง เนยแข็ง ฯลฯ นอกจากนั้นยังใช้ในอุตสาหกรรมย้อมผ้า นิยมใช้ผสมในเครื่องสำอางค์เพื่อแต่งสี

สารรงควัตถุสีเหลืองหรือ curcuminoids ที่สะสมอยู่ในเหง้าขมิ้นชันเป็นสารฟีนอลิกพวก phenolic compounds คือ phenolic diaryl heptanoid มี 3 ชนิด ได้แก่ curcumin (49%), demethoxycurcumin (28.7%) และ bisdemethoxycurcumin (22.3%) โดย curcumin เป็นสารสำคัญที่น่าสนใจจะนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากมีรายงานว่า มีคุณสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชัน ด้านการอักเสบ และมีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งหลายชนิดทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต่อต้านหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ เช่น *Clostridium perfringens* ที่อยู่บริเวณลำไส้ และ *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum* และ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ซึ่งเป็นเชื้อโรคเน่าในพืช

ในปัจจุบันมีความสนใจเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพรเพื่อขยายพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ ดัดแปลงพันธุกรรม และผลิตสารฟีนอลิกสำหรับผลิตยาและเครื่องสำอาง ซึ่งสารที่สร้างขึ้นมาโดยพืชสมุนไพรส่วนใหญ่มีราคาแพงมาก ตลอดหลายปีที่ผ่านมา นักวิชาการค้นพบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในรูปแบบแคลลัส (callus) เซลล์แขวนลอย (cell suspension) และรากลอย (hairy root) เป็นวิธีการที่ใช้พัฒนาการผลิตสารฟีนอลิกเพื่อประโยชน์ทางการค้าได้ โดยมีแนวโน้มได้เปรียบเหนือการปลูกพืชตามธรรมชาติแบบดั้งเดิม เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำได้ตลอดเวลา ใช้เวลาสั้น ไม่ขึ้นกับภูมิประเทศและภูมิอากาศ ใช้พื้นที่น้อย และควบคุมการเจริญเติบโตได้ ทำให้ควบคุมคุณภาพได้คงที่และการสกัดแยกสารกระทำได้ง่ายกว่า เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัสและรากแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) เพื่อ vincristine และ vinblastine ที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง การผลิต emitine และ cephaeline จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและราก *Cephaelis ipecacuanha* และการผลิต anthocyanin โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสแครอท (*Daucus carota*) เป็นต้น ซึ่งการที่พืชที่เพาะเลี้ยงจะสร้างสารฟีนอลิกได้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งคาร์บอน และความเครียด (stress) ที่เหนี่ยวนำขึ้นมา เช่น แสงต้นออกสโมติก ความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ รวมทั้งการชักนำด้วยสิ่งกระตุ้น เช่น สารพิษจากเชื้อ จุลินทรีย์ (เอื้อพร, 2531)

ในงานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้ขมิ้นชันเกิดแคลลัสและการเพาะเลี้ยงแคลลัส การตรวจสอบและวิเคราะห์ปริมาณ curcuminoids ที่ผลิตขึ้นในแคลลัส รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากแคลลัสในการต่อต้านจุลินทรีย์บางชนิด และเนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตสาร curcuminoids นี้ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฉะนั้นคาดว่าจะผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของการพัฒนาการผลิตสาร curcuminoids โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

คำอธิบายอักษรย่อ

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	6-benzyladenine
BAP	6-benzylamino purine
NAA	α -naphthaleneacetic acid
IAA	indole-3-acetic acid
TDZ	thidiazuron
MS	Murashige and Skoog (1962) medium
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ppm	part per million

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดแคลลัสไขมันชั้น ได้แก่ แสง อายุชิ้นส่วนตั้งต้น การตัดแบ่งชิ้นส่วนพืช และสารควบคุมการเจริญเติบโต
2. เพื่อศึกษาปัจจัยในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแคลลัสไขมันชั้น ได้แก่ น้ำตาล และแสง
3. เพื่อศึกษาปัจจัยในการเจริญเติบโตและการผลิตสารกลุ่ม curcuminoids ของแคลลัสไขมันชั้น ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล และความเป็นกรดเป็นด่าง
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดยับยั้งจากแคลลัสไขมันชั้น

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อภาษาสามัญว่า turmeric มีชื่อพื้นเมืองว่า ขมิ้นแกง ขมิ้นหยวก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) ขมิ้นชัน (กลาง) ขี้ขมิ้น (ใต้) ตายอ (กะเหรี่ยง-กำแพงเพชร) และสะยอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) (ผอง, 2543) เป็นพืชประเภทล้มลุกข้ามปีและมีหัวอยู่ใต้ดิน เป็นลำต้นใต้ดิน เรียกว่า เหง้า (rhizome) ประกอบด้วย แ่งที่มีลักษณะต่างๆ กัน คือ แ่งแม่ (mother rhizome) หรือแ่งหลัก มีลักษณะกลมเป็นที่แตกแขนงที่

สองและสามต่อไป (secondary and tertiary branches) ส่วนของแขนงที่แตกออกมาถ้ามีลักษณะกลมจะเรียกว่า หัว (corm) และถ้ามีลักษณะยาวคล้ายนิ้วมือ เรียกว่า นิ้ว (finger) เป็นที่เกิดของรากฝอย บริเวณแกงของหัวและนิ้วจะมีตาอยู่ทั่วไป สีค่อนข้างอ่อน ปลายแหลม ซึ่งต่อไปจะเจริญเป็นลำต้นและใบ ส่วนของลำต้นที่ปรากฏให้เห็นอยู่เหนือพื้นดินเป็นลำต้นเทียม ความสูงประมาณ 50-70 เซนติเมตร ประกอบด้วยกาบใบซ้อนทับกันเป็นชั้นๆ จากโคนถึงปลาย ใบเป็นใบเดี่ยว แผ่นใบมีลักษณะยาวรี ปลายแหลม ความยาวประมาณ 30-45 เซนติเมตร และความกว้างประมาณ 10-20 เซนติเมตร มีเส้นกลางใบเห็นได้ชัดเจนจากทางด้านล่างของใบ ใบเรียบแบบสลับและอยู่กันเป็นกลุ่ม เมื่อโตเต็มจะมีใบประมาณ 6-10 ใบ ดอกเกิดเป็นช่อ ช่อดอกจะเกิดบนลำต้นที่มีใบหรือโผล่ขึ้นมาจากใจกลางของกลุ่มใบ ช่อดอกมีรูปร่างแบบทรงกระบอก (cone) ความยาวประมาณ 10-18 เซนติเมตร และความกว้างประมาณ 5 เซนติเมตร โดยปกติแล้วขมิ้นชันจะเป็นหมัน จึงมักไม่ติดผลและเมล็ด (รุ่งรัตน์, 2540)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม วิธีการปลูกและเก็บเกี่ยวขมิ้นชัน

ขมิ้นชันเป็นพืชที่ชอบอากาศค่อนข้างร้อนและต้องการความชื้นสูงเช่นเดียวกับขิง อาจปลูกโดยอาศัยน้ำฝนหรือใช้การชลประทานเข้าช่วย นอกจากนี้ยังชอบดินร่วนที่มีการระบายน้ำดี เนื่องจากพื้นที่ที่มีน้ำขังหรือมีความชื้นสูงเกินไปจะทำให้เหง้าขมิ้นชันเน่าเสียได้ (รุ่งรัตน์, 2540)

การปลูกขมิ้นชันนิยมปลูกทั้งแบบยกร่องและไม่ยกร่อง แต่ในเขตที่มีการชลประทานหรือมีน้ำดี จะนิยมปลูกแบบยกร่องเพื่อช่วยระบายน้ำ โดยร่องปลูกควรมีความกว้างประมาณ 50-60 เซนติเมตร และความสูงประมาณ 25 เซนติเมตร ความยาวไม่จำกัดหรือเป็นช่วงประมาณ 10-20 เซนติเมตร เพื่อความสะดวกในการดูแลรักษา และใช้ระยะปลูกประมาณ 15x15 เซนติเมตร ท่อนพันธุ์ขมิ้นชันที่ใช้ อาจใช้ทั้งท่อนยาวๆ หรือตัดเป็นท่อนๆ ให้มีตาติดอยู่ประมาณ 1-2 ตา อาจเพาะท่อนพันธุ์ให้งอกหน่อออกมาก่อนปลูกในแปลงก็ได้ ฤดูกาลปลูกส่วนใหญ่จะอยู่ช่วงต้นฤดูฝนหรือก่อนฤดูฝนเล็กน้อย ประมาณเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม การเพาะปลูกขมิ้นชันในเขตชลประทานจะใช้เวลางอกประมาณ 15 วัน แต่ถ้าปลูกในที่ราบอาศัยน้ำฝนจะใช้เวลาประมาณ 1 เดือน จากนั้นอีกประมาณ 5-6 เดือน จะเป็นช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ซึ่งจะสิ้นสุดลงประมาณเดือนกันยายนและตุลาคม ต่อจากนั้นจะเป็นการเจริญเติบโตของเหง้าและเริ่มออกดอกในช่วงเดือนพฤศจิกายน แต่การออกดอกจะไม่ใช่ที่ต้องการของเกษตรกร เพราะมีผลทำให้เหง้าเจริญเติบโตช้าและมีขนาดเล็ก ดังนั้นเกษตรกรจึงควรตัดช่อดอกทิ้งตั้งแต่ในระยะเริ่มแรก หลังจากปลูกขมิ้นชันได้ประมาณ 7 เดือน ใบล่างๆ จะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าขมิ้นชันเริ่มแก่แล้ว ควรปล่อยให้ใบเปลี่ยนจนมีอายุ 9-10 เดือน จึงขุดเหง้าได้ การขุดระวังไม่ให้เหง้าเสียหาย ขมิ้นชันกอ

หนึ่งๆ จะมีหัวประมาณ 2-8 อัน และมีแง่นิ้วมือประมาณ 10-40 อัน ให้ผลผลิตไร่ละประมาณ 3,200-3,500 กิโลกรัม (รุ่งรัตน์, 2540)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของขมิ้นชัน

การค้าขมิ้นชันจะแบ่งขมิ้นชันออกเป็น 3 ชนิด คือ ชนิดนิ้วมือ ชนิดทั้งเหง้า และชนิดแตกหัก โดยชนิดแรกมีคุณภาพดีที่สุด ขมิ้นชันที่จำหน่ายภายในประเทศนั้นมีทั้งชนิดหัวและชนิดแง่นิ้วมือคละกัน ราคาจำหน่ายอยู่ระหว่าง 6-20 บาทต่อกิโลกรัม ส่วนขมิ้นชันที่ส่งออกอาจจะต้มหรือไม่ต้มก่อนก็ได้ แต่ส่วนใหญ่นิยมนำมาต้มก่อน ก่อนการส่งออกจะต้องผ่านการรมยาและขอใบรับรองตรวจโรคเพื่อจำหน่ายต่อไป อย่างไรก็ตาม เกษตรกรมักจะปลูกขมิ้นชันในลักษณะเป็นพืชแซม ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศ การปลูกเป็นการค้ายังไม่แพร่หลายทำให้ต่างประเทศไม่ค่อยรู้จักขมิ้นชันของประเทศไทย นอกจากนี้ความไม่แน่นอนของตลาดต่างประเทศก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรมีความสนใจปลูกขมิ้นชันน้อยลง (รุ่งรัตน์, 2540)

ประโยชน์ของขมิ้นชัน

ขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรที่มีสารสำคัญ คือ curcumin ซึ่งมีสรรพคุณด้านเภสัชกรรมสามารถรักษาโรคได้หลายชนิด เช่น เป็นยาลดกรด ขับลมแก้ปวดท้อง แก้อาการปวดเกร็งของกล้ามเนื้อ ลดการบีบตัวของลำไส้ แก้อาการแน่นจุกเสียด เป็นยาเจริญอาหาร ขับน้ำเหลือง รักษาโรคผิวหนัง น้ำคั้นจากเหง้าสามารถนำมารักษาโรคผิวหนัง หรือนำมาพอกแก้ปวดตามข้อได้ แก่โรคตา แก่ปวดท้อง แก่ดีซ่าน ประโยชน์อื่นๆ เช่น ใช้เป็นสีย้อม และเครื่องสำอาง (www.geocities.com/yongyang_98/doctors2/herb_curcuma0.1.html)

เนื่องจากขมิ้นชันยังมีสารสำคัญอีกหลายชนิด จึงมีผู้ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่น สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น เชื้อหนอง เชื้อนิวมอเนีย เชื้อไทฟอยด์ และเชื้อวัณโรค น้ำมันขมิ้นชันมีฤทธิ์ฆ่าพยาธิ เช่น พยาธิตัวตืด และพยาธิไส้เดือน นอกจากนี้สารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการกำจัดแมลงและศัตรูพืช จำพวกหนอนใยผัก หนอนหลอดหอม มอดข้าวเปลือก ตัวงวง และด้วงถั่วเขียว (โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง กรมป่าไม้, 2541)

สารเคมีที่พบในขมิ้นชัน

สารเคมีที่พบในขมิ้นชัน ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยมีปริมาณตั้งแต่ 2-6% ซึ่งมีอยู่หลายชนิด ได้แก่ termerone zingiberene, sabinene, borneol, cineol, termerol, curcumone และ

phellandrene ส่วนในเหง้าของขมิ้นชันยังพบสารสีเหลืองส้มหรือสีเหลืองแดงที่ทำให้ขมิ้นชันมีสี เรียกว่า สารกลุ่ม curcuminoids ซึ่งประกอบด้วยสารหลัก 3 ชนิด คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท phenolics (พรทิพย์, 2544) ในกลุ่มนี้สารที่พบมากที่สุด คือ curcumin ซึ่งมีประมาณ 1.8-5.4% จากการศึกษาพบว่า ปริมาณน้ำมันหอมระเหย และ curcumin ในขมิ้นชันจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับ อายุของพืช กล่าวคือ ขมิ้นชันที่มีการเจริญเต็มที่แล้วจะมีปริมาณของ curcumin เปลี่ยนแปลงไป ในช่วงระยะการเจริญตั้งแต่เดือนที่ 5 ถึงเดือนที่ 8 เพียง 7% เท่านั้น ส่วนน้ำมันหอมระเหยใน ขมิ้นชันที่มีการเจริญเต็มที่จะมีปริมาณลดลง และการลดลงจะมีมากที่สุดในเดือนที่ 8

(www.geocities.com/yongyang_98/doctors2/herb_curcuma0.1.html)

ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนิน การพัฒนาของพืชขึ้นอยู่กับสัดส่วนของฮอร์โมน 2 กลุ่มนี้ คือ ถ้าสัดส่วนไซโตไคนินต่อออกซินสูงจะ พัฒนาไปเป็นตา ลำต้น และใบ หากสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินต่ำจะพัฒนาเป็นรากได้ ดีกว่า และหากมีสัดส่วนที่สมดุลจะพัฒนาไปเป็นแคลลัส (รังสฤษฎ์, 2540) มีการแนะนำว่า ออกซินที่นิยมใช้มากที่สุดในการเพาะเลี้ยงแคลลัส คือ 2,4-D เป็นสารชักนำให้เกิดแคลลัสและ รักษาแคลลัสให้อยู่ในสภาพนี้ตลอดไป ปริมาณที่ใช้ประมาณ 1-50 ไมโครโมล เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรืออาจใช้รวมกันกับ NAA (อารีย์, 2541)
2. ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากธาตุที่เป็นส่วนประกอบทั่ว ๆ ไปของสูตรอาหารแล้ว อาหาร เสริมกรดอะมิโน เช่น กลูตามีน แอสปารากีน อาร์จีนีน พิวรีน และไพริมิดีน เป็นต้น เคซีน ไฮโดรไลเซต สารสกัดจากมอลต์ สารสกัดจากยีสต์และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้น ให้เกิดแคลลัส (ประศาสตร์, 2536)
3. แหล่งคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญ คือ กลูโคสและซูโครส ความเข้มข้น 2-4% ซูโครส เป็นไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) ที่สลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน ดังนั้นหลังจากการอบนึ่ง ฆ่าเชื้อแล้ว อาหารเพาะเลี้ยงจะประกอบไปด้วยกลูโคสและฟรุกโตส (ประศาสตร์, 2536)
4. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (environmental factors) เช่น แสง การเพาะเลี้ยงแคลลัสต้องการแสง ความเข้มข้นต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ยังต้องการ ก๊าซออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย (ประศาสตร์, 2536)
5. สถานะของอาหารที่ใช้เลี้ยง (media status) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งเจริญเติบโตได้น้อย กว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารน้อยกว่า และตรง

ตำแหน่งที่ขึ้นส่วนของแคลลัสสัมผัสกับอาหาร จะมีสารที่มีผลต่อการเติบโตซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolite wastes) ที่เซลล์ปล่อยออกมา (ประศาสตร์, 2536)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดแคลลัสและเลี้ยงแคลลัสของพืชวงศ์ Zingiberaceae

สุมนา และคณะ (2542) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน โดยนำชิ้นส่วนตาบริเวณเหง้ามาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA, NAA และ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การใช้ 2,4-D เพียงชนิดเดียวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยเมื่อระดับความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้นจาก 0.1 จนถึง 1.0 ppm สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เพิ่มขึ้นจาก 60% เป็น 80% แต่เมื่อใช้ 2,4-D ร่วมกับ BA พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 ppm ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5.0 ppm สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ถึง 100% ลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีเหลืองอ่อนและฉ่ำน้ำ

Neeta *et al.* (2000) ศึกษาการพัฒนาของยอดจากการเพาะเลี้ยงขมิ้นชัน โดยใช้ส่วนดอกอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA และ TDZ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่า การใช้ BA ความเข้มข้น 5 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดมากที่สุด คือ 98 และ 71% ตามลำดับ แต่มีอัตราเฉลี่ยของยอดต่อชิ้นส่วนต่ำ ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับการใช้ TDZ ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่า มี%การเกิดยอดต่ำแต่มีอัตราเฉลี่ยของยอดต่อชิ้นส่วนมากกว่า จากการทดลองนี้ได้สรุปผลว่า BA สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนดอกอ่อนของขมิ้นชันเกิดยอดได้สูง แต่ไม่ส่งเสริมอัตราการเกิดยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน

Shetly *et al.* (1982) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของขมิ้นชัน โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาจากเหง้าของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS ที่มี kinetin ความเข้มข้นต่างๆ และเลี้ยงไว้ในที่มืด พบว่า kinetin ความเข้มข้น 0.2–0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็นจุดสีเขียว (green spot) จากนั้นเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมแต่มีแสงพบว่า แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นและรากได้

Sunitibala *et al.* (2001) ศึกษาการขยายพันธุ์และการสร้างเหง้า (rhizome) ของขมิ้นชัน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยการนำชิ้นส่วนตาของเหง้าและปลายยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ใส่ 2,4-D เพียงอย่างเดียวความเข้มข้น 2.5-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อนำแคลลัสที่ได้เปลี่ยนย้ายลงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อกระตุ้นให้เกิดต้น พบว่า การใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร STD และให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง สามารถเกิดต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้

กอบเกียรติ (2541) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและอายุขึ้นส่วนของต้นอ่อน กระเจียว (*Curcuma* sp.) ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้ชิ้นส่วนรอยต่อระหว่าง รากกับลำต้นขนาด 10 มิลลิเมตร อายุ 1, 2 และ 3 เดือน มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D และ BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และการใช้ชิ้นส่วนที่มีอายุ 2 เดือนมีความเหมาะสมในการ ชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าอายุ 1 และ 3 เดือน เมื่อนำแคลลัสจากสูตรชักนำที่ดีที่สุดมา เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA หรือ 2,4-D ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อเพิ่มปริมาณ แคลลัสพบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่าง เดียวสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้มากที่สุด จากนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยที่ได้จาก แคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับน้ำมะพร้าวหรือซูโครส ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า อาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10% ทำให้เซลล์มี การเจริญเติบโตดีที่สุดที่สุดในรูปของปริมาตร น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ส่วนการใช้ซูโครสทำให้เซลล์ มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้น 2%

Yasuda *et al.* (1988) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารอินทรีย์บางชนิด ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเติบโตของตากระเจียว 3 ชนิด คือ *C. zedoaria* *C. domestica* และ *C. aromatica* โดยนำชิ้นส่วนตาของลำต้นได้ดินมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ มี NAA kinetin และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาพอุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสง ความเข้ม 2,000 ลักซ์ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนตา กระเจียวทั้ง 3 ชนิดเจริญเติบโตเป็นยอดได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกิดยอดจำนวนมากขึ้นหากเพิ่มความเข้มข้น NAA เป็น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Malamug *et al.* (1991) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) พันธุ์ Kintoki โดยนำส่วนตาจากเหง้าที่มีความยาว 1.0–1.5 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D, NAA และ BAP ความเข้มข้นแตกต่างกัน ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 24 ± 3 องศา เซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่มีแสงเป็นเวลา 1 เดือนพบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100% เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5–1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเมื่อนำแคลลัส (friable callus) ที่ได้มาเลี้ยงพบว่าสามารถเพิ่ม ปริมาณแคลลัสได้

Babu *et al.* (1992) ศึกษาการเกิดเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสของขิง (*Z. officinale* Rosc.) โดยนำชิ้นส่วนใบของต้นขิงอายุ 2 เดือน เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ใส่ NAA

ร่วมกับ 2,4-D ที่มีความเข้มข้นต่างกัน เพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 9.0-22.6 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ปริมาณมาก เมื่อเลี้ยงแคลลัสได้ 2 เดือน จึงแยกชิ้นส่วนแคลลัสลงมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D kinetin และ BA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสูตรอาหาร ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.9 ไมโครโมล ร่วมกับ BA 13.3 ไมโครโมล สามารถทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้ 87%

Babu *et al.* (1993) ชักนำให้เกิดแคลลัสจากช่อดอกอ่อนของขิง โดยเมื่อนำชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่มีอายุ 1-10 วัน มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D และ/หรือ BA ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และจะเกิดยอดเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อย้ายยอดไปเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลชักนำให้ต้นเกิดรากจำนวนมากและนำไปปลูกต่อไปได้

Ilahi and Jabeen (1987) ศึกษาชนิดของชิ้นส่วนและอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด แคลลัสของขิง โดยเมื่อนำชิ้นส่วนลำต้น ตายอด และยอดที่ได้จากต้นกล้าที่มีอายุ 3 เดือน มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ครึ่งสูตรที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยเลี้ยงไว้ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ได้รับแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีจากเนื้อเยื่อส่วนยอดที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D และ BAP ทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งแคลลัสเหล่านี้สามารถพัฒนาไปเป็นจุดกำเนิดของตา (bud primordia) ได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีหรือมี 2,4-D ความเข้มข้นต่ำลง ส่วนชิ้นส่วนของลำต้นก็สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้โดยไม่ผ่านแคลลัสเมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์

Ishida and Adachi (1988) สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนตาเกิดแคลลัสในขิงพันธุ์ Ohshoga ได้ โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนตาจากเหง้าบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมาเมื่อย้าย friable และ nodular callus ที่เกิดขึ้นมาเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถ ชักนำให้เกิดยอดได้ 27.7%

Choi (1993) ศึกษาตำแหน่งชิ้นส่วนลำต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของขิง โดยใช้ชิ้นส่วนจากลำต้นเทียม แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนโคน กลาง และส่วนยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA และ BA ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้รับแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าส่วนกลางของลำต้นตอบสนองได้ดีที่สุด คือ สามารถเกิดแคลลัสได้ในอาหารที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกิดยอดและราก

จำนวนมากมาเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Malamug *et al.* (1991)

การวิเคราะห์สารกลุ่ม curcuminoids

การวิเคราะห์สารกลุ่ม curcuminoids โดยเทคนิค HPLC มีการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม curcuminoids ด้วยเทคนิค HPLC

คอลัมน์	Mobile phase	Detector	ปริมาณฉีด (ไมโครลิตร)	อ้างอิง
C ₁₈	acetonitrile : water : formic acid อัตราส่วน 45 : 75 : 2	UV (254 nm)	10	ณรงค์ศักดิ์ (2528)
C ₁₈	acetonitrile : water : acetic acid อัตราส่วน 51 : 49 : 5	UV (254 nm)	10	Henschen <i>et al.</i> (1985)
Amino	alcohol : water อัตราส่วน 60 : 40	UV (254 nm)	20	Sabinsa <i>et al.</i> (2003) อึ้งโน (www.curcuminoids.com)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดขมิ้นชัน

Bhavanishankar and Murthy (1985) ทำการศึกษาลดต่อต้านหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยใช้สารสกัดจากขมิ้นชัน ได้แก่ curcumin และน้ำมันหอมระเหย การทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Clostridium perfringens* ในบริเวณลำไส้ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ curcumin ให้สูงขึ้นจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Cl. perfringens* ได้มากขึ้น และมีการยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์เมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.05%

Apisariyakul *et al.* (1995) ศึกษาผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังและเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคได้ ที่ระดับความเจือจาง 1:40-1:320 และ 1:40-1:80 ตามลำดับ

Yusuf *et al.* (2001) นำสารสกัดจากขมิ้นชันธรรมชาติมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ พบว่า สามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC 24213 และ ATCC 29213, *Micrococcus luteus* และ *Enterococci faecalis* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และจากการทดลองพบว่าสาร

สกัดจากขมิ้นธรรมชาติทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC 25222 และ ATCC 35213 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้

พรทิพย์ และคณะ (2540) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า น้ำคั้นที่ได้จากการสกัดขมิ้นชันด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำร้อน เอทานอล อีเทอร์ เมทานอล และ คลอโรฟอร์ม เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียโรคพืช คือ *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum* และ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ดีกว่า 80-100% และมีค่า ED_{50} ประมาณ 30,000 ppm เมื่อเทียบกับสารคูปราวิทซึ่งเป็นสารเคมีทางการเกษตรที่ใช้กำจัดเชื้อราและแบคทีเรีย

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

พืชที่ใช้ในการทดลอง

ต้นอ่อนขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชูโครส 30 กรัมต่อลิตร รุน 7.5 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดต่าง 5.8 และเลี้ยงไว้ในภาชนะที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ทั้งการชักนำให้ขมิ้นชันเกิดแคลลัสและการเพาะเลี้ยงแคลลัสใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มี รุน 7.5 กรัมต่อลิตร เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและชูโครสระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง ปรับความเป็นกรดต่าง 5.8 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องออโตเคลฟ ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

การสกัดและวิเคราะห์สารกลุ่ม curcuminoids

นำตัวอย่างพืชมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ แล้วบดให้ละเอียด ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างละ 75 มิลลิกรัม แช่ในเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดและอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (ดัดแปลงจาก www.curcuminoids.com.html) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น 1100 series (Agilent Co.,Ltd) ซึ่งมีสภาวะการฉีดสาร ดังนี้

คอลัมน์	C ₁₈
Mobile phase	methanol : water : 1% phosphoric acid อัตราส่วน 70 : 30 : 2
Flow rate	1 มิลลิลิตรต่อนาที
Detector	UV ที่ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร
ปริมาณการฉีด	20 ไมโครลิตร

ทำการฉีดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาหาปริมาณสารกลุ่ม curcuminoids โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นสารของสารมาตรฐาน

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

นำตัวอย่างแห้งบดละเอียด 0.1 กรัม มาแช่ในเมทานอล 50% ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน cellulose membrane ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ซึ่งจะได้สารสกัดหยาบความเข้มข้น 6.67%

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียใช้วิธี paper disc diffusion โดยนำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาเพาะในอาหาร tryptic soy broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland no.5 (Dorothy, 1972) และนำเชื้อมา swab ลงบนผิวหน้าอาหาร tryptic soy agar จนทั่ว ทั้งไว้ประมาณ 5 นาที ก่อนนำ paper disc เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารสกัดหยาบ 20 ไมโครลิตร วางบนผิวหน้าของอาหารที่ swab เชื้อเรียบร้อยแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผลจากเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

การวางแผนการทดลอง

การศึกษาแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

1. ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส

1.1 ผลของสภาพแสง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบสภาพแสง ได้แก่ มีด และมีแสง (40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน)

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน ความยาว 1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS มี 2,4-D 5.0 มิลลิกรัม และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร เก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืดและมีแสง

1.2 ผลของอายุชิ้นส่วนตั้งต้น

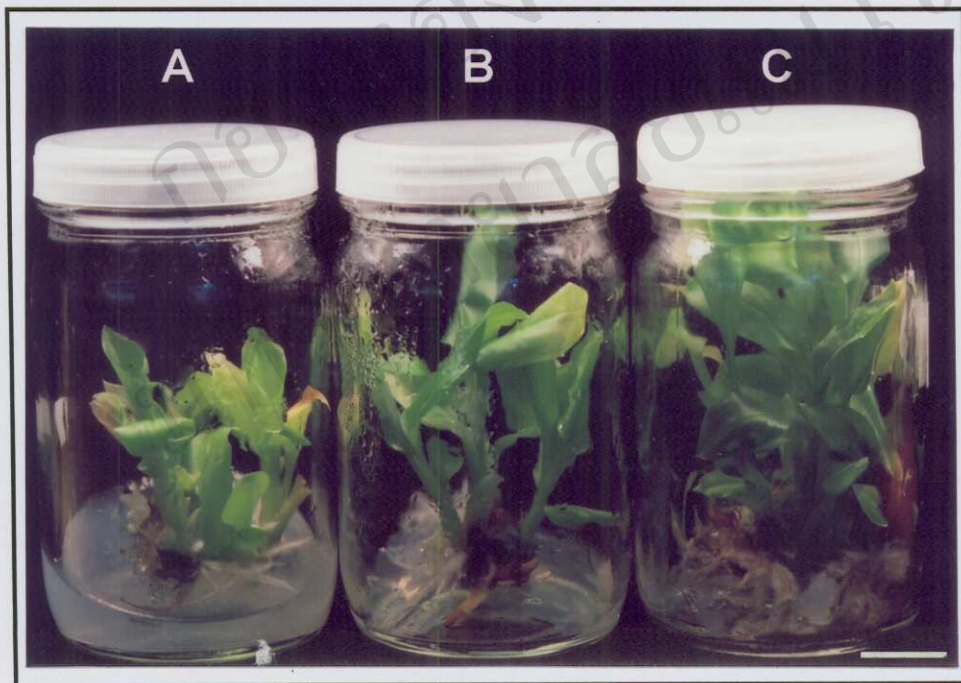
วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบอายุชิ้นส่วนลำต้นอ่อน ได้แก่ 30, 60 และ 90 วัน (ภาพที่ 1)

นำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนความยาว 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 และเก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด

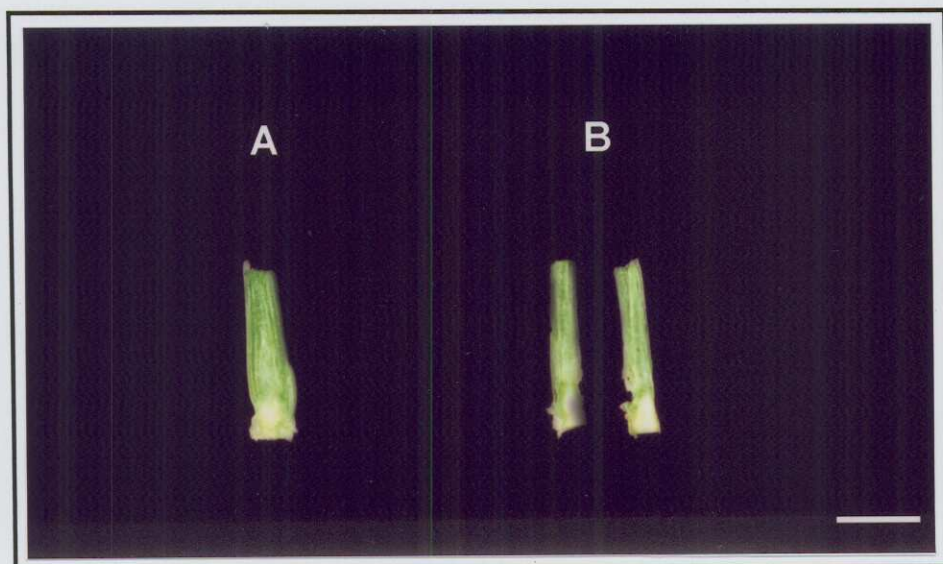
1.3 ผลของการตัดแบ่งชิ้นส่วนตั้งต้น

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบลักษณะการตัดแบ่งชิ้นส่วนลำต้นอ่อน อายุ 60 วัน และตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 ส่วน และ 4 ส่วน (ภาพที่ 2)

นำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนความยาว 1 เซนติเมตร ที่ตัดแบ่งแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 และเก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด



ภาพที่ 1 ต้นอ่อนมันชันที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 30, 60 และ 90 วัน (A, B และ C ตามลำดับ) (bar = 1.2 เซนติเมตร)



ภาพที่ 2 ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน (A และ B ตามลำดับ) (bar = 5 มิลลิเมตร)

1.4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D 0, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน ความยาว 1 เซนติเมตร ซึ่งตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 ส่วน เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ในระดับความเข้มข้นดังที่กำหนด และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด

2. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแคลลัส

2.1 ผลของน้ำตาลและสภาพแสง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของชูโครส ได้แก่ 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสภาพแสง ได้แก่ มืดและมีแสง (40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน)

นำแคลลัสอายุ 60 วัน น้ำหนักสด 0.1 กรัม ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร มาย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผันแปรระดับความ

เข้มข้นของซูโครสดังที่กำหนด ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร 5.8 เก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด หรือมีแสง

3. ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสและการผลิตสารกลุ่ม curcuminoids ในแคลลัส

3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ได้แก่ 0, 0.25, 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำแคลลัสอายุ 60 วัน น้ำหนักสด 0.1 กรัม ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มาย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีซูโครส 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งผันแปรระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ดังที่กำหนด ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร 5.8 เก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน จึงนำแคลลัสไปหาน้ำหนักแห้ง สกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม curcuminoids ด้วยเทคนิค HPLC

3.2 ผลของน้ำตาล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของซูโครส ได้แก่ 30, 50, 70 และ 90 กรัมต่อลิตร

นำแคลลัสอายุ 60 วัน น้ำหนักสด 0.1 กรัม ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มาย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งผันแปรระดับความเข้มข้นของซูโครสดังที่กำหนด ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร 5.8 เก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน จึงนำแคลลัสไปหาน้ำหนักแห้ง สกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม curcuminoids ด้วยเทคนิค HPLC

3.3 ผลของความเป็นกรดเป็นด่าง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบระดับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร ได้แก่ 5.2, 5.8, 6.4 และ 7.0

นำแคลลัสอายุ 60 วัน น้ำหนักสด 0.1 กรัม ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มาย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และมีซูโครส 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งผันแปรระดับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารดังที่กำหนด เก็บเนื้อเยื่อไว้ใน

สภาพมืด หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน จึงนำแคลลัสไปหั่นน้ำหนักแห้ง สกัดและวิเคราะห์ ปริมาณสารกลุ่ม curcuminoids ด้วยเทคนิค HPLC

4. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบแหล่งของสารสกัดหยาบ จากมันชัน ได้แก่ แคลลัสอายุ 30 วัน เลี้ยงที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.2 และ 5.8 ใบของต้น เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 2 เดือน และเหง้าธรรมชาติอายุ 6 เดือน และชนิดของแบคทีเรียก่อโรคใน อาหาร ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 029 และ TISTR 885

นำสารสกัดหยาบจากแหล่งเนื้อเยื่อต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งหมดด้วยวิธี paper disc diffusion

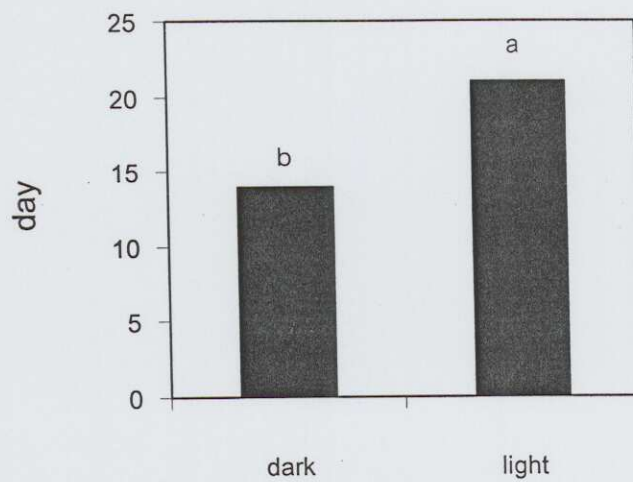
ผลการวิจัย

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

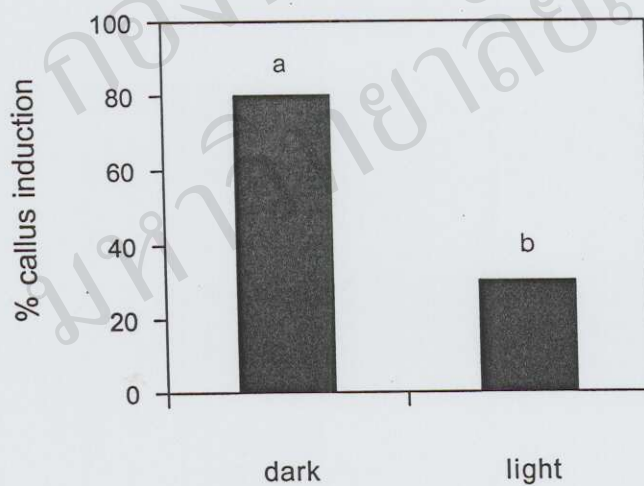
1.1 ผลของสภาพแสง

เมื่อเปรียบเทียบผลของที่มีดและมีแสงต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมันชันที่ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เกิด แคลลัส พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนสามารถเกิดแคลลัสได้ทั้งในที่มืดและมีแสง โดยเริ่มเกิดแคลลัส ในที่มีดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 14 วัน ซึ่งรวดเร็วกว่าและแตกต่างทางสถิติจากที่มี แสงที่มีการเกิดแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 21 วัน (ภาพที่ 3) และยังเกิดแคลลัส ในที่มีด 80% ซึ่งสูงกว่าในที่ที่มีแสงซึ่งเกิดแคลลัส 30% (ภาพที่ 4)

แคลลัสที่ชักนำได้เริ่มเกิดขึ้นที่บริเวณฐานของชิ้นส่วนลำต้นอ่อน แล้วขยายครอบคลุม บริเวณอื่น มีลักษณะเกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ สีขาวครีมและฉ่ำน้ำ แคลลัสที่เกิดในที่มืดมีสีอ่อน กว่าแคลลัสที่เกิดในที่ที่มีแสง นอกจากนี้มีการเกิดรากขนาดเล็กบนแคลลัสด้วย (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 3 วันที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่มีแสง



ภาพที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่มีแสงเป็นเวลา 60 วัน

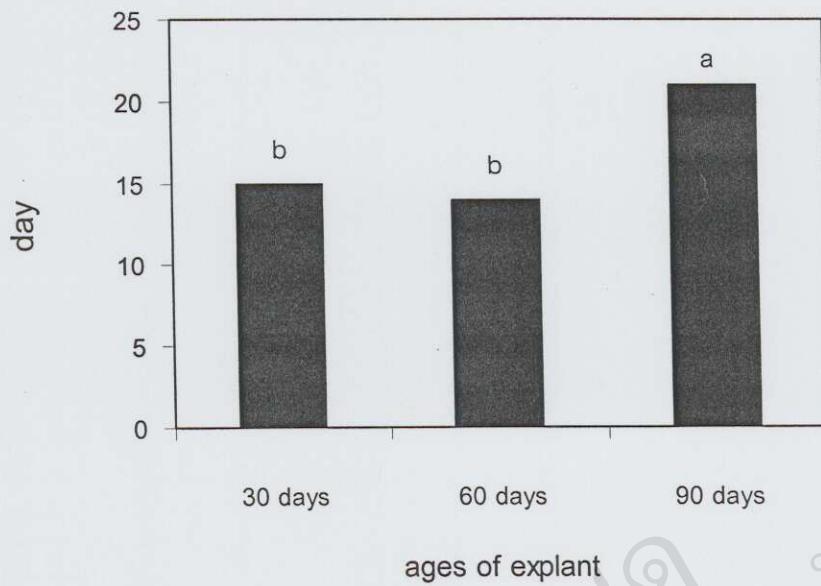


ภาพที่ 5 แคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 ต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 60 วัน (bar = 2 มิลลิเมตร)

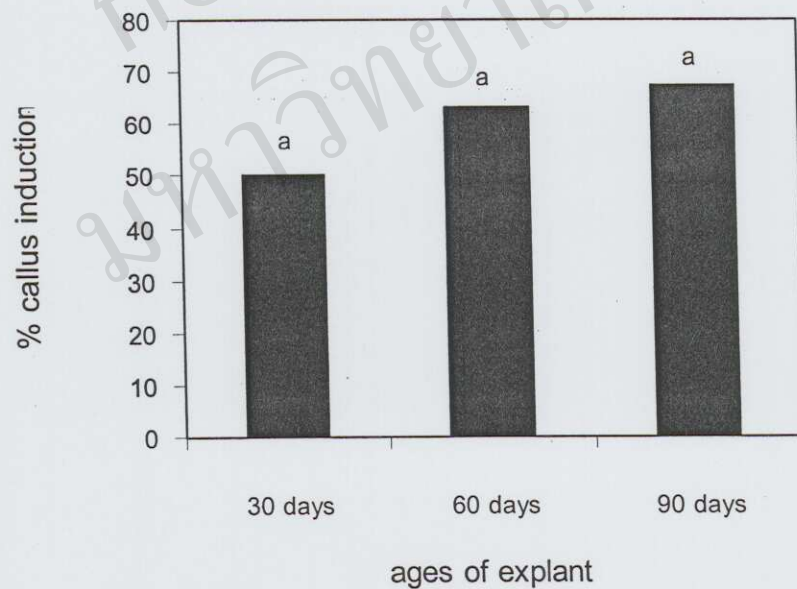
1.2 ผลของอายุชิ้นส่วนตั้งต้น

จากผลที่ได้ในการทดลองที่ 1.1 จึงใช้ที่มีดในการชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันเกิดแคลลัส โดยเมื่อนำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุต่างๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 30 และ 60 วัน เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงเฉลี่ย 15 และ 14 วัน ตามลำดับ ซึ่งรวดเร็วกว่าและมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 90 วัน ที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยง เฉลี่ย 21 วัน (ภาพที่ 6) แต่ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนทั้งสามระยะมีการเกิดแคลลัสใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างทางสถิติ อยู่ในช่วง 50-67.5% (ภาพที่ 7)

