สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตสารทุติยภูมิจากดองดึงด้วยเทคนิคการขยายพันธุ์และเลี้ยงในถังหมัก

(PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES FROM CLIMBING LILY) BY TECHNICAL MICROPROPAGATION AND BIOREACTOR

ผู้ทำวิจัย

ผศ.นวรัตน์ ปานแย้ม/ รศ.นวลพรรณ ณ ระนอง/ และน.ส.ดวงสุรีย์ แสนสุริยะ

งานวิจัยประยุกต์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีงบประมาณ 2543

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ (10520)

RCH
QK
725
น299ก
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 48868
วัน, เดือน, ปี 25 S.A. 2546
b.11346607
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

สารทุติยภูมิที่พบมากในดองดึงได้แก่โคชิซินซึ่งพบมากในเมล็ดและลำต้นใต้ดินได้ศึกษาการผลิตสารไคชิซินด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เป็นแคลลัส แล้วนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อศึกษาการผลิตสารโคชิซินผลการศึกษาพบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากลำต้นใต้ดินเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารแข็ง MS. ที่มีการเติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต 2,4-D และ BAP ในอัตราส่วน 1 : 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้น้ำหนักแคลลัส 2.766 กรัม ต่อมาได้เปรียบเทียบอาหารเหลว MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BAP อาหารเหลว MS. ที่เติม NAA ร่วมกับ BAP และอาหารเหลว MS. ที่เติม IBA ร่วมกับ BAP นำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเจริญดีที่สุดที่อาหารเหลว MS. ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BAP ในอัตรา 1:1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดสารโคชิซิน จึงเติมสารกระตุ้นอชีวภาพ (โคบอลตัสคลอไรด์) 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารชนิดแข็งและเหลวในสภาวะมืดและมีแสงเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ศึกษาผลที่ได้เปรียบเทียบกับการเติมสารต้นตอ (แอล-ฟีนิลอะลานิน) ในสภาวะเดียวกัน อาหารแข็งที่เติมโคบอลตัสคลอไรด์ให้โคชิซิน 0.123 และ 0.140 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนอาหารที่เติมสารต้นตอแอล-ฟีนิลอะลานินในระดับความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} โมลาร์ พบว่าในที่มีแสงแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับ ฟลาสก์ ที่เติม แอล-ฟีนิลอะลานิน 10^{-3} โมลาร์ให้ผลผลิตโคชิซินดีที่สุดที่ 0.612 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง จึงได้นำผลมาทดลองในระดับถังหมัก (ความจุ 2 ลิตร) เพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหาร MS. ที่มี 2,4-D และ BAP ความเข้มข้น 1:1 มิลลิกรัมต่อลิตร และใส่สารต้นตอ แอล-ฟีมิลอะลานิน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ เพาะเลี้ยงในที่มีแสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ วัดน้ำหนักแคลลัสได้ 1.21 กรัม/ต่อน้ำหนักเริ่มต้น 1.00 กรัม แม้ว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสน้อยกว่าในอาหารแข็ง แต่การทดลองในระดับถังหมักนี้เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

The mainly production of secondary metabolites in Gloriosa superba Linn. is colchicine. It presents in seeds and rhizome. The production of colchicine by cullus culture were studied in varios factors. Callus formation from rhizomal tissue were initiated and subcultured onto the solid MS medium containing 1 mg/liter of 2, 4 – D and BAP at the dark in 25 – 28 °C temperature for 8 weeks. The comparision of three liquid MS medium modification for the best growth of callus culture were 2. 4 – D with BAP, NAA with BAP and IBA with BAP and cultured them for 4 weeks at the dark condition. The results indicated that the MS medium supplemented with 1 mg/liter 2, 4 – D and BAP could produce callus in the best amount. In order to introduce production of colchicine from callus culture by addition of 0.4 mg/liter abiotic elicitor (cobaltous chloride) in MS medium and cultured for 8 weeks at dark or light conditions were examined. The solid MS medium with 0.4 mg/liter of cobaltous chloride could yield 0.123 and 0.140 mg/gm dry weight at the dark and light conditions. As the same conditions in liquid MS medium could produce 0.113 and 0.122 mg/gm. Dry weight. The other intro duced production of colchicine by addition precursors L – Phenylalanine concertration were 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} and 10^{-5} M. in MS medium as flask cultured for 8 weeks at dark or light conditions. This experiment showed that the liquid MS medium supplement with 10^{-3} M. of L – Phenylalanine produced colchicine in the best amount at 0.612 mg/gm. Dry weight in the light condition. The last experiment was callus cultured in bioreactor (volume 2 liter) at the light condition for 4 weeks in liquid MS medium with 10^{-3} M. of precursor L – Phemylalanine. Its produced 1.21 mg/gm. dry weight of colchicine although. The result showed production in very small amounts but this experiment was carried out as fundamental research on production of secondary metabolites in large scale suspension cultures of industrial production.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย เรื่อง การผลิตสารทุติยภูมิจากดองดึงด้วยเทคนิคการขยายพันธุ์และเลี้ยงในถังหมัก นี้ ได้รับทุนสนับสนุนโครงงานวิจัยประเภทงานวิจัยประยุกต์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีงบประมาณ 2543 เป็นจำนวนเงิน 100,000 บาท จากบัณฑิตวิทยาลัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

หัวหน้าโครงการวิจัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นวรัตน์ ปานแย้ม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญรูป.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 คองคึง.....3

2.1.1 แหล่งที่พบ.....4

2.1.2 ประโยชน์ของคองคึง.....4

2.1.3 สารเคมีที่พบ.....5

2.2 โคลชิซีน.....7

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....11

2.4 การสกัดอัลคาลอยด์.....26

2.5 การตรวจสอบสารสกัดจากพืช.....27

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....31

3.1 การศึกษาผลของสารเพื่อการเติบโตต่อการเจริญเป็นแคลลัสของเหง้าคองคึงบนอาหารแข็ง MS.....33

3.2 การศึกษาผลของสารเพื่อการเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสบนอาหารแข็ง MS.....33

3.3 การศึกษาผลของสารเพื่อการเติบโตต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว MS.....34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....108

5.1 สรุปผลการวิจัย.....108

5.2 ข้อเสนอแนะ.....112

บรรณานุกรม.....113

ภาคผนวก.....121

ประวัติผู้เขียน.....125

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 อาหารเหลวMS สูตรที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส....34

3.2 อาหารเหลวMS สูตรที่เติม NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส....35

3.3 อาหารเหลวMS สูตรที่เติม IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส....36

4.1 ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์....42

4.2 ผลการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด และที่มีแสง เป็นเวลา 16 สัปดาห์....48

4.3 ผลการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์....52

4.4 ผลการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์....56

4.5 ผลการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์....59

4.6 ผลของสารโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์....62

4.7 ผลของสารโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์....66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.8 ผลของสารโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....69

4.9 ผลของสารโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....73

4.10 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....76

4.11 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....81

4.12 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และอาหารเหลว MS ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....86

4.13 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ระดับถังหมัก ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....89

4.14 ผลของโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....94

4.15 ผลของโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....96

4.16 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.17 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....102

4.18 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ในระดับฟลาสก์ (flask) เขย่า และระดับถังหมัก ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....105

4.19 ปริมาณสารโคลชิซีนจากตัวอย่างต่างๆ.....107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ขบวนการชีวสังเคราะห์ของสารโคลชิซีน....10

2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแบบหมุนจุ่มอาหาร....16

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแบบวางบนเครื่องเขย่า....16

2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแบบ spinning culture....17

2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแบบ stirring culture....17

2.6 ส่วนประกอบของ HPLC....30

4.1 ลักษณะต่างๆ ของเหง้าดองดึง....43

4.2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์....45

4.3 เนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์....46

4.4 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 16 สัปดาห์....49

4.5 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 16 สัปดาห์....50

4.6 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์....53

4.7 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์....54

4.8 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์....57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.9 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....60

4.10 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....63

4.11 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....64

4.12 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....67

4.13 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....70

4.14 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....71

4.15 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....74

4.16 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.17 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....79

4.18 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....83

4.19 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....84

4.20 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโต ของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 87

4.21 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโต ของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....88

4.22 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโต ของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....88

4.23 การเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว MS ระดับถังหมัก 90

4.24 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโต ของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ระดับถังหมัก ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.25 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโต ของแคลลัสคองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง อาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์ (flask) เขย่า และระดับถังหมัก ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....91

4.26 โครมาโทกราฟของสารมาตรฐานโคลชิซีน.....92

4.27 กราฟมาตรฐานของสารโคลชิซีน.....93

4.28 ผลของโคบอลต์ 60 ไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....95

4.29 ผลของโคบอลต์ 60 ไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....97

4.30 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัส ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....100

4.31 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัส ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 103

4.32 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัส ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเหลว MS ระดับฟลาสก์ (flask) เขย่า และระดับถังหมัก ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

ดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) เป็นพืชในสกุล Gloriosa เป็นไม้ล้มลุกเลื้อย จัดว่าเป็นพืชสมุนไพรที่ลำต้นใต้ดิน (rhizome) หรือเหง้า มีสารอัลคาลอยด์โคลชิซีน ซึ่งนำมาใช้ทางการแพทย์, ทางการเกษตร และในทางอื่นๆ อีกมากมาย (จรินทร์, 2521) ทางการแพทย์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งบางชนิดในคน (ยุพา, 2527) , โรคไขข้ออักเสบ (เสงี่ยม, 2522) , ลดไข้ (Dhawan *et. al.* , 1977) ทางการเกษตรใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (Narain and Raina, 1975) ทำให้โครโมโซม (chromosome) เกิดการเพิ่มเป็น 2 เท่า (double chromosome) ในพืช (Kumar, 1952 ; Sucharit and Surathin, 1993) หรือเกิดโพลีพลอยด์ (polyploid) (Eigsti *et.al.* 1949)

พบว่ามีการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสมุนไพร ในสูตรอาหารที่เหมาะสม ทำให้เนื้อเยื่อพืชนั้นเจริญเติบโตขึ้นมาในสภาพของแคลลัส โดยมีปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิที่คำนึงถึง ได้แก่ แสง , อุณหภูมิ และสารควบคุมการเจริญเติบโต (พรรนิภา, 2530) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบของอาหาร (Davies, 1972 ; Ikeda, 1976 ; Dougall ,1980 ; Nettleship and Slaytor, 1974 ; Misawa *et. al.* , 1975 ; Dobberstein and Staba, 1969 ; Zenk *et. al.* , 1975), สารเร่งอชีวภาพ (abiotic elicitors) (Limsirichaikul, 1995) , สารตั้นตอ (precursor) (Gibson *et. al.* , 1963 ; Tabata *et. al.* , 1972 ; Mizukami *et. al.* , 1977) , การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ (Ikuta *et.al. et. al.* , 1974) และอายุของส่วนที่นำมาทดลอง (Wildman, 1960 ; Okazawa *et. al.* , 1967)

ปัจจุบันมีรายงานต่างๆ ที่พบว่า นักวิทยาศาสตร์สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรได้สำเร็จหลายชนิด เนื้อเยื่อเหล่านี้สามารถผลิตสารที่ใช้ในการบำบัดรักษาวินิจฉัยโรค หรือเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารที่ใช้เป็นยา นอกจากนี้ ยังมีสารที่ใช้ผสม หรือปรุงแต่งกลิ่นรส และสีของยา (Butcher, 1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานวิจัยนี้ จะทำการศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงบนอาหารแข็งเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น จะไม่ทำการทดลอง เนื่องจากวราภรณ์ (2529) ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว ศึกษาผลของสารเร่งอชีวภาพ (abiotic elicitors) คือโคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) และสารต้นตอ (precursor) คือ แอลฟีนิลอะลานีน (L-Phenylalanine) ที่มีต่อการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง เพื่อเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึงบนอาหารแข็ง

1.2.2 เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับฟลาสก์ (flask) เขย่า

1.2.3 เพื่อศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับฟลาสก์(flask) เขย่า

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกวิจัยนี้ ขั้นแรกนำเหง้าดองดึงมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส แล้วนำแคลลัสที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมแต่มีการเติมสารเร่งอชีวภาพ (abiotic elicitors) คือโคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารต้นตอ คือ แอลฟีนิลอะลานีน (L-Phenylalanine) ความเข้มข้น 0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} โมลาร์ (M) เพื่อศึกษาการผลิตสารโคลชิซีน จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มาสกัด และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ด้วย HPLC

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตสารทุติยภูมิจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง

1.4.2 ทราบแนวทางในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ดองดึง

ดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) มีชื่อสามัญว่า climbing lily , superb lily และ turk' s cap มีชื่ออื่นว่า ก้ามปู , คมขวาน , ดาวดึงส์ , บ้องขวาน , พันมหา , มะขาโก้ง , ว่านก้ามปู , หมอยหีย่า และหัวขวาน (นันทวัน และอรนุช , 2541) โดยทางวิทยาศาสตร์จัดจำแนก (classification) (สุพจน์ และคณะ , 2536 ; สมกพ , 2539) ได้ดังนี้

Kingdom.....Plantae
Division.....Anthophyta
Class.....Angiospermae
Subclass.....Monocotyledoneae
Order.....Liliflorae
Family.....Liliaceae
Genus.....Gloriosa
Species.....Superba

ดองดึงเป็นไม้ล้มลุกเลื้อย มีลำต้นใต้ดินรูปทรงกระบอก เรียกว่า เหง้า (rhizome) ลักษณะคล้ายหัวขวาน ใบเป็นใบเดี่ยวรูปหอกเรียงสลับ เส้นกลางใบเห็นชัด ไม่มีก้านใบ โคนใบกว้าง ปลายใบเรียวแหลม ขึดขาวออก ทำหน้าที่เป็นมือเกาะ ดอกมีขนาดใหญ่ เป็นดอกเดี่ยว ออกที่ซอกใบใกล้ปลายเถา ก้านดอกยาว ตรงปลายโค้งงอเล็กน้อย กลีบดอกยาว มีประมาณ 6 กลีบ ขอบของแต่ละกลีบเป็นคลื่น โคนกลีบมีสีเหลือง ปลายกลีบมีสีแดง เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีแดงทั้งดอก ผลเป็นแบบแคบซูล เมื่อแห้งแล้วแตกตามแนวผนังกั้น (septicidal capsule) รูปทรงกระบอกมี 3 พู เมล็ดกลมมีสีส้มแกมน้ำตาล และแข็งเมื่อแก่ (นันทวัน และอรนุช , 2541 ; Backer and Bakhuizen , 1968 ; Chopra *et. al.* , 1965 ; พรพรหม , 2536 ; นันทิรา , 2533) ทุกส่วนของพืชชนิดนี้มีพิษ (Neal, 1965 ; Chopra *et. al.* 1965)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 แหล่งที่พบ

พืชในสกุล (genus) Gloriosa มีหลายชนิด (species) เช่น *Gloriosa superba* Linn. , *Gloriosa virescens* Lindl. , *Gloriosa simplex* Linn. , *Gloriosa minor* Rendle. , *Gloriosa Gloriosa abyssinica* A. Rich. , *Gloriosa carsonii* Baker. และ *Gloriosa rothschildiana* O' Brien. มีถิ่นกำเนิดในทวีปอัฟริกา ส่วนในเอเชียพบเพียงชนิดเดียวคือ *Gloriosa superba* Linn. ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชีย (Thiselton-Dyer , 1898 ; Bailey , 1947 ; Hooker , 1894 ; Jackson , 1895) สำหรับประเทศไทย พบเห็นทั่วไป พบมากในดินร่วนปนทราย แถบชายทะเล ทางภาคใต้ และภาคตะวันออก พบปะปรายทางสระบุรี เชียงใหม่ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เสงี่ยม, 2522 ; เต็ม, 2533 ; สุนทรี, 2535)

2.1.2 ประโยชน์ของดองดึง

ดองดึงจัดว่าเป็นพืชสมุนไพรที่มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในทางการแพทย์ และทางการเกษตรมากขึ้น เนื่องจากลำต้นใต้ดิน (rhizome) หรือเหง้า มีสารอัลคาลอยด์ลูมิโคลชิซีน (lumicolchicine) , รากมีสารซูเปอร์บิน (superbine) , ใบและเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) มีสารโคลชิซีน (colchicine) (จรินทร์, 2521) ในทำนองเดียวกัน ได้มีผู้รายงานว่า ในดองดึงมีอัลคาลอยด์หลายชนิด (นิจศิริ และพยอม, 2534) แต่ที่พบมากและมีปริมาณสูงกว่าอัลคาลอยด์ชนิดอื่นคือ โคลชิซีน (colchicine) (Sarin *et. al.* ,1974) ซึ่งทางการแพทย์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งบางชนิดในคน (อุพา, 2527) , โรคไขข้ออักเสบ (เสงี่ยม, 2522) , ลดไข้ (Dhawan *et. al.* 1977) , โรคเก๊าท์ (Chopra *et. al.* ,1965) , โรคเกี่ยวกับเลือด ,โรคโกโนเรีย , โรคกามตายด้าน (Quissumbing, 1951) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (George and Pandalai, 1949 ; อารีรัตน์ และคณะ, 2531) , ยับยั้งเชื้อรา (ชุลีวรรณ และคณะ, 2528) ในทางตรงกันข้าม สารโคลชิซีนจัดว่าเป็นสารพิษชนิดหนึ่ง ซึ่งมีผู้รายงานว่า สารนี้ถ้ารับประทานเข้าไปมากจะทำให้หมดสติ , การหายใจติดขัด และทำให้ถึงตายได้ (พเยาว์, 2520) และยังเป็นพิษต่อเซลล์ (พรทิพา และคณะ, 2528 ; Engprasert *et. al.* ,1996) ทางด้านการเกษตร ใช้ดองดึงในการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (Narainand Raina, 1975) ทำให้โครโมโซม(chromosome) เกิดการเพิ่มเป็นสองเท่า (double chromosome) ในพืช (วิมล, 2527 ; Eigsti and Dustin, 1955 ; Kumar, 1952 ; Sucharit and Surathin, 1993) หรือเกิดโพลีพลอยด์ (polyploid) (Eigsti *et. al.* 1949) ทำให้พืชมีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์เดิม ซึ่งโดยทั่วไปจะทำให้ได้ต้นพืชที่ให้ผลผลิตสูง และคุณภาพของผลผลิตดีขึ้นอีกด้วย (ปรีดี, 2523 ; ลัดดาวัลย์ และถนอมจิต, 2522) นอกจากนี้ยังใช้ดองดึงในการปราบแมลงศัตรูพืชได้อีกด้วย ส่วนทางด้านปศุสัตว์ใช้เหง้าดองดึงในการถ่ายพยาธิในสัตว์เลี้ยง เช่น วัว และควาย เป็นต้น (Grosvenor and Grosvenor, 1966 ; Jain, 1968 ; ชมรมธรรมชาติศึกษาไทย, 2521) นอกจากนี้ยังมีผู้สนใจที่จะนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ และตัดดอกขายอีกด้วย ปัจจุบันร้านจัดดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม้ได้สั่งคองดึงจากต่างประเทศ เพื่อใช้จัดกระเช้าร่วมกับดอกไม้ชนิดอื่นๆ มากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคองดึงมีแนวโน้มเป็นไม้ตัดดอกหรือไม้กระถางที่มีอนาคตไกลไม่แพ้ดอกไม้อื่น (สมสุข และปราโมทย์, 2541) และมีรายงานการสกัดคองดึงด้วยแอลกอฮอล์, เพทอีเธอร์ และคลอโรฟอร์ม มีค่า ED_{50} ต่ำกว่า 1 ไมโครกรัม ตามกฎเกณฑ์บอกว่า ED_{50} ต่ำกว่า 5 ไมโครกรัม จึงจะดี (ED_{50} หมายถึงความเข้มข้นของสารที่ฆ่าเซลล์มะเร็งได้เป็นครึ่งหนึ่งของกลุ่มควบคุม) (Engprasert, 1995) จากประโยชน์ของคองดึงหลายๆ ด้านดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมุ่งทำการศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากคองดึงโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2.1.3 สารเคมีที่พบ

สารเคมีที่แยกได้จากพืชนั้น นักวิทยาศาสตร์ได้จำแนกออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

สารปฐมภูมิ (primary metabolite) เป็นสารที่พบได้ในพืชทุกชนิด เป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการแสงสังเคราะห์ (photosynthesis) เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และไขมัน เป็นต้น

สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เป็นสารที่พบได้ไม่เหมือนกันในพืชแต่ละชนิด ไม่พบทั่วไป และไม่มี metabolic function ที่ชัดเจน เช่น อัลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ แทนนิน เป็นต้น

พวกสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) จะมีสารเริ่มต้นเป็นกรดอะมิโน, อะซิเทต (acetate), เมวาโลเนต (mevalonate) ฯลฯ โดยมีเอนไซม์ (enzyme) เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งพืชต่างชนิดกันจะมีเอนไซม์ (enzyme) ที่ไม่เหมือนกัน ทำให้วิถีทางในกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ต่างกันไป และได้สารประเภทสารทุติยภูม (secondary metabolite) ต่างกันไป ในต้นไม้ต่างชนิดกัน หรือต่างฤดูกัน สาเหตุที่แท้จริงในการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในพืชยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าอาจเกิดจากการพยายามปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป

อัลคาลอยด์ (alkaloid) เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (organic nitrogen compound) พบในพืชชั้นสูงเป็นส่วนมาก แต่บางครั้งก็พบได้ในสัตว์ และพวกจุลินทรีย์

คุณสมบัติของอัลคาลอยด์ ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ชนิดต่างๆ มีฤทธิ์เป็นด่าง และมักมีฤทธิ์ต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย

หน้าที่ของอัลคาลอยด์ ในพืชยังไม่มีคำตอบที่แน่นอน แต่นักวิทยาศาสตร์ก็ได้ให้ข้อสังเกตที่น่าเชื่อถือได้ว่าอาจมีหน้าที่ดังนี้

(1) เป็นสารที่มีพิษ ป้องกันมิให้แมลง หรือสัตว์มารบกวน หรือทำลาย

(2) เป็นผลที่ได้จากกระบวนการทำลายพิษ (detoxification) ของสารที่เป็นอันตรายต่อพืช

(3) เป็นตัวช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (growth regulator)

(4) เป็นตัวเก็บสะสมแร่ธาตุ สามารถจะสลายตัวให้ธาตุไนโตรเจน และธาตุอื่นๆ ที่จำเป็นต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การดำรงชีพของพืช

(5) เป็น nitrogen excretory product เช่นเดียวกับยูเรีย และยูริค

(6) ช่วยรักษาดุลของไอออน (maintain ionic balance)

อัลคาลอยด์อาจพบในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ในเมล็ด (หมาก) , ในผล (พริกไทย) , ในใบ (ลำโพง) , ในเปลือก (ชิงโคน่า) , ในเหง้า (ดองดึง) ,ในราก (ระย่อม) และยังพบได้ในราที่ขึ้นบนพืช (ergot) เป็นต้น (นิจศิริ และพยอม, 2534)

สารอัลคาลอยด์ที่พบ

การสำรวจ และสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของดองดึงหัวขวาน เช่น เหง้า , เมล็ด , ใบ และดอก พบอัลคาลอยด์ดังนี้

β-lumicolchicine พบในส่วนของใบ ,เหง้า และดอก (Dvorackova *et. al.* ,1984 ; Thakur *et. al.* , 1975 ; Kaul and Thakur , 1977 ; Merchant , 1976) , N-deacetyl-N-formyl-γ-lumicolchicine พบในส่วนของเหง้า (Dvorackova *et. al.* , 1984 ; Canonica *et. al.* ,1967 ; Kaul and Thakur , 1977) , γ-lumicolchicine พบในเหง้า และดอก (Dvorackova *et. al.* , 1984 ; Kaul and Thakur , 1977 ; Merchant , 1976) , N- formyl-N-deacetyl-β-lumicolchicine พบในเหง้า (Dvorackova *et. al.* , 1984 ; Canonica *et. al.* ,1967) , Colchicine (Superbine) พบในเหง้า ((Dvorackova *et. al.* , 1984 ; Thakur *et. al.* , 1975 ; Hrbek and Santavy , 1962 ; Clewer *et. al.* 1915 ; Subbaratnam , 1952 ; Parthasarathy , 1941 ; Kariyone *et. al.* 1944 ; Canonica *et. al.* ,1967) ในเมล็ด (Thakur *et. al.* , 1975) ในดอก (Kaul and Thakur , 1977 ; Thakur *et. al.* , 1975) ในใบ และลำต้น (Thakur *et. al.* , 1975) , N- deacetyl-O-demethyl-N- formyl-β- lumicolchicine พบในเหง้า (Canonica *et. al.* ,1967) , O- demethyl-β-lumicolchicine พบในเหง้า (Canonica *et. al.* ,1967) , 3- demethyl-β- lumicolchicine พบในเหง้า (Thakur *et. al.* , 1975 ; Dvorackova *et. al.* , 1984) , 3- demethyl-N- formyl-N-deacetyl-β-lumicolchicine พบในเหง้า (Dvorackova *et. al.* , 1984 ; Thakur *et. al.* ,1975 ; Kaul and Thakur ,1977 ; Merchant , 1976) , 3- demethyl-γ-lumicolchicine พบในเหง้า (Dvorackova *et. al.* , 1984 ; Thakur *et. al.* , 1975 ; Kaul and Thakur , 1977) , 3- demethyl-N- deacetyl-N- formyl-γ-lumicolchicine พบในเหง้า (Dvorackova *et al.* , 1984 ; Kaul and Thakur , 1977) , 2- demethylcolchicine พบในเหง้า Thakur *et. al.* , 1975 ; Kaul and Thakur , 1977) , 2, 3-didemethyl-N- deacetylcolchicine พบในใบ ดอก และเหง้า (Dvorackova *et. al.* , 1984 ; Thakur *et. al.* , 1975) , 2, 3-didemethylcolchicine พบในเหง้า (Dvorackova *et. al.* , 1984 ; Thakur *et. al.* , 1975 ; Chaudhuri , 1993) , 3- demethyl-N-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

formyl- N- deacetylcolchicine พบในเหง้า (Dvorackova *et. al.* , 1984 ; Thakur *et. al.* , 1975 ; Canonica *et al.* ,1967) , 3- demethylcolchicine พบในเหง้า (Dvorackova *et al.* , 1984 ; Kaul and Thakur , 1977 ; Chaudhuri , 1993 ; Thakur *et. al.* , 1975) ในดอก (Kaul and Thakur , 1977 ; Dvorackova *et. al.* , 1984) 2- demethylcolchicine พบในเหง้า (Thakur *et. al.* , 1975) , Deacetyl-N-formyl colchicine พบในดอก(Kaul and Thakur , 1977) , N- deacetyl-O-demethyl-N- formyl colchicine พบในเหง้า (Canonica *et. al.* ,1967)

2.2 โคลชิซีน

โคลชิซีน (colchIcIne) เป็นอัลคาลอยด์ที่พบในพืชซึ่งอยู่ในวงศ์ Liliaceae โดยเฉพาะพืชในสกุล Colchicum

Hussein and Nasra (1974) รายงานว่า โคลชิซีนสกัดได้ครั้งแรกจาก *Colchicum autumnale* Linn. ปริมาณที่พบจากส่วนหัว (corm) ประมาณ 0.25% และจากเมล็ดประมาณ 0.5% ในสมัยโบราณชาวยุโรปได้นำสาร colchicine จากต้นไม้ชนิดนี้มารักษาโรคเก๊าท์ได้

Eigsti and Dustin (1955) ได้ศึกษาและสกัดสารโคลชิซีน (colchicine) จากพืชในสกุล Colchicum และ Gloriosa พบว่า โคลชิซีนมีมากที่สุดในส่วนของเมล็ด (seed) โดยเฉพาะเมล็ดของ *Colchicum autumnale* Linn. ปริมาณสารที่พบประมาณ 0.8%

Clewer *et. al.* (1915) พบว่าในเหง้าของ *Gloriosa superba* มีโคลชิซีนประมาณ 0.3%

Wildman (1960) ได้สกัดสารโคลชิซีนจาก *Gloriosa superba* โดยนำเหง้ามาจากแหล่งที่ต่างกันเขาพบว่า เหง้าจากเชคโกสโลวาเกียให้ปริมาณสาร 0.23% ซึ่งมากกว่าเหง้าจากประเทศอินเดียที่ให้ปริมาณสารเพียง 0.05% เท่านั้น เขาสรุปได้ว่าสิ่งแวดล้อมต่างๆ และฤดูกาลเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารโคลชิซีน ซึ่งพบใน *Gloriosa superba* ที่นำมาจากอินเดีย และอัฟริกา ซึ่งเก็บในช่วงเวลาที่ต่างกัน เขาพบว่า ปริมาณและความเข้มข้นของสารที่พบแตกต่างกัน

ในธรรมชาติพบว่า โคลชิซีนมักเกิดร่วมกับโคลชิซีอีน (colchiceine) และอัลคาลอยด์อื่นๆ ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (Hussein and Nasra , 1974) นอกจากนี้ในเหง้าของ *Gloriosa rothchildiana* และ *Gloriosa simplex* พบว่า มีสารโคลชิซีนเช่นเดียวกัน (Eigsti and Dustin , 1955)

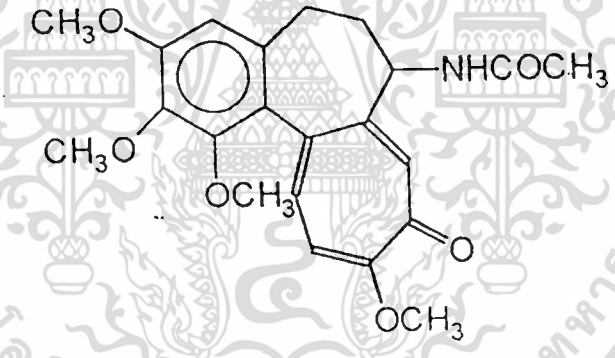
สุนิชาและคณะ (2521) ได้ทำการศึกษาโคลชิซีนในสมุนไพรไทยซึ่งอยู่ในวงศ์ Liliaceae พบว่า *Gloriosa superba* มีปริมาณสารมากที่สุดในฝัก และเมล็ด เหง้ามีปริมาณรองลงมา ในใบและลำต้นมีน้อย ส่วนในพืชสมุนไพรชนิดอื่นไม่พบว่ามีโคลชิซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Engprasert (1995) ได้ทำการสกัดแยกสารสำคัญจากเหง้าดองดึง โดยวิธีการหมักด้วยเมธานอล (methanol) และตามด้วยการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ด้วยอลูมินั่มออกไซด์ (aluminum oxide) พบสารประกอบโทรโปโลนอัลคาลอยด์ 3 ชนิดคือ β-lumicolchicine , 3-demethylcolchicine และ 3-demethyl-N-formyl-N-deacethyl colchicine ตามลำดับ เหง้าดองดึงแบ่งตามรูปร่างเหง้าได้ 3 ชนิดคือ รูปแอล (L) , รูปวี (V) และรูปที (T) พบว่ามีปริมาณสารโทรโปโลนอัลคาลอยด์ไม่แตกต่างกันในแต่ละลักษณะ นอกจากนี้ เหง้ารูปแอล (L) แบ่งตามลักษณะได้ 3 ชนิดคือ ชนิดที่มีลักษณะเหง้าอ้วนแบนและผิวเรียบ มีปริมาณสารมากกว่าชนิดที่มีลักษณะเหง้าอ้วน แบน ผิวขรุขระ และเหง้าผอม กลม ผิวเรียบ

สมบัติทางเคมีของโคลชิซีน

โคลชิซีนมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{22}H_{25}O_6N$ น้ำหนักโมเลกุล 399.43 ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



(Dewar , 1945 ; Eigsti and Dustin , 1955)

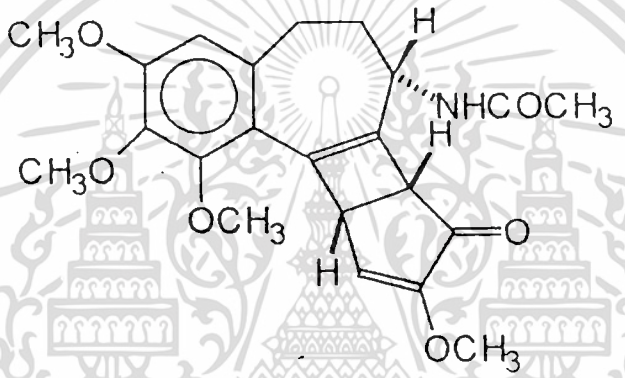
โครงสร้างทางเคมี

โคลชิซีนมีโครงสร้างประกอบด้วย tropolone ring มี 7-membered saturated ring ที่มี ไนโตรเจน (nitrogen) อยู่นอกวง และมี trimethoxy-substituted benzene ring (Glavac *et. al.* ,1984)

ลักษณะของโคลชิซีน เป็นอัลคาลอยด์ สีขาวอมเหลือง ผลึกรูปร่างไม่แน่นอน เมื่อถูกแสงจะเปลี่ยนเป็นสีคล้ำ และให้สีเหลือง เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดแก่(Hussein and Nasra , 1974) โคลชิซีน เป็นเบสที่อ่อนมาก ละลายได้ดีในน้ำ แอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม แต่ละลายได้น้อย ในอีเทอร์ หรือปิโตรเลียม (Evan , 1939)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อโคลชิซีน ถูกแสงอุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปไปเป็นสารผสมของโฟโตไอโซเมอร์ (photoisomers) โดยมีการเกิดโครงสร้างแบบเตตร้าไซคลิก พร้อมกับมีการละลายของโทรพานอยด์ (tropanoid ring) กลายเป็นสารผสม 3 ชนิด คือ เบต้าลูมิโคลชิซีน (β-lumicolchicine), แกมม่าลูมิโคลชิซีน (γ-lumicolchicine) และแอลฟ่าลูมิโคลชิซีน (δ-lumicolchicine) ซึ่งเบต้าลูมิโคลชิซีน (β-lumicolchicine) ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางยาได้ ถ้าตรวจพบปริมาณเบต้าลูมิโคลชิซีน (β-lumicolchicine) มาก จะพบปริมาณของโคลชิซีนลดลง (Fell and Doreen , 1967) ซึ่งเบต้าลูมิโคลชิซีน (β-lumicolchicine) มีสูตรโครงสร้างดังนี้

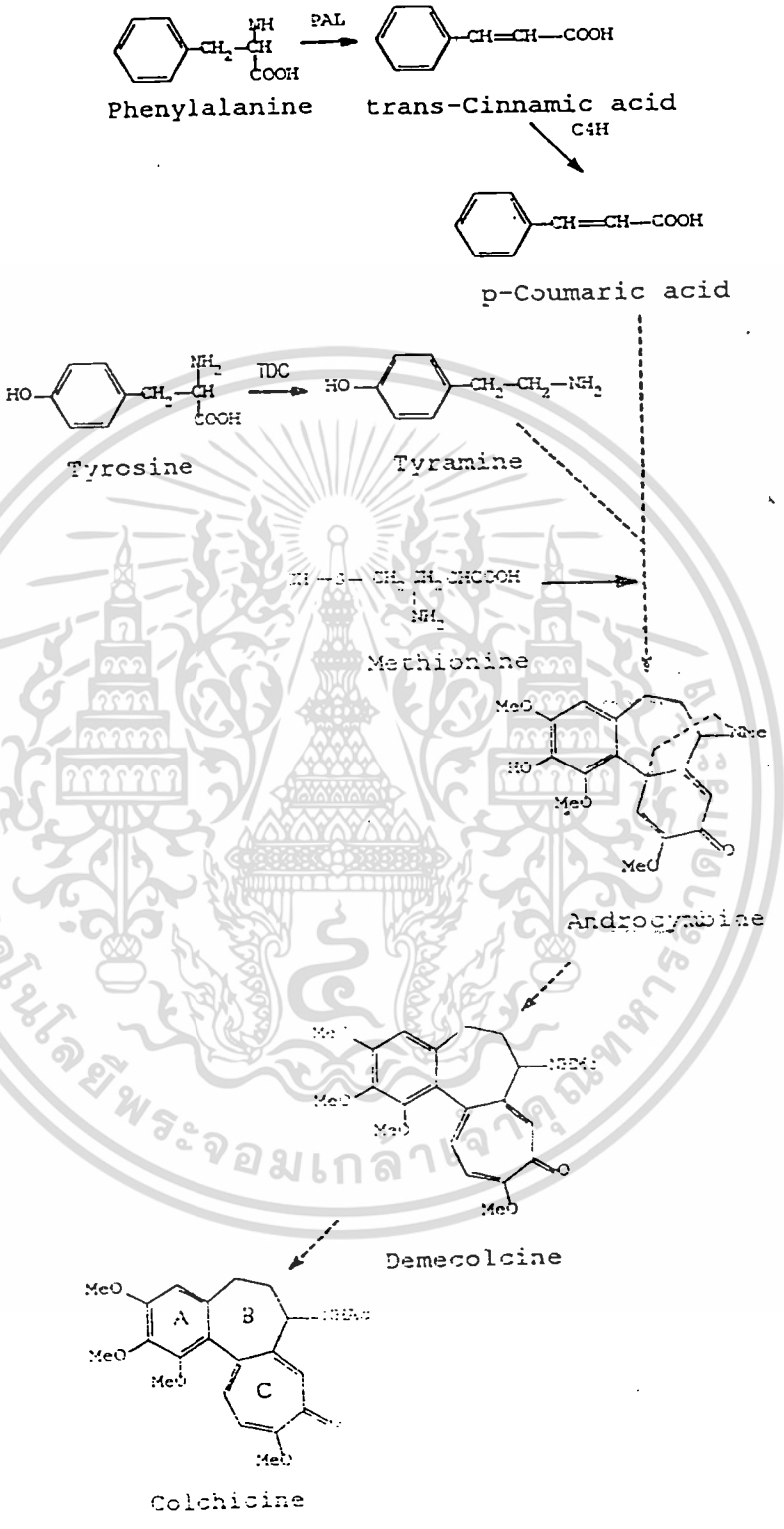


ดังนั้นปริมาณโคลชิซีนซึ่งได้จากธรรมชาติ จะขึ้นอยู่กับ ระยะเวลาเก็บเกี่ยว การทำให้แห้ง และการเก็บรักษา (Santavy *et. al.* , 1981)

ขบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthsis)

โคลชิซีนเป็นอัลคาลอยด์ ที่มี nitrogen atom อยู่นอกวง (ring) เป็นอนุพันธ์ของฟีนิลเอธิลเอมีน (phenylethylamine) ซึ่งมีชีวสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโน (amino acid) ฟีนิลอลานีน (phenyl alanine) และไทโรซีน (tyrosine) (Yoshida *et. al.* , 1988 ; Santavy *et. al.* , 1979 ; Finnei *et. al.* , 1994) ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ขบวนการชีวสังเคราะห์ของสารโคลชิซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารเพื่อการเติบโต (hormone) ในสภาพปลอดเชื้อ และในสภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอุณหภูมิ , ความชื้น และแสงสว่าง (อรดี , 2522) ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง ควรเป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญ เช่น บริเวณปลายยอด และปลายราก (ไพบูลย์ , 2524 ; Murashige , 1974) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ให้บรรลุความสำเร็จ นอกจากจะขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร ปัจจัยภายในพืช และปัจจัยภายนอกแล้ว การเจริญของเนื้อเยื่อเป็นต้น หรือราก นั้นยังขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของสารควบคุมการเติบโต (hormone) 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และไซโตไนนิน โดยถ้าความเข้มข้นของสูง ไซโตไคนินต่ำ เนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็นแคลลัส และราก ในทางตรงกันข้าม ถ้าความเข้มข้นของออกซินต่ำ ไซโตไคนินสูง เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอด เมื่อความเข้มข้นของสารสองกลุ่มนี้ เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอด และราก (Skoog and Miller , 1957)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทอย่างมากทั้งในด้าน วิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกษตรกรรม การแพทย์ และอุตสาหกรรม ซึ่งจำแนกได้อย่างกว้างๆ ดังนี้

1. การขยายพันธุ์พืชปริมาณในระยะเวลาสั้น

โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิด ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชเป็นทวีคูณ จากตัวอย่างการเลี้ยงพืชเพียงต้นเดียว และย้ายเนื้อเยื่อ เดือนละครั้ง หากสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็น 10 ต้นแล้ว ในระยะเวลาเพียง 6 เดือน จะสามารถผลิตต้นพืชได้ถึง 1,000,000 ต้น ($1x10^6$)

2. การผลิตพืชที่ปราศจากโรค

ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตพืชคือ การเกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย วิสา และไมโคพลาสมา ที่ติดมากับเมล็ด หรือส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคเหล่านี้ หากไม่แสดงอาการให้เห็น และทราบได้ต่อเมื่อเกิดอาการเป็นโรคบนต้นพืชที่ปลูกไปแล้ว เมื่อถึงเวลานั้นก็ยากที่จะแก้ไข หรือป้องกัน กำจัด นอกจากกำจัด หรือทำลายพืชนั้นทิ้งไป การใช้สารเคมีคลุกเมล็ด หรือส่วนขยายพันธุ์ก่อนปลูก แม้จะช่วยลดปริมาณเชื้อ ที่อาจติดมากับผิวของวัสดุปลูกได้ แต่ไม่อาจใช้ได้ผลดีในกรณีการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติดมาภายในเซลล์พืชได้ การผลิตพืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ต้นพืชที่ปราศจากเชื้อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อรา และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย เพราะหากมีเชื้อเหล่านี้แล้ว จะแสดงอาการปนเปื้อนในอาหารที่ใช้เลี้ยงทันที เนื่องจากแบคทีเรีย และรา เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่ใช้เลี้ยง ทำให้สามารถขจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของวิสา ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมาก และดำรงอยู่ได้ในเซลล์พืช จึงมักไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็น แม้โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็ตาม ในทางปฏิบัติจะต้องคัดเลือก และตรวจสอบเนื้อเยื่อก่อนการเลี้ยงจนแน่ใจว่าปลอดจากเชื้อวิสา ชิ้นส่วนของพืชที่ปลอดจากเชื้อวิสามากที่สุดคือ เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (apical meristem) และเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryonic tissue) ที่อยู่ในเมล็ด เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีส่วนของท่อลำเลียง (vascular tissues) ซึ่งได้แก่ท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem) ที่ติดต่อกับส่วนอื่นๆ ของต้นพืชที่ติดเชื้อวิสาจะสามารถเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนได้

3. การปรับปรุงพันธุ์พืช

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทาน (tolerant plants) หรือสายพันธุ์ที่ต้านทาน (resistant plants) ได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหาร และสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง หรือชักนำการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยใช้รังสี หรือสารเคมี เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็ม จากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดสายพันธุ์ทนดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ทนร้อนโดยเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง การสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารพิษของโรค แมลง และสารเคมีกำจัดวัชพืช นอกจากนั้น จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการตัดต่อดีเอ็นเอ (DNA recombination) และการถ่ายยีน (gene transformation) ยังเปิดโอกาสให้ใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่ต้องการในพืชบางชนิด

4. การผลิตยาและสารเคมีจากพืช

พืชบางชนิดให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยา หรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางกรณี เนื้อเยื่อที่นำมาสกัดสารดังกล่าวมีปริมาณที่น้อยมาก จึงต้องใช้วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวน และชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น

5. การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์

พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ สามารถติดตามการพัฒนา และการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์ หรือเนื้อเยื่อพืชต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช สาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคมีป้องกันกำจัดวัชพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์ หรือเนื้อเยื่อพืชที่เกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ

6. การเก็บรักษาพันธุ์พืช

ในปัจจุบัน พืชพันธุ์หลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์พืชที่หายาก และมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์หลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปในไม่ช้า สาเหตุสำคัญอาจมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์เอง นอกจากนั้น พืชบางชนิดยังยากที่จะขยายพันธุ์ หรือเก็บรักษาพันธุ์ได้โดยวิธีปกติ ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาที่นาน และไม่คุ้มค่า นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้คิดค้นวิธีเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆ ไว้ในสภาพหลอดทดลอง โดยการเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารบางชนิดที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือมีสารที่ทำให้เกิดสภาพขาดน้ำ (water stress) เพื่อชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพและมีชีวิตได้ยาวนาน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งเช่นปกติ อีกหนึ่งวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายคือ เก็บรักษาเซลล์ หรือเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ (รังสสฤษดิ์, 2541)

การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียว มีขนาดต่างๆ กัน มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ของแวคคิวโอล (vacuole) สูง แคลลัสที่เซลล์เกาะตัวกันแน่น เราเรียกว่า compact callus ถ้าเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus ภายในเซลล์ของแคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ (pigment) มีเป็นส่วนน้อยที่พบว่ามีสีเขียว เพราะมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองเพราะมีแคโรทีนอยด์ และฟราโวนอยด์ สีม่วงเพราะมีแอนโทไซยานิน ซึ่งปริมาณและชนิดของรงควัตถุดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยของแสง

ชิ้นส่วนพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิตอยู่ สามารถที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ จากรายงานพบว่าส่วนที่ให้เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงสุดในพืชใบเลี้ยงคู่ คือ ส่วนของเอมบริโอ ใบเลี้ยง ลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง และราก ส่วนในพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว ส่วนของเอมบริโอ ใบอ่อน ดอกอ่อน และเมล็ดที่เพิ่งเริ่มงอกดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่ออื่นๆ ของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ก็คือ แคมเบียม (cambium) คอร์เทค (cortex) ไส้หรือแกนลำต้น (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem vessels) และไซเลมพาเรนไคมา (xylem parenchyma) และเอ็นโดสเปอร์ม (endosperm)

ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

1. สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators)

โดยเฉพาะฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งการพัฒนาของพืชจะขึ้นกับสัดส่วนของฮอร์โมนสองกลุ่มนี้ คือ ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง พืชจะพัฒนาไปเป็นราก สัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินต่ำจะพัฒนาไปเป็นต้น และหากอยู่ในสัดส่วนที่ปานกลางหรือสมดุล ก็จะพัฒนาไปเป็นแคลลัส จากการศึกษาในหลายๆ พืชพบว่าออกซินที่ใช้อยู่ในช่วง 0.01-10.0 mg/l และ kinetin (ไซโตไคนินชนิดหนึ่ง) 0.1-10.0 mg/l

2. ธาตุอาหาร (nutrients)

นอกจากธาตุที่เป็นส่วนประกอบทั่วๆ ไปของสูตรอาหารแล้ว พบว่า อาหารเสริมจำพวก กรดอะมิโน เช่น กลูตามีน แอสปาราจีน อาร์จินีน พูรีน และไพริมิดีน เป็นต้น เคซีนไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลต์ สารสกัดจากยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส

3. แหล่งของคาร์บอน (carbon sources)

แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4 %

4. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (environmental factors)

เช่น แสง การเพาะเลี้ยงแคลลัส ต้องการแสงความเข้มต่ำ หรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการก๊าซออกซิเจน เพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย

5. สถานะของอาหารที่ใช้เลี้ยง (media status)

จากรายงาน พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลว ทั้งนี้เป็นเพราะมีพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับอาหารน้อยกว่า และตรงตำแหน่งที่ชิ้นส่วนของแคลลัสสัมผัสกับอาหาร จะมีสารที่มีผลต่อการเติบโต ซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการเมตาโบลิซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(metabolic wastes) ที่เซลล์ปล่อยออกมา

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. **เพื่อการขยายพันธุ์พืช (plant propagation)**
   เราสามารถที่จะชักนำให้เกิดต้นพืชได้จากเนื้อเยื่อของแคลลัส

2. **เพื่อใช้ในการผลิตโปรโตพลาสต์ (protoplast production)**
   แคลลัสเหมาะแก่การนำไปผลิตโปรโตพลาสต์ เพราะง่ายต่อการย่อยผนังเซลล์ และมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้ว

3. **เพื่อการผลิตสารเคมีจากพืช**
   มีการทดลอง พืชบางชนิดสามารถผลิตสารเคมี (secondary metabolites) บางชนิดที่สามารถสกัดนำเอาไปใช้ในทางการแพทย์ หรือทางอุตสาหกรรมได้

4. **เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant)**
   เช่น ทนต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว ทนต่ออากาศร้อน และหนาว เป็นต้น

5. **เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant)**
   เช่น พันธุ์ต้านทานต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบวัชพืช และพันธุ์ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส เป็นต้น

6. **เพื่อการผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploidy)**
   โดยการใช้สารเคมี (colchicine) ชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซม

7. **เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช (germplasm)**

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture)

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย หมายถึง การนำเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มเซลล์เล็กๆ (aggregate cells) มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื้อเยื่อที่เหมาะแก่การนำมาเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ แคลลัส (friable callus) ซึ่งเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ ออกจากกัน นอกจากนี้ อาจใช้ส่วนของใบก็ได้ แต่ต้องทำการย่อยเนื้อเยื่อเสียก่อน โดยใช้เอนไซม์

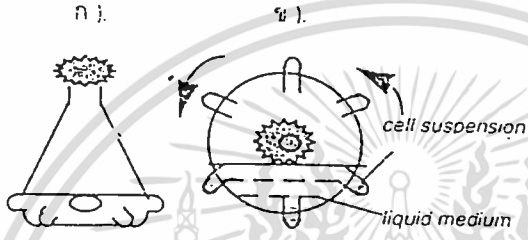
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพคติเนส 0.25% หรือใช้สารละลายโพแทสเซียม เดกแดรนซัลเฟต (potassium dextran sulfate) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยทำได้หลายรูปแบบดังนี้

1. การเลี้ยงแบบหมุนจุ่มอาหารอย่างช้าๆ (slowly rotate culture)

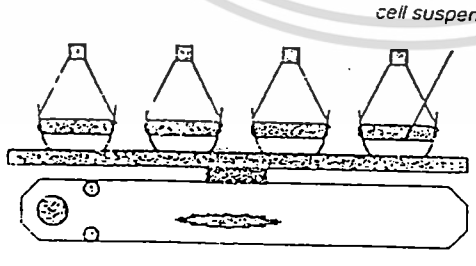
โดยมีภาชนะที่ออกแบบพิเศษ ให้มีหลอดยื่นออกมารอบๆ (รูปที่ 2.2) เพื่อกักเก็บเซลล์ในขณะที่มอเตอร์หมุนภาชนะไปรอบแกนด้วยความเร็วประมาณ 1-2 รอบ/นาที



รูปที่ 2.2 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแบบหมุนจุ่มอาหาร
ก. มองจากด้านข้าง ข. มองจากด้านบน

2. การเลี้ยงแบบเขย่า (shake culture)

วิธีนี้ทำกันได้ง่าย และนิยมกันทั่วไป โดยภาชนะที่ใส่ตัวอย่างวางเลี้ยงอยู่บนเครื่องเขย่าแบบวน (orbital platform shaker) ที่ความเร็วประมาณ 80-120 รอบ/นาที (รูปที่ 2.3)



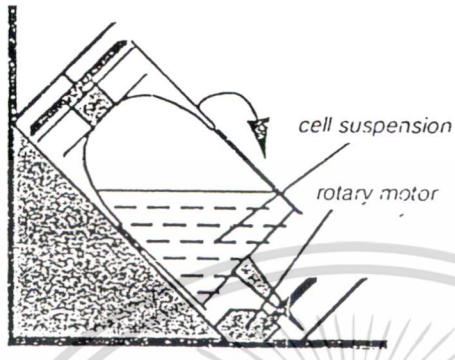
รูปที่ 2.3 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบวางบนเครื่องเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง_พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3. การเลี้ยงแบบหมุน (spinning culture)

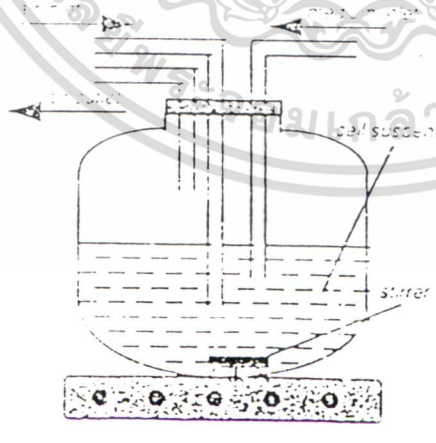
วิธีนี้เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงคราวละมากๆ หลักการก็คือ นำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างไปติดตั้งกับแกนหมุนที่วางเอียงทำมุม 45 องศา (รูปที่ 2.4) ความเร็วรอบประมาณ 80-120 รอบ/นาที



รูปที่ 2.4 แสดงการเลี้ยงเซลล์แบบ spinning culture

4. การเลี้ยงแบบกวนหรือคน (stirring culture)

วิธีนี้เหมาะแก่การเลี้ยงในปริมาณมากๆ เช่นกัน โดยภาชนะติดตั้งอยู่บนแท่นที่มีแท่งคนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และมีระบบการนำอากาศเข้า โดยปั๊มอากาศผ่าน carbon filter และ microfilter ส่วนทางอากาศออกอุดไว้ด้วยสำลี นอกจากนี้ ยังมีระบบเติมอาหาร และวัดสภาพของอาหารในภาชนะ (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 แสดงการเลี้ยงแบบ stirring culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
48868

การวัดการเจริญเติบโตของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ได้มีผู้พัฒนาวิธีการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อเป็นข้อมูลวัดประสิทธิภาพของสูตรอาหาร และปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงไว้หลายวิธี ดังนี้

1. การวัดปริมาตรของเซลล์ที่ผ่านการทำให้ตกตะกอน (packed cell volume หรือ PCV)

กระทำโดยการย้ายเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 200 g เวลา 5 นาที ค่า PCV ที่ได้ก็ คือ ปริมาตรของเซลล์ที่ตกตะกอน หน่วยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยเทียบกับปริมาตรเริ่มต้น

2. การนับจำนวนเซลล์ (cell number)

ถ้าเซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม (cell clump) ซึ่งยากแก่การนับ ให้ทำการแยกเซลล์เสียก่อน โดยการนำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 ส่วนมาเติมด้วยสารละลายโครมิคไตรออกไซด์ (chromic trioxide) ความเข้มข้น 8% (W/V) 2 ส่วน แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูม 70 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 2-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเขย่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน หรือใช้เอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้น 0.25% แช่นานประมาณ 30 นาที ก็ได้ ต่อจากนั้นก็ทำการนับเซลล์ด้วย haemocytometer

3. การหาน้ำหนักสดของเซลล์ (fresh wieght)

ทำได้โดยการกรองเซลล์แขวนลอยด้วยกระดาษกรอง whatman No. 1 แล้วล้างเซลล์ออกจากกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์ไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ แล้วชั่งหาน้ำหนัก

4. การหาน้ำหนักแห้ง (dry wieght)

กระทำได้โดยการกรองเซลล์แขวนลอยด้วยกระดาษกรอง whatman No. 1 แล้วนำไปอบแห้งในเตาอบ (hot oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง บันทึกน้ำหนักเซลล์ครั้งสุดท้าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

1. เพื่อการศึกษากระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์
2. เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน
4. เพื่อการผลิตสารเคมีบางชนิดในห้องทดลอง (secondary metabolites)
5. เพื่อการผลิตเอมบริออยด์
6. เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทานและพันธุ์ต้านทาน

(ประศาสตร์ , 2536)

สารทุติยภูมิที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร

การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) โดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (พรรนิภา , 2530) ทำได้โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสมุนไพรในสูตรอาหารที่เหมาะสม ทำให้เนื้อเยื่อนั้นเจริญเติบโตขึ้นมาในสภาพของแคลลัส หรือโคโลนีของเซลล์พืช หรือคัลเจอร์ของอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งของพืช เช่น คัลเจอร์ของรากหรือละอองเรณู แล้วจึงหาวิธีการที่เหมาะสมให้เนื้อเยื่อเหล่านี้ผลิตสารทุติยภูมิ ที่มีประ โยชน์เช่น การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหาร โดยใส่สารตั้งต้น (precursor) ของสารที่ต้องการลงในอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิที่ควรคำนึงถึง ได้แก่ แสง อุณหภูมิ และสารควบคุมการเจริญเติบโต (เอื้อพร , 2531)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทางด้านเภสัช

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้นำมาใช้ในการสร้างสารตัวยาจากพืชสมุนไพรหลายชนิด มีรายงานว่า ที่ประเทศอินเดีย มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะระ และสกัดเอาอินซูลิน (insulin) มาใช้รักษาโรคเบาหวานได้สำเร็จ (อรดี , 2522) ในการสกัดสารตัวยานั้น อาจสกัดจากเนื้อเยื่อที่ได้จากการเลี้ยงโดยตรง หรือสกัดจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรนั้นๆ (Seabrook , 1980) พืชชั้นสูงหลายชนิด นอกจากจะใช้ประโยชน์ในแง่เป็นอาหารแล้ว ยังสามารถนำสารที่เกิดขึ้นในระหว่างขบวนการเมตาโบลิซึมมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ จึงมีผู้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการผลิตสารดังกล่าว และเป็นวิธีที่ประหยัด และพบว่า สารที่พืชสร้างขึ้นมีหลายชนิด เช่น alkaloids , steroids , terpenes , quinones และสารอื่นๆ ที่มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรค และมีอัลคาลอยด์ (alkaloids) มากกว่า 1,000 ชนิดที่สกัดออกมาได้ การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตอัลคาลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นได้มีความพยายามกันมาก เนื่องจากพืชหลายชนิดที่สร้างอัลคาลอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้นั้น เป็นพืชที่หายาก และขาดแคลน (Misawa , 1980) อุปสรรคในการศึกษา เช่น เนื่องเยื่อที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตช้า ความเข้มข้นของสารที่สกัดได้ต่ำ และบางครั้งให้สารที่ไม่พบในธรรมชาติของพืชนั้น (Butcher and Connolly , 1971 ; Nickell , 1980)

Allison *et. al.* (1968) ได้พบสาร sesquiterpene lactones ใหม่อีก 3 ชนิด จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Andrographis paniculata.*

Heble *et. al.* (1971) พบสาร 24-methyene cholesterol จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Holarrhena antidysenterica.*

Nickell (1980) พบสาร lucidin จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Morinda citrifolia.* ซึ่งสารดังกล่าวล้วนแต่เป็นสารใหม่ที่ไม่พบในธรรมชาติของพืชเหล่านั้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างอัลคาลอยด์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. สารเพื่อการเติบโต

สารเพื่อการเติบโต มีผลต่อการสร้างอัลคาลอยด์ของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง

Kaul *et. al.* (1969) พบว่าสารเพื่อการเติบโตมีผลทำให้การสร้าง sapogenin เพิ่มขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Dioscorea* sp.

Furuya *et. al.* (1971) พบว่า IAA กระตุ้นการสร้าง nicotin ในขณะที่ 2,4-D ขัดขวางการสร้างอัลคาลอยด์นี้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Nicotiana tabacum* var.

Bright *et. al.* (1975) พบว่า ไคเนติน และ IAA ส่งเสริมการสร้าง sapogenin จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Trigonella foenum-graecum* L.

Marshall and Staba (1976) พบว่า 2,4-D เหมาะสมต่อการสร้างสาร diosgenin มากที่สุด ส่วน GA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อของ *Dioscorea deltoidea.*

Ramawat and Arya (1979) พบว่า การสร้างสาร ephedrine จะสูงถึง 0.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Ephedra gerardiana.* บนอาหารที่เติมไคเนติน 0.5 mg/l ร่วมกับ IBA 10.0 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลต่อการสร้างอัลคาลอยด์

Khanna and Jain (1972) ได้ศึกษาผลของ nicotinic acid ต่อการสร้างอัลคาลอยด์ trigonelline โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Trigonella foenum-graecum* Linn. และแคลลัสที่นำมาทดลองได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 mg/l ปรากฏว่า เมื่อเติม nicotinic acid ปริมาณ 500 mg/l จะให้สาร trigonelline ปุระมาณ 5.25 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนนี้เป็น 1,000 mg/l จะได้ปริมาณสารลดลงเหลือ 5.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแคลลัสที่นำมาวิเคราะห์นั้นมีอายุ 8 สัปดาห์เท่านั้น

3. การเติมสารต้นตอ (precursor)

การเติมสารต้นตอ (precursor) ของอัลคาลอยด์ชนิดนั้นๆ ก็ช่วยเพิ่มการสร้างอัลคาลอยด์ได้ในบางครั้ง

Gibson and Abbott (1963) พบว่า การสร้าง tropine เพิ่มขึ้น เมื่อเติม protine ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Datura stramonium.*

Tabata *et. al.* (1972) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Scopolia parviflora.* โดยใช้ส่วนของลำต้น และเหง้า บนอาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog , 1965) ปรากฏว่า รากที่เจริญมาจากแคลลัสสามารถสร้างอัลคาลอยด์ atropine ได้ แต่มีปริมาณน้อยกว่าในธรรมชาติ เมื่อทดลองเติมสารต้นตอ คือ tropic acid ความเข้มข้นระหว่าง 50 และ 100 ไมโครโมล พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณ atropine ได้ถึง 0.12 เปอร์เซ็นต์

Mizukami *et. al.* (1977) พบว่า เมื่อเติม ascorbic acid ปริมาณ 10^{-4} M ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Lithospermum erythorrhizon.* จะส่งเสริมการสร้างสาร shikonin หรือ napthoquinone

4. ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลต่อปริมาณอัลคาลอยด์ที่สร้าง

Khanna *et. al.* (1977) ได้ศึกษาการสร้างอัลคาลอยด์ atropine ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Atropa belladonna* Linn. ปรากฏว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 mg/l จะให้ปริมาณ atropine สูงสุดถึง 0.53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแคลลัสมีอายุ 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khanna and Sharma (1977) ได้ศึกษาการสร้างอัลคาลอยด์ opium โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Papaver rhoeas* Linn. ปรากฏว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 mg/l จะให้อัลคาลอยด์สูงสุดในช่วงอายุ 6 สัปดาห์

5. การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ

การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อมีผลต่อการสร้างอัลคาลอยด์ (Staba , 1977)

Ikuta *et. al.* (1974) ศึกษาชนิดของอัลคาลอยด์ที่พบในแคลลัส และ plantlets ของพืชที่อยู่ในวงศ์ Papaveraceae ปรากฏว่า plantlets สามารถสร้าง choline และ protoberberine เหมือนกับในธรรมชาติ แต่ในแคลลัสตรวจไม่พบอัลคาลอยด์เหล่านี้

6. องค์ประกอบของอาหาร

ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจมีผลต่อการสร้างสารของพืชได้ ที่ได้มีการศึกษากันมาก ได้แก่

ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นองค์ประกอบของน้ำตาล ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Maretzki *et. al.* , 1974 ; Dougall , 1980) ในสายทางเมตาโบลิซึมของสารประกอบคาร์โบไฮเดรตจะได้สารอินเทอมีเดียทมากมาย ที่จะนำไปสร้างสาร ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้น เช่น แป้ง และสารที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ของพืช ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลจึงมีผลต่อการสร้างสารของพืชบางชนิดด้วย

Davies (1976) ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลที่มีต่อการสร้างสาร โดยศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Rosa* sp. ในอาหารเหลว ปรากฏว่า สาร polyphenols เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณซูโครสจากเดิม 2.0 เป็น 4.0 เปอร์เซ็นต์

Ikeda *et. al.* (1976) พบว่า การเพิ่มปริมาณซูโครสในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 จากเดิม 2.0 เป็น 5.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สาร Ubiquinone มีปริมาณลดลง

ธาตุไนโตรเจน เป็นธาตุหลักที่พืชต้องการ ในธรรมชาติพืชจะใช้ไนโตรเจนได้ต่อเมื่ออยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ และพืชจะดูดไนโตรเจนในรูปของไนเตรต และแอมโมเนียม โดยที่ไนเตรตจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแอมโมเนียม โดยผ่านขบวนการที่เรียกว่า nitrate reduction จากนั้นแอมโมเนียม จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดต่างๆ ซึ่งกรดอะมิโนบางตัวเป็นสารต้นตอที่สำคัญของอัลคาลอยด์บางชนิด เช่น nicotinic acid เป็นสารต้นตอของ nicotine ในยาสูบ tryptophane เป็นสารต้นตอของ quinine ส่วน phenylalanine เป็นสารต้นตอของโคลชิซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(สัมพันธ์, 2525) ดังนั้น ปริมาณธาตุไนโตรเจนที่ประกอบอยู่ในอาหาร น่าจะมีผลต่อปริมาณกรดอะมิโน และสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นด้วย

Davies (1972) พบว่า ปริมาณ polyphenols ลดลงเมื่อใช้ไนเตรต 20 mM. ซึ่งเทียบกับที่ใช้ไนเตรต 10 mM. ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Rosa* sp. ในอาหารเหลว

NettleshIp and Slaytor (1974) ทดลองเลี้ยงแคลลัสของ *Peganum harmala.* ปรากฏว่า การสังเคราะห์อัลคาลอยด์ที่ได้จาก tryptophane ลดลง เมื่อเติมแอมโมเนียม หรือกลูตามีน (glutamine) แทนไนเตรตในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสนั้น

Misawa *et. al.* (1975) พบว่าการสร้างกลูตามีนสูงสุดเมื่อเติมแอมโมเนียมไนเตรต 4.95 กรัมต่อลิตร และโปตัสเซียมไนเตรต 5.7 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Symphytum officinale.* แต่เมื่อเพิ่มปริมาณสารทั้ง 2 มากกว่าสัดส่วนดังกล่าว มีผลทำให้การเจริญ และปริมาณสารกลูตามีนลดลง

ธาตุฟอสฟอรัส เป็นส่วนประกอบของโปรตีน กรดนิวคลีอิค adenine triphosphate (ATP) และน้ำตาลฟอสเฟต ซึ่งมีความสำคัญต่อขบวนการเมตาโบลิซึมของพืช ในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ได้มีการศึกษาผลของฟอสเฟตต่อการสร้างสารในพืชดังนี้

Dobberstein and Staba (1969) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณฟอสเฟตลงในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง Ipomoea ทำให้อัลคาลอยด์เพิ่มขึ้นด้วย

Nettleship and Slaytor (1974) พบว่า เมื่อไม่เติมฟอสเฟตลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสของ *Peganum harmala.* ทำให้ปริมาณสาร hamalol และ harmine เพิ่มขึ้น

Zenk *et. al.* (1975) พบว่า เมื่อเพิ่มฟอสเฟตเป็น 5.0 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง *Morinda citrifolia.* ทำให้ปริมาณสาร anthraquinones เพิ่มขึ้นถึง 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากธาตุดังกล่าวแล้ว ผลของมาโครธาตุ และไมโครธาตุอื่นๆ ที่มีต่อการสร้างสารทุติยภูมิ(secondary product) ของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการศึกษาน้อยมาก (Dougall, 1980)

7. แสงและความมืด

แสงและความมืดมีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary product) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Kadkade (1978) อ้างโดย Seibert and Kadkade (1980) รายงานว่า แคลลัสของ *Solanum acculeatissimum.* จะสร้าง glycoalkaloids ได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงแคลลัสนั้นในที่มี แสงโดยการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kadkade and Andrade (1971) อ้างโดย Seibert and Kadkade (1980) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Dioscorea* spp. เปรียบเทียบระหว่างในที่มืด และที่มีแสง พบว่า ในช่วง 8 วันแรกหลังจากเริ่มเลี้ยงปริมาณ diosgenin จะใกล้เคียงกัน แต่หลังจากนั้นอีก 8 วัน เขาพบว่า ในที่มีแสงเนื้อเยื่อสามารถสร้างสาร diosgenin ได้มากกว่าในที่มืด

8. พันธุกรรมของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง

พันธุกรรมของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสร้างสาร และปริมาณสาร (Staba , 1977 ; Dougall , 1979) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสกัดสารที่ต้องการนั้น เนื้อเยื่อเริ่มต้นที่นำมาเลี้ยงควรจะได้จากพืชที่มีการสร้างสารปริมาณสูงในธรรมชาติ เพราะอาจจะทำให้สารที่ต้องการในปริมาณที่มากพอจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Dougall , 1979) แต่บางครั้งถึงแม้จะนำเนื้อเยื่อพืชที่สร้างสารได้มากในธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงก็อาจให้ปริมาณสารน้อย เช่น การทดลองของดังนี้

Chan and Staba (1965) พบว่า เนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของ Datura จะไม่ให้ปริมาณสาร tropane มาก ดังเช่นในธรรมชาติและเขาก็ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าการสร้างสาร tropane ของแคลลัสของ Datura จะถูกควบคุมโดยสภาพต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือเป็นผลมา จากยีน

Staba (1977) รายงานว่า การตอบสนองของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงจะถูกควบคุม โดยสิ่งแวดล้อม และพันธุกรรม

ข้อได้เปรียบของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ผลิตสารเป็นยา

1. เซลล์ที่เลี้ยงเป็นเซลล์ประเภท undifferentiated cells มีการรวมกลุ่มกันแบบธรรมดา ดังนั้นจะตัดปัญหายุ่งยากในขบวนการขนถ่ายวัตถุดิบในการผลิตสารของพืช สารต่างๆ จากเซลล์ซึมผ่านได้ง่ายทำให้กลุ่มเซลล์สามารถจะใช้สารที่เป็นวัตถุดิบ (metabolic pool) ในขบวนการชีวสังเคราะห์ และสะดวกที่จะให้สารจากภายนอกเข้าไป (precursor incorporation) เพื่อช่วยเร่งการผลิตสารสำคัญที่มีประโยชน์ทางยา

2. สามารถควบคุมสภาพการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดได้ตามต้องการ เช่น อุณหภูมิแวดล้อม ความเข้มของแสง สูตรและสภาพของอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วงจรการเจริญเติบโต (growth cycles) ของเนื้อเยื่อสั้น ดังนั้นในการผลิตสารจึงไม่มีความแตกต่างเนื่องจากฤดูกาลตามธรรมชาติ

4. ง่ายต่อการศึกษาเกี่ยวกับการจับกัมมันตภาพรังสี (labelled precursors) โดยเซลล์พืช เพื่อศึกษาเกี่ยวกับขบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช

5. การเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) จึงแน่ใจได้ว่าสารต่างๆ ในสูตรอาหารถูกใช้โดยเซลล์พืชภายใต้ขบวนการชีวสังเคราะห์ ไม่ใช่จากจุลชีพที่อาศัยอยู่ตามส่วน ต่างๆ ของพืช

6. ผนังของเนื้อเยื่อบาง และเซลล์ส่วนใหญ่มักไม่มีคลอโรฟิล ดังนั้นการเก็บเกี่ยวและการ สกัดสารสำคัญจึงทำได้ง่าย และสะดวก

7. การเลี้ยงเนื้อเยื่อทำในห้องทดลองจึงไม่สิ้นเปลืองเนื้อที่ในการเลี้ยง

8. ในขณะที่มีการเลี้ยงเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ จะมีโอกาสที่จะเกิด spontaneous mutation ทำให้เกิด somaclonal ชั้น จึงมีโอกาสในการปรับปรุง และคัดเลือก cell line ใหม่ๆ ที่มีสิ่งที่เราต้องการ

(พรรนิภา , 2530)

ข้อเสียเปรียบของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ผลิตสารเป็นยา

1. ปริมาณสารที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่มีน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณที่สกัดได้จากพืชในธรรมชาติ หรือเนื้อเยื่ออาจจะผลิตสารตัวอื่นแทนสารที่เราต้องการ ทั้งนี้เนื่องจากแคลลัส เป็นเซลล์ประเภทที่จำแนกจำพวกไม่ได้ ดังนั้น ขบวนชีวสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นอาจจะมีแนวโน้มที่ผิดปกติไปจากธรรมชาติ

2. ต้องการผู้ที่มีความรู้ และมีความชำนาญในการปฏิบัติงานเพื่อให้เนื้อเยื่อที่เลี้ยงอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ค่าใช้จ่ายในการทดลองสูง และจำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง

4. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้นได้โดยอัตโนมัติ (genone instatility) จำเป็นจะต้องมีการควบคุมพันธุกรรมของเซลล์ที่ผลิตสาร ให้ผลิตในปริมาณสูงให้คงที่อยู่เสมอเพราะพวกที่เป็น cell line ที่ให้ high yield มักไม่ค่อย stable

5. ในการ regenerate ต้นใหม่จาก cell line ที่มี high yield มักทำได้ยากเพราะพวกที่มี yielding สูงๆ จะมี chromosome เป็น polyploid ซึ่งเป็นสาเหตุขวางกั้นไม่ให้เกิด regeneration ได้ง่าย

(พรรนิภา , 2530 ; มนทกานติ , 2530 ; Street , 1973)

2.4 การสกัดอัลคาลอยด์

การสกัดอัลคาลอยด์จากพืชสามารถทำได้หลายวิธีคือ

1. การสกัดด้วยน้ำ หรือแอลกอฮอล์เจือกรด จะได้อัลคาลอยด์ออกมาในรูปเกลือของกรดอินทรีย์ เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการสกัดอัลคาลอยด์ทางอุตสาหกรรม เนื่องจากค่าใช้จ่ายต่ำ แต่การใช้น้ำสกัด จะทำให้ลดปริมาณได้ยาก มักเกิดฟอง และอาจมีสารอื่นปนออกมามาก

2. สกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่รวมตัวกับน้ำ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเธอร์ ไดคลอโรมีเธน การสกัดด้วยวิธีนี้ จะต้องทำผงยาให้อยู่ในสภาพด่าง เพื่อเปลี่ยนอัลคาลอยด์ให้อยู่ในรูปอิสระ แล้วจึงทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ วิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดอัลคาลอยด์จากพืชปริมาณน้อย เช่น การวิจัย แต่ไม่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากค่าใช้จ่ายสูง

3. สกัดด้วยตัวทำละลายที่ผสมกับน้ำได้ เช่น เอทานอล (ethanol) เมทานอล (methanol) แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดอัลคาลอยด์ได้ทั้งในรูปเกลือ และรูปอิสระ จึงเป็นที่นิยมใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์จากพืช

(อ้อมบุญ , 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การตรวจสอบสารสกัดจากพืช

ในพืชแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลายชนิด ดังนั้น สารสกัดที่ได้เบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมี เพื่อให้ได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิค และอุปกรณ์ ต่างๆ ซึ่งการแยกอาจทำได้โดย

1. Chemical means

โดยอาศัยคุณสมบัติและปฏิกิริยาทางเคมี เราสามารถแยกสารออกจากกันได้ เช่น

1.1 ความเป็นด่าง (basicity) เช่นสกัดแยกพวก amine จากสารอื่นด้วยกรด

1.2 ความเป็นกรด (acidity) แยกกรดออกโดยใช้ด่าง

1.3 พวก carbonyl จะสามารถทำปฏิกิริยากับ saturated solution ของ sodium bisulfite ได้เป็น bisulfite ซึ่งสารประกอบนี้เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับ strong sodium carbonate solution จะได้ aldehyde และ ketone กลับมา ใช้เป็นวิธีแยกสาร 2 ชนิดนี้ออกจากสารอื่น

1.4 เราสามารถแยก primary , secondary และ tertiary amine ออกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลาย primary amine จะละลายในด่าง แต่ secondary amine ไม่ละลาย ถ้าเอา amine ทั้ง 3 ชนิดไปทำปฏิกิริยากับ toluene-p-sulphonyl chloride แล้วกลั่นแยกเอา primary และ secondary amine tosyl derivative ออกด้วยไอน้ำ

1.5 อาจใช้วิธี fractional liberation ในบางกรณีเราสามารถแยกสารออกจากกันได้โดยเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสาร เช่น การเปลี่ยนเกลือของอัลคาลอยด์ให้เป็นอัลคาลอยด์ ซึ่งเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จะละลายออกมา หรือการแยกส่วนผสมของเกลือของกรดโดยใช้กรด เป็นต้น

2. Physical Means

เป็นการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ อาจใช้วิธีการต่างๆ คือ distillation , steam distillation , sublimation , solvent separation , solvent precipitation , chroma tography , fractional crystallization , dialysis , electrophoresis และ centrifugation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Distillation

เป็นการกลั่นเพื่อแยกเอาสารซึ่งระเหยได้ออกจากสารที่ไม่ระเหย เช่น แยก coumarin ซึ่งระเหยได้จากสารอื่น หรือการแยกสารซึ่งมีจุดเดือด ต่างกันโดยควบคุมอุณหภูมิก็จะสามารถแยกสารได้ตามจุดเดือด

Steam Distillation

เป็นการแยกสารซึ่งระเหยได้โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ เช่น การแยกน้ำมันหอมระเหยจากสารประกอบอื่น

Sublimation

สารบางชนิดอาจจะแยกออกจากพืชได้โดยวิธีเผา เช่น การแยก caffeine ออกจากอัลคาลอยด์อื่นที่ไม่ระเหิดออกจากใบชา

Solvent Separation

ในการแยกสารออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติของสารในการละลายในตัวทำละลายต่างๆ กัน เช่น แยกพวก fat และ wax ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้วออกจากสารสกัดโดยใช้ปิโตเลียมอีเธอร์เป็นต้น

Solvent/Solvent Precipitation

เป็นวิธีการแยกสาร โดยอาศัยหลักการละลายเช่นกัน นำสารผสมละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วเติมตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งสารบางชนิดในสารผสมนั้นละลายได้น้อยกว่าลงไป สารนั้นก็จะตกตะกอน ออกมา เช่น การแยก triterpenoid glycosside จากสารสกัด ทำได้โดยนำเอาสารสกัดมาละลายในเมทานอล แล้วเติมอะซิโตนไป พวก triterpenoid saporin จะตกตะกอนออกมา เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโตกราฟี (Chromatography)

โครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสารที่ค้นพบตั้งแต่ศตวรรษที่ 17 โครมาโตกราฟีที่ค้นพบชนิดแรกคือ ion-exchange

โครมาโตกราฟี เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารในระหว่างเฟส (phase) 2 ชนิด ซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ stationary phase และ mobile phase สารจะเคลื่อนที่ (migrate) ไปบน stationary phase โดยการพาของ mobile phase ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับ interaction ระหว่างสาร (solute) กับ stationary phase และระหว่าง solute กับ mobile phase สารที่มี interaction กับ stationary phase ได้ดี สารนั้นก็จะเคลื่อนที่ไปได้ช้า

High performance liquid Chromatography (HPLC)

HPLC (ย่อมาจาก High performance liquid Chromatography หรือ High pressure liquid Chromatography หรืออาจเรียกว่า Modern liquid Chromatography หรือ Rapid liquid Chromatography)

HPLC มีประโยชน์เหนือกว่าโครมาโตกราฟีชนิดอื่น คือ

1. ความเร็ว สามารถแยกได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยมาก 15-30 นาที ถ้าไม่ใช่สารผสมที่ซับซ้อนอาจจะได้ใน 5 นาที
2. แยกสารได้กว้างเนื่องจากมีผู้พัฒนา adsorbent จนทำงานได้กว้างมาก

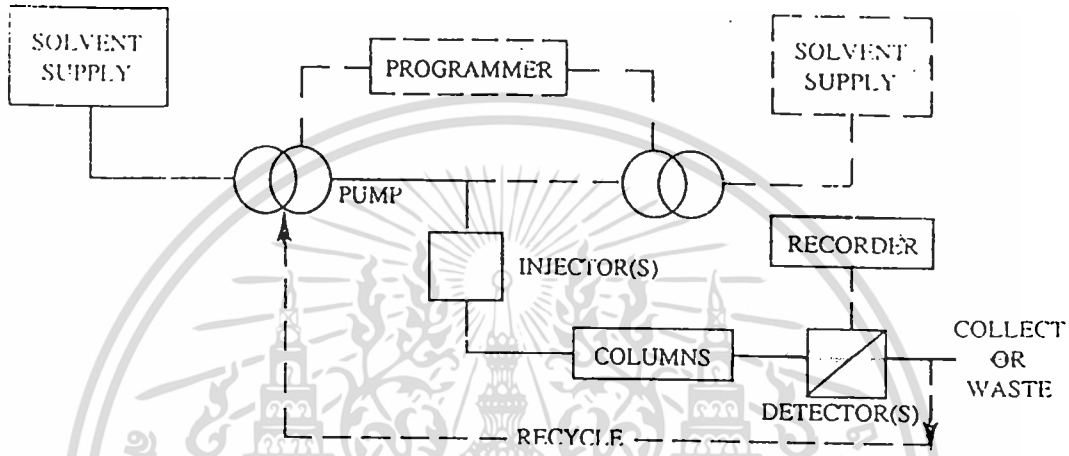
ส่วนประกอบของ HPLC

HPLC ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ตามไดอะแกรม (diagram) (รูปที่ 2.6) ปั๊ม (pump) จะดูดตัวทำละลายจากขวด ถ้าเป็น HPLC ซึ่งมีระบบ gradient จะมีปั๊ม (pump) 2 ตัว ดูดตัวทำละลายจากขวด หรือ ฟลาสก์ (flask) มาผสมกันในอัตราส่วนตามต้องการด้วย การควบคุมโดยอัตโนมัติ ก่อนที่ตัวทำละลายจะผ่านไปยังคอลัมน์ (column) เครื่อง HPLC โดยทั่วไปมักจะมีระบบปรับการเคลื่อนที่ทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ราบเรียบเสมอกัน ที่หัวคอลัมน์ (column) จะมี injecting port ซึ่งเป็นที่สำหรับฉีดสารที่ต้องการแยก ตัวทำละลายจะพาสารผ่านคอลัมน์ (column) ซึ่งมีขนาดเล็ก ไปยัง detector ซึ่งมีชนิดต่างๆ ได้แก่ UV- detector , refractive index detector , fluorescent detector , infrared detector , flamionization detector , electrochemical detector แต่ที่นิยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันมากคือ UV- detector จากนั้นจะผ่าน integrator หรือ recorder เพื่อแปรสัญญาณและรายงานผลเป็นพีก (peak)

(ถนอมศรี และคณะ , 2534)



รูปที่ 2.6 แสดงส่วนประกอบของ HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชทดลองคือ เหง้าดองดึง

2. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ , กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร , ปิเปต , ฟลาสก์ขนาด 250 และขนาด 125 มิลลิลิตร , ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ , แท่งแก้ว , ขวดปรับปริมาตร (volume metric flask) , จานเลี้ยงเชื้อ (plate) , กรวยแก้ว , ชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore) , ชุดกรองสุญญากาศ (suction) , ขวดใส่ตัวอย่าง (vial) , ขวดสีชา และ ขวด Duran

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตรของ Murashige and Skoog (1962) (ภาคผนวก)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70% และ 95% , คลอรอกซ์ (clorox) หรือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) 10% และ 5%, ทวีน (tween) 20

3.3 สารเพื่อการเจริญเติบโต (hormone) ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), α-naphtaleneacetic acid (NAA) , 6-benzylaminopurine (BAP) , Indolebutaric acid (IBA)

3.4 สารกระตุ้นอชีวภาพ (abiotic elicitor) ได้แก่ โคบอลต์คลอไรด์ (cobalt chloride) หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$

3.5 สารต้นตอ (precursor) ได้แก่ แอลฟีนิลอะลานีล (L-Phenylalanine)

3.6 สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำละลาย (solvent) ในการสกัด ได้แก่ เมธานอล (methanol)

3.7 สารเคมีที่ใช้เป็น mobile phase ได้แก่ acetonitrile และ น้ำ (deionized water)

3.8 สารมาตรฐาน ได้แก่ โคลชิซีน (colchicine)

4. เครื่องชั่งแบบละเอียด (4 ตำแหน่ง) และแบบหยาบ (2 ตำแหน่ง)

5. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

6. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

7. ตู้ปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. เครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ มีดผ่าตัด และปากคีบ

9. ตะเกียงแอลกอฮอล์

10. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส , ชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ , หลอดไฟ grolux ความเข้มแสงประมาณ 1000-2000 ลักซ์ (lux) , เครื่องเขย่า (shaker) ความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที (rpm)

11. โกร่งบดยา

12. ตู้อบตัวอย่าง อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

13. ตู้อบเครื่องแก้ว อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส

14. water bath

15. desicator

16. กระดาษกรองเบอร์ 1 , กระดาษกรองขนาดรู 0.45 ไมครอน ได้แก่ เซลลูโลสอะซิเตรท (cellulose acetrate) และ ไนลอน 66 (nilon 66)

17. เครื่อง sonicator

18. HPLC

19. Column C_{18} inertsil ODS-3 (5μm 4.6x250 mm.)

20. Micropipette

21. Syring

22. Svenex

23. ถังหมัก (Bioreactor) ขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิจัย

3.1 การศึกษาผลของสารเพื่อการเติบโตต่อการเจริญเป็นแคลลัสของเหง้าดองดึงบนอาหารแข็ง MS

นำเหง้าอ่อนมาล้างด้วยสบู่ และน้ำให้สะอาด แล้วจุ่มในเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้น 70% เป็นเวลาประมาณ 5 วินาที แล้วย้ายลงฟอกในสารละลายคลอรอกซ์ (clorox) หรือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 10% และ 5% (ที่มี 2-3 หยดของ Tween20) โดยปริมาตร เป็นเวลาประมาณ 10 และ 5 นาที ตามลำดับ แล้วจึงนำมาล้างออก ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3 ครั้ง หรือล้างจนกว่าไม่มีกลิ่นของคลอรอกซ์หรือโซเดียมไฮโปคลอไรท์ นำเหง้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วดังกล่าวมาตัดเป็นท่อนๆ หนาประมาณท่อนละ 0.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักสด แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตในกลุ่มของออกซินคือ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซโตไคนินคือ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งวรากรณ์ (2529) ได้ทำการศึกษาไว้แล้วพบว่าเหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสมากที่สุด นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการสังเกต และบันทึกภาพ ชั่งน้ำหนักสด เพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

3.2 การศึกษาผลของสารเพื่อการเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสบนอาหารแข็ง MS

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหง้าบนอาหารแข็ง MS ที่ได้จากการทดลองในในข้อ 3.1 มาเลี้ยงต่อ โดยตัดเอาเฉพาะส่วนของแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดียวกัน ตัดส่วนของแคลลัสให้มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน โดยให้มีน้ำหนักสดประมาณก้อนละ 0.2 กรัม ทำการศึกษาทั้งในที่มืด และที่มีแสงความเข้มแสงประมาณ 1000-2000 ลักซ์ (lux) อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการสังเกต และบันทึกภาพ ชั่งน้ำหนักสดเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การศึกษาผลของสารเพื่อการเติบโตต่อการเจริญของแคลลัสในอาหารเหลว MS

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยตัดให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน โดยมีน้ำหนักก้อนละประมาณ 0.2 กรัม นำก้อนแคลลัสมาบี้ด้วยแท่งแก้วให้มีขนาดเล็กลง และดำเนินการทดลองดังนี้

3.3.1 ศึกษาผลของสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส

โดยนำแคลลัสดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0 , 0.5 , 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0 , 0.5 , 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้อาหารทั้งหมด 16 สูตร (ดังตารางที่ 3.1) ซึ่งแต่ละสูตรทำในฟลาสก์ (flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร มีอาหารอยู่ฟลาสก์ (flask) ละ 30 มิลลิลิตร ทำสูตรละ 3 ฟลาสก์ (flask) นำไปเลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการชั่งน้ำหนักสดเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.1 อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส

ความเข้มข้น (mg/l)				
BAP	2,4-D			
	0	0.5	1	1.5
0	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
0.5	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7	สูตรที่ 8
1	สูตรที่ 9	สูตรที่ 10	สูตรที่ 11	สูตรที่ 12
1.5	สูตรที่ 13	สูตรที่ 14	สูตรที่ 15	สูตรที่ 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 ศึกษาผลของสารเพื่อการเติบโตคือ NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส

โดยนำแคลลัสดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติม NAA ความเข้มข้น 0 , 0.5 , 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0 , 0.5 , 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้อาหารทั้งหมด 16 สูตร (ดังตารางที่ 3.2) ซึ่งแต่ละสูตรทำในฟลาสก์ (flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร มีอาหารอยู่ฟลาสก์ (flask) ละ 30 มิลลิลิตร ทำสูตรละ 3 ฟลาสก์ (flask) นำไปเลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการชั่งน้ำหนักสด เพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.2 อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส

ความเข้มข้น (mg/l)				
BAP	NAA			
	0	0.5	1	1.5
0	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
0.5	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7	สูตรที่ 8
1	สูตรที่ 9	สูตรที่ 10	สูตรที่ 11	สูตรที่ 12
1.5	สูตรที่ 13	สูตรที่ 14	สูตรที่ 15	สูตรที่ 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 ศึกษาผลของสารเพื่อการเติบโตคือ IBA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส

โดยนำแคลลัสดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติม IBA ความเข้มข้น 0 , 0.5 , 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0 , 0.5 , 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้อาหารทั้งหมด 16 สูตร (ดังตารางที่ 3.3) ซึ่งแต่ละสูตรทำในฟลาสก์ (flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร มีอาหารอยู่ฟลาสก์ (flask) ละ 30 มิลลิลิตร ทำสูตรละ 3 ฟลาสก์ (flask) นำไปเลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการชั่งน้ำหนักสดเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.3 อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส

ความเข้มข้น (mg/l)				
BAP	IBA			
	0	0.5	1	1.5
0	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
0.5	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7	สูตรที่ 8
1	สูตรที่ 9	สูตรที่ 10	สูตรที่ 11	สูตรที่ 12
1.5	สูตรที่ 13	สูตรที่ 14	สูตรที่ 15	สูตรที่ 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ (cobaltous chloride) หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส

3.4.1 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ (cobaltous chloride) หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยตัดให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน โดยให้มีน้ำหนักก้อนละประมาณ 0.2 กรัม นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรเดียวกันกับข้อ 3.1 แต่มีการเติมโคบอลตัสคลอไรด์ (cobaltous chloride) หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทำตามวิธีของ Limsirichaikul (1995) ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว พบว่ามีผลต่อการเจริญได้ดีที่สุด นำไปเลี้ยงในที่มืด และที่มีแสงความเข้มแสงประมาณ 1000-2000 ลักซ์ (lux) เปรียบเทียบกัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการสังเกต และบันทึกภาพ ชั่งน้ำหนักสดเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

3.4.2 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ (cobaltous chloride) หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยตัดให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน โดยให้มีน้ำหนักก้อนละประมาณ 0.2 กรัม ทำการบี้ให้มีขนาดเล็กลงด้วยแท่งแก้ว นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรเดียวกันกับข้อ 3.1 แต่มีการเติมโคบอลตัสคลอไรด์ (cobaltous chloride) หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทำตามวิธีของ Limsirichaikul (1995) ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว พบว่ามีผลต่อการเจริญได้ดีที่สุด นำไปเลี้ยงในที่มืดและที่มีแสงความเข้มแสงประมาณ 1000-2000 ลักซ์ (lux) เปรียบเทียบกัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการสังเกต และบันทึกภาพ ชั่งน้ำหนักสดเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ศึกษาผลของสารต้นตอ (precursor) คือ แอลฟีนิลอะลานีล (L-Phenylalanine) ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารแข็ง MS

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยตัดให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน คือให้มีน้ำหนักประมาณก้อนละ 0.2 กรัม นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรเดียวกันกับข้อ 3.1 แต่มีการเติมสารต้นตอ (precursor) คือ แอลฟีนิลอะลานีล (L-Phenylalanine) ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ คือ 0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} โมลาร์ (M) นำไปเลี้ยงในที่มืด และที่มีแสงความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) เปรียบเทียบกัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการสังเกต และบันทึกภาพ ชั่งน้ำหนักสดเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

3.6 ศึกษาผลของสารต้นตอ (precursor) คือ แอลฟีนิลอะลานีล (L-Phenylalanine) ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ (M) ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.6.1 ศึกษาผลของสารต้นตอ (precursor) คือ แอลฟีนิลอะลานีล (L-Phenylalanine) ความ เข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ (M) ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารแข็ง MS ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยตัดให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน คือ ให้มีน้ำหนักประมาณก้อนละ 0.2 กรัม นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรเดียวกันกับข้อ 3.1 แต่มีการเติมสารต้นตอ (precursor) คือ แอลฟีนิลอะลานีล (L-Phenylalanine) ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ (M) นำไปเลี้ยงในที่มีแสงความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) เปรียบเทียบกัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการสังเกต และ บันทึกภาพ ชั่งน้ำหนักสดเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 ศึกษาผลของสารต้นตอ (precursor) คือ แอลฟีนิลอะลานีล (L-Phenylalanine) ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ (M) ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว MS ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยตัดให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน คือ ให้มีน้ำหนักประมาณก้อนละ 0.2 กรัม ทำการบี้ก้อนแคลลัสให้มีขนาดเล็กลง นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรเดียวกันกับข้อ 3.1 แต่มีการเติมสารต้นตอ (precursor) คือ แอลฟีนิลอะลานีล (L-Phenylalanine) ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ (M) นำไปเลี้ยงในที่มีแสงความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) เปรียบเทียบกัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการสังเกต และบันทึกภาพ ชั่งน้ำหนักสดเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

3.7 ศึกษาผลของสารต้นตอ (precursor) คือ แอลฟีนิลอะลานีล (L-Phenylalanine) ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ (M) ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว MS ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.1 มาตัดให้มีน้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม ใช้แท่งแก้วบี้ให้มีขนาดเล็กลงแต่ไม่ต้องบี้มาก แล้วนำไปเลี้ยงในฟลาสก์ (flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว MS ซึ่งมีการเติมสารเพื่อการเติบโต คือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลกรัมต่อลิตร อยู่ 30 มิลลิลิตร เลี้ยงไว้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) นำไปเลี้ยงในที่มีแสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำหัวเชื้อที่ได้มาชั่งน้ำหนักสดให้มีน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ใส่ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลวสูตรเดิมอยู่ 30 มิลลิลิตร และสารต้นตอ คือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-1} M อยู่ 10.3 มิลลิลิตร นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้มาใส่ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเหลว MS ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอยู่ 1 ลิตร (เมื่อใส่หัวเชื้อที่เตรียมแล้วจะได้ความเข้มข้นของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine เท่ากับ 10^{-3}M) ปิดฝาให้เรียบร้อย นำไปเลี้ยงในที่มีแสง ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการกวน 100 รอบต่อนาที (rpm) และให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการสังเกต และบันทึกภาพ ชั่งน้ำหนักสดเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 ศึกษาปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS สูตรเดียวกัน ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงทั้งในที่มืด และที่มีแสงความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ของแต่ละการทดลองที่ต้องการศึกษาหาปริมาณสารโคลชิซีนคือ การศึกษาผลของสารโคบอลต์คลอไรด์, สารต้นตอ และตัวอย่างอื่นๆ เช่น เหง้าธรรมชาติ , ส่วนของแคลลัสที่มีสีเขียว , รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยง และแคลลัสที่เปลี่ยนแปลงรูปร่าง มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง นำไปบดด้วยโกร่งบดยาให้ละเอียด แล้วนำผงยาที่ได้มา 0.1 กรัม ใส่ในฟลาสก์(flask) แล้วทำการสกัดด้วยเมธานอล (methanol) โดยใส่เมธานอล (methanol) ลงไป 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ (flask) ที่มีผงยาอยู่ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยแห้งใน water bath จนแห้งหรือเกือบแห้ง แล้วนำไปไว้ใน desicator กรณีที่ยัง ไม่ได้นำไปตรวจหาปริมาณสารเป็นเวลาหลายวัน ใส่เมธานอล (methanol) ไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่ว นำไปกรองด้วยชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore) หรือใช้ syring กับ svenex โดยใช้กระดาษกรองขนาดรู 0.45 ไมครอน หรือกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตรท (cellulose acetrate) นำไปตรวจหาปริมาณสารด้วย HPLC โดยสภาวะที่ใช้คือ mobile phase ใช้ acetonitrile ต่อ น้ำ เท่ากับ 27:73 คอลัมน์ (column) C_{18} อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ UV เป็น detector ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 254 นาโนเมตร (nm) และใช้สารมาตรฐานโคลชิซีน (standard colchicine) เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยสารมาตรฐานโคลชิซีน (standard colchicine) ที่ใช้มีความเข้มข้นดังนี้ คือ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) เก็บผลการทดลองโดยนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการได้จากกราฟมาตรฐาน(standard curve) นี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหง้าบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในเวลา 3 สัปดาห์หลังจากเริ่มเลี้ยง เนื้อเยื่อรอบนอกของเหง้ามีการก่อตัวของแคลลัสขึ้น และปรากฏชัดในเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 พบว่ามีการก่อตัวของแคลลัสเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเหง้ามีการเปลี่ยนแปลงไม่เหมือนกัน ในแต่ละขวด อาจเป็นเพราะความไม่สม่ำเสมอของตำแหน่งเนื้อเยื่อที่เอามาเลี้ยง จึงเลือกเอาเนื้อเยื่อที่เจริญได้ดีที่สุดมาถ่ายภาพไว้ ในการศึกษานี้เหง้าที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงเป็นเหง้าแบบตัวแอล (L-shape) ซึ่งลักษณะต่างๆ ของเหง้าดองดึงนั้นมีหลายรูปแบบคือ แบบเส้นตรง (Linear-shape) , แบบตัวที (T-shape) , แบบตัวแอล (L-shape) , และแบบตัววี (V-shape) ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.1 การวัดการเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักสด พบว่า มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.286 กรัม ในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจากน้ำหนักเหง้าที่นำมาเพาะเลี้ยงเริ่มต้นเท่ากับ 0.362 กรัม แสดงว่าได้แคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.924 กรัม ในสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 2.21 กรัม แสดงว่าแคลลัสที่ได้มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.848 กรัม จากที่เริ่มเลี้ยง และแคลลัสที่ได้มากกว่าในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 0.924 กรัม ซึ่งแสดงว่าแคลลัสที่ได้ในสัปดาห์ที่ 8 เพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัวจากสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้ในทุกๆ 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังตารางที่ 4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.2 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองอ่อนปนขาว หรือบางขวดมีสีเหลืองอ่อนปนสีน้ำตาลอ่อนแสดงดังรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

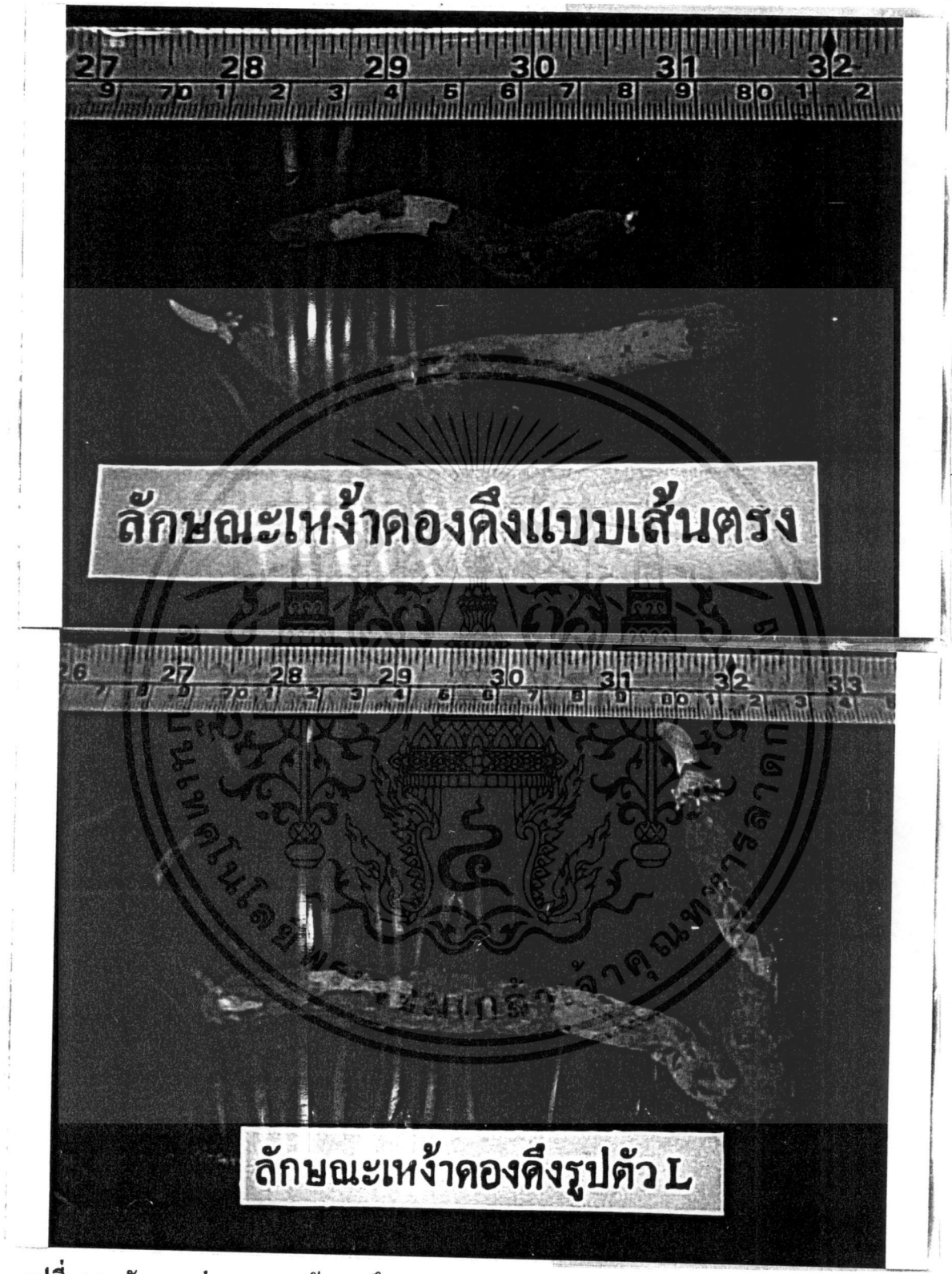
ตารางที่ 4.1 ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	0.362C [2]
4	1.286B
8	2.210A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.3 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

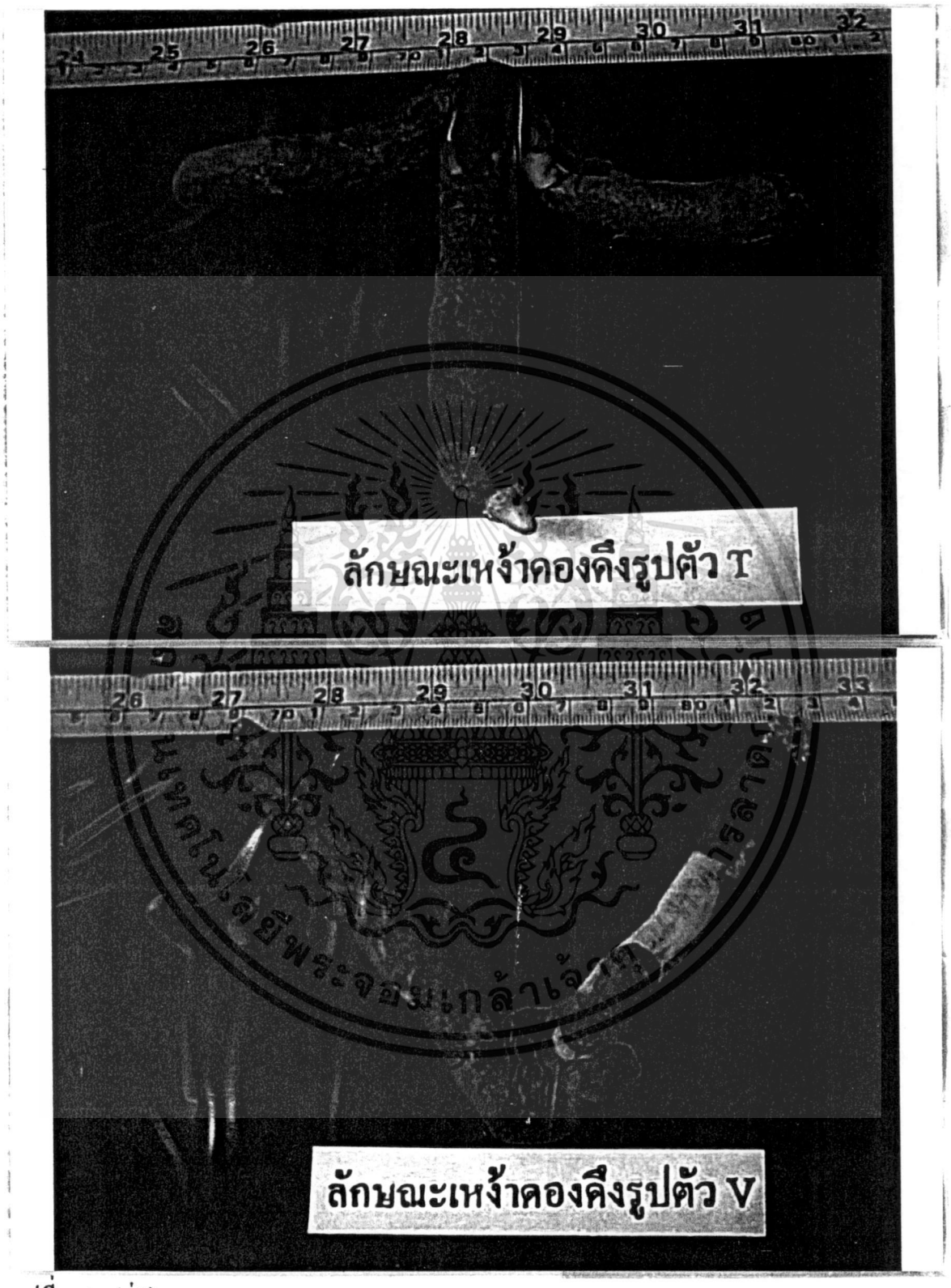


รูปที่ 4.1 ลักษณะต่างๆ ของเหง้าดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.)

รูปบน : เหง้าดองดึงแบบเส้นตรง (Linear-shape)

รูปล่าง : เหง้าดองดึงแบบตัวแอล (L-shape)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

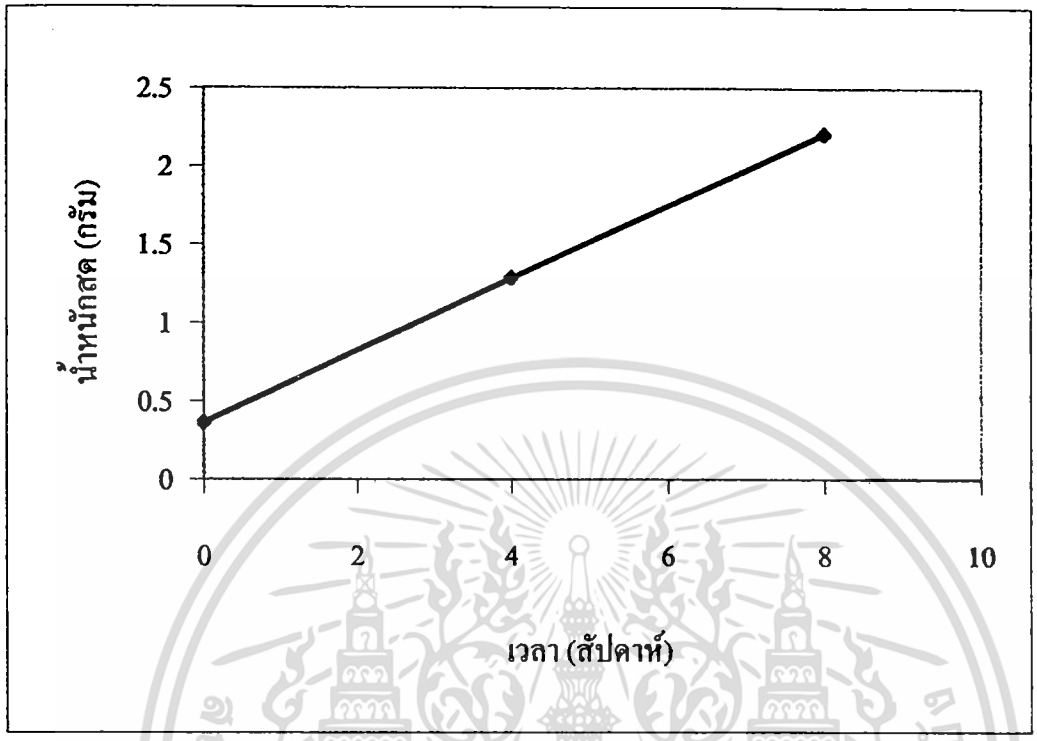


รูปที่ 4.1 (ต่อ)

รูปบน : เหง้าดองดึงแบบตัวที (T-shape)

รูปล่าง : เหง้าดองดึงแบบตัววี (V-shape)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเหง้าคองคึง (*Gloriosa superba* Linn.) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 เนื้อเยื่อเหง้าคองคึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืดและที่ให้แสง เป็นเวลา 16 สัปดาห์

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการ เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืดและที่ให้ แสง เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าการวัดการเจริญเติบโตในที่มืดมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสมากกว่าในที่ให้แสงเป็นดังนี้คือ น้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.23 กรัม สัปดาห์ที่ 4 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.968 กรัม สัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 2.766 กรัม สัปดาห์ที่ 12 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 2.802 กรัม และสัปดาห์ที่ 16 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 2.872 กรัม เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า สัปดาห์ที่ 4 น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่เริ่มเลี้ยง สัปดาห์ที่ 8 น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 4 และที่เริ่มเลี้ยง ส่วนในสัปดาห์ที่ 12 และสัปดาห์ที่ 16 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงดังตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.4 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแสดงดังรูปที่ 4.5 (ก) ส่วนการวัดการเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงในที่ให้แสงมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสน้อยกว่าในที่มืด เป็นดังนี้คือ น้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.246 กรัม สัปดาห์ที่ 4 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.612 กรัม สัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 2.412 กรัม สัปดาห์ที่ 12 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 2.492 กรัม และสัปดาห์ที่ 16 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 2.574 กรัม เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า สัปดาห์ที่ 4 น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่เริ่มเลี้ยง สัปดาห์ที่ 8 น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 4 และที่เริ่มเลี้ยง สัปดาห์ที่ 12 น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 8 และสัปดาห์ที่ 16 น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 12 แสดงดังตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.4 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 12 บางขวดเริ่มมีสีเขียวเกิดขึ้น บางขวดมีลักษณะของแคลลัสเปลี่ยนแปลงไปคือมีลักษณะเป็นก้อนกลมๆ รีๆ เล็กๆ หลายก้อน และมีน้ำค่อนข้างเหนียว มีสีใสปรากฏขึ้นด้วย บางขวดปรากฏว่ามีรากเกิดขึ้น นอกจากนี้ บางขวดมีลักษณะเปลี่ยนแปลงคล้ายกับลักษณะของส่วนกลีบ (bulb) ของหัวหอม แสดงดัง รูปที่ 4.5 (ก , ข และ ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

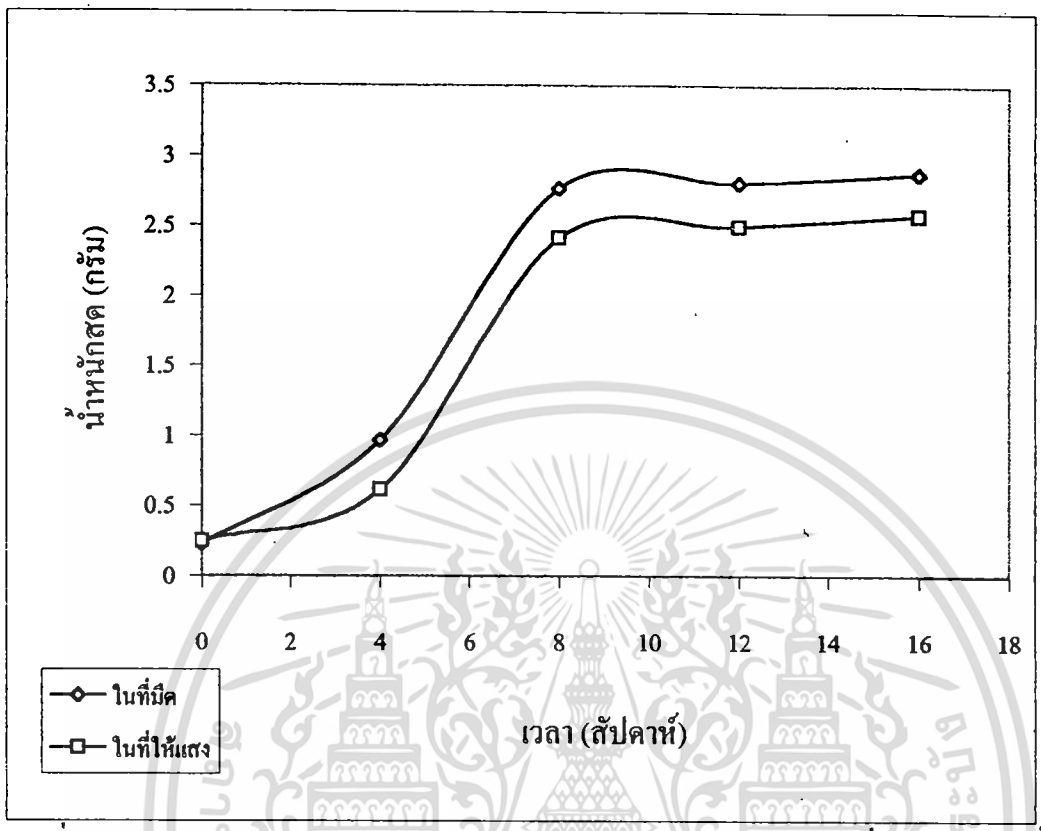
ตารางที่ 4.2 ผลการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 16 สัปดาห์ [1]

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
0	0.230C [2]	0.246D [2]
4	0.968B	0.612C
8	2.766A	2.412B
12	2.802A	2.492AB
16	2.872A	2.574A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 16 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ข. ค.

รูปที่ 4.5 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสาร เพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 16 สัปดาห์

ก. 8 สัปดาห์ ข. 12 สัปดาห์ ค. 16 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สูตรที่ 11 คือมีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงมากที่สุดคือเท่ากับ 0.67 กรัม รองลงมาคือสูตรที่ 9 ซึ่งมีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/l ไม่เติม BAP ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.45 กรัม สูตรที่ 5 คือมีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/l ไม่เติม BAP ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.44 กรัม สูตรที่ 10 คือมีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l ได้ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.43 กรัม และสูตรที่ 6 คือมีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l ได้ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.32 กรัม ตามลำดับ ส่วนสูตรอื่นๆ พบว่า น้ำหนักไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมากนักจากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า สูตรที่ 1 คือกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสน้อยที่สุดคือเท่ากับ 0.23 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.23 กรัม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับสูตรที่ 2 , 3 , 4 , 7 , 8 , 12 , 13 , 14 , 15 และ 16 ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของ แคลลัสมากกว่าเล็กน้อย แต่สูตรที่กล่าวมาแล้วนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 6 โดยสูตรที่ 6 นั้น แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 5 , 9 และ 10 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 11 ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงมากที่สุดคือเท่ากับ 0.67 กรัม ตามลำดับโดยจากน้อยไปมากจากที่กล่าวมาแสดงดังตารางที่ 4.3 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.6 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

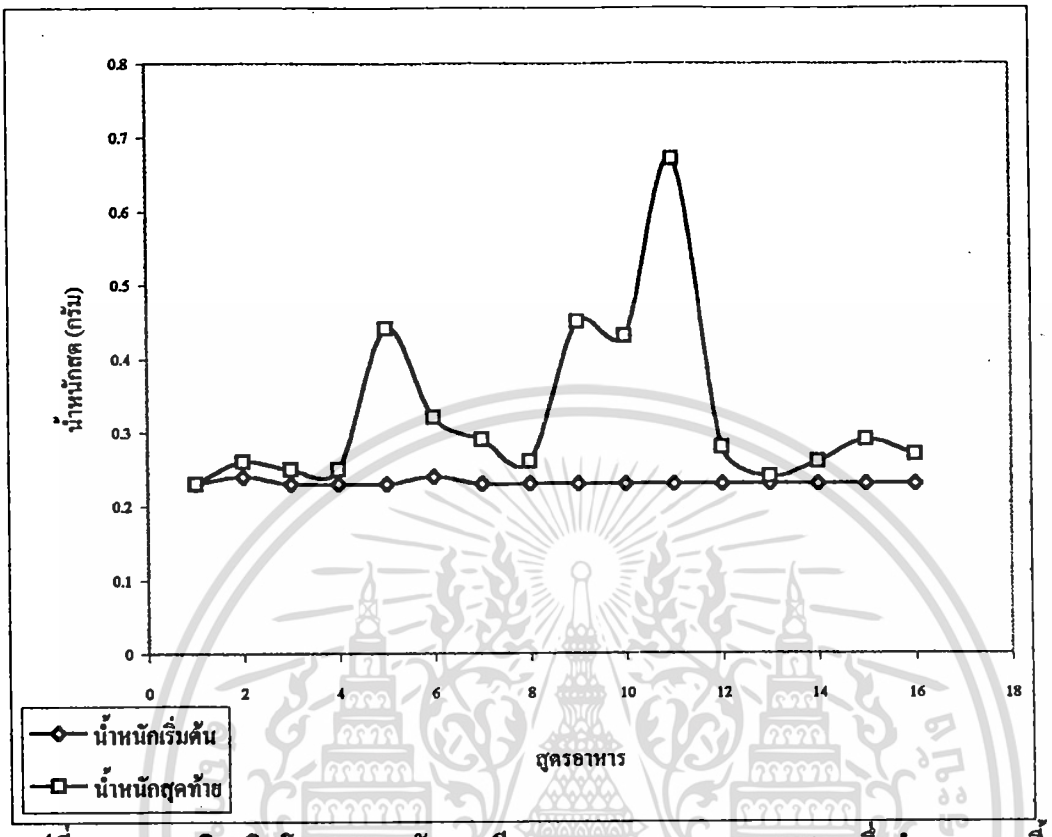
ตารางที่ 4.3 ผลการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ [1]

สูตรอาหาร	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	น้ำหนักสด (กรัม)	
			น้ำหนักเริ่มต้น	น้ำหนักสุดท้าย
1	0	0	0.23	0.23D [2]
2	0	0.5	0.24	0.26CD
3	0	1	0.23	0.25CD
4	0	1.5	0.23	0.25CD
5	0.5	0	0.23	0.44B
6	0.5	0.5	0.24	0.32C
7	0.5	1	0.23	0.29CD
8	0.5	1.5	0.23	0.26CD
9	1	0	0.23	0.45B
10	1	0.5	0.23	0.43B
11	1	1	0.23	0.67A
12	1	1.5	0.23	0.28CD
13	1.5	0	0.23	0.24CD
14	1.5	0.5	0.23	0.26CD
15	1.5	1	0.23	0.29CD
16	1.5	1.5	0.23	0.27CD

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

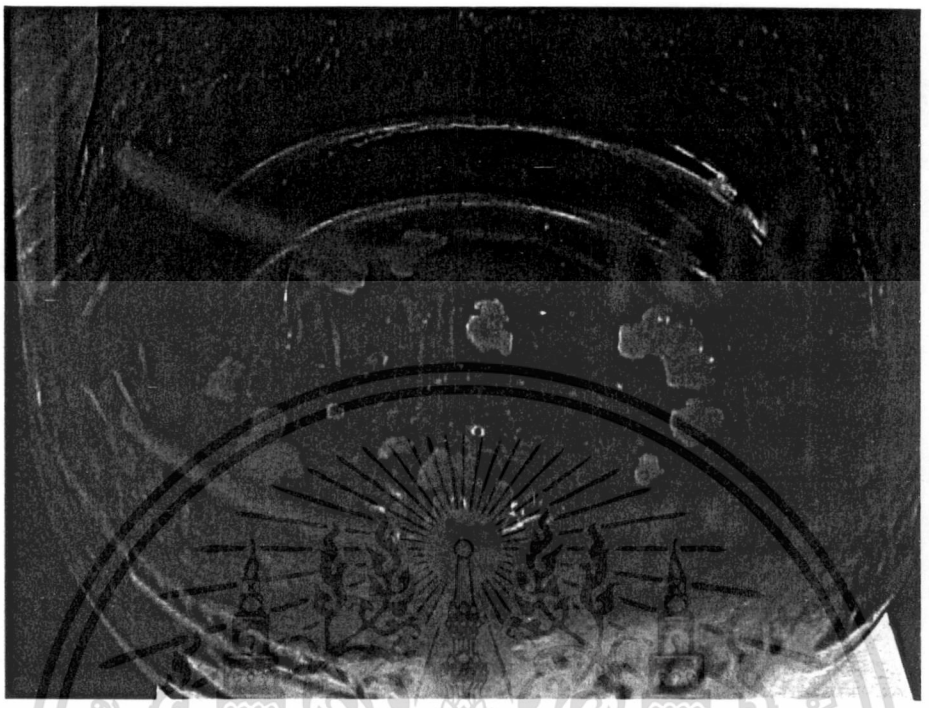
[2] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโตของแคลลัสคองดึง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวMS ที่มีการเติมสาร เพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สูตรที่ 10 คือมีการเติม NAA ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงมากที่สุดคือเท่ากับ 0.46 กรัม รองลงมาคือสูตรที่ 9 ซึ่งมีการเติม NAA ความเข้มข้น 1 mg/l ไม่เติม BAP ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.43 กรัม สูตรที่ 5 คือมีการเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ไม่เติม BAP ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.39 กรัม สูตรที่ 11 คือมีการเติม NAA ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ได้ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.37 กรัม และสูตรที่ 6 คือมีการเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l ได้ น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.32 กรัม ตามลำดับ ส่วนสูตรอื่นๆ พบว่า น้ำหนักไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมากนักจากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า สูตรที่ 1 คือกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสน้อยที่สุดคือเท่ากับ 0.22 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.22 กรัม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับสูตรที่ 2 , 3 , 4, 12 , 14 , 15 และ 16 ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของ แคลลัสมากกว่าเล็กน้อย แต่สูตรที่กล่าวมาแล้วนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 8 และ 13 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสูตรที่ 8 และ 13 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 7 โดยสูตรที่ 7 นั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 6 ซึ่งสูตรที่ 6 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 11 โดยสูตรที่ 11 นั้น แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 5 ซึ่งสูตรที่ 5 นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 9 และสูตรที่ 9 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติกับสูตรที่10 ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงมากที่สุดคือเท่ากับ 0.46 กรัม ตามลำดับโดยจากน้อยไปมากจากที่กล่าวมา แสดงดังตารางที่ 4.4 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูป ที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

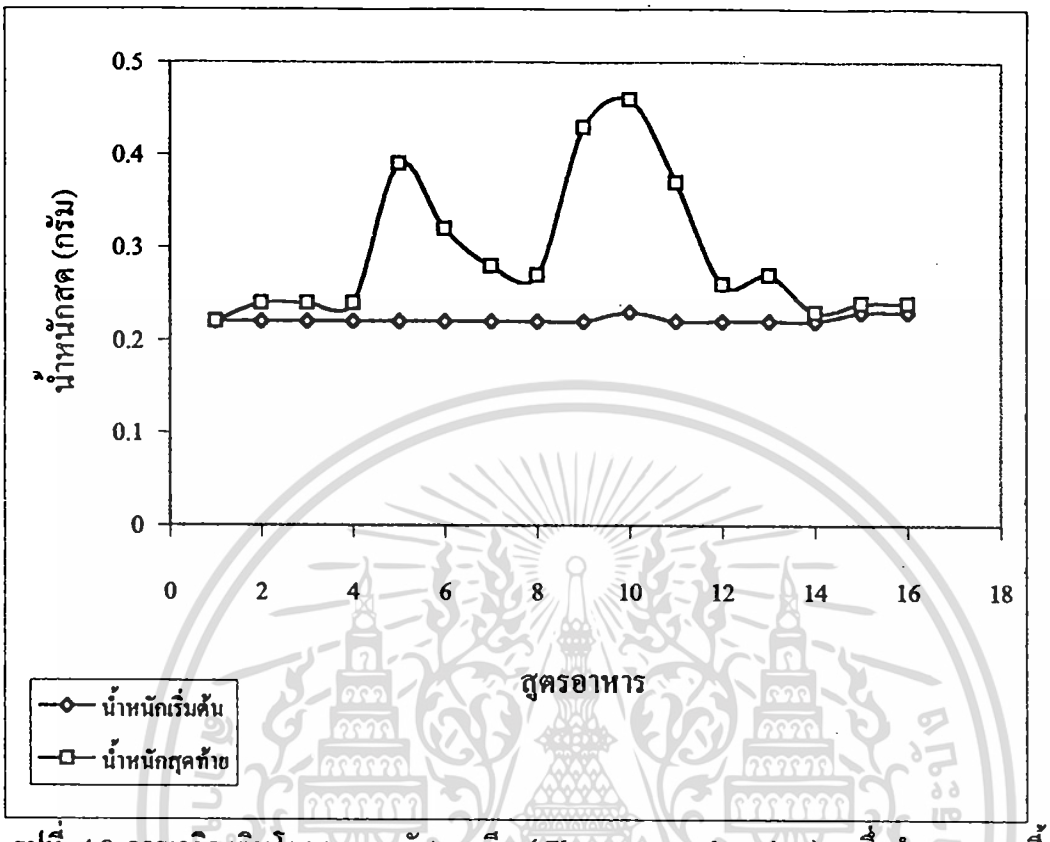
ตารางที่ 4.4 ผลการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ [1]

สูตรอาหาร	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	น้ำหนักสด (กรัม)	
			น้ำหนักเริ่มต้น	น้ำหนักสุดท้าย
1	0	0	0.22	0.22F [2]
2	0	0.5	0.22	0.24EF
3	0	1	0.22	0.24EF
4	0	1.5	0.22	0.24EF
5	0.5	0	0.22	0.39BC
6	0.5	0.5	0.22	0.32D
7	0.5	1	0.22	0.28DE
8	0.5	1.5	0.22	0.27DEF
9	1	0	0.22	0.43AB
10	1	0.5	0.23	0.46A
11	1	1	0.22	0.37C
12	1	1.5	0.22	0.26EF
13	1.5	0	0.22	0.27DEF
14	1.5	0.5	0.22	0.23EF
15	1.5	1	0.23	0.24EF
16	1.5	1.5	0.23	0.24EF

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สูตรที่ 5 คือมีการเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ไม่เติม BAP และสูตรที่ 9 คือมีการเติม NAA ความเข้มข้น 1 mg/l ไม่เติม BAP ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงมากที่สุด คือเท่ากับ 0.32 กรัม รองลงมาคือสูตรที่ 10 ซึ่งมีการเติม NAA ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l และสูตรที่ 11 ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.31 กรัม ตามลำดับ ส่วนสูตรอื่นๆ พบว่า น้ำหนักไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมากนักจากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า สูตรที่ 1 คือกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสน้อยที่สุดคือเท่ากับ 0.23 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.23 กรัม รองลงมาคือสูตรที่ 2 , 4 , 8 และ 12 ซึ่ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับสูตรที่ 3 , 7 , 13 และ 16 ซึ่งมี น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสมากกว่าเล็กน้อย แต่สูตรที่กล่าวมาแล้วนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 15 โดยสูตรที่ 15 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 14 ซึ่งสูตรที่ 14 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตร ที่ 6 สูตรที่ 6 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตร ที่ 10 และ 11 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 9 ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ทำการ เพาะเลี้ยงมากที่สุด คือเท่ากับ 0.32 กรัม ตามลำดับโดยจากน้อยไปมากจากที่กล่าวมา แสดงดังตารางที่ 4.5 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูป ที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

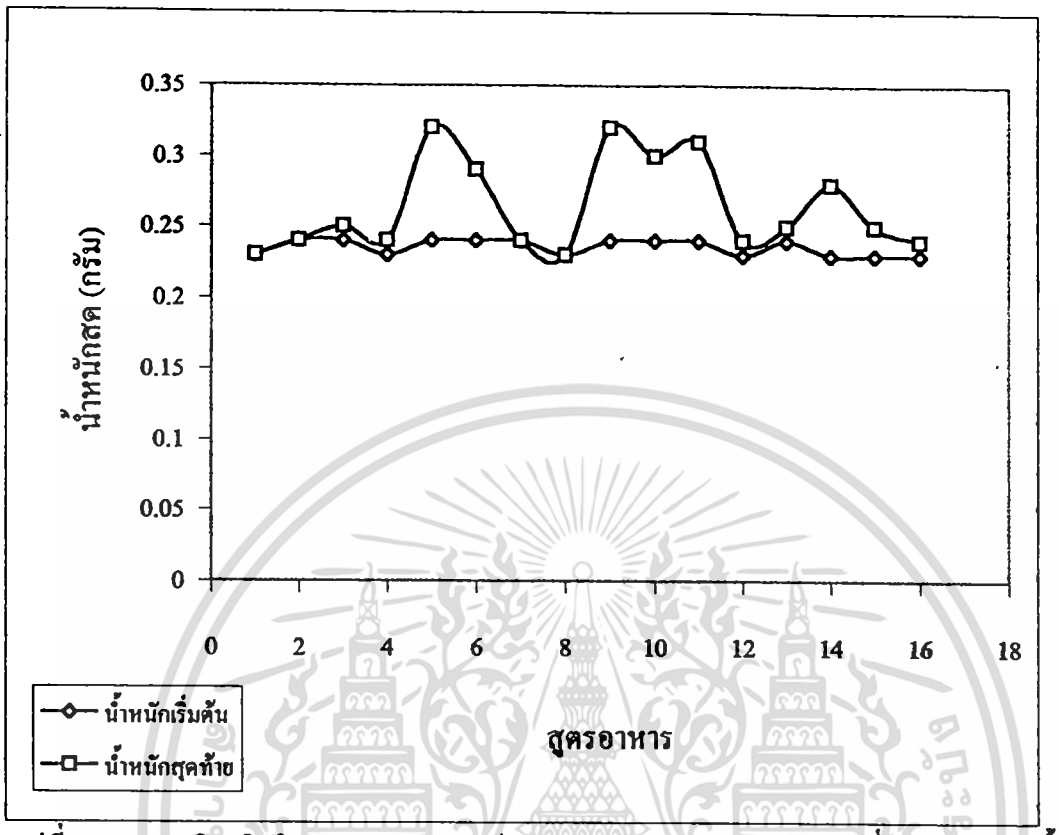
ตารางที่ 4.5 ผลการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ [1]

สูตรอาหาร	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	น้ำหนักสด (กรัม)	
			น้ำหนักเริ่มต้น	น้ำหนักสุดท้าย
1	0	0	0.23	0.23E [2]
2	0	0.5	0.24	0.24E
3	0	1	0.24	0.25DE
4	0	1.5	0.23	0.24E
5	0.5	0	0.24	0.32A
6	0.5	0.5	0.24	0.29ABC
7	0.5	1	0.24	0.25DE
8	0.5	1.5	0.23	0.24E
9	1	0	0.24	0.32A
10	1	0.5	0.24	0.31AB
11	1	1	0.24	0.31AB
12	1	1.5	0.23	0.24E
13	1.5	0	0.24	0.25DE
14	1.5	0.5	0.23	0.28BCD
15	1.5	1	0.23	0.25CDE
16	1.5	1.5	0.23	0.24DE

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l

4.6.1 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส ดองดึงที่ทำการ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า สัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในกลุ่มควบคุมคือ ไม่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 mg/l มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.724 กรัม ส่วนในกลุ่มทดลองคือมีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 mg/l มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.901 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.226 กรัม และ 0.222 กรัม ตามลำดับ ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 นั้น พบว่า ในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.236 กรัม และกลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.406 กรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้ ในสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ 8 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากที่เริ่มเลี้ยง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.6 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.10 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต คือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$
0	0.226	0.222
4	0.724	0.901
8	1.236	1.406

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	0.224B [2]
4	0.813A
8	1.322A

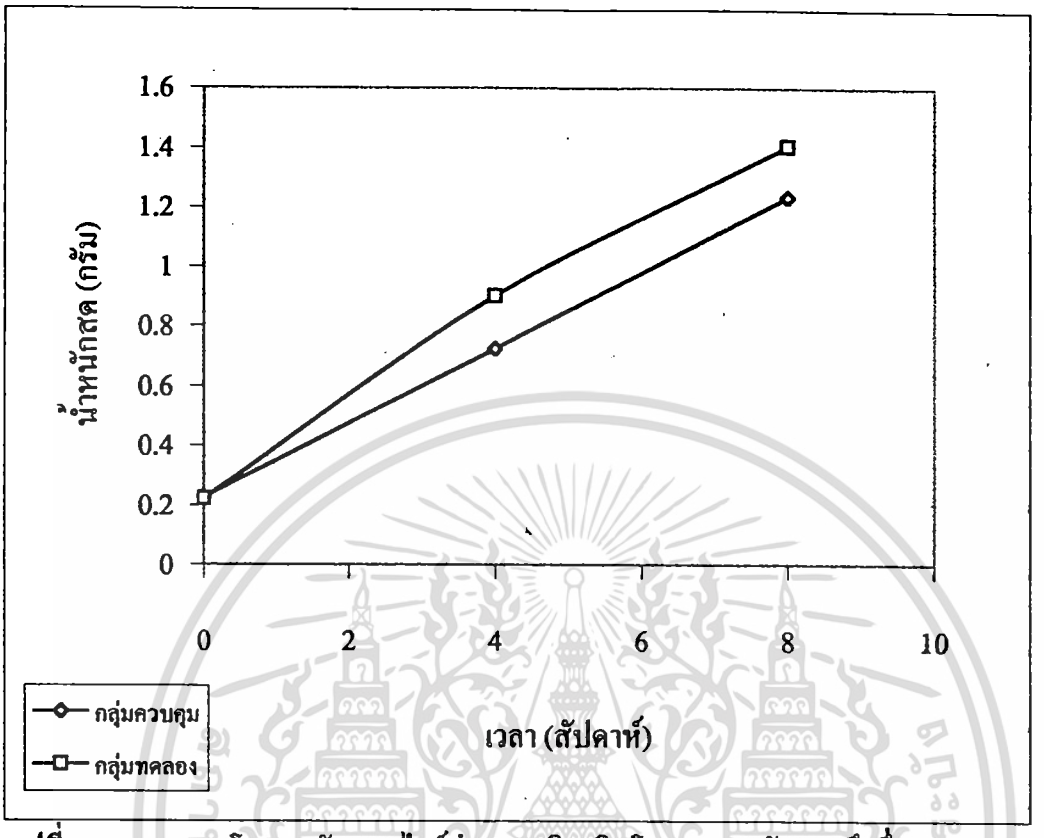
การทดลอง	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
กลุ่มควบคุม	0.729A [3]
กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$	0.844A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 6 ซ้ำ

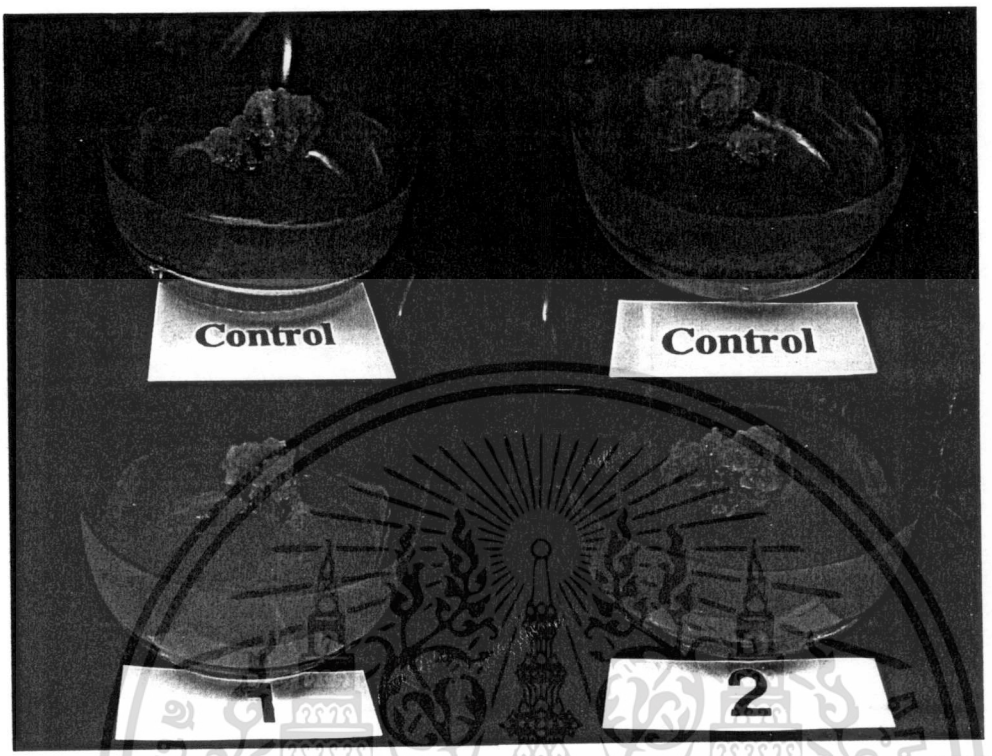
[3] ค่าเฉลี่ยจาก 9 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

1 : ในที่ให้แสง 2 : ในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 ศึกษาผลของโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส คองดึงที่ทำการ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า สัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในกลุ่มควบคุมคือ ไม่มีการเติมสารโคบอลต์สคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 mg/l มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.630 กรัม ส่วนในกลุ่มทดลองคือมีการเติมสารโคบอลต์สคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 mg/l มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.767 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.224 กรัม และ 0.224 กรัม ตามลำดับ ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 นั้น พบว่า ในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.092 กรัม และกลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.251 กรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้ ในสัปดาห์ที่ 4 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากที่เริ่มเลี้ยง และสัปดาห์ 8 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 4 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.7 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.12 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$
0	0.224	0.224
4	0.630	0.767
8	1.092	1.251

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	0.225C [2]
4	0.699B
8	1.172A

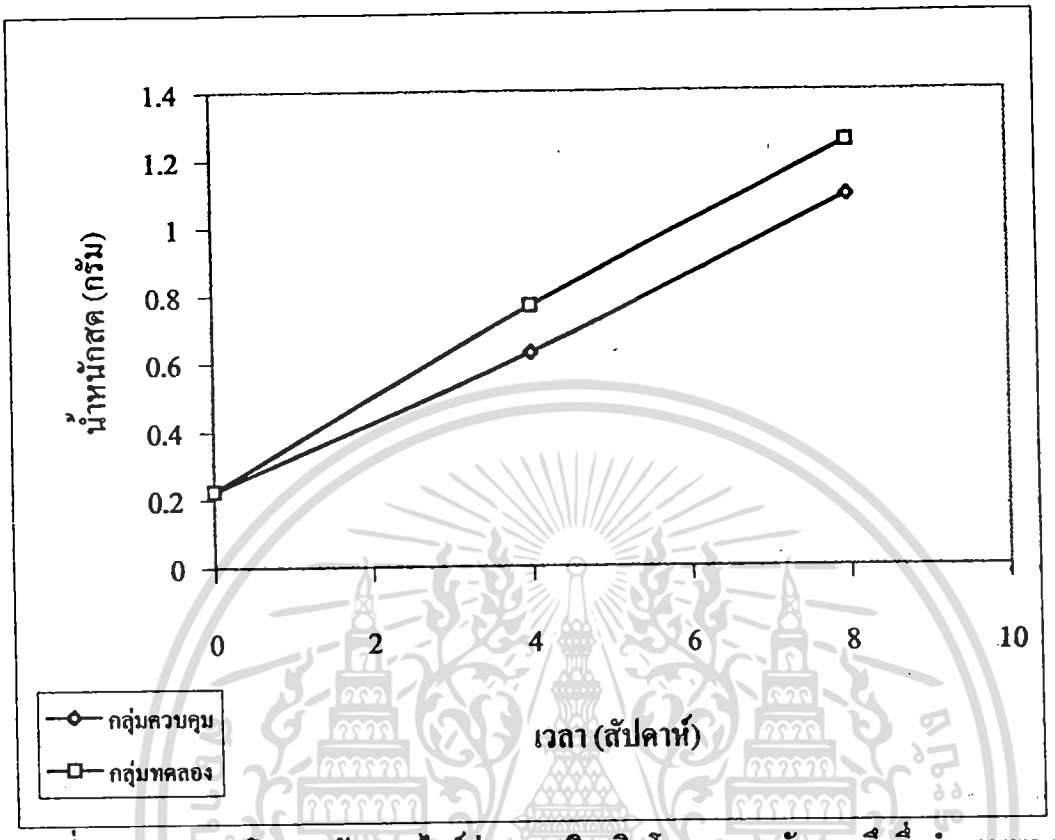
การทดลอง	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
กลุ่มควบคุม	0.649A [3]
กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$	0.748A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 6 ซ้ำ

[3] ค่าเฉลี่ยจาก 9 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสคองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l

4.7.1 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส ดองดึงที่ทำการ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า สัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในกลุ่มควบคุมคือ ไม่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 mg/l มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.433 กรัม ส่วนในกลุ่มทดลองคือมีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 mg/l มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.526 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.220 กรัม และ 0.226 กรัม ตามลำดับ ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 นั้น พบว่า ในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.956 กรัม และกลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.020 กรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้ ในสัปดาห์ที่ 4 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากที่เริ่มเลี้ยง และสัปดาห์ 8 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 4 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.8 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.13 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ผลของโคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$
0	0.220	0.226
4	0.433	0.526
8	0.956	1.020

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	0.223C [2]
4	0.480B
8	0.988A

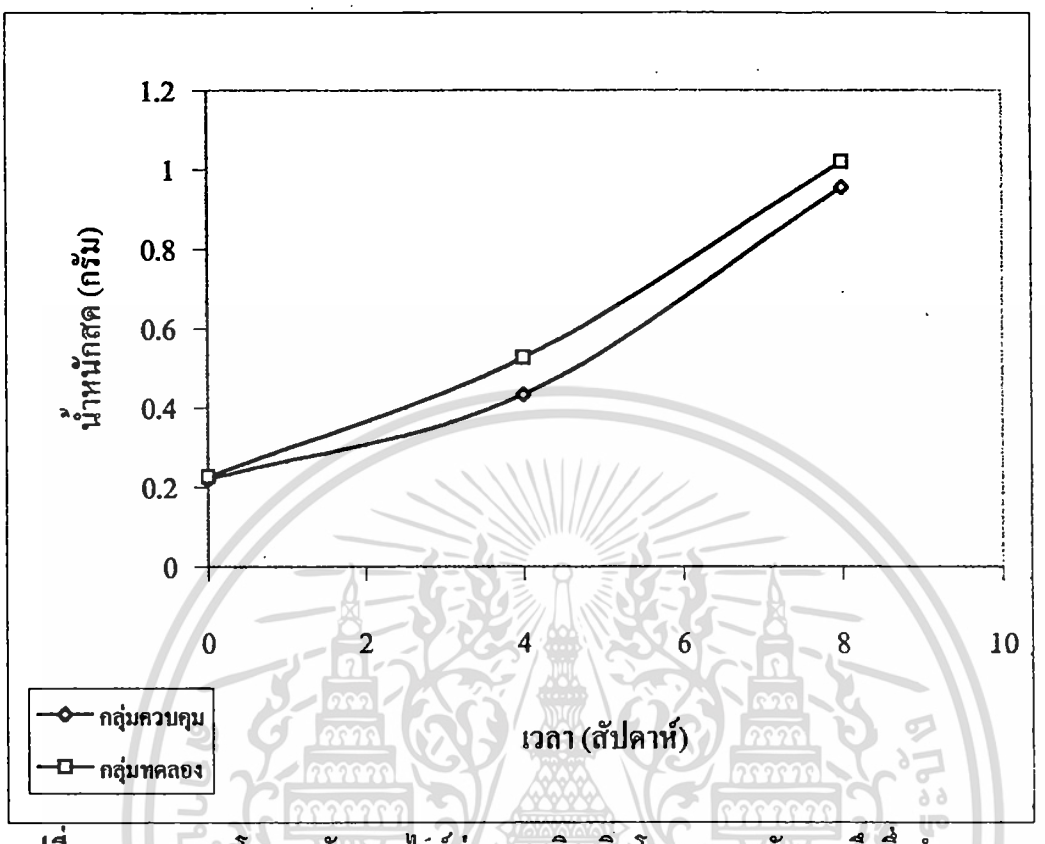
การทดลอง	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
กลุ่มควบคุม	0.536A [3]
กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$	0.591A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 6 ซ้ำ

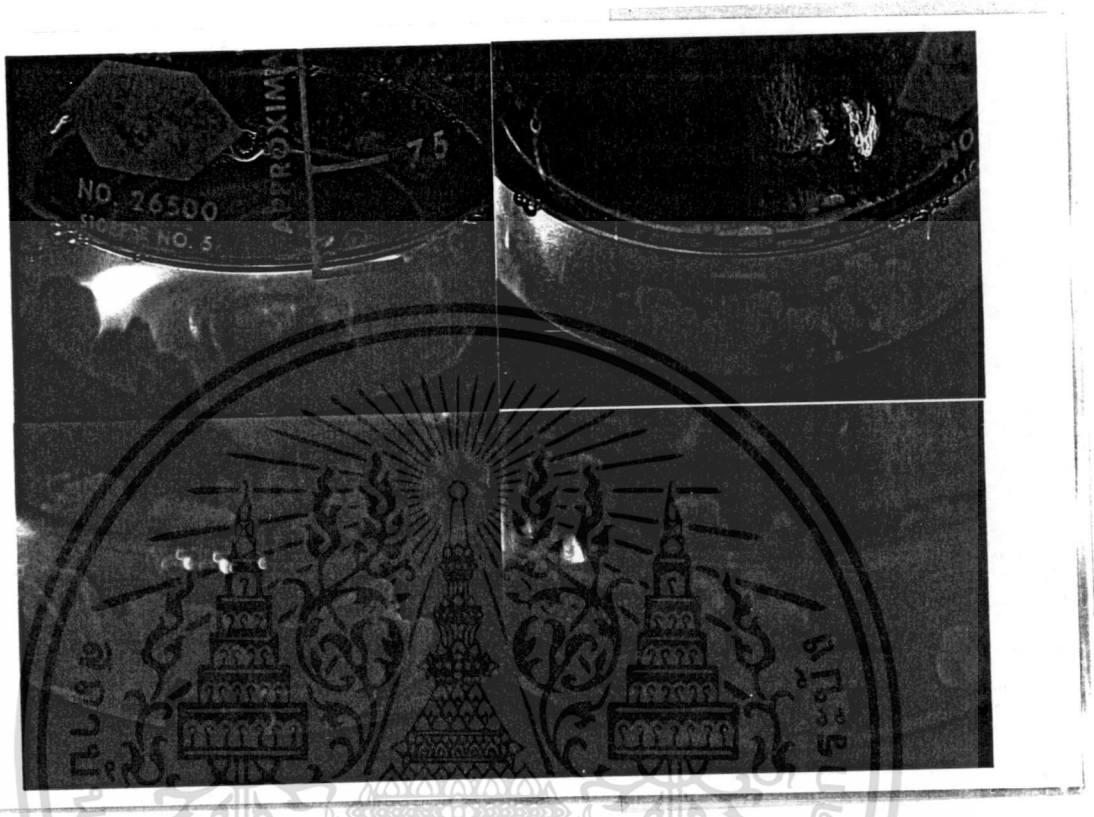
[3] ค่าเฉลี่ยจาก 9 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4.14 ผลของโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงใน อาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ก. บน : กลุ่มควบคุม ล่าง : กลุ่มทดลอง (ในที่ให้แสง)

ข. บน : กลุ่มควบคุม ล่าง : กลุ่มทดลอง (ในที่มืด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7.2 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส ดองดึงที่ทำการ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า สัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในกลุ่มควบคุมคือ ไม่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 mg/l มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.300 กรัม ส่วนในกลุ่มทดลองคือมีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 mg/l มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.406 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.226 กรัม และ 0.223 กรัม ตามลำดับ ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 นั้น พบว่า ในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.900 กรัม และกลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 1.943 กรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้ ในสัปดาห์ที่ 4 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากที่เริ่มเลี้ยง และสัปดาห์ 8 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 4 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.9 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.15 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสคองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$
0	0.226	0.223
4	0.300	0.406
8	0.900	0.943

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	0.225C [2]
4	0.353B
8	0.921A

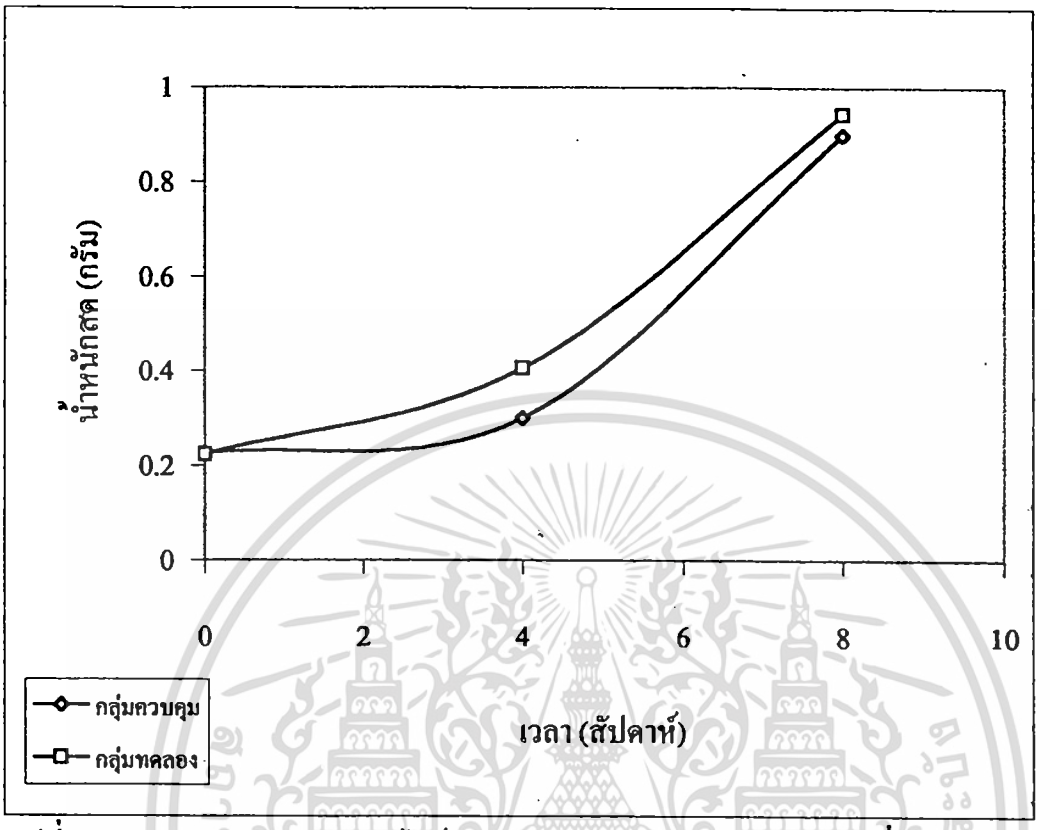
การทดลอง	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
กลุ่มควบคุม	0.475A [3]
กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$	0.524A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 6 ซ้ำ

[3] ค่าเฉลี่ยจาก 9 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ผลของโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ศึกษาผลของสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l

4.8.1 ศึกษาผลของสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมคือ ไม่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ในสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักเท่ากับ 2.620 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-1} M มีน้ำหนักเท่ากับ 0.348 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-2} M มีน้ำหนักเท่ากับ 0.242 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M มีน้ำหนักเท่ากับ 1.494 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-4} M มีน้ำหนักเท่ากับ 1.512 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-5} M มีน้ำหนักเท่ากับ 2.480 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ในทุกๆ 4 สัปดาห์ที่ทำการเพาะเลี้ยง น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้จากแคลลัสในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสารL-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-2} M มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่น้อยที่สุด รองลงมาคือ ความเข้มข้น 10^{-1} M ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M และ 10^{-4} M ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มทดลองที่มีการเติมสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-5} M และกลุ่มควบ คุม ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.10 ลักษณะการเจริญเติบโต แสดงดังรูปที่ 4.16 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

ความเข้มข้นของ L-Phenylalanine (M)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) เวลา (สัปดาห์)		
	0	4	8
0	0.226	0.990	2.620
10^{-1}	0.222	0.262	0.348
10^{-2}	0.222	0.238	0.242
10^{-3}	0.226	0.522	1.494
10^{-4}	0.226	0.742	1.512
10^{-5}	0.224	0.882	2.480

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	0.224C [2]
4	0.606B
8	1.449A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

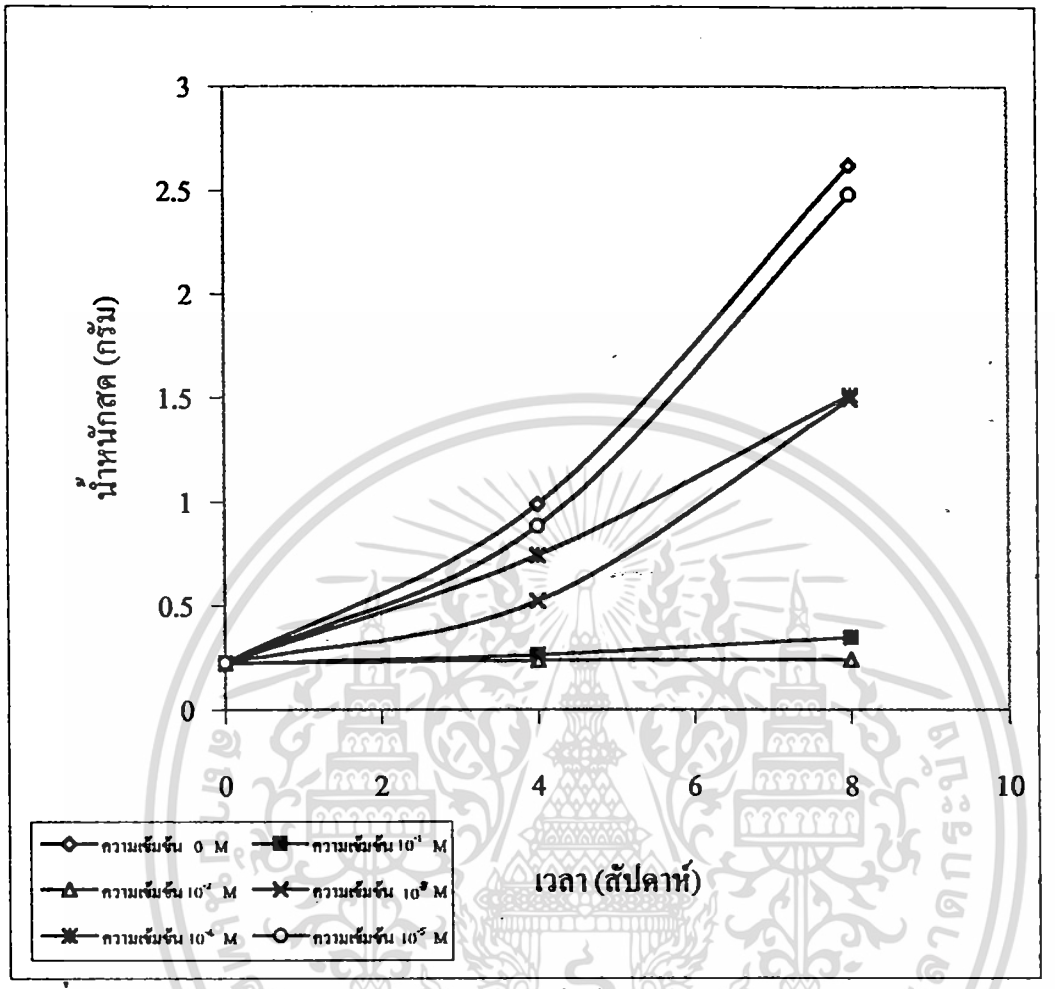
ความเข้มข้นของ L-Phenylalanine (M)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	1.278A [3]
10^{-1}	0.277C
10^{-2}	0.234C
10^{-3}	0.747B
10^{-4}	0.826B
10^{-5}	1.195A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 30 ซ้ำ

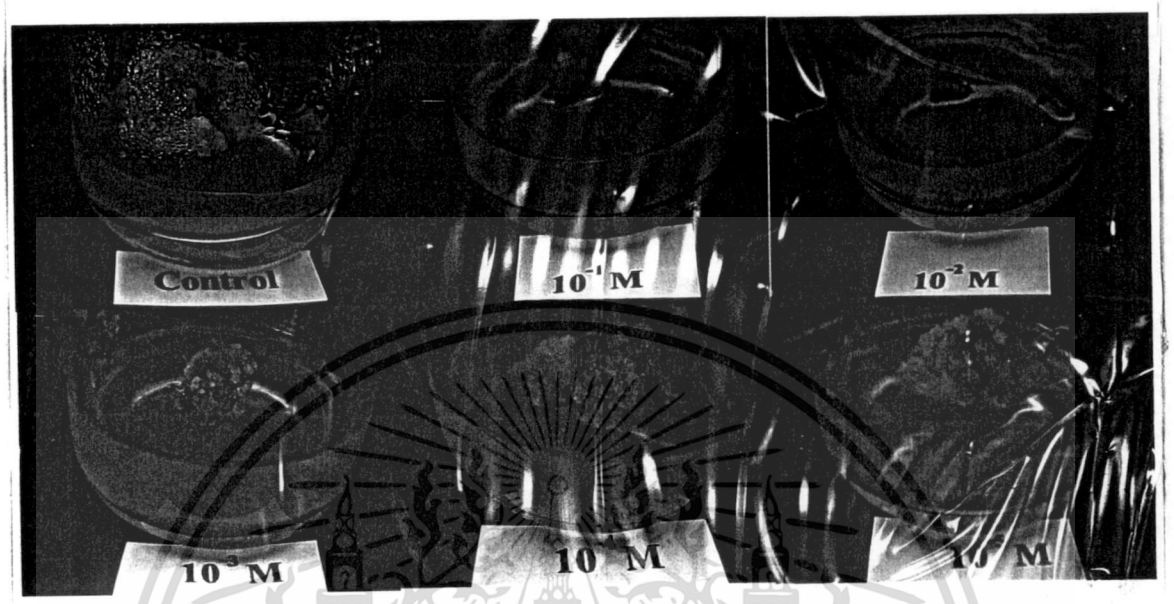
[3] ค่าเฉลี่ยจาก 15 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกัน ไม่มีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสคองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8.2 ศึกษาผลของสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมคือ ไม่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ในสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักเท่ากับ 2.454 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-1} M มีน้ำหนักเท่ากับ 0.230 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-2} M มีน้ำหนักเท่ากับ 0.282 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M มีน้ำหนักเท่ากับ 0.832 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-4} M มีน้ำหนักเท่ากับ 1.380 กรัม ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-5} M มีน้ำหนักเท่ากับ 1.526 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ในทุกๆ 4 สัปดาห์ที่ทำการเพาะเลี้ยง น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้จากแคลลัสในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-1} M มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่น้อยที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้น 10^{-2} M ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 10^{-4} M และ 10^{-5} M ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.11 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.18 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

ความเข้มข้นของ L-Phenylalanine (M)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม) เวลา (สัปดาห์)		
	0	4	8
0	0.224	0.774	2.454
10^{-1}	0.224	0.228	0.230
10^{-2}	0.222	0.226	0.282
10^{-3}	0.222	0.514	0.832
10^{-4}	0.222	0.646	1.380
10^{-5}	0.222	0.700	1.526

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	0.222C [2]
4	0.521B
8	1.117A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 (ต่อ)

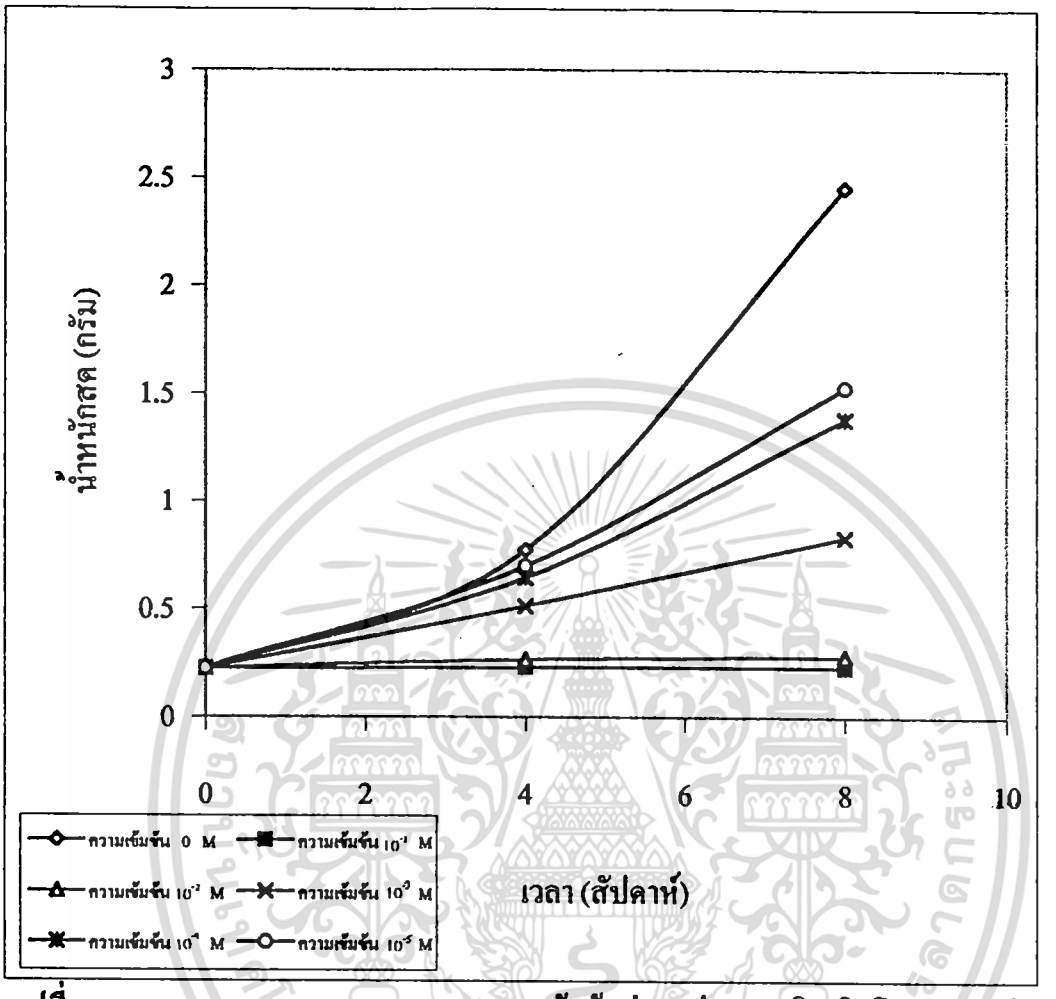
ความเข้มข้นของ L-Phenylalanine (M)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	1.151A [3]
10^{-1}	0.227D
10^{-2}	0.256D
10^{-3}	0.523C
10^{-4}	0.749B
10^{-5}	0.816B

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 30 ซ้ำ

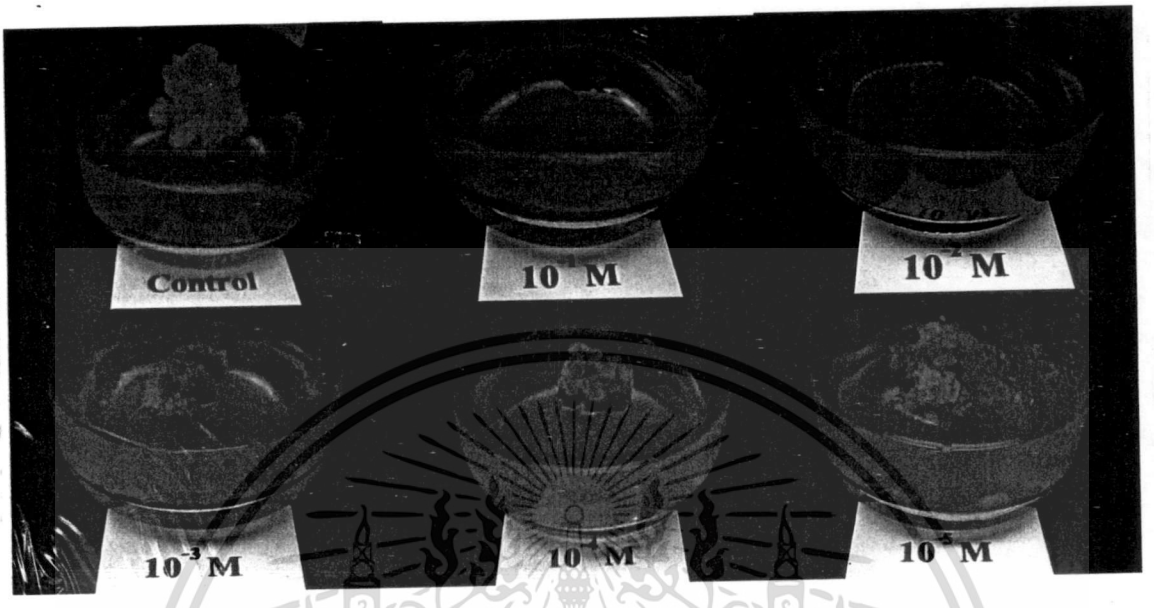
[3] ค่าเฉลี่ยจาก 15 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9 ศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญ เติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาแข็ง และเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ในสัปดาห์ที่ 2 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.384 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 0.220 กรัม ในสัปดาห์ที่ 4 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.522 กรัม ในสัปดาห์ที่ 6 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.912 กรัม และในสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.948 กรัม ตามลำดับ เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 2 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากที่เริ่มเลี้ยง น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 2 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส ที่ได้จากการเพาะ เลี้ยงในสัปดาห์ที่ 6 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 4 แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมากที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.12 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดัง รูปที่ 4.20 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.21 ส่วนน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในสัปดาห์ที่ 2 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.222 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 0.221 กรัม ในสัปดาห์ที่ 4 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.404 กรัม ในสัปดาห์ที่ 6 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.842 กรัม และในสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.916 กรัม ตามลำดับ เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 2 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากที่เริ่มเลี้ยง น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 2 น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส ที่ได้ จากการเพาะ เลี้ยงในสัปดาห์ที่ 6 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 4 แต่ไม่แตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมากที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.12 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.20 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

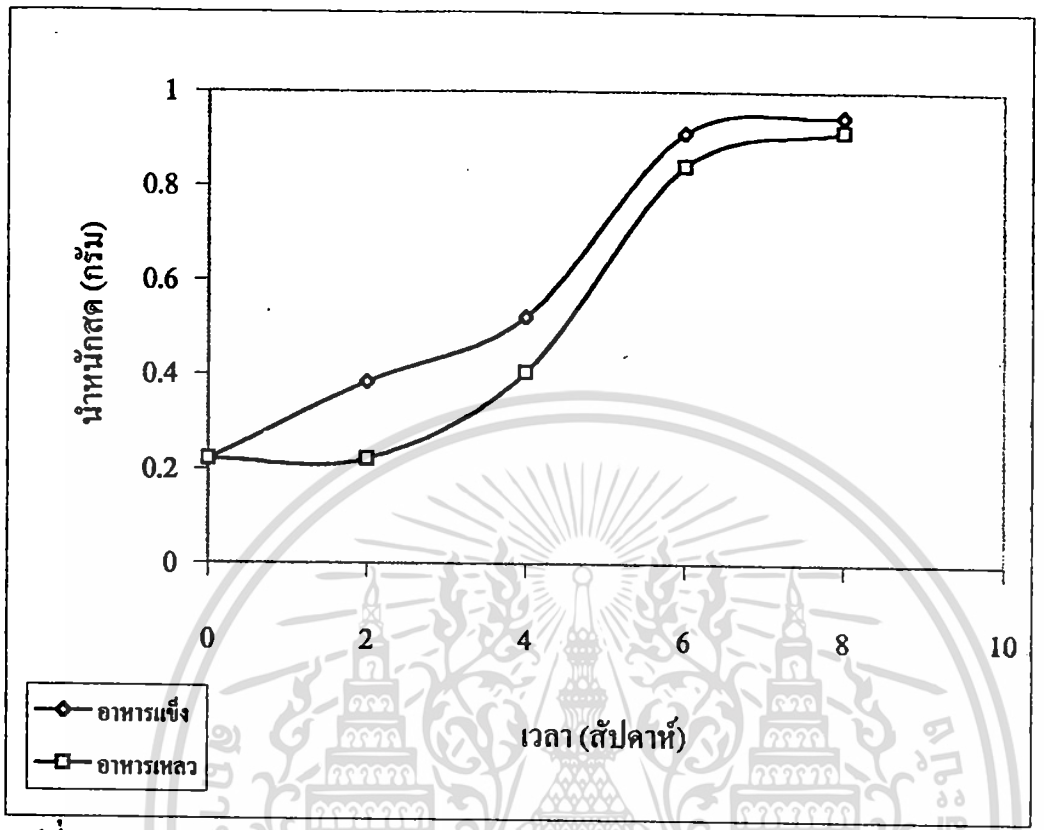
ตารางที่ 4.12 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	
	อาหารแข็ง MS	อาหารเหลว MS
0	0.220D [2]	0.221C [2]
2	0.384C	0.222C
4	0.522B	0.404B
6	0.912A	0.842A
8	0.948A	0.916A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 0.2 กรัม

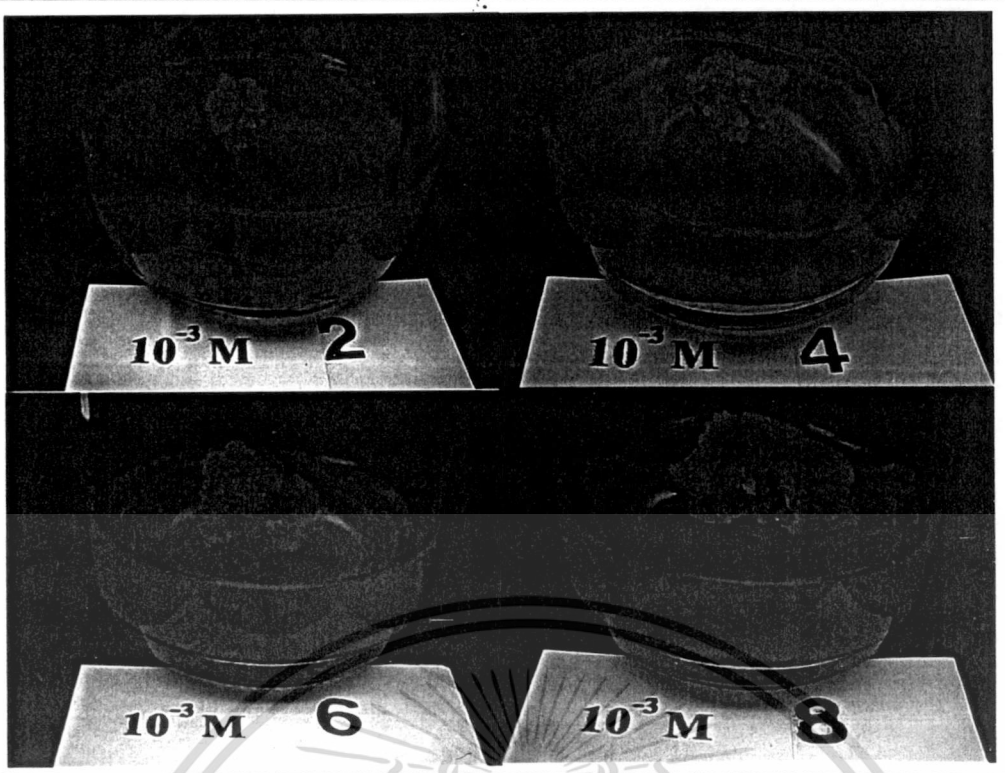
[2] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

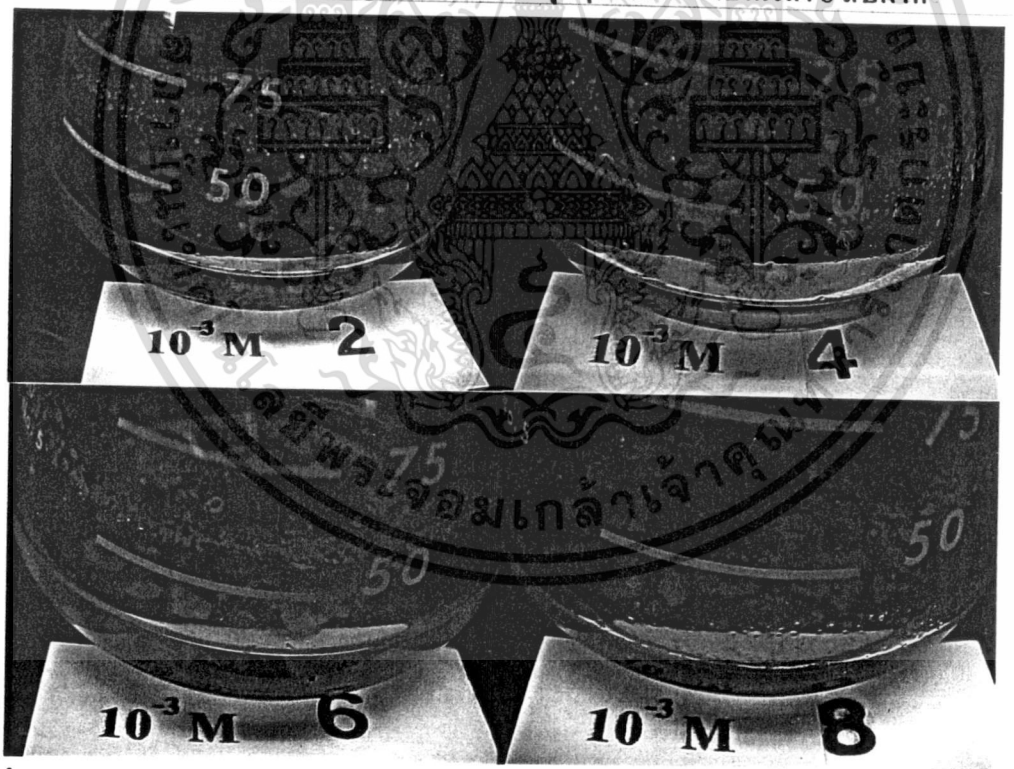


รูปที่ 4.20 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสคองคึง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.22 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

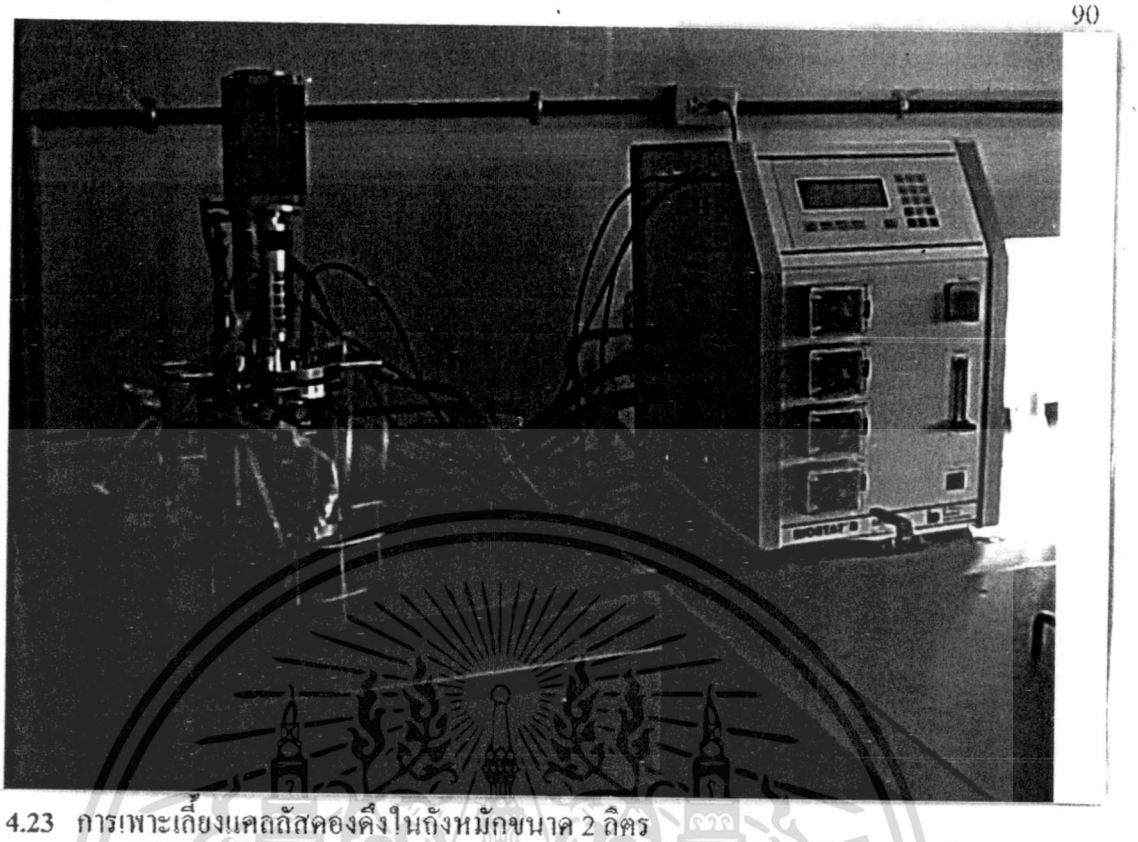
4.10 ศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต คือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ซึ่งทำในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต คือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ซึ่งทำในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตรแสดงดังรูปที่ 4.23 ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 มีน้ำหนักเท่ากับ 1.21 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 1.00 กรัม แสดงดังตารางที่ 4.13 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.24 เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS , อาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์ (flask) เขย่า และระดับถังหมัก (bioreactor) ในอาหารสูตรเดียวกัน ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหารแข็ง MS แสดงดังรูปที่ 4.25

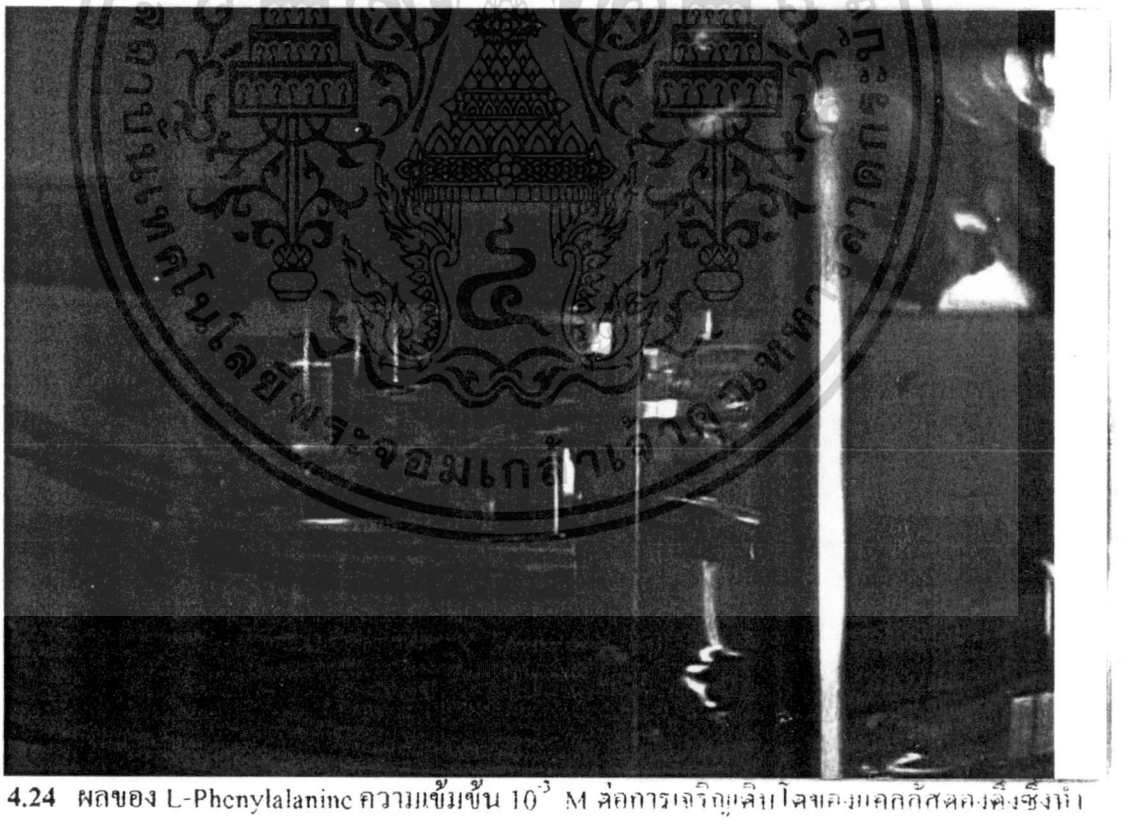
ตารางที่ 4.13 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ซึ่งทำในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์[1]

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	1.00
4	1.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

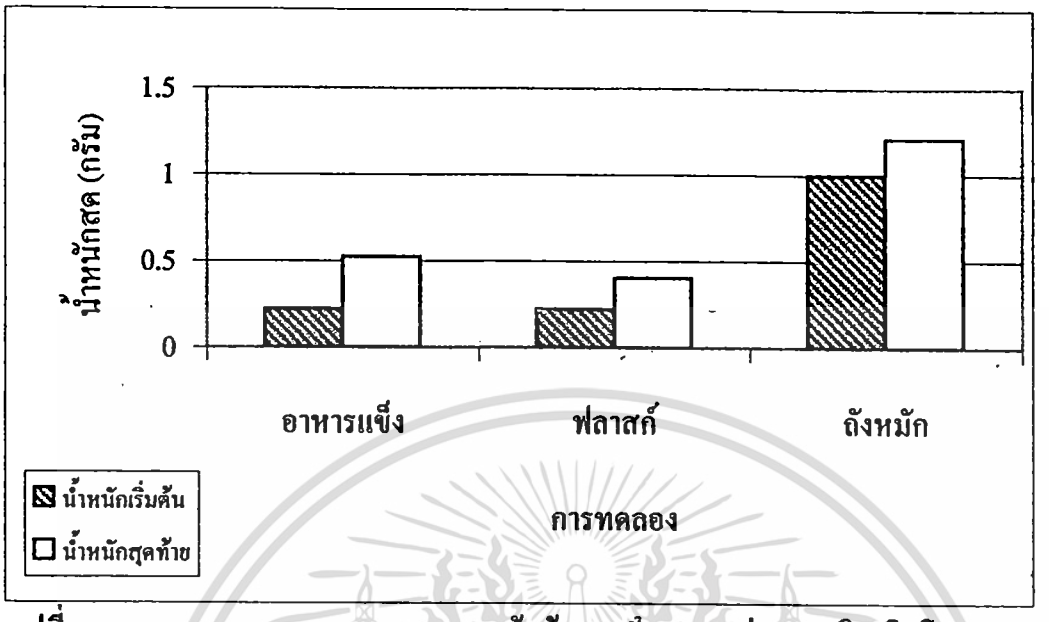


รูปที่ 4.23 การเพาะเลี้ยงแคลลัสดองดึงในถังหมักขนาด 2 ลิตร



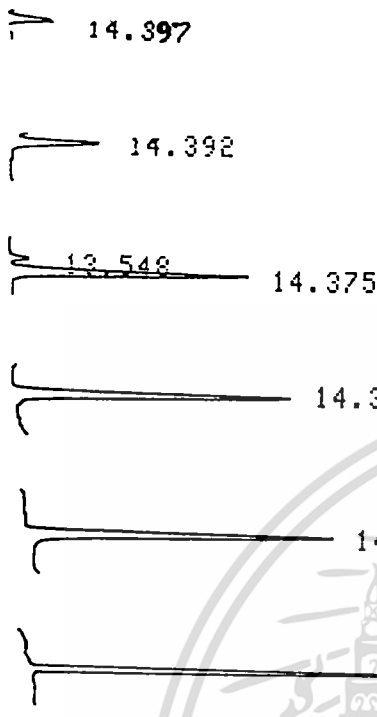
รูปที่ 4.24 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญและการสะสมโปรตีนของแคลลัสดองดึงซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในระดับถังหมัก ขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



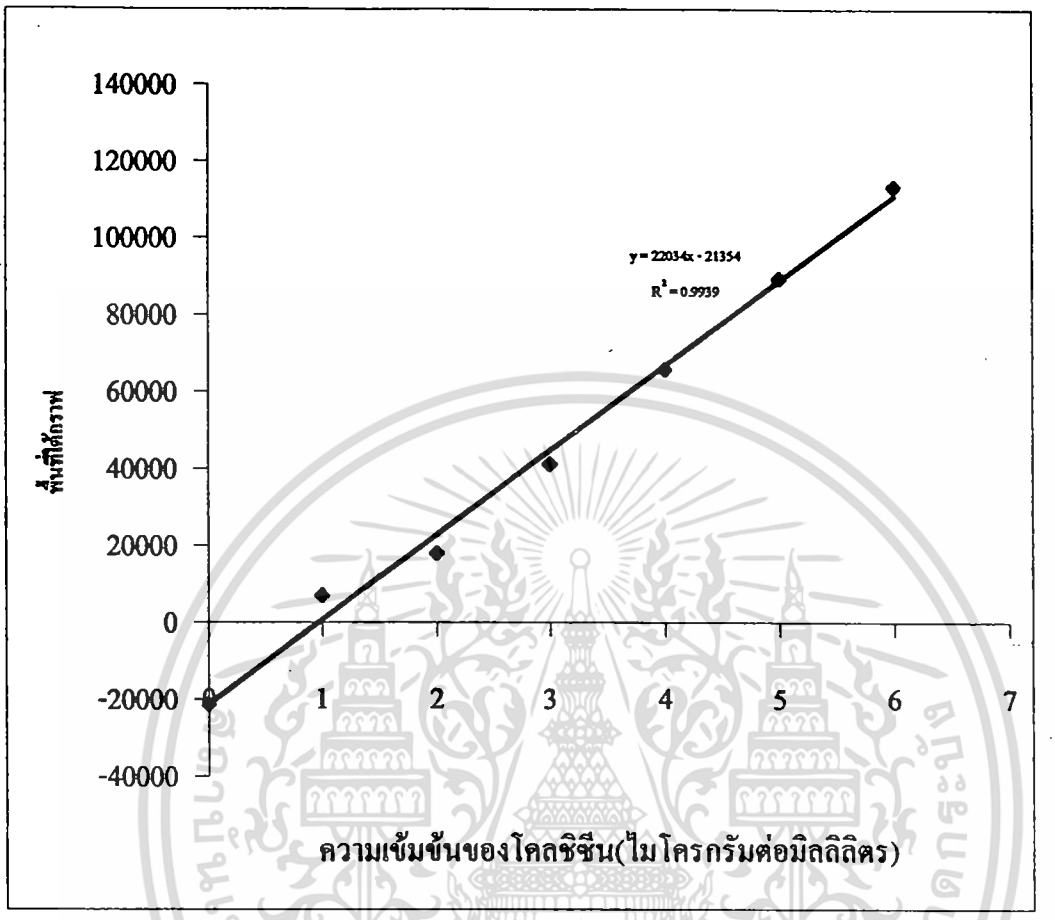
รูปที่ 4.25 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง อาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์ (flask) เขย่า และระดับถังหมัก (bioreactor) ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มีแสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.26 โครมาโทกราฟของสารมาตรฐานโคลชิซีนความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 µg/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 กราฟมาตรฐานของสารโคลชิซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.11 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสคองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสคองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมคือ ไม่เติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ที่เลี้ยงในที่มืดมีเท่ากับ 0.120 mg/g dry weight และในที่ให้แสงมีเท่ากับ 0.133 mg/g dry weight ส่วนในกลุ่มทดลองคือ มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 mg/l ที่เลี้ยงในที่มืดมีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.123 mg/g dry weight และในที่ให้แสงมีเท่ากับ 0.140 mg/g dry weight เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมทั้งที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด และที่ให้แสง แสดงดังตารางที่ 4.14 ปริมาณสารโคลชิซีนแสดงดังรูปที่ 4.28

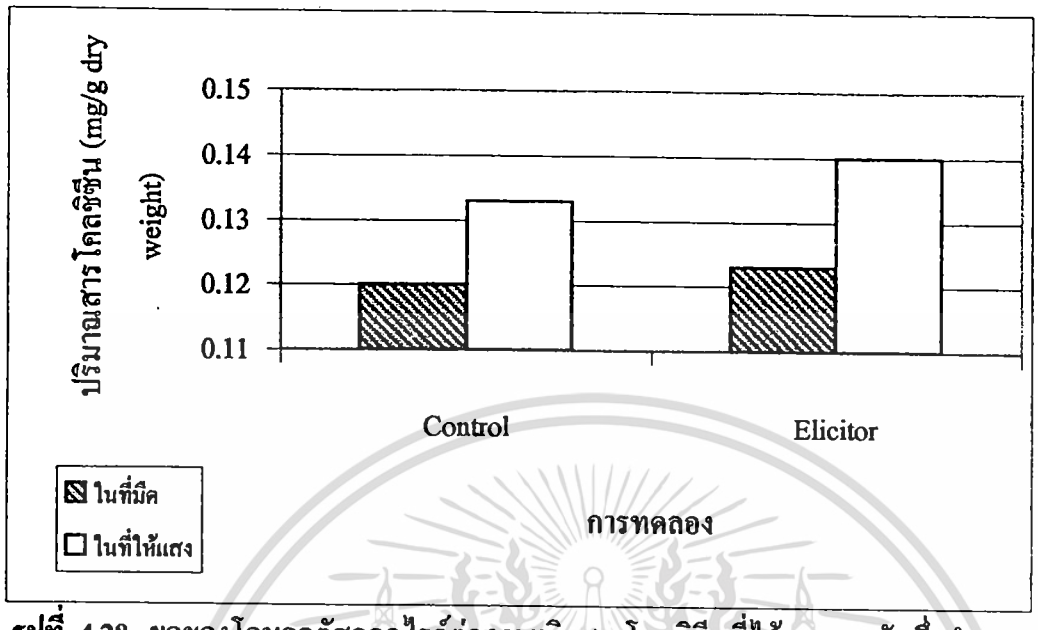
ตารางที่ 4.14 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสคองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

การทดลอง	ปริมาณสารโคลชิซีน (mg/g dry weight)	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
กลุ่มควบคุม	0.120A [2]	0.133A [2]
กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$	0.123A	0.140A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 100 ไมโครลิตร

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.28 ผลของโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.12 ศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมคือ ไม่เติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ที่เลี้ยงในที่มืดมีเท่ากับ 0.104 mg/g dry weight และในที่ให้แสงมีเท่ากับ 0.104 mg/g dry weight ส่วนในกลุ่มทดลองคือ มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 mg/l ที่เลี้ยงในที่มืดมีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.113 mg/g dry weight และในที่ให้แสงมีเท่ากับ 0.122 mg/g dry weight เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมทั้งที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด และที่ให้แสง แสดงดังตารางที่ 4.15 ปริมาณสารโคลชิซีนแสดงดังรูปที่ 4.29

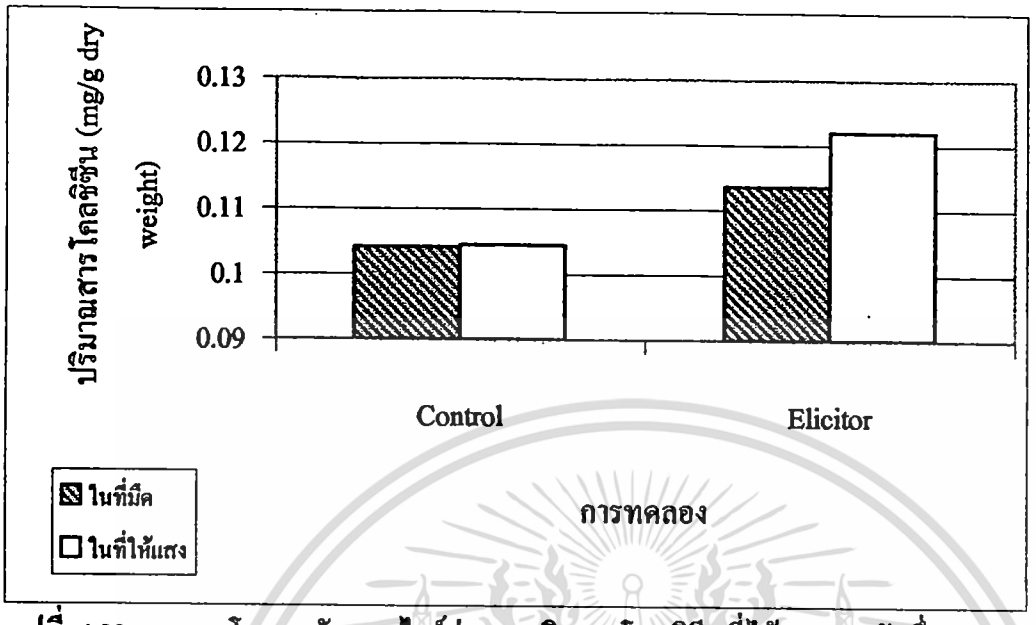
ตารางที่ 4.15 ผลของโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 mg/l ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

การทดลอง	ปริมาณสารโคลชิซีน (mg/g dry weight)	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
กลุ่มควบคุม	0.104B [2]	0.104B [2]
กลุ่มที่เติมสาร $CoCl_2 . 6H_2O$	0.113A	0.122A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 100 ไมโครลิตร

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 ผลของโคบอลต์สคลอไรด์ต่อการผลิตสารโคลชีซีนที่ได้จากแคลลัสซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.13 ศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด ในกลุ่มควบคุมคือ ไม่มีการเติมสาร L-Phenylalanine มีปริมาณสารโคลชิซีนน้อยที่สุด คือมีเท่ากับ 0.120 mg/g dry weight ส่วนในที่ให้แสงมีเท่ากับ 0.128 mg/g dry weight ในกลุ่มทดลอง พบว่า ปริมาณสารที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่ให้แสง ในกลุ่มที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M มีปริมาณสารโคลชิซีนมากที่สุด คือมีเท่ากับ 0.612 mg/g dry weight เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด ในกลุ่มควบคุมคือ ไม่มีการเติมสาร L-Phenylalanine มีปริมาณสารโคลชิซีนน้อยที่สุด รองลงมาคือ ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-2} M ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-4} M โดยที่ปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-4} M มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-5} M และ 10^{-1} M ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จาก แคลลัสในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ส่วนปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่ให้แสง ในกลุ่มควบคุมคือ ไม่มีการเติมสาร L-Phenylalanine มีปริมาณสารโคลชิซีนน้อยที่สุด รองลงมาคือ ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-5} M ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-2} M โดยที่แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-2} M แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-4} M และ 10^{-1} M ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสในกลุ่มทดลองที่มีการเติมสาร L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ปริมาณสารที่กล่าวมาแล้วเรียงตามลำดับจากน้อยไปมาก ตามลำดับ แสดงตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.30

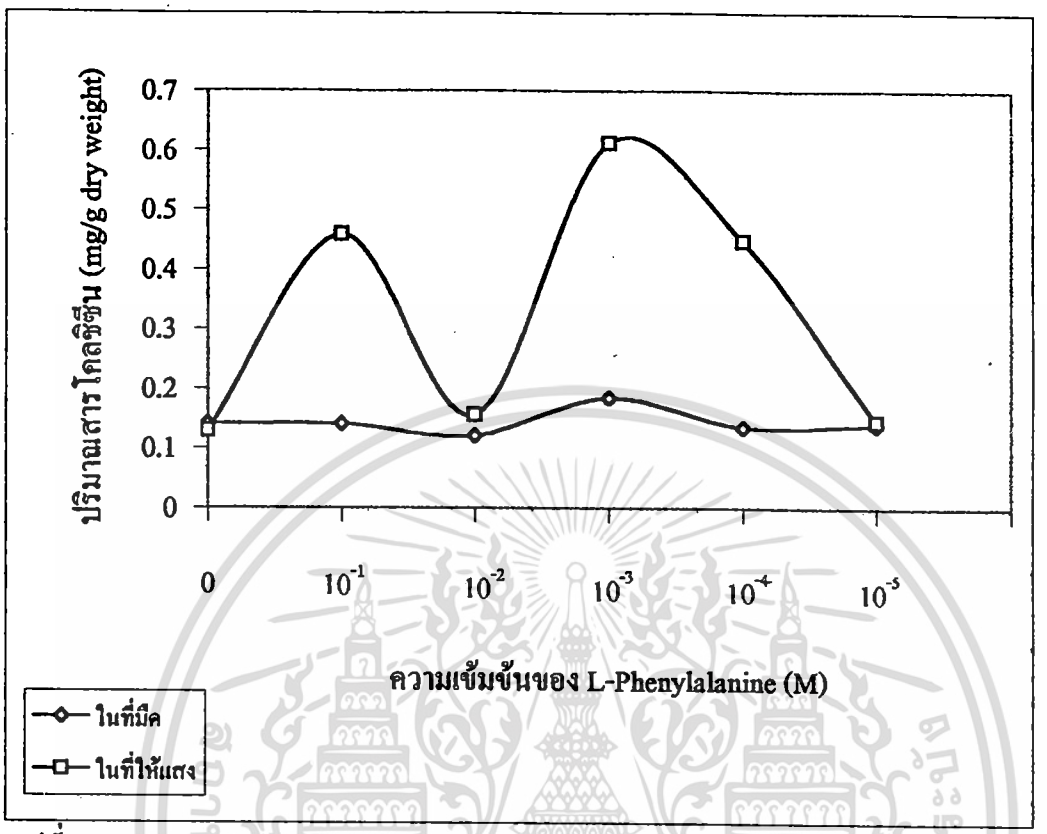
ตารางที่ 4.16 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

ความเข้มข้นของ L-Phenylalanine (M)	ปริมาณสารโคลชิซีน (mg/g dry weight)	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
0	0.120C [2]	0.128D [2]
10^{-1}	0.141B	0.459B
10^{-2}	0.121C	0.156C
10^{-3}	0.185A	0.612A
10^{-4}	0.135BC	0.448B
10^{-5}	0.140B	0.145CD

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 100 ไมโครลิตร

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.30 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่มืด และที่ให้แสงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.14 ศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรดังกล่าว ในสัปดาห์ที่ 2 มีเท่ากับ 0.124 mg/g dry weight ในสัปดาห์ที่ 4 มีเท่ากับ 0.231 mg/g dry weight ในสัปดาห์ที่ 6 มีเท่ากับ 0.272 mg/g dry weight และในสัปดาห์ที่ 8 มีเท่ากับ 0.612 mg/g dry weight ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรดังกล่าว ในทุกๆ 2 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรดังกล่าว ในสัปดาห์ที่ 2 มีเท่ากับ 0.115 mg/g dry weight ในสัปดาห์ที่ 4 มีเท่ากับ 0.125 mg/g dry weight ในสัปดาห์ที่ 6 มีเท่ากับ 0.126 mg/g dry weight และในสัปดาห์ที่ 8 มีเท่ากับ 0.14 2 mg/g dry weight ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรดังกล่าว ในสัปดาห์ที่ 2 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 8 แสดงดังตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

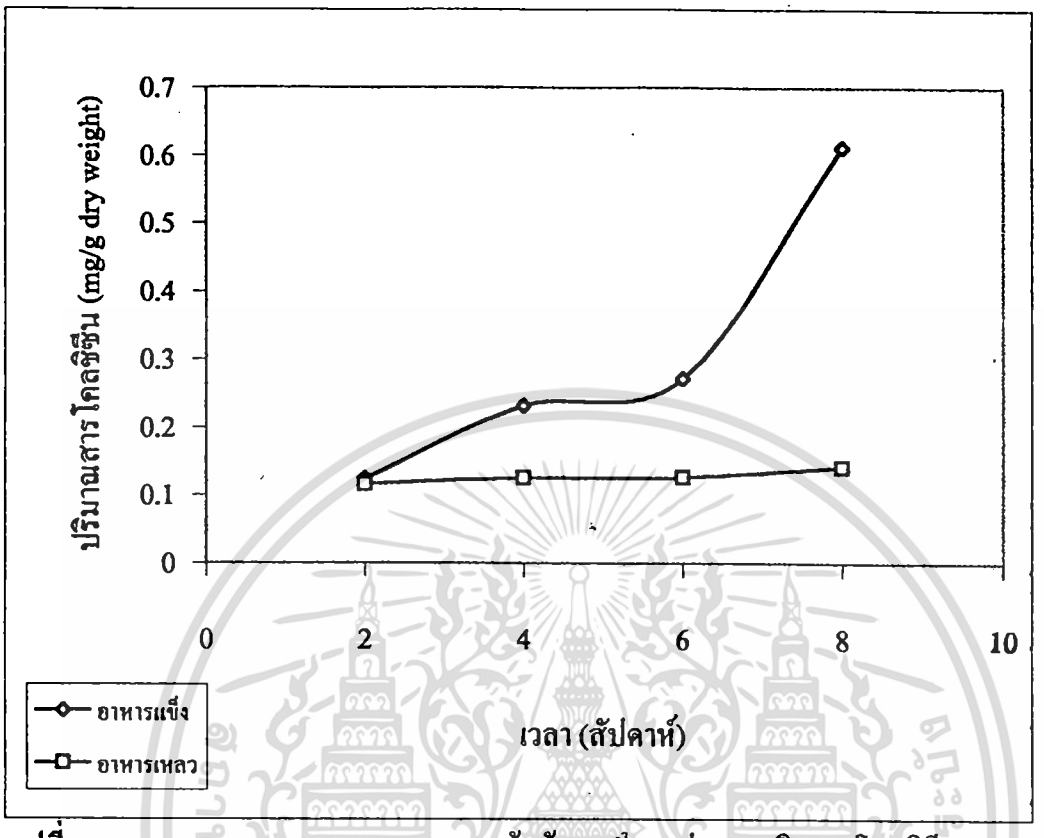
ตารางที่ 4.17 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสคองคึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสงทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

เวลา (สัปดาห์)	ปริมาณสารโคลชิซีน (mg/g dry weight)	
	อาหารแข็ง MS	อาหารเหลว MS
2	0.124D [2]	0.115C [2]
4	0.231C	0.125B
6	0.272B	0.126B
8	0.612A	0.142A

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 100 ไมโครลิตร

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.31 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเหลว MS ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.15 ศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์เขย่า และระดับถังหมัก ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์เขย่า และระดับถังหมัก ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรดังกล่าว มีปริมาณมากที่สุด คือเท่ากับ 0.231 mg/g dry weight รองลงมาคือในอาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์ (flask) เขย่า คือมีเท่ากับ 0.125 mg/g dry weight และในอาหารเหลว MS ระดับถังหมัก (bioreactor) คือมีเท่ากับ 0.117 mg/g dry weight ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัส ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์ (flask) เขย่า และในอาหารเหลว MS ระดับถังหมัก (bioreactor) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัส ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรเดียวกัน แสดงดังตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

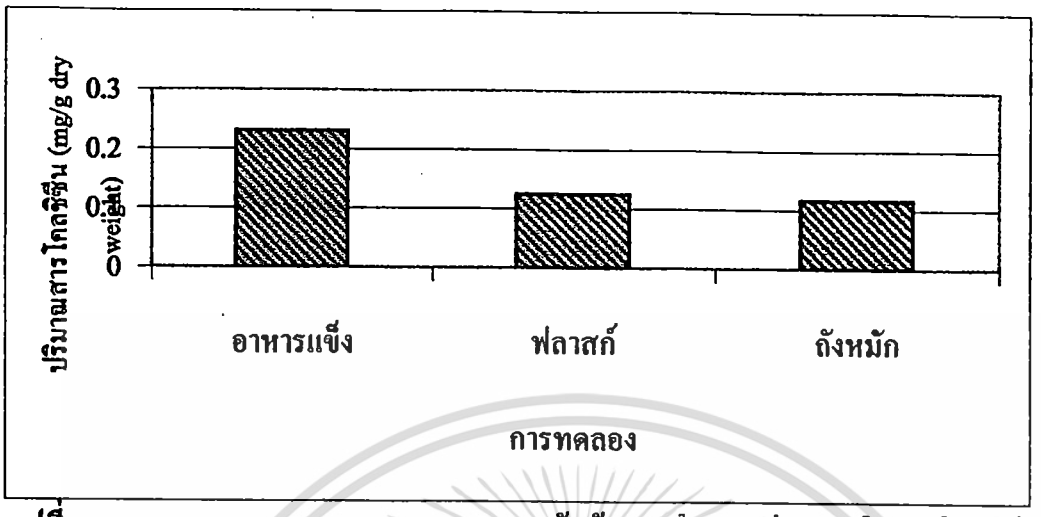
ตารางที่ 4.18 ผลของสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์เขย่า และระดับถังหมัก ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ [1]

การทดลอง	ปริมาณสารโคลชิซีน (mg/g dry weight)
อาหารแข็ง MS	0.231A
อาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์เขย่า	0.125B
อาหารเหลว MS ระดับถังหมัก	0.117B

หมายเหตุ : [1] ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละประมาณ 100 ไมโครลิตร

[2] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.32 ผลของ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง อาหารเหลว MS ระดับฟลาสก์ (flask) เขย่า และระดับถังหมัก (bioreactor) ที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 mg/l ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.16 ศึกษาปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จากตัวอย่างต่างๆ ดังต่อไปนี้

จากการศึกษาปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จากตัวอย่างต่างๆ ดังต่อไปนี้คือ เหง้าธรรมชาติ อายุ 16 สัปดาห์ มีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 4.960 mg/g dry weight รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยง อายุ 12 สัปดาห์ มีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.191 mg/g dry weight แคลลัสที่มีส่วนสีเขียว อายุ 12 สัปดาห์ มีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.199 mg/g dry weight และแคลลัสที่เปลี่ยนแปลงรูปร่าง อายุ 12 สัปดาห์ มีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.268 mg/g dry weight แสดงดังตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 ปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จากตัวอย่างต่างๆ ดังต่อไปนี้

ตัวอย่าง	อายุ (สัปดาห์)	ปริมาณสารโคลชิซีน (mg/g dry weight)
เหง้าธรรมชาติ	16	4.960
รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยง	12	0.191
แคลลัสที่มีส่วนสีเขียว	12	0.199
แคลลัสที่เปลี่ยนแปลงรูปร่าง	12	0.268

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเหง้าที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าช่วงสัปดาห์ที่ 4 เห็นการเกิดแคลลัสได้ชัดเจนที่สุดหลังจากเริ่มเลี้ยง ชั่งน้ำหนักสดได้ 1.28 กรัม จากน้ำหนักสดเริ่มต้น 0.36 กรัม แสดงว่าน้ำหนักแคลลัสที่ได้เท่ากับ 0.92 กรัม และสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นคือมีน้ำหนักสดเท่ากับ 2.21 กรัม แสดงว่าน้ำหนักแคลลัสที่ได้เท่ากับ 1.85 กรัมจากน้ำหนักสดเริ่มต้น คือเท่ากับ 0.36 กรัม และน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 0.93 กรัม แสดงว่าน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 0.93 กรัม แสดงว่า ช่วงสัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 4 และช่วงสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 8 อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสไม่แตกต่างกันมากคือช่วงสัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 4 มีน้ำหนักสดแคลลัสเท่ากับ 0.92 กรัม และช่วงสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักสดแคลลัสเท่ากับ 0.93 กรัม

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ตัดเอาเฉพาะแคลลัสไม่รวมเหง้ามาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรเดิม อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่ให้แสงความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักเริ่มเปลี่ยนแปลงเห็นชัดที่สัปดาห์ที่ 4 และน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สัปดาห์ที่ 8 จากนั้นน้ำหนักไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงในสัปดาห์ที่ 12 และสัปดาห์ที่ 16 คือน้ำหนักเริ่มคงที่ทั้งในที่มืดและที่ให้แสง แต่ในที่มืดมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากกว่าที่ให้แสง และพบว่าช่วงสัปดาห์ที่ 12 ของที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่ให้แสงเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสคือ คือแคลลัสเริ่มมีสีเหลืองเข้ม บางครั้งเริ่มมีสีเขียว หรือเกิดราก และจะเห็นการเปลี่ยนแปลงชัดเจนมากขึ้นในสัปดาห์ที่ 16

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP , NAA ร่วมกับ BAP และ IBA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารที่ 11 ของกลุ่มสูตรอาหารที่เติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ มีน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 0.67 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 0.23 กรัม ดังนั้น แสดงว่า มีน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.44 กรัม

จากการศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ (cobaltous chloride) หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่ให้แสงที่ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสเจริญได้ดีในอาหารที่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ (cobaltous chloride) หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ดีกว่าที่ไม่เติมหรือกลุ่มควบคุม และพบว่าการเลี้ยงในที่มืดมีการเจริญดีกว่าในที่ให้แสง สัปดาห์ที่ 8 แคลลัสที่เลี้ยงในที่มืดในกลุ่มควบคุม คือไม่มีการเติมโคบอลตัสคลอไรด์ มีน้ำหนักสดเท่ากับ 1.23 กรัม และที่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ มีน้ำหนักสดเท่ากับ 1.41 กรัม ส่วนในที่ให้แสง ในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเท่ากับ 1.09 กรัม และที่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ มีน้ำหนักสดเท่ากับ 1.25 กรัม

จากการศึกษาผลของโคบอลตัสคลอไรด์ (cobaltous chloride) หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทั้งในที่มืดและที่ให้แสงที่ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เป็นเช่นเดียวกันกับที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS แต่น้ำหนักน้อยกว่าถ้าเปรียบเทียบกับในอาหารแข็ง MS คือ สัปดาห์ที่ 8 แคลลัสที่ทำการเลี้ยงในที่มืดในอาหารเหลว MS ที่ไม่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ หรือกลุ่มควบคุม มีน้ำหนักสดเท่ากับ 0.95 กรัม ส่วนที่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ มีน้ำหนักสดเท่ากับ 1.02 กรัม ส่วนในที่ให้แสง กลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดเท่ากับ 0.86 กรัม และที่มีการเติมโคบอลตัสคลอไรด์ มีน้ำหนักสดเท่ากับ 0.94 กรัม

จากการศึกษาผลของสารตั้นตอคือ L-Phenylalanine ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต คือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่ให้แสงที่ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ทำการเลี้ยงในที่มืดคือ ที่ความเข้มข้น 0 M หรือกลุ่มควบคุม ในสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักสดเท่ากับ 2.62 กรัม รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 10^{-5} M มีน้ำหนักเท่ากับ 2.48 กรัม ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M มีน้ำหนักเท่ากับ 1.51 กรัม ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M มีน้ำหนักเท่ากับ 1.49 กรัม และที่ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-1} M การเจริญเติบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โตไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง คือมีน้ำหนักเท่ากับ 0.34 และ 0.23 กรัม ตามลำดับ ส่วนในที่ให้แสง พบว่า แคลลัสมีการเจริญเติบโตเช่นเดียวกันกับในที่มืด แต่ถ้าเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตในที่มืดแล้ว ในที่ให้แสงมีน้ำหนักน้อยกว่าเป็นดังนี้ โดยเรียงตามลำดับจากน้ำหนักมากไปหาน้อย ความเข้มข้น 0 Mหรือกลุ่มควบคุม ในสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนักสดเท่ากับ 2.45 กรัม รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 10^{-5} M มีน้ำหนักเท่ากับ 1.52 กรัม ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M มีน้ำหนักเท่ากับ 1.38 กรัม ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M มีน้ำหนักเท่ากับ 0.83 กรัม และที่ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-1} M การเจริญเติบโตไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง คือมีน้ำหนักเท่ากับ 0.28 และ 0.24 กรัม

จากการศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในที่ให้แสงที่ความเข้ม 1000-2000 ลักซ์ (lux) ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS มีการเจริญเติบโตดีกว่าในอาหารเหลว MS คือสัปดาห์ที่ 8 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด มีน้ำหนักเท่ากับ 0.94 กรัม และ 0.91 กรัม ตามลำดับ เมื่อดูการเจริญเติบโตทุกๆ 2 สัปดาห์ พบว่า ทั้งในอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS เป็นเช่นเดียวกันคือ สัปดาห์ที่ 2 ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงมากนัก สัปดาห์ที่ 4 เริ่มมีน้ำหนักมากขึ้นแต่ก็ไม่มากนัก และสัปดาห์ที่ 6 ถึง สัปดาห์ที่ 8 น้ำหนักมากขึ้นเห็นได้ชัดตามลำดับ

จากการศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต คือ2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที ในที่ให้แสงที่ความเข้ม 1000-2000 ลักซ์ (lux) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นไม่มากนัก คือ มีน้ำหนักเท่ากับ 1.21 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 1.00 กรัม แต่ถ้าเปรียบเทียบทั้งในอาหารแข็ง ในอาหารเหลวระดับฟลาสก์เขย่า และระดับถังหมัก ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า ในอาหารแข็งมีน้ำหนักมากกว่า ในอาหารเหลวระดับถังหมัก และระดับฟลาสก์เขย่า ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาผลของสารโคบอลตัสคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการผลิตสารโคลชิซีน ที่ได้จากแคลลัสซึ่งทำการเพาะเลี้ยงทั้งบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต คือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่ให้แสงที่ความเข้ม 1000-2000 ลักซ์ (lux) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารที่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ แคลลัสสามารถผลิตสารได้มากกว่า แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ หรือกลุ่มควบคุม และแคลลัสที่ทำการเลี้ยงในที่มีแสงสามารถผลิตสารได้มากกว่าแคลลัสที่ทำการเลี้ยงในที่มืด แต่ไม่แตกต่างกันมากนัก คือ แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ในที่มืด มีปริมาณสารมากกว่ากลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.003 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ส่วนในที่มีแสงมีปริมาณสารมากกว่ากลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.007 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมสารโคบอลตัสคลอไรด์ในที่มืด มีปริมาณสารมากกว่ากลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ส่วนในที่ให้แสงมีปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.017 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-phenylalanine ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต คือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่ให้แสงที่ความเข้มแสง 1000-2000 ลักซ์ (lux) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนมีมากที่สุดตามลำดับจากมากไปหาน้อยดังนี้ คือ ความเข้มข้น 10^{-3} , 10^{-1} , 10^{-4} , 10^{-2} , 10^{-5} และ 0 M ซึ่งที่ความเข้มข้น 10^{-3} M มีปริมาณสารโคลชิซีนมากที่สุด คือในที่มืดมีเท่ากับ 0.185 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และในที่ให้ แสงมีเท่ากับ 0.612 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาผลของสารต้นตอคือ L-phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโตคือ 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในที่ให้แสงที่ความเข้ม 1000-2000 ลักซ์ (lux) ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็งมีการผลิตสารโคลชิซีนมากกว่าที่เลี้ยงในอาหารเหลว เกือบเท่าตัว ในสัปดาห์ที่ 8 มากกว่าเห็นได้ชัดมาก คือ แคลลัสที่ทำการเลี้ยงในอาหารแข็งในสัปดาห์ที่ 2 , 4 , 6 และ 8 มีปริมาณสารโคลชิซีนดังนี้ ตามลำดับ คือ 0.124 , 0.231 , 0.272 ,และ 0.612 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ส่วนในอาหารเหลวในสัปดาห์ที่ 2 , 4 , 6 และ 8 มีปริมาณสารโคลชิซีนดังนี้ ตามลำดับ คือ 0.117 , 0.125 , 0.126 , และ 0.142 มิลลิกรัมต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาผลของสารตั้นตอคือ L-phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-3} M ต่อผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึง ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารเพื่อการเติบโต คือ2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที ในที่ให้แสงที่ความเข้ม 1000-2000 ลักซ์ (lux) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีปริมาณสารโคลชิซีนเท่า 0.117 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งน้อยกว่าในอาหารเหลวระดับฟลาสก์เขย่า ในสัปดาห์ที่ 4 คือมีเท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จากตัวอย่างต่างๆ ดังนี้คือ เหง้าธรรมชาติอายุ 16 สัปดาห์มีปริมาณสาร โคลชิซีนเท่ากับ 4.96 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอายุ 12 สัปดาห์มีปริมาณสารโคล ชิซีนเท่ากับ 0.191 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง แคลลัสที่มีสีเขียวอายุ 12 สัปดาห์มีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.199 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และแคลลัสที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอายุ 12 สัปดาห์มีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.268 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองนี้ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยกว่าเหง้าธรรมชาติมากซึ่งแคลลัสเป็นส่วนที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ ดังนั้น ควรมีการศึกษาในปริมาณมาก ซึ่งในการศึกษานี้การเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักอาจได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจนัก เนื่องจากใช้ถังหมักที่ไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช โดยส่วนมากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช มักทำในถังหมักแบบ bubble column หรือแบบ air lift เป็นต้น ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อเป็นประโยชน์ในการผลิตปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กาญจนา สานุกูล และกิ่งกาญจน์ ทวีปรีชารัตน์. 2538. ผลของ $CoCl_2$ และ $CuSO_4$ ต่อการเกิดเหง้าของเนื้อเยื่อดองดึง. โครงการพิเศษนักศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 62 หน้า.

จรินทร์ ศรีพรหมมา. 2521. พรรณไม้มีพิษบางชนิดในประเทศไทย. หน้า 14.

ชมรมธรรมชาติศึกษาไทย. 2521. ดองดึงดอกไม้ที่มากประโยชน์. ธรรมชาติศึกษาฉบับแนะนำดอกไม้ป่าของประเทศ. ส.ประสิทธิ์การพิมพ์. ฉบับประจำเดือนพฤษภาคม. หน้า 453.

ชวลิต ดาบแก้ว และสุดาวดี เหมทานนท์. 2541. พรรณไม้ในวรรณคดีไทย. โรงพิมพ์ ดี แอล เอส. หน้า 137.

ชุลีวรรณ ชุติยสันตยานนท์ , สุภางค์ ศิริกุล , ศันสนา บุญทวีกุล และอรุณี เดิมรัตนศิริกุล. 2528. การศึกษาสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคผิวหนัง. โครงการพิเศษนักศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 37 หน้า.

เต็ม สมิตินันทน์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ: หจก.ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง. หน้า 155-156.

ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์ , นันทวัน บุญยะประภัศร , พรรนิภา ชุมศรี , วันดี กฤษณพันธ์ , วีณา จิรัจฉริยากูล ,อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ และเอมอร โสมนะพันธุ์. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. 499 หน้า.

นันทวัน บุญยประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2541. สมุนไพรพื้นบ้าน. สำนักงานข้อมูลสมุนไพรและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. หน้า 2-6.

นันทิรา เมฆอรุณกมล. 2533. การเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตดองดึง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

นิจศิริ เรืองรังษี และพยอม ตันติวัฒน์. 2534. พืชสมุนไพร. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. หน้า 1-132.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 158 หน้า.

ปรีดี เอกะวิภาต. 2523. กลอริโอสา. ในชีวิตที่ต้องรดน้ำ. กรุงสยามการพิมพ์. หน้า 29.

พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. 2520. พืชพิษ. วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 4(3): 119-127.

พรพรหม พรหมเมศร์ , ชัยฤกษ์ สงวนทรัพยากร , ยิ่งยง ไพสุขสานติวัฒนา และนิรันดร์ จันทวงศ์. 2536. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของดองดึง. โปสเตอร์แสดงงานเกษตรแห่งชาติ กพ.

พรทิพา พิชา และคณะ. 2528. การทดสอบสมุนไพรเพื่อหาสารต้านมะเร็ง. การประชุมวิชาการเรื่องการพัฒนายาจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ. หน้า 129-130.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรรนิภา ชุมศรี. 2530. การขยายพันธุ์สมุนไพรโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เภสัชวินิจฉัย. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. หน้า 1-17.

พรรนิภา ชุมศรี. 2536. การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 216-224.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 118 หน้า.

มนทกานติ วัชราภัย. 2530. การใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการผลิตสาร. เอกสารประกอบการบรรยายในการประชุมเรื่อง "Cooperative Development Research Program on Improvement and Propagation of Medicinal Plants by Tissue Culture Techniques" . สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ. 43-46.

ยุพา จงสุวัฒน์. 2527. พืชสมุนไพรกับโรคมะเร็ง. วารสารศูนย์แพทย์ศาสตร์. 10(2): 59-62.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. หลักการและเทคนิค.ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์. หน้า 1-98.

ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ และถนอมจิต สุภาวิตา. 2522. ชื่อสมุนไพรและประโยชน์.แผนกวิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 5.

วราภรณ์ ฉลองกิตติศักดิ์. 2529.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาวดึงส์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 78 หน้า.

วิมล ขวัญเกื้อ. 2527. การใช้สารโคลชิซีนกับพืช. ข่าวสารเกษตรศาสตร์. 29(3) : 22-34.

สมภพ ประธานธุรารักษ์. 2539. อนุกรมวิธานพืชสมุนไพร. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 150 หน้า.

สมสุข ศรีจักรวาฬ และปราโมทย์ เกิดศรี. 2541. การพัฒนาของดอกดองดึงเมื่อปลูกในช่วงเวลาต่าง ๆ . วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 16 ฉบับที่ 1 (ม.ค.-เม.ย.). 42-48.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2525. สรีรวิทยาของพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 358.

สุนทรี สิงหบุตรา. 2535. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. บริษัทคุณ 39 จำกัด. 160 หน้า.

สุนิชา เอี่ยมน้อย , กิตติ พิทักษ์นิตินันท์ , นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และนันทวัน บุญยประภัศร. 2521. การสำรวจหาโคลชิซินในสมุนไพรไทย. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 46 หน้า.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์ , ยุพา วรยศ , และวราภรณ์ กิจวิริยะ. 2536.หลักชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. หน้า 265-284.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2522. ไม้เทศ-เมืองไทย. สรรพคุณของยาเทศและยาไทย. โรงพิมพ์กรุงธน. หน้า 226-227.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อารีรัตน์ ลออปักษา , สุรัตนา อำนวยผล และวิเชียร จงบุญประเสริฐ. 2531. การศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ (ตอนที่ 1). ไทยเภสัชสาร. 13(1): 23-36.

อรดี สหวัชรินทร์. 2522. ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทางด้านการเกษตร. วารสารพืชสวน. 14(4) : 35-43.

เอื้อพร ไชยวรรณ. 2531. ตำราเภสัชเวท. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร เล่ม 1. 115 หน้า.

อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536. การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 63.

Allison , A.J. , Butcher , D.N. , Connolly , J.D. and Overton , K.H. 1968. Paniculides , A , B and C bisabolenoid lactones from tissue cultures of *Andrographis paniculata*. *Chem. Commun.* 23 : 1493.

Backer , C.A. and Bakhuizen , R.C. 1968. Flora of Java , N.V.W.-Noordhoff , Netherland , Groningen. 3 : 761.

Bailey , L.H. 1947. The Standard Cyclopedia of Horticulture. Macmillan co. , New York. 1221 p.

Butcher , D. and Connolly , J. 1971. An investigation of factors which influence the production of abnormal terpenoids by callus cultures of *Andrographis paniculata*. *Ness. J. Exp. Bot.* 22 : 314-322.

Butcher, D.N. 1977. Secondary Products in Tissue Cultures. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. , eds. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Part 2. New York : Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 678-683.

Canonica , L. , Canieli , B. , Manitto , P. , Russo , G. and Bombardelli , E. 1967. New alkaloids from *Gloriosa superba*. *Chim.* Ind (Milan). 49 : 1304.

Chan , W.M. and Staba , E.J. 1965. Alkaloid production by Datura callus and suspension tissue cultures. *Lloydia*. 28 : 55-62.

Chaudhuri , P.K. and Thakur , R.S. 1993. 1,2-Didemethyl-colchicine : a new alkaloid from *Gloriosa superba*. *J. Nat. Prod.* 56(7) : 1174-1176.

Chopra , R.N. , Badhwar , R.L. and Ghosh , S. 1965. Poisonous Plants of India , 2 : 880-882. Indian Conncil of Agricultural Research , New Delhi.

Clewer , H.W.V. , Green , S.S. and Tutin , F. 1915. The constituents of *Gloriosa superba*. *J. Chem.* Soc (London). 107 : 835-846.

Davies , M.E. 1972. Polyphenol synthesiss in cell suspension cultures of Paul ' s Scarlet rose. *Planta*. 104 : 50-65.

Dewer , M.J.S. 1945. Structure of colchicine. *Nature*. 155 : 141-142.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dhawan, B.N.,Patnaik, G.K.,Rastogi, R.P.,Singh, K.K. and Tandon, J.S. 1977. Screening of Indian plants for Biological activity. VI. *Indian. J.Exp.Biol.* 15: 208-219.

Dobberstein , R.H. and Staba , E.J. 1969. Ipomoea , Rivea and Argyeia tissue cultures : influence of various chemical factors on indole alkaloid production and growth. *Lloydia.* 32 : 141.

Dougall , K.D. 1979. Factors affecting the yields of secondary products in plants tissue cultures. In Sharp , W.R. (ed.). Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications. Ohio State University Press. Columbus. 727-743.

Dougall , K.D. 1980. Nutrition and metabolism , pp.21-58. In Staba , J. (ed.). Plant Tissue Culture As a Source of Biochemicals. CRC Press , Inc. , Florida.

Dvorackova , S. , Sedmeera , P. , Potesilova , H. , Santavy , F. and Sîmanek , V. 1984. Alkaloids of *Gloriosa superba* L. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 49(6) : 1536-1542.

Eigsti, O.J.,Dustin, J.R. and Gay-Winn, W. 1949. On the discovery of the action of colchicine on mitosis. *Science.* 110: 692.

Eigsti , O.J. , Dustin , J.P. 1955. Colchicine In Agriculture , Medicine , Biology and Chemistry. The Lowa State College Press , Ames , Iowa. 441 p.

Engprasert, S. 1995. Isolation, Structure elucidation, Assay and Cytotoxic Property of Tropolone Alkaloids from Tubers of *Gloriosa superba* Linn. Thesis for the Degree of Master of Science (Pharmacy). Mahidol University. 187.

Engprasert, S.,Chumsri, P.,Ruchirawat, S.,Kraisintu, K. and Picha, P. 1996. Isolation, Structure elucidation, Assay and Cytotoxic Property of Tropolone Alkaloids from Tubers of *Gloriosa superba* Linn. NRCT-JSPS 3rd Joint Seminar. 19-27 Nov. Bangkok. 249.

Evan , W.C. 1939. Drugs of biological origin. English language book society. In : Pharmacognocy , 13th ed. Condon : Baillier. Tindal. 500-503.

Fell , K.R. and Doreen , R. 1967. *Colchicum* : A Review of Colchicine and the sources , Chemistry , Biogenesis and assay of chlochincine and its congeners. *Lloydia.* 30(2) : 123-140.

Finnie , J.F. and Staden , J.V. 1994. *Gloriosa superba* Linn. (Flame Lily) : Micropropagation and in vitro production of colchicine. In : Bajaj , Y.P.S. ed. Biotechnology in agriculture and forestry. 26 : Medicinal and aromatic plants VI. Berlin : Springer-Verlag : 146-166.

Furuya , T. , Kojima , H. and Syono , K. 1971. Regulation of nicotine biosynthesis by auxin In tobacco callus tissue. *Phytochemistry.* 10 : 1529.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

George, M. and Pandalai, K.M. 1949. Investigations on plant antibiotics. Part IV. Future search for antibiotic substances in Indian medicinal plants. *Indian. J. Med. Res.* 37: 169-181.

Gibson , M.R. and Abbott , E.R. 1963. The effect of proline on growth and alkaloid synthesis In *Datura stramonium* Var. *tatula. Lloydia.* 26 : 125-132.

Glavac , D. , Komhauser , A. and Ravnile-Glavac , M. 1984. Isolation and structuring of alkaloids in *Colchicum autumnale* L. of slovenian origin. *Vestn. Slov. Kem. Drus.* 31(1) : 11-21.

Grosvenor, D.K. and Grosvenor, G.M. 1966. Exquisite Climbing lily, *Gloriosa superba.* The Nation Geographic Magazine. Ceylon. 129(4): 447-497.

Hayashi, T., Sano, K. and Yoshida, K. 1988. Colchicine precursors and the formation of alkaloids in suspension cultured of *Colchicum antumnale.* Phytochem. 25(5): 1375-1378.

Heble , M.R. , Narayanaswami , S. and Chadha , M.S. 1971. 24-Methylene-Cholesterol in tissue of *Holarrhena antIdysenterIa. Z. Naturforsch.* 26 : 12.

Hooker, J.D. 1894. Flora of British India. Vol VI. Kent. England: Reeve, L. Co., Ltd.

Hrbek , JR. J. and Santavy , F. 1962. Substance from plants of the subfamily Wurmbaeoideae And their derIvatives. LI. Isolation of the alkaloids of the colchicine type from some African species of the subfamily Wurmbaeoideae. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 27 : 255.

HusseIn , F.T. and Nasra , M.A.A. 1974. A chromatographic method of assay of colchicine alkaloid. *Planta. Medica.* 25 : 396-400.

Ikeda , I. , Matsumoto , T. and Noguchi , M. 1976. Effect of nutritional factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cell in suspension culture. *Agr. Biol. Chem.* 40 : 1765.

Ikuta , A. , Syono , K. and Furuya , T. 1974. Alkaloids of callus tissues and redifferentiated Plantlets in the Papaveraceae. *Phytochemistry.* 13 : 2175-2179.

Jackson, B.D. 1895. Index Kewensis. Tomus I. Oxford: Clearendon Prees.

Jain, S.K. 1968. Medicinal Plant. Nation Book Trust. India. 50-51.

Kariyone , T. , Tominaga , S. and Kawahara , S. 1944. Crude drugs in Southern Asia. II. Components of the roots of *Gloriosa superba. J. Chem. Soc.* Japan. 64(11A) : 67.

Kaul , B. , Stohs , S.J. and Staba , E.J. 1969. Dioscorea tissue cultures. III. Influence of various factors on diosgenin production by *Dioscorea deltoidea.* Callus and suspension cultures. *Lloydia.* 32(3) : 347.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kaul , S.K. and Thakur , R.S. 1977. Chemical constituents of the flowers of *Gloriosa superba* Linn. *Proc. Nat. Acad. Sci. India. Sert. A.* 47 : 21-22.

Khanna , P. and Jain , S.C. 1972. Effect of nicotinic acid on growth and production of trigonelline by *Trigonella foenumgraecum.* L. tissue cultures. *Indian. J. Exp. Biol.* 10(3) : 248.

Khanna , P.R.B. and Jain , S.C. 1975. Effect of various hormones on production of sapogenins and sterols in *Trigonella foenum-graecum* L. suspension cultures *Indian. J. Exp. Biol.* 13 : 582-583.

Khanna , P. , Sharma , G.L. and Uddin , A. 1977. Atropine from *Atropa belladonna.* Linn. tissue culture. *Indian. J. Exp.* 15(4) : 323.

Khanna , P. and Sharma , G.L. 1977. Production of opium alkaloids from in vitro tissue culture of *Papaver rhoeas.* Linn. *Indian. J. Exp. Biol.* 15(5) : 951-952.

Kumar, L.S.S. 1952. Doubling of chromosomes induced by glorisine isolated from *Gloriosa superba. J. Sci. Ind. Res.* 11: 446.

Linsmaier , M. and Skoog , F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18 : 100-127.

Limsirichaikul , S. 1995. Comparative study of colchicine content of *Gloriosa superba* Linn. from various sources : tissue culture , abiotic elicitor treated culture and natural sources. Thesis for the degree of Master of Science (Pharmacy). Mahidol University. 187.

Maretzki , A. , Thom , M. and Nickell , L.G. 1974. Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus culture. In Street , H.E. (ed.). Tissue Culture and Plant Science. Academic. Press. London. 14.

Marshall , J.G. and Staba , E.J. 1976. Hormonal effects on diosgenin biosynthesis and growth in *Dioscorea deltoidea.* Tissue cultures. *Phytochemistry.* 15 : 53-55.

Merchant , J.R. 1976. Chemical Constituents of *Gloriosa superba* (Liliaceae). *Indian. J. Chem. Sser. B.* 14 : 908.

Misawa , M. , Tanaka , H. , Chiyo , O. and Mukai , M. 1975. Production of plasmin inhibitory Substance by *Scopolia japonica.* suspension culture. *Bioeng.* 17 : 305.

Misawa , M. 1980. Industrial and government research. In Staba , J. (ed.). Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Inc. *Florida.* 167-190.

Mizukami , H. , Konoshima , M. and Tabata , M. 1977. Effect of nutritional factors on shikonin Derivative formation in Lithospermum callus cultures. *Phytochemistry.* 16 : 1183.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Murashige , T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. *Plant. Physiol.* 25 : 135-166.

Narain, P. and Raina, S.N. 1975.Cytological assay of C-mitotic potency of colchicine obtained from *Gloriosa superba* Linn. Cytologia (Tokyo). 40(3/4): 751-757.

Neal , C.M. 1965. In Gardens of Hawaii. Bishop Museum Press , Honolulu. 924 p.

Nettleship , L. and Slaytor , M. 1974. Adaptation of *Peganum harmala.* callus to alkaloids Production. J. Exp. Bot. 25 : 1114.

Nickell , L.G. 1980. Products. In Staba , J. (ed.). Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Inc. *Florida.* 235-269.

Okazawa , Y. , Katsura , N. and Tagawa , T. 1967. Effects of auxin and cytokinin on the development and differentiation of potato tissue culture in vitro. *Physiol. Plant.* 20 : 862-869.

Parthasarathy , N. 1941. An Indian source for colchicine. *Curr. Sci.* 10 : 446.

Quisumbing , E. 1951. Medicinal Plants of the Philippines. Republic of the Philippines , Department of Agriculture and Natural Resources Technical Bulletin. 16 : 205 p.

Raffauf, R.F. 1970. A hand of alkaloid and alkaloid containing plant.

Ramawat , K.G. and Arya , H.C. 1979. Effect of some growth regulators on ephedrine production in *Ephedra gerardiana.* callus cultures. *Indian. J. Exp. Biol.* 17 : 227-228.

Sarin, Y.K.,Jamwal, P.K.,Gupta,B.K. and Atal, C.R. 1974. Colchicine from the seed of *Gloriosa superba* L. Hort. Abst. 44: 504.

Santavy , F. 1979. Colchicum alkaloids and related substances their chemistry and biology. *Acta. Univ. Olom.* 90 : 15-45.

Santavy , F. , Preiningger , V.I. , SImanek , V. and Potesilova , H. 1981. Transformation of alkaloids of the colchicine type in leaves and flowers of *Colchicum autumnale. and C. byzantinum. Planta. Med.* 2(43) : 153-160.

Seabrook , J.E.A. 1980. Laboratory culture. In Sstaba , J. (ed.). Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Inc. *Florida.* 1-20.

Seibert , M. and Kadkade , P.G. 1980. Environment factors : A. Light. In Staba , J. (ed.). Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC. Press. Inc. *Florida.* 123-136.

Skoog , F. and Miller , C.D. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Sym. Soc. Exp. Biol.* 11 : 118-131.

Staba , E.J. 1977. Tissue culture and pharmacy. In Reinert , J. and Bajaj , Y.P.S. (eds.). Plant Cell , Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag. Berlin. 694-702.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Street , H.E. 1973. Old Problems and New Perspectives. Plant Tissue and Cell Culture. University of California Press. Berkeley and Los Angeles. 422-431.

Subbaratnam , A.V. 1952. Alkaloid Constituents of *Gloriosa superba. J. Sci. Ind. Res.* 11(B) : 446-447.

Sucharit, S. and Surathin, K. 1993. The role of medicinal plants for the study of mosquito species complex. Mahidol Univ. Annual. Res. Abst. 1993. And Bibliogy. Nonformal. Public. 1993. 21: 183.

Tabata , M. , Yamamoto , H. , Hiraoka , N. and Konoshima , M. 1972. Organization and Alkaloid production in tissue cultures of *Scopolia parviflora. Phytochemistry.* 11 : 949-955.

Thakur , R.S. , Potesilova , H. and Santavy , F. 1975. Substances from plants of the subfamily Wurmbaeotideae and their derivatives. LXXIX. Alkaloids of the plant *Gloriosa superba. Planta. Med.* 28 : 201.

Thiselton-Dyer , W.T. 1898. Flora of Tropical Africa. The Oast Home , Brook , Ashford , Kent. 3 : 725 p.

Wildman , W.C. 1960. Colchicine and related compounds , pp. 247-284. In Manske , R.H.F. (ed.). The Alkaloid Chemistry and Physiology. Academic Press , New York.

Yoshida , K. , Hayashi , T. and Sano , K. 1988. Colchicine precursors and the formation of alkaloids in suspension cultured of *Colchicum autumnale. Phytochem.* 25(5) : 1375-1378.

Zenk , M. H. , El-shagi , H. and Schulte , U. 1975. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia. Planta Med.* 28 : 79-101.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

1. อาหาร MS (1962)

มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

NH_4NO_3	1,650	mg/l
KNO_3	1,900	mg/l
$CaCl_2.2H_2O$	440	mg/l
$MgSO_4.7H_2O$	370	mg/l
KH_2PO_4	170	mg/l
H_3BO_3	6.2	mg/l
$MnSO_4.4H_2O$	6.9	mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$	6.14	mg/l
KI	0.83	mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	mg/l
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	mg/l
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	mg/l
Na_2-EDTA	37.25	mg/l
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	mg/l
Glycine	2.0	mg/l
Nicotinic acid	0.5	mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5	mg/l
Thiamine-HCl	0.1	mg/l
Sucrose	30,000	mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมอาหารทำได้ดังนี้

2.1 ดูดสารละลายจาก Stock solutions ต่างๆ ที่เตรียมไว้มารวมกัน โดยใช้ปริมาตรตามที่คำนวณไว้ตามต้องการ

2.2 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาล แล้วแต่สูตรอาหารที่ใช้ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ซูโครส 30 กรัม/ลิตร

2.3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารเคมีอื่นๆ ตามความ ต้องการของสูตรอาหาร(ในการทดลองนี้ใช้ 2,4-D และ BAP ความเข้มข้น 1mg/l)

2.4 ปรับปริมาตรสารละลายอาหารให้ได้ครบตามที่ต้องการเตรียม

2.5 ปรับค่าความเป็นกรดและด่างด้วยกรดเกลือ (HCl) และ KOHให้ได้ค่าประมาณ 5.5-5.8

2.6 เติมวุ้น (กรณีอาหารกึ่งแข็ง และอาหารแข็ง) ในการทดลองนี้เติมวุ้น 8 กรัม/ลิตร กรณีเตรียมอาหารแข็ง และไม่ใส่วุ้นกรณีเตรียมอาหารเหลว

2.7 เคี่ยวอาหารเพื่อหลอมละลายวุ้นโดยใช้ Hot plate, เตาแก๊ส หรือเตาไมโครเวฟ

2.8 เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยง

2.9 นำภาชนะอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นลง

3. การเตรียมสารมาตรฐานโคลชิซีน

3.1 สารมาตรฐานโคลชิซีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml)

3.2 ดูดสารมาตรฐานโคลชิซีนจากข้อ 3.1 ด้วยไมโครปิเปตมา 100 , 200 , 300 , 400 , 500 และ 600 ไมโครลิตร (μl)

3.3 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ไมโครลิตร (μl) หรือ 1 มิลลิลิตร ด้วยเมธานอล (methanol)

3.4 ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเตรียมสารต้นตอคือ L-Phenylalanine

สารละลายความเข้มข้น 1 โมลาร์ (M) คือ สารละลาย 1 ลิตร มีสาร L-Phenylalanine 1 โมล (L-Phenylalanine 1 โมล เท่ากับ มวลโมเลกุลของ L-Phenylalanine คือเท่ากับ 165.19) ดังนั้น ในสารละลาย 1 ลิตร มีสาร L-Phenylalanine เท่ากับ 165.19 กรัม

ในการทดลองนี้ เตรียมสารต้นตอคือ L-Phenylalanine ความเข้มข้น 10^{-1} M เป็น stock solution ซึ่งทำดังนี้

0.1 โมล ชั่งสารมา 16.519 กรัม ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ในการทดลองนี้ เตรียม 100 มิลลิลิตร ดังนั้น ชั่งสารมา 1.6519 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูเท่ากับ 0.45 ไมครอน ในการทดลองนี้ใช้กระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตรท (cellulose acetrate) โดยทำการกรองในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวดวงสุรีย์ แสนสีระ เกิดเมื่อวันที่ 9 มีนาคม พ.ศ. 2518 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2541 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้