ผลของสารสกัดจากแคลลัสกานพลูต่อการสงบนิ่งปลาดุกอุยเทศ

Effects of Crude Extract from Cloves Callus on Sedation of Hybrid Catfish

นพรัตน์ พุทธกาล,[1] สุพรรณ โพธิ์ศรี[1], เสาวณีย์ บัวโทน[2] ,กัลยา โมกขพันธุ์[3]

Nopparat Buddhakala[1], Suphan Posri[1], Saowanee Buatone[2], Kanlaya Mokephun[3]

Received: 5 January 2018; Accepted: 21 May 2018

บทคัดย่อ

กานพลูมีสารยูจีนอลที่ใช้เป็นยาชา และยาสลบ แต่การขยายพันธุ์กานพลูทำได้ยาก วัตถุประสงค์การวิจัยครั้งนี้จึง (1) ศึกษาอัตราการเกิดแคลลัสกานพลูบนอาหาร WPM จำนวน 21 สูตร (2) ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแคลลัสกานพลูต่อการสงบนิ่งของปลาดุกอุยเทศ ทำการทดลองเพาะเลี้ยงส่วนใบ ตายอด และตาข้างกานพลูบนอาหาร WPM 7 สัปดาห์ จึงนำชิ้นส่วนที่มีอัตราการรอดสูงสุดมากระตุ้นให้เกิดแคลลัสบนอาหาร 21 สูตร เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ จากนั้นนำแคลลัสกานพลูที่เจริญดีมาสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5 ppm และ MS-222 10 ppm (5 ซ้ำ) เพื่อศึกษาฤทธิ์สงบนิ่งและการฟื้นของปลาดุกอุยเทศ ผลการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนใบกานพลูมีอัตราการรอดสูงที่สุด 28 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตรที่ 17 ที่เติม TDZ 0.05 ppm และ 2,4-D 0.5-3.0 ppm กระตุ้นแคลลัสใบกาพลูได้ดีที่สุดขนาด 0.5 เซนติเมตร หนัก 0.5 กรัม และสารสกัดแคลลัสใบกานพลูที่ความเข้มข้น 5 ppm ทำให้ปลาดุกอุยเทศมีการเคลื่อนไหวช้าที่ 99.03±2.07 นาที อาการสงบนิ่ง 1.45±0.87 นาที จึงฟื้นสู่การตอบสนอง 2.12±0.34 และว่ายน้ำปกติ 2.52±0.12 นาที ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดแคลลัสใบกานพลูมีฤทธิ์ต่อการสงบนิ่งของปลาดุกอุยเทศ และมีความปลอดภัยต่อปลามากกว่าสาร MS-222 เนื่องจากปลามีระยะเวลาในการฟื้นตัวรวดเร็ว และมีอาการปกติ

คำสำคัญ : การสงบนิ่ง ปลาดุกอุยเทศ การเพาะเลี้ยงแคลลัส กานพลู

Abstract

Clove contains a high concentration of eugenol, which has been used extensively for sedation and its anesthetic properties. But it is difficult to cultivate clove plants. The aims of this research were to:- (1) study the callus growth rate on WPM with 21 different growth regulators (2) to test the sedative activities of clove callus extract on sedation of hybrid catfish (10-15 cm, 10-15 g). The methodologies of leaf, axillary bud, and lateral bud cultures on WPM were studied for 7 weeks. Then the highest survival rate was to induce new callus in 21 WPMs for 6 weeks. The best growth callus was extracted with 95% ethanol at the dose of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 ppm compared with MS-222 (5 Rep.) at 10 ppm for sedation and recovery of hybrid catfish. The results found that clove calluses grow up 0.5 cm, weight gain of 0.5 grams per callus. At 5 ppm the extract of clove callus stimulated catfish caught to show slow motion at 99.03 ± 2.07 min, sedative response at 1.45±0.87 min and recovered to slow motion at 2.12±0.34 and then recovered to normal fish at 2.52±0.12 min. The results of this study showed that cloves callus was safer on hybrid catfish than MS-222 because of its rapid recovery time to normal fish.

Keywords: Sedation, Hybrid catfish, Callus culture, Clove

---

[1] ผู้ช่วยศาตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.ธัญบุรี ตำบลคลองหก อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110

[2] ครู คศ.2 ศูนย์วิทยาศาสตร์เพื่อการศึกษารังสิต ตำบลรังสิต ถนนรังสิต-นครนายก อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110

[3] นักวิจัย ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ วว. ตำบลคลองห้า อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 10120

[1] Asst.prof.Biology Division, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology, Thanyaburi, Pathumthani, 12110

[2] Lecturer, Rangsit Science Center, Rangsit Nakornnayok Rd. Thanyaburi, Pathumthani, 12110

[3] Researcher, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, 35 Mu 3, Khlong Ha, Khlong Luang, Pathimthani, 12120

** Correspondence to: Nopparat Buddhakala, Biology Division, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology, Thanyaburi, Pathumthani, 12110, Thailand, E-mail:nopparat_b@rmutt.ac.th*

บทนำ

ปลาดุกอุยเทศ (Hybrid catfish; *Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) เป็นปลาลูกผสมระหว่าง ปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus* Burchell) และปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่ได้รับความนิยมรับประทานของคนไทย โดยใช้ประกอบอาหาร ปิ้งย่าง ลาบ และผัดเผ็ดปลาดุก เป็นต้น และยังเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับสองของประเทศไทยรองจากปลานิล เนื่องจากปลาดุกเป็นปลาที่มีคุณค่าทางโปรตีนสูงโดยให้โปรตีน 23 กรัม ต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม แต่การเลี้ยงปลาดุกอุยเทศก็พบปัญหาในเรื่องการอนุบาลและการขนส่ง เพราะในระหว่างการขนส่งปลาดุกมักจะเกิดความเครียดจากเสียดสีกัน จึงทำให้ปลาอ่อนแอ และเป็นแผลติดเชื้อได้ง่าย เกษตรกรจึงใช้สารเคมี เช่น MS-222 ในการทำสลบปลาและป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในปลาเพราะออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว แต่ต้องพักปลาก่อนนำไปบริโภคนานถึง 21 วัน จึงจะปลอดภัย[1] เพื่อลดปัญหาสารพิษตกค้างก่อนจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภค จึงมีการนำสมุนไพรมาใช้ในการทำสลบและฟื้นปลามากขึ้น

กานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่จัดอยู่ในวงศ์ชมพู่ ต้นกานพลูเป็นไม้ยืนต้นและเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีความนิยมใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ปวดฟัน นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณทางยาอีกมากมาย มีรายงานว่ากานพลูขนาด 750 มิลลิกรรมต่อน้ำหนักตัวหนูแรทหนึ่งกิโลกรัมออกฤทธิ์ทำให้หนูแรทหลับได้นานที่สุด 146.2±7.66 นาทีซึ่งถือว่าเป็นฤทธิ์ผ่อนคลายต่อสัตว์ทดลอง[2] จึงนิยมนำมาใช้เป็นเครื่องเทศและผสมในตำรับยาไทย เนื่องจากกานพลูมีสารสำคัญคือ ยูจีนอล(eugenol) พบได้ในส่วนของดอกตูม ผล ต้น เปลือก และจากรายงานของ สุริยเมธินทร์ วงศ์เผ่าสกุล และคณะฯ (2560)[3] พบสารยูจีนอลในดอกแห้ง (62.53%) และใบกานพลู (79.62%) นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำมันหอมระเหยในบัญชียาสมุนไพรตามประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา (ฉบับที่ 5) นอกจากนี้มีงานวิจัยหลายแห่งที่ใช้น้ำมันจากดอกกานพลูมียูจีนอลสูงถึง 82.3-91.4%[4] และนำมาใช้เป็นยาระงับความรู้สึกสัตว์น้ำ[5] แทนสารเคมีในท้องตลาดเพื่อลดปริมาณสารพิษตกค้างในสัตว์น้ำก่อนจำหน่ายแก่ผู้บริโภค โดยใช้น้ำมันกานพลูเพื่อพักและอนุบาลสัตว์น้ำขณะทำการขนส่งไปยังฟาร์ม และแหล่งเพาะพันธุ์[6] ทั้งนี้มีรายงานว่าปลาที่ได้รับยาสลบ MS-222 กับน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นเท่ากันปลาสามารถกินอาหารได้ปกติภายหลังสลบด้วยกานพลู 4 ชั่วโมง และกินอาหารได้ 48 ชั่วโมงเมื่อได้รับ MS-222[7] ปัญหาในการขยายพันธุ์กานพลู เช่น การเพาะเมล็ดภายหลังการเก็บเกี่ยวกานพลูมีอัตราการงอกประมาณร้อยละ 90 และอัตราการงอกจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้กานพลูเป็นพืชเศรษฐกิจที่หาได้ยากในท้องตลาดจึงมีราคาดอกแห้งกิโลละ 750-800 บาท หากการศึกษาวิจัยสามารถนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยเร่งให้เกิดแคลลัส (callus) ดังรายงานของ Malamug (1991)[1] ที่ได้ศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขิงในอาหารที่มีการเติมฮอร์โมน 2,4-D 1.0 ppm และเติมฮอร์โมน NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5-1.0 ppm โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ทั้งที่มีแสงและที่มืดเป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์[7] สำหรับกานพลูเป็นไม้ยืนต้นที่มีสารฟีนอลิกสูงเป็นอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารสูตร WPM ที่เติมฮอร์โมน TDZ (0.1 ppm) และ 2,4-D (0.1 ppm)[9]

การเพาะเลี้ยงแคลลัส เพื่อกระตุ้นเนื้อเยื่อให้เป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืช โดยชักนำให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์เกิดเป็นแคลลัสแล้วเจริญเติบโตเกิดเป็นหน่อ หรือต้นพืชที่มีการคัดเลือกแคลลัสที่มีคุณสมบัติบางประการ เช่น ทนเค็ม ทนสารฆ่าวัชพืช ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของพืชใบเลี้ยงคู่มักได้จากส่วนใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ปลายยอด ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง และราก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากส่วนของใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน ขึ้นอยู่กับสารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulators) โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ สัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนของออกซินต่ำกว่าไซโตไคนินเนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนออกซินเท่ากับไซโตไคนินชิ้นส่วนของพืชจะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ นั้นพบว่าชิ้นส่วน ออกซินจะอยู่ในช่วง 0.01 - 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) และไคเนตินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1 - 10.0 มก/ล. ทั้งนี้ปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วนของพืช จากการศึกษาวิจัยครั้งก่อนการกระตุ้นแคลลัสกานพลูจากชิ้นส่วนของใบเจริญได้ดีกว่า ตาข้าง[9] การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการใช้ประโยชน์จากเทคนิคการกระตุ้นแคลลัสจึงเป็นการเร่งให้ได้สารจากกานพลูในระยะเวลาสั้นกว่าการปลูกต้นกานพลู และลดต้นทุนในการปลูกพืชระยะยาวได้

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงทำการสกัดสารจากแคลลัสของใบกานพลูแทนน้ำมันจากดอกแห้งของกานพลูโดยหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการระงับความรู้สึกของปลา

ระหว่างการพักปลาแบ่งระดับอาการออกเป็น 3 ระดับอาการ ได้แก่ เคลื่อนไหวช้า นิ่ง และสลบ[10] ดังนั้นคาดว่าผลที่ได้จากการทดลองในงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อพัฒนาการผลิตสารเพื่อใช้ในการสลบปลาดุกอุยเทศแทนสารเคมีที่ใช้ในท้องตลาดซึ่งสารเคมีนั้นทำให้เกิดสารตกค้างซึ่งอาจเป็นอันตรายกับผู้บริโภคและเป็นประโยชน์ต่อการพักปลาในระหว่างที่ปลาเข้าสู่อาการสงบนิ่ง (sedation) และอาการเคลื่อนไหวช้า[5] เพื่อประโยชน์ในการป้องกันการเกิดแผลและความเครียดของปลาระหว่างการขนส่ง[11] ช่วยป้องกันการเคลื่อนไหวที่อาจเสียดสีจนเกิดบาดแผลที่ติดเชื้อได้ง่าย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารช่วยเร่งอัตราการเกิดแคลลัสกานพลูในอาหารสูตร WPM ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน

2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากแคลลัสกานพลูกับสารมาตรฐาน MS - 222 ต่อการสงบนิ่งของปลาดุกอุยเทศขนาด 10-15 เซนติเมตร โดยมีสาร Tween 80 เป็นกลุ่มควบคุม

วิธีการทดลอง

1. แบบการทดลองและสถิติที่ใช้ แบ่งเป็น 2 ชุด ดังนี้

1.1 ชุดที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการกระตุ้นแคลลัสกานพลูในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อนำไปหาค่าร้อยละของการรอดชีวิตสูงที่สุดของชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อในเวลา 7 สัปดาห์ และหาค่าร้อยละของการเกิดแคลลัสกานพลูที่ควบคุมบนอาหาร สูตร WPM และหาร้อยละการรอดชีวิตของแคลลัสที่กระตุ้นด้วยสารควบคุมการเจริญเติบในเวลา 6 สัปดาห์ (n=10)

1.2 ชุดที่ 2 วางแผนการทดลองแบบ CRD การวิเคราะห์ข้อมูล หาค่าเฉลี่ยระยะเวลา (นาที) ที่ปลาตอบสนองระดับอาการต่าง ๆ ในแต่ความเข้มข้น (n=5)

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1 นำต้นกานพลูจากคลองสิบห้า อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานีมาทำการอนุบาลต้นพืชไว้ในโรงเรือนศูนย์วิทยาศาสตร์เพื่อการศึกษารังสิต พื้นโรงเรือนเป็นพื้นซีเมนต์ อุณหภูมิ 29±2 องศาเซลเซียส ให้น้ำด้วยวิธีการสเปรย์ฉีดพ่นยากันเชื้อราและศัตรูพืชสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

2.2 เตรียมอาหารสูตร WPM ที่ใช้กับไม้ยืนต้นทั่วไป

2.3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต่างๆ ของกานพลู

2.3.1 เลือกชิ้นส่วนของกานพลูที่สมบูรณ์มาทำการสเปรย์ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างแบบรินน้ำผ่านประมาณ 2-3 นาที

2.3.2 แยกชิ้นส่วนตายอด ตาข้างและใบอ่อนของกานพลูออกจากกัน นำแต่ละชิ้นส่วนไปแช่น้ำยากันเชื้อรา นาน 30 นาที

2.3.3 แช่ชิ้นส่วนกานพลูในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อโดยแบ่งเป็น 3 สูตร ดังนี้

- สูตรที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อีก 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 นาที
- สูตรที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อีก 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 นาที
- สูตรที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที สารละลายคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้ออีก 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 นาที

2.3.4 นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงในอาหารสูตร WPM ไปเลี้ยงที่ห้องปลอดเชื้อโดยควบคุมความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บผลในทุก ๆ วันเป็นระยะเวลา 13 สัปดาห์

3. การกระตุ้นแคลลัสกานพลู

จากการศึกษาครั้งนี้ช่วงแรกได้นำเอาชิ้นส่วนกานพลูที่ผ่านการทดลองมา 7 สัปดาห์ และมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่เติมฮอร์โมนหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันต่อเนื่อง 6 สัปดาห์ รวมระยะเวลาที่กระตุ้นแคลลัสกานพลูทั้งสิ้น 13 สัปดาห์ ดังนี้

3.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญ

ชั่ง Thidiazuron (TDZ) ชั่ง TDZ 0.01 กรัม ละลายใน 1 M KOH เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย TDZ ที่ความเข้มข้น 100 ppm และเตรียม NAA, BA, 2,4-D, IAA และ GA อย่างละ 100 ppm

3.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ต่อการชักนำชิ้นส่วนใบกานพลูในสภาพปลอดเชื้อให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร WPM

3.2.1 นำชิ้นส่วนใบกานพลูที่มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดจากสูตรที่ 1 ที่มีอัตราการรอด 28 เปอร์เซ็นต์

และมีการพัฒนาต่อเนื่องสังเกตได้จากมีขนาดของเส้นใบหนาและขนาดใบใหญ่ขึ้นจึงนำมากระตุ้นแคลลัสโดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตด้วยฮอร์โมนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันจำนวน 21 สูตร ๆ ละ 10 ซ้ำ โดยสูตรที่ 1 เป็นชุดควบคุมอาหารสูตร WPM ที่เติมฮอร์โมน 0 ppm และTween 80 (1%) สูตร WPM ที่ 2, 4, 6 และ8 เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 3 ppm ตามลำดับ สูตร WPM ที่ 3, 5, 7 และ 9 เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 ppm ตามลำดับ และเพิ่ม NAA ความเข้มข้น 0.5 ppm ด้วย ส่วนสูตร WPM ที่ 10-19 เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 – 3 ppm และ TDZ ความเข้มข้น 0.05 ppm ตามลำดับ สูตร WPM ที่ 20 เติม GA (0.1 ppm) และ IAA (0.5 ppm) อาหารสูตรที่ 21 เติมฮอร์โมน NAA (1 ppm) และ KI (2 ppm) ดัง Table1

3.2.2 นำชุดการทดลองทั้งหมดไปทำการควบคุมการกระตุ้นแคลลัสที่ห้องปลอดเชื้อโดยควบคุมความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกลักษณะของแคลลัส และร้อยละของการเกิดแคลลัสเป็นระยะเวลา 13 สัปดาห์

3.3 การเพิ่มขนาดของแคลลัสที่ได้จากการกระตุ้นชิ้นส่วนใบกานพลู โดยทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหาร WPM ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่สุดจากTable 1 เป็นเวลา 6 สัปดาห์เพื่อกระตุ้นให้แคลลัสมีการเพิ่มขนาดมากขึ้นก่อนนำไปทำการสกัดสารจากแคลลัสกานพลูต่อไป

4. การสกัดสารจากแคลลัสใบกานพลู

4.1 การเตรียมสารสกัด ทำการแบ่งการทดลองออกเป็นสองชุด ได้แก่

- ชุดทดสอบ คือ ตัวอย่างแคลลัสจากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร WPM ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับที่เหมาะสมและผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเป็นเวลา 13 สัปดาห์ 0.1 กรัมบดให้ละเอียดกับไนโตรเจนเหลวจึงนำมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- ชุดควบคุม คือ ใช้เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตรแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Table 1 Growth regulators in WPM formula to stimulate callus of clove

No.	Concentration (ppm)						
	BA	NAA	2,4-D	TDZ	GA	IAA	KI
1	-	-	-	-	-	-	-
2	0.5	-	-	-	-	-	-
3	0.5	0.5	-	-	-	-	-
4	1	-	-	-	-	-	-
5	1	0.5	-	-	-	-	-
6	2	-	-	-	-	-	-
7	2	0.5	-	-	-	-	-
8	3	-	-	-	-	-	-
9	3	0.5	-	-	-	-	-
10	-	-	0.5	-	-	-	-
11	-	-	0.5	0.05	-	-	-
12	-	-	1	-	-	-	-
13	-	-	1	0.05	-	-	-
14	-	-	2	-	-	-	-
15	-	-	2	0.05	-	-	-
16	-	-	2.5	-	-	-	-
17	-	-	2.5	0.05	-	-	-
18	-	-	3	-	-	-	-
19	-	-	3	0.05	-	-	-
20	-	-	-	-	0.1	0.5	-
21	-	1	-	-	-	-	2

4.1.1 นำตัวอย่างทั้งหมดมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.1.2 นำตัวอย่างที่ผ่านการบ่มแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.1.3 แยกส่วนใสไปกรองผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ

4.1.4 ทำการเก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการทดลอง

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแคลลัสกานพลูในการสลบปลาดุกอุยเทศ

5.1 การเตรียมปลาดุกอุยเทศ

ซื้อปลาดุกอุยเทศจากฟาร์มเลี้ยงจังหวัดปทุมธานี ขนาดยาว 10-15 เซนติเมตร น้ำหนัก 10-15 กรัม อายุประมาณ 3 เดือน มาอนุบาลไว้ในตู้ปลา เพื่อให้ปลาดุกคุ้น

เคยกับสภาพแวดล้อม 1 สัปดาห์ ให้อาหารสำหรับปลากินเนื้อวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) จนกว่าจะเริ่มดำเนินการทดลอง

5.2 ทำการทดสอบฤทธิ์ต่ออาการสงบนิ่ง (Sedation) ของปลาดุกอุยเทศโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดทดลอง (ชุดละ 5 ซ้ำ) ดังนี้

ชุดที่ 1 เอทิลแอลกอฮอล์ 50% และTween 80 (1%)
ชุดที่ 2 สาร MS-222 (10 ppm)
ชุดที่ 3 สารสกัดแคลลัสใบกานพลู (1 ppm)
ชุดที่ 4 สารสกัดแคลลัสใบกานพลู (2 ppm)
ชุดที่ 5 สารสกัดแคลลัสใบกานพลู (3 ppm)
ชุดที่ 6 สารสกัดแคลลัสใบกานพลู (4 ppm)
ชุดที่ 7 สารสกัดแคลลัสใบกานพลู (5 ppm)

บันทึกระยะเวลาออกฤทธิ์ต่ออาการสงบนิ่ง และหาระยะเวลาในการฟื้นปลาจากการตอบสนอง เคลื่อนไหวช้าจนปลาว่ายน้ำปกติ โดยการนำปลาดุกอุยเทศที่สงบนิ่งไปพักในน้ำสะอาดที่ให้ออกซิเจนตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกระยะเวลาที่ปลาเริ่มมีอาการตอบสนองจนว่ายน้ำปกติ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติทดสอบต่อไป

6. นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 5 มาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ One-Way ANOVA เมื่อพบว่าผลการตรวจสอบสมมติฐานแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ตามวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p<0.05$)

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาอัตราการรอดของชิ้นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ตายอด ตาข้าง และใบของกานพลูที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยา 3 สูตร ๆ ละ10 ชิ้น (ซ้ำ) ได้ผล ดังนี้

ตายอดของกานพลูมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคือสูตรที่ 2 มีอัตราการรอด 15% เนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และสูตรที่ 3 อัตราการรอด 15% เนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ส่วนสูตรที่ 1 อัตราการรอด 5% เนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ตามลำดับ

ตาข้างของกานพลูมีอัตราการรอดชีวิตได้ดีที่สุดคือสูตรที่ 3 มีอัตราการรอด 20% เนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ รองลงมาคือสูตรที่ 1 มีอัตราการรอด 5% เนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ส่วนสูตรที่ 2 มีอัตราการรอดเพียง 5% เนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตามลำดับ

ใบกานพลูมีอัตราการรอดชีวิตได้ดีที่สุดคือสูตรที่ 1 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคือ 30% เนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้นานกว่า 8 สัปดาห์ รองลงมาคือ สูตรที่ 2 มีอัตราการรอด 20% เนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้นานกว่า 8 สัปดาห์ ส่วนสูตรที่ 3 มีอัตราการรอด 20% เนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้นานกว่า 8 สัปดาห์

ผลการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสใบกานพลูในอาหารสูตร WPM จำนวน 21 สูตร โดยนับระยะเวลาหลังจากกระตุ้นให้เกิดแคลลัสต่อเนื่องอีก 6 สัปดาห์ รวมระยะเวลาทดลองทั้งสิ้น 13 สัปดาห์ ดังตารางที่ 1 จากอาหาร 21 สูตร มีเพียง 6 สูตรที่สามารถกระตุ้นการเกิดแคลลัสได้ดังนี้ อาหารสูตรที่ 1-12 และสูตรที่ 19-21 มีอัตราการรอดชีวิตทั้งหมด แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ ส่วนอาหารสูตรที่ 13-18 ชิ้นส่วนใบกานพลูพัฒนาเป็นแคลลัสได้แตกต่างกัน คือ สูตรที่ 13 มีอัตรารอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเกิดแคลลัส 10 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 14 อัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเกิดแคลลัส 20 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 15 อัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเกิดแคลลัส 10 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 16 อัตรารอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเกิดแคลลัส 90 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 17 อัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเกิดแคลลัส 70 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่ 18 อัตรารอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเกิดแคลลัส 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูตร WPM ที่ 17 เติมสาร TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ppm และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.5 ppm พบว่าแคลลัสใบกานพลูมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 0.5 กรัมต่อชิ้น และมีขนาดเพิ่มขึ้น 0.5 เซนติเมตร (Figure 1 และ Table 2)

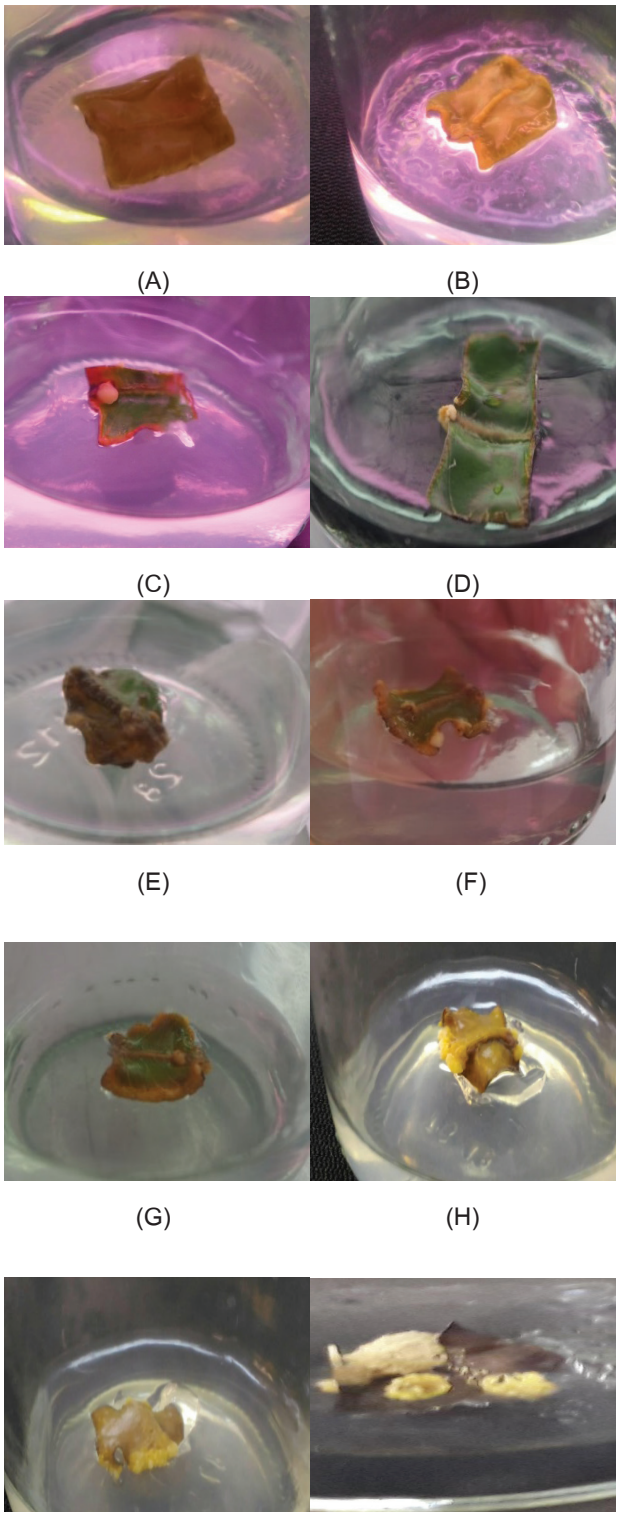

Figure 1 Growth of clove callus on WPM (No. 17) supplemented with TDZ at 0.05 ppm and 2,4-D (2.5 ppm); A-J the tissue ages 4-13 week (respectively)

Table 2 Survival rate and growth rate of clove callus on WPM for 6 weeks

No. of WPM formula	Survival rate (%)	Callus culture (%) of growth rate
1-12	100	-
13	90	10
14	100	20
15	100	10
16	90	90
17	100	70
18	90	50
19-21	100	-

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแคลลัสกานพลูต่อการสงบนิ่งปลาดุกอุยเทศที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมใช้เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดแคลลัสกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ5 ppm และสาร MS-222 ความเข้มข้น 10 ppm มีฤทธิ์ต่อการสงบนิ่งของปลาดุกอุยเทศจนาด 10-15 เซนติเมตร น้ำหนัก 10-15 กรัม อายุประมาณ 3 เดือน (Figure 2 และ Table 3) โดยปลาเข้าสู่ระดับอาการเคลื่อนไหวช้าใช้เวลา 7.13, 5.35, 2.74, 1.87, 0.99 และ5.02 นาที ตามลำดับ เข้าสู่ระดับอาการสงบนิ่งใช้เวลา 7.61, 6.21, 3.74, 2.72, 1.28 และ18.94 นาที ตามลำดับ และเข้าสู่ระดับอาการสงบนิ่งได้นาน 51.70, 53.14, 55.51, 56.50, 57.68 และ 39.00 นาที ตามลำดับ

Figure 2 Anesthesia of Hybrid catfish receiving clove callus extract (5 ppm) to stimulate in sedation

จากการทดลองฟื้นความรู้สึกพบว่าสารสกัดแคลลัสใบกานพลูระดับความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 ppm และสาร MS-222 ความเข้มข้น 10 ppm ทำให้ปลาดุกอุยเทศขนาด 10-15 เซนติเมตร น้ำหนัก 10-15 กรัม อายุประมาณ 3 เดือน มีระดับการตอบสนองต่อฤทธิ์ของสารสกัดจากแคลลัสใบกานพลู

Table 3 The average time (minutes) of catfish anesthesia at different symptom levels when using callus extract at concentrations of 1, 2, 3, 4 and 5 ppm compared with MS-222 at 10 ppm

No.	Concentration	Period To Show The Symptoms Of Juveniles (Minute)			
		Slow Motion	Sedation	Anesthesia	n
1	control (1% Tween 80)	Normal	Normal	normal	5
2	MS-222 at 10 ppm	5.02±0.42^{d}	18.94±0.76^{f}	39.00±0.88^{a}	5
3	clove callus extract 1 ppm	7.13±0.03^{e}	7.60±0.10^{e}	51.70±0.04^{b}	5
4	clove callus extract 2 ppm	5.35±0.09^{d}	6.21±0.70^{d}	53.14±0.15^{c}	5
5	clove callus extract 3 ppm	2.74±0.14^{c}	3.74±0.14^{c}	55.51±0.04^{d}	5
6	clove callus extract 4 ppm	1.87±0.12^{b}	2.72±0.14^{b}	56.50±0.15^{d}	5
7	clove callus extract 5 ppm	0.99±0.11^{a}	1.28±0.38^{a}	57.68±0.06^{e}	5

Note that the mean values in different letters (a, b, c, d, e, and f) vertically differ (p<0.05)

โดยเข้าสู่ระดับอาการตอบสนองใช้เวลา 0.34, 0.44, 0.81, 1.24, 1.45 และ 0.21 นาทีตามลำดับ เข้าสู่ระดับอาการเคลื่อนไหวช้าใช้เวลา 0.43, 0.53, 1.04, 1.51 2.12 และ 0.96 นาที ตามลำดับ และฟื้นสู่การว่ายน้ำได้ปกติที่เวลา 1.11, 1.32, 1.61, 2.33, 2.52 และ3.30 นาที ตามลำดับดัง Table 4

Table 4 The average time (minutes) of catfish recovery at different symptom levels when using callus extract at concentrations of 1, 2, 3, 4 and 5 ppm compared with MS-222 at 10 ppm

No	Concentration	Recovery Period (Minutes)			
		Response	Slow Motion	Normal	n
1	control (1% Tween 80)	Normal	Normal	normal	5
2	MS-222 at 10 ppm	0.21±0.07^{a}	0.96±0.17^{b}	3.30±0.07^{f}	5
3	clove callus extract 1 ppm	0.34±0.02^{b}	0.43±0.01^{a}	1.11±0.03^{a}	5
4	clove callus extract 2 ppm	0.44±0.01^{b}	0.53±0.01^{a}	1.32±0.04^{b}	5
5	clove callus extract 3 ppm	0.81±0.12^{c}	1.04±0.11^{b}	1.61±0.10^{c}	5
6	clove callus extract 4 ppm	1.24±0.02^{d}	1.51±0.02^{c}	2.33±0.06^{d}	5
7	clove callus extract 5 ppm	1.45±0.03^{e}	2.12±0.04^{d}	2.52±0.03^{e}	5

Note that the mean values in different letters (a, b, c, d, e, and f) vertically differ (P<0.05)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนกานพลู

พบการนำชิ้นส่วนตายอด ตาข้าง และใบจากต้นกานพลูมาฟอกฆ่าเชื้อในน้ำยาคลอรอกซ์ 3 สูตรพบว่าที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ตามด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (3 ซ้ำ ๆ ละ 5 นาที) ได้เนื้อเยื่อใบกานพลูที่มีชีวิตอยู่ถึง 30% และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องโดยเนื้อเยื่อมีการตอบสนองต่อฮอร์โมน TDZ และ 2,4-D จึงพัฒนาเป็นแคลลัสได้เนื่องจากอาหารสูตร WPM มีคุณสมบัติในการกระตุ้นเนื้อเยื่อเจริญของไม้ยืนต้นได้ดี [12] ประกอบกับชิ้นส่วนใบของกานพลูไม่มีส่วนยื่นแผ่นใบมีลักษณะเกลี้ยง เรียบเป็นมันเขียวสด ไม่มีรอยแผล ชิ้นส่วนตายอด และตาข้าง ซึ่งมีรอยไหม้จากน้ำยาฟอกบริเวณซอกใบอ่อน และแขนงอ่อนที่ยื่นมีลักษณะการปนเปื้อนเชื้อรา การ

ชักนำตายอดมีอัตราการรอดสูง 5% โดยเนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ส่วนตาข้างอัตราการรอด 5% โดยเนื้อเยื่อสามารถรอดอยู่ได้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เนื่องจากมีการปนเปื้อนเชื้อราจากการชักนำชิ้นส่วนต่าง ๆ แม้จะพ่นน้ำยากันราก่อนทำการฟอกฆ่าเชื้อ

ผลการกระตุ้นแคลลัสใบกานพลูด้วยฮอร์โมน

ผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถพบสัดส่วนที่เหมาะสมของของอาหารสูตร WPM[9] ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อพืชให้มีการยืดตัวได้มากกว่าปกติ[13] ต่อสารกลุ่มไซโตไคนินที่เหมาะสมจึงมีผลต่อการชักนำการแบ่งเซลล์[14] ชิ้นส่วนใบกานพลูให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร WPM เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (0.05 ppm) และ 2,4-D (2.5 ppm) ปรับ pH เท่ากับ 5.7 นั้น ทำให้ชิ้นส่วนของใบกานพลูได้รับสารสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างไซโตไคนินต่อปริมาณออกซิน[15,16] ซึ่งทำให้มีการดูดซึมอาหาร และแร่ธาตุตลอดเวลา แม้จะมีสารฟีนอลิกที่ปลดปล่อยออกมาขัดขวางการเจริญเติบโตในปริมาณสูง เมื่อมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ และย้ายชิ้นส่วนออกจากฟีนอลิกทุก ๆ สัปดาห์ ทำให้เนื้อเยื่อใบกานพลูมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และมีการพัฒนาเป็นแคลลัสมากที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ ประกอบกับจำนวนใบต่อต้นกานพลูมีปริมาณมาก สามรถเก็บจากต้นได้ตลอดเวลา และฟอกฆ่าเชื้อได้สะอาดปราศจากเชื้ออื่น ๆ ได้รวดเร็วกว่าชิ้นส่วนของตายอด และตาข้าง เมื่อได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน และไซโตไคนินจึงมีโอกาสกระตุ้นเป็นแคลลัส[17] ได้มากกว่า และมีอัตราการรอดชีวิตสูง นอกจากนี้แคลลัสยังสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดอ่อนได้หากได้รับสารเร่งการเจริญเติบโตต่อไป[18]

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแคลลัสกานพลูในการสลบปลาดุกอุยเทศ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแคลลัสใบกานพลูต่อการสงบนิ่งของปลาดุกอุยเทศ พบว่าสารสกัดจากแคลลัสใบกานพลูระดับความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 ppm และสารมาตรฐาน MS-222 ที่ความเข้มข้น 10 ppm มีฤทธิ์ต่อการตอบสนองในระดับอาการต่าง ๆ ของปลาดุกอุยเทศ โดยไม่พบปลาตาย และหลังฟื้นปลาดุกอุยเทศสามารถว่ายน้ำเป็นปกติทุกตัว และสารสกัดแคลลัสกานพลูที่ความเข้มข้น 5 ppm ฤทธิ์ในการสงบนิ่งของปลาดุกอุยเทศดีที่สุดโดยเข้าสู่ระดับอาการเคลื่อนไหวช้าใช้เวลา 0.99 นาที เข้าสู่ระดับอาการนิ่งใช้เวลา 1.28 นาที เข้าสู่ระดับอาการสลบได้นาน 57.68 นาที และเมื่อนำมาทำการฟื้นปลาใช้เวลาเข้าสู่ระดับมีการตอบสนอง 1.45 นาที เข้าสู่ระดับอาการเคลื่อนไหวช้าใช้เวลา 2.12 นาที และเข้าสู่ระดับอาการว่ายน้ำได้ปกติที่เวลา 2.52 นาที ซึ่งให้ผลที่ดีกว่าสาร MS-222 ซึ่งปลาฟื้นตัวได้ช้ากว่า และยังต้องมีการพักปลาเพื่อความปลอดภัยของปลา และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากปริมาณสารที่ทดสอบมีความเข้มข้นต่ำมาก แต่สามารถออกฤทธิ์ต่ออาการสงบนิ่งได้นั้นอาจเนื่องจากปริมาณของยูจินอลซึ่งเป็นสารสำคัญในใบกานพลู[3] พบได้สูงกว่าชิ้นส่วนตาข้าง และตายอด ทำให้เนื้อเยื่อใบกานพลูพัฒนาเป็นแคลลัสที่สะสมสารยูจินอลสูง จึงทำให้ลูกปลาดุกอุยเทศสงบนิ่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของพบว่าน้ำมันกานพลู และสารยูจินอล (60 ppm) มีผลต่อกลไกการทำงานของสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ชนิดกาบา (gamma-aminobutyric acid; GABA) บนสารกลูตามิกรีเซฟเตอร์รีเซฟเตอร์ทำให้ปลาทองขนาด 3-4 เซนติเมตรสลบได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวเครือวัลย์ ศรีมุข ที่ช่วยรวบรวมข้อมูลตามแผนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ วช. ที่สนับสนุนโครงการวิจัย ให้คำแนะนำและคำปรึกษาจนโครงงานนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยา และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรีที่อนุมัติงบประมาณและอำนวยความสะดวกในการจัดทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. นาวิน มหาวงศ์ เมธา คชาภิชาติ ปฏิพัทธ์ อภิธนกุล และประโยชน์ บุญประเสริฐ, “การทดลองเบื้องต้นในการใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในปลาน้ำจืดที่สำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด” สำนักงานประมงจังหวัดพะเยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา 2549.
2. กันยารัตน์ ศึกษากิจ, กฤติยา ทิสยากร, วิเชียร เขยนอก, กาญจนา สีแย้ม, ดรุณี ปะหุสี และนพรัตน์ พุทธกาล. ฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูต่อเวลาการนอนหลับในหนูทดลอง. Science and Technology RMUTT Journal 2557:4(2);45-50.
3. สุริยเมธินท์ วงศ์เผ่าสกุล สุพรรณ โพธิ์ศรี สุทธวรรณ สุพรรณ และนพรัตน์ พุทธกาล. ผลของสารสกัดดอกและกานพลูต่อการระงับความรู้สึกของปลาดุกอุยเทศ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2560(7):24-35.
4. Alma,H., Murat, E. Nitz, S. and Kollmannsber ger, H. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove. (*S. aro-*

maticum L.) 2007:2(2);265-269.

5. ดนัย สมใจ อรอุมา พาลเสือ และ สมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ. ความเป็นพิษและประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูในการสลบปลากัดจีน. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 2551:30-38.
6. ชยันต์ พิเชียรสุนทร แม้นมาส ชวลิตและวิเชียร จิรวงศ์. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พลับบลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน).กรุงเทพฯ 2542.
7. Pirhonen, J. and Schreck, C.B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO_2 on feed in tanke and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacultue 2003:220;507-514.
8. Malamug, J.F, Inden, H. and Asahira, T. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. Scientia Hort 1991:48; 89–97.
9. นพรัตน์ พุทธกาล เสาวณีย์ บัวโทน สุพรรณ โพธิ์ศรี ดลนภา แก้วภา และกาญจนา ภิญโญภาพ. ศึกษา สูตรอาหาร MS และWPM ในการควบคุมการเจริญเติบโตของแคลลัสกานพลู. 6th RMUTNC & 5th RMUTIC 2014 2558:125-136.
10. Donald L. Neiffer and M. Andrew Stamper. Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. Department ofAnimal Health, 1200 North Savannah Circle East, Lake Buena Vista 2009:FL32830.
11. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. รายชื่อสมุนไพรที่มีการขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณไว้ 100 อันดับแรก 2549.
12. Larry D. Nooden and Kenneth V. Thimann. Evidence for requirement for proteinsynthesis for auxin-induced cell enlargement. Biological laboratories,Harvard university 1963.
13. Weber, S., Weisse, C., Schwarz, T., Innis, C. and Klide, A.M. Anesthesia Diagnostic Imaging and Surgery of Fish," Compendium : Continuing Education for Veterinarians 2009:1-8.
14. บุญยืน กิจจวิจารณ์. เทคโนโลยีเบื้องต้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการพัฒนาพันธุ์พืช. คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น 2547:146หน้า.
15. รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะ เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ 2545:219 หน้า.
16. เยาวนุช หงษ์รานนท์ เสียงใส พิริยพฤนต์ และธารทิพย์ เพชระบูรณ์. การขยายพันธ์กานพลู โดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ ประจำปี 2535 กลุ่มพืชสมุนไพร และเครื่องเทศ. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพ 2535:156-166.
17. พีรเดช ทองอำไพ. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ : แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. หจก. ไดนามิคการพิมพ์, กรุงเทพ ฯ 2529:196 หน้า.
18. Mathew, M. K. and Hariharan, M. In Vitro Multiple Shoot Regeneration in *Syzygium aromaticum*. Annals of Botany 1989:65;277-279.