การผลิตสารเอคไดสเตอโรนโดยวิธีการตรึงเซลล์ พืชไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.)

นาย พนา โลหะทรัพย์ทวี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-227-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17989446

Production of Ecdysterone by Immobilized *Vitex glabrata* R.Br. Cells

Mr. Pana Lohasupthawee

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-227-6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตสารเอคไดสเตอโรนโดยวิธีการตริงเซลล์พืชไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.)

โดย นาย พนา โลหะทรัพย์ทวี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พนา โลหะทรัพย์ทวี : การผลิตสารเอคไดสเตอโรนโดยวิธีการตรึงเซลล์นิชไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.) (PRODUCTION OF ECDYSTERONE BY IMMOBILIZED VITEX GLABRATA R.BR. CELLS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สัณห์ พณิชยกุล, 131 หน้า, ISBN 974-579-227-6

จากการศึกษาศักยภาพของการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน ด้วยวิธีการโคลนเซลล์นิชไข่เน่า พบว่าเมื่อกระจายเซลล์เกาะกลุ่ม (5 - 6 เซลล์ต่อกลุ่ม) ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง แล้วคัดเลือกโคโลนีของเซลล์นิชที่เกิดขึ้นในจานอาหารเพาะเลี้ยง โดยอาศัยลักษณะความแตกต่างของกลุ่มแคลลัส ความหนาแน่นของเซลล์ต่ำสุดที่ทำให้เกิดโคโลนีได้อยู่ในช่วงระหว่าง (8 - 10) x 10^4 กลุ่มเซลล์/จานเพาะ เซลล์นิชไข่เน่าที่คัดเลือกและเพาะเลี้ยงได้มี 3 กลุ่ม ซึ่งสามารถผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้ระดับแตกต่างกัน กลุ่มเซลล์คัดเลือก PNA 1 ผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25±2°ซ ภายใต้ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม./วัน เมื่อนำเซลล์ PNA 1 ไปตรึงด้วยอัลจิเนต 2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่า เซลล์ตรึงสามารถผลิตสารเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตรต่างๆ ได้สูงกว่าเซลล์แขวนลอยอิสระ ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงคือ B5 ให้การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน ได้สูงกว่าอาหารสูตร 1/2 MS ทั้งสภาวะของการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยอิสระและแบบเซลล์ตรึง การเติมโคเลสเตอรอล 200 มก/ล จะกระตุ้นการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ลดการเจริญของเซลล์ลงบ้างเล็กน้อย การเติมทวีน80 (Tween 80) ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.25 กรัม/ลิตร เพื่อช่วยการกระจายโคเลสเตอรอลในอาหารเหลว มีผลยับยั้งการเจริญและการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต พนา โลหะทรัพย์ทวี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

PANA LOHASUPTHAWEE : PRODUCTION OF ECDYSTERONE BY IMMOBILIZED VITEX GLABRATA R.BR. CELLS. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D. 131 PP. ISBN 974-579-227-6

Study on the β-ecdysone production was performed by cloning the mixtures of Vitex glabrata cell aggregates (5 - 6 cells per aggregate) on the solid medium. The effective cell density of the culture to exhibit the growth and propagation of cells in petri dish was (8 - 10) x 10^4 cell units/plate. Three types of selected V. glabrata cell lines could produce various level of β-ecdysone. The selected cell line PNA1 produced highest level of β-ecdysone when cultured in 1/2 MS medium supplemented with 2,4-D 1 mg/l and BA 2 mg/l, shaking at 100 rpm, at 25±2° C, under 2000 lux light intensity, 16 hr. per day. After immobilized with alginate (2 % w/v), the immobilized cells could produce higher level of β-ecdysone in comparison to the free cells. Immobilized V. glabrata cells produced higher level of β-ecdysone when cultured in B5 medium. Addition of cholesterol as a precursor in the growth medium partially stimulated the level of β-ecdysone production but slightly decreased cell growth. However, adding tween-80 for dispersion of cholesterol in the growth medium did not effect any level of β-ecdysone production while the level of detergent higher than 0.25 g/l would diminish the level of β-ecdysone in cell suspension culture.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต พนา โลหะทรัพย์ทวี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำในการวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน และ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณท่านคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์ต่องานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณสุนันท์ รังษีกาญจน์ส่อง แห่งศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือวิเคราะห์ตัวอย่าง ขอขอบคุณ พี่ เพื่อนและน้อง ในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับมิตรภาพ ความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี ที่ให้ความสนับสนุนทางด้านสารเคมี อุปกรณ์ ตลอดจนเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (STDB) สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของข้าพเจ้า ที่ให้ความช่วยเหลือความเข้าใจ กำลังใจและกำลังทรัพย์ อันมีค่ายิ่งต่อข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ฑ

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. วิธีการทดลอง..... 11

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 11

2.1.1 อุปกรณ์..... 11

2.1.2 สารเคมี..... 12

2.2 ตัวอย่างแคลลัสพืชไข่เน่าส่วนต้น..... 13

2.3 อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า..... 13

2.4 วิธีเตรียมสารละลายโคเลสเตอรอล..... 13

2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าในอาหารเหลว..... 14

2.6 การวัดการเจริญของเซลล์พืชในอาหารเหลว..... 14

2.7 การกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง..... 15

2.8 วิธีการตรึงเซลล์พืช..... 15

2.9 วิธีวัด strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึง..... 16

2.10 การละลายเม็ดเจลเพื่อปลดปล่อยเซลล์ตรึงให้เป็นอิสระ..... 19

2.11 การย้อมเซลล์พืชอิสระ และเซลล์ตรึงเพื่อศึกษาความมีชีวิต..... 19

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	2.12 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด...	20
	2.13 การเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ระดับเบตา-เอคไดโซน.....	22
	2.14 การสกัดแยกสารเบตา-เอคไดโซนจากเซลล์เพาะเลี้ยง.....	22
	2.15 วิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC....	22
	2.16 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC.....	23
3.	ผลการทดลอง	
	3.1 สมบัติและลักษณะของเซลล์แคลลัสจากส่วนต้นไข่เน่า.....	24
	3.2 สมบัติและลักษณะของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า.....	24
	3.3 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์ก่อนและหลังกรองผ่านแผ่นไนลอน.....	26
	3.4 การศึกษาความเข้มข้นของเซลล์ยูนิตที่เหมาะสมต่อการเจริญ ในอาหารเพาะเลี้ยงแข็ง.....	26
	3.5 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์พืชในจานอาหารเพาะเลี้ยง.....	33
	3.6 การคัดเลือกโคโลนีของเซลล์พืชไข่เน่า.....	33
	3.7 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในระบบแขวนลอย ของโคลนที่คัดเลือกแล้ว.....	37
	3.8 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตริงเซลล์พืช.....	49
	3.9 ศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายเม็ดเซลล์ตริง.....	53
	3.10 ศึกษาความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ต่อการเจริญเติบโตของ เซลล์แขวนลอย PNA 1.....	53
	3.11 ศึกษาชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง.....	58
	3.11.1 ผลกระทบของชนิดอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย PNA 1.....	58
	3.11.2 ผลกระทบของชนิดอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริง PNA 1.....	62

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.11.3 ผลกระทบของการตริงเซลล์ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตร B5.....	67
	3.12 ศึกษาสารตั้งต้นโคเลสเตอรอล.....	69
	3.12.1 ผลกระทบของโคเลสเตอรอลต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย PNA 1.....	69
	3.12.2 ผลกระทบของโคเลสเตอรอลต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริง PNA 1.....	72
	3.12.3 ผลกระทบของการตริงเซลล์ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในสูตรอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอล.....	76
	3.13 ศึกษาลักษณะภายนอกของเซลล์ตริงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด.....	78
	3.14 ศึกษาสารช่วยการละลายและกระจายโคเลสเตอรอลในอาหารเพาะเลี้ยง...	78
	3.14.1 ผลกระทบของสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, ทวีน80 และไดไพริดิล ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย PNA 1.....	78
	3.14.2 ผลกระทบของสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, ทวีน80 และไดไพริดิล ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริง PNA 1.....	88
	3.14.3 ผลกระทบของการตริงเซลล์ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในสูตรอาหารที่ใส่สารละลายอินทรีย์ไดออกเซน,ทวีน80 และไดไพริดิล	93
	3.15 ศึกษาความเข้มข้นของทวีน80 และไดไพริดิลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย PNA 1.....	93
4.	บทวิจารณ์และสรุป.....	98
	เอกสารอ้างอิง.....	113

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวกที่

1. อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์พืชสูตร Murashige and Skoog..... 127

2. อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์พืชสูตร B5..... 128

3. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเครื่อง HPLC.... 129

4. กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซน..... 130

ประวัติผู้เขียน..... 131

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การตรึงเซลล์พืชเพาะเลี้ยงในโพลิเมอร์เจลชนิดต่างๆ.....	7
2	ความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม ก่อนและหลังกรองผ่านแผ่นไนลอนขนาด 110 ไมครอน	27
3	อิทธิพลของความหนาแน่นเซลล์ในจานอาหารเพาะเลี้ยง ต่อประสิทธิภาพการเกิดโคโลนี ภายในเวลา 1 เดือน.....	30
4	การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง.....	40
5	การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 2 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง.....	43
6	การเจริญและการผลิตสารประกอบแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 3 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง.....	46
7	อิทธิพลของความเข้มข้นเซลล์พืชไข่เน่าในเม็ดเจลอัลจิเนต ต่อความแข็งของเม็ดเจล.	52
8	เปรียบเทียบบัฟเฟอร์ต่างๆที่ใช้สลายเม็ดเซลล์ตรึงอัลจิเนต.....	54
9	ผลกระทบของความเข้มข้น $CaCl_2$ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย PNA 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง เป็นเวลา 1 เดือน.....	55
10	การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง.....	59
11	การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง.....	60

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

12 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 64

13 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 65

14 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 70

15 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 74

16 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 84

17 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน และ 2 กรัม/ลิตร ทวีน80 และ 0.005 mM ไดไพริดิล เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน ของการทดลอง..... 85

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

18 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 89

19 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน และ 2 กรัม/ลิตร ทวีน80 และ 0.005 mM ไดไพริดิล เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน ของการทดลอง..... 90

20 ผลกระทบของทวีน80 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง เป็นเวลา 1 เดือน..... 96

21 ผลกระทบของไดไพริดิล ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง เป็นเวลา 1 เดือน..... 97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซน.....	2
2	สูตรโครงสร้างของสารตั้งต้นโคเลสเตอรอล.....	2
3	สมมติฐานของกระบวนการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน จากโคเลสเตอรอล ในเซลล์พืช.....	9
4	การตริงเซลล์พืชไข่เน่า ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต.....	17
5	เครื่องมือวัดความแข็งของเม็ดเจลเซลล์ตริง.....	18
6	ลักษณะของเม็ดเจลเซลล์ตริง ที่ผ่านการวัดความแข็งแล้ว.....	18
7	แสดงความมีชีวิตของเซลล์พืช โดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท.....	21
8	แคลลัสส่วนต้นของพืชไข่เน่า เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล อายุ 4 สัปดาห์.....	25
9	เซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล อายุ 4 สัปดาห์.....	25
10	ความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม ก่อนและหลังกรองผ่านแผ่นไนลอน ขนาด 110 ไมครอน.....	28
11	ความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม ก่อนกรองผ่านแผ่นไนลอนขนาด 110 ไมครอน.....	29
12	ความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม หลังกรองผ่านแผ่นไนลอนขนาด 110 ไมครอน.....	29
13	อิทธิพลของความหนาแน่นเซลล์ในจานอาหารเพาะเลี้ยง ต่อประสิทธิภาพ การเกิดโคโลนี ภายในเวลา 1 เดือน.....	31
14	โคโลนีของเซลล์พืชไข่เน่า ซึ่งเกิดจากการกระจายเซลล์ในจานอาหารเพาะเลี้ยง ด้วยความเข้มข้นเซลล์ 8 x 10^4 เซลล์ยูนิต/จานเพาะ อายุ 1 เดือน.....	32
15	โคโลนีของเซลล์พืชไข่เน่า ซึ่งเกิดจากการกระจายเซลล์ในจานอาหารเพาะเลี้ยง ด้วยความเข้มข้นเซลล์ 1 x 10^5 เซลล์ยูนิต/จานเพาะ อายุ 1 เดือน.....	32
16	การติดตามการเจริญของเซลล์เกาะกลุ่มขนาด 6 เซลล์/กลุ่ม ในจานอาหารเพาะเลี้ยง ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 25 เท่า.....	34

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

17 การติดตามการเจริญของเซลล์เกาะกลุ่มขนาด 11 - 15 เซลล์/กลุ่ม ในจานอาหารเพาะเลี้ยง ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 25 เท่า..... 35

18 การเพาะเลี้ยงโคโลนีพืชไข่เน่า ขนาด 1 มิลลิเมตร ในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล..... 36

19 สายพันธุ์พืชไข่เน่าที่คัดเลือกได้คือ PNA 1, PNA 2 และ PNA 3 เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล อายุ 4 สัปดาห์..... 36

20 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 50 เท่า แสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัสพืชไข่เน่า PNA 1 อายุ 4 สัปดาห์..... 38

21 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 50 เท่า แสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัสพืชไข่เน่า PNA 2 อายุ 4 สัปดาห์..... 38

22 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 50 เท่า แสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัสพืชไข่เน่า PNA 3 อายุ 4 สัปดาห์..... 39

23 เซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1, PNA 2 และ PNA 3 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล อายุ 4 สัปดาห์..... 39

24 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 41

25 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 2 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 44

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

26 การเจริญและการผลิตสารประกอบแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 3 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 47

27 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA1, PNA2 และ PNA3 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 48

28 อิทธิพลของระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงสารละลาย $CaCl_2$ ต่อความกลมของเม็ดเจลอัลจิเนต..... 51

29 ผลกระทบของความเข้มข้น $CaCl_2$ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย PNA 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง เป็นเวลา 1 เดือน..... 56

30 การแตกของเม็ดเซลล์ตริงพืชไข่เน่า ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ไม่ได้เสริมความเข้มข้นของ $CaCl_2$ อายุ 8 สัปดาห์..... 57

31 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 และอาหารสูตร 1/2 MS ทั้งสองสูตรเสริม 2,4-D 1 มก/ล , BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 61

32 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 และอาหารสูตร 1/2 MS ทั้งสองสูตรเสริม 2,4-D 1 มก/ล , BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 66

33 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตริง พืชไข่เน่า PNA1 ในอาหารสูตร B5 เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล , BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 68

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

34 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่มีโคเลสเตอรอล 200 มก/ล และไม่มีโคเลสเตอรอล (อาหารควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 71

35 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่มีโคเลสเตอรอล 200 มก/ล และไม่มีโคเลสเตอรอล (อาหารควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 75

36 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตริง พืชไข่เน่า PNA1 ในอาหารสูตร B5 เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล , BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ และโคเลสเตอรอล 200 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 77

37 เปรียบเทียบขนาดของเม็ดเซลล์ตริงอัลจิเนตที่อายุ 1 วันและ 2 เดือน..... 79

38 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ที่อายุ 1 วัน และ 2 เดือน..... 80

39 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 35 เท่า แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ที่อายุ 1 วัน, 1 เดือน และ 2 เดือน..... 81

40 เศษเซลล์ของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ และโคเลสเตอรอล 200 มก/ล อายุ 8 สัปดาห์..... 82

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

41 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริม 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ ที่มีโคเลสเตอรอล 200 มก/ล ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, ทวีน80 และไดไพริดิล เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดียวกันแต่ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 86

42 เปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารที่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล เทียบกับอาหารที่ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล อายุ 4 สัปดาห์..... 87

43 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริม 2,4-D 1 มก/ล ,BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ ที่มีโคเลสเตอรอล 200 มก/ล ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, ทวีน80 และไดไพริดิล เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดียวกันแต่ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 91

44 เปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารที่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล เทียบกับอาหารที่ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล อายุ 4 สัปดาห์..... 92

45 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตริง พืชไข่เน่า PNA1 ในอาหารสูตร B5 เสริม 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ และโคเลสเตอรอล 200 มก/ล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, ทวีน80 และไดไพริดิล เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง..... 94

คำย่อ

มก/ล	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มล	=	มิลลิลิตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
MS	=	Murashige and Skoog
2,4-D	=	2.4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	=	benzyladenine
PCV	=	Packed Cell Volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย