# บทที่ 4

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากมีรายงานการใช้สารเบตา-เอคไดโซนจากต้นไข่เน่า ความเข้มข้น 2.3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหารเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกราม 100 กรัม พบว่าฮอร์โมนนี้จะกระตุ้นการเจริญของลูกกุ้งก้ามกรามอย่างมีนัยสำคัญ (พัฒนัญญา, 2528; Chaiwatcharakool, S,1986)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ ปัจจัยสำคัญคือ แหล่งของพืช ส่วนประกอบของอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยง พบว่าความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิของแคลลัสขึ้นกับความสามารถผลิตสารทุติยภูมิในพืชธรรมชาติ นั่นคือถ้าคัดเลือกพืชที่สามารถผลิตสารได้สูง โอกาสที่แคลลัสจะผลิตสารได้สูงก็มีมากกว่า จากรายงานที่ผ่านมาตรวจพบปริมาณเบตา-เอคไดโซนในส่วนเปลือกต้นของต้นไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.) 1.57% (Werawattanametin และคณะ,1986) ซึ่งเป็นรายงานการตรวจพบสารเบตา-เอคไดโซนในระดับสูงมาก เพราะในพืชส่วนใหญ่จะมีเบตา-เอคไดโซนน้อยกว่า 1% จึงสนใจที่จะทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นไข่เน่า โดยทำการคัดเลือกส่วนของพืชที่ยังอยู่ในระยะการเจริญเติบโตเช่นใบอ่อน ยอดอ่อน เพราะง่ายต่อการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้เนื้อเยื่อ 3 ส่วนในการเริ่มต้นศึกษา คือชิ้นส่วนของใบ ชั้นอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้น

สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เมื่อทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสม ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของใบ ชั้นของอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้น ได้แก่ความเข้มข้นของสารอาหาร (medium conce tion) สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) รวมทั้งสภาวะกา. ง (light period)

อาหารเพาะเลี้ยงใช้สูตรของ Murashige and Skoog (MS) ซึ่งมีสารอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่ มีสารจำพวก microelements ที่จำเป็นต่อ

พืชในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับสารอาหารสูตรอื่น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารอาหารเพาะเลี้ยงที่มากเกินไปก็จะยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืช (Staba,1980)

เมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้นเต็มสูตร (MS) และครึ่งสูตร (1/2 MS) ต่อการชักนำการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าทั้ง 3 ส่วน เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°ซ ให้แสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารอาหารสูตร MS มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วน โดยที่ความเข้มข้น 1/2 MS เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าทั้ง 3 ส่วน มากกว่าเมื่อมีความเข้มข้นของสารอาหารสูงๆ (MS) เพราะจะไปยับยั้งการเจริญและทำให้เซลล์ตายในที่สุด

Mulder-Krieger และคณะ (1982) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต้นของซิงโคนา (Cinchona pubescens Vahl.) เพื่อศึกษาผลของธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองของอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/8MS, 1/4MS, 1/2MS, MS ที่มี BA, IBA และ 2,4-D ต่างๆกัน พบว่าอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญ BA:IBA (2:8), BA:2,4-D (2:1), BA:IBA (1:5) ที่แต่ละระดับเมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารอาหาร พบว่าที่ 1/2MS จะให้การเจริญดีกว่า MS ในทุกระดับ

การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลงในอาหารเพาะเลี้ยงในระยะเริ่มต้นอาจจะไม่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่การเสริมสารเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเซลล์พืชจะมีความจำเป็นมากในการช่วยโอกาสการเจริญที่สูงกว่า ทั้งนี้เพราะการพัฒนาของเซลล์เพื่อเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะส่วนต่างๆนั้น จะมีความจำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณที่เหมาะสม (Devlin และ Witham, 1980 ; Butenko, 1985)

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เป็นออกซินที่นิยมใช้ชักนำให้เกิดแคลลัส และให้คงสภาพแคลลัสไว้ และมีความสามารถยับยั้งการสร้างอวัยวะ (organogenesis) (Staba,1980)

BA (Benzyladenine) เป็นไซโตไคนินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส ทำหน้าที่ให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว เสริมการยืดตัวของเซลล์ และทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น (Grenlach,1973)

Ruiz และ Valadez (1985) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสของบานไม่รู้โรย (Gomphrena globosa บนอาหาร MS ที่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับต่างๆ กันคือ $10^{-5}$ M napthalene acetic acid (NAA), benzyladenine (BA) $10^{-9}$ M, NAA $10^{-5}$ M ร่วมกับ BA $10^{-8}$ M และ 2,4-D $10^{-6}$ M ร่วมกับ BA $10^{-8}$ M พบว่าอาหารที่เสริมด้วย 2,4-D $10^{-6}$M ร่วมกับ BA $10^{-8}$M จะให้การเจริญของแคลลัสสูงสุด และได้แคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดหรือราก

เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D ในระดับ 0, 1, 2, 3, 4 มก./ล. ร่วมกับ BA 0, 1, 2, 3 มก./ล. ต่อเนื้อเยื่อพืชทั้ง 3 ส่วน ทำการเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2 ° ซ ให้แสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าการชักนำการเกิดแคลลัสในเนื้อเยื่อส่วนของต้นและชิ้นส่วนของใบที่ระดับความเข้มข้นของ BA สูงๆ การสร้างแคลลัสมีแนวโน้มลดลงและที่ BA สูงๆ ลักษณะของแคลลัสส่วนของต้นที่ได้จะมีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ ในขณะที่แคลลัสจากชิ้นส่วนของใบจะมีลักษณะเกาะกันแน่นกว่า การเพิ่ม 2,4-D จะเพิ่มการชักนำการเกิดแคลลัสในทุกส่วนของพืช BA ที่ความเข้มข้นไม่สูงนักจะมีส่วนในการชักนำการเกิดแคลลัสในเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าด้วย แต่ที่ BA สูงถึง 3 มก./ล. จะมีผลไปยับยั้งการเกิดแคลลัส นอกจากนี้ BA ยังมีผลทำให้แคลลัสที่ได้ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เกาะกันอย่างหลวมๆ เป็นแบบ friable callus พบว่าการทำงานร่วมกันของ 2,4-D และ BA จะให้การเกิดแคลลัสดีกว่าเมื่อมีสารควบคุมตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว และให้ผลสอดคล้องกันว่าเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของใบและส่วนของต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. จะชักนำการสร้างแคลลัสดีที่สุด

สำหรับเนื้อเยื่อชั้นอีพิเดอร์มิสนั้น ในการทดลองใช้เนื้อเยื่อเริ่มต้นมาทำการเพาะเลี้ยงหลายๆครั้ง พบว่ามีปัญหาและอุปสรรคค่อนข้างมาก คือมีปัจจัยภายนอกเข้ามาร่วมด้วยเช่น ฤดูกาล โรคพืช และการปนเปื้อน ทำให้การทดลองได้ผลแตกต่างกันยากในการควบคุม แต่จากผลการทดลองหลายๆครั้งให้ผลสอดคล้องกันว่า อาหาร 1/2 MS ที่เสริม 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ชักนำการเกิดแคลลัสได้ดี และเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของเปลือก ดังนั้นจะเลือกใช้อาหารสูตรนี้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชั้นอีพิเดอร์มิสด้วย

เมื่อติดตามการเจริญของแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบบนอาหาร 1/2 MS ที่แปรผัน

ความเข้มข้นของ 2,4-D และ BA จะเห็นได้ว่าความเข้มข้น 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. นอกจากจะชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดแล้ว ยังเป็นระดับสารควบคุมที่กระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้สูงที่สุด นอกจากนี้พบว่ารูปแบบการเจริญของทุกความเข้มข้นเหมือนกัน คือแคลลัสจะเข้าสู่การเจริญสูงสุดที่ 6 สัปดาห์และที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D : BA (1:2 มก./ล.) จะให้การเจริญสูงสุด รองลงมาคือ 2,4-D : BA (4:2 มก./ล.) ส่วนที่ระดับ 2,4-D : BA (2:2 และ 3:2) การเจริญสูงสุดใกล้เคียงกันและต่ำกว่าที่ระดับอื่น

การแปรผันระดับ 2,4-D และ BA เทียบกับสูตรควบคุม (2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.) ให้ผลว่าไม่ใช่ปริมาณของ 2,4-D หรือ BA ที่ควบคุมการชักนำการเกิดแคลลัสและการเจริญของเซลล์ แต่จะเป็นสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญทั้ง 2 ชนิด ที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาแคลลัสของเนื้อเยื่อต้นไข่เน่า อาหารที่มี BA สูงๆ แม้ว่าจะสามารถชักนำการเกิดแคลลัสจากส่วนของต้นได้ดี แต่ไม่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัส เพราะนอกจากจะให้การเจริญต่ำแล้ว ยังไม่สามารถรักษาสภาพของแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงไว้ได้แบบต่อเนื่อง แต่สำหรับอาหาร 1/2 MS ที่เสริม 2,4-D : BA (1 : 2 มก./ล.) จะให้การเจริญของแคลลัสเพิ่มขึ้นสูงกว่าเมื่อมี 2,4-D เท่ากันแต่เพิ่ม BA เป็น 3 มก./ล. เกือบ 8 เท่าของน้ำหนักสดภายใน 6 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะเหลืองสดและมีสภาพสมบูรณ์จนสิ้นสุดการทดลอง ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากส่วนของต้น คืออาหาร 1/2 MS ที่เสริม 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

ดังนั้นในการวิจัยนี้จะใช้สูตรอาหาร 1/2 MS ที่เสริม 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. เป็นอาหารสูตรมาตรฐานและควบคุมเพื่อการศึกษาคุณสมบัติของแคลลัส และสภาวะการผลิตเบตา-เอคไดโซนในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต่อไป

การติดตามการเจริญของแคลลัสจากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วนบนอาหาร 1/2 MS ที่เสริม 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. โดยการชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่ารูปแบบการเจริญคล้ายคลึงกัน และแคลลัสส่วนของต้นเจริญได้สูงสุดเกือบ 8 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้นในขณะที่แคลลัสจากส่วนของใบและชั้นอีพิเดอร์มิสมีการเจริญได้ประมาณ 6 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้นและการเจริญใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญต่อแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของพืชชนิดเดียวกันจะมีผลต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งอาจมีปัจจัย กลไกควบคุมการเจริญและการแบ่งเซลล์ในสภาวะที่เหมือนกันแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้

อาจขึ้นกับอายุและลักษณะของแคลลัสที่นำมาเพาะเลี้ยงด้วย

นอกจากการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญต่อการเจริญของแคลลัส ที่ได้จากเนื้อเยื่อของต้นไข่เน่าโดยติดตามน้ำหนักสดแล้ว ยังได้ทดสอบอิทธิพลของความเข้มข้นสารอาหารต่อการชักนำและการเจริญของแคลลัส โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วนบนอาหาร MS และ 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ผลการทดลองยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่าอาหารสูตร MS ถึงแม้จะมีสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมก็ไม่สามารถชักนำการสร้างแคลลัสในชิ้นส่วนของใบ แต่สำหรับชั้นอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้นสามารถถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่การเจริญของแคลลัสจากเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิดในอาหารสูตร MS จะมีค่าต่ำกว่าใน 1/2 MS ที่เสริมสารควบคุมการเจริญ เมื่อเปรียบเทียบเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วนบนอาหาร 1/2 MS ที่เสริมสารควบคุมการเจริญ พบว่าเนื้อเยื่อส่วนของต้นจะถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (86%) รองลงมาคือชั้นของอีพิเดอร์มิส (29.42%) และชิ้นส่วนของใบ (10.04%) ตามลำดับ และส่วนของต้นมีการเจริญดีที่สุด ( GI = 1.89 ) รองลงมาคือชั้นอีพิเดอร์มิส ( GI = 1.52 ) และใบ ( GI = 0.87 ) ตามลำดับ นั่นแสดงว่าความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำ และการเจริญของแคลลัส คือ อาหาร 1/2 MS ที่เสริม 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ผลการทดลองสอดคล้องกับการแปรเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นซิงโคนา เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญสูงสุดพบว่าอาหาร 1/2 MS ที่เสริม 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. เหมาะสมต่อการเจริญแคลลัสมากที่สุด (Mulder และคณะ 1982)

แสง เป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แม้ว่าโดยทั่วไปแสงไม่จำเป็นต่อการเจริญของแคลลัส เพราะแคลลัสจะได้รับพลังงานจากน้ำตาลที่มีอยู่ในจากอาหารเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามแสงก็มีผลต่อขบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ทำให้เซลล์หรือแคลลัสของพืชเจริญได้แตกต่างกับในที่ไม่มีแสง (Mantell และ Smith, 1983 ; Gamborg, 1984 )

เมื่อศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั้ง 3 ส่วนบนอาหาร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. เก็บไว้ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน และในที่มืดตลอดเวลา จะเห็นได้ว่า แสงสามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืด

ในทุกส่วนของพืช โดยเฉพาะชิ้นส่วนของใบและชั้นอีพิเดอร์มิส แต่อิทธิพลของแสงต่อการเกิดและการเจริญของแคลลัสจากส่วนของต้น จะไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจนมากนัก

นอกจากนี้ลักษณะของแคลลัสในที่มืดและในที่สว่างจะแตกต่างกันออกไป คือ ในที่มืดแคลลัสจะมีสีขาวใสเกาะกันอย่างหลวมๆ แต่ในที่สว่างแคลลัสส่วนต้นจะมีสีเหลืองปนเขียวเล็กน้อย ส่วนของใบจะมีแคลลัสสีเหลืองปนกับแคลลัสสีเขียว ในขณะที่แคลลัสจากชั้นอีพิเดอร์มิสจะมีสีเหลืองจางๆปนแคลลัสสีขาวใส และทุกส่วนจะมีลักษณะเกาะกันแน่นกว่าในที่มืด โดยในส่วนใบจะมีลักษณะเกาะกันแน่นมากที่สุด รองลงมาคือส่วนของต้นและชั้นอีพิเดอร์มิสตามลำดับ

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4) ซึ่งพบว่าแคลลัสจากส่วนของต้นที่เจริญในที่มืดจะให้ค่า GI สูงกว่าในที่สว่าง จึงติดตามการเจริญโดยการชั่งหาน้ำหนักสดและแห้งของแคลลัสส่วนของต้น ในอาหาร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตรเดียวกันแต่เก็บไว้ในที่มืดตลอดเวลา พบว่ารูปแบบการเจริญของแคลลัสในสภาวะทั้งสองคล้ายคลึงกัน และเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดที่ 6 สัปดาห์เท่ากัน แต่แคลลัสที่เจริญในที่สว่างมีการเจริญสูงสุดสูงกว่าเล็กน้อย คือเจริญได้มากกว่า 3 เท่าของน้ำหนักแห้งเริ่มต้น แต่ในที่มืดเจริญได้ประมาณ 2 เท่าของน้ำหนักแห้งเริ่มต้นเท่านั้น ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำและการเจริญแคลลัสจากเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของใบ ชั้นอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้นไข่เน่า คือในอาหาร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 °ซ มีรายงานว่าแสงมีอิทธิพลต่อการเจริญของแคลลัสเช่นแคลลัสจากส่วนของต้นของชิงโคนา Cinchona pubescens จะเจริญในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ได้ดีกว่าในที่มืด (Mulder-Krieger และคณะ,1982) ในขณะที่การให้แสงจะมีอิทธิพลต่อยับยั้งการเจริญของเซลล์ Coptis japonicas (Sato และ Yamada, 1982)

การศึกษาลักษณะของแคลลัส

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเนื้อเยื่อพืชทั้ง 3 ส่วน บนอาหารและสภาวะมาตรฐานที่ใช้เป็นเวลานาน 6 เดือน โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆเดือนหลังจากนั้นแล้วทำการศึกษารูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงจำนวนและลักษณะโครโมโซมอีกด้วย

จากการศึกษาลักษณะภายนอก ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าแคลลัสทั้ง 3 ส่วน ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดมีรูปร่างแตกต่างกันคือ รูปรี ( ขนาด 50x40, 80x40 ไมโครเมตร ) รูปวงกลม (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30-50 ไมโครเมตร) และรูปยาว (ขนาด 120x40, 180x40 ไมโครเมตร) จะพบเซลล์ทั้ง 3 แบบในทุกส่วนของแคลลัสแต่ในปริมาณแตกต่างกัน ในแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบจะพบเซลล์รูปยาวมากกว่าเซลล์ชนิดอื่น เซลล์รูปกลมจะพบเป็นจำนวนมากในแคลลัสจากทุกส่วนของพืช เมื่อศึกษาภายในเซลล์เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยการย้อมสีของแคลลัสที่ช่วงระยะการเจริญต่างๆกัน ผลการทดลองถึงแม้ว่าจะไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้อย่างชัดเจนถูกต้องมากนัก แต่เมื่อทำการทดลองหลายๆครั้ง และนำผลที่ได้มาเทียบกับรายงานจำนวนโครโมโซมของพืชสกุล Vitex โดยทั่วไป พบว่าต้นไข่เน่ามีจำนวน 2N = 32 แท่ง Moore(1973) รายงานว่าพืชในสกุล Vitex โดยทั่วไปมีจำนวนแท่งของโครโมโซมใกล้เคียงกัน คือประมาณ 32-34 แท่ง นั่นแสดงว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เป็นเวลานานประมาณ 6 เดือน ก็ยังมีจำนวนของโครโมโซมใกล้เคียงกับพืชธรรมชาติ

ปริมาณน้ำ(Water content) ในแคลลัส

จากการศึกษา ปริมาณน้ำภายในเซลล์ของแคลลัสที่ได้จากส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า พบว่าปริมาณน้ำในแคลลัสแต่ละส่วนมีความแตกต่างกันบ้างแต่ไม่มากนัก คือแคลลัสจากชั้นอีพิเดอร์มิสมีปริมาณ น้ำในเซลล์มากที่สุด (98.04%) รองลงมาคือแคลลัสจากส่วนของต้น (97.06%) และจากส่วนของใบ (95.94%) ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะของเซลล์ที่ตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แคลลัสใบซึ่งส่วนใหญ่เป็นเซลล์สายยาวมีไซโตพลาสซึมน้อยกว่าเซลล์กลมที่พบส่วนใหญ่ในแคลลัสจากชั้นอีพิเดอร์มิสและส่วนของต้น

การพัฒนาวิธีสกัดแยกเบตา-เอคไดโซน

วิธีสกัดสารกลุ่มเอคไดโซนมักจะให้กับแหล่งของสารเริ่มต้น ถ้าเป็นการสกัดแยกจากสัตว์ มักนิยมใช้เมธานอลหรือเอธานอล (Wilson และคณะ, 1980 ; Scalia และ Morgan, 1982, 1985; ) เป็นตัวทำละลาย แต่สำหรับในพืชซึ่งมีลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์และไซโตพลาสซึมแข็งแรงและหนากว่าเซลล์สัตว์ การสกัดแยกสารเบตา-เอคไดโซนโดยการบดตัวอย่างพืชกับตัวทำละลายอินทรีย์โดยตรงและใช้เวลาสั้น ที่อุณหภูมิต่ำไม่เพียงพอที่

จะสกัดแยกสารทั้งหมดออกจากเซลล์พืชได้

Imai และคณะ(1967) ทำการสกัดโพแนสเตอโรน เอ และ เบตา-เอคไดโซน ออกจากพืชในวงศ์ podocarpaceae และพืชในสกุล Taxus โดยการต้มสารละลายตัวอย่างบดกับเอธานอล นอกจากนี้ยังมีอีกหลายรายงานที่ใช้การสกัดแยกโดยใช้เอธานอล (Imai และคณะ, 1967; Schooley และคณะ, 1972; Werawatanametin, 1986)

Imai และคณะ (1968) สกัดไซแอสเตอโรน และ เบตา-เอคไดโซน จากพืช Ajuga decumbens Thunb A. nipponensis Makino A. insica และในพืชสกุล Trillium อีกหลายชนิดโดยการแช่ย่ากับเมธานอล (5 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง ) วิธีเดียวกันนี้ยังถูกนำไปใช้กับพืชชนิดอื่นๆ อีกเช่นพืชสกุล Ajuga Blechnum amabile Makino and B. niponicum Makino (Blechnaceae), Helleborus และ Vitex thrysiflora เป็นต้น (Takemoto และคณะ, 1969 ; Hardman และ Benjamin, 1977 ; Kubo และคณะ, 1983,1985 )

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของการสกัดสารเบตา-เอคไดโซน โดยใช้เอธานอลและเมธานอลที่สภาวะต่างๆกัน เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารเบตา-เอคไดโซนจากต้นไข่เน่า ผลปรากฏว่าการสกัดด้วยเมธานอลโดยใช้ Soxhlet apparatus เป็นเวลา 4 ชั่วโมงได้ปริมาณเบตา-เอคไดโซนสูงกว่าการสกัดด้วยเมธานอลโดยแช่ย่าที่อุณหภูมิ 55 °ซ ถึง 3 เท่า Ogawa และคณะ (1977) พบว่าวิธีสกัดเบตา-เอคไดโซน จาก Achyranthes radix ที่ดีที่สุดควรใช้ Soxhlet apparatus นาน 5 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดโดยใช้เอธานอลและเมธานอล โดยใช้ Soxhlet apparatus นาน 4 ชั่วโมง พบว่าใช้ เอธานอล 95% จะให้ประสิทธิภาพของการสกัดแยกเบตา-เอคไดโซน (2.30%) สูงกว่าเมื่อสกัดด้วยเมธานอล (0.2916%) ประมาณ 80 เท่า Schooley และคณะ (1972) รายงานว่าการสกัดสารเบตา-เอคไดโซนจากพืช Podocarpus nakaii และเมื่อใช้เอธานอลจะสกัดได้ประสิทธิภาพสูงสุด และมากกว่าเมธานอลเช่นกัน

การแปรผันเวลาของการสกัดด้วย เอธานอล 95% ใน Soxhlet apparatus (ตารางที่ 7 ) แสดงให้เห็นว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงจะสามารถสกัดสารเบตา-เอคไดโซนได้สูงสุดคือสูงกว่าเมื่อใช้เวลาสกัด 4 ชั่วโมงถึงเกือบ 20 เปอร์เซนต์ ดังนั้นในการสกัด

แยกสารเบตา-เอคไดโซนจากตัวอย่างที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ จะสกัดด้วยเอธานอล 95% โดยใช้ Soxhlet apparatus เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตัวอย่างกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์

วิธีการตรวจสอบชนิดและปริมาณของสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์อย่างคร่าวๆ ทำได้โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง (TLC) (Imai และคณะ ,1967; Ruh และ Black,1976; Kaplanis และคณะ, 1980; Wilson และคณะ,1981 ; Wilson,1985) วิธีการตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ บนแผ่นโครมาโตแกรมที่ทำได้หลายวิธี เช่น ฉีดพ่นด้วย กรดซัลฟูริค 20% ให้ความร้อนที่ 100 °ซ นาน 5 นาที หรือ กรดซัลฟูริคเข้มข้น ให้ความร้อนที่ 110 °ซ นาน 10 นาที ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร ฉีดพ่นด้วย vanillin-$H_2SO_4$-95% ethanol (5;70:25, w/v/v) หรือ anisaldehyde

จากผลการทดลอง ศึกษาระบบตัวชะที่เหมาะสมต่อการแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากต้นไข่เน่าธรรมชาติ โดยใช้สารสกัดจากส่วนเปลือกและติดตามตรวจสอบชนิดเอคไดโซนโดยใช้วิธี UV detection ที่ 254 นาโนเมตรและ/หรือฉีดพ่นด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น เทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ พบว่าระบบตัวชะที่มีประสิทธิภาพดีมี 3 ระบบคือ คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(3:1), คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(4:1) และ คลอโรฟอร์ม-เอธานอล (65:35) ซึ่งจะให้ค่า Rf ของเบตา-เอคไดโซนเท่ากับ 0.60, 0.57 และ 0,67 ตามลำดับ เบตา-เอคไดโซน และ 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซนจะให้สีเหลืองกับกรดซัลฟูริค ส่วนมาคีสเตอโรน เอ ให้สีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วยกรดซัลฟูริค นอกจากนี้การแยกองค์ประกอบของสารบนแผ่น TLC สำเร็จรูปจะให้ผลที่ดีกว่า ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการเตรียมเพลตขึ้นเองอาจมีประสิทธิภาพของเพลต ตลอดจนการพัฒนาก็ค่อนข้างจะยุ่งยากใช้เวลานาน วิธีตรวจสอบชนิดของสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์โดยใช้พ่นด้วย anisaldehyde และนำไปอังบนเตาไฟฟ้า จะสังเกตและติดตามความเปลี่ยนแปลงสีของแต่ละสารประกอบได้ซึ่งจะช่วยในการจำแนกได้ว่าจุดต่างๆ ตรงกับสารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบหรือไม่ ตัวอย่างเช่น เบตา-เอคไดโซนจะเปลี่ยนสีจากม่วงชมพูเข้มไปเป็นเขียว 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซี-เอคไดโซน เปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นส้มอมเขียว และ มาคีสเตอโรน เอ เปลี่ยนสีจากชมพูม่วงเป็นสีม่วง

ผลการเปรียบเทียบ sensitivity ของวิธีการใช้ตรวจสอบตำแหน่งและชนิดของสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ด้วยเทคนิค TLC 4 วิธีคือ (1) UV detection (2) สเปรย์ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น (3) สเปรย์ด้วย Vanillin-sulfuric acid (4) สเปรย์ด้วย anisaldehyde บนแผ่นอลูมิเนียมฉาบด้วยซิลิกาเจล 60 เอฟ$_{254}$ ตัวชะคือ คลอโรฟอร์ม-เมธานอล (4:1) พบว่า การตรวจสอบด้วยแสง UV จะให้ sensitivity ดีกว่า การสเปรย์ด้วยสารที่ทำให้เกิดสีเล็กน้อย และการสเปรย์ด้วยสารต่างชนิดกัน sensitivity ไม่แตกต่างกัน วิธี ตรวจสอบสารโดยใช้ UV detection สำหรับ TLC มี sensitivity กว่าแล้วยังรวดเร็วกว่าวิธีอื่นด้วย ผลการทดลองสอดคล้องกับงานของ Ruh และ Black ( 1976 )

ข้อได้เปรียบของระบบ TLC คือ (1) การใช้ระบบตัวชะเพียงระบบเดียวก็สามารถให้การแยกที่ดี (2) รวดเร็วและ sensitivity แม้ว่า sensitivity จะต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบโดยวิธี GC และ HPLC และจะมีสารตัวอย่างจำนวนหนึ่งที่ถูกดูดซับบนสารซิลิกาและไม่สามารถสกัดแยกออกมาได้

จากการตรวจสอบชนิดของสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ ในสารสกัดตัวอย่างจากส่วนต้นและเปลือกบนแผ่นอลูมิเนียมฉาบด้วย ซิลิกาเจล 60 เอฟ$_{254}$ ระบบตัวชะคือ คลอโรฟอร์ม-เมธานอล (3:1) ตรวจสอบสารโดยใช้ UV detection และสเปรย์ด้วย anisaldehyde เทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ พบว่า ในสารสกัดที่แยกได้มีทั้งเบตา-เอคไดโซน และ 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซนโดยพบสารประกอบทั้ง 2 ชนิดในส่วนเปลือกมากกว่าในส่วนต้น สำหรับในใบตรวจพบเบตา-เอคไดโซนเพียงชนิดเดียว

สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์โดยเทคนิค HPLC หลักการตรวจสอบสารดูดกลืนแสงของกลุ่มคีโต(alpha,beta-unsaterated keto-chromophore) ที่เป็นโครงสร้างที่พบในฮอร์โมนลอกคราบพืชทุกชนิด สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ UV 254 นาโนเมตร (Hardman, 1979)

วิธีการแยกสารในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ด้วย HPLC มีการศึกษาทั้งระบบ normal-phase และ reverse phase (Wilson และคณะ,1980; Scalia,1982) Lafont และคณะ(1979) ได้ทดสอบคอลัมน์ HPLC ที่มีจำหน่ายในการค้าด้วยระบบตัวชะต่างๆ กันพบว่า คอลัมน์ $C_{18}$ reversed-phase ที่มีอะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่ระบบ isocratic จะให้ผลดีที่สุด และ UV detection สามารถตรวจสอบปริมาณเบตา-เอคไดโซนในปริมาณที่น้อย

กว่า 10 นาโนกรัมได้ นอกจากนี้ระบบ reversed-phase ยังมีความเสถียรมากกว่าระบบ normal-phase และไม่มีสารปนเปื้อนในตัวอย่างหรือมีจำนวนน้อยที่ออกหลังเบตา-เอคไดโซน

Gilgan(1976) ศึกษาระบบที่เหมาะสมในการแยกสารตัวอย่างที่มีสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์หลายๆชนิด บนคอลัมน์ Corasil II และ Bandapak phenyl-corasil ขนาด 1000x3 mm.I.D. ตรวจสอบสารด้วย UV detector ที่ 254 นาโนเมตร และพบว่าถ้ามีสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์หลายๆชนิดอยู่รวมกันแล้ว เป็นการยากที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะแยกได้ชัดเจน เพราะโครงสร้างและความเป็นขั้วใกล้เคียงกัน

Lafont และ Martin-Somme(1979) ใช้คอลัมน์ Zorbax ODS ที่มีปริมาณ stationary phase สูง(14%) มีจำนวนชั้น(plate number) 8,000 ชั้นสำหรับคอลัมน์ขนาด 25 ซม. ตรวจสอบสารที่ UV 254 นาโนเมตร ศึกษาการแยกของสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์โดยใช้ระบบตัวชะต่างๆกัน พบว่าอะซิโตรไนไตรล์-น้ำ(5-10% ถึง 30-40% อะซิโตรไนไตรล์ในน้ำ) อัตราการไหล 0.8-1.5 มล./นาที จะให้การแยกที่ดีที่สุด

แม้ว่าอะซิโตรไนไตรล์จะให้การแยกที่ดี แต่เนื่องจากมีอันตรายต่อผู้ใช้และราคาแพง อีกทั้งระบบเมธานอล-น้ำ สามารถแยกสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ได้ดี ดังนั้นในการศึกษาเบตา-เอคไดโซนโดยทั่วไปนิยมใช้เมธานอล-น้ำเป็นตัวชะ (Issac และคณะ,1982; Scalia, 1982; Wilson และคณะ,1982a,1982b ;Scalia และ Morgan,1985 )

ในงานวิจัยนี้ใช้คอลัมน์ Zorbax $C_{18}$(ODS) ขนาด 4.6 มม.x 25 ซม. การศึกษาขั้นต้นคือศึกษา retention time ของสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ ในระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ ในอัตราส่วนต่างๆกัน อัตราการไหลคงที่คือ 1 มล./นาที พบว่าการเพิ่มเปอร์เซนต์เมธานอล มีผลให้ค่า retention time ของสารมาตรฐานทุกตัวลดน้อยลง

โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ เมื่อใช้ คอลัมน์ Zorbax $C_{18}$ ที่มีเมธานอล-น้ำ(45:55) เป็นตัวชะ อัตราการไหล 1 มล./นาที (ภาพที่ 18) ลำดับของสารมาตรฐานและ retention time ที่ผ่านคอลัมน์คือ 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซี-เอคไดโซน ( Rt=5.31 ) เบตา-เอคไดโซน ( Rt=8.47 ) โพลีโพดีน บี( Rt=9.15) มาคีสเตอโรน เอ ( Rt=11.78) แอลฟา-เอคไดโซน ( Rt=13.27) และโพแนสสเตอ-โรน เอ ( Rt=31.45) ออกเป็นลำดับสุดท้าย

เมื่อใช้สภาวะดังกล่าวตรวจวิเคราะห์ชนิดและระดับสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ ในสารสกัดจากส่วนใบ เปลือก ชั้นอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้นของต้นไข่เน่า พบว่าที่ระบบ

ตัวชะ: เมธานอล-น้ำ (45:55) สามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเบตา-เอคไดโซนในส่วนเปลือก ชั้นอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้น โดยใช้มาคีสเตอโรน เอ เป็นสารมาตรฐานภายใน แต่ไม่เหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนในส่วนใบ เพราะมีสารปนเปื้อนอยู่ในปริมาณที่มากกว่า ซึ่งพีคของสารปนเปื้อนเหล่านั้นรบกวนพีคของเบตา-เอคไดโซนและมาคีสเตอโรน เอ

จากโครมาโตแกรมแสดงอย่างชัดเจนว่า ส่วนประกอบของพืชแต่ละส่วนจะมีสารประกอบภายในแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ เป็นเพราะส่วนประกอบของพืชทำหน้าที่แตกต่างกัน เช่น ใบทำหน้าที่สร้างอาหาร เกิดขบวนการสังเคราะห์แสงและเมตาบอลิซึมภายในมากมาย เกิดสารหลายชนิดทั้งจำนวนมากและน้อยที่สามารถตรวจพบได้ ส่วนต้นตรวจพบชนิดและปริมาณสารน้อยที่สุด เพราะเซลล์ต้นพืชไม่ได้มีหน้าที่หลักในการสร้างสาร หน้าที่สำคัญจะลำเลียงอาหารและให้ความแข็งแรงแก่ต้นพืช เมื่อเปรียบเทียบชั้นอีพิเดอร์มิสกับส่วนเปลือกต้น จะเห็นว่ามีลักษณะโครมาโตแกรมของสารสกัดคล้ายกันมาก แต่ในส่วนเปลือกต้นมีปริมาณสารมากกว่ารวมทั้งเบตา-เอคไดโซนด้วย

ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเบตา-เอคไดโซนในส่วนใบ ต้องเปลี่ยนระบบตัวชะจากเมธานอล-น้ำ(45:55) เป็นอะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (18.5:81.5) อัตราการไหล 1 มล./นาที ซึ่งจะลดการรบกวนของพีคข้างเคียงและให้พีคเด่นชัดขึ้น

สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณในแคลลัสส่วนต่างๆ จะมีสารปนเปื้อนที่มีขั้วสูงอยู่เป็นจำนวนมาก ที่ถูกชะออกก่อนเบตา-เอคไดโซน จึงมีความจำเป็นต้องกำจัดสารปนเปื้อนที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก เพราะสารเหล่านี้รบกวนการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ทำให้การคำนวณปริมาณสารคลาดเคลื่อน

การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณของเอคไคสสเตอร์รอยด์ ซึ่งโดยมากจะ partition ระหว่างเฮกเซนกับแอลกอฮอล์-น้ำ เฮกเซนกับอะซิโตรไนไตรล์ คลอโรฟอร์มกับน้ำเพื่อกำจัดไขมัน หรือบิวทานอลกับน้ำเพื่อกำจัดสารมีขั้วสูง ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้เฮกเซนกับเอธานอล-น้ำ เพื่อกำจัดไขมันส่วนใหญ่ออกไป แม้ว่าพวกไขมันไม่ใช่ปัญหาสำคัญในการวิเคราะห์สาร แต่ผ่านการสกัดด้วยเฮกเซน จะทำให้ตัวอย่างสะอาดขึ้น เพื่อลดความสกปรกที่จะไปเกาะในคอลัมน์เป็นการยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ด้วย การสกัดด้วยเฮกเซนเป็นการกำจัดสารกลุ่มที่มีขั้วต่ำแต่ในสารสกัดจากแคลลัสนั้น สารปนเปื้อนส่วนใหญ่ที่รบกวนการวิเคราะห์เป็นสารที่มีความเป็นขั้วสูง การสกัดด้วยเฮกเซนขั้นตอนเดียวยังไม่เพียง

มีรายงานว่าการใช้ Sep-pak $C_{18}$ ซึ่งเป็นคอลัมน์สำเร็จรูป สามารถกำจัดสารปนเปื้อนในการวิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนทั้งในพืชและสัตว์จำนวนมาก ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง (Lafont, 1979; Lafont และคณะ,1982 ; Pimprikar และคณะ,1984 ; Scalia และ Morgan,1982,1985 ) ซึ่งสะดวกและมีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับวิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนทั้งในพืชและในสัตว์

จากผลการวิจัย พอจะกล่าวได้ว่าสารสกัดที่จะนำไปวิเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนโดยวิธี HPLC ควรผ่านการสกัดด้วยเฮกเซน และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย Sep-pak $C_{18}$ ที่จะเก็บสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ไว้ภายใน และยอมให้สารปนเปื้อนที่มีขั้วผ่านออกไปกับชั้นน้ำ และชะสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ออกจากคอลัมน์ด้วยเมธานอล สำหรับสารสกัดจากแคลลัสทุกส่วน จะผ่านการสกัดด้วยเฮกเซน 2 ครั้ง และผ่านลงในคอลัมน์ Sep-pak $C_{18}$ จากนั้นชะด้วยน้ำ 10 มล.MeOH 20% 10 มล. และ MeOH 80% 10 มล. สารเบตา-เอคไดโซนจะถูกชะออกมาในชั้น MeOH 80% พบว่าวิธีนี้จะให้ %recovery สูงถึง 73.86% ซึ่งใกล้เคียงกับงานของ Pimprikar (1984) นอกจากนี้วิธีการสกัดด้วยเฮกเซน และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sep-pak $C_{18}$ นี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สะดวกและรวดเร็วเหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ และ คอลัมน์ Sep-pak ที่ใช้แล้วเมื่อล้างด้วยเมธานอล และทำให้สมดุลย์ด้วยน้ำ สามารถนำกลับมาใช้ได้อีกหลายครั้ง

เมื่อศึกษาการเจริญและผลิตสารเบตา-เอคไดโซน ในแคลลัสจากส่วนต่างๆ ของต้นไข่เน่า โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐานที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. หลังจากนั้นทำการสกัดแยก และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของเบตา-เอคไดโซนโดยเทคนิค HPLC ในระบบตัวชะคืออะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% พบว่ารูปแบบการเจริญคล้ายกันคือเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดที่เวลา 6 สัปดาห์ใกล้เคียงกันทั้ง 3 ชนิด โดยแคลลัสส่วนต้นมีการเจริญได้สูงสุด สูงกว่าแคลลัสจากส่วนของใบและชั้นอีพิเดอร์มิสประมาณ 25 เปอร์เซนต์ เมื่อทำการวัดปริมาณเบตา-เอคไดโซนในแต่ละช่วงระยะการเจริญ พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งปริมาณและระยะการสร้างเบตา-เอคไดโซนสูงสุด คือแคลลัสจากส่วนของต้นจะสร้างเบตา-เอคไดโซนสูงสุดเท่ากับ 0.014 กรัมเปอร์เซนต์(%) ที่ระยะ mid-log (4 สัปดาห์) ต่ำสุดเท่ากับ 0.005 กรัม% ที่ระยะ log แคลลัสจากชั้นอีพิเดอร์มิสจะสร้างสูงสุดเท่ากับ 0.003 กรัม% ที่ระยะ late log (6 สัปดาห์) ต่ำสุดเท่ากับ 0.001 กรัม% ที่

ระยะ stationary (8 สัปดาห์) แคลลัสจากชิ้นส่วนของใบจะสร้างเบตา-เอคไดไดโซน สูงสุดเท่ากับ 0.003 กรัม% ที่ระยะ mid log (2 สัปดาห์) ต่ำสุดเท่ากับ 0.002 กรัม% ที่ระยะ late log จะเห็นได้ว่าภายในเนื้อเยื่อพืชธรรมชาติ สามารถที่จะผลิตเบตา-เอคไดโซนได้ในปริมาณที่สูงกว่า (ประมาณ 10 เท่า) ซึ่งคล้ายกับที่ตรวจพบ diosgenin และ solasodine ในการเพาะเลี้ยงส่วนต้นของ Solanum jasminoides paxt พบว่า diosgenin ที่ผลิตในธรรมชาติจะมีระดับสูงกว่าที่ผลิตในแคลลัสเช่นเดียวกัน (Jain และคณะ, 1981)

ในเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าที่นำมาทดลอง พบว่าส่วนของต้นตามธรรมชาติมีปริมาณสารต่ำกว่าในชั้นอีพิเดอร์มิส แต่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์พบว่าแคลลัสส่วนต้นกลับผลิตสารได้สูงสุด และสูงกว่าแคลลัสชั้นอีพิเดอร์มิส นั่นแสดงว่าระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้น มีศักยภาพในการสังเคราะห์สารเมตาโบไลท์นี้สูงกว่าแคลลัสจากส่วนอื่น แม้ว่าจะผลิตได้น้อยกว่าในธรรมชาติ นอกจากนี้แคลลัสที่ได้ยังมีความเสถียรต่อการผลิตสาร แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์มากกว่า 2 ปี ดังนั้นในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเบตา-เอคไดโซนจึงจะใช้แคลลัสส่วนของต้นเป็นแม่แบบของการทดลองต่อไป

<u>การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อการเจริญและการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซน</u>

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าแคลลัสจะมีศักยภาพในการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน แต่ความสามารถในการสร้างยังขึ้นกับปัจจัยอีกหลายอย่าง ปัจจัยข้อหนึ่งคือแหล่งของพืชและอายุ เพราะพืชทดลองจากแหล่งอายุต่างๆกัน จะมีความสามารถในการผลิตสารแตกต่างกัน Galanes และคณะ (1984) รายงานว่าระดับของ diosgenin ที่ตรวจพบได้ในแคลลัสของ Solanum aviculare จะขึ้นกับแหล่งของพืชที่ได้เพาะเลี้ยงและอายุของพืชนั้น ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิต คือสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสที่จะมีผลกระทบโดยตรงกับการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

จากรายงานความสำเร็จในการผลิตสารทุติยภูมิ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตและสะสมของสารทุติยภูมิคือ สารเร่งการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง การเสริมสารอาหาร และสารตั้งต้นของขบวนการสังเคราะห์ในอาหาร พืชแต่ละชนิดต้องการปัจจัยเหล่านี้แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ จึงทำการศึกษาและคัดเลือกปัจจัยที่น่าจะเสริมการสร้างสารทุติยภูมิ (Barz และคณะ,1977; Hemphill และคณะ,1978;

Widholm,1980 ; Heinstein,1985; Rhodes และคณะ,1987 )

สารต้นตอคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงต่างชนิดกัน จะส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิต่างกัน จากการทดลองแปรเปลี่ยนชนิดของแหล่งต้นตอคาร์บอน โดยใช้ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสในปริมาณที่เท่ากันคือ 30 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาวะมาตรฐาน จะได้ว่ากลูโคสจะให้การเจริญของแคลลัสส่วนต้นดีกว่าซูโครสและฟรุคโตส ทั้งอัตราการเจริญและความสามารถในการเจริญสูงสุด ในขณะที่ฟรุคโตสจะเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ให้ค่าการเจริญต่ำกว่าซูโครสอย่างชัดเจน และค่าเฉลี่ยของผลผลิตเบตา-เอคไดโซนเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตรเกือบ 70% ในขณะที่ในอาหารที่มีฟรุคโตสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนจะให้ผลผลิตสูงกว่าประมาณ 30% แสดงว่าฟรุคโตสมีผลยับยั้งการเจริญแต่เสริมการสร้างเบตา-เอคไดโซน ส่วนกลูโคสส่งเสริมการเจริญแต่มีผลยับยั้งการสร้างเบตา-เอคไดโซน ผลการทดลองให้ผลทำนองเดียวกันกับงานวิจัยของ Sato และ Yamada (1984) ที่ทำการศึกษาผลของการแปรเปลี่ยนชนิดของสารต้นตอคาร์บอน ต่อการผลิตสาร berberine ในเซลล์ Coptis japonica และพบว่าฟรุคโตสจะเสริมการสร้างสารได้ดีกว่ากลูโคส

มีรายงานการศึกษา ผลผระทบของแหล่งต้นตอไนโตรเจนต่อการสร้างสารทุติยภูมิ (Tal และคณะ ,1982) พบว่าแอมโมเนียมและไนเตรทเสริมการเจริญและการสร้างสาร diosgenin ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ Dioscorea delloidea และมีรายงานว่าโดยทั่วไปการเพิ่มระดับของไนเตรท โปแตสเซียม แอมโมเนียม และฟอสเฟต จะเสริมการเจริญเติบโตหรือการขาดสารเหล่านี้จะยับยั้งการเจริญและมีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิ Zenk และคณะ (1977) เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์บนอาหารเพาะเลี้ยงต่างกัน รายงานว่าเซลล์จะเจริญได้ดีในอาหารที่เสริมสารไนเตรท แต่ปริมาณอัลคาลอยด์มีความแปรปรวนมาก Dougall (1980)สังเกตว่าการแทนสารไนโตรเจนอินทรีย์ในอาหารพื้นฐานด้วยสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่น เช่น 0.2% (w/v) peptone หรือ yeast extract จะเพิ่มการสร้างสารอัลคาลอยด์อย่างมีนัยสำคัญ

ในการทดลอง เมื่อเพิ่มโปแตสเซียมไนเตรทจากเดิมขึ้นไปอีก 1 และ 2 มก./ล. พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มโปแตสเซียมไนเตรทจากเดิม 2 มก./ล. จะให้การเจริญได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม(ประมาณ 20%) และให้ผลผลิตเบตา-เอคไดโซนสูงขึ้นมากกว่า 60% แต่ในอาหารที่มีระดับโปแตสเซียมไนเตรทเพิ่มจากเดิม 1 มก./ล กลับยับยั้งทั้งการเจริญและ

การผลิตสารซึ่งแตกต่างกันมาก มีรายงานของนักวิจัยบางกลุ่มที่แสดงให้เห็นว่า ผลของไนโตรเจนอินทรีย์อาจมีผลยับยั้งทั้งการเจริญและการสร้างสารทุติยภูมิ เช่น nicotine ในเนื้อเยื่อใบยาสูบ ที่เสริมด้วย casein hydrolysate (Pearson,1978 ;Kurz และ Constabel,1979 )

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของอุทัยพรรณ(2533) ที่ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากเนื้อเยื่อส่วนต้นของต้นไข่เน่า ในอาหาร 1/2 MS และอาหารสูตร B-5 ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. เท่ากัน พบว่าเซลล์สามารถเจริญและผลิตสารเบตา-เอคไดโซนในอาหาร B-5 ดีกว่าในอาหาร 1/2 MS ซึ่งความแตกต่างที่สำคัญคือปริมาณโปแตสเซียมไนเตรทในสารอาหาร อาหารสูตร B-5 มีโปแตสเซียมไนเตรท 2,500 มก./ล. ในขณะที่อาหาร 1/2 MS มีโปแตสเซียมไนเตรท เพียง 975 มก./ล. ต่างกันเกือบ 3 เท่า

กรดอะมิโนไธโรซีน เป็น aromatic amino acid ที่พบมากในการสร้างสารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น การเพิ่มกรดอะมิโนไธโรซีนลงในอาหารเพาะเลี้ยง จะไปเพิ่มการสร้างสารทุติยภูมิในเซลล์ของซิงโคนา Cinchona succirubra ขึ้น 60 เท่า (Schmauder และคณะ,1985)

ในการวิจัยเมื่อเพิ่มกรดอะมิโนไธโรซีน 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐาน ทำการทดลองพบว่า ไธโรซีนตั้งแต่ 1 กรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งทั้งการเจริญและการผลิตสาร โดยแคลลัสจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำอย่างรวดเร็วและไม่มีการเจริญเติบโต นอกจากนี้ความสามารถในการผลิตสารลดลงกว่าครึ่ง อาจเป็นได้ว่าความเข้มข้นของการอะมิโนไธโรซีนในอาหารสูงเกินไป จนไปยับยั้งการเจริญของแคลลัส ทำให้แคลลัสตายลง ความสามารถในการสร้างสารจึงหมดลงไปด้วย และปริมาณสารที่ตรวจพบเป็นปริมาณที่มีอยู่เดิมภายในเซลล์ก่อนแปรเปลี่ยนอาหาร

จากการศึกษาวิถีการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน พบว่ามีโคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้น ( Nakanishi และคณะ, 1972 ;Heftman, 1975) ดังในงานวิจัยนี้ จึงได้สนใจที่จะเพิ่มระดับของเบตา-เอคไดโซน โดยเสริมโคเลสเตอรอลลงในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย

เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสจากส่วนของต้นในอาหารมาตรฐาน ที่เสริมด้วยโคเลสเตอรอล 50 และ 100 มก./ล. พบว่าที่ความเข้มข้นของโคเลสเตอรอล 50 มก./ล. ยับยั้งการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซน ยิ่งความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลสูงขึ้นเป็น

100 มก./ล. จะมีผลต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะพืชไม่สามารถนำโคเลสเตอรอลไปใช้โดยตรงได้ และการเพิ่มโคเลสเตอรอลซึ่งเป็นสาร non-polar ลงในอาหารอาจไปทำให้ความสามารถในการการดูดซึมสารอาหาร วิตามิน และเกลือแร่ของแคลลัสเพื่อขบวนการเมตาบอลิซึมอื่นๆเปลี่ยนแปลงไปได้ ทำให้การเจริญและการผลิตลดลง

DL-mavalonate เป็น intermediate ที่สำคัญในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล (Heftman,1975) และนิวเคลียสของสารสเตอรอยด์หลายชนิด ในการวิจัยนี้จึงทำการเสริมสาร DL-mevalonate เข้าไปในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อศึกษาผลที่เกิดขึ้น ซึ่งพบว่าอาหารมาตรฐานที่เสริม DL-mevalonate 50 และ 100 มก. มีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัสจากส่วนของต้น ที่ 8 สัปดาห์การเจริญยังไม่เข้าสู่ระยะสูงสุด โดย DL-mavalonete ที่ความเข้มข้น 50 มก./ล จะให้การเจริญดีกว่าความเข้มข้น 100 มก./ล. นอกจากยับยั้งการเจริญแล้ว ยังยับยั้งการผลิตด้วย โดยผลิตสารลดลงจากกลุ่มควบคุมประมาณ 30 % สำหรับที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. และประมาณ 70% สำหรับความเข้มข้น 100 มก./ล. ซึ่งอาจเป็นได้ว่า DL-mavalonate ไม่เสริมสร้างการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซน และมีแนวโน้มว่ายิ่งความเข้มข้นสูงขึ้น จะยับยั้งทั้งการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซน ทั้งนี้ผลกระทบของ DL-mevalonate คล้ายคลึงกับผลกระทบของโคเลสเตอรอลก็ได้

ผลการทดลองสอดคล้องกับ Heinstein และ El-Shagi(1981) ที่เสริม DL-mavalonate (11.80 mCi/m mole) ในอาหารเพาะเลี้ยง LS ที่มี ซูโครส 30 กรัม $10^{-6}$ M 2,4-D และ $10^{-6}$ NAA เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ Gossypium hirsutim L. พบว่าจะผลิตสาร gossypol ลดลงจากเดิม 11.0 กรัม/60 กรัม เหลือเพียง 0.02 % น้ำหนักแห้ง ซึ่งเมื่อติดตามโดยติดฉลาก $C^{14}$ บน DL-mevalonate ในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่ามีการใช้ DL-mevalonate เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (3-5%)

เมื่อศึกษาผลของ $\beta$-sitosterol และ stigmasterol ซึ่งเป็น intermediate ในการสังเคราะห์สารกลุ่มสเตอรอยด์รวมทั้งโคเลสเตอรอล ดังนั้นจึงสนใจศึกษาผลกระทบที่มีต่อการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซน เมื่อเสริม $\beta$-sitosterol และ stigmasterol ในอัตราส่วน 50:50 ที่ระดับ 50 มก./ล. และ 100 มก./ล. ลงในอาหารมาตรฐาน พบว่าที่ความเข้มข้น 100 มก./ล.ไม่มีผลต่อการเจริญแต่อย่างใด ในขณะที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี $\beta$-sitosterol และ stigmasterol 50 มก./ล. จะ

ให้การเจริญต่ำกว่าแคลลัสในกลุ่มควบคุมเกือบครึ่ง อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้น stigmasterol และ $\beta$-sitosterol สูง จะให้การผลิตเบตา-เอคไดโซนต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน (ลดลงมากกว่า 50% ที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. และปริมาณ 90% ที่ความเข้มข้น 100 มก./ล.)

จิบเบอเรริค แอซิด ($GA_3$) เป็นฮอร์โมนที่พบว่ามีส่วนในการเจริญ การเปลี่ยนรูปร่าง (differentiation) และลักษณะของเซลล์โดยทั่วไป จึงสนใจที่จะศึกษาผลกระทบของฮอร์โมนนี้เกี่ยวกับการเปลี่ยนคุณสมบัติของแคลลัสต่อการผลิตเบตา-เอคไดโซน

ผลการเสริม $GA_3$ ความเข้มข้น 2 และ 10 มก./ล. ลงในอาหารมาตรฐาน พบว่าที่ความเข้มข้นของ $GA_3$ 10 มก./ล. มีการเจริญลดลงเล็กน้อย ส่วน $GA_3$ 2 มก./ล. จะให้การเจริญต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และในอาหารที่มี $GA_3$ 10 มก./ล. สำหรับความสามารถในการผลิตสารพบว่า $GA_3$ ทั้ง 2 ความเข้มข้นจะยับยั้งการสร้างสารลดลงมากกว่า 80% ในระดับ $GA_3$ 2 มก./ล. และมากกว่า 90% ในระดับ $GA_3$ 2 มก./ล.

ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลกระทบต่อการสร้างสารทุติยภูมิ คือสารควบคุมการเจริญ

Ravishanker (1979) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Trianthema portulacastrum บนอาหาร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเทียบกับอาหาร MS ที่เสริม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10 มก./ล. ตามลำดับ และตรวจวัดปริมาณเบตา-เอคไดโซน พบว่าในอาหาร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญ ได้เซลล์แห้ง 0.0376 กรัม ผลิตสารได้ 0.0039 % ในขณะที่เมื่อเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10 มก./ล. เซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็น 0.0540, 0.0944 และ 0.0357 กรัมตามลำดับ และผลิตสารได้ 0.0119, 0.0349 และ 0.0256% นั่นแสดงว่า 2,4-D สามารถเพิ่มการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้ แต่ที่ความเข้มข้นสูงระดับหนึ่ง จะไปยับยั้งทั้งการเจริญและการผลิตสารของแคลลัส

Chung และ Staba (1987) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญและการผลิตสารอัลคอลอยด์ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและปลายยอดของซิงโคนา Cinchona ledgeriana พบว่าในอาหาร MS ที่เสริม BA 5 มก./ล. จะให้การผลิตควินิน (quinine) ในระดับสูง และเมื่อไม่มี BA จะเหมาะสมต่อการผลิตสาร quinidine

ในการทดลองใช้ 2,4-D เสริมกับ BA ที่อัตราส่วนต่างๆกันในอาหารมาตรฐาน

2,4-D เป็นฮอร์โมนสังเคราะห์กลุ่มออกซิน ที่มีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงเซลล์พืชหลายชนิด นอกจากนี้ความสามารถในการสังเคราะห์สารยังขึ้นกับระยะการแปรเปลี่ยนของเซลล์หรืออวัยวะของพืช (Kohlenbach, 1977)

เมื่อทำการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2,4,8 มก./ล. ที่มี BA คงที่คือ 2 มก./ล. พบว่า ที่ 2,4-D ความเข้มข้นสูงกว่า 1 มก./ล. จะเริ่มยับยั้งการเจริญของแคลลัสและการยับยั้งเกือบสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มเป็น 4 และ 8 มก./ล. นอกจากนี้ 2,4-D ยังมีผลยับยั้งการสร้างสาร(ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ลดลงประมาณ 50%)

เมื่อลดความเข้มข้นของ BA ลงเหลือ 1 มก./ล. ส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D คงที่ 1 มก./ล. แคลลัสจะเจริญได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้นของ BA สูงขึ้น (4 มก./ล.) จะเริ่มยับยั้งการเจริญของแคลลัสและพบว่าความเข้มข้นของ BA มากหรือน้อยกว่ากลุ่มควบคุมสามารถผลิตสารได้ต่ำลงมาก (ลดลงกว่า 50%)

จากการทดลองพัฒนาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนในแคลลัสส่วนของต้นไข่เน่า สามารถผลิตสารเพิ่มขึ้นจากเดิม 0.014 กรัม% เป็น 0.0238 กรัม% และจากรายงานการศึกษาการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน โดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Hikino และคณะ (1971) ผลิตเบตา-เอคไดโซนจากแคลลัสจากเมล็ดพืชในสกุล Achyranthes ได้ปริมาณ 0.002 กรัม% และ Ravishankar(1979) ผลิตจากแคลลัสต้นกล้าของ Triathema portulacastrum ได้ปริมาณเบตา-เอคไดโซน 0.0349 กรัม% จะเห็นว่างานวิจัยนี้สามารถผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้ในระดับที่น่าพอใจ และมีแนวโน้มว่าสามารถเพิ่มการผลิตให้สูงขึ้นได้

อย่างไรก็ตาม ยังมีอีกหลายวิธีที่สามารถใช้การปรับปรุงความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิในเซลล์ของพืช เช่นใช้พืชทดลองสำหรับเพาะเลี้ยง จากต้นที่มีการสะสมสารทุติยภูมิในระดับสูงซึ่งได้รับการสนับสนุนจาก Zenk และคณะ (1977) และ Kinerslky และ Dougall (1980) เนื่องจากแสงมีผลกระทบต่อเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ แม้ว่าแคลลัสจะเจริญในที่มีแสงดีกว่า แต่มีขบวนการภายในเซลล์บางขบวนการที่แสงมีส่วนในการเสริมสร้างหรือยับยั้งการสร้างสารทุติยภูมิ รวมทั้งความเข้มแสงที่เหมาะสม (Mulder - Krieger และคณะ 1984 ;Sato และ Yamada ,1984 ) ตลอดไปจนถึงการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมเพื่อก่อเกิดการกลายพันธุ์ เหล่านี้ล้วนแต่เป็นปัจจัยที่น่าได้รับการศึกษาวิจัยอย่างยิ่ง

# สรุปผลการวิจัย

1. งานวิจัยสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของใบ ส่วนของต้น และชั้นของอีพิเดอร์มิสของต้นไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.) ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เลือกใช้ คือ อาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสม คือ 1/2MS ที่เสริม 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2°ซ ให้แสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

2. สภาวะเพาะเลี้ยงที่มีแสงจะชักนำการสร้างแคลลัส และการเจริญสูงกว่าในที่มืด ในทุกส่วนของเนื้อเยื่อใช้จากต้นไข่เน่า

3. แคลลัสที่นำมาศึกษาประกอบด้วยเซลล์หลายลักษณะเหมือนกันคือ เซลล์รูปยาว รูปกลม รูปรี แต่แตกต่างกันที่จำนวนเซลล์ต่อชนิด พบว่าแคลลัสส่วนใบมีเซลล์รูปยาวต่อกันเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่แคลลัสส่วนต้นและชั้นอีพิเดอร์มิสจะพบเซลล์ลักษณะกลมเป็นส่วนใหญ่

4. จำนวนโครโมโซมที่ตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ (2N)= 32 แท่ง

5. การเจริญของแคลลัสจะเป็น logarithmic growth โดยที่แคลลัสส่วนของต้นจะเจริญได้ด้วยอัตราความสามารถในการเจริญได้สูงที่สุด ในขณะที่แคลลัสจากชั้นอีพิเดอร์มิสจะมีการเจริญได้ช้า และมีการเจริญต่ำสุด อย่างไรก็ตามแคลลัสทั้ง 3 ชนิด จะเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดภายในระยะเวลาใกล้เคียงกันประมาณ 6 สัปดาห์

6. การศึกษาการผลิตฮอร์โมนลอกคราบในสภาพธรรมชาติ และในแคลลัสชนิดต่างๆ ที่ได้จากชิ้นส่วนของใบ ส่วนของต้น และชั้นของอีพิเดอร์มิส พบว่าเซลล์ของต้นไข่เน่าทั้งในสภาพธรรมชาติและในสภาพแคลลัสสามารถผลิตฮอร์โมนเบตา-เอคไดโซนได้

7. การวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน ในเนื้อเยื่อธรรมชาติ ส่วนใบสามารถจะทำได้โดยตรงหลังจากสกัดแยกออกจากเนื้อเยื่อด้วย เอธานอล 95% ใน Soxhlet apparatus ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเฮกเซน และวิเคราะห์สารโดยใช้ HPLC สภาวะที่ใช้คือ คอลัมน์ Zorbax $C_{18}$ ขนาด 4.6 มม.x 25 ซม. ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2%(18.5:81.5) อัตราการไหล 1 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย UV monitor ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

8. การวิเคราะห์ชนิดของสารในกลุ่ม เบตา-เอคไดโซน จากเนื้อเยื่อต่างกัน อาจทำได้โดยให้เทคนิคโครมาโตกราฟฟี เช่น พวก TLC และ/หรือ เทคนิค HPLC โดย การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ระบบตัวชะที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบจากตัวอย่างต้น ไข่เน่าคือ คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(3:1) คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(4:1) และ คลอโรฟอร์ม-เอธานอล(65:35) ที่ให้ค่า Rf ของเบตา-เอคไดโซนดังนี้ 0.60 , 0.57 และ 0.67 ตามลำดับ โดย sensitivity ของวิธีวิเคราะห์ด้วย TLC วิธีที่ดีที่สุดคือตรวจสอบการดูดกลืนสารที่ UV ช่วงคลื่นสั้น รองลงมาคือการพ่นด้วยสารเคมีที่นำปฏิกริยาเกิดสีที่สังเกตได้

9. การวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน ในเนื้อเยื่อธรรมชาติ เปลือกชั้นอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้น สามารถจะทำได้โดยตรงหลังจากสกัดแยกออกจากเนื้อเยื่อด้วย เอธานอล 95% ใน Soxhlet apparatus ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเฮกเซน และวิเคราะห์สาร โดยใช้ HPLC สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์ Zorbax $C_{18}$ ขนาด 4.6 มม.x 25 ซม. ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ (45:55) อัตราการไหล 1 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย UV monitor ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ในสภาพธรรมชาติ ส่วนเปลือกของต้นไข่เน่าจะมีการผลิตและสะสมเบตา-เอคไดโซน ได้สูงที่สุด (2.51 กรัมเปอร์เซนต์ น.น.แห้ง) รองลงมาคือในชั้นอีพิเดอร์มิส (0.2622%) ส่วนของต้น(0.1478%) และใบ (0.1332%) ตามลำดับ

10. การวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซนในแคลลัส จำเป็นต้องทำการสกัดแยกเอาสารปนเปื้อนที่มีความเป็นขั้วสูงออกจากสารตัวอย่าง โดยหลังจากสกัดแยกออกจากแคลลัสด้วย เอธานอล 95% ใน Soxhlet apparatus ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเฮกเซนแล้ว นำสารสกัดผ่าน Sep-pak $C_{18}$ แล้วชะด้วยน้ำ 10 มล. เมธานอล 20% 10 มล. เมธานอล 80% 10 มล.เก็บชั้น เมธานอล 80% ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร โดยวิธีนี้จะได้ % recovery เท่ากับ 73.86%

11. วิธีวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซนจากแคลลัส หลังจากสกัดแยกออกจากแคลลัสด้วย เอธานอล 95% ใน soxhlet apparatus ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเฮกเซน และผ่าน Sep-pak $C_{18}$ วิเคราะห์สารด้วย HPLC สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์ Zorbax $C_{18}$ ขนาด 4.6 มม.x 25 ซม. ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (14.5: 85.5) อัตราการไหล 1 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย UV monitor ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ปริมาณเบตา-เอคไดโซนในแคลลัสเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ส่วนที่ผลิตสูงสุดคือแคลลัสจากส่วนของต้น 0.014% รองลงมาคือแคลลัสชั้นอีพิเดอร์มิส 0.003% และ

แคลลัสจากชิ้นส่วนของใบ 0.0025% ตามลำดับ

12. การผลิตเบตา-เอคไดดซนในแคลลัสนั้น ระยะการเจริญของแคลลัสที่มีการสังเคราะห์สูงสุดคือ ระยะ log mid-log ถึง late-log

13. ปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อการผลิตเบตา-เอดไดโซน

13.1 แหล่งต้นตอคาร์บอน

ฟรุคโตสจะเสริมการเจริญมากกว่าซูโครสและกลูโคส และค่าเฉลี่ยการผลิตเบตา-เอคไดโซนสูงกว่าในอาหารที่ใช้ซูโครสมากกว่า 30% ในขณะที่กลูโคสจะผลิตสารได้ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับซูโครสถึง 70%

13.2 แหล่งต้นตอไนโตรเจน

อาหารที่เพิ่มโปแตสเซียมไนเตรทจากเดิม 2 กรัมต่อลิตร จะให้การเจริญของแคลลัสสูงขึ้น 20% และผลิตสารมากกว่าในสูตรควบคุมกว่า 60%

13.3 กรดอะมิโนไธโรซีน

กรดอะมิโนไธโรซีนตั้งแต่ 1 กรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งทั้งการเจริญและการผลิตสาร โดยแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีดำอย่างรวดเร็วและไม่มีการเจริญ และความสามารถ ผลิตสารลดลงกว่าครึ่ง

13.4 โคเลสเตอรอล

โคเลสเตอรอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 มก./ล.ขึ้นไป ยับยั้งการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน

13.5 DL-mevalonate

DL-mevalonate ความเข้มข้น 50 และ 100 มก./ล. ยับยั้งการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน โดยมีแนวโน้มว่าที่ความเข้มข้นสูงขึ้นยิ่งยับยั้งการสร้างสาร

13.6 $\beta$-sitosterol และ stigmasterol

$\beta$-sitosterol และ stigmasterol (อัตราส่วน 50:50) ที่ความเข้มข้น 100 มก./ล. ไม่มีผลต่อการเจริญในขณะที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. ยับยั้งการเจริญมากกว่าครึ่ง นอกจากนี้ทั้ง 2 ความเข้มข้นยังมีผลยับยั้งการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน

13.7 Gibberellic acid ($GA_3$)

$GA_3$ ไม่มีผลต่อการเจริญมากนัก แต่มีผลยับยั้งการสร้างสารสูงมาก

คือที่ความเข้มข้น 2 มก./ล. ความสามารถในการสร้างสารลดลงกว่า 80% และที่ความเข้มข้น 10 มก./ล. ความสามารถในการสร้างสารลดลงมากกว่า 90%

13.8 2,4-D

2,4-D ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 มก./ล. จะยับยั้งการเจริญของแคลลัส และมีผลยับยั้งการสร้างสารเบตา-เอคไดโซน(ลดลงมากกว่า 50%)

13.9 BA

ความเข้มข้นของ BA ต่ำกว่า 2 มก./ล. ไม่มีผลต่อการเจริญ แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะเริ่มยับยั้งการเจริญของแคลลัส และไม่ว่าความเข้มข้นจะสูงหรือต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ความสามารถผลิตสารจะลดลง