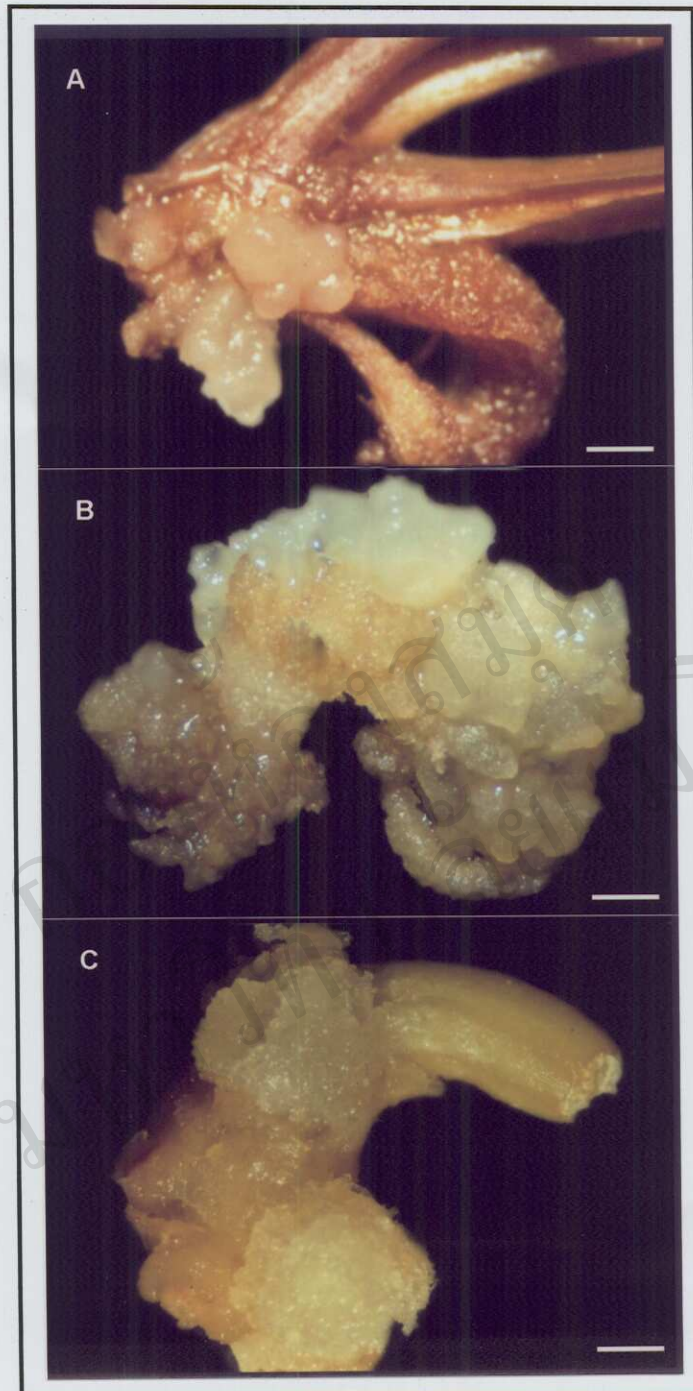
แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ มีสีขาวครีมและฉ่ำน้ำ โดยพบว่าแคลลัสที่ชักได้จากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุต่างๆ มีการเจริญเติบโตที่ต่างกัน กล่าวคือ หลังเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน แคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน มีขนาดใหญ่ครอบคลุมทั่วชิ้นส่วนพืช ส่วนแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 30 และ 60 วัน มีขนาดเล็กกว่าและพบอยู่เพียงบางส่วนของชิ้นส่วนพืช (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 6 วันที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 30, 60 และ 90 วัน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มีด



ภาพที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 30, 60 และ 90 วัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มีดเป็นเวลา 60 วัน

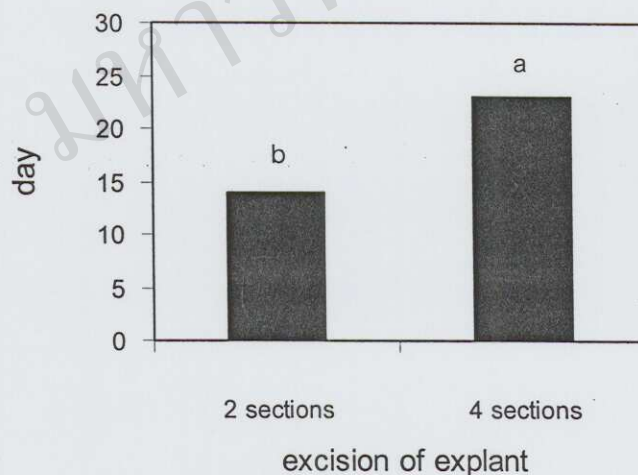


ภาพที่ 8 ลักษณะแคล์สซของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนไขมันชั้นอายุ 30, 60 และ 90 วัน (A, B และ C ตามลำดับ) หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มีดเป็นเวลา 60 วัน (bar = 1 มิลลิเมตร)

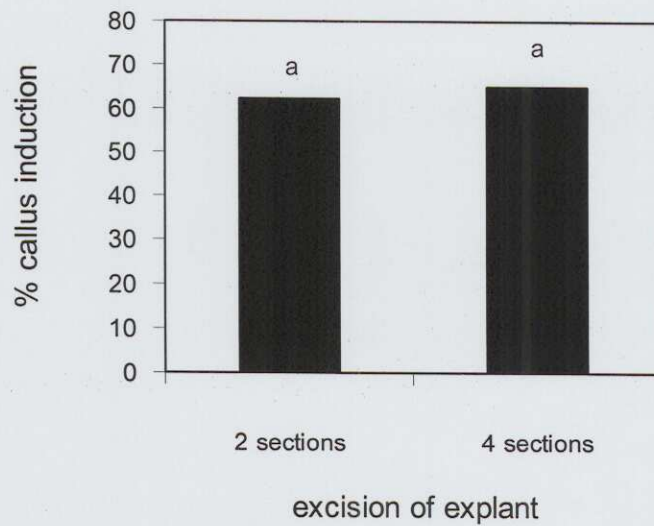
1.3 ผลของการตัดแบ่งชิ้นส่วนตั้งต้น

จากผลการทดลองที่ 1.2 จะเห็นได้ว่า ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน สามารถเกิดแคลลัสได้สูงและมีการเจริญเติบโตดีกว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุอื่นๆ จึงใช้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน มาใช้ในการทดลองนี้ โดยเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสระหว่างชิ้นส่วนที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน และเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และทูกโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืด พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่ตัดแบ่งออกเป็น 2 ส่วนเริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงเฉลี่ย 14 วัน ซึ่งรวดเร็วกว่าและแตกต่างทางสถิติจากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่ตัดแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงเฉลี่ย 23 วัน (ภาพที่ 9) แต่ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่ตัดแบ่งทั้งสองแบบมีการเกิดแคลลัสใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันทางสถิติอยู่ในช่วง 62.5-65.0% (ภาพที่ 10)

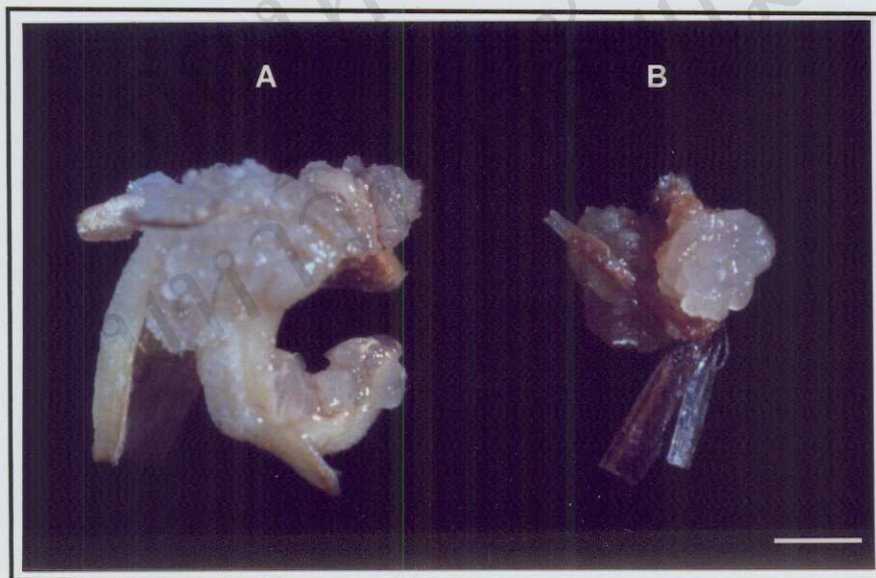
แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ มีสีขาวครีมและฉ่ำน้ำ โดยพบว่า แคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่ตัดแบ่งทั้งสองแบบมีการเจริญเติบโตที่ต่างกัน กล่าวคือ หลังเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน แคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 ส่วน มีขนาดใหญ่ครอบคลุมทั่วชิ้นส่วนพืช ส่วนแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 4 ส่วน มีขนาดเล็กกว่าเกิดขึ้นเพียงบริเวณส่วนฐานของชิ้นส่วน (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 9 วันที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขม้นชันอายุ 60 วัน ที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และทูกโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืด



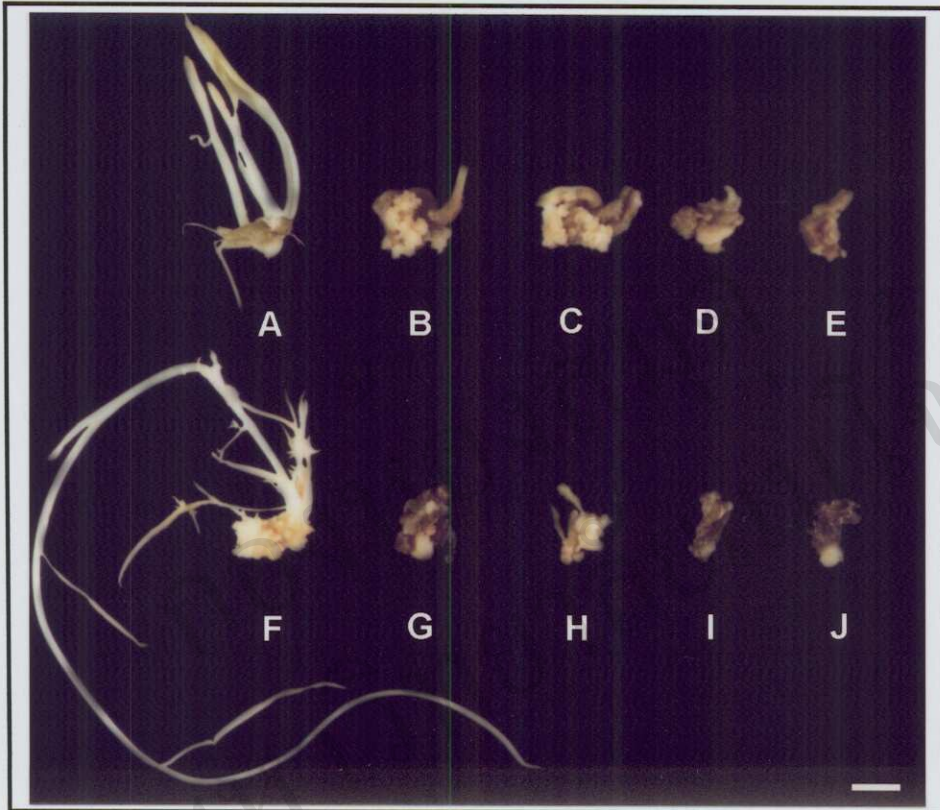
ภาพที่ 10 เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน ที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 60 วัน



ภาพที่ 11 การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน ที่ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน (A และ B ตามลำดับ) หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 60 วัน (bar = 4 มิลลิเมตร)

1.4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต

จากผลที่ได้ในการทดลองที่ 1.3 จึงใช้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน ที่ตัดแบ่งตามยาว ออกเป็น 2 ส่วน มาชักนำให้เกิดแคลลัสในการทดลองนี้ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BA (0 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีชูโครส 30 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืด พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนมีการเกิดทั้งแคลลัส ยอด และ ราก (ภาพที่ 12)



BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	0	0.5	1.0	3.0	5.0
0	A	B	C	D	E
1	F	G	H	I	J

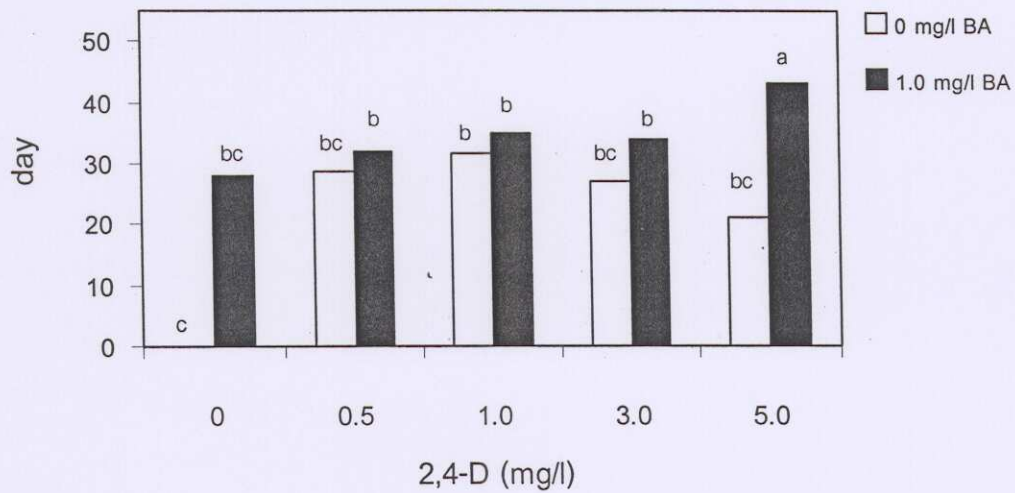
ภาพที่ 12 การเกิดแคลลัส ยอด และรากของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน (bar = 1 เซนติเมตร)

ในการเกิดแคลลัสนั้น พบว่า ทุกกรรมวิธีสามารถเกิดแคลลัสได้ ยกเว้นชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่ไม่ได้รับทั้ง 2,4-D (0 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ BA (0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ชิ้นส่วนที่ได้รับ 2,4-D เพียงอย่างเดียว (0.5-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยไม่มี BA (0 มิลลิกรัมต่อลิตร) เริ่มเกิดแคลลัสได้รวดเร็วกว่าชิ้นส่วนที่ได้รับ 2,4-D (0-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BA (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยการใช้ 2,4-D 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้รวดเร็วที่สุดหลังจากเพาะเลี้ยงเฉลี่ย 21 วัน การนำ BA (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาใช้ร่วมกับ 2,4-D ทุกระดับความเข้มข้น ทำให้ระยะเวลาชักนำให้เกิดแคลลัสนานขึ้น (ภาพที่ 13)

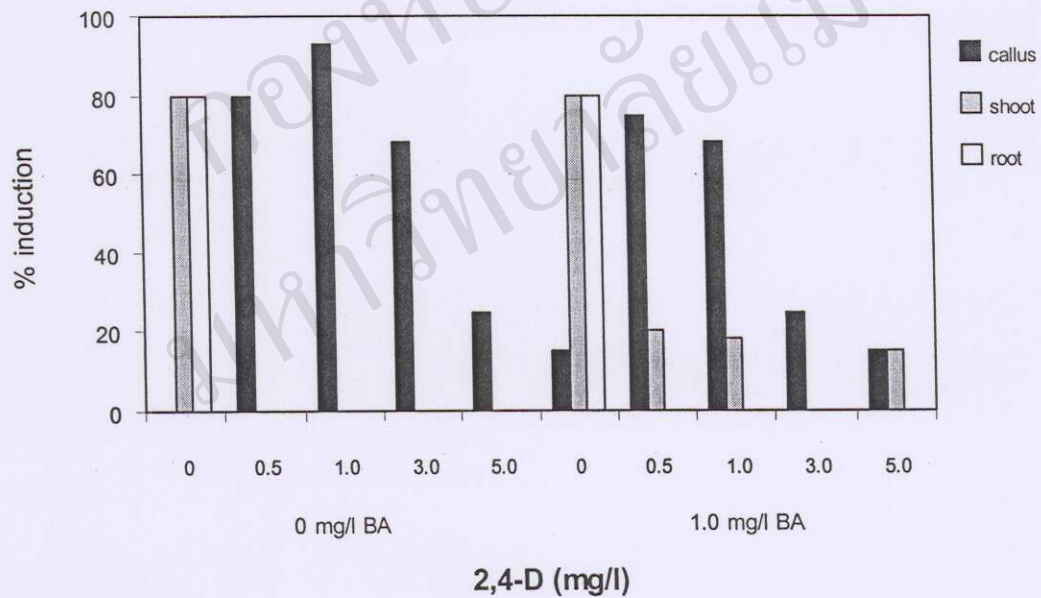
ชิ้นส่วนที่ได้รับ 2,4-D เพียงอย่างเดียว (0.5-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีการเกิดแคลลัสสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ 2,4-D ร่วมกับ BA เมื่อเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เท่ากัน และพบว่า ชิ้นส่วนที่ได้รับ 2,4-D 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดแคลลัส (80 และ 93% ตามลำดับ) สูงกว่าระดับความเข้มข้นอื่นๆ ทั้งในกลุ่มที่ได้รับ 2,4-D เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ BA แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ให้สูงขึ้นเป็น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับพบว่า มีการเกิดแคลลัสลดลงตามระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 14)

แคลลัสที่ชักนำได้จากการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียวมีลักษณะเกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ มีสีขาวครีมและฉ่ำน้ำ โดยแคลลัสที่ชักนำด้วย 2,4-D 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นจะเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองอ่อน มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D ให้สูงขึ้นเป็น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้น มีขนาดเล็ก ส่วนแคลลัสที่ชักนำได้จาก 2,4-D ร่วมกับ BA มีลักษณะเกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ มีสีขาวครีมและฉ่ำน้ำเช่นเดียวกัน และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้นเมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น และแคลลัสมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 12)

การเกิดยอดพบในชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่ไม่ได้รับทั้ง 2,4-D และ BA ได้รับ BA เพียงอย่างเดียว และได้รับ 2,4-D ร่วมกับ BA (ยกเว้น 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งเกิดยอดสูงในชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับทั้ง 2,4-D และ BA หรือได้รับ BA เพียงอย่างเดียว คือ 80% เท่ากัน (ภาพที่ 14) ส่วนการเกิดรากพบเฉพาะชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับทั้ง 2,4-D และ BA และกลุ่มที่ได้รับ BA เพียงอย่างเดียว โดยมีการเกิดรากสูงใกล้เคียงกัน คือ 80 และ 75% ตามลำดับ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 13 วันที่เริ่มเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มีด



ภาพที่ 14 เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส ยอด และรากของชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันอายุ 60 วัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มีดเป็นเวลา 60 วัน

2. การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแคลลัส

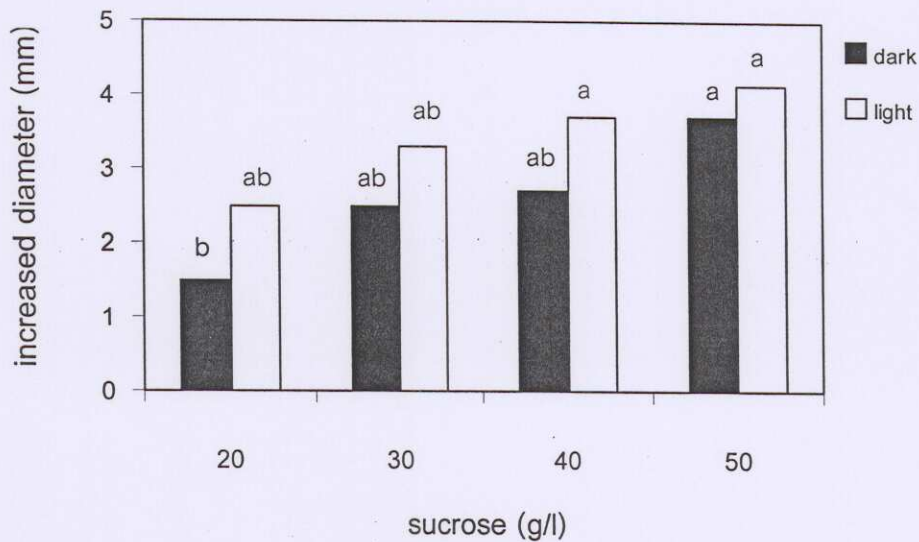
จากผลที่ได้ในการทดลองที่ 1.4 เลือกแคลลัสขมื่นชั้นที่ชักนำได้จากการใช้ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มาศึกษาการเพาะเลี้ยงต่อไป เนื่องจาก 2,4-D ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นระดับที่ต่ำที่สุดที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและแคลลัสมีการเจริญดี

ในการทดลองนี้ได้นำชิ้นส่วนแคลลัสอายุ 60 วัน ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกับที่ชักนำ แต่ผันแปรระดับความเข้มข้นของซูโครส (20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร) เลี้ยงในที่มืดและที่มีแสงเป็นเวลา 30 วัน ปรากฏผลดังนี้

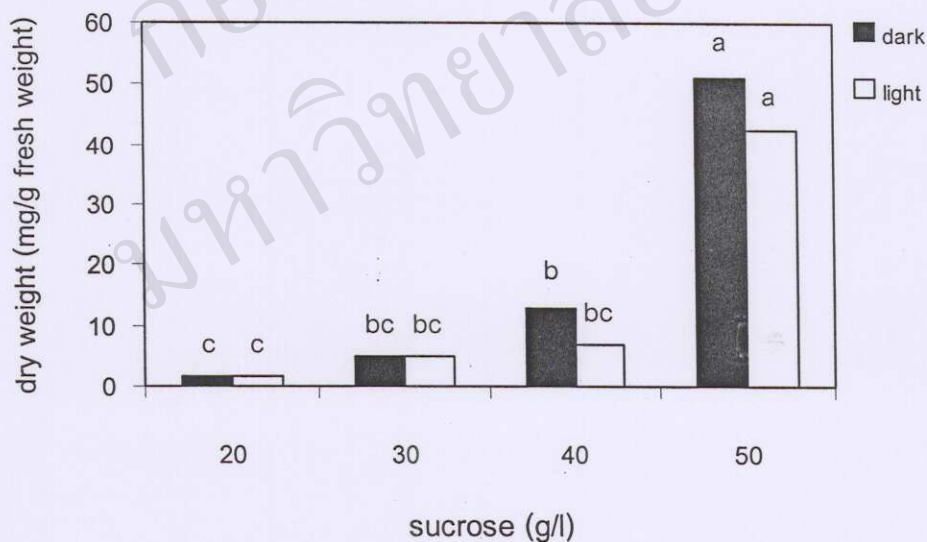
แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงในที่มืดในทุกระดับความเข้มข้นของซูโครสที่เท่ากัน และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของซูโครสที่สูงขึ้น โดยแคลลัสที่ได้รับซูโครสระดับความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นมากที่สุดทั้งที่เพาะเลี้ยงในที่มืดและที่มีแสง เท่ากับ 4.13 และ 3.70 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 15)

น้ำหนักแห้งของแคลลัสในที่เพาะเลี้ยงในที่มืดมีค่าสูงกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดในทุกระดับความเข้มข้นของซูโครสที่เท่ากัน และมีค่าสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของซูโครสที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะซูโครสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร น้ำหนักแห้งของแคลลัสมีค่าสูงที่สุดทั้งในที่มืดและที่มีแสง คือ 42.5 และ 51.1 กรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

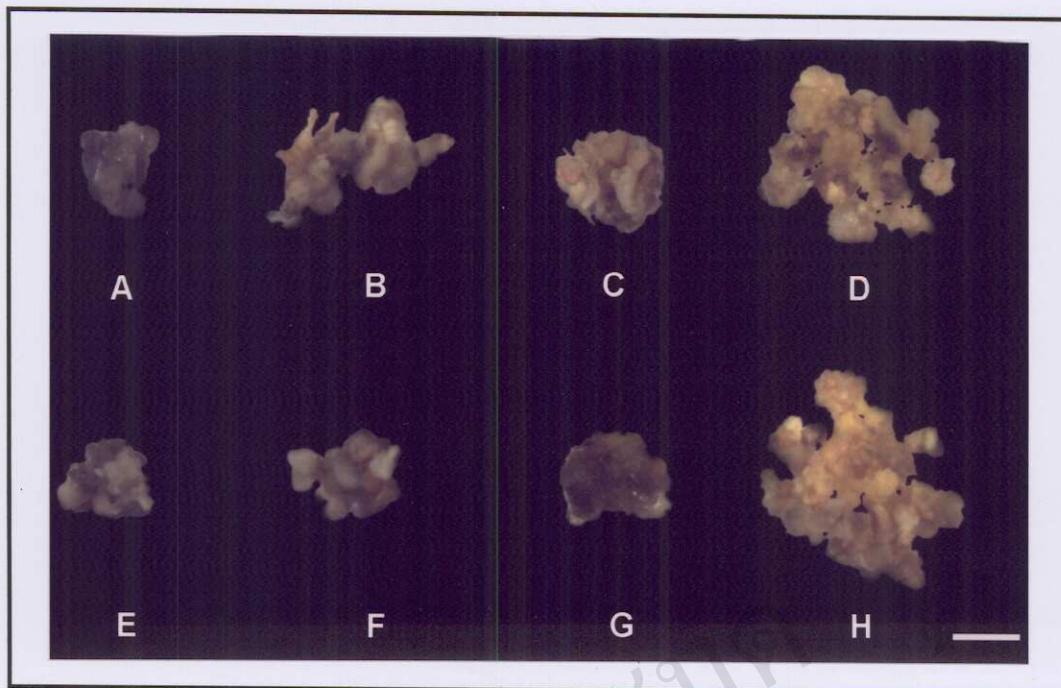
แคลลัสที่เกิดขึ้นใหม่ทั้งในที่มืดและที่มีแสงมีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ มีสีขาวครีม เกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ และฉ่ำน้ำ แต่เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น แคลลัสเริ่มมีสีเข้มขึ้นเป็นสีน้ำตาลตามระดับความเข้มข้นของซูโครสที่ลดลง แคลลัสที่ได้รับซูโครสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร มีสีเหลืองและมีความร่วนมากกว่ากลุ่มอื่นๆ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดฉ่ำน้ำมากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในที่มืด (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 15 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสมีนชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครสความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืดและมีแสงเป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 16 น้ำหนักแห้งของแคลลัสมีนชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครสความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืดและมีแสงเป็นเวลา 30 วัน



สภาพแสง	ชูโครส (กรัมต่อลิตร)			
	20	30	40	50
มีแสง	A	B	C	D
มืด	E	F	G	H

ภาพที่ 17 ลักษณะแคลลัสไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครสความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืดและมีแสงเป็นเวลา 30 วัน (bar = 5 มิลลิเมตร)

3. การเจริญเติบโตของแคลลัสและการผลิตสารกลุ่ม curcuminoids ในแคลลัส

3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต

จากการนำชิ้นส่วนแคลลัสไขมันชั้นอายุ 60 วัน ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร มาย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีชูโครส 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งผันแปรระดับความเข้มข้นของ 2,4-D (0, 0.25, 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร 5.8 และเก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด เป็นเวลา 30 วัน ปรากฏผลดังนี้

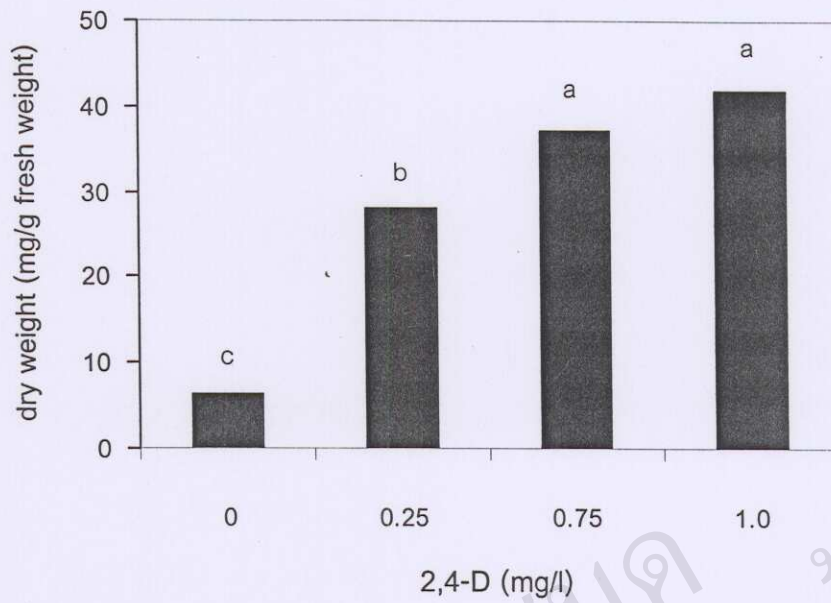
แคลลัสที่ได้รับ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ มีสีขาวขุ่น เกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ และฉ่ำน้ำ (ภาพที่ 18) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และสีน้ำตาลตามลำดับ

น้ำหนักแห้งแคลลัสมีแนวโน้มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่สูงขึ้น แคลลัสที่ได้รับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุด 41.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และแตกต่างจากแคลลัสที่ได้รับ 2,4-D 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีน้ำหนักแห้ง 37.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมา คือ แคลลัสที่ได้รับ 2,4-D 0.25 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีน้ำหนักแห้ง 28.0 และ 6.4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

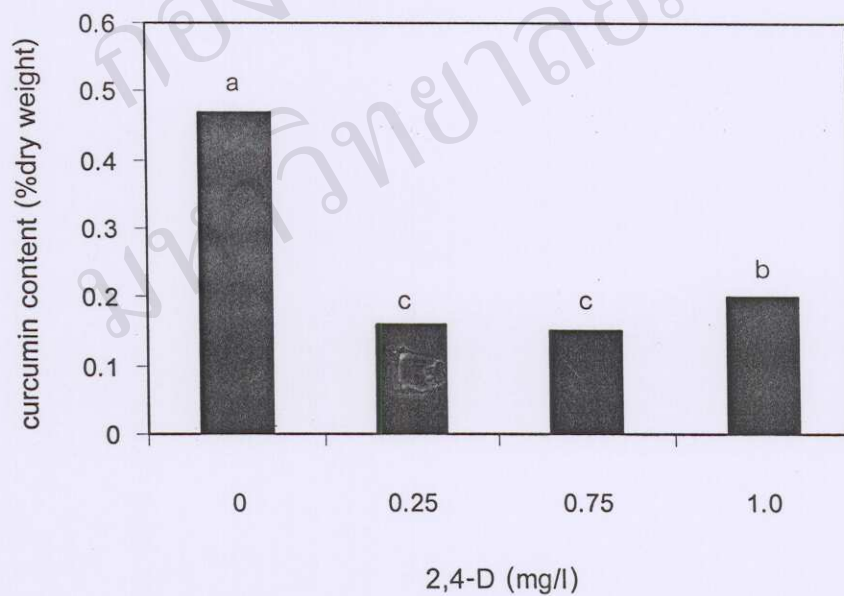
ในขณะที่ปริมาณสารกลุ่ม curcuminoids ของแคลลัสนั้น มีสารหลักที่พบมากที่สุด คือ curcumin ส่วนสารอีก 2 ชนิดในกลุ่มนี้ คือ demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin พบในปริมาณน้อยมากหรือไม่มี ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ โดยพบว่า แคลลัสที่ได้รับ 2,4-D 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไม่ได้รับ 2,4-D) มีปริมาณสาร curcumin มากที่สุด 0.47% น้ำหนักแห้ง รองลงมา คือ แคลลัสที่ได้รับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสาร curcumin 0.20% น้ำหนักแห้ง ส่วนแคลลัสที่ได้รับ 2,4-D 0.25 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสาร curcumin น้อยที่สุดใกล้เคียงกัน คือ 0.16 และ 0.15% น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 18 ลักษณะแคลลัสของขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี 2,4-D หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (bar = 5 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 19 น้ำหนักแห้งของเซลล์ไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 20 ปริมาณสาร curcumin ของเซลล์ไขมันชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

3.2 ผลของน้ำตาล

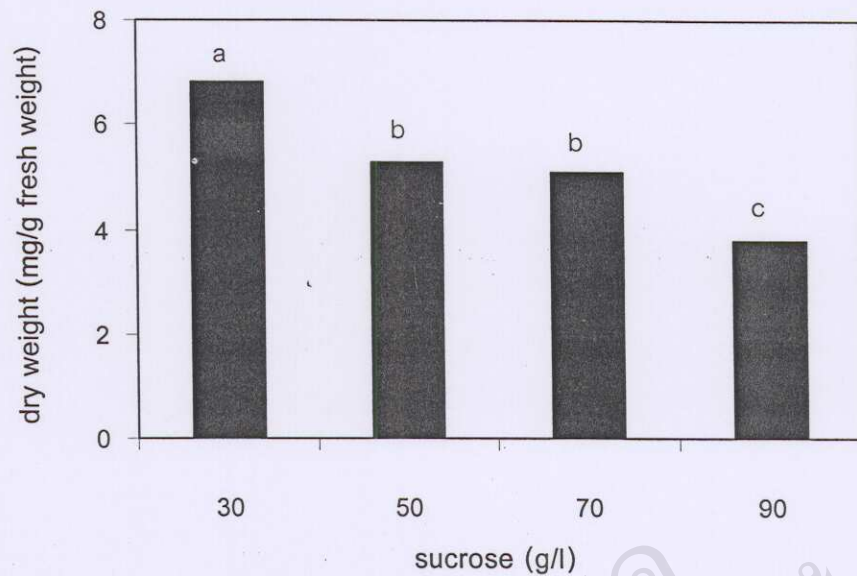
จากผลที่ได้ในการทดลองที่ 3.1 จึงตัดสินใจไม่เติม 2,4-D ลงในอาหารเพาะเลี้ยง (2,4-D 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือใช้อาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตนั่นเอง เนื่องจากการใช้ 2,4-D แม้จะทำให้แคลลัสมีน้ำหนักแห้งสูง แต่กลับพบปริมาณสารกลุ่ม curcuminoids ต่ำกว่าการไม่เติม 2,4-D

เมื่อนำชิ้นส่วนแคลลัสมีนัยอายุ 60 วัน ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร มาย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งผันแปรระดับความเข้มข้นของชูโครส (30, 50, 70 และ 90 กรัมต่อลิตร) ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร 5.8 และเก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด เป็นเวลา 30 วัน ปรากฏผลดังนี้

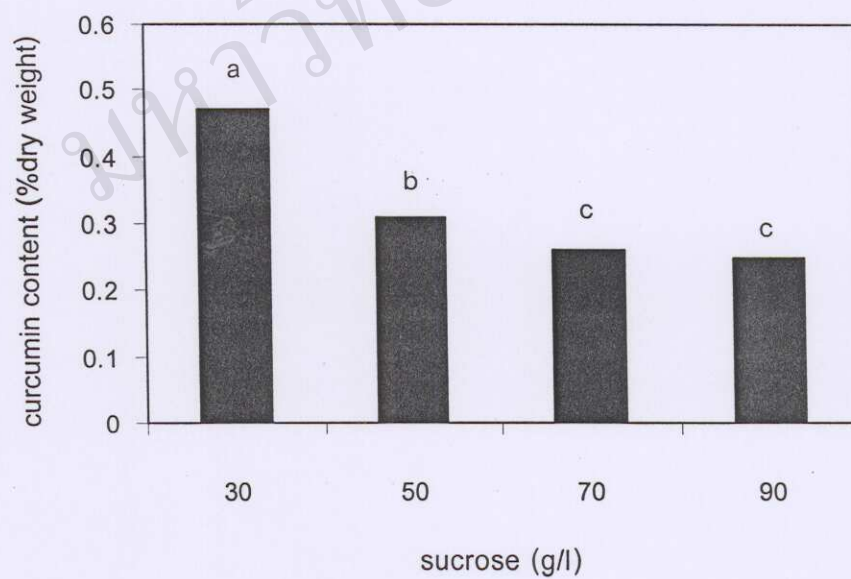
แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ มีสีขาวขุ่น เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ และฉ่ำน้ำ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนและสีน้ำตาลตามลำดับ

แคลลัสที่ได้รับชูโครสระดับความเข้มข้นสูงขึ้นมีแนวโน้มของน้ำหนักแห้งลดลง แคลลัสที่ได้รับชูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแห้งสูงสุด 6.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมา คือ แคลลัสที่ได้รับชูโครส 50, 70 และ 90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีน้ำหนักแห้ง 5.3, 5.1 และ 3.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ภาพที่ 21)

ส่วนปริมาณสารกลุ่ม curcuminoids ในแคลลัส พบว่า สารหลักที่พบมากที่สุด คือ curcumin ส่วนสารอีก 2 ชนิดในกลุ่มนี้ คือ demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin พบในปริมาณที่น้อยมากหรือไม่มี ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ ซึ่งผลของระดับความเข้มข้นชูโครสต่อปริมาณสาร curcumin มีแนวโน้มเป็นเช่นเดียวกับน้ำหนักแห้ง คือ ปริมาณสาร curcumin มีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของชูโครสเพิ่มขึ้น โดยแคลลัสที่ได้รับชูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีปริมาณสาร curcumin สูงที่สุด 0.47% น้ำหนักแห้ง รองลงมา คือ แคลลัสที่ได้รับชูโครส 50, 70 และ 90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีปริมาณสาร curcumin 0.31, 0.26 และ 0.25% น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 21 น้ำหนักแห้งของแคลลัสมีนชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีซูโครสระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 22 ปริมาณสาร curcumin ของแคลลัสมีนชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีซูโครสระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

3.3 ผลของความเป็นกรดเป็นด่าง

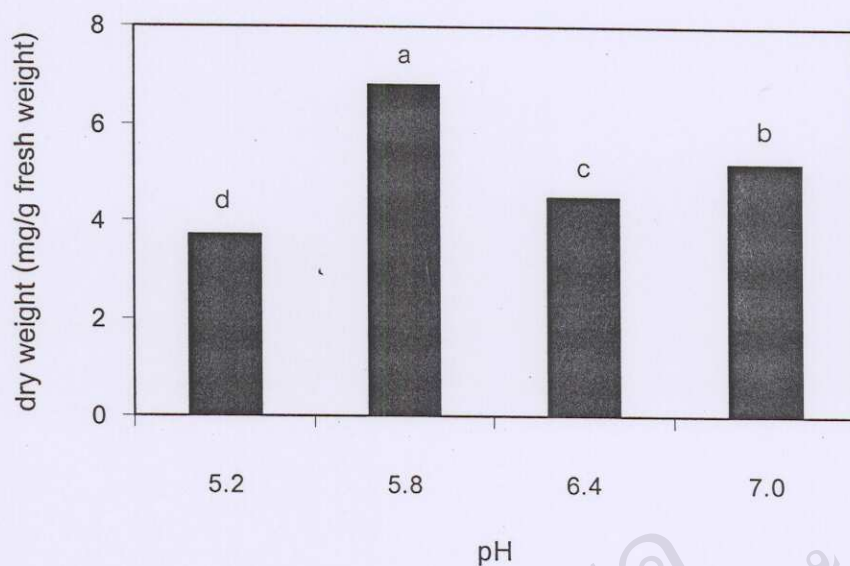
จากผลที่ได้ในการทดลองที่ 3.1 จึงตัดสินใจไม่เติม 2,4-D ลงในอาหารเพาะเลี้ยง (2,4-D 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือใช้อาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตนั่นเอง เนื่องจากการใช้ 2,4-D แม้จะทำให้แคลลัสมีน้ำหนักแห้งสูง แต่กลับพบปริมาณสารกลุ่ม curcuminoids ต่ำกว่าการไม่เติม 2,4-D

เมื่อนำชิ้นส่วนแคลลัสมีนัยอายุ 60 วัน ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชูโครส 30 กรัมต่อลิตร มาย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และมีชูโครส 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งผ่านแปรรูปความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร (5.2, 5.8, 6.4 และ 7.0) และเก็บเนื้อเยื่อไว้ในสภาพมืด เป็นเวลา 30 วัน ปรากฏผลดังนี้

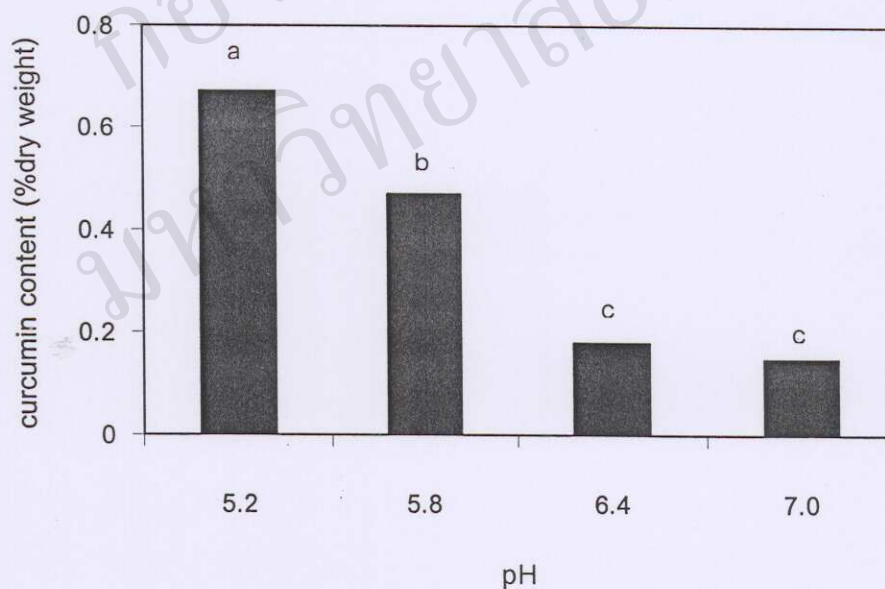
แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ มีสีเขียวช้ำ เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ และฉ่ำน้ำ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนและสีน้ำตาลตามลำดับ

แคลลัสที่เลี้ยงในระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8 มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด 6.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมา คือ แคลลัสที่เลี้ยงในระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0, 6.4 และ 5.2 ตามลำดับ มีน้ำหนักแห้ง 5.2, 4.5 และ 3.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ภาพที่ 23)

ส่วนปริมาณสารกลุ่ม curcuminoids พบว่า ในแคลลัสมีสารหลักที่พบมากที่สุด คือ curcumin ส่วนสารอีก 2 ชนิดในกลุ่มนี้ คือ demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin พบในปริมาณที่น้อยมากหรือไม่มี ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยปริมาณสาร curcumin มีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับความเป็นกรดเป็นด่างสูงขึ้น แคลลัสที่เลี้ยงในระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.2 มีปริมาณสาร curcumin สูงที่สุด 0.67% น้ำหนักแห้ง รองลงมา คือ แคลลัสที่เลี้ยงในระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8, 6.4 และ 7.0 ตามลำดับ มีปริมาณสาร curcumin 0.47, 0.18 และ 0.15% น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 23 น้ำหนักแห้งของแคลลัสมีนชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีระดับความเป็นกรดเป็นด่างต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 24 ปริมาณสาร curcumin ของแคลลัสมีนชั้นหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีระดับความเป็นกรดเป็นด่างต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

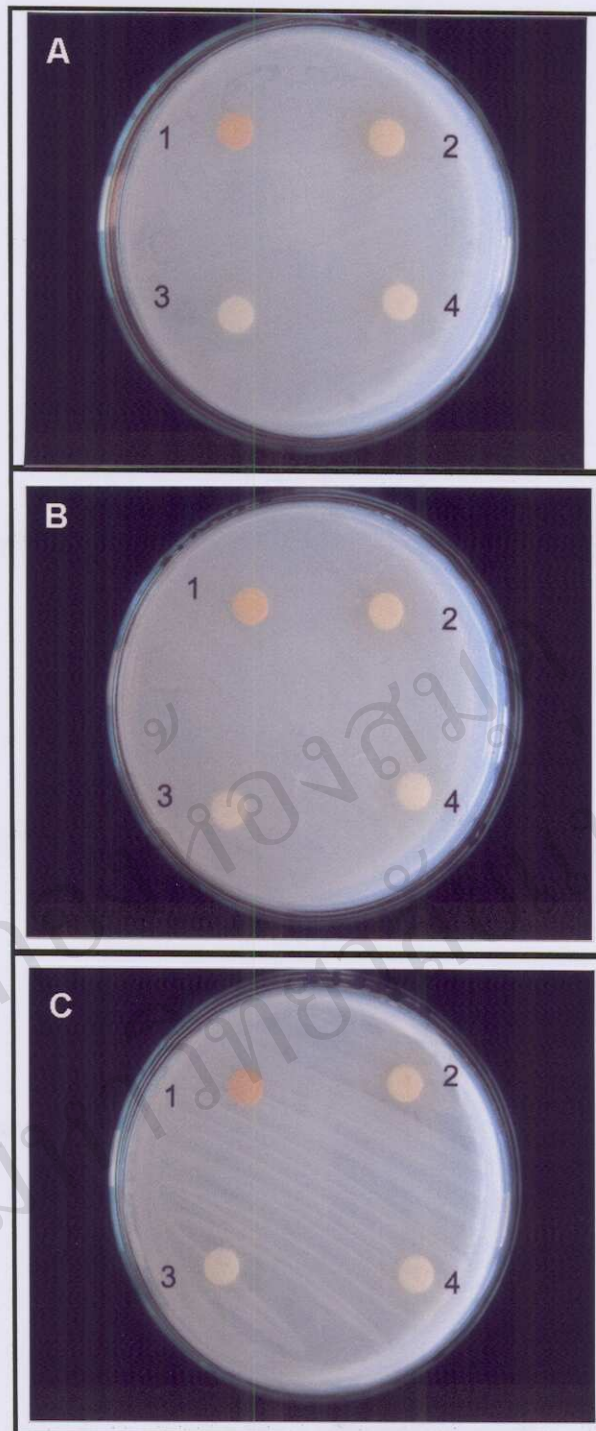
4. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

การนำสารสกัดหยาบของเนื้อเยื่อไขมันชั้นจาก 4 แหล่ง ได้แก่ แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเป็นกรดเป็นด่าง 5.2 และ 5.8 ซึ่งมีปริมาณสาร curcumin สูงจากการทดลองที่ 3.2 ไปของต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเหง้าธรรมชาติมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่าง ๆ ได้ผลดังนี้

ทุกสารสกัดไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 2 ชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* O157:H7 แต่ยับยั้งแบคทีเรียที่เหลือซึ่งเป็นแกรมบวกได้ โดยสารสกัดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.2 และ 5.8 สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *Bacillus subtilis* TISTR 008 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 029 ซึ่งมีความกว้างของบริเวณใสใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 9.10-9.30 มิลลิเมตร และ 8.20-8.60 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 25A และ 25B) สารสกัดจากเหง้าธรรมชาติยับยั้ง *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 029 และ TISTR 885 ได้ ซึ่งมีความกว้างของบริเวณใสอยู่ระหว่าง 9.20-9.8 มิลลิเมตร (ตารางที่ 2 และภาพที่ 25A, 25B และ 25C) ส่วนใบของต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่สามารถยับยั้งเชื้อทุกชนิดที่ทดสอบ

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเนื้อเยื่อไขมันชั้นแหล่งต่างๆ ทดสอบโดยวิธี paper disc diffusion

แบคทีเรีย	ความกว้างของบริเวณใส (มิลลิเมตร)			
	แคลลัสเลี้ยงที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.2	แคลลัสเลี้ยงที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8	ใบของต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	เหง้าธรรมชาติ
	5.2	5.8		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> TISTR 008	9.30	9.10	-	9.80
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 029	8.60	8.20	-	9.20
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 885	-	-	-	9.50



ภาพที่ 25 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 008 (A), *Staphylococcus aureus* TISTR 029 (B) และ TISTR 885 (C) ของสารสกัดหยาบจากขมิ้นชัน 4 แหล่ง ได้แก่ เหง้าธรรมชาติ (1) แคลลัสเลี้ยงที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.2 (2) และ 5.8 (3) และใบของต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (4)

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการนำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันมาชักนำให้เกิดแคลลัสในที่มืดและมีแสง พบว่า การเพาะเลี้ยงในที่มืดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและรวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในที่ที่มีแสง สอดคล้องตามที่มีรายงานไว้ว่าสามารถใช้ในที่มืดชักนำให้ขมิ้นชันเกิดแคลลัสได้ (Shetly *et al.*, 1982) อาจเป็นเพราะขมิ้นชันมีการตอบสนองต่อการเกิดแคลลัสในที่มืดได้ดีกว่าที่มีแสง และในการทดลองนี้เติม 2,4-D ความเข้มข้นสูง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งมีรายงานถึงระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่สูงนี้ อาจทำให้เนื้อเยื่อมีความไวต่อแสง จึงมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้น้อยลง (Yemoman and Davidson, 1971 อ้างโดย George, 1993)

ในการชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันที่มีอายุต่างๆ (30-90 เดือน) เกิดแคลลัส แม้ว่าเกิดแคลลัสได้ดีทั้งหมด แต่มีความแตกต่างด้านระยะเวลาการเกิดแคลลัส พบว่า การใช้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่มีอายุน้อย (30-60 วัน) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้รวดเร็วกว่าการใช้ชิ้นส่วนที่มีอายุมากกว่า (90 วัน) อาจเป็นได้ว่า เนื้อเยื่อที่ได้จากต้นที่มีอายุน้อยจะมีความอ่อนไหว และแข็งแรงมากกว่าเนื้อเยื่อจากต้นที่มีอายุมากกว่า โดยที่เซลล์ที่มีอายุน้อยกว่าย่อมมีเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต (meristematic tissues) จำนวนมากกว่า และมีปัญหาเกี่ยวกับการพัฒนาที่เหมาะสม การแก้ทางสรีรวิทยา ตลอดจนการพักตัวน้อยกว่าเนื้อเยื่อที่มีอายุมาก (รังสฤษดิ์, 2540) อย่างไรก็ตามสังเกตได้ว่า ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนที่มีอายุ 60 วัน เกิดแคลลัสที่เจริญได้ดีกว่าแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนอายุอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในแกลดิโอลัสพันธุ์ Peter Pears ที่พบว่า ชิ้นส่วน cormel ส่วนกลางที่มีอายุ 6 และ 9 สัปดาห์ สามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่า 12 สัปดาห์ (Remotti and Loffler, 1995)

สำหรับการนำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันมาตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 และ 4 ส่วน เพื่อศึกษาขนาดที่เหมาะสมของชิ้นส่วนตั้งต้น พบว่า มีการเกิดแคลลัสใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างทางสถิติ แต่ชิ้นส่วนที่ตัดแบ่งออกเป็น 2 ส่วน เกิดแคลลัสได้เร็วกว่าและแคลลัสเจริญได้ดีกว่าชิ้นส่วนที่ตัดแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ซึ่งเป็นไปได้ว่าการตัดแบ่งชิ้นส่วนออกเป็น 2 ส่วน ทำให้ได้ขนาดที่เหมาะสม แม้ในทางปฏิบัติจะนิยมตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดเล็กๆ เพื่อให้มีจำนวนชิ้นส่วนตั้งต้นมากขึ้นและเป็นการเพิ่มปริมาณผลผลิตให้ได้มากๆ แต่ควรพิจารณาถึงขนาดของเนื้อเยื่อที่เล็กที่สุดที่มีประสิทธิภาพ (minimum size) ด้วย เนื่องจากเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กเกินไปอาจโตช้า และไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเท่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ขึ้น หากเกิดสภาพเครียดจากการแยกหรือการผ่าตัดจะเกิดความเสียหายต่อเซลล์ที่อยู่ภายในชิ้นส่วนขนาดเล็กมากกว่าชิ้นส่วนขนาดใหญ่กว่า (รังสฤษดิ์, 2540)

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (2,4-D) และกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ต่อการชักนำให้ขึ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชันเกิดแคลลัส แสดงให้เห็นว่า การใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียวในความเข้มข้นที่ไม่สูงเกินไป (0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูง รวดเร็วและมีขนาดใหญ่กว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียวในความเข้มข้นสูงขึ้น (3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งมีรายงานพบว่า 2,4-D ระดับความเข้มข้นที่ไม่สูงเกินไป (0.1-1.0 ppm) สามารถชักนำให้ขึ้นส่วนตาจากเหง้าขมิ้นชันเกิดแคลลัสได้ดี (สุมนา และคณะ, 2542) การที่ 2,4-D ความเข้มข้นที่ไม่สูงเกินไปชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีอาจเนื่องมาจาก ความแตกต่างของความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ในชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ ในชิ้นส่วนพืชที่มีระดับออกซินสูงอยู่แล้ว เมื่อได้รับออกซินจากภายนอกมากเกินไป ระดับสมดุลอาจยับยั้งหรือทำลายเนื้อเยื่อได้ (Thimann, 1963) และในการสังเกตลักษณะแคลลัสที่ชักนำได้พบว่า การใช้ 2,4-D ความเข้มข้นไม่สูงเกินไป (0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) เกิดแคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อนเมื่อเลี้ยงในระยะเวลาสั้นขึ้น แต่ถ้าใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูง (3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำให้แคลลัสมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น ซึ่งได้มีรายงานในกระเจียวว่า แคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนกระเจียวด้วย 2,4-D ความเข้มข้นที่เหมาะสมและไม่สูงเกินไป (0.063-0.250 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีสีเหลืองอ่อน แต่หากใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่านี้จะมีผลให้เนื้อเยื่อบางส่วนของแคลลัสเป็นสีน้ำตาล (กอบเกียรติ, 2541)

ชุดโครสความเข้มข้นต่างๆ (20-50 กรัมต่อลิตร) และสภาพแสง (ที่มีมืดและมีแสง) มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแคลลัสขมิ้นชันที่ชักนำได้จากการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงขนาดแคลลัส การเพาะเลี้ยงในที่มืดทำให้แคลลัสมีเส้นผ่าศูนย์กลางที่เพิ่มขึ้นมากกว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืด และมีแนวโน้มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของชุดโครสสูงขึ้น ซึ่งแคลลัสที่ได้รับชุดโครสความเข้มข้นสูงที่สุด (50 กรัมต่อลิตร) มีเส้นผ่าศูนย์กลางที่เพิ่มขึ้นมากที่สุด โดยเฉพาะในที่มืด ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานใน *Rhodiola sachalinensis* ที่พบว่า การใช้ชุดโครสความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้แคลลัสมีขนาดเล็กลง (Xu et al., 1999) อย่างไรก็ตามการวัดขนาดไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าภายในเซลล์มีการเจริญเติบโต สังเคราะห์สารประกอบและออร์แกเนลล์มากนักน้อยเพียงใด จึงควรพิจารณาน้ำหนักแห้งของแคลลัสด้วย เนื่องจากการสะสมชีวมวลและสารทุติยภูมิ รวมทั้งการดูดซึมสารจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ (Jame and Arthur, 1952) ผลปรากฏว่า การเพาะเลี้ยงในที่มืดกลับทำให้แคลลัสมีน้ำหนักแห้งมากกว่าเพาะเลี้ยงในที่มืด โดยแคลลัสที่ได้รับชุดโครสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงในที่มืดมีน้ำหนักแห้งมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานในแคลลัสแคโรทที่มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของชุดโครสมาก

ขึ้น แต่หากเพิ่มความเข้มข้นเกินกว่าระดับที่เหมาะสมมีผลทำให้น้ำหนักแห้งน้อยลง (Narayan and Venkataraman, 2002)

ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และซูโครส และระดับความเป็นกรดเป็นด่างในอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสซึ่งแสดงจากน้ำหนักแห้ง กล่าวคือ ในกรณีของ 2,4-D พบว่า เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นที่สูงขึ้นมีผลทำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ซึ่งระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่สูงที่สุดในการทดลอง คือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้แคลลัสมีน้ำหนักแห้งสูงสุด ส่วนการไม่รับ 2,4-D (2,4-D 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลทำให้แคลลัสมีน้ำหนักแห้งน้อยกว่าแคลลัสที่ได้รับ 2,4-D สอดคล้องกับรายงานของ Catapan *et al.* (1999) ที่กล่าวว่า การใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้น้ำหนักของแคลลัส *Marrubium vulgare* และ *Polygala cyparissias* เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามควรศึกษาระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีเพิ่มเติม เนื่องจากหากใช้ในระดับความเข้มข้นสูงเกินไปอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ ส่วนผลของซูโครสที่มีต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส พบว่า ซูโครสที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลทำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งเห็นได้จากการที่แคลลัสมีน้ำหนักแห้งมากที่สุดเมื่อได้รับซูโครสในระดับต่ำที่สุดในการทดลอง คือ 30 กรัมต่อลิตร ในขณะที่หากได้รับซูโครสในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น (50, 70 และ 90 กรัมต่อลิตร) พบว่า แคลลัสมีแนวโน้มของน้ำหนักแห้งน้อยลงตามลำดับ สอดคล้องกับวันทนา (2544) รายงานว่า ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสเจตมูลเพลิงแดงเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นซูโครสสูงขึ้นจะมีผลทำให้น้ำหนักแคลลัสลดลง นอกจากนี้ Kang *et al.* (2003) พบว่า ระดับความเข้มข้นของซูโครสที่สูงขึ้นจะทำให้ค่าแรงดันออสโมติกต่ำลง ซึ่งมีผลทำให้อับละอองเรณูของข้าวสาลีเกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสลดลง และในกรณีผลของระดับความเป็นกรดเป็นด่างในอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส พบว่า ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8 ซึ่งเป็นระดับที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไป ส่งผลให้น้ำหนักแห้งมีค่าสูงที่สุด ส่วนการใช้ความเป็นกรดเป็นด่างที่ระดับต่ำ (5.2) หรือสูงกว่านี้ (6.4 และ 7.0) ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตน้อยลง อาจเป็นไปได้ว่าระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8 อยู่ในช่วงที่มีความเหมาะสมดังที่ Murashige and Skoog (1962) กล่าวว่า ช่วงของระดับความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 5.7-5.8 เป็นระดับที่พืชสามารถนำธาตุอาหารและสารประกอบอินทรีย์ไปใช้ได้ดีที่สุด เนื่องจากยังอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ทำให้พืชดูดซึมได้ดี ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช

นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และซูโครส และระดับความเป็นกรดเป็นด่างในอาหารยังมีผลต่อการผลิตสารกลุ่ม curcuminoids ที่พบมากที่สุดในการทดลองนี้ คือ curcumin โดยผลของ 2,4-D ต่อปริมาณสาร curcumin ในแคลลัสไม่ได้มีแนวโน้มเช่นเดียวกับที่มีผลต่อ

น้ำหนักแห้ง ซึ่งพบว่า การไม่ได้รับ 2,4-D (2,4-D 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลดีทำให้แคลลัสมีปริมาณสาร curcumin สูงที่สุด และมากกว่าการได้รับ 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ สอดคล้องกับที่ Houghton (1998) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารที่มี 2,4-D จะส่งผลให้กระบวนการผลิตสารทุติยภูมิลดลง ส่วนผลของชูโครส พบว่า ชูโครสระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดในการทดลอง คือ 30 กรัมต่อลิตร นอกจากส่งผลให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดตั้งข้างต้นแล้ว ยังมีผลทำให้แคลลัสมีปริมาณสาร curcumin สูงที่สุดด้วย แต่ถ้าวระดับความเข้มข้นของชูโครสสูงกว่านี้ (50, 70 และ 90 กรัมต่อลิตร) กลับมีผลทำให้ปริมาณสาร curcumin ลดลงตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Paska *et al.* (1999) ที่ว่า แคลลัสของ *Ipomoea cairica* มีการสร้างสารทุติยภูมิสูงขึ้น หากได้รับชูโครสระดับความเข้มข้นต่ำระหว่าง 20-40 กรัมต่อลิตร และในกรณีผลของระดับความเป็นกรดเป็นด่างในอาหาร พบว่า ระดับความเป็นกรดเป็นด่างที่ต่ำที่สุดในการทดลอง คือ 5.2 แม้ว่าจะมีการเจริญเติบโตของแคลลัสน้อยที่สุด แต่ปรากฏว่ามีปริมาณสาร curcumin สูงที่สุด ซึ่งเมื่ออาหารมีระดับความเป็นกรดเป็นด่างสูงกว่านี้ (5.8, 6.4 และ 7.0) กลับส่งผลให้มีปริมาณสาร curcumin ลดลงตามลำดับ โดยอาจเป็นไปตามที่ Martin and Rose (1976) กล่าวว่า ระดับความเป็นกรดต่างที่สูงขึ้นมีผลทำให้การนำออกซิเจนมาใช้ได้น้อยลง เป็นผลให้การเจริญเติบโตและการผลิตสารทุติยภูมิของเนื้อเยื่อพืชลดลง นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังมีข้อสังเกตว่า แคลลัสจะมีการสร้างสาร curcumin สูงหากมีการเจริญเติบโตน้อย ซึ่งอาจเป็นไปตามที่ Bhadra and Shanks (1997) กล่าวไว้ว่า การสังเคราะห์สารทุติยภูมิบางชนิดไม่ได้สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งจะสร้างสารทุติยภูมิในปริมาณที่สูงหากเซลล์อยู่ในระยะที่มีการเจริญเติบโตลดลงหรือในระยะ stationary phase อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มีการศึกษาปริมาณสาร curcumin ในแคลลัสมันชัน ซึ่งปริมาณสาร curcumin ที่สูงที่สุดที่วิเคราะห์ได้ในแคลลัส คือ 0.67% น้ำหนักแห้ง นั้นยังมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารที่พบในเหง้ามันชันที่ปลูกตามธรรมชาติ อายุ 6 เดือน (ปวีณา, ข้อมูลส่วนตัว) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่อาจส่งเสริมการสร้างสารกลุ่ม curcuminoids ในแคลลัสให้สูงขึ้นต่อไป

ในงานวิจัยนี้ยังเป็นครั้งแรกที่มีการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากแคลลัสมันชันต่อฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โดยเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากแหล่งเนื้อเยื่ออื่นๆ คือ ใบของต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเหง้ามันชันธรรมชาติ และเลือกใช้แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.2 และ 5.8 ซึ่งมีปริมาณสาร curcumin สูง ผลปรากฏว่า สารสกัดหยาบทั้งหมดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* O157:H7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่สามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก โดยสารสกัดจากแคลลัสยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ทุกชนิด ยกเว้น

Staphylococcus aureus TISTR 885 ส่วนสารสกัดจากเหง้าขมิ้นในธรรมชาติยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ทุกชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 029 และ TISTR 885 สอดคล้องกับรายงานของ Yusuf *et al.* (2001) ที่พบว่า สารสกัดจากขมิ้นชั้นธรรมชาติไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25222 และ ATCC 35213 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC 24213 และ ATCC 29213, *Micrococcus luteus* และ *Enterococci faecalis* อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเป็นผลของสารออกฤทธิ์ใด และมีข้อสังเกตอื่นๆ คือ สารสกัดหยาบยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียค่อนข้างต่ำ โดยดูจากความกว้างของบริเวณใส (inhibition zone) ซึ่งสารสกัดจากเหง้ามีฤทธิ์ยับยั้งดีกว่าสารสกัดจากแคลลัสเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบดังกล่าวได้มาจากพืชและมีความเข้มข้นของปริมาณสารออกฤทธิ์ต่ำ ดังนั้นเพื่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่ดีขึ้น อาจเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณสารสกัดที่นำมาทดสอบให้มากขึ้น ปรับปรุงวิธีการสกัดสาร และวิธีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในการศึกษาครั้งต่อไป

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาวิธีการชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนขมิ้นชั้นเกิดแคลลัส โดยผันแปรสภาพแสง อายุของชิ้นส่วนตั้งต้น ลักษณะการตัดแบ่งชิ้นส่วน และสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า วิธีการชักนำเกิดแคลลัสที่เหมาะสม คือ ใช้ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนอายุ 60 วัน ตัดแบ่งตามยาวออกเป็น 2 ส่วน เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสรวดเร็ว ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง และแคลลัสที่ได้เจริญเติบโตดี

2. การเพาะเลี้ยงแคลลัสขมิ้นชั้นด้วยการผันแปรความเข้มข้นของซูโครสและสภาพแสง พบว่า ซูโครสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงในที่มืด ทำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเท่ากับ 0.0511 กรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และมีสีเหลืองอ่อนและมีความร่วนมากกว่าแคลลัสกลุ่มอื่นๆ

3. การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ แยกกัน ได้แก่ 2,4-D ซูโครส และระดับความเป็นกรดเป็นด่างในอาหารต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารกลุ่ม curcuminoids ของแคลลัสขมิ้นชั้น ในด้านการเจริญเติบโต พบว่า แคลลัสที่ได้รับ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงในระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีน้ำหนักแห้งสูงที่สุด 41.9, 6.8 และ 6.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ส่วนด้านการผลิตสารกลุ่ม curcuminoids

พบสารหลัก คือ curcumin ซึ่งแคลลัสที่ไม่ได้รับ 2,4-D (2,4-D 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้รับชูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงที่ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 5.8 มีปริมาณสาร curcumin สูงที่สุด 0.47, 0.47 และ 0.67% น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

4. การนำสารสกัดหยาบจากแคลลัสมีนชั้นมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากเหง้าในธรรมชาติและใบของต้นพะเอียงเนื้อเยื่อ พบว่า สารสกัดหยาบทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ทั้งหมด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* O157:H7 แต่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ ยกเว้นสารสกัดจากใบ โดยสารสกัดจากแคลลัสสามารถยับยั้งได้เฉพาะ *Bacillus subtilis* TISTR 008 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 029 สารสกัดจากเหง้าธรรมชาติสามารถยับยั้งได้ทั้งหมด คือ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 029 และ TISTR 88

เอกสารอ้างอิง

- กอบเกียรติ แสงนิล. 2541. การเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อ. รายงานการวิจัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 214 น.
- โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง กรมป่าไม้. 2541. ก้าวไปกับสมุนไพร. ม.ป.ท. 207 น.
- ณรงค์ศักดิ์ ใบเนียม. 2528. ผลจากโปแตสเซียมและฟอสฟอรัสต่อองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคและปริมาณของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นชัน และต่อปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ทั้งหมดและอัตราส่วนขององค์ประกอบในเหง้าขมิ้นชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 102 น.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 158 น.
- ผอง พวงสุวรรณ. 2543. สมุนไพรรักษาไข้. สำนักพิมพ์ภูมิไทย, กรุงเทพฯ. 175 น.
- พรทิพย์ ไวกูตติ. 2544. ผลของเคอร์คูมินต่อที-ไกลโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยยาวิโนบลาสติน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 60 น.
- รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. พืชเครื่องเทศและสมุนไพร. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 200 น.

- รังษฤษดิ์ กาวีตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. ฝ่ายโรงพิมพ์ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 น.
- วันทนา บุตรสาลี. 2544. การเพาะเลี้ยงเซลล์ของเจตมูลเพลิงแดง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. 20 น.
- สุนนา นิระ อพัชชดา เศรษฐศิริ ปรีชา นิระ และ รวมชาติ แต่พงษ์โสรัถ. 2542. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อขม้นชั้น. แก่นเกษตร 27(1): 25-29.
- อารีย์ วรรณวัฒน์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อดิสรณ์, กรุงเทพฯ. 133 น.
- เอื้อพร ไชยวรรณ. 2531. ตำราเภสัชเวท การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพร เล่ม 1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 115 น.
- Apisariyakul, A., N. Vanittanakom, and D. Buddhasukh. 1995. Antifungal activity of turmeric oil extract from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). J. Ethnopharmacol. 49(3): 163-169.
- Babu, K.N., K. Samsudeen and M.J. Ratnambal. 1992. *In vitro* plant regeneration from leaf-derived callus in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 29: 71-74.
- Bhavanishankar, T. N. and V. S. Murthy. 1985. Inhibitory effect of curcumin on intestinal gas formation by *Clostridium perfringens*. Nutr. Rep. Int. 32: 1285-1295.
- Bhadra, R., J. A. Morgan and J. V. Shanks. 1997. Transient studies of nutrient uptake, growth, and indole alkaloid accumulation in heterotrophic cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*: growth and. Biotechnol. Bioeng. 55: 527-534.
- Catapan, E., E. Nunes, J.J. Zanco and A.M. Viana. 1999. *In vitro* culture and callus culture induction of *Marrubium vulgare* and *Polygala cypparissias*. XVI International Botanical Congress. (abstract 5681)
- Choi, S.K. 1993. Studies on the clonal multiplication of ginger through the *in vitro* cuttings. Hort. Abstr. 63(7): 5388.
- Dorothy, G. 1972. Method in Clinical Bacteriology. New York: Charles G. Tomas Pubisher. 126 p.
- George I.E. 1993. Plant propagation by tissue culture: Part 1. 2nd edition. Butler and Tann, Great Britain. 574 p.

- Henschen A, K. Hupe, F. Lottspeich and W. Voelter. 1985. High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry. VCH, Weinheim. 638 p.
- Houghton, P.J. and Raman. 1998. Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. Chapman & Hall, London. 199 p.
- Ilahi I. and M. Jabeen. 1987. Micropropagation of *Zingiber officinale* Rosc. Hort. Abstr. 19(1): 61-65.
- Ishida, M. and T. Adachi. 1988. Plant regeneration from ginger callus and observation of the morphological changes. Jan. J. Breed. 38(Suppl. 2): 78-79.
- James, B. and W.G. Arthur. 1952. Principle of Plant Physiology. 499 p.
- Kang, T. J., M. S. Yang and E. L. Deckard. 2003. The effect of osmotic potential on anther culture in spring wheat *Triticum aestivum*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 75(1): 35-40.
- Malamug, J.I., F.H. Inden and T. Asanira. 1991. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. Hort. Sci. 48: 89-97.
- Martin, S. M. and D. Rose. 1976. Growth of plant cells (*Ipomoea*) suspension cultures at controlled pH levels. Can. J. of Bot. 54: 1264-1270.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- Narayan, M.S. and L.V. Venkataraman. 2002. Effect of sugar and nitrogen on the production of anthocyanin in cultured carrot (*Daucus carota*) cells. J. of Food Sci. 67(1): 84-86.
- Neeta, D.S., G. Leela and E. Susan. 2000. Direct regeneration of shoots from immature inflorescence cultures of turmeric. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 62: 235-238.
- Paska, C., G. Innocenti, M. Kunvari, M. Laszlo and L. Szilagyi. 1999. Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. Phytochemistry 52(5): 879-883.
- Remotti, P.C. and H.J.M. Loffler. 1995. Callus induction and plant regeneration from gladiolus. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 42: 171-178.
- Shetly, M.S., P. Haridasan and R.D. Iyer. 1982. Tissue studies in turmeric. Hort. Sci. 52(12): 796.

- Sunitibala, H., M. Damayanti and G.J. Sharma. 2001. *In vitro* propagation and rhizome formation in *Curcuma longa* Linn. Cytobios 105(409): 71-82.
- Thimann, K.V. 1963. Plant growth substances: past, present and future. Plant Physiol. 14: 1-8.
- Yasuda, K., T. Tsuda, H. Shimizu and A. Suggaya. 1988. Multiplication of *Curcuma* species by tissue culture. Planta Med. 54: 75-79.
- Yusuf, N. A., H. Ibrahim and N. Khalid. 2001. Antibacterial evaluation and tissue culture studies of selected medicinal *Curcuma* species. In Proc. NSF Workshop, Kuala Lumpur.
- Xu, J.F., P.Q. Ying, A.M. Han and Z.G. Su. 1999. Enhanced solidoside production in liquid-cultivated compact callus aggregated of *Rhodiola sachalinensis*: manipulation of plant growth regulators and sucrose. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 55: 53-58.
- www.geocities.com/yongyang_98/doctors2/herb_curcuma0.1.html
- www.curcuminoids.com