หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่3

ผลการทดลอง

3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยง คือ ความเข้มข้นของสารอาหาร (medium concentration) สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) รวมทั้งสภาวะการให้แสง (light period)

3.1.1 ปริมาณความเข้มข้นของสารอาหาร

(1) ความเข้มข้นสารอาหารเต็มสูตร

(2) ความเข้มข้นสารอาหารครึ่งสูตร

ทำการเตรียมและฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ชั้นของอีพิเดอร์มิส ชิ้นส่วนของใบและส่วนของต้น (ตามวิธีข้อ 2.6) เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS และ 1/2 MS นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง ที่ อุณหภูมิ 25±2 °ซ ให้แสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลองคิดเป็นเปอร์เซนต์เนื้อเยื่อที่อยู่รอดและลักษณะเนื้อเยื่อที่อยู่รอด

ในการทดลองทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ชิ้นต่อ 1 ขวดทดลอง แต่ละสภาวะของการทดลองใช้จำนวนตัวอย่าง 30 ชิ้น ระยะเวลาทดลอง 4 สัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารอาหารมีผลต่อการเจริญของชิ้นเนื้อเยื่อ และโดยเฉลี่ยแล้วสารอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีเปอร์เซนต์การรอดของชิ้นเนื้อเยื่อต่ำ และลักษณะของเนื้อเยื่อที่อยู่รอดอยู่ในสภาพที่ด้อยกว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของสารอาหารลดลงครึ่งหนึ่ง เป็นที่น่าสังเกตว่าส่วนของต้นจะมีเปอร์เซนต์การรอดสูงและลักษณะของเนื้อเยื่อที่รอดก็ยังคงสภาพเขียว และปกติมากกว่าเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของใบและชั้นของอีพิเดอร์มิส

3.1.2 อิทธิพลของความความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ตารางที่ 1. ผลของความเข้มข้นของสารอาหาร MS ต่อเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าส่วนต่างๆเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Plant part	Media concentration [1]	Survival tissue(%)	Response of explant to media
Leaf piece	1/2 MS	Ø	-
	MS	Ø	-
Epidermal layer	1/2 MS	13.4	black
	MS	Ø	-
Stem section	1/2 MS	48.Ø	brown
	MS	13.4	blackish brown

1. MS คือสารอาหารสูตร Murashige และ Skoog(1962)

1/2 MS คือสารอาหารที่มีความเข้มข้นของ macronutrient และ micronutrient เป็นครึ่งหนึ่งของสูตรอาหาร MS

เมื่อทำการแปรผัน ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D ในระดับ 0,1,2,3,4 มก./ล. ใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA ในระดับ 0,1,2,3 มก./ล. สภาวะการเพาะเลี้ยงตามข้อ 2.7 บันทึกผลการทดลองโดยคิดเป็นเปอร์เซนต์การตาย (% death) เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส (% callusing) และการให้คะแนนการเกิดแคลลัส (average callus score) และดัชนีการเจริญเติบโต (growth index, GI) เมื่อใช้ระยะเวลาทดลอง 4 สัปดาห์

หมายเหตุ

$$\text{เปอร์เซนต์การตาย} = \frac{\text{จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ตาย}}{\text{จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทดลอง}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทดลอง}} \times 100$$

$$\text{คะแนนแคลลัสเฉลี่ย} = \text{คะแนนแคลลัสรวม}/\text{จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทดลอง}$$

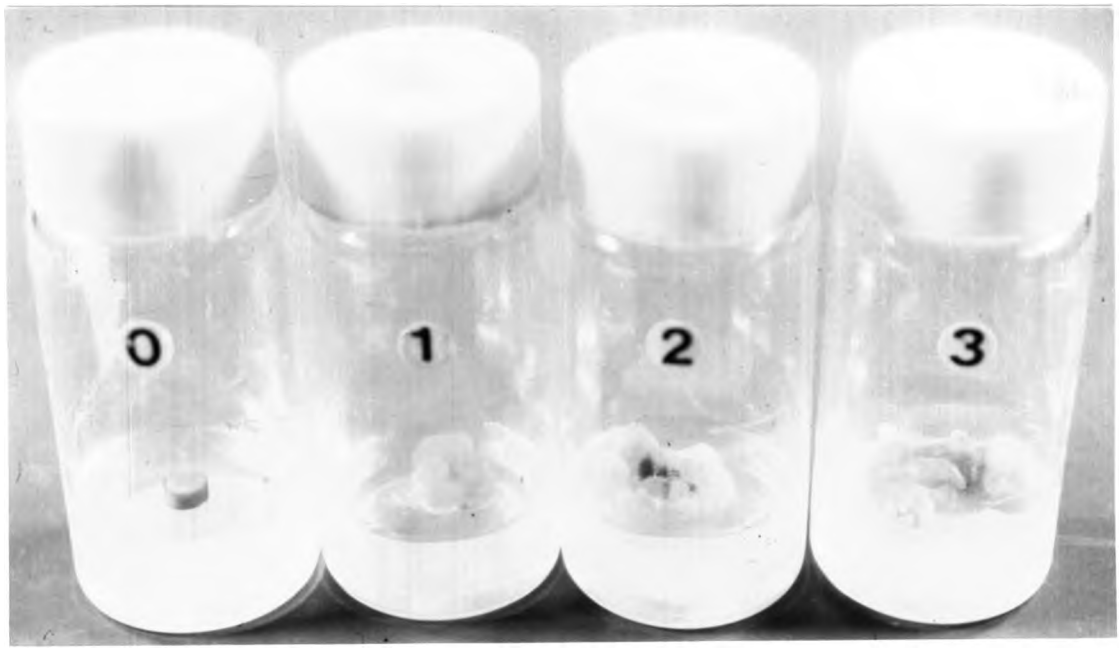
$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโต} = \frac{\text{น้ำหนักสดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

ผลการทดลอง (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6,7) แสดงให้เห็นว่าการชักนำการสร้างแคลลัสของต้นไข่เน่าจะเกิดขึ้นได้ดี จำเป็นต้องอาศัยการทำงานเสริมกันของทั้งออกซินและไซโตไคนิน คือ 2,4-D และ BA ในอัตราส่วนที่เหมาะสม

อย่างไรก็ตาม 2,4-D ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (1 ถึง 4 มก./ล.) โดยไม่มี BA สามารถชักนำการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อส่วนของต้นได้บ้าง ในขณะที่ BA (1 ถึง 3 มก./ล.) โดยไม่มี 2,4-D ไม่มีผลต่อการชักนำการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อส่วนของต้น แต่สามารถชักนำการเกิดแคลลัสในเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของใบได้บ้างเล็กน้อย และการชักนำการเกิดแคลลัสจะสูงขึ้น เมื่อมีการเสริมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดในสัดส่วนที่เหมาะสม

เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซนต์การตาย เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส คะแนนการเกิดแคลลัส และดัชนีการเจริญเติบโต จะให้ผลสอดคล้องกันว่าเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของใบ ชั้นอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. จะชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสดีที่สุด

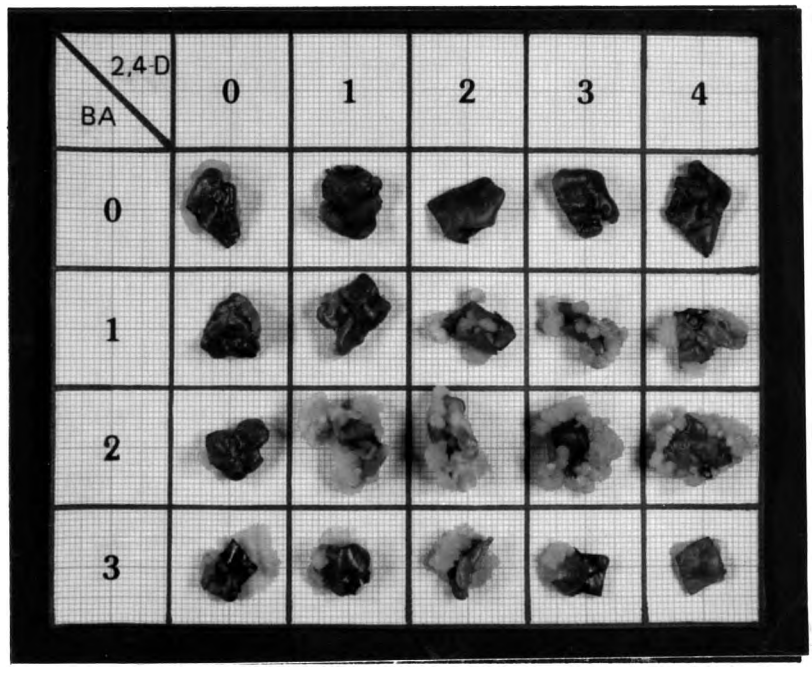
สำหรับรูปแบบของการชักนำการเกิดแคลลัสในเนื้อเยื่อส่วนของต้นและชิ้น



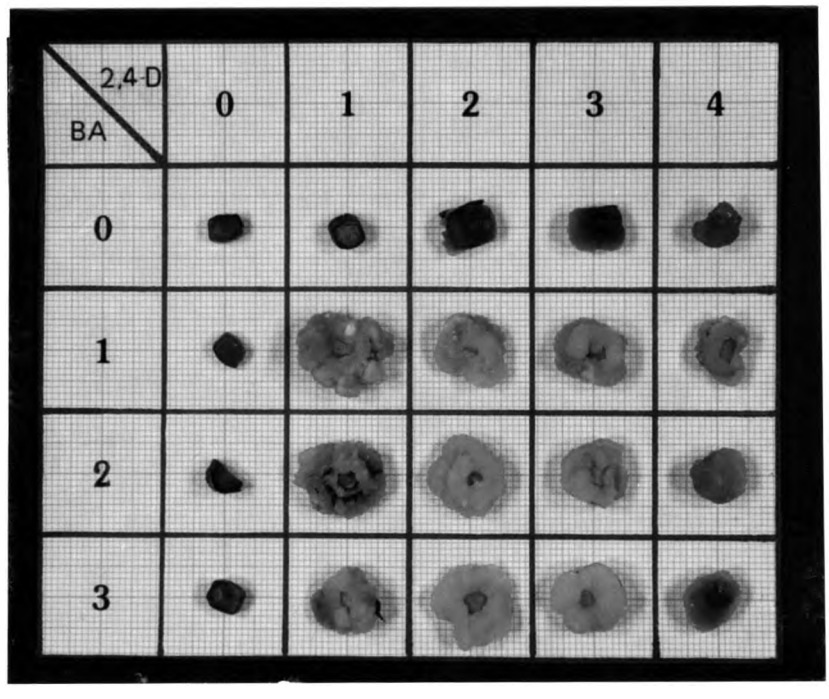
ภาพที่ 5. ภาพแสดงมาตรฐานของลักษณะและขนาดแคลลัสที่ใช้เป็นเกณฑ์กำหนดคะแนนการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อต้นไข่เน่า

0	ไม่ตอบสนอง	น้ำหนักประมาณ	0.00-0.02	กรัม
1	เกิดแคลลัสปริมาณต่ำ	" "	0.03-0.05	กรัม
2	เกิดแคลลัสปริมาณปานกลาง	" "	0.06-0.25	กรัม
3	เกิดแคลลัสปริมาณสูง	น้ำหนักมากกว่า	0.26	กรัม

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย



ภาพที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต(2,4-D และ BA) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันต่อการชักนำการเกิดแคลลัสจากใบของต้นไข่เน่า อายุ 4 สัปดาห์



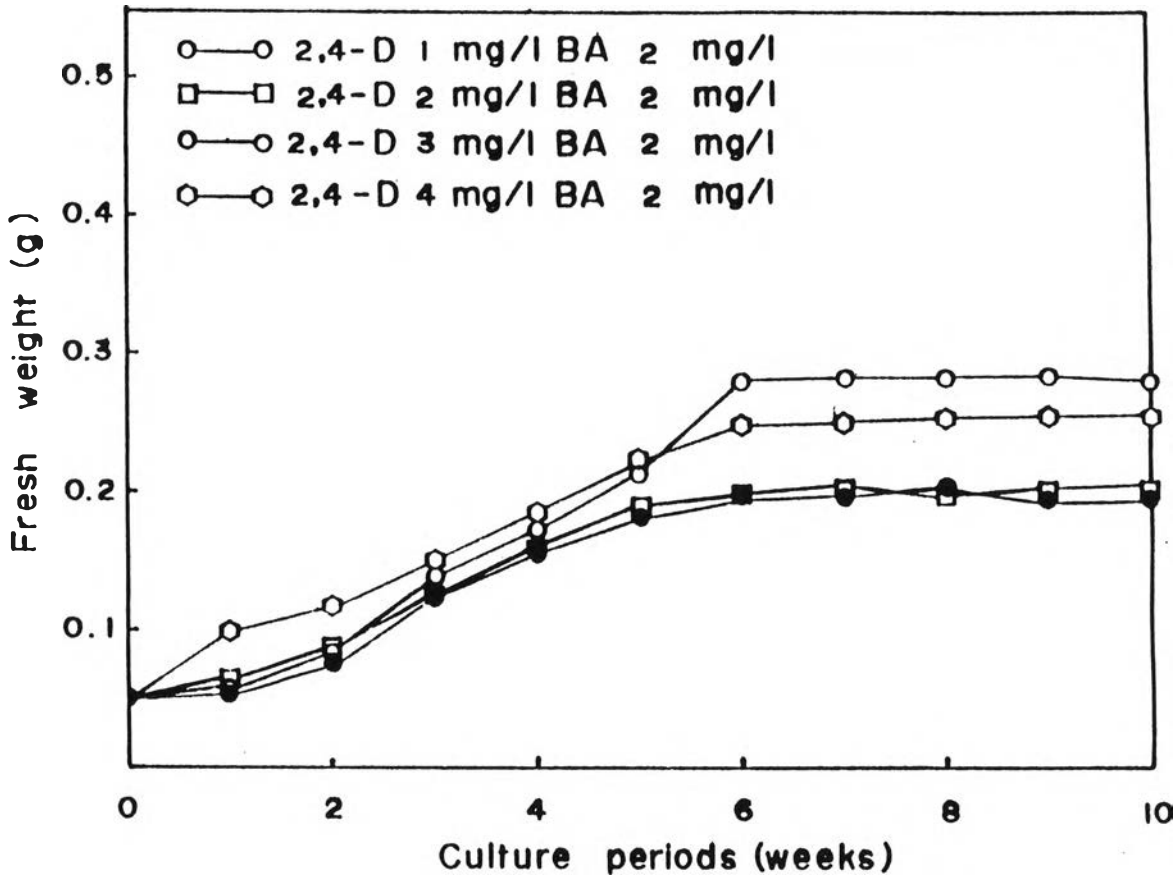
ภาพที่ 7 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต(2,4-D และ BA) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ต่อการชักนำการเกิดแคลลัสจากต้นไข่เน่า อายุ 4 สัปดาห์

ส่วนของใบที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ BA สูงๆ การสร้างแคลลัสมีแนวโน้มลดลง และที่ความเข้มข้นของ BA สูงๆ ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากส่วนของต้นจะเล็กและฟู (friable callus) มีสีเหลืองสด ในขณะที่แคลลัสจากชิ้นส่วนของใบจะมีลักษณะแน่น (compact) มากกว่า

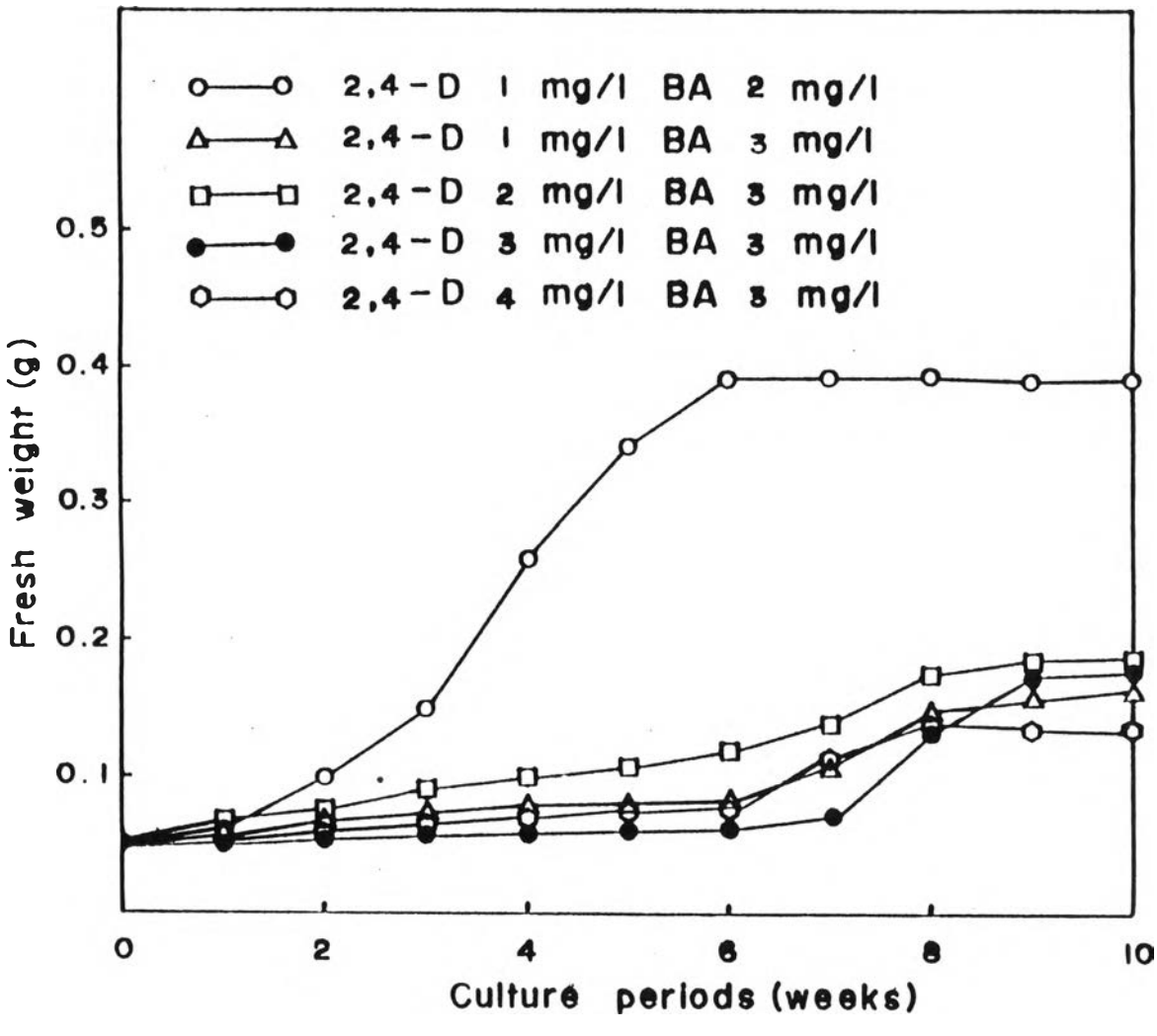
3.1.3 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของแคลลัสต้นไข่เน่า

แคลลัสจากชิ้นส่วนของใบ ส่วนของต้นและชั้นอีพิเดอร์มิส ที่ได้จากการชักนำในอาหาร 1/2 MS แล้วแปรผันความเข้มข้นของ 2,4-D และ BA เพื่อติดตามอัตราการเจริญ และการเจริญสูงสุดของแคลลัสที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองในภาพที่ 8, 9 และ 10 แสดงให้เห็นว่า แคลลัสจากชิ้นส่วนของใบจะมีอัตราการเจริญสูงกว่าแคลลัสส่วนของต้นที่ทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ ยกเว้นในสภาะที่เลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่มี 2,4-D 1 มก./ล. เสริมกันกับ BA 2 มก./ล. แคลลัสจากส่วนของต้นจะให้อัตราการเจริญสูงสุด เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดที่อัตราส่วนอื่นๆ และที่สภาวะนี้แคลลัสจากส่วนของต้นจะให้การเจริญสูงกว่า การเจริญของแคลลัสจากส่วนของใบที่ทุกสภาวะของการทดลองที่ใช้

สำหรับแคลลัสที่เกิดจากชั้นอีพิเดอร์มิสนั้น พบว่าการเจริญในอาหาร 1/2 MS จะต้องเสริมด้วยความเข้มข้นของ 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. และที่ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างไปกว่านี้ จะให้การเจริญที่ไม่แน่นอน นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าแคลลัสจากชั้นอีพิเดอร์มิสจะมีคุณสมบัติค่อนข้างอ่อนแอ เมื่อเทียบกับในแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนของใบและส่วนของต้น คือแคลลัสจะกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มและผลสุดท้ายจะตายหมด หากได้รับการถ่ายอาหารเพาะเลี้ยงช้ากว่า 8 อาทิตย์ แต่เมื่อนำเอาแคลลัสทั้ง 3 ชนิดมาเจริญควบคู่กันไปและติดตามรูปแบบของการเจริญในอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. เช่นกันแล้ว จะเห็นได้ว่าการเจริญของแคลลัสส่วนของต้นจะมีอัตราการเจริญและการเจริญสูงสุดดีที่สุด โดยที่แคลลัสชิ้นส่วนของใบจะปรับตัวต่ออาหารและแบ่งเซลล์ได้อัตราการเจริญระยะต้นสูงกว่า แต่ผลสุดท้ายจะให้ค่าการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกัน (รูปที่ 10) เป็นที่น่าสังเกตว่าแคลลัสส่วนของต้นสามารถเจริญได้ถึงเกือบ 8 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น ในขณะที่แคลลัสชิ้นส่วนของใบและชั้นอีพิเดอร์มิสจะมีการเจริญได้ประมาณ 6 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้นเท่านั้น

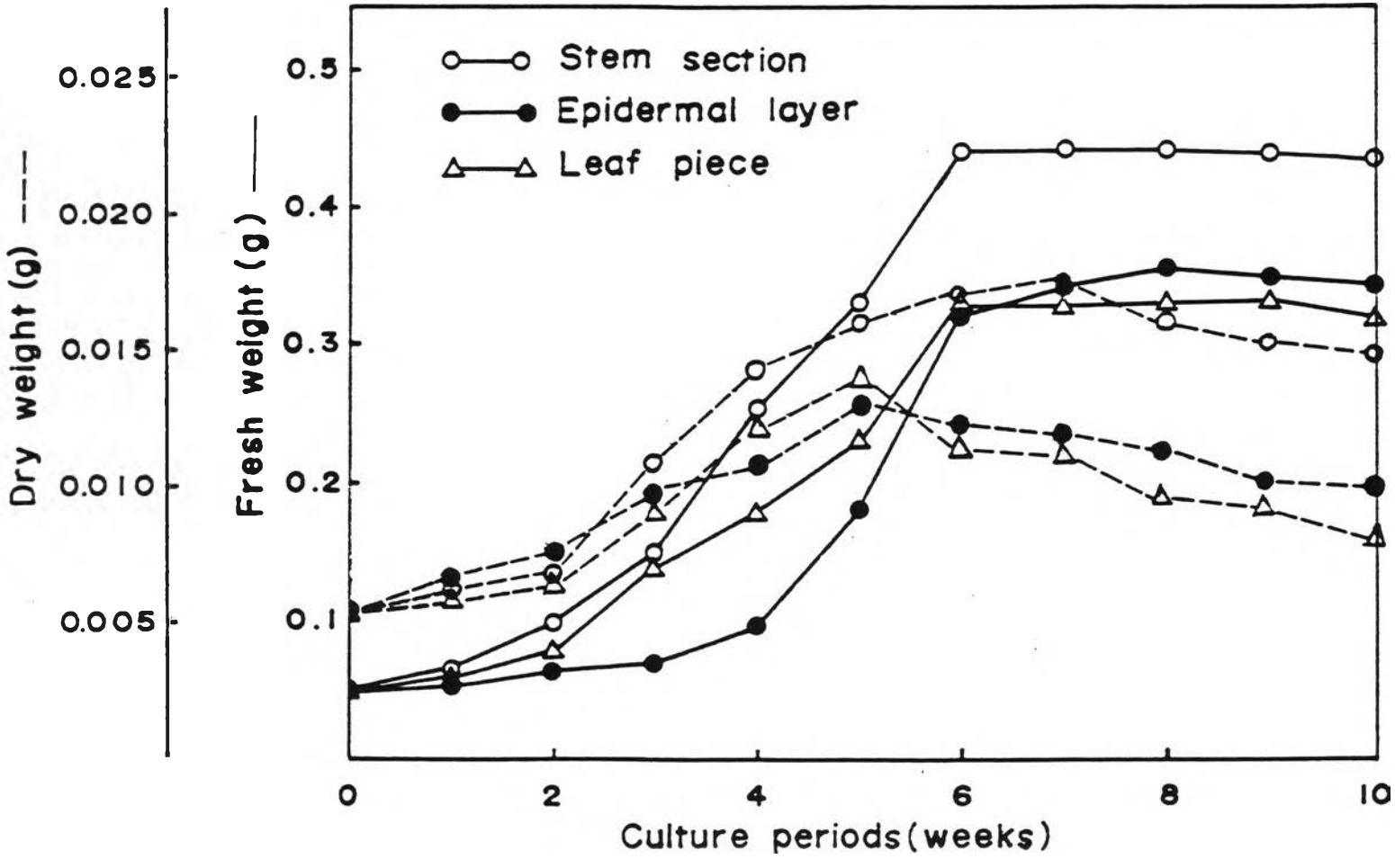


ภาพที่ 8 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เกิดจากใบ บนอาหาร 1/2MS ที่มีระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1,2,3,4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมแสง ความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ



ภาพที่ 9 กราฟการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เกิดจากต้น ในอาหาร 1/2MS ที่มีระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1,2,3,4 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับสูตรที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมแสง ความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ

ภาพที่ 10 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เกิดจากใบ(▵——▵) ชั้นของอีพิเดอร์มิส(●——●) และส่วนของต้น(○——○) บนอาหาร 1/2MS ที่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมแสง ความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ


Stem section
Epidermal layer
Leaf piece
Dry weight (g)
Fresh weight (g)
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2
4
6
8
10
Culture periods (weeks)

ในขณะที่เนื้อเยื่อชั้นอีพิเดอร์มิส ผลสรุปจากการทดลองหลายๆครั้ง พบว่ามีการแปรปรวนของข้อมูลมาก มีอัตราการตายและการปนเปื้อนสูงในบางฤดูกาล แต่สามารถถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในอาหาร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ลักษณะแคลลัสจะผู เช่นเดียวกับส่วนของต้น แต่ไม่ได้ศึกษาและรายงานรายละเอียดของการเจริญไว้ในการวิจัยนี้

3.1.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารอาหารต่อการชักนำการสร้าง และการเจริญเติบโตของแคลลัส

เลี้ยงเนื้อเยื่อของแคลลัสจากเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของใบ ส่วนของต้นและชั้นอีพิเดอร์มิสในอาหาร MS และ 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และBA 2 มก./ล. ระยะเวลาทดลอง 4 สัปดาห์ บันทึกผลเปอร์เซนต์การสร้างแคลลัส และระดับคะแนนการสร้างแคลลัสเฉลี่ย

ผลการทดลอง (ตารางที่ 3) แสดงว่าที่ความเข้มข้นของสารอาหาร 1/2 MS เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของต้นไข่เน่าจากแหล่งเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิดมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นเต็มสูตร ยิ่งไปกว่านั้นผลการทดลองยังแสดงอีกว่าแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนของต้นสามารถถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและเจริญเติบโตได้ดีที่สุด รองลงไปคือแคลลัสชิ้นส่วนของใบและชั้นอีพิเดอร์มิส

3.1.5 อิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของใบ ชั้นของอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้นในอาหารสูตร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ในสภาวะที่ได้รับแสงต่างกันคือ

(1) ได้รับแสง ความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

(2) ในที่มืด

ระยะเวลาการทดลอง 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส และค่าดัชนีการเจริญเติบโต

ผลการทดลอง(ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าแสงมีอิทธิพลในการชักนำแคลลัสจากเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าทั้งสามชนิดแตกต่างกัน ในที่มืดชิ้นส่วนของใบและชั้นอีพิเดอร์มิส

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้นของสารอาหารต่อการชักนำการสร้างแคลลัส เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS และ 1/2MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ อายุ 4 สัปดาห์

Plant part.	MS+ 1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BA			1/2MS+ 1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BA		
	Callusing (%)	Average callus score	GI	Callusing (%)	Average callus score	GI
Leaf piece	0	-	-	10.04	0.13	0.87
Epidermal layer	10.02	0.10	0.32	29.42	0.65	1.52
Stem section	23.36	0.27	0.51	86.10	1.73	1.89

ตารางที่ 4 แสดงผลของแสงต่อการชักนำการสร้างแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหาร 1/2MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องที่มีแสง 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวันและในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ อายุ 4 สัปดาห์

Plant part	Light			Dark		
	Callusing (%)	Average callus score	GI	Callusing (%)	Average callus score	GI
Leaf piece	73.36	1.30	0.02	10.00	0.13	0.20
Epidermal layer	80.92	1.81	1.40	29.42	0.65	0.45
Stem section	93.40	1.37	1.05	86.10	1.73	1.40

หมายเหตุ ระยะเวลาของการเกิดแคลลัสทั้งในที่มีแสงและไม่มีแสงใกล้เคียงกัน คือประมาณ 6-10 วัน

จะถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยกว่าเมื่อมีแสงอย่างชัดเจน ในขณะที่แสงไม่มีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนของต้นมากนัก เนื้อเยื่อส่วนนี้จะเกิดแคลลัสได้ดีไม่ว่าจะมีแสงหรือไม่ก็ตาม

3.1.6 ผลกระทบของแสงต่อการเจริญของแคลลัส

ทำการทดลองโดยใช้แคลลัสของส่วนของต้นเป็นแม่แบบ ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 1/2 MS ซึ่งเสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.ที่มีแสง 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืดตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2° ซ ทำการทดลอง 10 ชุด ชุดละ 10 ซ้ำ ติดตามการเปลี่ยนแปลงของลักษณะและน้ำหนักแคลลัสที่เกิดได้

ผลการทดลอง (ภาพที่ 11) พบว่า แคลลัสจากส่วนของต้น จะเจริญในที่มีแสงได้ดีกว่าที่มืดที่ทุกช่วงการเจริญ แต่เป็นที่น่าสังเกตุว่ารูปแบบการเจริญของแคลลัสทั้งในที่มืดและในที่สว่างจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันคือเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดที่เวลา 6 สัปดาห์เท่ากัน ถึงแม้ว่าอัตราการเจริญของแคลลัสในที่สว่างจะสูงกว่าก็ตาม

ลักษณะของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืด และที่สว่างมีความแตกต่างกัน แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดจะมีสีขาวใส และลักษณะแคลลัสจะเกาะกันอย่างหลวมๆ ในขณะที่แคลลัสในที่สว่าง จะมีสีเหลืองหรือเหลืองปนเขียวเมื่อสร้างจากเนื้อเยื่อพืชใหม่ๆ และเซลล์เกาะกันแน่นมากกว่า

3.2 การศึกษาลักษณะของแคลลัส

3.2.1 ลักษณะภายนอก

เซลล์พืชมีรูปร่างหลายแบบ ขึ้นกับตำแหน่งและหน้าที่ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ 2 มก./ล. BA เป็นเวลานาน 6 เดือน นำแคลลัสที่ระยะ 4 สัปดาห์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษารูปร่างลักษณะของแคลลัสพบว่ามีหลายแบบที่พบส่วนใหญ่มี 3 แบบ และมีขนาดต่างกันดังนี้

ก. รูปรี (elliptrical cell) ขนาด 50x40, 80x40 ไมโครเมตร

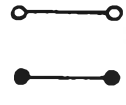
ข. รูปวงกลม (round cell) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30-50 ไมโครเมตร

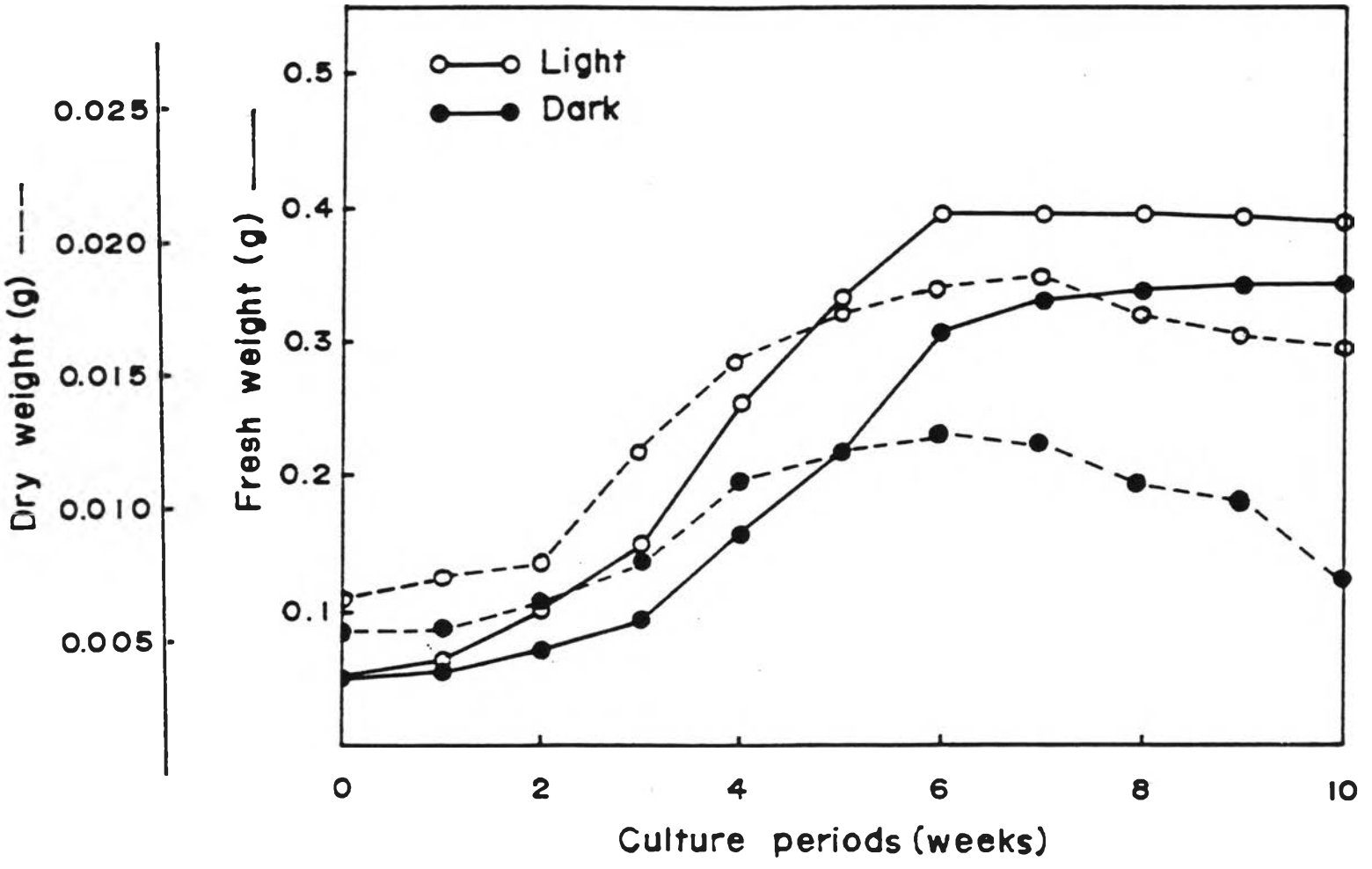
ค. รูปยาว (elongated cell) ขนาด 120x40, 180x40 ไมโครเมตร

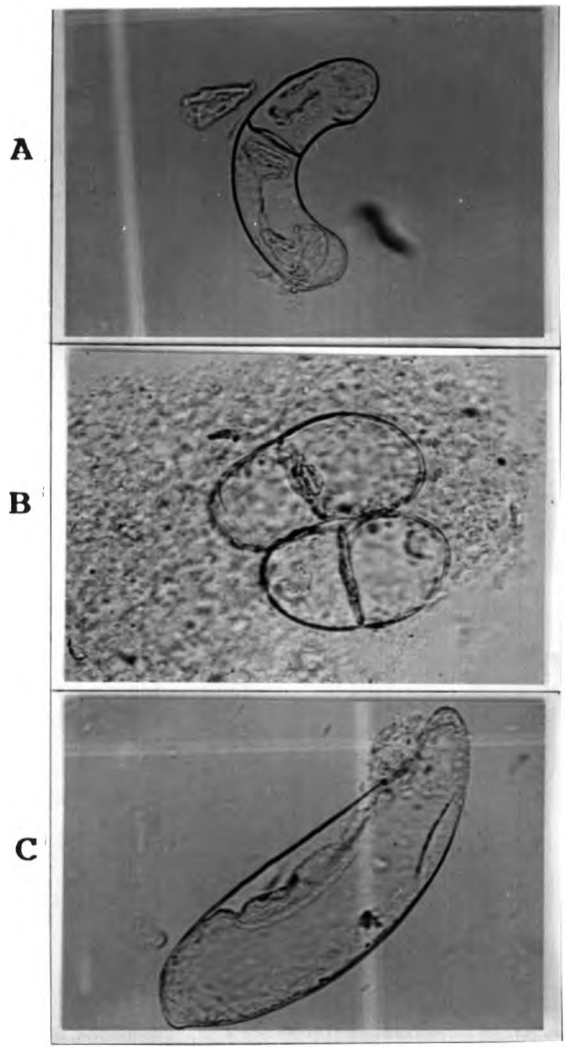
รูปแสดงดังภาพที่ 12 จะพบว่าในแคลลัสทั้ง 3 ชนิดมีเซลล์หลายชนิดปน

I 10311998

ภาพที่ 11 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เกิดจากต้นของไข่เน่าบนอาหาร 1/2 MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องที่มีแสง 2,000 ลักซ์ 16 ชั่งโมงต่อวัน และในที่มืด อุณหภูมิ 25+2 °ซ




Light
Dark
Dry weight (g)
Fresh weight (g)
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2
4
6
8
10
Culture periods (weeks)



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า อายุ 4 สัปดาห์

A เซลล์รูปร่างยาว (x100)

B เซลล์รูปร่างกลม (x100)

C เซลล์รูปร่างรี (x200)

กัน ในแคลลัสจากชั้นอีพิเดอร์มิส เซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์กลมและมีขนาดเล็กกว่าในส่วนอื่นๆ คือมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30-40 ไมโครเมตร เซลล์รูปร่างอื่นๆ พบบ้างแต่มีจำนวนน้อย เซลล์ในแคลลัสส่วนของต้นมีลักษณะคล้ายในแคลลัสชั้นอีพิเดอร์มิสคือพบเซลล์ลักษณะกลมเป็นส่วนใหญ่ และเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 ไมโครเมตรขึ้นไป สำหรับแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบพบว่ามีความแตกต่างจากส่วนอื่นๆ คือเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปยาวต่อกันเป็นสาย รองลงมาคือเซลล์กลมที่มีขนาดแตกต่างกันทั้งขนาดเล็กและใหญ่อยู่รวมกัน

3.2.2 ลักษณะภายในเซลล์

จากการศึกษาลักษณะโครโมโซมของแคลลัสส่วนของต้นที่ระยะ 4 สัปดาห์ แม้ว่าจะไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจน แต่เมื่อเทียบกับรายงานจำนวนโครโมโซมของพืชสกุล Vitex ว่ามีจำนวนโครโมโซม 2N = 32-34 แท่ง (Moore,1973) แล้วจะเห็นว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีจำนวนแท่งของโครโมโซมประมาณ 32 แท่งซึ่งใกล้เคียงกับที่มีรายงาน (ภาพที่ 13)

3.2.3 ปริมาณน้ำ (water content) ในแคลลัส

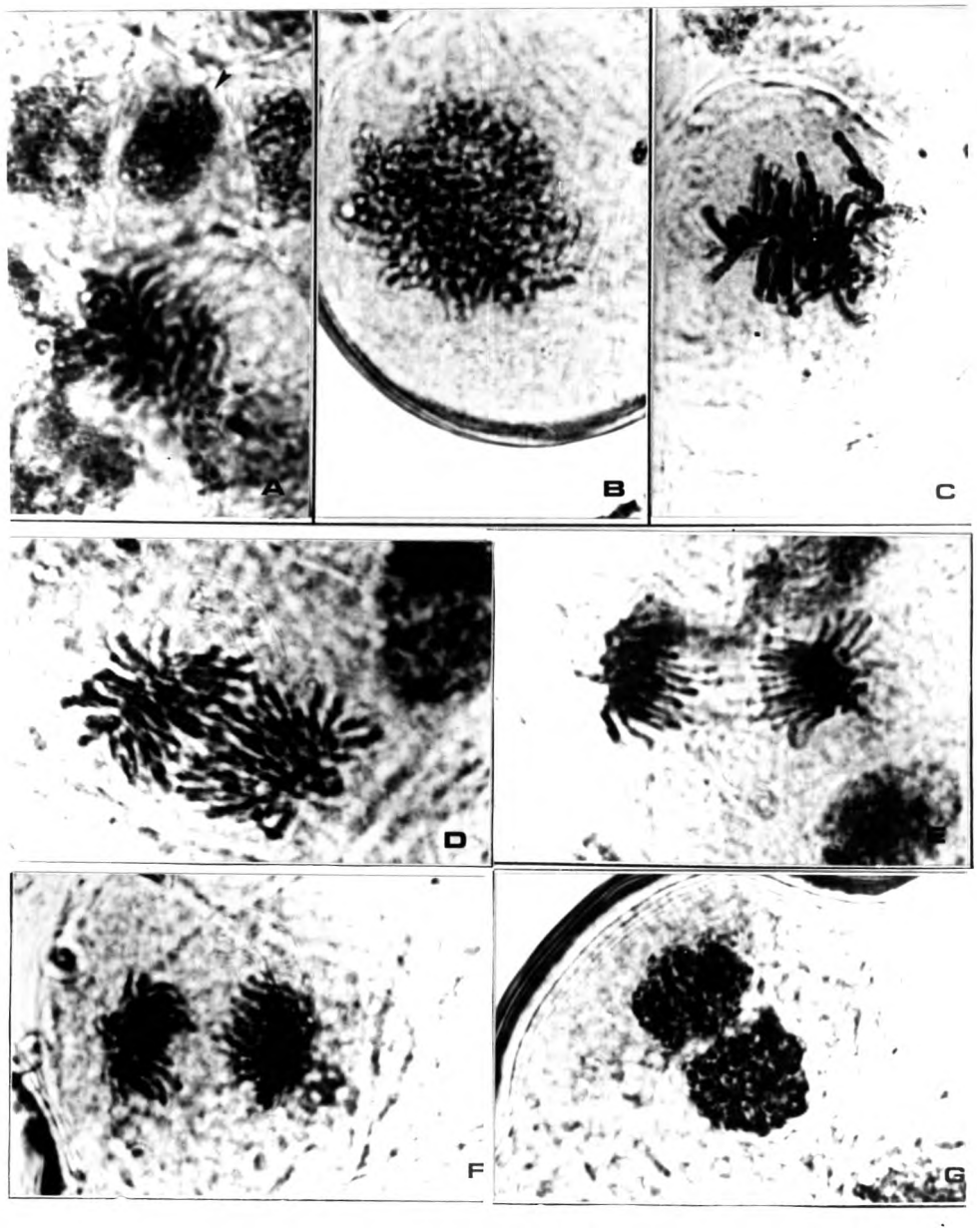
ทำการทดลองเพื่อหาปริมาณน้ำ ที่มีในแคลลัสที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของต้นไข่เน่า โดยนำแคลลัสแต่ละส่วนอายุ 4 สัปดาห์ ชั่งหาน้ำหนักสดเริ่มต้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °ซ ชั่งหาน้ำหนักแห้งทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลต่างที่ได้คือปริมาณน้ำในแต่ละส่วน

ผลการทดลองพบว่ามีน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้นไม่เกิน 50 กรัมจะให้น้ำหนักแห้งคงที่ภายใน 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 5) แสดงว่าแคลลัสที่เกิดจากชั้นอีพิเดอร์มิสมีปริมาณน้ำในเซลล์มากที่สุดคือ 98.04 เปอร์เซนต์ ใกล้เคียงกับแคลลัสจากส่วนของต้น คือ 97.06 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบ เท่ากับ 95.94 เปอร์เซนต์

3.3 การพัฒนาวิธีสกัดแยกเบตา-เอคไดโซน

ใช้เปลือกของต้นไข่เน่าครั้งละ 1.0 กรัมแห้งบดละเอียด เป็นตัวแทนแล้วทำการสกัดแยกด้วยสารอินทรีย์ที่สภาวะต่างๆกันคือ

นำสารละลายที่ได้จากการสกัด มาระเหยเอาตัวทำละลายส่วนใหญ่ออกด้วย rotary evaporator และอบต่อจนแห้งที่อุณหภูมิ 60 °ซ ชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วเอาไปวิเคราะห์



ภาพที่ 13 แสดงระยะการแบ่งตัวของเซลล์แคลลัสที่เกิดจากต้นไข่เน่า (2.5x100)x4

A:early prophase B:middle prophase C:metaphase

D,E:anaphase F,G:telophase

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำในเซลล์ส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า

Plant part	No	Wet weight (g)	Dry weight (g)	Water content (%)
Leaf piece	1	46.80	2.37	94.94
	2	50.58	2.18	95.69
	3	52.41	2.50	97.21
			X =	95.94
Stem section	1	52.68	0.90	98.28
	2	56.89	1.43	97.49
	3	48.17	2.21	95.42
			X =	97.06
Epidermal layer	1	49.19	0.73	98.52
	2	43.70	0.97	97.79
	3	50.22	1.09	97.82
			X =	98.04

เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณสารที่แยกได้ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธี 2.15

ผลการทดลองตามตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าสารละลาย เอธานอล 95% ในเครื่อง Soxhlet apparatus นาน 4 ชั่วโมง จะเป็นสภาวะที่ให้ประสิทธิภาพของการสกัดแยกเบตา-เอคไดโซนมากที่สุด

เมื่อทำการทดลองศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดตัวอย่างพืชด้วย Soxhlet apparatus โดยใช้ตัวอย่างเปลือกแห้งบดละเอียด ทำการสกัดด้วยเอธานอล 95% 100 มล. โดยใช้ Soxhlet apparatus ให้ความร้อนด้วย heating mantle เป็นเวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 1-8 ชั่วโมง ผลการทดลอง(ตารางที่ 7 และภาพที่ 14) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มเวลาของการสกัดแยกเบตา-เอคไดโซนด้วยการใช้ เอธานอล 95% ใน Soxhlet apparatus นานขึ้นจาก 4 ชั่วโมงเป็น 6 ชั่วโมง จะได้ปริมาณของเบตา-เอคไดโซนสูงขึ้นจากเดิม 2.30% เป็น 2.50% และเมื่อใช้เวลามากกว่านี้ ก็จะไม่เพิ่มปริมาณของเบตา-เอคไดโซนที่สกัดได้แต่อย่างไร

3.4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตัวอย่างกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์

3.4.1 วิธีการวิเคราะห์ชนิดของเอคไดโซนโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง

ใช้สารมาตรฐานเอคไดสเตอรอยด์ ซึ่งประกอบด้วย มาคีสเตอโรน เอ 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน และ เบตา-เอคไดโซน หยดบนแผ่นโครมาโตกราฟีแผ่นบาง จากนั้นละลายสารสกัดจากส่วนเปลือก โดยใช้ เอธานอล 95% หยดสารละลายตัวอย่างบนโครมาโตกราฟีแผ่นบาง ซิลิกาเจล 60 เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม. บนแผ่นแก้วใสที่มีสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์หยดอยู่ แล้วแยกองค์ประกอบของตัวอย่างที่ใช้ด้วยระบบตัวทำลายที่เหมาะต่อการแยกชนิดตัวอย่างของพืช ตรวจสอบสารที่แยกได้ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตที่ 254 และ/หรือพ่นด้วย กรดกำมะถันเข้มข้น หรือ Vanillin-H_2SO_4 อบที่อุณหภูมิ 110-120 °ซ นาน 10 นาที บันทึกผลที่ได้

ผลทดลองเมื่อวิเคราะห์โครมาโตแกรมของสารตัวอย่างที่ได้และค่า Rf ของสารมาตรฐาน (ตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่ามีระบบตัวทำละลายหลายชนิดที่ใช้แยกส่วนประกอบของตัวอย่างจากต้นไข่เน่าแต่มีระบบที่ดีและแยกเบตา-เอคไดโซนอย่างชัดเจนเพียง 3 ระบบคือ คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(3:1), คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(4:1) และ คลอโรฟอร์ม-เอธานอล (65:35) (ภาพที่ 15.1, 15.2 และ 15.3)

ตารางที่ 6 ปริมาณเบตา-เอคไดโซนในส่วนเปลือกของต้นไข่เน่า เมื่อทดลองสกัดแยกด้วยวิธีการและสภาวะต่างๆกัน แล้วนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

method	sample weight (g)	crude weight (g)	beta-ecdysone (mg/g)	beta-ecdysone (% dry wt.)
1*	1.ØØ 1.ØØ	Ø.1994 Ø.19Ø2	Ø.8446 Ø.8589	Ø.Ø845 Ø.Ø859
			X =	Ø.Ø851
2**	1.ØØ 1.ØØ	Ø.1988 Ø.214Ø	2.8684 2.9426	Ø.2868 Ø.2943
			X =	Ø.2916
3***	1.ØØ 1.ØØ	Ø.214Ø Ø.1198	22.48ØØ 23.45Ø1	2.25 2.35
				x = 2.3Ø

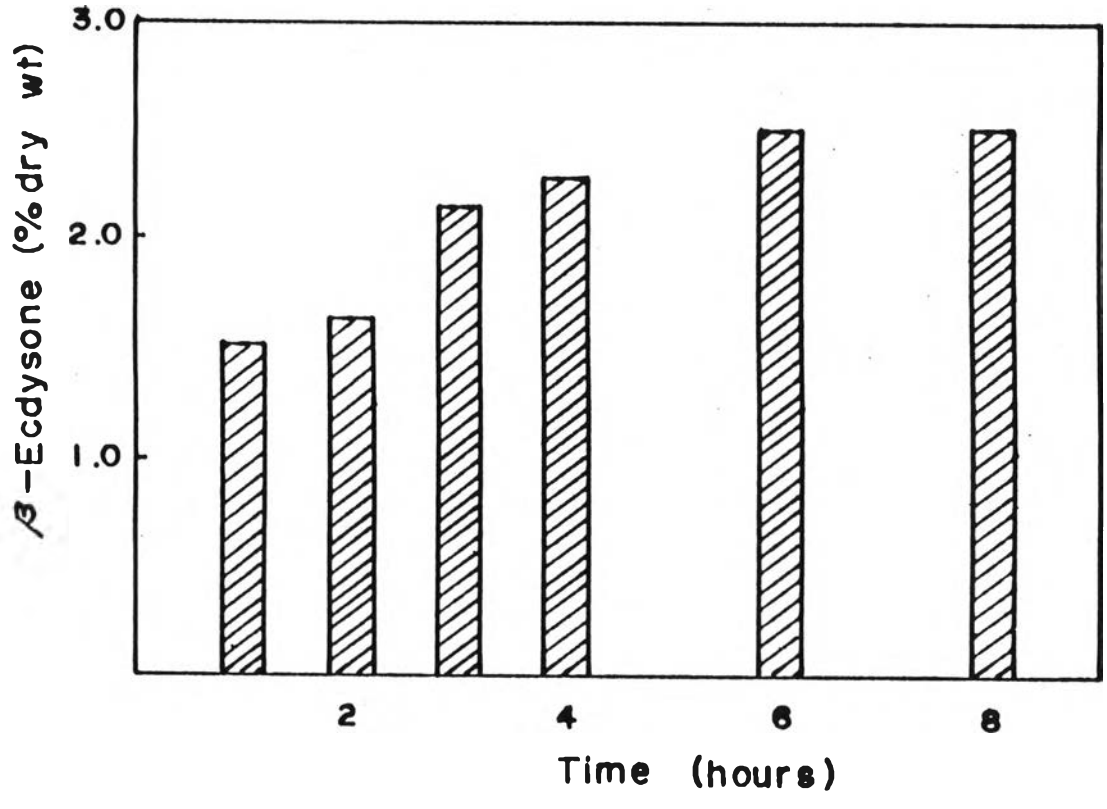
1* แช่ตัวอย่างแห้งใน เมธานอล 70% 50 มล. นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 55 °ซ ครบ 6 ชั่วโมง เปลี่ยนตัวทำละลาย เขย่าต่ออีก 6 ชั่วโมง

2** สกัดแยกสารด้วยเมธานอลสัมบูรณ์ (absolute methanol) 100 มล. โดยใช้ Soxhlet apparatus นาน 4 ชั่วโมง

3*** สกัดแยกสารด้วย เอธานอล 95% 100 มล. โดยใช้ Soxhlet apparatus นาน 4 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณเบตา-เอคไดโซนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ในส่วนเปลือกของต้นไข่เน่า เมื่อสกัดด้วย เอธานอล 95% โดยใช้ Soxhlet apparatus ที่ระยะเวลาต่างๆกัน

Time (hr.)	Sample weight (g)	Crude weight (g)	beta-ecdysone (mg/g)	beta-ecdysone (% dry wt)
1	1.00 1.00	0.1981 0.1883	15.7356 14.6043	1.57 1.45
			X =	1.51
2	1.00 1.00	0.2006 0.1905	14.7557 17.6229	1.48 1.76
			X =	1.62
3	1.00 1.00	0.1897 0.2053	19.8632 22.6004	1.98 2.26
			X =	2.12
4	1.00 1.00	0.2140 0.1198	22.4800 23.4501	2.25 2.35
			X =	2.30
6	1.00 1.00	0.2140 0.1998	25.1200 24.9255	2.51 2.49
			X =	2.50
8	1.00 1.00	0.2105 0.2004	26.2956 24.9404	2.63 2.49
			X =	2.51



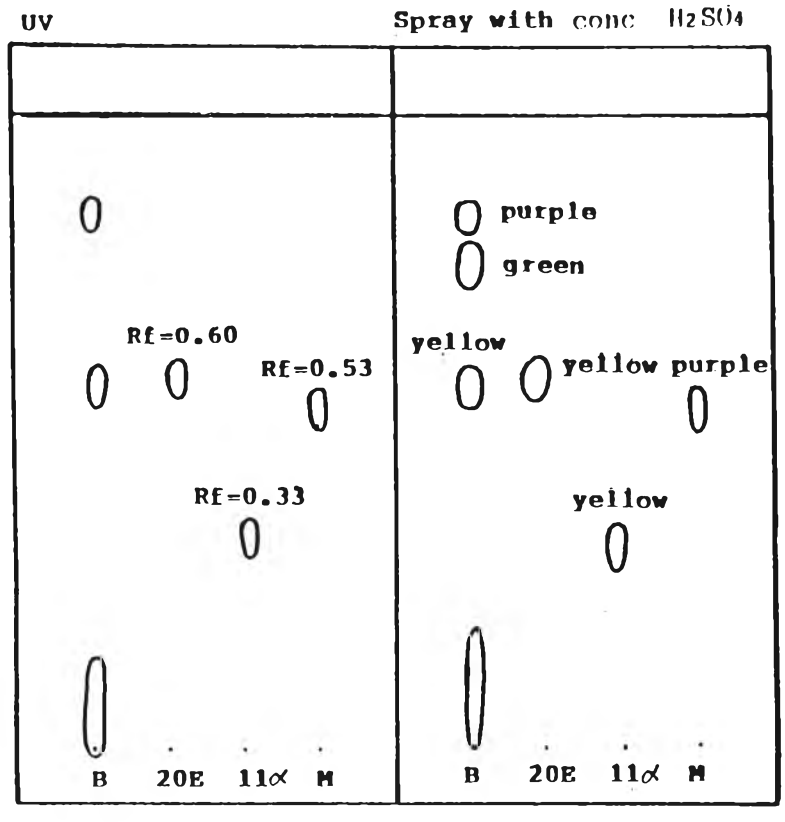
ภาพที่ 14 กราฟแท่งแสดงปริมาณเบตา-เอคไดโซนในส่วนเปลือกของต้นไข่เน่าที่วิเคราะห์ด้วย HPLC เมื่อสกัดแยกด้วย เอธานอล 95% โดยใช้ Soxhlet apparatus เมื่อใช้เวลาในการสกัดต่างกัน

ตารางที่ 8 แสดงชนิดของตัวทำละลาย ซึ่งใช้ในการแยกสารประกอบเอคไดโซนด้วยเทคนิค TLC บนแผ่นแก้วฉาบด้วยสารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม. ใช้สารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน 0.1 มก./มล. ตรวจสอบสารด้วย

1) UV detection ที่ 254 นาโนเมตร

2) สเปรย์ด้วย conc. H_2SO_4

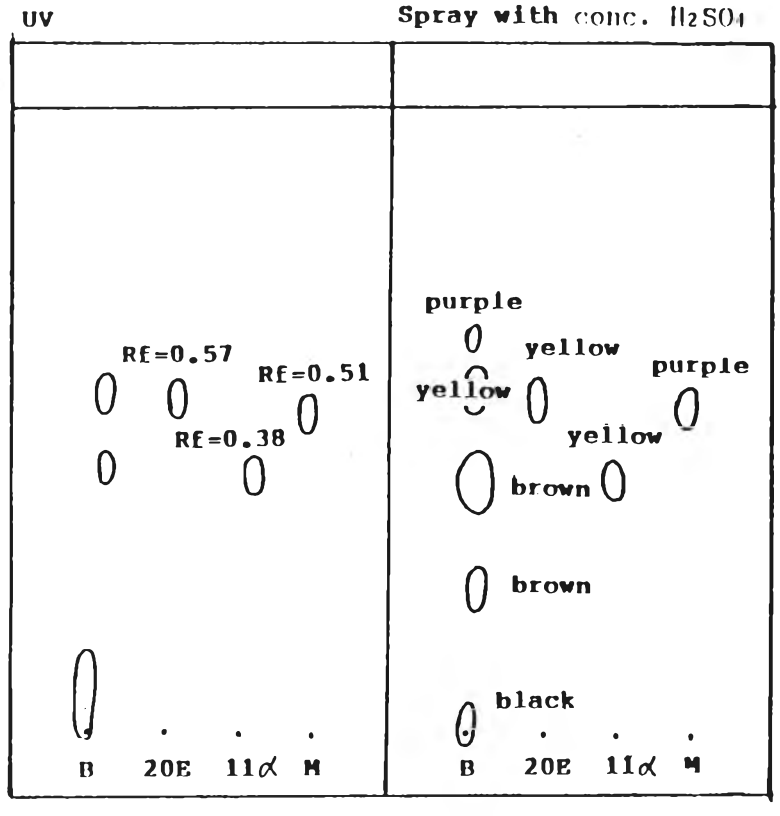
Solvent system	Ratio	Rf of Beta-ecdysone
chloroform:methanol	3:1	0.60
chloroform:methanol	4:1	0.57
chloroform:methanol	20:1	no separation
chloroform:ethanol	17:3	0.82
chloroform:ethanol	65:35	0.67
methanol:water	50:50	0.90
ethanol:water	50:50	0.90
chloroform:methanol:water	6:2:2	0.08
chloroform:methanol:water	6:3:1	0.79
dichloromethane:methanol:hexane	5:1:1	0.06
ethylacetate:ethanol:water	20:80:10	0.80



ภาพที่ 15.1 TLC โครมาโมแกรมของสารสกัดจากส่วนเปลือกของต้นไข่เน่าเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์บนแผ่นแก้วฉาบด้วยสารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม. ระบบตัวชะ: คลอโรฟอร์ม-เมธานอล (3:1) B: เปลือก M: มาคีสเตอโรน เอ 11α: 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน 20E: เบตา-เอคไดโซน

ตรวจสอบสารด้วย 1) UV detection ที่ 254 นาโนเมตร

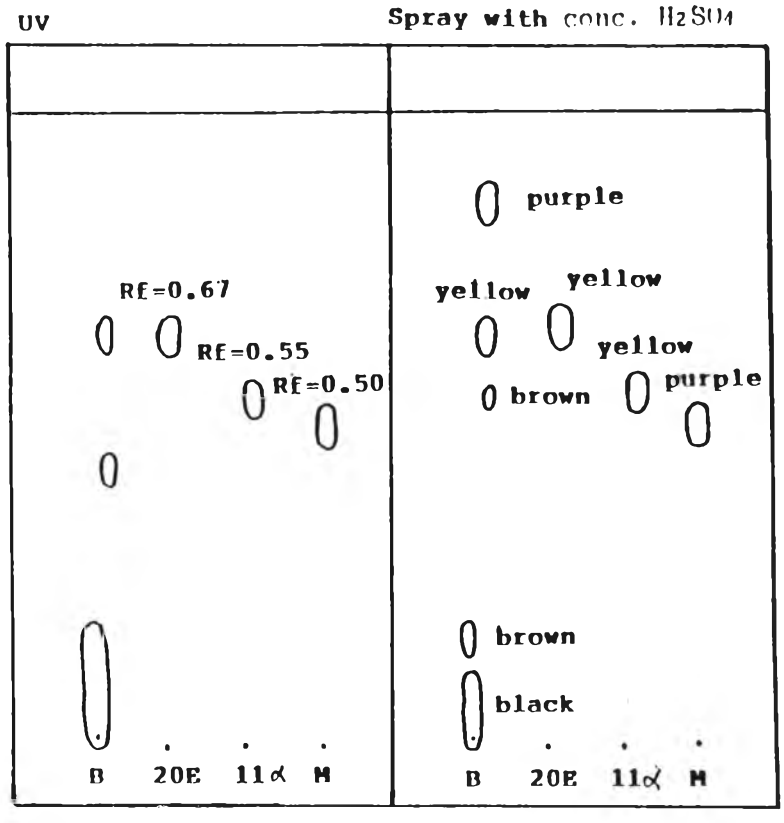
2) สเปรย์ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น



ภาพที่ 15.2 TLC โครมาโมแกรมของสารสกัดจากส่วนเปลือกของต้นไข่เน่าเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์บนแผ่นแก้วฉาบด้วยสารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม. ระบบตัวชะ: คลอโรฟอร์ม-เมธานอล (4:1) B: เปลือก M: มาคีสเตอโรน เอ 11α: 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน 20E: เบตา-เอคไดโซน

ตรวจสอบสารด้วย 1) UV detection ที่ 254 นาโนเมตร

2) สเปรย์ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น



ภาพที่ 15.3 TLC โครมาโมแกรมของสารสกัดจากส่วนเปลือกของต้นไข่เน่าเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์บนแผ่นแก้วฉาบด้วยสารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม. ระบบตัวชะ: คลอโรฟอร์ม-เอธานอล (65:35) B: เปลือก M: มาคีสเตอโรน เอ 11α: 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน 20E: เบตา-เอคไดโซน

ตรวจสอบสารด้วย 1) UV detection ที่ 254 นาโนเมตร

2) สเปรย์ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น

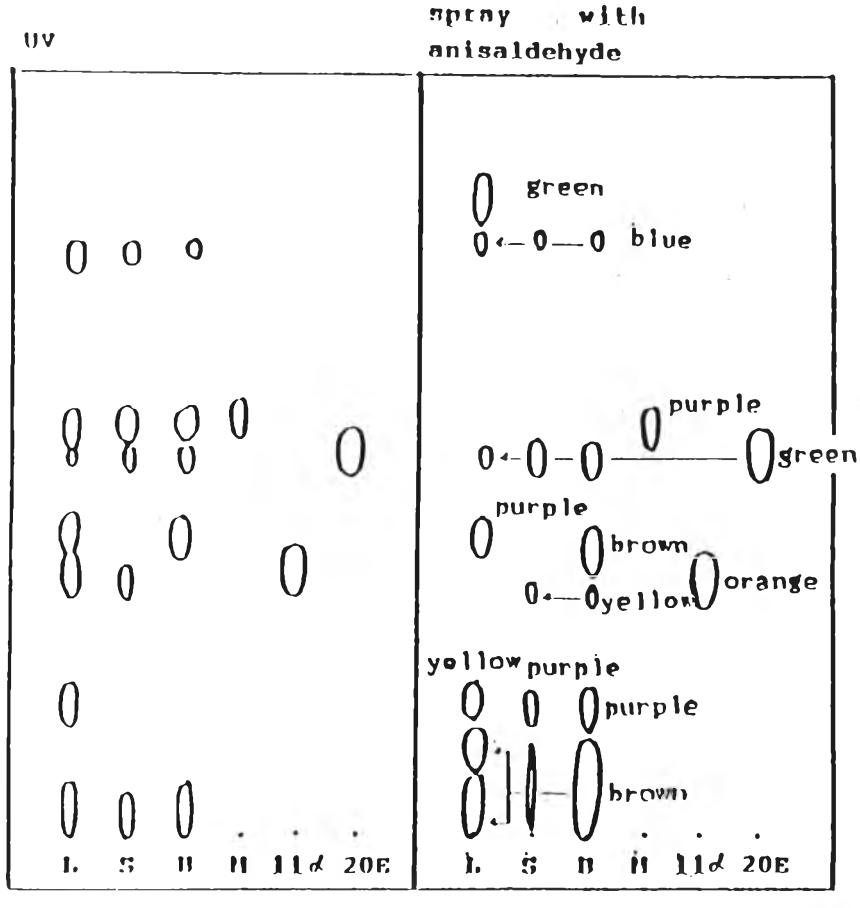
ในการทดลองวิธี TLC พบว่าการใช้แผ่น TLC ซิลิกาเจล 60 เอฟ$_{254}$ บนแผ่นอลูมิเนียมหนา 0.2 มม.สำเร็จรูป จะสะดวก รวดเร็ว และให้ผลการแยกองค์ประกอบได้ดีกว่าการใช้เคลือบบนแผ่นแก้วที่เตรียมขึ้นเอง จุดของสารประกอบเมื่อส่องด้วย UV และพ่นด้วย reagent ชัดเจนกว่า(ภาพที่ 16) จึงได้เลือกใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปในการทดลองเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ anisaldehyde-EtOH-H_2SO_4 พ่นบนแผ่น TLC สำเร็จรูปและนำไปอังความร้อนบนเตาไฟฟ้า เป็นวิธีที่รวดเร็ว และสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบที่แยกได้ชัดเจนมาก เพราะว่าสารแต่ละชนิดจะมีขั้นตอนการเปลี่ยนสีแตกต่างกัน มีประโยชน์ในการวิเคราะห์ว่าเป็นสารชนิดเดียวกันหรือไม่ ตัวอย่าง เช่น เบตา-เอคไดโซน จะเปลี่ยนสีจาก ม่วงชมพูเข้มไปเป็นเขียว 11แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน เปลี่ยนสีจากส้มเป็นส้มอมเขียว และ มาคีสเตอโรน เอ เปลี่ยนสีจากชมพูม่วงเป็นสีม่วง

เมื่อทำการทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธีการใช้ในการตรวจสอบสารประกอบในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ โดยใช้สารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน ผลการทดลอง (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจสอบโดยใช้ UV เป็นวิธีที่มีความไวสูงสุด ส่วนการตรวจสอบชนิดของสารประกอบโดยใช้พ่นด้วยสารเคมีทั้ง 3 ชนิด คือ sulfuric acid Vanillin-Sulfuric acid และ anisaldehyde-EtOH-H_2SO_4 จะให้ sensitivity ใกล้เคียงกันแตกต่างกันที่สีของสารที่ติดตามต่างกันสำหรับสารเคมีที่ใช้ติดตามผลแต่ละชนิด

ผลการทดลองวิเคราะห์ชนิดของสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ในตัวอย่างสกัดจากใบ เปลือก และส่วนของต้นไข่เน่าตามธรรมชาติ โดยเทคนิค TLC แสดงว่ามีเบตา-เอคไดโซน และ 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซนในส่วนเปลือกและส่วนของต้น ส่วนในใบนั้นพบเฉพาะเบตา-เอคไดโซนเท่านั้น และจากการเปรียบเทียบขนาดและความเข้มของสารที่ปรากฏ พบว่ามีเบตา-เอคไดโซนมากที่สุดในส่วนของเปลือก รองลงมาคือส่วนของต้นและใบ ตามลำดับ และตรวจไม่พบมาคีสเตอโรน เอ

3.4.2 <u>วิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดของสารกลุ่มเอคไดสเตอรอนด์ในเนื้อเยื่อพืชและแคลลัสเพาะเลี้ยงโดยวิธี HPLC</u>

เมื่อใช้สารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 ทำการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Zorbax C_{18} ใช้เมธานอล-น้ำ ในอัตราส่วนต่างๆกัน (ภาพที่17)



ภาพที่ 16 TLC โครมาโมแกรมของสารสกัดจากส่วนเปลือกของต้นไข่เน่าเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์บนแผ่นแก้วฉาบด้วยสารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม. ระบบตัวชะ: คลอโรฟอร์ม-เมธานอล (3:1) L: ใบ S: ส่วนของต้น B: เปลือก M: มาคีสเตอโรน เอ 11α: 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน 20E: เบตา-เอคไดโซน ตรวจสอบสารด้วย 1) UV detection ที่ 254 นาโนเมตร 2) สเปรย์ด้วย anisaldehyde

ตารางที่ 9 แสดง sensitivity ของวิธีการที่ใช้ทดสอบสารประกอบในกลุ่มเอคไดโซน เมื่อแยกด้วยเทคนิค TLC บนแผ่นอลูมิเนียมฉาบด้วย ซิลิกาเจล 60 เอฟ$_{254}$ ตัวชะคือ คลอโรฟอร์ม-เมธานอล (4:1) และใช้เครื่องหมายบวกแทน sensitivity ของวิธีที่ใช้

++++ หมายถึง การตอบสนองสูงสุด

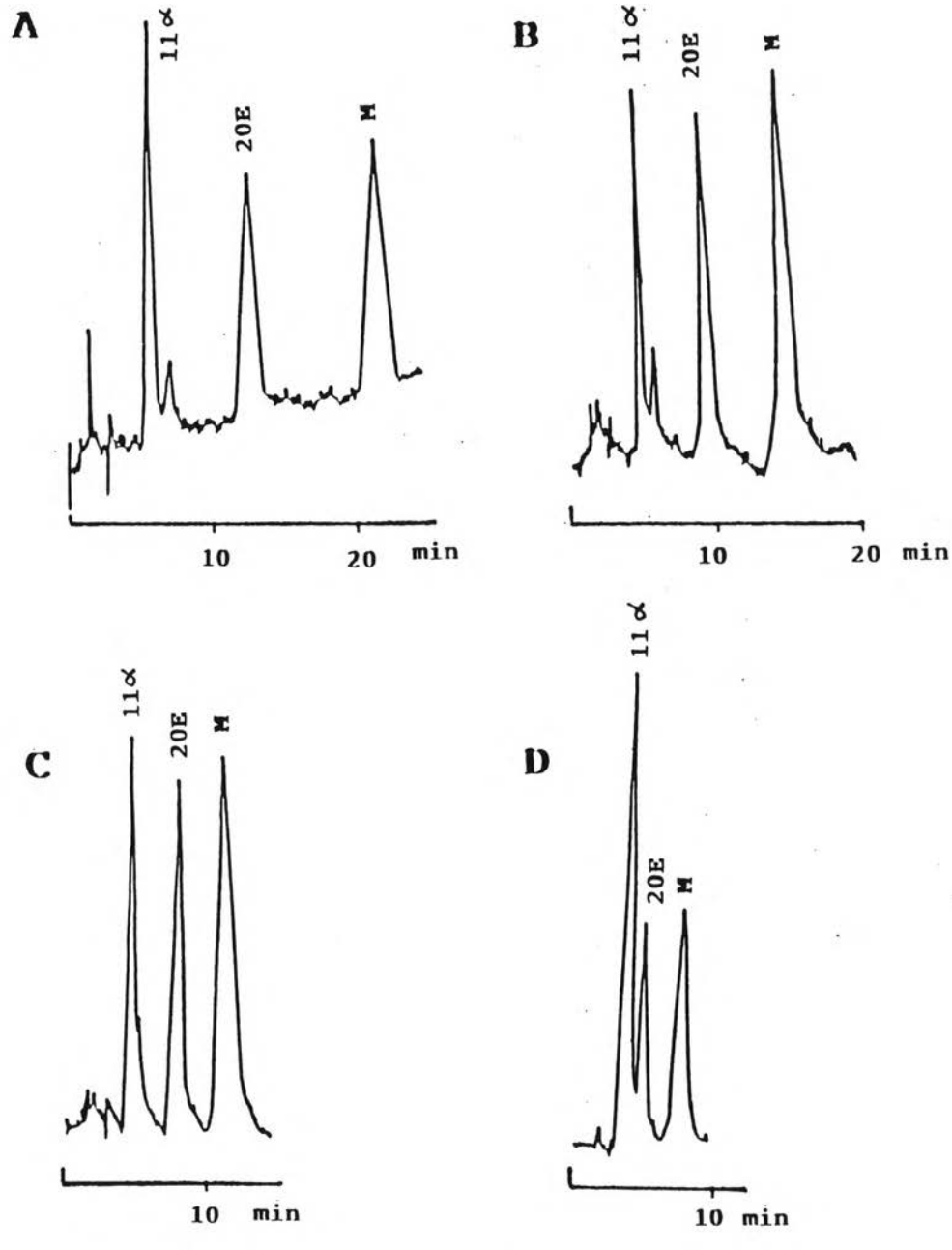
Detection Method	Amount of sample(micrograms)				
	1.00	0.75	0.50	0.25	0.10
UV	++++	++++	+++	+++	++
Sulfuric acid spray	++++	++++	+++	++	+
Vanillin-Sulfuric acid spray	++++	++++	+++	++	+
Anisaldehyde acid spray	++++	++++	+++	++	+

จากผลการทดลองในภาพที่ 17 แสดงให้เห็นว่าเมธานอล-น้ำ (45:55) เป็นระบบตัวชะ ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ ภาพที่ 18 แสดงโครมาโตแกรมรวมของสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ ในระบบตัวชะ เมธานอล-น้ำ(45:55)

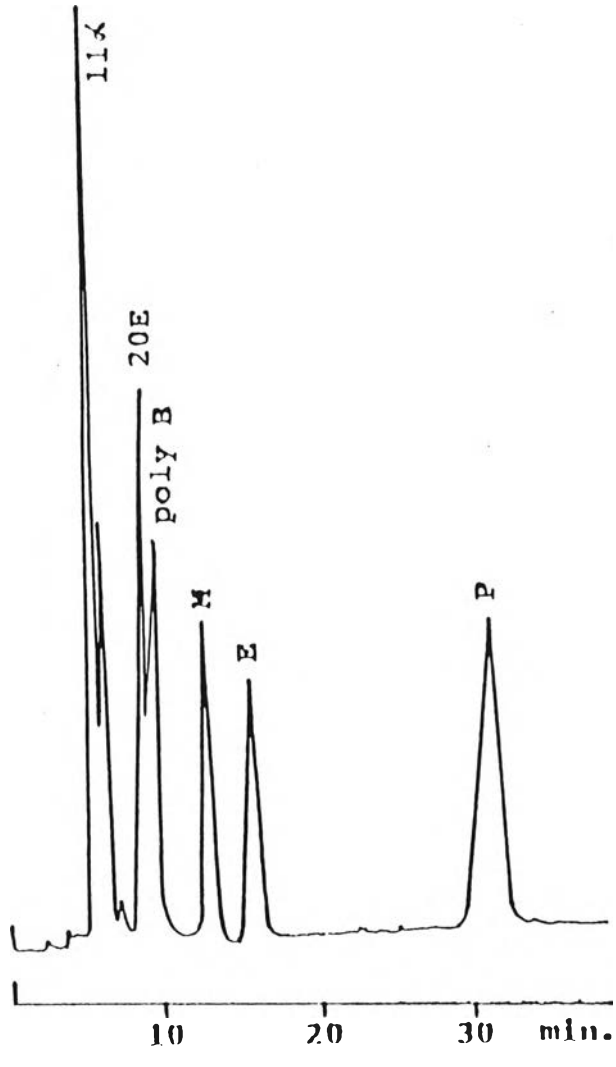
เมื่อนำตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อพืชส่วนใบ เปลือก และส่วนของต้น อย่างละ 1 กรัม มาสกัดแยกสารประกอบออกมาด้วย เอธานอล 95% และตรวจวิเคราะห์ชนิดและระดับสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีข้อ 2.15 เทียบกับสารมาตรฐาน เบตา-เอคไดโซน ลักษณะโครมาโตแกรมของสารประกอบมาตรฐานในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC แสดงดังภาพที่ 19 จะเห็นว่าระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ(45:55) สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ในส่วนเปลือกและส่วนของต้นได้อย่างดี เมื่อใช้มาคีสเตอโรน เอ เป็นสารมาตรฐานภายใน ในส่วนใบโครมาโตแกรมที่ได้จะไม่แสดงตำแหน่งของเบตา-เอคไดโซนอย่างชัดเจน เพราะในส่วนนี้มีสารปนเปื้อนอยู่หลายชนิดเมื่อเทียบกับตัวอย่างจากเปลือกและส่วนของต้น นอกจากนี้ยังมีพีคใหญ่ที่ตำแหน่งใกล้กับพีคของเบตา-เอคไดโซน ซึ่งมีผลรบกวนการตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบตัวทำละลายชนิดนี้ เพราะสารปนเปื้อนเหล่านั้น จะทำให้ตำแหน่งและพื้นที่ใต้กราฟของพีคเบตา-เอคไดโซนที่อ่านได้คลาดเคลื่อน

แม้ว่าจะแปรเปลี่ยนอัตราส่วนของระบบตัวชะหลาย ๆ ค่าแล้ว ก็ยังไม่สามารถแยกพีคของเบตา-เอคไดโซนและสารมาตรฐานมาคีสเตอโรน เอ ออกอย่างชัดเจน เมื่อทำการเปลี่ยนชนิดของระบบตัวชะจากเมธานอลไปใช้อะซิโตรไนไตรล์-น้ำโดยการเติมกรดอะซิติคในระบบตัวชะด้วย ได้ทำการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวแล้วข้างต้น พบว่าระบบตัวชะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนในส่วนใบคือ อะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2%(18.5:81.5) อัตราการไหล 1 มล./นาที ดังภาพที่ 20

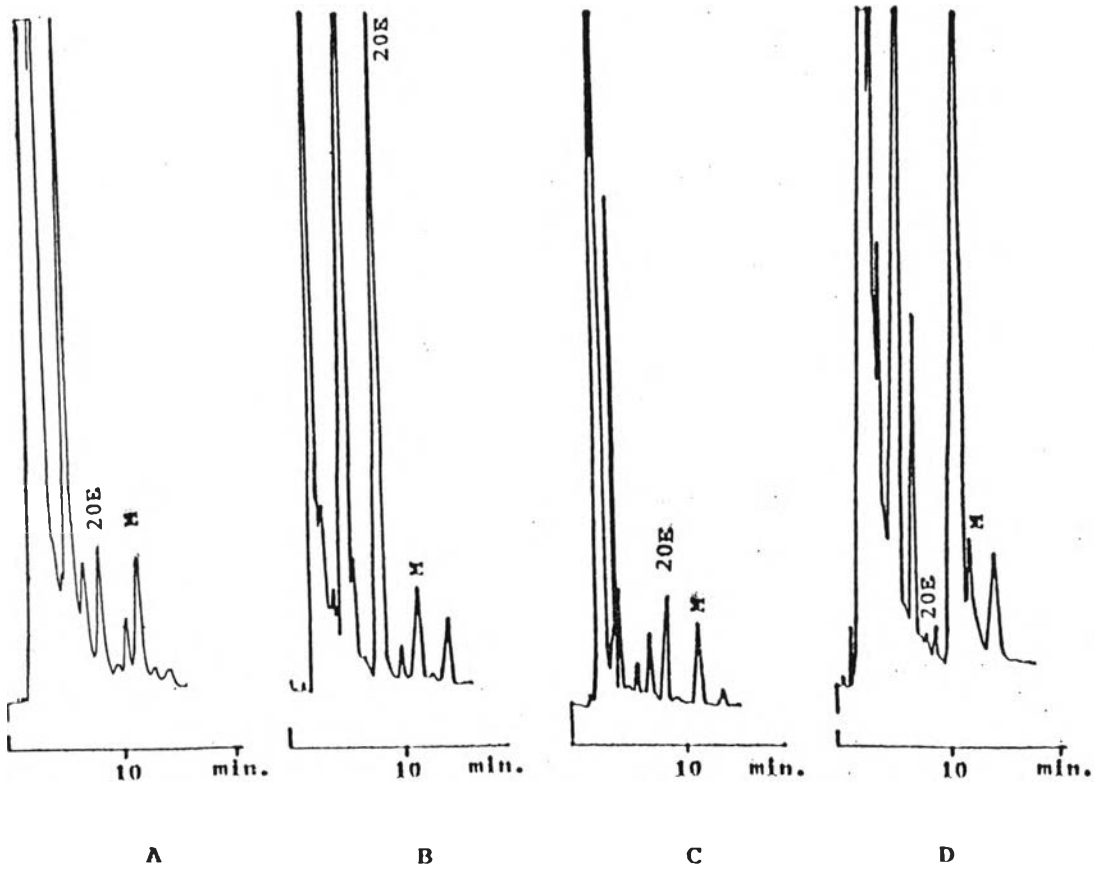
ภาพที่ 22 และ 23 แสดงการคัดเลือกระบบตัวชะ ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้แคลลัสส่วนของต้นเป็นแม่แบบ จะเห็นได้ว่าเทคนิควิธีตรวจวิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนที่พัฒนาขึ้นใช้กับตัวอย่างพืชธรรมชาติสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนได้โดยไม่มีอุปสรรคใดๆ



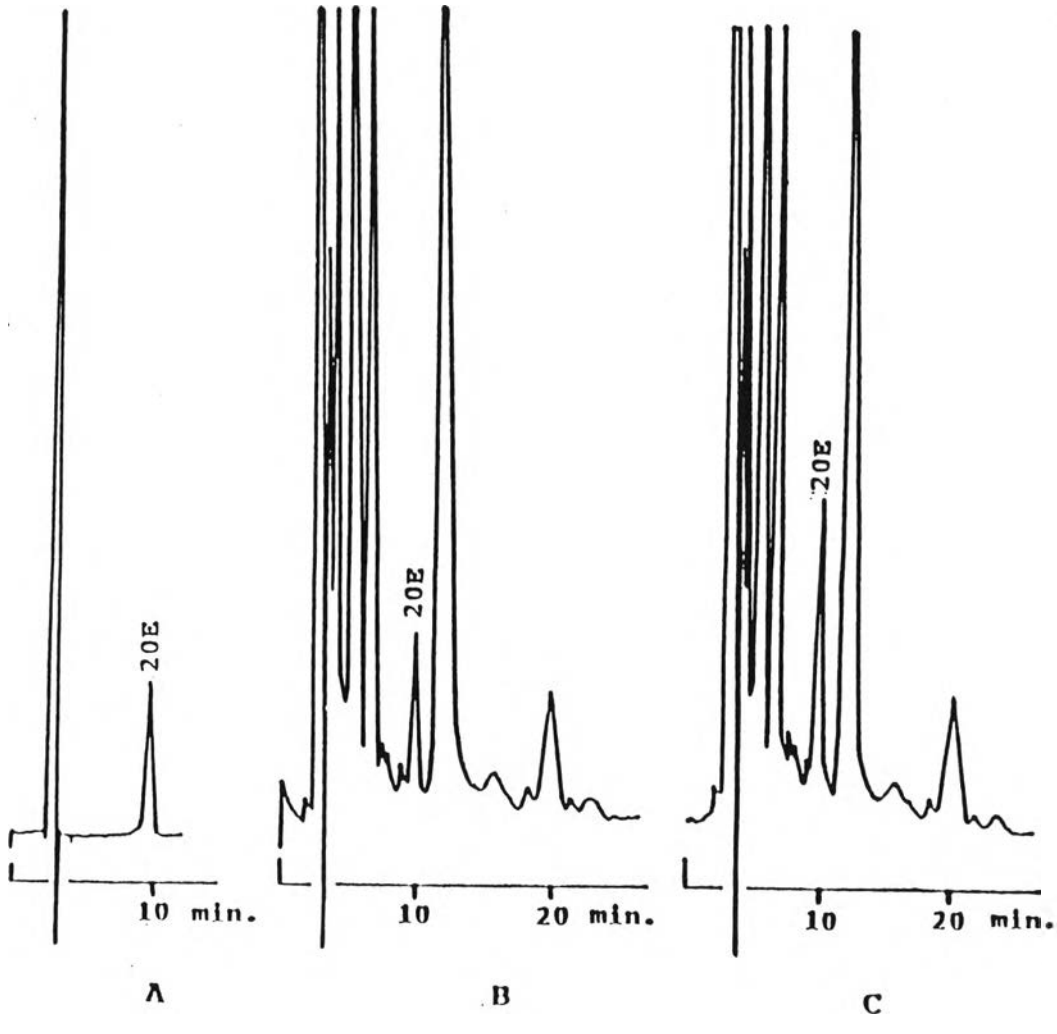
ภาพที่ 17 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเอคไดสเตอรอยด์ในระบบตัวชะต่างกัน
คือ A: เมธานอล-น้ำ(38:62) B: เมธานอล-น้ำ(40-60)
C: เมธานอล-น้ำ(45-55) D: เมธานอล-น้ำ(50-50)
อัตราการไหล 1 มล./นาที 11∝: 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน
20E: เบตา-เอคไดโซน M: มาคีสเตอโรน เอ



ภาพที่ 18 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเอคไดสเตอรอยด์ ในสภาวะดังนี้ คอลัมน์: Zorbax C_{18} (4.6 มม.x25 ซม.) ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ (45:55) อัตราการไหล:1 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย: UV monitor ที่ 254 นาโนเมตร; 11α: 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน 20E: เบตา-เอคไดโซน M: มาคีสเตอโรน เอ poly B: โพลีโพดีน บี E: แอลฟา-เอคไดโซน P: โพแนสเตอโรน เอ



ภาพที่ 19 HPLC โครมาโตแกรมส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า สภาวะที่ใช้คือ คอลัมน์: Zorbax C_{18} (4.6 มม.x25 ซม.) ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ (45:55) อัตราการไหล: 1 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย: UV monitor ที่ 254 นาโนเมตร; โดยใช้มาคีสเตอโรน เอ เป็นสารมาตรฐานภายใน A: ชั้นของอีพิเดอร์มิส B: เปลือก C: ส่วนของต้น D: ใบ

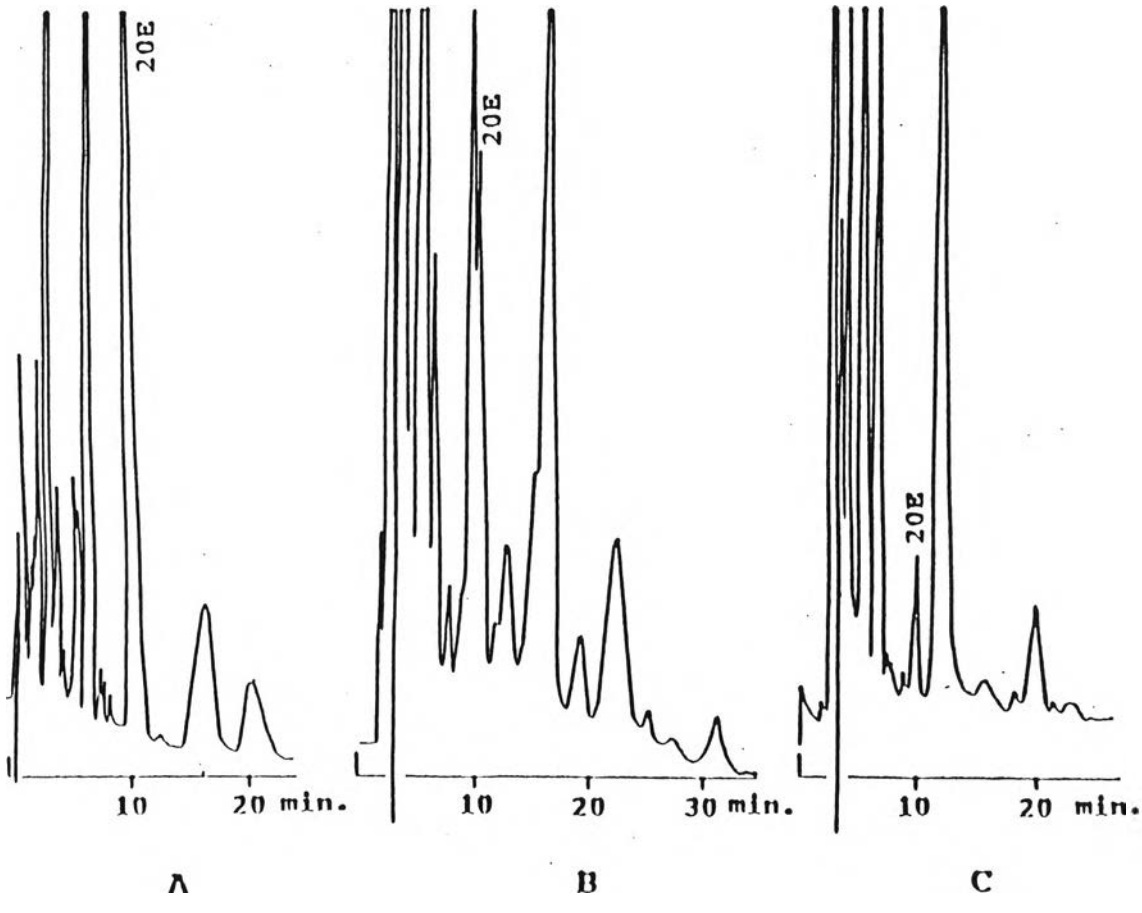


ภาพที่ 20 HPLC โครมาโตแกรมส่วนใบของต้นไข่เน่า
สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์-น้ำ ที่มีกรดอะซิติค 2% (18.5:81.5) อัตราการไหล: 1 มล./นาที
ตรวจสอบสารด้วย: UV monitor ที่ 254 นาโนเมตร

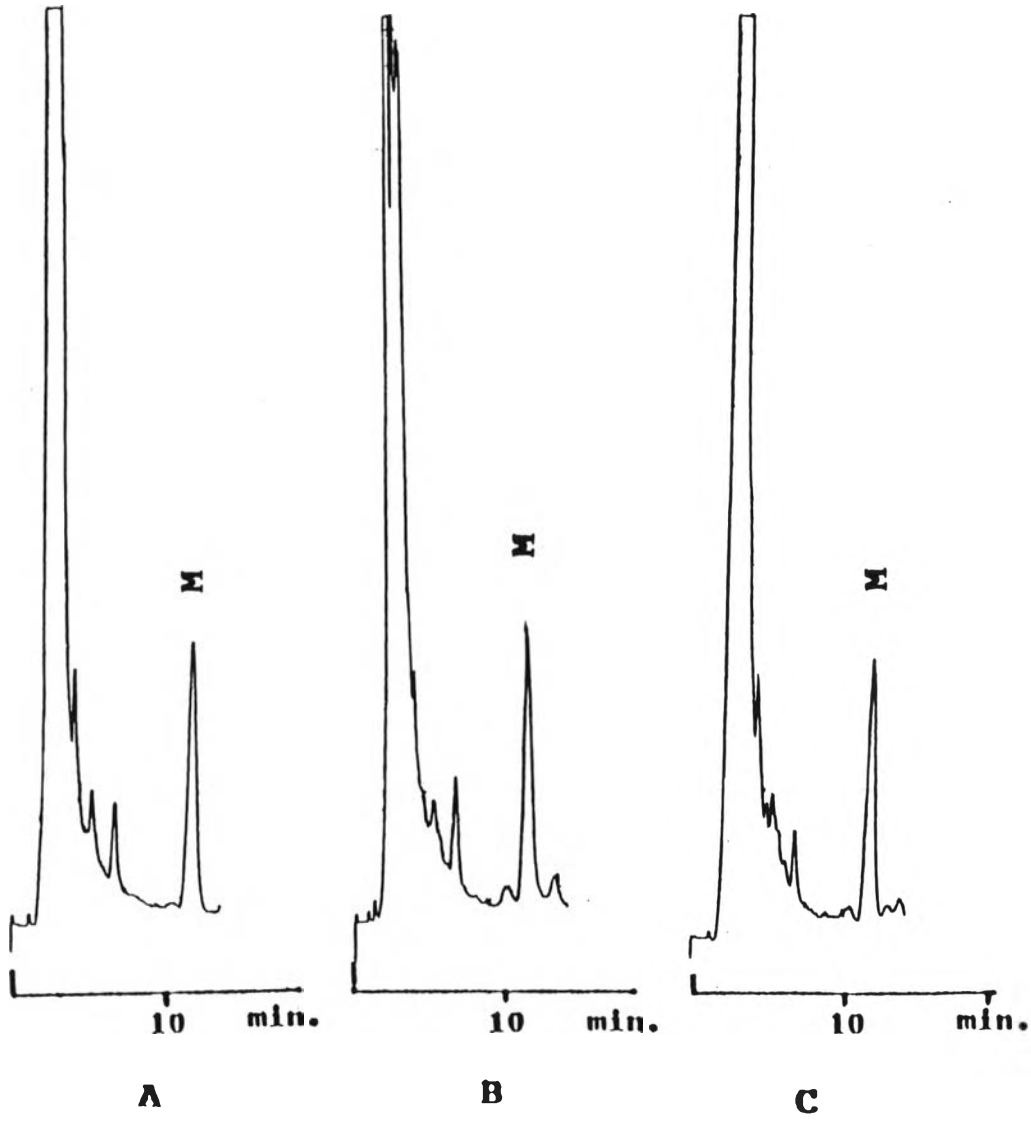
A: สารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

B: สารสกัดจากใบก่อนเติมสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

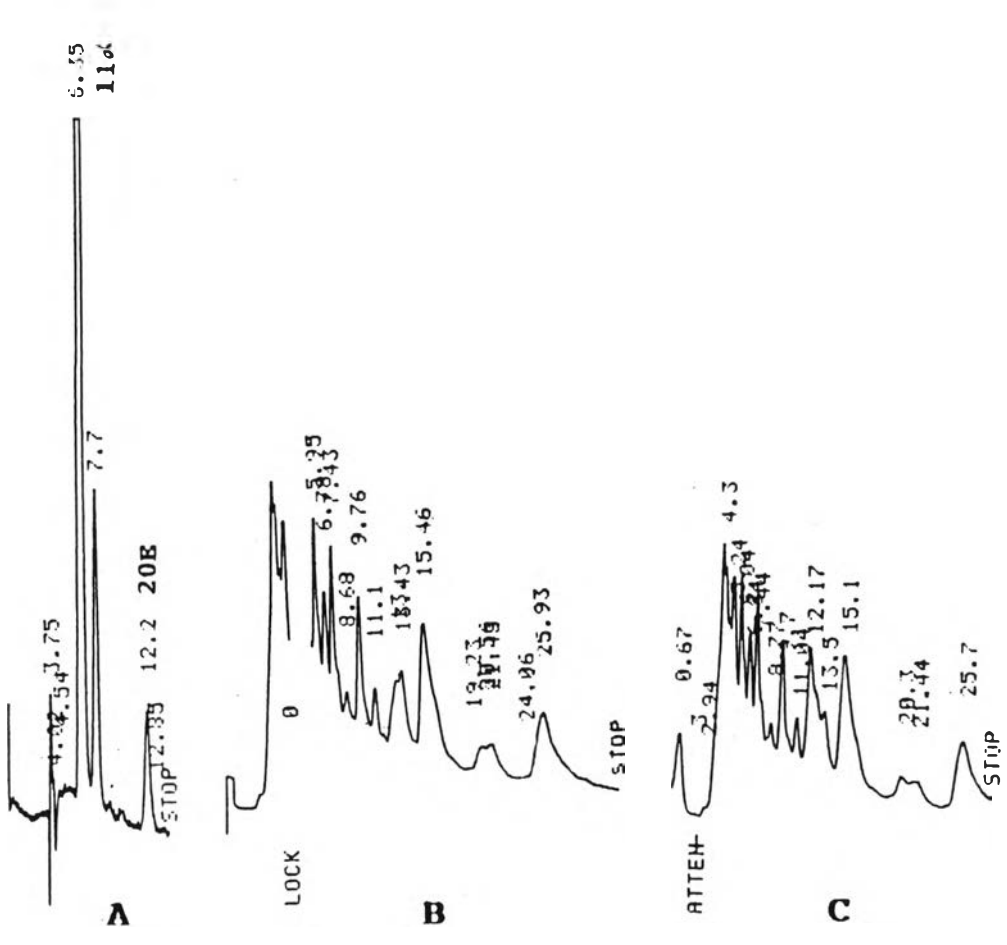
C: สารสกัดจากใบหลังเติมสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน



ภาพที่ 21 HPLC โครมาโตแกรมส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า
สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์-น้ำ
ที่มีกรดอะซิติค 2% (18.5:81.5) อัตราการไหล: 1 มล./นาที
ตรวจสอบสารด้วย: UV monitor ที่ 254 นาโนเมตร
A: เปลือก B: ส่วนของต้น C: ใบ



ภาพที่ 22 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสของต้นไข่เน่า
สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ(45:55)
อัตราการไหล: 1 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย: UV monitor ที่ 254 นาโนเมตร
โดยใช้มาคีสเตอโรน เอ เป็นสารมาตรฐานภายใน
A: สารสกัดจากแคลลัสชั้นส่วนของใบ
B: สารสกัดจากแคลลัสชั้นอีพิเดอร์มิส
C: สารสกัดจากแคลลัสส่วนของต้น

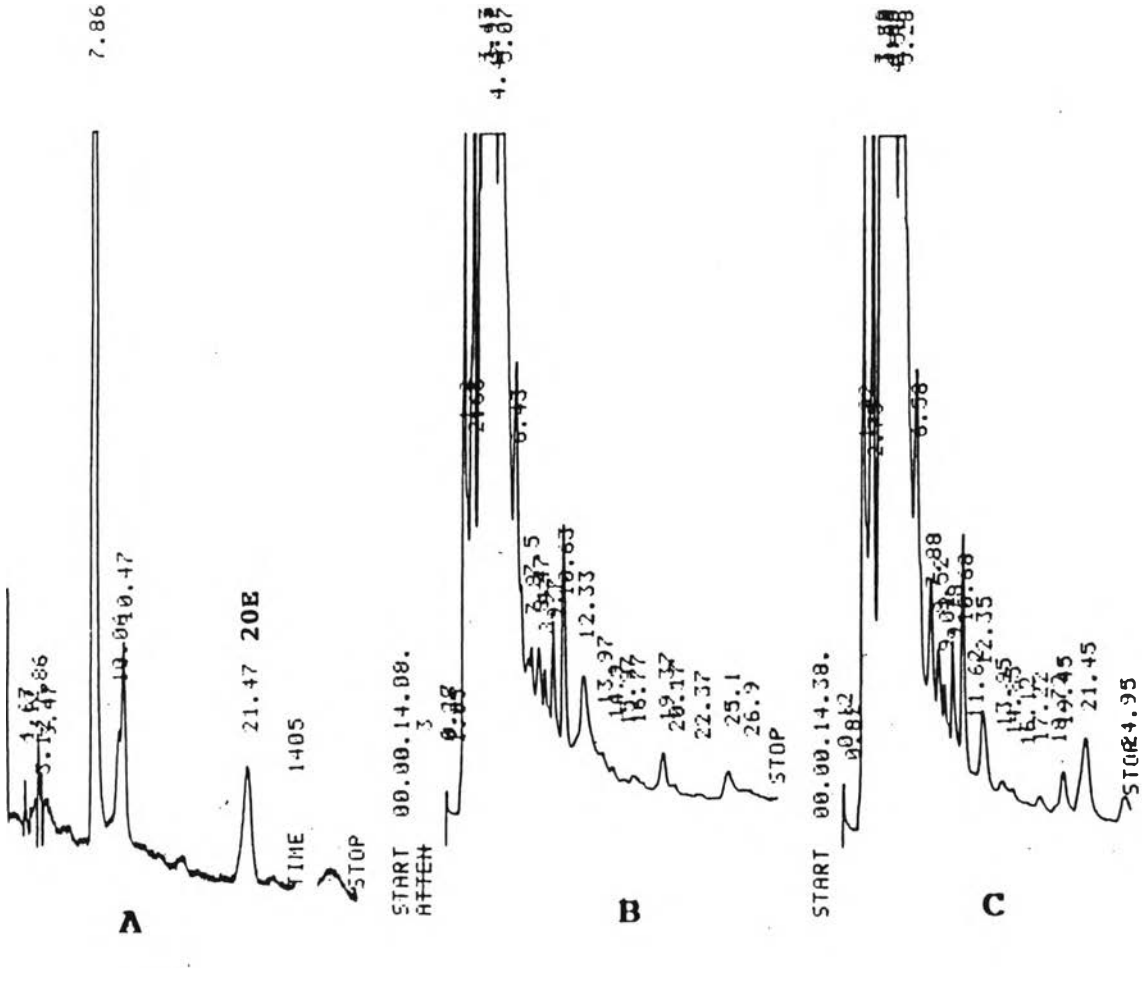


ภาพที่ 23.1 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากต้นของไข่เน่า ที่อายุ 4 สัปดาห์ สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2%(45:55) อัตราการไหล: 1 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย: UV monitor ที่ 254 นาโนเมตร

A: สารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

B: สารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากต้นก่อนเติมสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

C: สารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากต้นหลังเติมสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

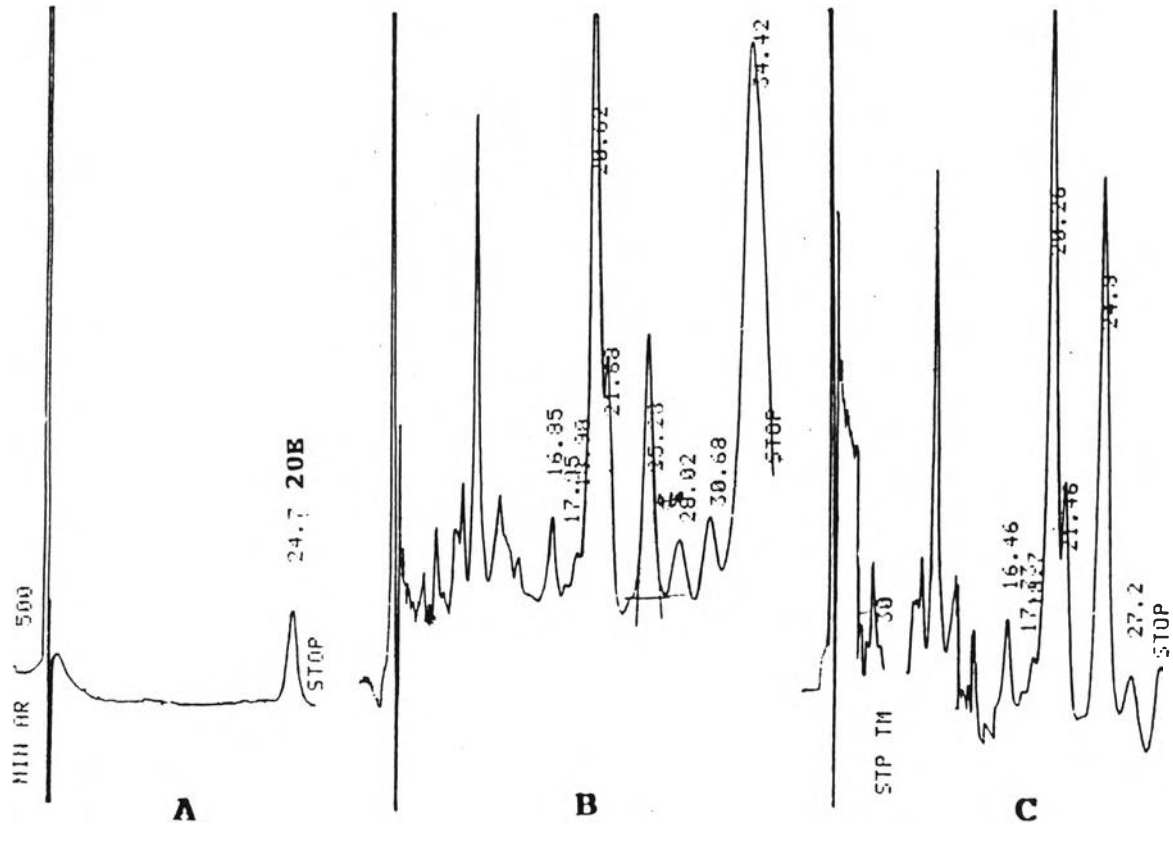


ภาพที่ 23.2 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากต้นของไข่เน่า ที่อายุ 4 สัปดาห์ สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์-น้ำ(14.5:85.5) อัตราการไหล: 1 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย: UV monitor ที่ 254 นาโนเมตร

A: สารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

B: สารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากต้นก่อนเติมสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

C: สารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากต้นหลังเติมสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน



ภาพที่ 23.3 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากต้นของไข่เน่า ที่อายุ 4 สัปดาห์ สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2%(14.5:85.5) อัตราการไหล: 1 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย: UV monitor ที่ 254 นาโนเมตร

A: สารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

B: สารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากต้นก่อนเติมสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

C: สารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากต้นหลังเติมสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน

3.5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า

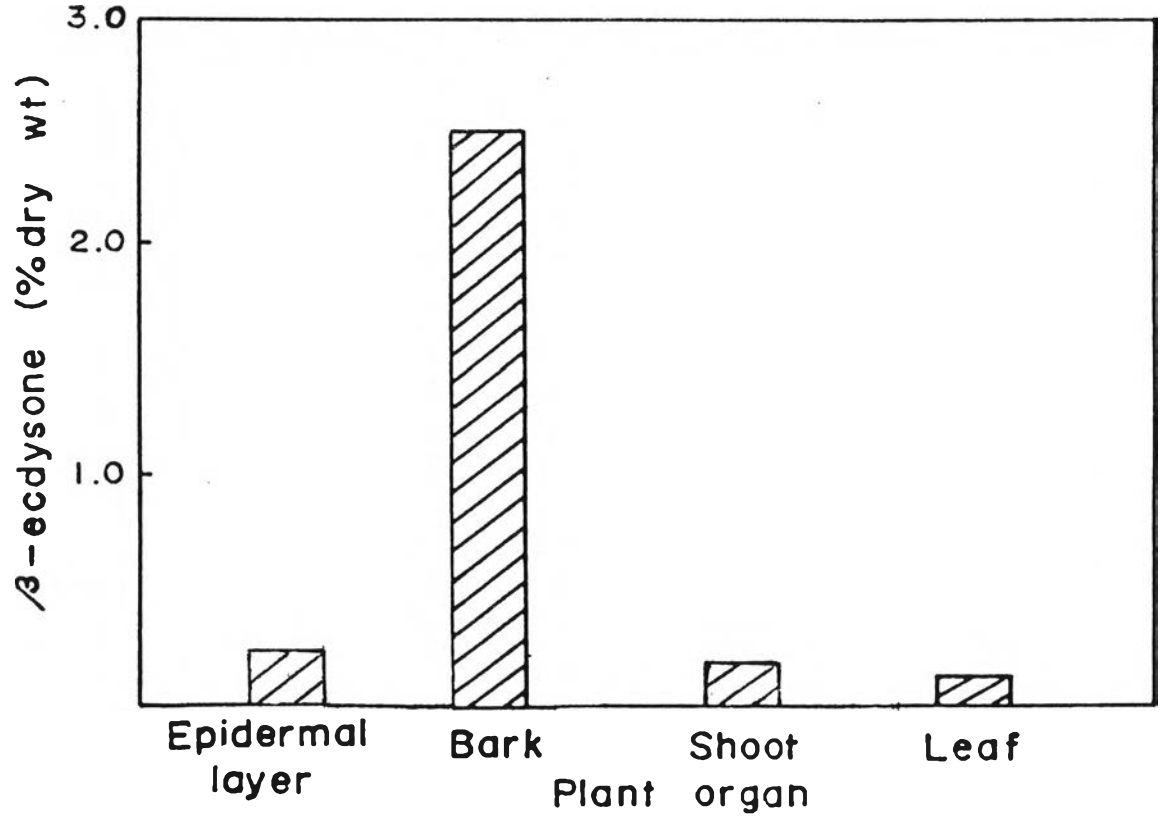
เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับของเบตา-เอคไดโซนจากส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า โดยใช้เทคนิค HPLC เมื่อใช้คอลัมน์ Zorbax C_{18} ขนาด 4.6 มม.x25 ซม. detector: spectrophotometer SPD-1 ที่ UV 254 นาโนเมตร สำหรับเปลือก ชั้นอีพิเดอร์มิสและส่วนของต้น ใช้สารสกัด 5 ไมโครลิตร แล้วชะด้วยเมธานอล-น้ำ(45:55) อัตราการไหล 1 มล./นาที แต่ในเนื้อเยื่อชั้นส่วนของใบนั้นทำการสกัดแยกโดยวิธีเดียวกันแต่วิเคราะห์ระดับเบตา-เอคไดโซน และชะด้วยระบบตัวทำละลายผสมอะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มี กรดอะซิติค 2% (18.5:81.5) อัตราการไหล 1 มล./นาทีเท่ากัน โดยใช้มาคีสเตอโรน เอ เป็นสารมาตรฐานภายใน อ่านค่าอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซนที่รู้ปริมาณเทียบกับมาคีสเตอโรน เอ

จากผลวิเคราะห์หลายๆ ครั้ง จะได้ผลการทดลอง (ภาพที่ 24) แสดงให้เห็นว่าในต้นไข่เน่านั้น สารเบตา-เอคไดโซนสามารถสังเคราะห์หรือสะสมได้ทั้งส่วนใบ เปลือกชั้นอีพิเดอร์มิสและส่วนของต้น อย่างไรก็ตาม ปริมาณเบตา-เอคไดโซนที่สังเคราะห์ใน ส่วนของต้นและใบจะมีค่าค่อนข้างต่ำคือ 0.1478 และ 0.1332 กรัมเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งตามลำดับ

3.6 การทำให้สารเบตา-เอคไดโซนจากเปลือกต้นไข่เน่าบริสุทธิ์

ใช้เปลือกต้นไข่เน่าแห้งบดแล้ว 600 กรัม ทำตามวิธีข้อ 2.15 สารสกัดที่ได้มีน้ำหนักแห้ง 19 กรัม นำมาผ่านบนคอลัมน์ซิลิกาเจล แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาแฟรคชันละ 30 มล. ตรวจสอบสารขั้นต้นด้วยเทคนิค TLC (วิธีข้อ 2.13) นำแฟรคชั่นที่ตรวจพบสารเบตา-เอคไดโซนรวมกัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายส่วนใหญ่ออกจนเหลือประมาณ 8-10 มล. ในขวดรูปชมพู่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 2 วัน จะได้ผลึกสีขาวเกิดขึ้น กรองและนำผลึกที่ได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จะเห็นได้ว่าสารที่แยกได้จะมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง และเมื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของเอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC พบว่าผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99 เปอร์เซนต์ ผลผลิตที่ได้เท่ากับ 0.58 กรัมเปอร์เซนต์น้ำหนักเปลือกแห้ง

3.7 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเบตา-เอคไดโซน ในแคลลัสต้นไข่เน่า



ภาพที่ 24 กราฟแท่งแสดงปริมาณเบตา-เอคไดโซนในส่วนต่างๆของต้นไข่เน่าธรรมชาติ

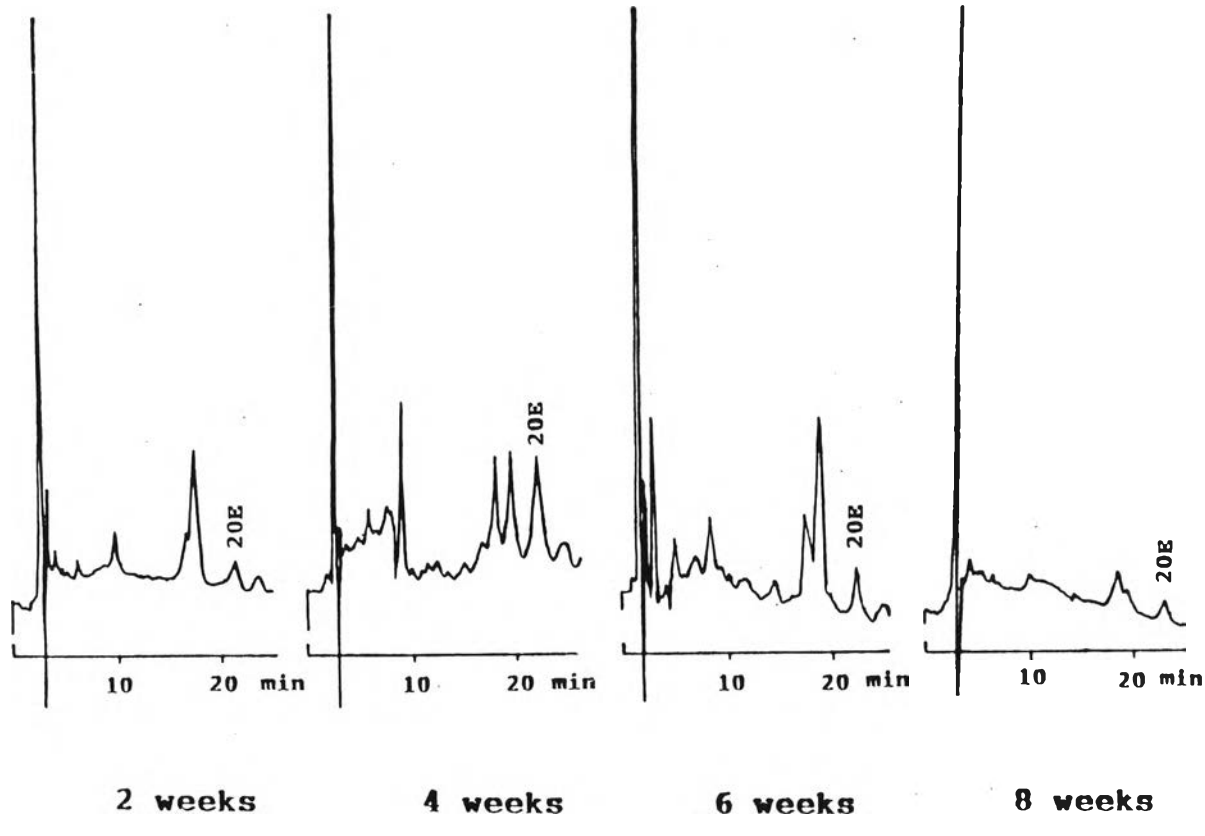
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ชิ้นส่วนของใบ ชั้นของอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้น ในอาหาร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ หลังจาก 6 เดือนนำแคลลัสที่ได้ไปศึกษารูปแบบของการเจริญและสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซน ในช่วงระยะการเจริญต่างๆ กัน คือ early-log mid-log และ stationary phase คือหลังจากแคลลัสเจริญไปได้ 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

ผลการทดลองเมื่อวิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้แคลลัสครั้งละ 0.5 กรัม มาสกัดแยกโดยใช้ เอธานอล 95% และตรวจวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนโดยฉีดสารละลายตัวอย่างในเมธานอลครั้งละ 20 ไมโครลิตร (วิธีข้อ 2.15) ใช้สารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซนซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC ในสภาวะเดียวกันเป็นสารควบคุม และสร้างกราฟมาตรฐานในสภาวะเดียวกับการตรวจวิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนในแคลลัสตัวอย่าง

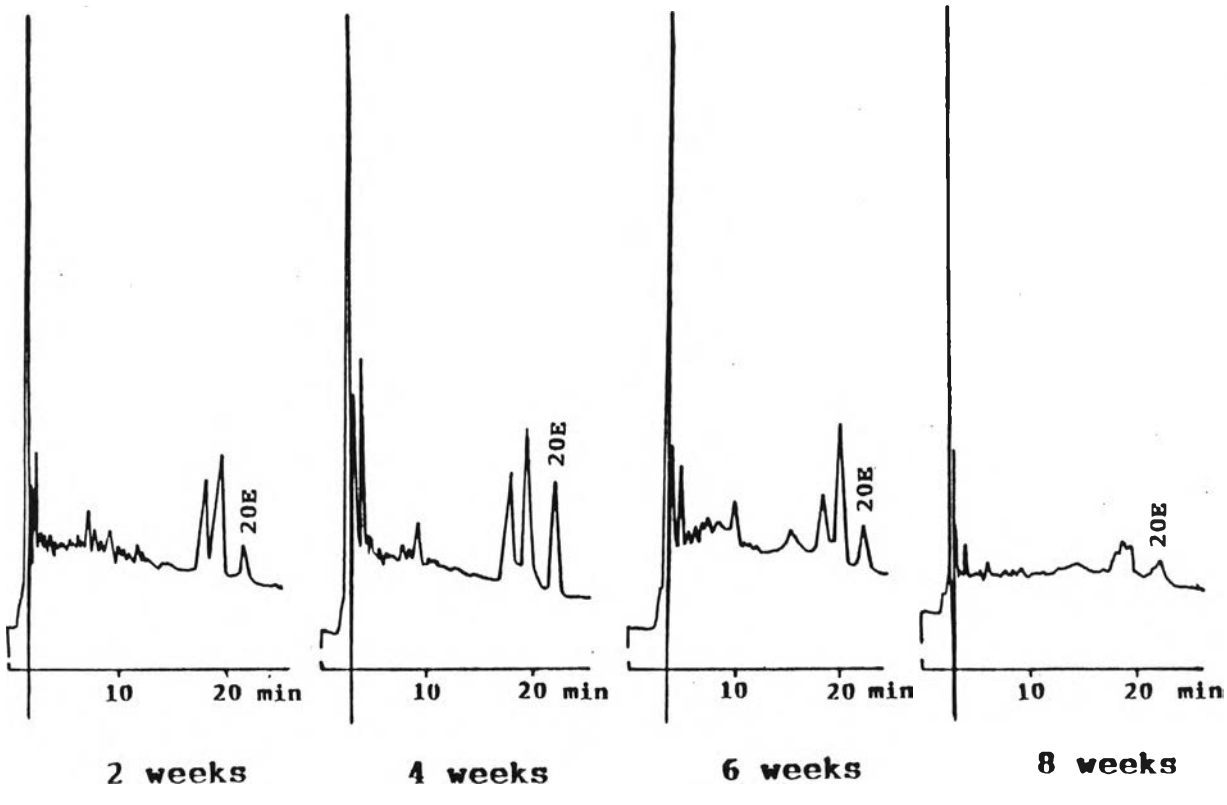
ภาพที่ 25-28 แสดงรูปแบบขององค์ประกอบของสารที่ตรวจพบในแคลลัสทั้ง 3 ชนิด ที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค HPLC ณ.ช่วงเวลาของการเจริญต่างๆ ผลปรากฏว่าแคลลัสแต่ละชนิดจะสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนได้ระดับแตกต่างกัน ที่แต่ละช่วงระยะเวลาของการเจริญของแคลลัส แคลลัสจากส่วนของต้นและใบจะสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนได้สูงสุด ที่ระยะ mid-log ในขณะที่แคลลัสจากชั้นอีพิเดอร์มิสจะสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนได้สูงสุดที่ระยะ late log

เป็นที่น่าสนใจว่า ในแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งนั้น แคลลัสที่ได้จากส่วนของต้นจะมีการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนได้สูงที่สุด ประมาณ 0.014 กรัมเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง ในขณะที่แคลลัสจากชั้นอีพิเดอร์มิสจะสังเคราะห์ได้มากรองลงมา (0.003 กรัมเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง) และแคลลัสจากชั้นส่วนของใบมีการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนต่ำสุด คือ 0.0025 กรัมเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง

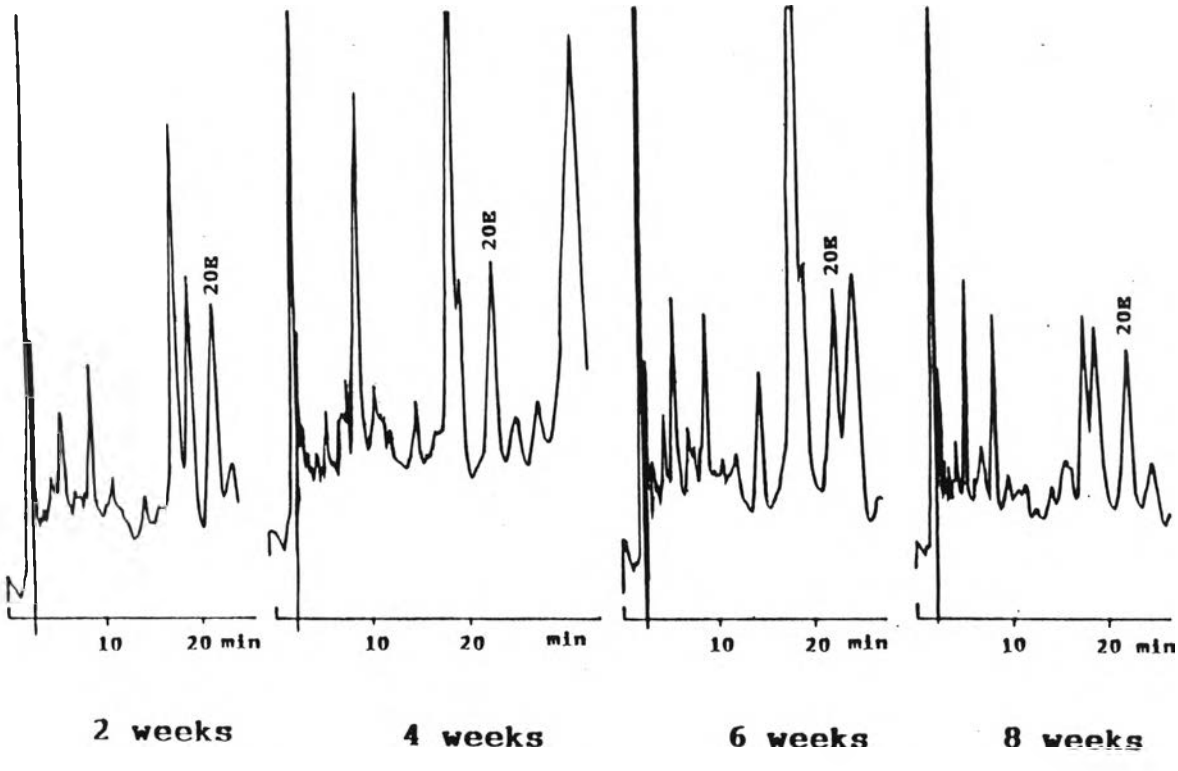
แคลลัสของต้นไข่เน่าทั้ง 3 ส่วน จะมีรูปแบบของการเจริญคล้ายคลึงกัน คือเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดภายใน 6 สัปดาห์ แคลลัสจากส่วนของต้น จะมีการปรับตัวได้เร็ว และอัตราการเจริญตลอดจนความสามารถในการเจริญสูงสุดมีค่าสูงที่สุด ในขณะที่แคลลัสที่ได้จากชั้นอีพิเดอร์มิสและชิ้นส่วนของใบจะมีอัตราการเจริญและความสามารถในการเจริญสูงสุดต่ำกว่ามาก



ภาพที่ 25 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสชิ้นส่วนของใบ ที่ระยะต่างๆ กัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

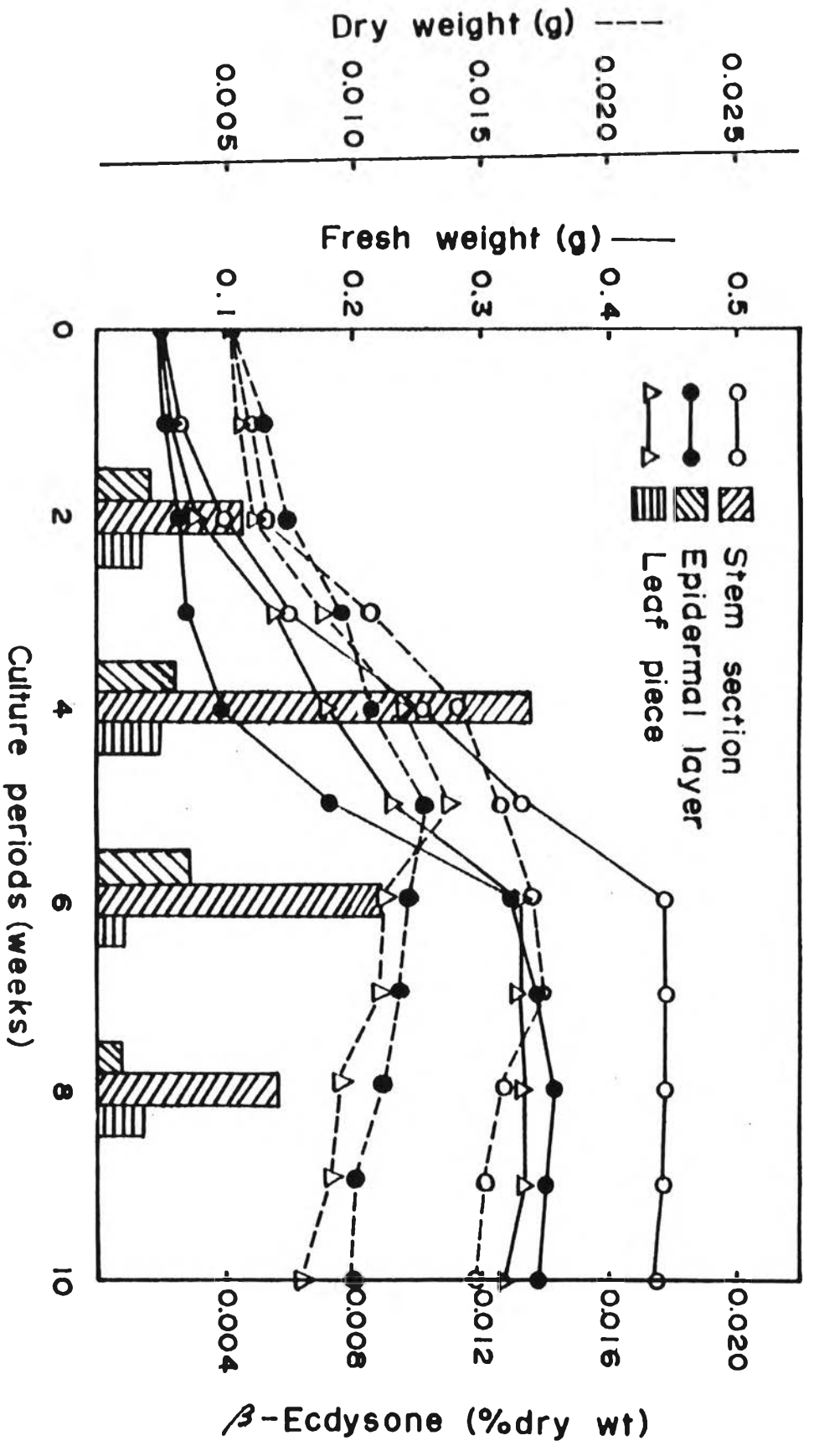


ภาพที่ 26 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสส่วนของต้น ที่ระยะต่างๆ กัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน



ภาพที่ 27 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสชั้นอีพิเดอร์มิสที่ระยะต่างๆ กัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

ภาพที่ 28 แสดงปริมาณเบตา-เอคไดโซนของแคลลัสที่เกิดจากส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า ที่เจริญในช่วงระยะต่างๆ กัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน


Dry weight (g) ---
0.005
0.010
0.015
0.020
0.025
Fresh weight (g) ——
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Stem section
Epidermal layer
Leaf piece
0
2
4
6
8
10
Culture periods (weeks)
0.004
0.008
0.012
0.016
0.020
β-Ecdysone (%dry wt)

3.8 การศึกษาความเสถียรของแคลลัสในการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซน

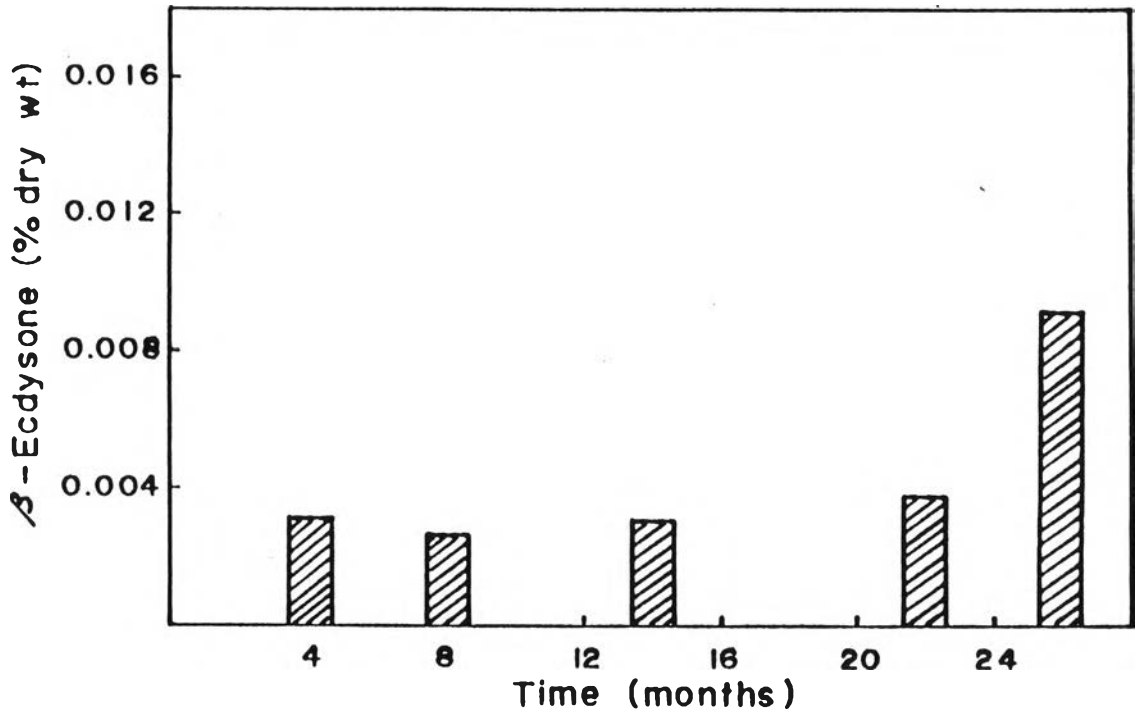
ในการศึกษาสารผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นโดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนั้น อิทธิพลที่สำคัญประการหนึ่งคือสภาพแคลลัสเพาะเลี้ยงระยะต้น จะยังคงมีผลของสาร intermediates ที่มีในพืชธรรมชาติ เช่น ฮอร์โมน ฯลฯ ที่มีส่วนในการควบคุมวิถีการสังเคราะห์ของแคลลัส ตลอดจนการแสดงออกของยีนในการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดอีกด้วย ดังนั้นในการผลิตสารทุติยภูมินั้น สิ่งที่น่าสนใจคือการเปลี่ยนแปลงระดับของการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ กับช่วงระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมาตรฐาน

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 29) ทำการศึกษาในแคลลัสจากส่วนของต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. วิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ในแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 4, 8, 14, 22 และ 26 เดือน พบว่าแคลลัสมีความเสถียรในการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซน และมีแนวโน้มว่าเมื่อมีการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานๆ แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงที่มีการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วยตัวของมันเอง หรือเพราะชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้

3.9 การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อการเจริญ และการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนของแคลลัสของต้นไข่เน่า

ในการทดลองนี้จะศึกษาผลกระทบของปัจจัยต่างๆ เช่นสารควบคุมการเจริญ แหล่งต้นตอคาร์บอน ไนโตรเจน สารตั้งต้นของการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซน ฯลฯ ที่มีต่อการเจริญและผลิตเบตา-เอคไดโซนของแคลลัสต้นไข่เน่า

ผลการทดลอง จะรายงานเป็นค่าเปรียบเทียบกับการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของแคลลัสจากส่วนต้นที่เริ่มต้นด้วยแคลลัสเท่ากัน (0.05 กรัม) เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐานคือ 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ในสภาวะมาตรฐานคือ อุณหภูมิ 25±2 °ซ ในสภาพที่ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยกำหนดให้ค่าการเจริญเป็นน้ำหนักสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6-7 (น้ำหนักสด 0.4 กรัม น้ำหนักแห้ง 0.005 กรัม) เป็นค่า Relative growth 100 เปอร์เซนต์ เพราะฉะนั้น



ภาพที่ 29 กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณสารเบตา-เอคไดโซนของแคลลัสที่เกิดจากส่วนของต้นอายุ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลานานต่างกัน

Relative growth(%) = $\frac{\text{wt. of callus in sample}}{\text{wt. of callus in std. media and condition}}$ x 100

และค่าผลผลิตของเบตา-เอคไดโซน(กรัมต่อน้ำหนักแห้ง) ที่ช่วงการเจริญระยะ 4 สัปดาห์ (0.012 กรัมเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง) เป็นค่า Relative β-ecdysone production 100 %

Relative β-ecdysone(%) = $\frac{\text{wt. of } \beta\text{-ecdysone in callus sample}}{\text{wt. of } \beta\text{-ecdysone in callus at std. media and condition}}$ x 100

3.9.1 แหล่งต้นตอคาร์บอน

ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงทั่วไป นิยมใช้ซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าแคลลัสสามารถใช้แหล่งต้นตอคาร์บอนชนิดอื่นเป็นแหล่งของพลังงานได้

ในการทดลองใช้ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน โดยใช้ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร แล้วใช้แคลลัสจากส่วนของต้นที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน จากการทดลองติดตามการเจริญของแคลลัสและการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซน ในช่วงระยะเวลา 4 และ 6 สัปดาห์

ผลการทดลอง(ภาพที่ 30.ก และ31.ก) จะเห็นได้ว่ากลุ่มตัวอย่างของแคลลัสส่วนของต้น ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม คือเลี้ยงในสภาวะที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน จะมีการเจริญได้ปกติ และผลิตเบตา-เอคไดโซนได้(0.012 กรัมเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง) ที่ระยะการเจริญ 4 สัปดาห์เป็นค่าควบคุมที่สมมูลย์กับค่า Relative β-ecdysone 100% โดยกำหนดให้ค่าการเจริญสูงสุดของแคลลัสในสูตรอาหารและสภาวะดังกล่าวเป็น Relative growth 100%

ผลการทดลอง(ภาพ 30.ข และ31.ข) แสดงให้เห็นว่ากลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ให้การเจริญที่ดีกว่าทั้งอัตราการเจริญและความสามารถในการเจริญสูงสุด ใน

ขณะที่ฟรุคโตสจะเป็นแหล่งต้นคอคาร์บอนที่ให้ค่าการเจริญต่ำกว่าซูโครสอย่างชัดเจน ค่าเฉลี่ยของผลผลิตเบตา-เอคไดโซน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีฟรุคโตสความเข้มข้นเท่ากับซูโครสจะสูงกว่าประมาณ 30 เปอร์เซนต์ แต่กลูโคสจะให้ผลผลิตของเบตา-เอคไดโซนต่ำกว่าเมื่อมีซูโครสเท่ากันถึงเกือบ 70 เปอร์เซนต์

3.9.2 แหล่งต้นคอไนโตรเจน

เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสจากส่วนของต้น ในสภาวะปกติของสูตรมาตรฐานเหมือนกับข้อ 3.9.1 เทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปกติเช่นกัน แต่เพิ่มปริมาณของโปแตสเซียมไนเตรทขึ้นไปจากเดิมอีก 1 และ 2 กรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญและการผลิตของเบตา-เอคไดโซน ผลการทดลอง (ภาพที่ 30.ค และ31.ค) จะเห็นว่าการเพิ่มที่ความเข้มข้นของโปแตสเซียมไนเตรทสูงขึ้นจากเดิมอีก 2 กรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสส่วนของต้นของต้นไข่เน่าเจริญได้ดีกว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารมาตรฐานปกติอย่างเห็นชัด ในขณะเดียวกันการผลิตเบตา-เอคไดโซนที่เวลา 6 สัปดาห์ก็สูงกว่าอย่างชัดเจนอีกด้วย ในขณะที่ความเข้มข้นของโปแตสเซียมไนเตรทสูงขึ้นกว่าสภาวะปกติ 1 กรัมต่อลิตร จะมีผลกลับกันคือสามารถไปลดทั้งการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซน ซึ่งผลการทดลองค่อนข้างจะผิดปกติ ที่การมีโปแตสเซียมไนเตรทสูงกลับทำให้การเจริญลดลง ปกติแล้วเซลล์พืชไม่ว่าในธรรมชาติหรือในสภาพเพาะเลี้ยง ปริมาณโปแตสเซียมไนเตรทน่าจะมีผลในการกระตุ้นการเจริญมากกว่า (Tal และคณะ, 1982)

3.9.3 กรดอะมิโนไธโรซีน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสส่วนของต้นในอาหารสูตรมาตรฐานที่มี 2,4-D 1 มก./ล., 4-D และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะปกติของการเพาะเลี้ยงเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในภาวะเดียวกันแต่เสริมด้วยกรดอะมิโนไธโรซีน 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในเวลา 4 และ 6 สัปดาห์

ผลการทดลอง (ภาพที่ 30.ง และ31.ง) จะเห็นได้ว่าไธโรซีนตั้งแต่ 1 กรัม/ลิตร มีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัสส่วนของต้นไข่เน่าอย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อติดตามการผลิตเบตา-เอคไดโซน จะพบว่า ผลผลิตของเบตา-เอคไดโซนเมื่อเทียบกันกลุ่มแคลลัสควบคุมที่ไม่ได้เสริมด้วยไธโรซีนจะต่ำกว่า อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า แคลลัสที่ช่วงนี้มีสีดำคล้ำซึ่งไม่

น่าจะมีชีวิตแล้ว การทดลองนี้จึงไม่ได้ติดตามว่าเซลล์ที่ไม่เจริญเป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หรือไม่

3.9.4 โคเลสเตอรอล

มีรายงานว่าโคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้น ที่ใช้ในการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนในพืช ดังนั้น ในการวิจัยนี้จึงได้ทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสส่วนของต้นในอาหารและสภาวะมาตรฐานตามข้อ 3.9.1 แล้วเสริมด้วยโคเลสเตอรอลความเข้มข้น 50 และ 100 มก./ล. ติดตามการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซน

ผลการทดลอง (ภาพที่ 30.จ และ31.จ) แสดงให้เห็นว่าโคเลสเตอรอลที่ความเข้มข้นสูง 50 มก./ล. จะมีผลไปยับยั้งทั้งการเจริญของแคลลัสและการผลิตเบตา-เอคไดโซน ยิ่งความเข้มข้นโคเลสเตอรอลสูงเป็น 100 มก./ล. จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนมากขึ้น

3.9.5 กรดเมวาโลนิค(DL-mevalonic acid)

กรดเมวาโลนิคเป็นสาร intermediate ที่สำคัญในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลและนิวเคลียสของสารสเตอรอยด์หลายชนิด ดังนั้นหากเป็นไปได้ อาจเป็นสารเริ่มต้นและกระตุ้นการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนได้

ในการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสจากส่วนของต้นในอาหารมาตรฐานที่เสริมด้วย DL-mevalonic acid 50 และ 100 มก./ล. และเพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐานตามข้อ 3.9.1 ผลการติดตามการเจริญและผลิตเบตา-เอคไดโซน (ภาพที่ 30.ฉ และ31.ฉ) แสดงให้เห็นว่า DL-mevalonic acid จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของแคลลัสต้นไข่เน่าได้ บางสภาวะที่ความเข้มข้น 100 มก./ลิตร จะเห็นความสามารถในการยับยั้งการเจริญเพิ่มขึ้นอีก ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นอีกว่า DL-mevalonic acid ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 50 มก./ลิตร จะยับยั้งการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ผลกระทบของ DL-mevalonic acid ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนไม่รุนแรงเท่ากับโคเลสเตอรอล

3.9.6 สติกมาสเตอรอลและเบตา-ซิโตสเตอรอล

สารสติกมาสเตอรอลและเบตา-ซิโตสเตอรอล เป็นสารในกลุ่มสเตอรอยด์

พบระดับสูงในพืชหลายชนิดเช่น อ้อย ถั่วเหลือง และมีโครงสร้างคล้ายกันกับโคเลสเตอรอล ดังนั้นอาจใช้เป็นแหล่งของสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซน หรือกลุ่มของเอคไดสเตอรอยด์ได้

ในการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสจากส่วนของต้น ในอาหารแข็งมาตรฐานและในสภาวะมาตรฐานตามข้อ 3.9.1 และเมื่อเสริมด้วยสติกมาสเตอรอลและเบตา-ซิโตสเตอรอล (ในอัตราส่วน 50:50) 50 และ 100 มก./ล. เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซน

ผลการทดลอง(ภาพที่ 30.ช และ31.ช) แสดงให้เห็นว่าสติกมาสเตอรอลและเบตา-ซิโตสเตอรอลที่ความเข้มข้น 100 มก./ล. ไม่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสแต่อย่างใด ในขณะที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสติกมาสเตอรอลและเบตา- ซิโตสเตอรอล 50 มก./ล. จะให้การเจริญต่ำกว่าเกือบครึ่ง อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นสติกมาสเตอรอลและเบตา- ซิโตสเตอรอลสูง จะให้การผลิตเบตา-เอคไดโซนต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน

3.9.7 <u>จิบเบอเรริค แอซิค</u> (Gibberellic acid) (GA_3)

จิบเบอเรริค แอซิด (GA3) เป็นฮอร์โมนซึ่งพบว่ามีส่วนร่วมในการเจริญและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและลักษณะของเซลล์พืชโดยทั่วไป ดังนั้นจึงได้รับความสนใจที่จะศึกษาผลกระทบของฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนคุณสมบัติ และรูปแบบของเนื้อเยื่อในพืชกับวิถีการผลิตเบตา-เอคไดโซน

ผลการทดลอง (ภาพที่ 30.ช และ31.ช) พบว่าแคลลัสจากส่วนของต้นซึ่งเพาะเลี้ยง ในอาหารมาตรฐานที่เสริมด้วย GA_3 2 มก./ล. จะไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของแคลลัสแต่อย่างไรเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันที่ไม่มี GA_3 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ GA_3 ขึ้นเป็น 10 มก./ล. จะมีผลเสริมการเจริญของแคลลัสเล็กน้อย อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ GA_3 ทั้ง 2 ความเข้มข้นจะไปลดการผลิตเบตา-เอคไดโซนลง

3.9.8 <u>2,4 Dichlorophenoxyacetic acid</u> (2,4-D)

เมื่อศึกษาผลกระทบของ 2,4-D ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในแคลลัสที่เกิดจากต้นของต้นไข่เน่า ในสูตรอาหาร 1/2 MS ที่กำหนดให้ BA คงที่ 2 มก./ล. ในสภาวะของการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน ผลปรากฏว่า (ภาพที่ 30.ฌ และ31.ฌ)

2,4-D ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 มก./ล. จะเริ่มยับยั้งการเจริญของแคลลัสจากส่วนของต้น และการยับยั้งเกือบจะสมบูรณ์ เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มเป็น 4 และ 8 มก./ล. ผลการทดลองนี้จะสอดคล้องกับการทดลองชักนำการเกิดแคลลัส และการศึกษาการเจริญของแคลลัสในภาพที่ 7 อย่างไรก็ตาม 2,4-D มีผลยับยั้งการผลิตเบตา-เอคไดโซนได้บ้างแต่ไม่เป็นการยับยั้งที่เห็นชัดมากนัก

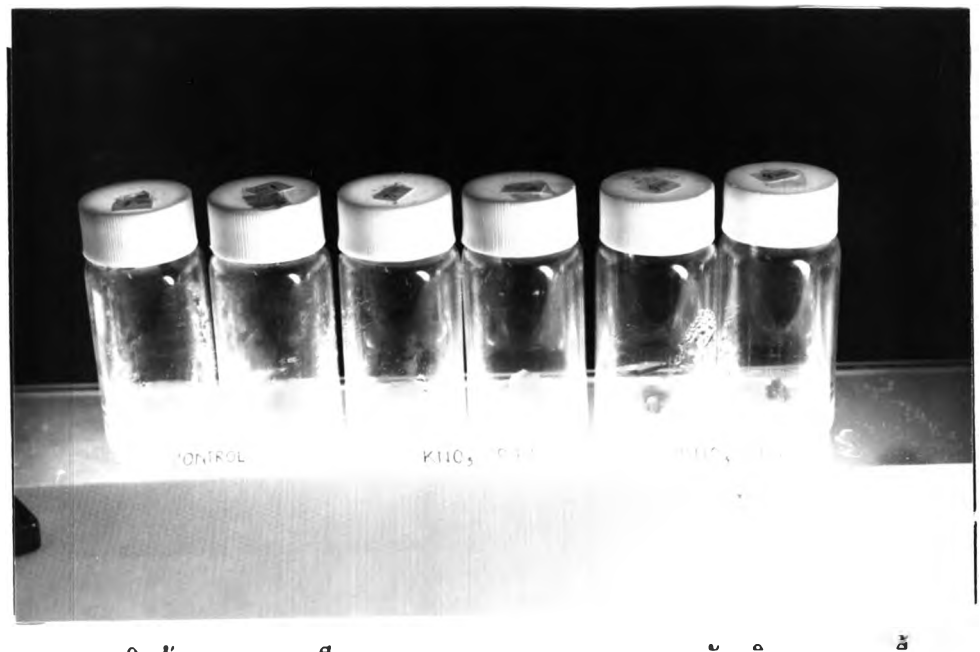
3.9.9 Benzyladenine (BA)

เมื่อทำการศึกษาผลกระทบของ BA ต่อการเจริญและสังเคราะห์ เบตา-เอคไดโซนของแคลลัสส่วนของต้นของต้นไข่เน่า เพาะเลี้ยงโดยกำหนดความเข้มข้น 2,4-D คงที่ 1 มก./ล. ในสภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยงในสูตร 1/2 MS ผลการทดลอง (ภาพที่ 30.ญ และ31.ญ) จะเห็นว่าเมื่อลดความเข้มข้นลง BA เป็น 1 มก./ล. แคลลัสจะเจริญได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น BA เป็น 4 มก./ล. จะไปยับยั้งการเจริญของแคลลัสลงได้อย่างชัดเจน ซึ่งผลการทดลอง สอดคล้องกับผลการทดลองระยะที่เริ่มชักนำแคลลัสของส่วนของต้น (ภาพที่ 7) ผลกระทบของ BA ต่างกันกับ 2,4-D อย่างมาก การเปลี่ยนความเข้มข้นของ BA ให้มากหรือน้อยกว่ากลุ่มควบคุมจะมีผลไปยับยั้งการผลิตเบตา-เอคไดโซนอย่างชัดเจน

ภาพที่ 30 รูปถ่ายเปรียบเทียบลักษณะแคลลัสส่วนของต้นของต้นไข่เน่า ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. อายุ 4 สัปดาห์

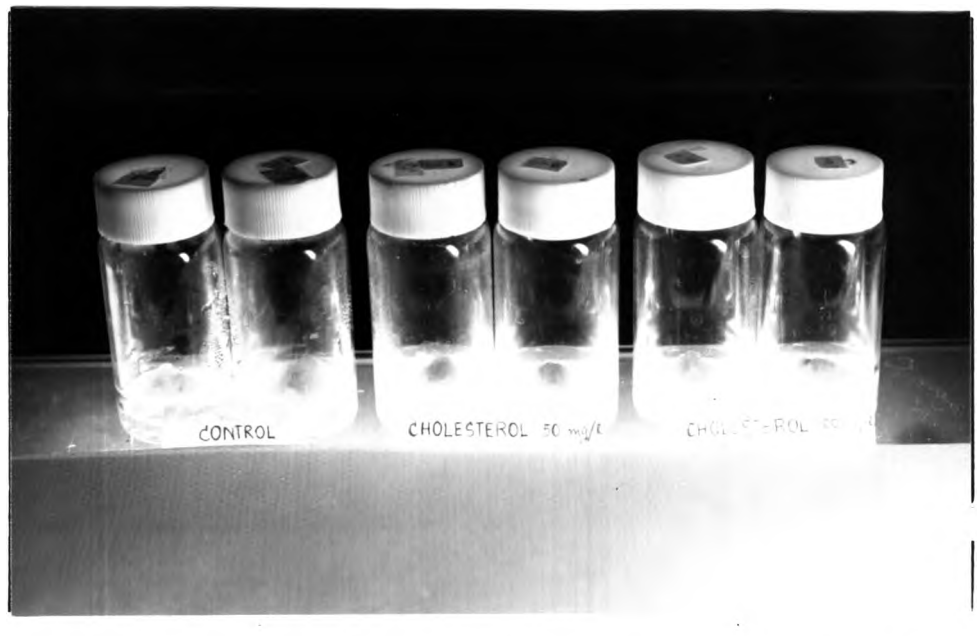
ก. โดยมี ซูโครส 30 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน

ข. โดยมี กลูโคส 30 กรัม/ลิตร หรือ ฟรุคโตส 30 กรัม/ลิตร เป็นสารต้นตอคาร์บอน เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



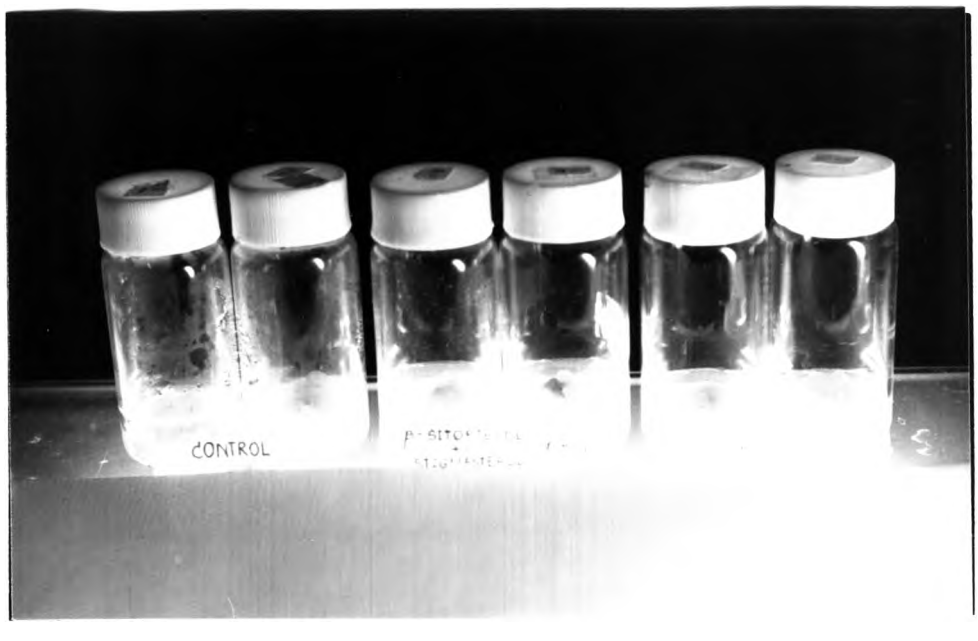
ค. เสริมด้วย โปแตสเซียมไนเตรท 0, 1 และ 2 กรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน

ง. เสริมด้วยกรดอะมิโนไธโรซีน 0, 1 และ 2 กรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



จ. เสริมด้วย โคเลสเตอรอล 0, 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน

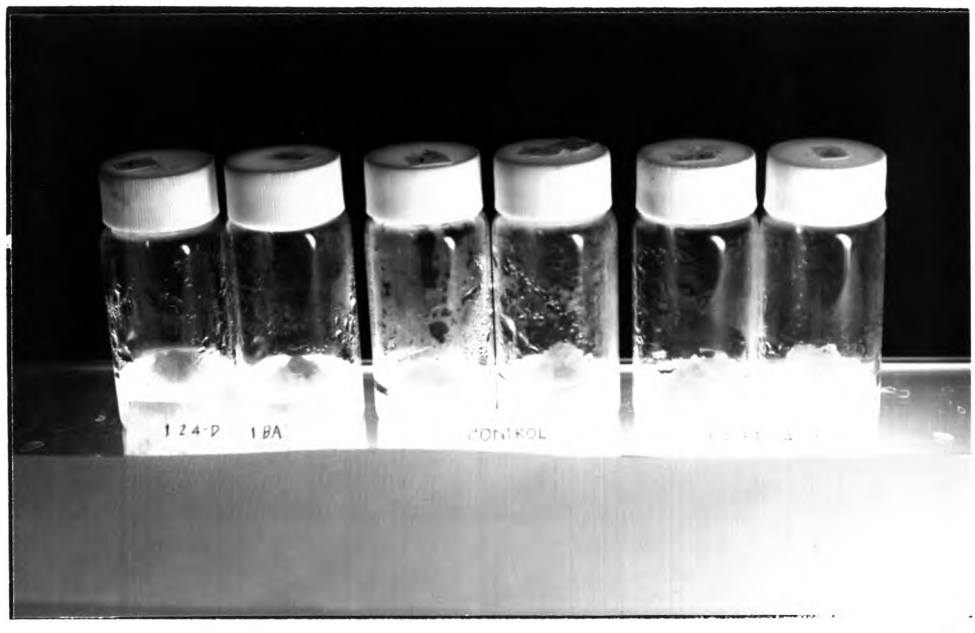
ฉ. เสริมด้วย ดีแอล-เมวาโลเนท 0, 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



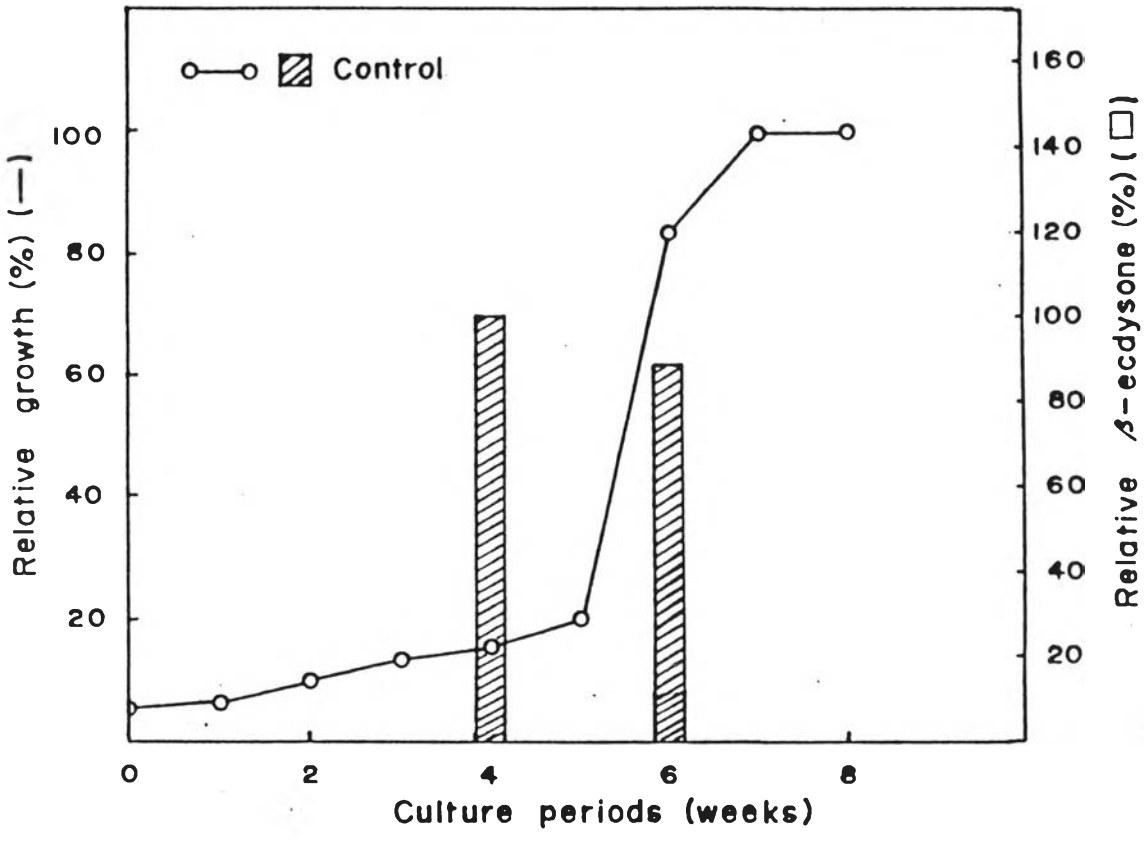
ช. เสริมด้วย เบตา-ซิโตสเตอรอลและสติกมาสเตอรอล 0, 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน

ช. เสริมด้วย จิบเบอเรริค แอซิด 0, 2 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน

ฌ. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 ,4 และ 8 มก./ล. ใช้ร่วมกับ BA 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน

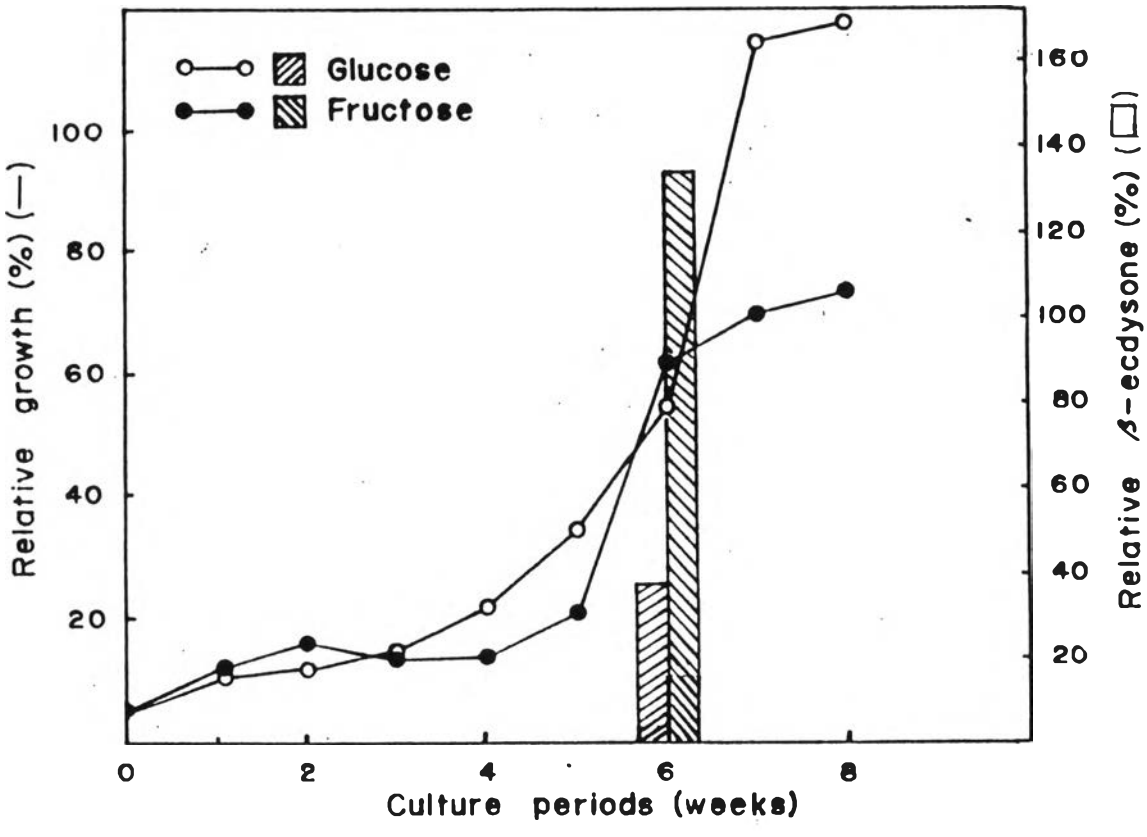


ญ. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ใช้ร่วมกับ BA 1 และ 4 มก./ล. เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน

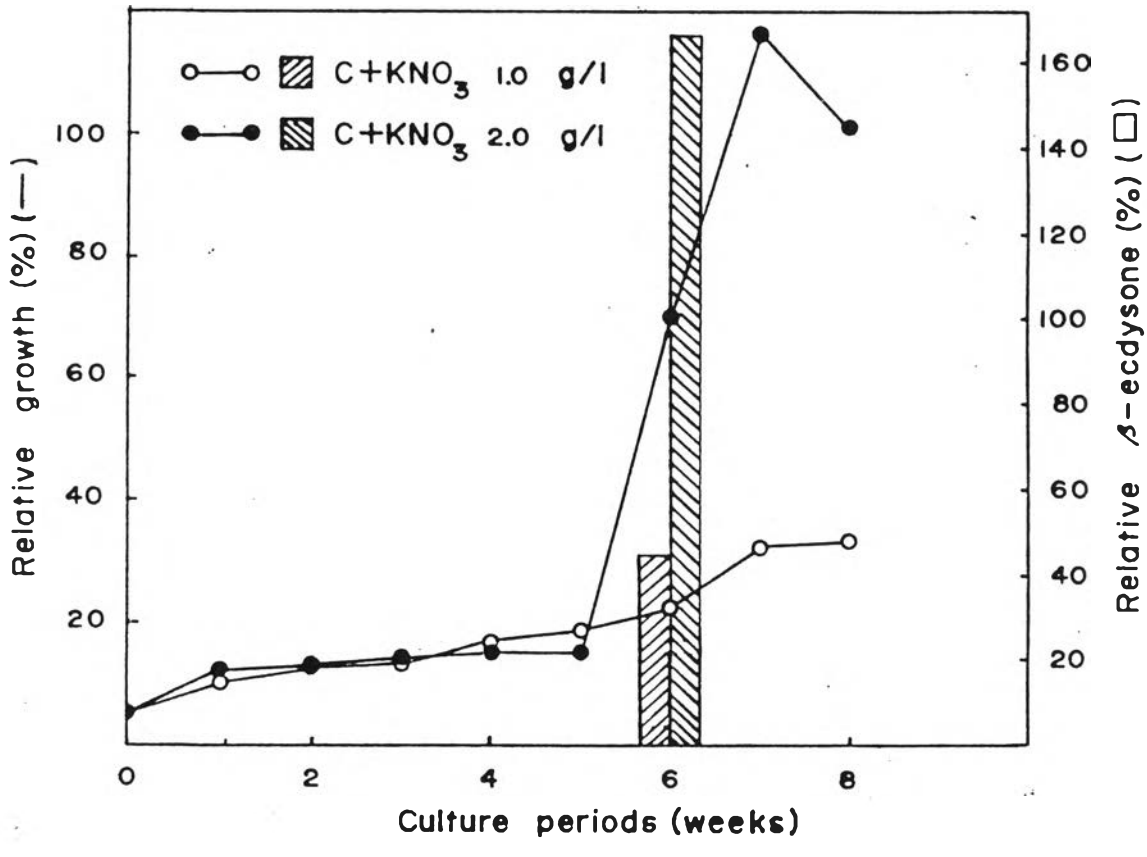


ภาพที่ 31 กราฟแสดงการเจริญเติบโตและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตรมาตรฐาน (ควบคุม) 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.

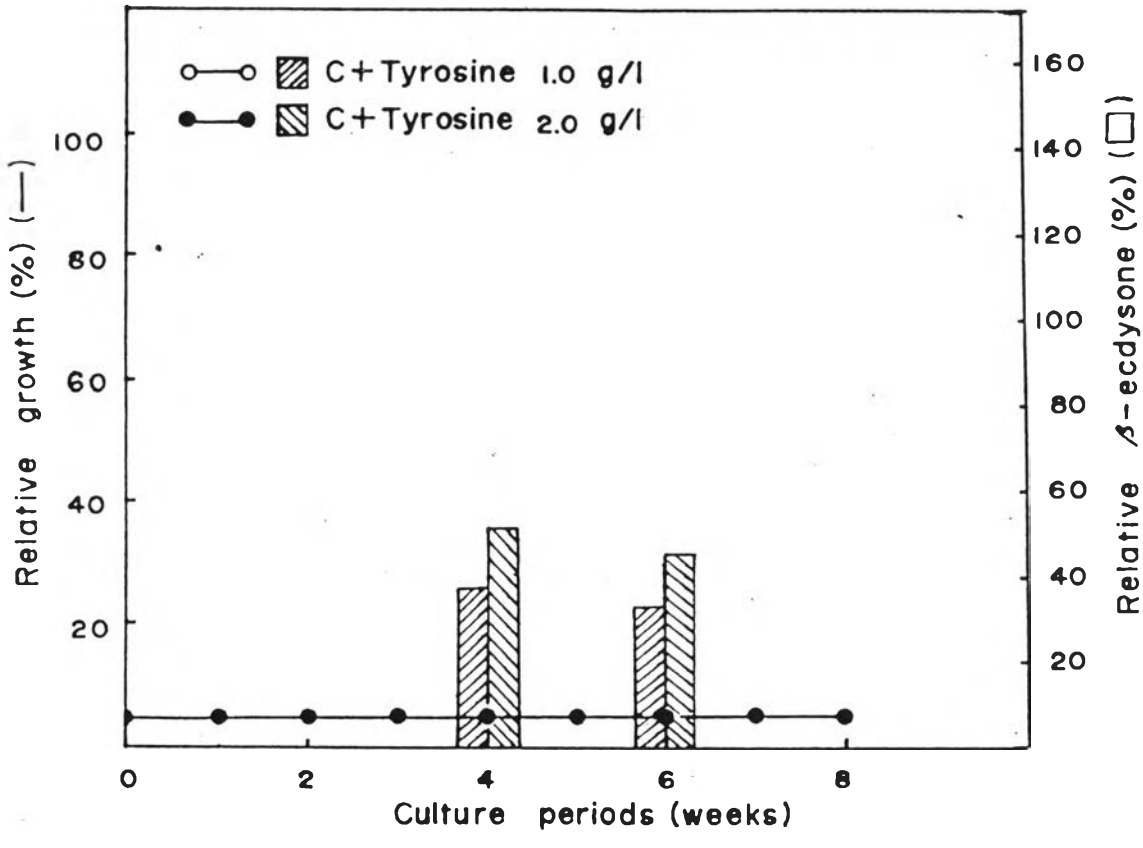
ก. โดยมี ซูโครส 30 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งต้นคาร์บอน เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



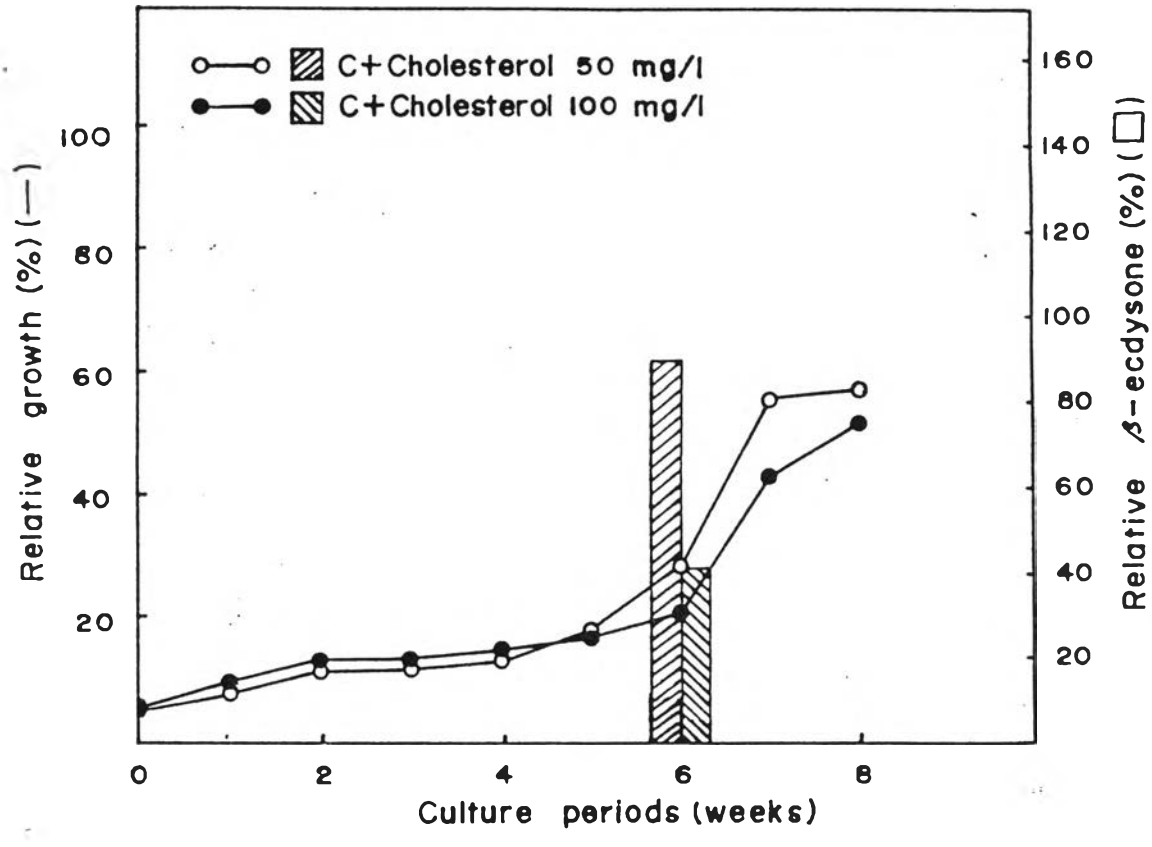
ข. โดยมี กลูโคส 30 กรัม/ลิตร หรือ ฟรุคโตส 30 กรัม/ลิตร เป็นสารต้นตอคาร์บอน เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



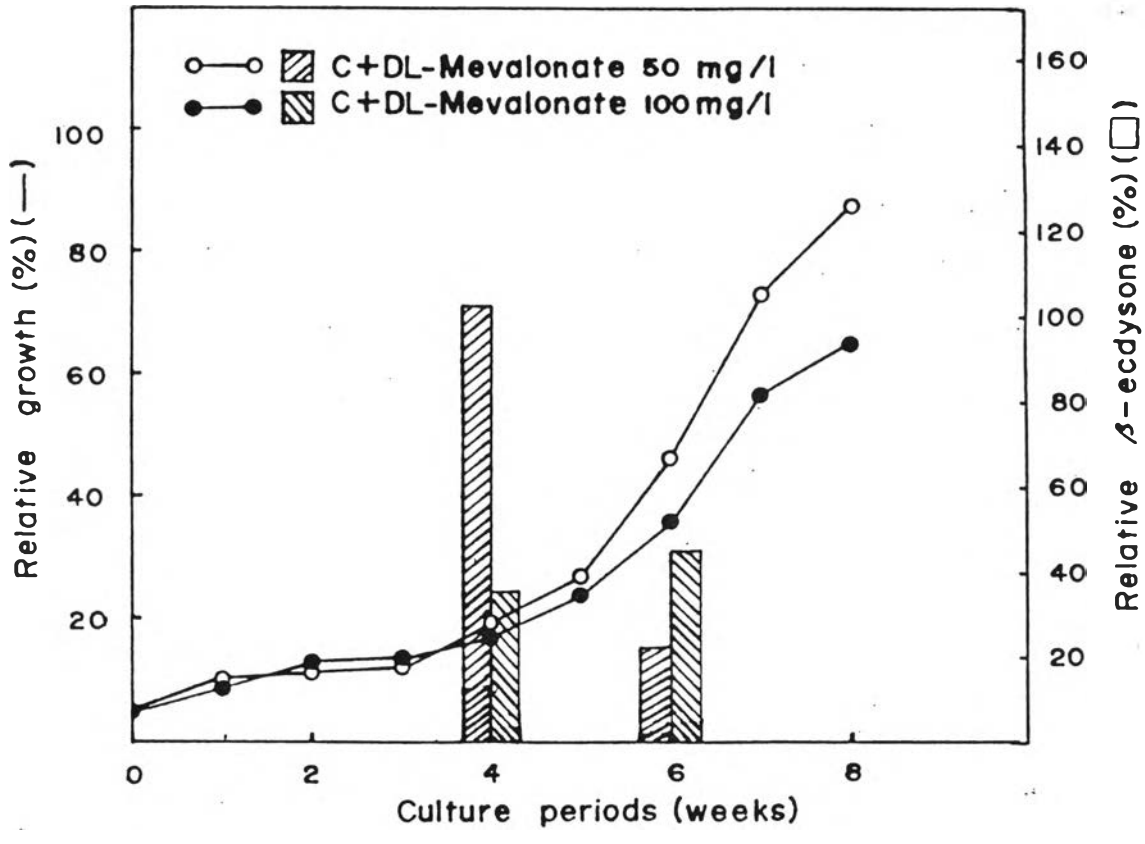
ค. เสริมด้วย โปแตสเซียมไนเตรท 1 และ 2 กรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



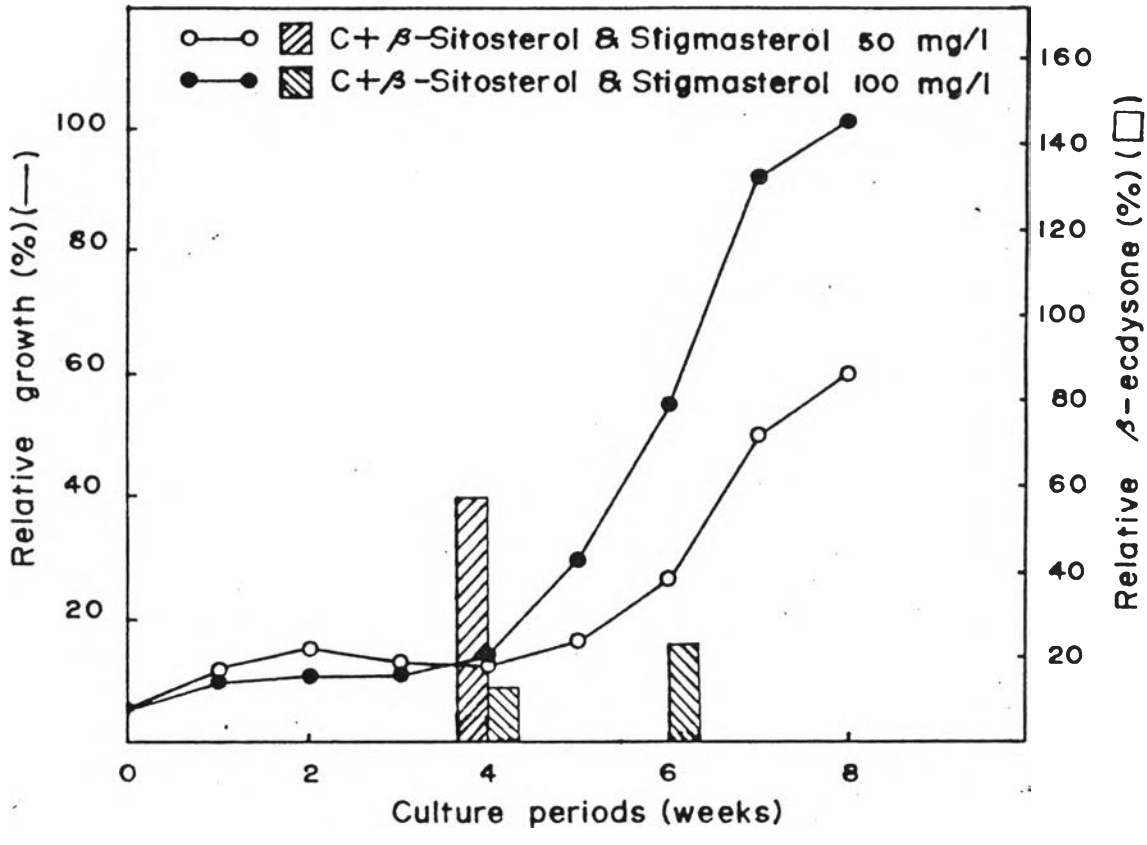
ง. เสริมด้วย ไธโรซีน 1 และ 2 กรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



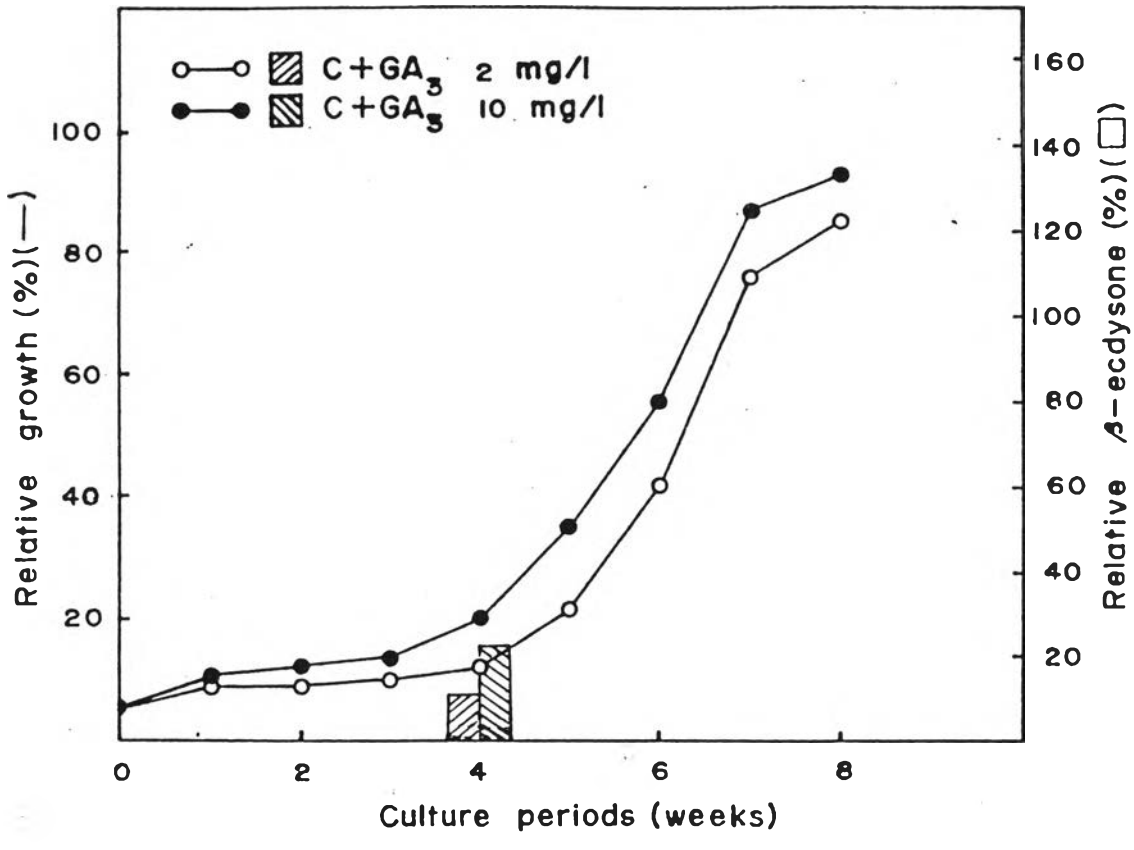
จ. เสริมด้วย โคเลสเตอรอล 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



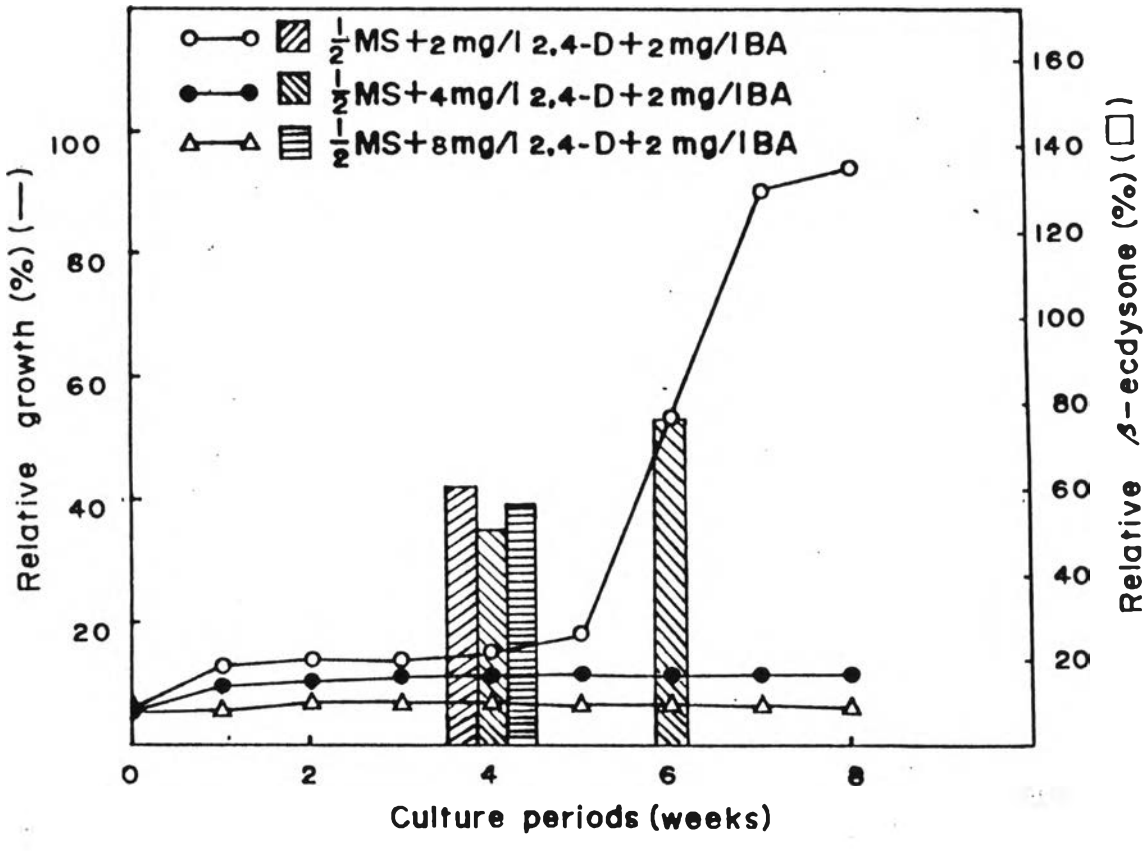
ฉ. เสริมด้วย ดีแอล-เมวาโลเนท 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



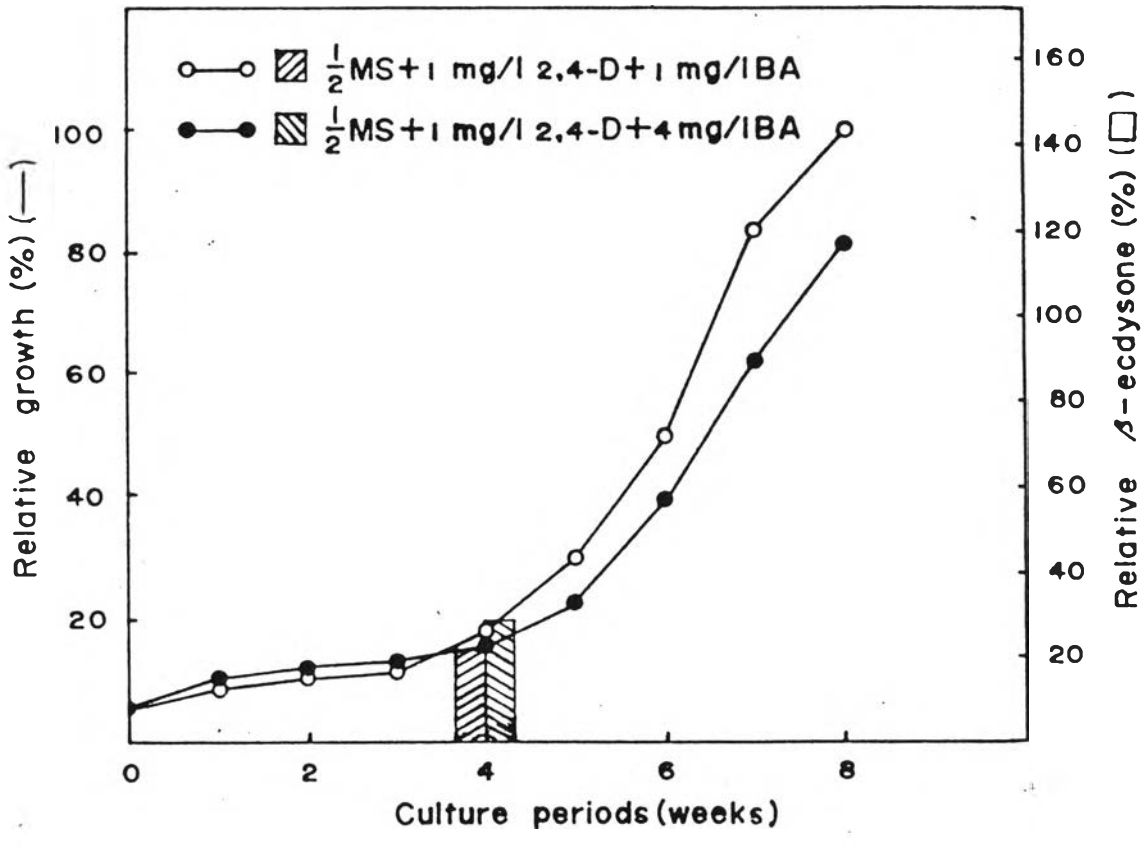
ช. เสริมด้วย เบตา-ซิโตสเตอรอลและสติกมาสเตอรอล 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



ช. เสริมด้วย จิบเบอเรริค แอซิด 2 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



ฆ. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 ,4 และ 8 มก./ล. ใช้ร่วมกับ BA 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน



ญ. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ใช้ร่วมกับ BA 1 และ 4 มก./ล. เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน