สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง

STUDY ON PRODUCTION OF COLCHICINE FROM CALLUS CULTURE OF CLIMBING LILY (*Gloriosa superba* Linn.)

ดวงสุรีย์ แสนสีระ

DUANGSUREE SANSEERA

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47709
วัน, เดือน, ปี 22 ส.ค. 2546

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-666-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON PRODUCTION OF COLCHICINE FROM CALLUS CULTURE OF CLIMBING LILY (*Gloriosa superba* Linn.)

DUANGSUREE SANSEERA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISBN 974-324-666-5

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง
นักศึกษา	นางสาวดวงสุรีย์ แสนสีระ
รหัสประจำตัว	41065201
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสของดองดึง จากผลการศึกษาพบว่าแคลลัสเจริญได้ดีในอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยให้น้ำหนักสดแคลลัส 2.766 กรัม ศึกษาผลของแอลฟีนิลอะลานีนและโคบอลตคลอไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีน พบว่าผลิตสารโคลชิซีนได้สูงที่สุด 0.612 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง MS ที่เหมาะสม โดยมีการเติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ในสภาวะให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะเดียวกันผลิตสารโคลชิซีนได้ 0.142 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เหมาะสม ที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า แคลลัสผลิตสารโคลชิซีนได้ 0.117 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในสัปดาห์ที่ 4 ของการเลี้ยง ในสภาวะให้แสง ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Study on Production of Colchicine from Callus Culture of Climbing Lily (*Gloriosa superba* Linn.)
Student	Miss Duangsuree Sanseera
Student ID	41065201
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Nuanphan Naranong

ABSTRACT

In this study, the optimal medium for growth and production of colchicine from callus culture of climbing lily (*Gloriosa superba* Linn.) was investigated. It was found that the callus grew well in MS solid medium supplemented with 1 mg/l of 2,4-D and 1 mg/l of BAP in the dark for 8 weeks. The fresh weight of the callus was 2.766 g. The effects of L-Phenylalanine and cobalt chloride for production of colchicine from callus culture were also studied. From the results, the highest of colchicine production was 0.612 mg/g dry weight when the callus was grown on the optimized MS solid medium containing L-Phenylalanine at the concentration of 10^{-3} M in the light for 8 weeks. Only 0.142 mg/g dry weight of colchicine was obtained when it was grown on the optimized liquid medium at the same conditions. Moreover, the production of colchicine from callus culture using the optimized MS liquid medium containing 10^{-3} M L-Phenylalanine in 2-l bioreactor was also investigated. The callus produced 0.117 mg/g dry weight of colchicine at 4 weeks of cultivation in the light with aeration rate of 0.5 vvm and agitation rate of 100 rpm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นวรัตน์ ปานแย้ม ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ภัญชนา มีแก้วกุญชร กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วีนา ชูโชติ กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชาที่กรุณาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการในการสอบ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้ง เพื่อนๆ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้อง ที่ให้กำลังใจ ช่วยเหลือสนับสนุน ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์

ดวงสุรีย์ แสนสีระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญรูป.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 ดองดึง.....3

2.1.1 แหล่งที่พบ.....4

2.1.2 ประโยชน์ของดองดึง.....4

2.1.3 สารเคมีที่พบ.....5

2.2 โคลชิซีน.....7

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....11

2.4 การสกัดอัลคาลอยด์.....18

2.5 การตรวจสอบสารสกัดจากพืช.....19

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....21

3.1 การศึกษาผลของฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ต่อการเจริญเป็นแคลลัสของเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS.....24

3.2 การศึกษาผลของสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและให้แสงต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP.....24

3.3 การศึกษาผลของฮอร์โมนต่อการเจริญของแคลลัสดองดึงในอาหารเหลว MS.....25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.1 การศึกษาผลของฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS.....25
3.3.2 การศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS.....27
3.3.3 การศึกษาผลของฮอร์โมน IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS.....28
3.4 การศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน (L-Phenylalanine) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP.....29
3.5 การศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ (M) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP.....29
3.6 การศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ (cobalt chloride หรือ $CoCl_2.6H_2O$) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP.....30
3.7 การศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....30
3.8 การวิเคราะห์.....31

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....33

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม.....83

ภาคผนวก.....92

ประวัติผู้เขียน.....97

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.8 ผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง.....61

4.9 ผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง.....61

4.10 ผลของโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร.....69

4.11 ผลของโคบอลคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร.....69

4.12 ผลของโคบอลคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร.....73

4.13 ผลของโคบอลคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร.....73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของโคลชิซีน....8

2.2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของเบต้าลูมิโคลชิซีน....9

2.3 ขบวนการชีวสังเคราะห์ของสารโคลชิซีน....10

2.4 แสดงส่วนประกอบของ HPLC....20

4.1 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด....34

4.2 ลักษณะต่างๆ ของเหง้าดองดึง....35

4.3 เนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด....37

4.4 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง....40

4.5 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง....40

4.6 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด....43

4.7 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด....43

4.8 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด....46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.9 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด....48

4.10 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด....54

4.11 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด....55

4.12 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง....56

4.13 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง....57

4.14 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง....58

4.15 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหเลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง....62

4.16 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง....63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.17 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง.....63

4.18 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง.....64

4.19 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด.....70

4.20 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง.....70

4.21 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง.....71

4.22 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง.....72

4.23 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร.....74

4.24 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง.....74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.25 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง.....75

4.26 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง.....76

4.27 การเพาะเลี้ยงแคลลัสดองดึงในอาหารเหลว MS ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....78

4.28 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง.....78

4.29 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง.....79

4.30 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง.....79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

ดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) เป็นพืชในสกุล Gloriosa เป็นไม้ล้มลุกเลื้อยจัดว่าเป็นพืชสมุนไพรที่ลำต้นใต้ดิน (rhizome) หรือเหง้า มีสารอัลคาลอยด์โคลชิซีน ซึ่งนำมาใช้ทางด้านแพทย์ การเกษตร และด้านอื่นๆ อีกมากมาย (จรินทร์ , 2521) ทางการแพทย์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งบางชนิดในคน (ยุพา , 2527) โรคไขข้ออักเสบ (เสงี่ยม , 2522) ลดไข้ (Dhawan *et al.* , 1977) ทางการเกษตรใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (Narain and Raina , 1975) ทำให้โครโมโซมเกิดการเพิ่มเป็น 2 เท่า (double chromosome) ในพืช (Kumar , 1952 ; Sucharit and Surathin , 1993) หรือเกิดโพลีพลอยด์ (polyploid) (Eigsti *et al.* , 1949)

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

ปัจจุบันมีรายงานต่างๆ ที่พบว่า นักวิทยาศาสตร์สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรได้สำเร็จหลายชนิด เนื้อเยื่อเหล่านี้สามารถผลิตสารที่ใช้ในการบำบัดรักษาวินิจฉัยโรค หรือเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารที่ใช้เป็นยานอกจากนี้ ยังมีสารที่ใช้ผสมหรือปรุงแต่งกลิ่นรส และสีของยา (Butcher , 1977)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง และศึกษาผลของสารต้นตอ (precursor) คือแอลฟีนิลอะลานีน (L-Phenylalanine) และสารกระตุ้นอชีวภาพคือโคบอลคลอไรด์ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง เพื่อเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว

1.2.2 เพื่อศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว

1.2.3 เพื่อศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับถังหมัก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้ขั้นแรกนำเหง้าดองดึงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส แล้วนำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิม แต่มีการเติมสารต้นตอคือแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} โมลาร์ (M) และสารกระตุ้นอชีวภาพคือโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาการผลิตสารโคลชิซีน โดยนำแคลลัสที่ได้มาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้ด้วย 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 มีชื่ออื่นว่าก้ามปู คมขวาน ดาวดึงส์ บ้องขวาน พันมหา มะขาโก้ง ว่านก้ามปู หมอยหีย่า และหัวขวาน (นันทวัน และอรนุช , 2541) โดยทางวิทยาศาสตร์จัดจำแนก (classification) (สุพจน์ และคณะ , 2536 ; สมภพ , 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 ปลายใบเรียวแหลมยืดยาวออก ทำหน้าที่เป็นมือเกาะ ดอกมีขนาดใหญ่ เป็นดอกเดี่ยว ออกที่ซอกใบ ใกล้ปลายเถา 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* 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 แถบชายทะเลทางภาคใต้ และภาคตะวันออก พบปะปรายทางสระบุรี เชียงใหม่ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เสงี่ยม, 2522 ; เต็ม, 2523 ; สุนทรี, 2535)

2.1.2 ประโยชน์ของดองดึง

ดองดึงจัดว่าเป็นพืชสมุนไพรที่มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในทางการแพทย์ และทางการเกษตรมากขึ้น เนื่องจากลำต้นใต้ดินหรือเหง้ามีสารอัลคาลอยด์ลูมิโคลชิซีน (lumicolchicine) รากมีสารซูเปอร์บิน (superbine) ใบและเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) มีสารโคลชิซีน (colchicine) (จรินทร์, 2521) ในทำนองเดียวกันได้มีผู้รายงานว่าในดองดึงมีอัลคาลอยด์หลายชนิด(นิจศิริ และพยอม, 2534) แต่ที่พบมากและมีปริมาณสูงกว่าอัลคาลอยด์ชนิดอื่นคือโคลชิซีน (Sarin *et al.* ,1974) ซึ่งทางการแพทย์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งบางชนิดในคน (ยุพา, 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) ในทางตรงกันข้ามสารโคลชิซีนจัดว่าเป็นสารพิษชนิดหนึ่ง ซึ่งมีผู้รายงานว่าสารนี้ถ้ารับประทานเข้าไปมากจะทำให้หมดสติ การหายใจติดขัด และทำให้ถึงตายได้ (พเยาว์, 2520) และยังเป็นพิษต่อเซลล์ (พรทิพา และคณะ, 2528 ; Engprasert *et. al.*, 1996) ทางด้านการเกษตรใช้ดองดึงในการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (Narain and Raina, 1975) ทำให้โครโมโซมเกิดการเพิ่มเป็นสองเท่า (double chromosome) ในพืช (วิมล, 2527 ; Eigsti and Dustin, 1955 ; Kumar, 1952 ; Sucharit and Surathin, 1993) หรือเกิดโพลีพลอยด์ (Eigsti *et al.* ,1949) ทำให้พืชมีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์เดิม ซึ่งโดยทั่วไปจะทำให้ได้ต้นพืชที่ให้ผลผลิตสูงและคุณภาพของผลผลิตดีขึ้นอีกด้วย (ปรีดี, 2523 ; ลัดดาวัลย์ และถนอมจิต, 2522) นอกจากนี้ยังใช้ดองดึงในการปราบแมลงศัตรูพืชได้อีกด้วย ส่วนทางด้านปศุสัตว์ใช้เหง้าดองดึงในการถ่ายพยาธิในสัตว์เลี้ยง เช่น วัว และควาย เป็นต้น (Grosvenor and Grosvenor, 1966 ; Jain, 1968 ; ชมรมธรรมชาติศึกษาไทย,2521) นอกจากนี้ยังมีผู้สนใจที่จะนำมาปลูกเป็นไม้ประดับและตัดดอกขาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกด้วยปัจจุบันร้านจัดดอกไม้ได้สั่งดองดึงจากต่างประเทศ เพื่อใช้จัดกระเช้าร่วมกับดอกไม้ชนิดอื่นๆ มากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ดองดึงมีแนวโน้มเป็นไม้ตัดดอกหรือไม้กระถางที่มีอนาคตไกลไม่แพ้ดอกไม้อื่น (สมสุข และปราโมทย์, 2541) และมีรายงานการสกัดดองดึงด้วยแอลกอฮอล์ เพทอีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม มีค่า ED_{50} ต่ำกว่า 1 ไมโครกรัม ตามกฎเกณฑ์บอกว่า ED_{50} ต่ำกว่า 5 ไมโครกรัม จึงจะดี (ED_{50} หมายถึงความเข้มข้นของสารที่ฆ่าเซลล์มะเร็งได้เป็นครึ่งหนึ่งของกลุ่มควบคุม) (Engprasert, 1995) จากประโยชน์ของดองดึงหลายๆ ด้านดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมุ่งทำการศึกษาการผลิตสารโคลชิซีนจากดองดึงโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2.1.3 สารเคมีที่พบ

สารเคมีที่แยกได้จากพืชนั้น นักวิทยาศาสตร์ได้จำแนกออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

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

สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เป็นสารที่พบได้ไม่เหมือนกันในพืชแต่ละชนิด ไม่พบทั่วไป และไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอน เช่น อัลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ แทนนิน เป็นต้น

พวกสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) จะมีสารเริ่มต้นเป็นกรดอะมิโน อะซิเทต (acetate) เมวาโลเนต (mevalonate) ฯลฯ โดยมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งพืชต่างชนิดกันจะมีเอนไซม์ที่ไม่เหมือนกัน ทำให้วิถีทางในกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ต่างกันไป และได้สารประเภทสารทุติยภูมิต่างกันไป เช่นต้นไม้ต่างชนิดกัน หรือต่างฤดูกัน สาเหตุที่แท้จริงในการสร้างสารทุติยภูมิในพืชยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่า อาจเกิดจากการพยายามปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป

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

คุณสมบัติของอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ชนิดต่างๆ มีฤทธิ์เป็นด่าง และมักมีฤทธิ์ต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย

หน้าที่ของอัลคาลอยด์ในพืชยังไม่มีคำตอบที่แน่นอน แต่นักวิทยาศาสตร์ก็ได้ให้ข้อสังเกตที่น่าเชื่อถือได้ว่าอาจมีหน้าที่ดังนี้

(1) เป็นสารที่มีพิษ ป้องกันมิให้แมลง หรือสัตว์มารบกวน หรือทำลาย

(2) เป็นผลที่ได้จากกระบวนการทำลายพิษ (detoxification) ของสารที่เป็นอันตรายต่อพืช

(3) เป็นตัวช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (growth regulator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(4) เป็นตัวเก็บสะสมแร่ธาตุ สามารถจะสลายตัวให้ธาตุไนโตรเจน และธาตุอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของพืช

(5) เป็นของเสียที่ได้จากการขับถ่ายของเสียของไนโตรเจน (nitrogen excretory product) เช่นเดียวกับยูเรีย และยูริค

(6) ช่วยรักษาดุลของไอออน (maintain ionic balance)

อัลคาลอยด์อาจพบในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด (หมาก) ผล (พริกไทย) ใบ (ลำโพง) เปลือก (ซิงโคน่า) เหง้า (ดองดึง) ราก (ระย่อม) และยังพบได้ในราที่ขึ้นบนพืช (ergot) เป็นต้น (นิจศิริ และพยอม, 2534)

สารอัลคาลอยด์ที่พบ

การสำรวจและสกัดสารจากส่วนต่างๆ 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) เมล็ด (Thakur *et al.* , 1975) ดอก (Kaul and Thakur , 1977 ; Thakur *et al.* , 1975) ใบ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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- 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 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง และจากเมล็ดประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง ในสมัยโบราณชาวยุโรปได้นำสาร colchicine จากต้นไม้ชนิดนี้มารักษาโรคเก๊าท์ได้

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

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

Wildman (1960) ได้สกัดสารโคลชิซีนจาก *Gloriosa superba* โดยนำเหง้ามาจากแหล่งที่ต่างกันเขาพบว่า เหง้าจากเชคโกสโลวาเกียให้ปริมาณสาร 0.23 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าเหง้าจากประเทศอินเดียที่ให้ปริมาณสารเพียง 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง เท่านั้น เขาสรุปได้ว่าสิ่งแวดล้อมต่างๆ และฤดูกาลเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารโคลชิซีนซึ่งพบใน *Gloriosa superba* ที่นำมาจากอินเดียและอัฟริกา ซึ่งเก็บในช่วงเวลาที่ต่างกัน เขาพบว่าปริมาณและความเข้มข้นของสารที่พบแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

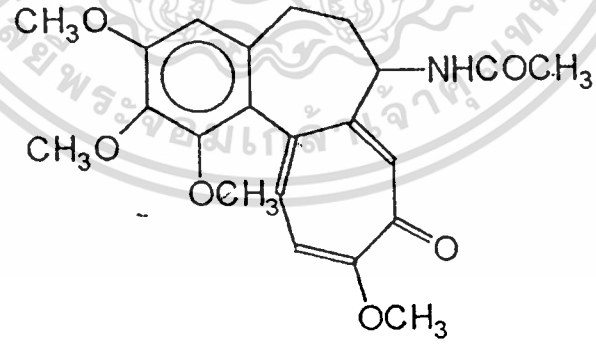
ในธรรมชาติพบว่า โคลชิซีนมักเกิดร่วมกับโคลชิซิอีน (colchiceine) และอัลคาลอยด์อื่นๆ ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (Hussein and Nasra , 1974) นอกจากนี้ในเหง้าของ *Gloriosa rothchildiana* และ *Gloriosa simplex* พบว่า มีสารโคลชิซีนเช่นเดียวกัน (Eigsti and Dustin , 1955)

สุนิชา และคณะ (2521) ได้ศึกษาโคลชิซีนในสมุนไพรไทยซึ่งอยู่ในวงศ์ Liliaceae พบว่า *Gloriosa superba* มีปริมาณสารมากที่สุดในฝักและเมล็ด เหง้ามีปริมาณรองลงมา ในใบและลำต้นมีน้อย ส่วนในพืชสมุนไพรชนิดอื่นไม่พบว่ามีโคลชิซีน

Engprasert (1995) ได้สกัดแยกสารสำคัญจากเหง้าดองดึง โดยวิธีการหมักด้วยเมทานอล (methanol) และตามด้วยการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ด้วยอลูมินั่มออกไซด์ (aluminum oxide) พบสารประกอบโทรโปโลนอัลคาลอยด์ 3 ชนิดคือ β-lumicolchicine 3-demethyl- colchicine 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 ชนิดที่มีลักษณะเหง้าอ้วน แบน และผิวเรียบ มีปริมาณสารมากกว่าชนิดที่มีลักษณะเหง้าอ้วน แบน ผิวขรุขระ และเหง้าผอม กลม ผิวเรียบ

สมบัติทางเคมีของโคลชิซีน

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



รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของโคลชิซีน

ที่มา : Dewar , 1945 ; Eigsti and Dustin , 1955

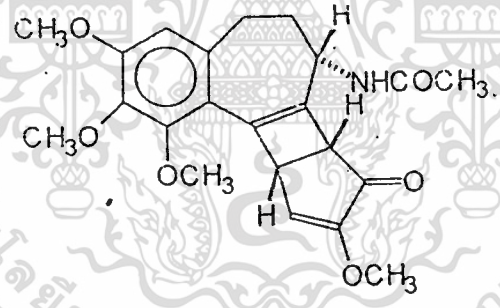
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างทางเคมี

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

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

เมื่อโคลชิซีนถูกแสงอุลตร้าไวโอเลต จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปไปเป็นสารผสมของโฟโตไอโซเมอร์ (photoisomers) โดยมีการเกิดโครงสร้างแบบเตตร้าไซคลิกพร้อมกับมีการละลายของโทรพาโนยด์ (tropanoid ring) กลายเป็นสารผสม 3 ชนิด คือ เบต้าลูมิโคลชิซีน (β-lumicolchicine) แกมม่าลูมิโคลชิซีน (γ-lumicolchicine) และแอลฟ่าลูมิโคลชิซีน (α-lumicolchicine) ซึ่งเบต้าลูมิโคลชิซีนไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางยาได้ ถ้าตรวจพบปริมาณเบต้าลูมิโคลชิซีนมากจะพบปริมาณของโคลชิซีนลดลง (Fell and Doreen , 1967) ซึ่งเบต้าลูมิโคลชิซีนมีสูตรโครงสร้างดังนี้



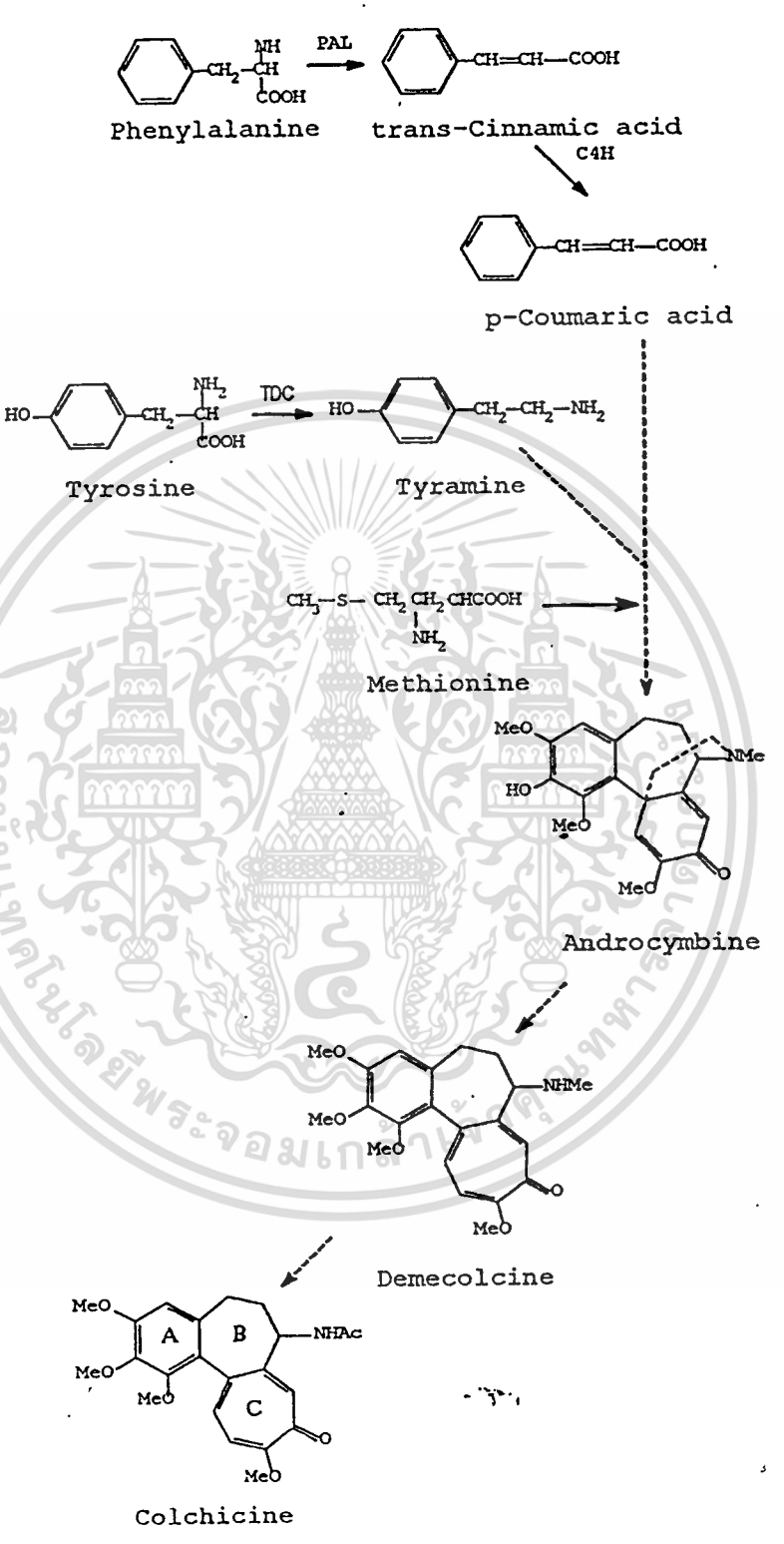
รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของเบต้าลูมิโคลชิซีน
ที่มา : Fell and Doreen , 1967

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

ขบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis)

โคลชิซีนเป็นอัลคาลอยด์ ที่มี nitrogen atom อยู่นอกวง (ring) เป็นอนุพันธ์ของฟีนิลเอทิลเอมีน (phenylethylamine) ซึ่งมีชีวสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) และไทโรซีน (tyrosine) (Yoshida *et al.* , 1988 ; Santavy , 1979 ; Finnei and Staden , 1994) ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ขบวนการชีวสังเคราะห์ของสารโคลชิซีน

ที่มา : Yoshida *et al.* , 1988 ; Santavy , 1979 ; Finnei and Staden , 1994.

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) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้บรรลุความสำเร็จ นอกจากจะขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร ปัจจัยภายในพืช และปัจจัยภายนอกแล้ว การเจริญของเนื้อเยื่อเป็นต้น หรือราก นั้นยังขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของสารควบคุมการเติบโต (hormone) 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และไซโตไนนิน โดยถ้าความเข้มข้นของออกซินสูง ไซโตไคนินต่ำ เนื้อเยื่อจะเจริญไปเป็นแคลลัสและราก ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นของออกซินต่ำ ไซโตไคนินสูงเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอด เมื่อความเข้มข้นของสารสองกลุ่มนี้เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอด และราก (Skoog and Miller , 1957)

การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มโดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียว มีขนาด ต่างๆ กัน มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ของแวคิวโอล (vacuole) สูง แคลลัสที่เซลล์เกาะตัวกันแน่น เราเรียกว่า compact callus ถ้าเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus ภายในเซลล์ของแคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ (pigment) มีเป็นส่วนน้อยที่พบว่ามีสีเขียว เพราะมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองเพราะมีแคโรทีนอยด์ และฟราโวนอยด์ สีม่วงเพราะมีแอนโทไซยานิน ซึ่งปริมาณและชนิดของรงควัตถุดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยของแสง (ประศาสตร์ , 2536)

ชิ้นส่วนพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิตอยู่ สามารถที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ จากรายงานพบว่าส่วนที่ให้เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงสุดในพืชใบเลี้ยงคู่คือส่วนของเอมบริโอ ใบเลี้ยง ลำต้น ส่วนใต้ใบเลี้ยง และราก ส่วนในพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว ส่วนของเอมบริโอ ใบอ่อน ดอกอ่อน และเมล็ดที่เพิ่งเริ่มงอกดีที่สุด ส่วนเนื้อเยื่ออื่นๆ ของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ก็คือ แคมเบียม (cambium) คอร์เทค (cortex) ไส้หรือแกนลำต้น (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem vessels) และไซเลมพาเรนไคมา (xylem parenchyma) และเอ็นโดสเปอร์ม (endosperm) (Street , 1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture)

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย หมายถึง การนำเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มเซลล์เล็กๆ (aggregate cells) มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื้อเยื่อที่เหมาะแก่การนำมาเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ แคลลัส (friable callus) ซึ่งเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ออกจากกัน นอกจากนี้ อาจใช้ส่วนของใบก็ได้ แต่ต้องทำการย่อยเนื้อเยื่อเสียก่อน โดยใช้เอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้สารละลายโพแทสเซียมเดกแตรนซัลเฟต (potassium dextran sulfate) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ประศาสตร์ , 2536)

สารทุติยภูมิที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร

การผลิตสารทุติยภูมิ โดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (พรรนิภา , 2530) ทำได้โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสมุนไพรในสูตรอาหารที่เหมาะสม ทำให้เนื้อเยื่อนั้นเจริญเติบโตขึ้นมา ในสภาพของแคลลัสหรือโคโลนีของเซลล์พืช หรือการเพาะเลี้ยงอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งของพืช เช่น ราก หรือละอองเรณู เป็นต้น วิธีการที่ทำให้เนื้อเยื่อเหล่านี้ผลิตสารทุติยภูมิที่มีประโยชน์ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหารโดยใส่สารตั้งต้น (precursor) ของสารที่ต้องการลงในอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิที่ควรคำนึงถึงได้แก่ แสง อุณหภูมิ และสารควบคุมการเจริญเติบโต (เอื้อพร , 2531)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทางด้านเภสัช

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำมาใช้ในการสร้างสารตัวยาจากพืชสมุนไพรหลายชนิด มีรายงานว่าที่ประเทศอินเดียมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะระและสกัดเอาอินซูลิน (insulin) มาใช้รักษาโรคเบาหวานได้สำเร็จ (อรดี , 2522) ในการสกัดสารตัวยานั้นอาจสกัดจากเนื้อเยื่อที่ได้จากการเลี้ยงโดยตรง หรือสกัดจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรนั้นๆ (Seabrook , 1980) พืชชั้นสูงหลายชนิด นอกจากจะใช้ประโยชน์ในแง่เป็นอาหารแล้วยังสามารถนำสารที่เกิดขึ้นในระหว่างขบวนการเมแทบอลิซึมมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ จึงมีผู้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการผลิตสารดังกล่าวโดยเป็นวิธีที่ประหยัด และพบว่าสารที่พืชสร้างขึ้นมีหลายชนิด เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloids) สเตียรอยด์ (steroids) เทอร์พีน (terpenes) ควิโนน (quinones) และสารอื่นๆ ที่มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรค และมีอัลคาลอยด์มากกว่า 1,000 ชนิด ที่สกัดออกมาได้ การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตอัลคาลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นได้มีความพยายามกันมาก เนื่องจากพืชหลายชนิดที่สร้างอัลคาลอยด์ได้เป็นพืชที่หายากและขาดแคลน (Misawa , 1980) อุปสรรคในการศึกษาเช่น เนื่อเยื่อที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติบโตช้า 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 เพิ่มขึ้น จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Dioscorea* sp.

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

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

Ramawat and Arya (1979) พบว่าการสร้างสาร ephedrine จะสูงถึง 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Ephedra gerardiana.* บนอาหารที่เติมไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วม กับ IBA 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ มีผลต่อการสร้างอัลคาลอยด์

Khanna and Jain (1972) ได้ศึกษาผลของ nicotinic acid ต่อการสร้างอัลคาลอยด์ trigonelline โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Trigonella foenum-graecum* Linn. และแคลลัสที่นำมาทดลองได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D คววมเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่า เมื่อเติม nicotinic acid ปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้สาร trigonelline ประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.25 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง ถ้าเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนนี้เป็น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณสารลดลงเหลือ 5.01 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งแคลลัสที่นำมาวิเคราะห์นั้นมีอายุ 8 สัปดาห์ เท่านั้น

3. การเติมสารต้นตอ (precursor)

การเติมสารต้นตอของอัลคาลอยด์ชนิดนั้นๆ ก็ช่วยเพิ่มการสร้างอัลคาลอยด์ได้ในบางครั้ง

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

Tabata *et al.* (1972) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Scopolia parviflora.* โดยใช้ส่วนของลำต้น และเหง้า บนอาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog , 1965) ปรากฏว่ารากที่เจริญมาจากแคลลัสสามารถสร้างอัลคาลอยด์ atropine ได้ แต่มีปริมาณน้อยกว่าในธรรมชาติ เมื่อทดลองเติมสารต้นตอคือ tropic acid ความเข้มข้นระหว่าง 50 และ 100 ไมโครโมล พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ atropine ได้ถึง 0.12 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง

Mizukami *et al.* (1977) พบว่า เมื่อเติม ascorbic acid ปริมาณ 10^{-4} โมลาร์ 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 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณ atropine สูงสุดถึง 0.53 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อแคลลัสมีอายุ 8 สัปดาห์

Khanna and Sharma (1977) ได้ศึกษาการสร้างอัลคาลอยด์ของฝิ่น (opium) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Papaver rhoeas* Linn. ปรากฏว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. องค์ประกอบของอาหาร

ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจมีผลต่อการสร้างสารของพืชได้ องค์ประกอบของอาหารที่ได้มีการศึกษากันมาก ได้แก่

ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นองค์ประกอบของน้ำตาลซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Maretzki *et al.* , 1974 ; Dougall , 1980) ในสายทางเมแทบอลิซึมของสารประกอบคาร์โบไฮเดรตจะได้สารอินเทอมีเดียทมากมาย ที่จะนำไปสร้างสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้น เช่น แป้ง และสารที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช ดังนั้น ความเข้มข้นของน้ำตาลจึงมีผลต่อการสร้างสารของพืชบางชนิดด้วย

Davies (1972) ได้ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลที่มีต่อการสร้างสาร โดยศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Rosa* sp. ในอาหารเหลว ปรากฏว่าสาร polyphenols เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณซูโครสเพิ่มขึ้นจาก 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

ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุหลักที่พืชต้องการ ในธรรมชาติพืชจะใช้ไนโตรเจนได้ต่อเมื่ออยู่ในรูปของสารอนินทรีย์และพืชจะดูดไนโตรเจนในรูปของไนเตรตและแอมโมเนียม โดยที่ไนเตรตจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแอมโมเนียมโดยผ่านขบวนการที่เรียกว่า nitrate reduction จากนั้นแอมโมเนียม จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดต่างๆ ซึ่งกรดอะมิโนบางตัวเป็นสารต้นตอที่สำคัญของอัลคาลอยด์บางชนิดเช่น nicotinic acid เป็นสารต้นตอของ nicotine ในยาสูบ tryptophane เป็นสารต้นตอของ quinine ส่วน phenylalanine เป็นสารต้นตอของโคลชิซีน (สัมพันธ์ , 2525) ดังนั้น ปริมาณธาตุไนโตรเจนที่ประกอบอยู่ในอาหารน่าจะมีผลต่อปริมาณกรดอะมิโน และสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นด้วย

Davies (1972) พบว่า ปริมาณ polyphenols ลดลงเมื่อใช้ไนเตรต 20 มิลลิโมลาร์. ซึ่งเทียบ กับที่ใช้ไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์. ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Rosa* sp. ในอาหารเหลว

Nettleship and Slaytor (1974) ทดลองเลี้ยงแคลลัสของ *Peganum harmala.* ปรากฏว่าการสังเคราะห์อัลคาลอยด์ที่ได้จาก tryptophane ลดลง เมื่อเติมแอมโมเนียม หรือกลูตามีน (glutamine) แทนไนเตรตในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสนั้น

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธาตุฟอสฟอรัส เป็นส่วนประกอบของโปรตีน กรดนิวคลีอิค adenine triphosphate (ATP) และน้ำตาลฟอสเฟต ซึ่งมีความสำคัญต่อขบวนการเมแทบอลิซึมของพืชในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น 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 ผลของมาโครธาตุและไมโครธาตุอื่นๆ ที่มีต่อการสร้างสารทุติยภูมิของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการศึกษาน้อยมาก (Dougall , 1980)

7. แสงและความมืด

แสงและความมืดมีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Seibert and Kadkade (1980) อ้างตาม Kadkade (1978) รายงานว่า แคลลัสของ *Solanum acculeatissimum.* จะสร้าง glycoalkaloids ได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงแคลลัสนั้นในที่มีแสง โดยการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

Seibert and Kadkade (1980) อ้างตาม Kadkade and Andrade (1971) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Dioscorea* spp. เปรียบเทียบระหว่างในที่มืดและที่มีแสง พบว่า ในช่วง 8 วันแรก หลังจากเริ่มเลี้ยง ปริมาณ diosgenin จะใกล้เคียงกัน แต่หลังจากนั้นอีก 8 วัน พบว่าในที่มีแสง เนื้อเยื่อสามารถสร้างสาร diosgenin ได้มากกว่าในที่มืด

8. พันธุกรรมของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง

พันธุกรรมของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสร้างสาร และปริมาณสาร (Staba , 1977 ; Dougall , 1979) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสกัดสารที่ต้องการนั้น เนื้อเยื่อเริ่มต้นที่นำมาเลี้ยงควรจะได้จากพืชที่มีการสร้างสารปริมาณสูงในธรรมชาติ เพราะอาจจะทำให้ได้สารที่ต้องการในปริมาณที่มากพอจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Dougall , 1979) แต่บางครั้งถึงแม้จะนำเนื้อเยื่อพืชที่สร้างสารได้มากในธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงก็อาจให้ปริมาณสารน้อย เช่น การทดลองดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chan and Staba (1965) พบว่า เนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของ Datura จะไม่ให้ปริมาณสาร tropane มาก ดังเช่นในธรรมชาติและเขาก็ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าการสร้างสาร tropane ของแคลลัสของ Datura จะถูกควบคุมโดยสภาพต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเป็นผลมาจากยีน

Staba (1977) รายงานว่าการตอบสนองของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงจะถูกควบคุมโดยสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม

ข้อได้เปรียบของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ผลิตสารเป็นยา

1. เซลล์ที่เลี้ยงเป็นเซลล์ประเภท undifferentiated cells มีการรวมกลุ่มกันแบบธรรมดาดังนั้นจะตัดปัญหายุ่งยากในขบวนการขนถ่ายวัตถุดิบในการผลิตสารของพืช สารต่างๆ จากเซลล์ซึมผ่านได้ง่ายทำให้กลุ่มเซลล์สามารถจะใช้สารที่เป็นวัตถุดิบ (metabolic pool) ในขบวนการชีวสังเคราะห์และสะดวกที่จะให้สารจากภายนอกเข้าไป (precursor incorporation) เพื่อช่วยเร่งการผลิตสารสำคัญที่มีประโยชน์ทางยา

2. สามารถควบคุมสภาพการเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดได้ตามต้องการ เช่น อุณหภูมิ ความเข้มของแสง สูตรและสภาพของอาหาร

3. วงจรการเจริญเติบโต (growth cycles) ของเนื้อเยื่อสั้น ดังนั้นในการผลิตสารจึงไม่มีความแตกต่างเนื่องจากฤดูกาลตามธรรมชาติ

4. ง่ายต่อการศึกษาเกี่ยวกับการจับกัมมันตภาพรังสี (labelled precursors) โดยเซลล์พืช เพื่อศึกษาเกี่ยวกับขบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช

5. การเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) จึงแน่ใจได้ว่าสารต่างๆ ในสูตรอาหารถูกใช้โดยเซลล์พืชภายใต้ขบวนการชีวสังเคราะห์ ไม่ใช่จากจุลชีพที่อาศัยอยู่ตามส่วนต่างๆ ของพืช

6. ผนังของเนื้อเยื่อบางและเซลล์ส่วนใหญ่มักไม่มีคลอโรฟิลล์ ดังนั้นการเก็บเกี่ยวและการสกัดสารสำคัญจึงทำได้ง่ายและสะดวก

7. การเลี้ยงเนื้อเยื่อทำในห้องทดลองจึงไม่สิ้นเปลืองเนื้อที่ในการเลี้ยง

8. ในขณะที่มีการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อ จะมีโอกาสที่จะเกิด spontaneous mutation ทำให้เกิด somaclonal ขึ้น จึงมีโอกาสในการปรับปรุงและคัดเลือก cell line ใหม่ๆ ที่มีสิ่งที่เราต้องการ (พรรนิภา , 2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสียเปรียบของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ผลิตสารเป็นยา

1. ปริมาณสารที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่มีน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณที่สกัดได้จากพืชในธรรมชาติหรือเนื้อเยื่ออาจจะผลิตสารตัวอื่นแทนสารที่เราต้องการ ทั้งนี้เนื่องจากแคลลัสเป็นเซลล์ประเภทที่จำแนกจำพวกไม่ได้ ดังนั้นขบวนชีวสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นอาจจะมีแนวโน้มที่ผิดปกติไปจากธรรมชาติ

2. ต้องการผู้ที่มีความรู้ และมีความชำนาญในการปฏิบัติงานเพื่อให้เนื้อเยื่อที่เลี้ยงอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

3. ค่าใช้จ่ายในการทดลองสูงและจำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง

4. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้นได้โดยอัตโนมัติ (genone instatility) จำเป็นจะต้องมีการควบคุมพันธุกรรมของเซลล์ที่ผลิตสารให้ผลิตในปริมาณสูง และคงที่อยู่เสมอเพราะพวกที่เป็น cell line ที่ให้ผลผลิตสูงมักไม่ค่อยเสถียร

5. ในการทำให้เกิดต้นใหม่จาก cell line จะได้ผลผลิตต่ำ เนื่องมาจากพืชที่ให้ผลผลิตสูงๆ มีโครโมโซมเป็น polyploid ซึ่งจะขัดขวางการเกิดต้นใหม่ได้ง่าย (พรรนิภา , 2530 ; มนทกานติ , 2530 ; Street , 1973)

2.4 การสกัดอัลคาลอยด์

การสกัดอัลคาลอยด์จากพืชสามารถทำได้หลายวิธีคือ

1. การสกัดด้วยน้ำหรือแอลกอฮอล์เจือกรด จะได้อัลคาลอยด์ออกมาในรูปเกลือของกรดอินทรีย์ เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการสกัดอัลคาลอยด์ทางอุตสาหกรรมเนื่องจากค่าใช้จ่ายต่ำ แต่การใช้น้ำสกัดจะทำให้ลดปริมาณได้ยาก มักเกิดฟองและอาจมีสารอื่นปนออกมามาก

2. สกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่รวมตัวกับน้ำ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน การสกัดด้วยวิธีนี้ จะต้องทำผงยาให้อยู่ในสภาพด่าง เพื่อเปลี่ยนอัลคาลอยด์ให้อยู่ในรูปอิสระ แล้วจึงทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ วิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดอัลคาลอยด์จากพืชปริมาณน้อย เช่น การวิจัย แต่ไม่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรมเนื่องจากค่าใช้จ่ายสูง

3. สกัดด้วยตัวทำละลายที่ผสมกับน้ำได้ เช่น เอทานอล (ethanol) เมทานอล (methanol) แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดอัลคาลอยด์ได้ทั้งในรูปเกลือ และรูปอิสระ จึงเป็นที่นิยมใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์จากพืช (อ้อมบุญ , 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การตรวจสอบสารสกัดจากพืช

ในพืชแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลายชนิด ดังนั้นสารสกัดที่ได้เบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมี เพื่อให้ได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคและอุปกรณ์ต่างๆ ซึ่งการแยกอาจทำได้โดยวิธีโครมาโตกราฟี

โครมาโตกราฟี (Chromatography)

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

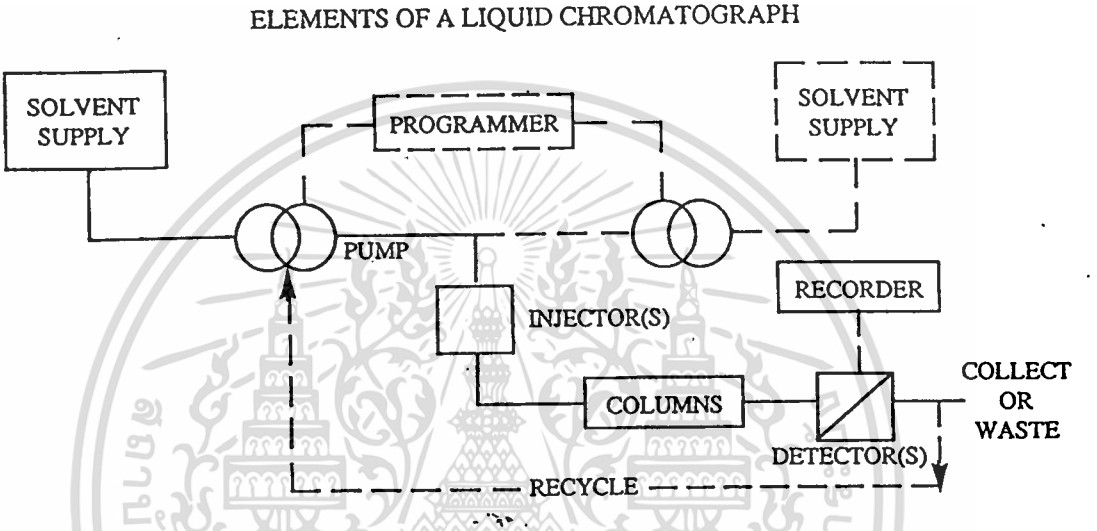
2. แยกสารได้กว้างเนื่องจากมีผู้พัฒนา adsorbent จนทำงานได้กว้างมาก

ส่วนประกอบของ HPLC

HPLC ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ตามไดอะแกรม (diagram) (รูปที่ 2.4) ปั๊ม (pump) จะดูดตัวทำละลายจากขวด ถ้าเป็น HPLC ซึ่งมีระบบ gradient จะมีปั๊ม (pump) 2 ตัว ดูดตัวทำละลายจากขวดหรือฟลาสก์มาผสมกันในอัตราส่วนตามต้องการด้วยการควบคุมโดยอัตโนมัติ ก่อนที่ตัวทำละลายจะผ่านไปยังคอลัมน์ (column) เครื่อง HPLC โดยทั่วไปมักจะมีระบบปรับการเคลื่อนที่ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ราบเรียบเสมอกัน ที่หัวคอลัมน์จะมี injecting port ซึ่งเป็นที่สำหรับฉีดสารที่ต้องการแยก ตัวทำละลายจะพาสารผ่านคอลัมน์ซึ่งมีขนาดเล็กไปยัง detector ซึ่งมี ชนิดต่างๆ ได้แก่ UV- detector refractive index detector fluorescent detector infrared detector flamionization detector และ electrochemical detector แต่ที่นิยมกันมากคือ UV- detector จากนั้น จะผ่าน integrator หรือ recorder เพื่อแปรสัญญาณและรายงานผลเป็นพีก (peak) (ถนอมศรี และคณะ , 2534)



รูปที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบของ HPLC

ที่มา : ถนอมศรี และคณะ , 2534

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	บริษัทผู้ผลิต	Fluka
โพแตสเซียมไนเตรท (KNO_3)	„	Merck
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท ($CaCl_2.2H_2O$)	„	Merck
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MgSO_4.7H_2O$)	„	Fluka
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	„	Carlo erba
กรดบอริค (H_3BO_3)	„	Merck
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	„	Carlo erba
ซิงซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	„	Carlo erba
โพแตสเซียมไอโอไดท์ (KI)	„	Fluka
โซเดียมโมลิบเดทไดไฮเดรท ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	„	BHD
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	„	Fluka
โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	„	Merck
โซเดียมเอดต้า (Na_2-EDTA)	„	Mallinckrodt
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($FeSO_4.7H_2O$)	„	Carlo erba
ไกลซีน (glycine)	„	Fluka
นิโคตินิคแอซิด (nicotinic acid)	„	Fluka
ไพริดอกซีน (pyridoxine)	„	Fluka
ไทเอมีน (thiamine)	„	Fluka
ซูโครส (sucrose)	„	-
วุ้น (agar)	„	Merck
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	„	BHD
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	„	Merck
กรดฟอสเฟอริค (H_3PO_4)	„	BHD
เอทานอล (absolute ethanol)	„	B.J.T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครอรอกซ์ (clorox)	บริษัทผู้ผลิต	The clorox
โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite)	„	HI-CHLOR
ทวีน20 (tween20)	„	-
ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติคแอซิด (2,4-D)	„	Fluka
แนฟทาลีนอะซิติคแอซิด (NAA)	„	Sigma
เบนซิลอะมิโนพิวรีน (BAP)	„	Sigma
อินโดลบิวทาริคแอซิด (IBA)	„	Fluka
แอลฟีนิลอะลานีน (L-Phenylalanine)	„	Sigma
เมทานอล (absolute methanol)	„	Merck
อะซิโตไนไตรด์ (acetonitrile)	„	Sigma
น้ำดีไอโอไนซ์ (deionized water)	„	-
โคลชิซีน (colchicine)	„	Sigma

อุปกรณ์

1 เครื่องวัดพีเอชของ TOA Electronics รุ่น HM-7E

2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ของ Hirayama รุ่น HA-300M IV

3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ของ Microflow รุ่น ABS 1200

4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งของ Shimadzu รุ่น Libror EB-4000H

5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งของ Satorius analytic รุ่น A200S

6 ตู้อบความร้อน (hot air oven) ของ WTB biuder รุ่น ED53

7 เครื่องอังน้ำ (water bath) ของ CREST

8 เครื่องเขย่า (shaker)

9 ตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร (swinney)

10 หลอดฉีดยา (syringe)

11 กระดาษกรองเบอร์ 1 ของ Whatman

12 กระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate)

13 กระดาษกรองไนลอน 66 (nilon 66)

14 เครื่อง HPLC ของ Shimadzu รุ่น SPD-6A

15 คอลัมน์ C_{18} (column C_{18}) ของ inertsil ODS-3 ขนาด 5 μm 4.6x250 mm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ของ Gilson รุ่น J25244M

17 เดซิเคเตอร์ (desicator) ของ Glaswerk wertheim รุ่น GL32

18 เครื่องโซนิเคท (sonicator) ของ CREST รุ่น T40031S

19 โกร่งบดยา

20 มีดผ่าตัด

21 ปากคีบ (forcep)

22 ตะเกียงแอลกอฮอล์

23 บีกเกอร์ (beaker)

24 กระบอกตวง (cylinder)

25 ปิเปตต์ (pipette)

26 ฟลาสก์ (flask)

27 ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

28 แท่งแก้วคน

29 ขวดปรับปริมาตร (volume metric flask)

30 จานเลี้ยงเชื้อ (plate)

31 กรวยแก้ว

32 ชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore)

33 ปั๊มสุญญากาศ (suction)

34 ขวดใส่ตัวอย่าง (vial)

35 ขวดสีชา

36 ขวดดูแรน (duran)

37 หลอดไฟ

38 ถังหมักขนาด 2 ลิตร รุ่น Biostat B ของ B. Braun Biotech international

พืชที่ใช้ในการทดลอง

ดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) โดยใช้ส่วนเหง้าของดองดึง ซึ่งได้มาจากตลาดนัดสวนจตุจักร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิจัย

3.1 การศึกษาผลของฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ต่อการเจริญเป็นแคลลัสของเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS

นำเหง้าอ่อนมาล้างด้วยสบู่และน้ำให้สะอาด แล้วจุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาประมาณ 5 วินาที แล้วย้ายลงฟอกในสารละลายคลอรอกซ์หรือโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่เติม Tween20 2-3 หยด) โดยปริมาตร เป็นเวลาประมาณ 10 และ 5 นาที ตามลำดับ แล้วจึงนำมาล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3 ครั้ง หรือล้างจนไม่มีกลิ่นของคลอรอกซ์ หรือโซเดียมไฮโปคลอไรท์ นำเหง้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ดังกล่าวมาตัดเป็นท่อนๆ หนาประมาณ ท่อนละ 0.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักสดให้มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน โดยให้มีน้ำหนักสดประมาณท่อนละ 0.3 กรัม แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก-1) ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มของออกซินคือ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซโตไคนิน คือ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ทำการทดลองละ 10 ซ้ำ) ซึ่งวราภรณ์ (2529) ได้ศึกษาไว้แล้วพบว่าเหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสมากที่สุด นำไปเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นทุกๆ 4 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์

3.2 การศึกษาผลของสภาวะการเลี้ยงในที่มืด และที่ให้แสงต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหง้าบนอาหารแข็ง MS ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 มาเลี้ยงต่อ โดยตัดเอาเฉพาะส่วนของแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดียวกัน ตัดส่วนของแคลลัสให้มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน โดยให้มีน้ำหนักสดประมาณก้อนละ 0.2 กรัม (ทำการทดลองละ 5 ซ้ำ) ทำการศึกษาทั้งในที่มืดและที่ให้แสง (ให้แสง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง) ความเข้มแสงประมาณ 2000 ลักซ์ (lux) อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นทุกๆ 4 สัปดาห์ จนครบ 16 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การศึกษาผลของฮอร์โมนต่อการเจริญของแคลลัสดองดึงในอาหารเหลว MS

3.3.1 การศึกษาผลของฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม จากนั้นนำแคลลัสแต่ละก้อนมาบี้ให้มีขนาดเล็กลงก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม 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 (นำอาหารแต่ละสูตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร) หลังจากใส่แคลลัสที่บี้ลงในอาหารแต่ละสูตร นำไปเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS.

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม จากนั้นนำแคลลัสแต่ละก้อนมาบี้ให้มีขนาดเล็กลงก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้อาหารทั้งหมด 16 สูตร (นำอาหารแต่ละสูตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร) หลังจากใส่แคลลัสที่บี้ลงในอาหารแต่ละสูตร นำไปเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.2 อาหารเหลวสูตรMS ที่เติม NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส

สูตรที่	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	NAA	BAP
17	0	0
18	0	0.5
19	0	1
20	0	1.5
21	0.5	0
22	0.5	0.5
23	0.5	1
24	0.5	1.5
25	1	0
26	1	0.5
27	1	1
28	1	1.5
29	1.5	0
30	1.5	0.5
31	1.5	1
32	1.5	1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การศึกษาผลของฮอร์โมน IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม จากนั้นนำแคลลัสแต่ละก้อนมาบี้ให้มีขนาดเล็กลงก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้อาหารทั้งหมด 16 สูตร (นำอาหารแต่ละสูตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร) หลังจากใส่แคลลัสที่บี้ลงในอาหารแต่ละสูตร นำไปเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.3 อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส

สูตรที่	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	IBA	BAP
33	0	0
34	0	0.5
35	0	1
36	0	1.5
37	0.5	0
38	0.5	0.5
39	0.5	1
40	0.5	1.5
41	1	0
42	1	0.5
43	1	1
44	1	1.5
45	1.5	0
46	1.5	0.5
47	1.5	1
48	1.5	1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การศึกษาผลของสารต้นตอคือแอลฟีนิลอะลานีน (L-Phenylalanine) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

โดยนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยแต่ละก้อนมีน้ำหนักใกล้เคียงกันคือ 0.2 กรัม นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรเดียวกันกับข้อ 3.1 และมีการเติมสารต้นตอ คือ แอลฟีนิลอะลานีนความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} โมลาร์ ทำการทดลองละ 5 ซ้ำ นำไปเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง (ให้แสง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง) ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นทุกๆ 4 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ และวิเคราะห์หาปริมาณสารโคลชิซีนตามข้อ 3.8.1 นำผลที่ได้ใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.5 การศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีนความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ (M) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร แข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยแต่ละก้อนมีน้ำหนักใกล้เคียงกันคือ 0.2 กรัม นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรเดียวกันกับข้อ 3.1 มีการเติมสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีนความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ นำไปเลี้ยงในที่ให้แสง (ให้แสง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง) ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ การเลี้ยงในอาหารเหลวต้องบี้ก้อนแคลลัสให้มีขนาดเล็กลงก่อน แล้วใส่ในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็ง นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในสภาวะเดียวกับที่เลี้ยงในอาหารแข็ง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น ทุกๆ 2 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ และวิเคราะห์หาปริมาณสารโคลชิซีนตามข้อ 3.8.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ (cobalt chloride หรือ $CoCl_2 . 6H_2O$) ต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยแต่ละก้อนมีน้ำหนักใกล้เคียงกันคือ 0.2 กรัม นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรเดียวกันกับข้อ 3.1 มีการเติมโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง (ให้แสง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง) ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ การเลี้ยงในอาหารเหลวต้องบี้ก้อนแคลลัสให้มีขนาดเล็กลงก่อน แล้วใส่ในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็ง นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในสภาวะเดียวกับที่เลี้ยงในอาหารแข็ง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น ทุกๆ 4 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ และวิเคราะห์หาปริมาณสารโคลชิซีนตามข้อ 3.8.1

3.7 การศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีนต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.1 มาตัดเป็นก้อนๆ โดยให้แต่ละก้อนมีน้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม จากนั้นนำแคลลัสแต่ละก้อนมาบี้ให้มีขนาดเล็กลงก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (นำอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ทำ 5 ฟลาสก์) นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.7.2 การเลี้ยงในถังหมัก

นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.7.1 มากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ แล้วนำหัวเชื้อที่ได้มาชั่งน้ำหนักสดให้มีน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ใส่ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลวสูตรเดิมอยู่ 30 มิลลิลิตร และเติมแอลฟีนิลอะลานีนที่ปลอดเชื้อ ซึ่งทำโดยกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท ความเข้มข้น 10^{-1} โมลาร์ ปริมาตร 10.3 มิลลิลิตร (เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมลาร์ เมื่อเติมหัวเชื้อลงในถังหมัก) สำหรับถังหมัก 2 ลิตร ใส่อาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้ม ข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ลงในถังหมัก นำไปเลี้ยงในที่ให้แสง (ให้แสง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง) ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดความเร็ว 100 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม (vvm) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และวิเคราะห์หาปริมาณสารโคลชิซีนตามข้อ 3.8.1

3.8 การวิเคราะห์

3.8.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารโคลชิซีน

3.8.1.1 การเตรียมสารมาตรฐานโคลชิซีน

สารมาตรฐานโคลชิซีน 5 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 5 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดูดสารละลายมา 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดปรับปริมาตร ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดูดสารละลายมา 100 200 300 400 500 และ 600 ไมโครลิตร (0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 มิลลิลิตร) แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 1000 ไมโครลิตร (1 มิลลิลิตร) ได้ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8.1.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่ต้องการมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้งตามวิธีในภาคผนวก ข-2 บดด้วยโกร่งบดยาให้ละเอียด นำผงยาที่ได้มา 0.1 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีเมทานอล (methanol) อยู่ 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ทำให้เข้มข้นโดยการระเหยแห้งในเครื่องอังน้ำ (water bath) จนแห้ง (หรือเกือบแห้งแล้ว นำไปไว้ในเดซิเคเตอร์ (desicator) กรณีที่ยังไม่ได้นำไปตรวจหาปริมาณสารเป็นเวลาหลายวัน) ใส่เมทานอล (methanol) ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.1.3 วิธีการวิเคราะห์

นำสารมาตรฐานโคลชิซีนและสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.1.1 และ 3.8.1.2 ตามลำดับ มากรองด้วยชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore) หรือใช้หลอดฉีดยา (syring) กับตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิลิตร (swinney) โดยใช้กระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate) นำไปตรวจหาปริมาณสารโคลชิซีนด้วย HPLC โดยสภาวะที่ใช้คือ mobile phase ใช้ acetonitrile ต่อน้ำ เท่ากับ 27 ต่อ 73 คอลัมน์ (column) inertsil C_{18} ODS-3 (ขนาด 4.6x250 mm) ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร (μm) อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ UV เป็น detector ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 254 นาโนเมตร (nm) และใช้สารมาตรฐานโคลชิซีน (standard colchicine) เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยสารมาตรฐาน โคลชิซีน (standard colchicine) ที่ใช้มีความเข้มข้น ดังนี้คือ 1 2 3 4 5 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml) ฉีดสารมาตรฐานโคลชิซีน และสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณสารโคลชิซีน 5 ครั้ง ครั้งละ 20 ไมโครลิตร (μl) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการได้จากกราฟมาตรฐาน(standard curve) แสดง ในภาคผนวก ค

3.8.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่ม (CRD) และเปรียบเทียบผลโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาผลของฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ต่อการเจริญเป็นแคลลัสของเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าในเวลา 3 สัปดาห์ หลังจากเริ่มเลี้ยงเนื้อเยื่อรอบนอกของเหง้าเกิดแคลลัสขึ้นและปรากฏชัดในเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 พบว่าเกิดแคลลัสเพิ่มมากขึ้น ในการศึกษานี้เหง้าที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นเหง้าแบบตัวแอล (L-shape) ซึ่งลักษณะต่างๆ ของเหง้าดองดึงนั้นมีหลายรูปแบบ คือแบบเส้นตรง (Linear-shape) แบบตัวที (T-shape) แบบตัวแอล (L-shape) และแบบตัววี (V-shape) (รูปที่ 4.2) วัดการเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักสด พบว่าน้ำหนักเริ่มต้น 0.362 กรัม เมื่อเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 1.286 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 0.924 กรัม ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเป็นน้ำหนักของแคลลัส เมื่อเลี้ยง 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.210 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 1.848 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้ในทุกๆ 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงดังตารางที่ 4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.1 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่นมีสีเหลืองอ่อนปนขาว หรือบางขวดมีสีเหลืองอ่อนปนสีน้ำตาลอ่อน แสดงดังรูปที่ 4.3

จากการทดลอง พบว่าการเจริญเป็นแคลลัสของเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีการเจริญเติบโตดี เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสต้องการแสงความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส (ประศาสตร์ , 2536) วราภรณ์ (2529) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดาวดึงส์โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเจริญเติบโตดีที่สุดมีน้ำหนัก 1.533 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้น 0.335 กรัม Hussey (1975) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืช 3 วงศ์ได้แก่ Liaceae Iridaceae และ Amaryllidaceae ปรากฏว่าฮอร์โมน 2,4-D สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเหล่านั้นเกิดแคลลัสได้ 2,4-D เป็นออกซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยเฉพาะในพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว Okazawa *et al.* (1967) รายงานว่า อาหารที่มีทั้งออกซิน และไซโตไคนินทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญดีขึ้น เนื่องจากไซโต-

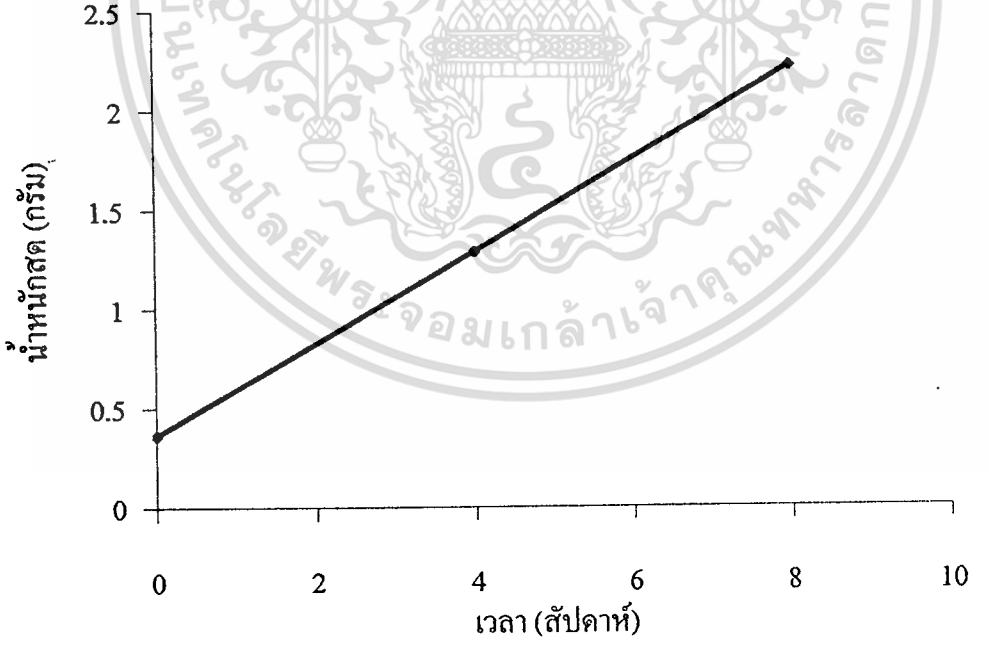
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคนินจะส่งเสริม การทำงานของออกซิน

ตารางที่ 4.1 ผลของฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเป็นแคลลัสของเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)
0	0.362c
4	1.286b
8	2.210a

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 ลักษณะต่างๆ ของเหง้าดองดึง

รูปบน : เหง้าดองดึงแบบเส้นตรง (Linear-shape)

รูปล่าง : เหง้าดองดึงแบบตัวแอล (L-shape)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 (ต่อ)

รูปบน : เหง้าดองดึงแบบตัวที (T-shape)

รูปล่าง : เหง้าดองดึงแบบตัววี (V-shape)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 เนื้อเยื่อเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาผลของสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง ต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์ - โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสเมื่อเลี้ยงในที่มืด มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากกว่าเมื่อเลี้ยงในที่ให้แสงเป็นดังนี้คือ น้ำหนักเริ่มต้น 0.230 กรัม เมื่อเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 0.968 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 0.738 กรัม เมื่อเลี้ยง 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.766 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 2.536 กรัม เมื่อเลี้ยง 12 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.802 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 2.572 กรัม และเมื่อเลี้ยง 16 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.872 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 2.642 กรัม นำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าสัปดาห์ที่ 16 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และไม่แตกต่างกับสัปดาห์ที่ 12 และสัปดาห์ที่ 8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.4 ส่วนการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในที่ให้แสงมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในที่มืดคือ น้ำหนักเริ่มต้น 0.246 กรัม เมื่อเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 0.612 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 0.366 กรัม เมื่อเลี้ยง 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.412 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 2.166 กรัม เมื่อเลี้ยง 12 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.492 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 2.246 กรัม เมื่อเลี้ยง 16 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.574 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 2.328 กรัม นำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า สัปดาห์ที่ 16 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และแตกต่างกับสัปดาห์ที่12 สัปดาห์ที่ 8 สัปดาห์ที่ 4 และ สัปดาห์ที่เริ่มเลี้ยง ซึ่งมีการเจริญเติบโตรองมา ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 สัปดาห์ที่ 8 สัปดาห์ที่ 12 และสัปดาห์ที่ 16 มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงดังตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.4 ลักษณะของแคลลัสเป็นแบบเกาะกันแน่นมีสีเหลืองเข้มปนขาวเมื่อเลี้ยงในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยง 12 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสมีสีเหลืองเข้มปนน้ำตาล บางขวดมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์เกิดขึ้นเล็กน้อย บางขวดเกิดราก และ บางขวดเกิดลักษณะคล้ายเหง้าตามธรรมชาติ และเมื่อเลี้ยง 16 สัปดาห์ แคลลัสมีสีเหลืองปนน้ำตาลเข้มมากขึ้นและมีลักษณะเช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงในที่ให้แสง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แต่เห็นการเปลี่ยนแปลงชัดขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.5

จากการทดลอง พบว่าเมื่อให้แสงแคลลัสเจริญเติบโตน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในที่มืด เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสต้องการแสงความเข้มต่ำ หรือไม่ใช้แสงเลย (ประศาสตร์ , 2536) ซึ่งผลการทดลองเหมือนกับ วราภรณ์ (2529) ได้ทดลองเปรียบเทียบการเลี้ยงเนื้อเยื่อเหง้าดองดึงในที่มืดและที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อเหง้าที่เลี้ยงในที่ให้แสงเกิดสีเขียวของคลอโรฟิลล์ขึ้น และเกิดแคลลัสได้น้อยกว่าในที่มืด นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในที่มืดในสัปดาห์ที่ 8 สัปดาห์ที่ 12 และสัปดาห์ที่ 16 มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Waraporn and Boonyean (2001) ที่พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของแคลลัสดองดึงคือ 8 สัปดาห์

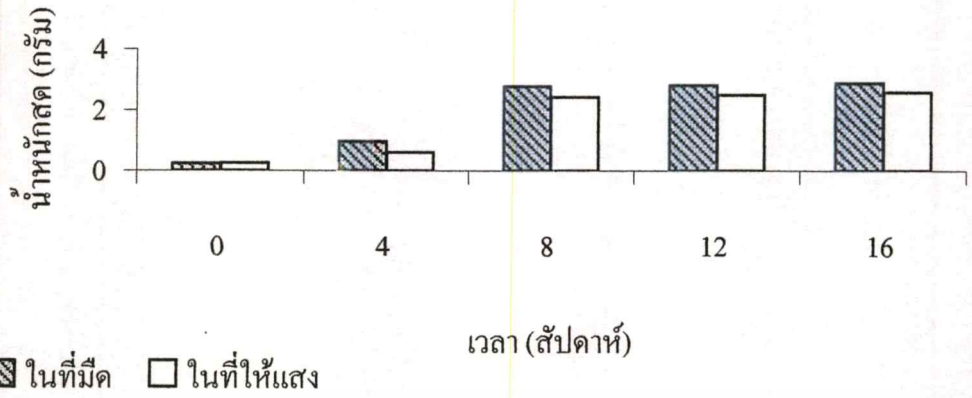
ตารางที่ 4.2 ผลของสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง ต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
0	0.230c	0.246d
4	0.968b*	0.612c*
8	2.766a*	2.412b*
12	2.802a*	2.492ab*
16	2.872a*	2.574a*

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วย * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด และที่ให้แสง

ก ข ค

รูปที่ 4.5 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง
ก : 8 สัปดาห์ ข : 12 สัปดาห์ ค : 16 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาผลของฮอร์โมนต่อการเจริญของแคลลัสดองดึงในอาหารเหลว MS

4.3.1 ผลการศึกษาผลของฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสูตรที่ 11 คือเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสดองดึงมากที่สุดเท่ากับ 0.670 กรัม รองมาคือสูตรที่ 9 ซึ่งเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP มีน้ำหนัก 0.450 กรัม สูตรที่ 5 คือเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP มีน้ำหนัก 0.440 กรัม สูตรที่ 10 คือเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนัก 0.430 กรัม และสูตรที่ 6 คือเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนัก 0.320 กรัม ตามลำดับ ส่วนสูตรอื่นๆ พบว่าน้ำหนักไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมากนักจากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าสูตรที่ 11 คือเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 9 5 และ 10 ซึ่งมีการเจริญเติบโตรองมา ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.3 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.6 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองอ่อนปนขาว มีขนาดเล็กและขนาดใหญ่ปนกันแสดงดังรูปที่ 4.7

จากการทดลอง พบว่า แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 11) เนื่องจากการพัฒนาชิ้นส่วนของพืชไปเป็นแคลลัสได้ดี เมื่อสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินอยู่ในสมดุล (ประศาสตร์ , 2536) เมื่อใช้ฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้นสูง มีผลทำให้เนื้อเยื่อตายเพราะ 2,4-D แสดงผลของออกซินได้มาก มีความคงตัวดีและไม่เคลื่อนที่ออกไปจากตำแหน่งที่ก่อปฏิกิริยา เมื่ออัตราความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับออกซินอีกหลายชนิดที่ก่อผลในการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเมแทบอไลต์ที่เป็นอินเทอมีเดียทจึงก่อให้เกิดพิษแก่เนื้อเยื่อ ผลดังกล่าวนี้ใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชแบบคัดเลือกได้ แต่อัตราส่วนต่ำทำให้ส่งเสริมการเจริญเป็นแคลลัสได้ดี (Salisbury , 1969 ; Murashige , 1974)

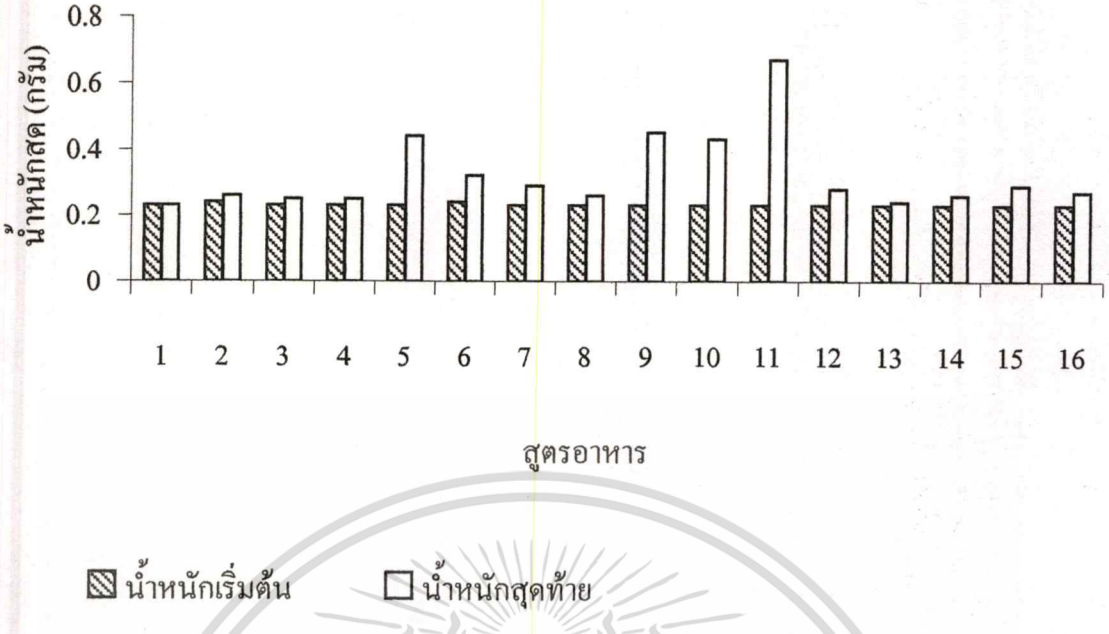
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลของฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด

สูตรอาหาร	2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	
			น้ำหนักเริ่มต้น	น้ำหนักสุดท้าย
1	0	0	0.230a	0.230d
2	0	0.5	0.240a	0.260cd
3	0	1	0.230a	0.250cd
4	0	1.5	0.230a	0.250cd
5	0.5	0	0.230a	0.440b
6	0.5	0.5	0.240a	0.320c
7	0.5	1	0.230a	0.290cd
8	0.5	1.5	0.230a	0.260cd
9	1	0	0.230a	0.450b
10	1	0.5	0.230a	0.430b
11	1	1	0.230a	0.670a
12	1	1.5	0.230a	0.280cd
13	1.5	0	0.230a	0.240cd
14	1.5	0.5	0.230a	0.260cd
15	1.5	1	0.230a	0.290cd
16	1.5	1.5	0.230a	0.270cd

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด

รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลการศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สูตรที่ 26 คือเติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสดองดึงมากที่สุดเท่ากับ 0.460 กรัม รองมาคือสูตรที่ 25 ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP มีน้ำหนัก 0.430 กรัม สูตรที่ 21 คือเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP มีน้ำหนัก 0.390 กรัม สูตรที่ 27 คือเติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนัก 0.370 กรัม และสูตรที่ 22 คือเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนัก 0.320 กรัม ตามลำดับ ส่วนสูตรอื่นๆ พบว่าน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงจากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงมากนัก เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าสูตรที่ 26 คือเติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 25 ซึ่งมีการเจริญเติบโตรองมาแสดงดังตารางที่ 4.4 ลักษณะการเจริญเติบโต แสดงดังรูปที่ 4.8

จากการทดลอง พบว่า แคลลัสเจริญเติบโตดีที่สุดในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 26) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Skoog and Miller (1957) ที่กล่าวว่าถ้าความเข้มข้นของออกซินสูงไซโตไคนินต่ำเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นแคลลัสหรือราก แต่การเจริญเติบโตไม่ดีเท่ากับสูตรที่ 11 ในการทดลองที่ 4.3.1 เนื่องจาก วราภรณ์ (2529) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง พบว่าแคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนัก 0.733 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้น 0.225 กรัม ซึ่งให้น้ำหนักน้อยกว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีน้ำหนัก 1.533 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้น 0.325 กรัม

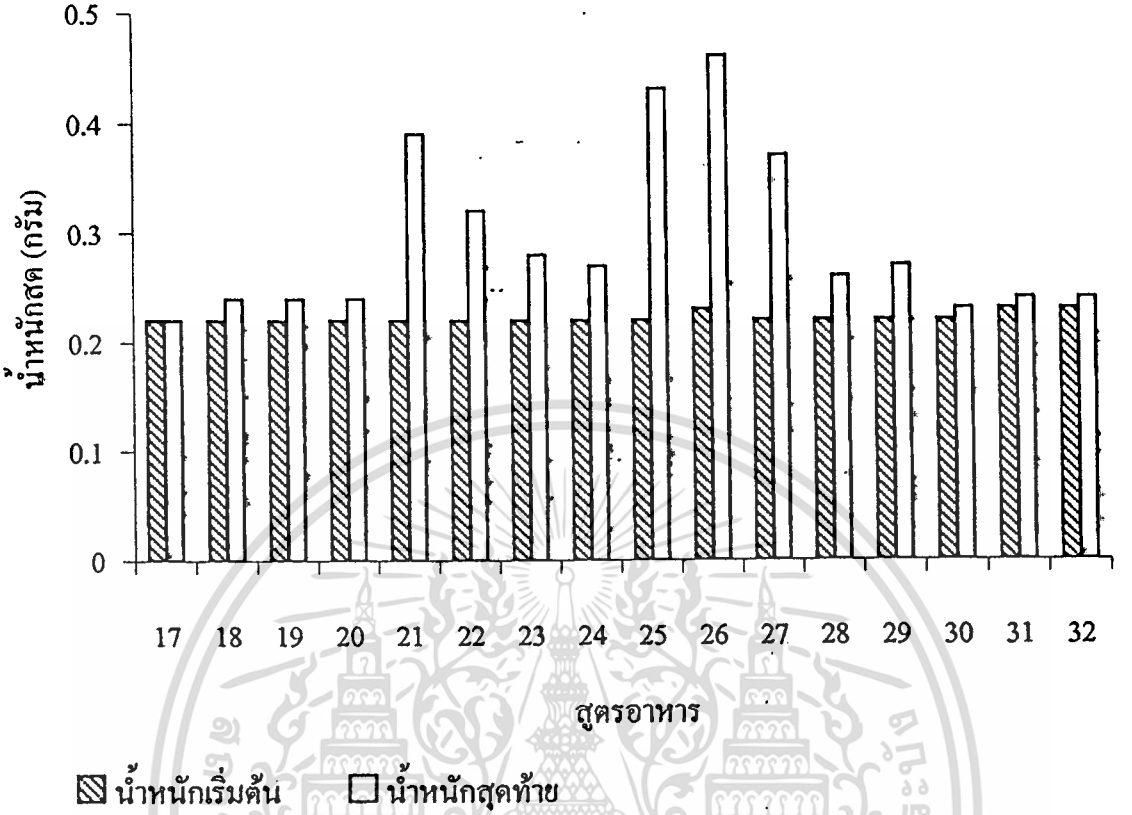
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด

สูตรอาหาร	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	
			น้ำหนักเริ่มต้น	น้ำหนักสุดท้าย
17	0	0	0.220a	0.220f
18	0	0.5	0.220a	0.240ef
19	0	1	0.220a	0.240ef
20	0	1.5	0.220a	0.240ef
21	0.5	0	0.220a	0.390bc
22	0.5	0.5	0.220a	0.320d
23	0.5	1	0.220a	0.280de
24	0.5	1.5	0.220a	0.270def
25	1	0	0.220a	0.430ab
26	1	0.5	0.230a	0.460a
27	1	1	0.220a	0.370c
28	1	1.5	0.220a	0.260ef
29	1.5	0	0.220a	0.270def
30	1.5	0.5	0.220a	0.230ef
31	1.5	1	0.230a	0.240ef
32	1.5	1.5	0.230a	0.240ef

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลการศึกษาผลของฮอร์โมน IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด

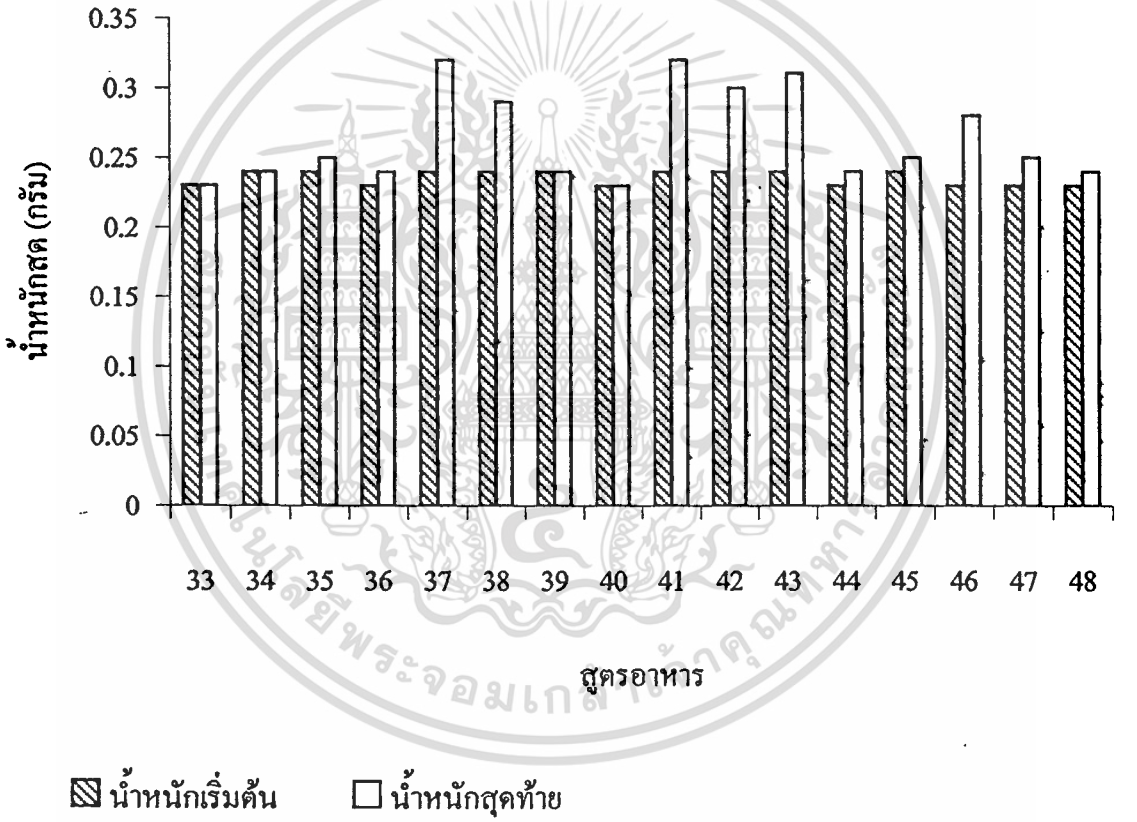
จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวMS ที่เติมฮอร์โมน IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสูตรที่ 37 คือเติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP และสูตรที่ 41 คือเติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสดองดึงมากที่สุดคือ 0.320 กรัม รองมาคือสูตรที่ 42 ซึ่งเติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรที่ 43 ซึ่งเติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนัก 0.310 กรัม ตามลำดับ ส่วนสูตรอื่นๆ พบว่าน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงจากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงมากนัก เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าสูตรที่ 37 คือเติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP และสูตรที่ 41 คือเติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงดังตารางที่ 4.5 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.9

จากการทดลอง พบว่า แคลลัสเจริญเติบโตดีที่สุดในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP (สูตรที่ 37) และในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม BAP (สูตรที่ 41) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Skoog and Miller (1957) ที่กล่าวว่าถ้าความเข้มข้นของออกซินสูง ไซโตไคนินต่ำเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นแคลลัสหรือราก แต่การเจริญเติบโตไม่ดีเท่ากับสูตรที่ 11 ในการทดลองที่ 4.3.1 ซึ่งอาจเกี่ยวกับความเหมาะสมของฮอร์โมนที่ใช้ร่วมกันคือ ฮอร์โมน IBA อาจทำงานร่วมกับ BAP ไม่ดีเท่าฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินตัวอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับ Okazawa *et al.* (1967) รายงานว่าอาหารที่มีทั้งออกซินและไซโตไคนินทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตดีขึ้น เนื่องจากไซโตไคนินจะส่งเสริมการทำงานของออกซิน

จากการทดลอง พบว่าการศึกษาผลของฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเจริญได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 11 คือเติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส 0.670 กรัม ส่วนการศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 26 คือเติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส 0.460 กรัม และศึกษาผลของฮอร์โมน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเจริญได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 37 คือเติมฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม BAP และสูตรที่ 41 คือเติมฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม BAP ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส 0.320 กรัม จากการทดลองสรุปได้ว่า อาหารเหลว MS ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงคือ สูตรที่ 11 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารแข็ง MS เมื่อเลี้ยงที่สภาวะเดียวกับในอาหารเหลว พบว่าแคลลัสเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส 0.968 กรัม ซึ่งเจริญดีกว่าในอาหารเหลว 1.4 เท่า



รูปที่ 4.9 การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน IBA ร่วม BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลของฮอร์โมน IBA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในที่มืด

สูตรอาหาร	IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	
			น้ำหนักเริ่มต้น	น้ำหนักสุดท้าย
33	0	0	0.230a	0.230e
34	0	0.5	0.240a	0.240e
35	0	1	0.240a	0.250de
36	0	1.5	0.230a	0.240e
37	0.5	0	0.240a	0.320a
38	0.5	0.5	0.240a	0.290abc
39	0.5	1	0.240a	0.250de
40	0.5	1.5	0.230a	0.240e
41	1	0	0.240a	0.320a
42	1	0.5	0.240a	0.310ab
43	1	1	0.240a	0.310ab
44	1	1.5	0.230a	0.240e
45	1.5	0	0.240a	0.250de
46	1.5	0.5	0.230a	0.280bcd
47	1.5	1	0.230a	0.250cde
48	1.5	1.5	0.230a	0.240de

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

จากการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงเป็นดังนี้ ในกลุ่มควบคุมคือ ไม่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ในสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนัก 2.620 กรัม ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-1} โมลาร์ มีน้ำหนัก 0.348 กรัม ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-2} โมลาร์ มีน้ำหนัก 0.242 กรัม ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ มีน้ำหนัก 1.494 กรัม ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ มีน้ำหนัก 1.512 กรัม ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ มีน้ำหนัก 2.480 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสดีที่สุดที่ความเข้มข้นของแอลฟีนิลอะลานีน 0 โมลาร์ ในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ความเข้มข้นของแอลฟีนิลอะ-ลานีน 10^{-5} โมลาร์ ที่มีการเจริญเติบโตรองมา แสดงดังตารางที่ 4.6 ลักษณะการเจริญเติบโต แสดงดังรูปที่ 4.10 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} โมลาร์ เป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเข้มปนขาว ส่วนแคลลัสที่เกิดขึ้นในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-2} โมลาร์ เป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีน้ำตาลเข้ม แสดงดังรูปที่ 4.11 ส่วนผลการศึกษาผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุม ในสัปดาห์ที่ 8 มีน้ำหนัก 2.454 กรัม ส่วนผลการทดลองในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-1} โมลาร์ มีน้ำหนัก 0.230 กรัม ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-2} โมลาร์ มีน้ำหนัก 0.282 กรัม ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ มีน้ำหนัก 0.832 กรัม ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ มีน้ำหนัก 1.380 กรัม ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ มีน้ำหนัก 1.526 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสดีที่สุด ที่ความเข้มข้นของแอลฟีนิลอะลานีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0 โมลาร์ ในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ความเข้มข้นของแอลฟีนิลอะลานีน 10^{-5} โมลาร์ ที่มีการเจริญเติบโตรองมา และเมื่อเปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง พบว่าสัปดาห์ที่ 4 การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงโดยไม่เติมแอลฟีนิลอะลานีน (ความเข้มข้น 0 โมลาร์) มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืด และที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความเข้มข้นอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสัปดาห์ที่ 8 การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงโดยไม่เติมแอลฟีนิลอะลานีน และที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ ไม่มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนที่ความเข้มข้นของแอลฟีนิลอะลานีน 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-5} โมลาร์ มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.6 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.12 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} โมลาร์ เป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเข้มปนขาว ส่วนแคลลัสที่เกิดขึ้นในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-2} โมลาร์ เป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีน้ำตาลเข้ม แสดงดังรูปที่ 4.13

จากการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารที่ผลิตได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดในกลุ่มควบคุมมีปริมาณสารโคลชิซีนน้อยที่สุด เท่ากับ 0.120 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-1} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.141 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-2} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.121 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.185 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.135 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.140 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนในที่ให้แสง ในกลุ่มควบคุมมีปริมาณสารโคลชิซีนน้อยที่สุดเท่ากับ 0.128 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-1} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.459 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-2} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.156 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.612 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.448 มิลลิกรัมต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักแห้ง ในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีน 0.145 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดในกลุ่มทดลองที่เติม แอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีนมากที่สุด และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-5} โมลาร์ ซึ่งมีปริมาณสารโคลชิซีนรองมา ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-5} โมลาร์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.7 และปริมาณสารโคลชิซีนแสดงดังรูปที่ 4.14 ส่วนในที่ให้แสงในกลุ่มทดลองที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ มีปริมาณสารโคลชิซีนมากที่สุด และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-4} โมลาร์ ซึ่งมีปริมาณสารโคลชิซีนรองมา ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-4} โมลาร์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตแสดงดังตารางที่ 4.7 และปริมาณสารโคลชิซีนแสดงดังรูปที่ 4.14 และเมื่อเปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง พบว่าที่ความเข้มข้นของแอลฟีนิลอะลานีน 0 และ 10^{-5} โมลาร์ ไม่มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนที่ความเข้มข้นอื่นๆ มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเลี้ยงในที่ให้แสงผลิตสารโคลชิซีนได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงในที่มืดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงดังตารางที่ 4.7

จากการทดลอง พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเลี้ยงในที่ให้แสงสามารถผลิตสารโคลชิซีนได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงในที่มืด 3.3 เท่า เนื่องจากแสงและความมืด มีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary product) Seibert and Kadkade (1980) อ้างตาม Kadkade (1978) รายงานว่าแคลลัสของ *Solanum acculeatissimum.* จะสร้างไกลโคอัลคาลอยด์ (glycoalkaloids) ได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงแคลลัสนั้นในที่ให้แสง (โดยการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน) เนื่องจากการเติมสารต้นตอที่ใช้ในการผลิตอัลคาลอยด์ของพืชบางชนิด สามารถเพิ่มการผลิตสารอัลคาลอยด์ชนิดนั้นๆ เพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Mizukami *et al.* (1977) พบว่า เมื่อเติมแอสคอบิคแอซิด (ascobic acid) ปริมาณ 10^{-4} โมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Lithospermum erythorrhizon.* จะส่งเสริมการสร้างสารไซโคนิน (shikonin) หรือแนปโทควิโนน (napthoquinone) Tabata *et al.* (1972) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Scopolia parviflora โดยใช้ส่วนของลำต้นและเหง้าบนอาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog , 1965) ปรากฏว่ารากที่เจริญมาจากแคลลัสสามารถสร้างอัลคาลอยด์ atropine ได้ แต่มีปริมาณน้อยกว่าในธรรมชาติ เมื่อทดลองเติมสารต้นตอคือ tropic acid ความเข้มข้นระหว่าง 50 และ 100 ไมโครโมล (μmol) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณ atropine ได้ถึง 0.12 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

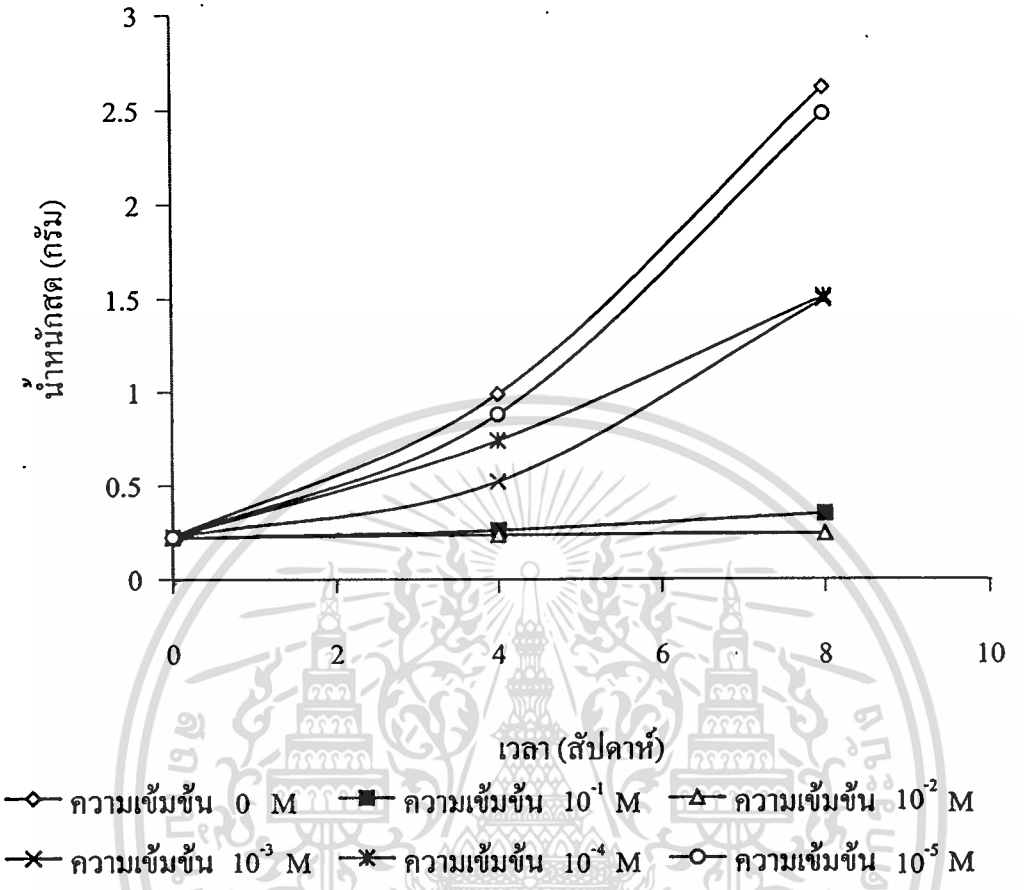
ตารางที่ 4.6 ผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ L-Phenylalanine (โมลาร์)	น้ำหนักสด (กรัม)					
	เวลา 0 สัปดาห์		เวลา 4 สัปดาห์		เวลา 8 สัปดาห์	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง	ในที่มืด	ในที่ให้แสง	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
0	0.226a	0.224a	0.990a*	0.774a*	2.620a	2.454a
10^{-1}	0.222a	0.224a	0.262e	0.228c	0.348c*	0.230d*
10^{-2}	0.222a	0.222a	0.238e	0.266c	0.242c*	0.282d*
10^{-3}	0.226a	0.222a	0.522d	0.514b	1.494b*	0.832c*
10^{-4}	0.226a	0.222a	0.742c	0.646b	1.512b	1.380b
10^{-5}	0.224a	0.222a	0.882b	0.700b	2.480a*	1.526b*

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

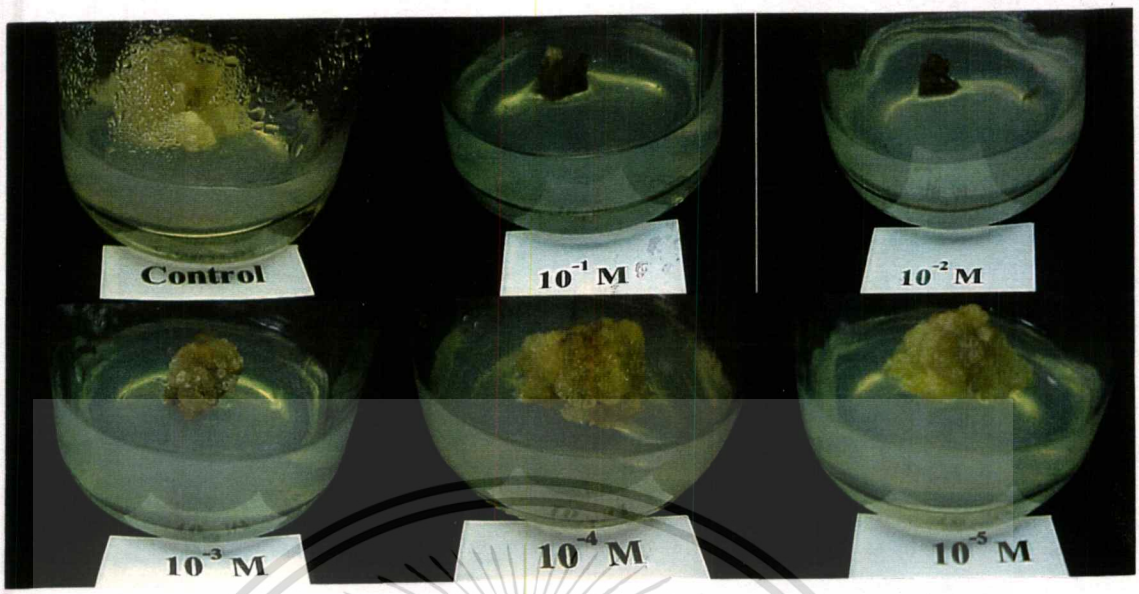
ค่าเฉลี่ยในแนวนอนของสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง ในแต่ละช่วงสัปดาห์ที่ตามด้วย * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด

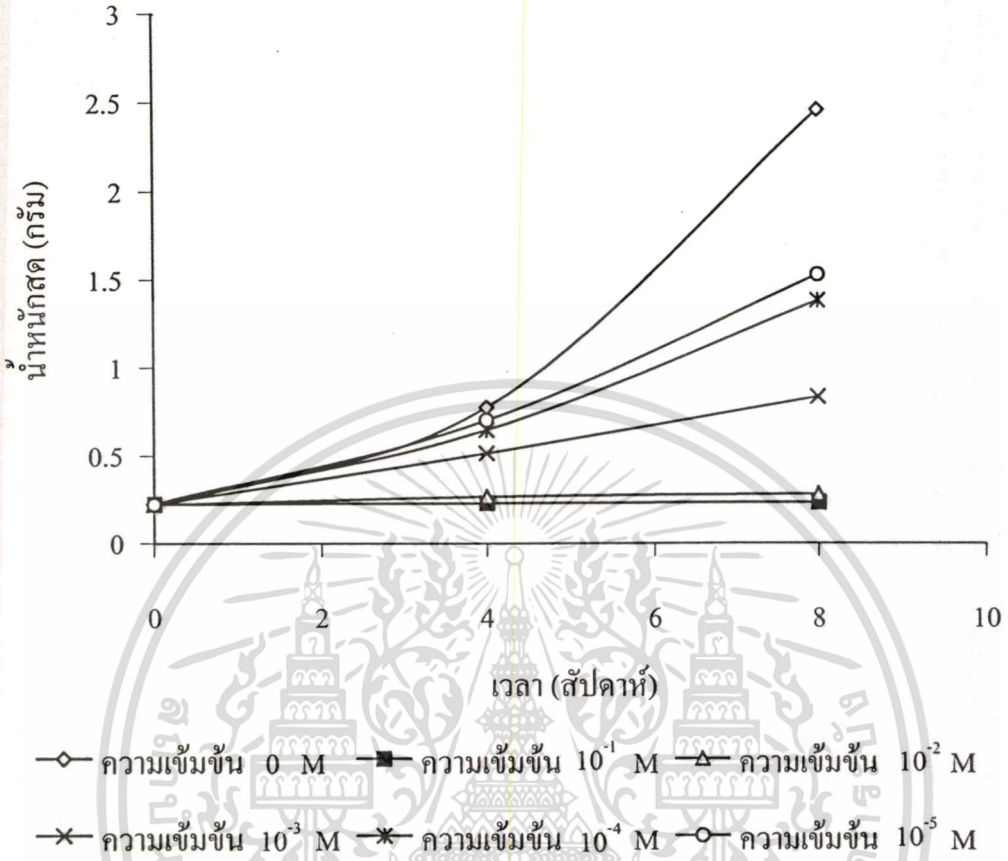
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.13 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

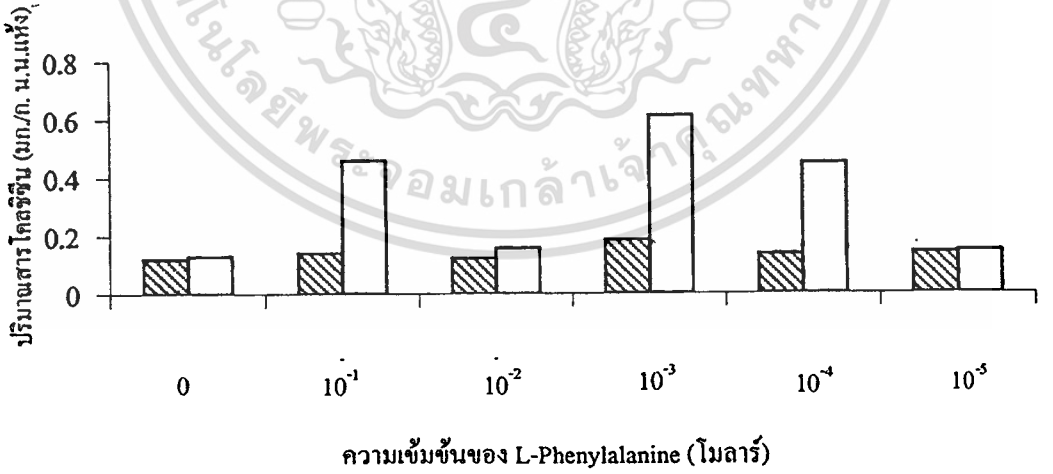
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีนความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ L-Phenylalanine (โมลาร์)	ปริมาณสารโคลชิซีน (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
0	0.120c	0.128d
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 : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วย * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT



รูปที่ 4.14 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีนความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและ ในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ในที่ให้แสง

จากการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ในสัปดาห์ที่ 2 มีน้ำหนัก 0.384 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้น 0.220 กรัม เมื่อเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 0.522 กรัม เมื่อเลี้ยง 6 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 0.912 กรัม และเมื่อเลี้ยง 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 0.948 กรัม ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ในสัปดาห์ที่ 8 รองมาคือในสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 8 แสดงดังตาราง ที่ 4.8 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.15 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเข้มปนขาวแสดงดังรูปที่ 4.16 ส่วนน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ในสัปดาห์ที่ 2 มีน้ำหนัก 0.222 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้น 0.221 กรัม เมื่อเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 0.404 กรัม เมื่อเลี้ยง 6 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 0.842 กรัม และเมื่อเลี้ยง 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 0.916 กรัม ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ในสัปดาห์ที่ 8 รองมาคือในสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 8 แสดงดังตารางที่ 4.8 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.15 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเข้มปนขาว มีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ แสดงดังรูปที่ 4.17 และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS พบว่าเมื่อเลี้ยงที่ 0 4 6 และ 8 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างระหว่างการเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในสัปดาห์ที่ 2 มีการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งดีกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.8

จากการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสงทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรดังกล่าว ในสัปดาห์ที่ 2 เท่ากับ 0.124 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.231 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในสัปดาห์ที่ 6 มีเท่ากับ 0.272 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และในสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 0.612 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรดังกล่าว ในทุกๆ 2 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรดังกล่าว ในสัปดาห์ที่ 2 เท่ากับ 0.115 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 0.126 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และในสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 0.142 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรดังกล่าว ในสัปดาห์ที่ 8 มีมากที่สุดและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 6 4 และ 2 ซึ่งมีปริมาณสารโคลชิซีนรองมา ตามลำดับ แต่สัปดาห์ที่ 6 และ 4 ปริมาณสารโคลชิซีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงดังตารางที่ 4.9 และปริมาณสารโคลชิซีนแสดงดังรูปที่ 4.18 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS พบว่า ทุกๆ 2 สัปดาห์ ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS แสดงดังตารางที่ 4.9 และปริมาณสารโคลชิซีนผลิตได้มากจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS มากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ประมาณ 4.3 เท่า

จากการทดลอง พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลิตสารโคลชิซีนได้มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสัปดาห์อื่น เนื่องจากระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลต่อปริมาณอัลคาลอยด์ที่สร้าง Khanna *et al.* (1977) ได้ศึกษาการสร้างอัลคาลอยด์ atropine ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Atropa belladonna* Linn. ปรากฏว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณ atropine สูงสุดถึง 0.53 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อแคลลัสมีอายุ 8 สัปดาห์ ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สามารถผลิตสารโคลชิซีนได้มากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS อาจเนื่องมาจากสภาวะในการเลี้ยงยังไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Khanna and Sharma (1977) ได้ศึกษาการสร้างอัลคาลอยด์จากฝิ่น (opium) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Papaver rhoeas* Linn. ปรากฏว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้อัลคาลอยด์สูงสุดในช่วงอายุ 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	
	อาหารแข็ง MS	อาหารเหลว MS
0	0.220d	0.221c
2	0.384c*	0.222c*
4	0.522b	0.404b
6	0.912a	0.842a
8	0.948a	0.916a

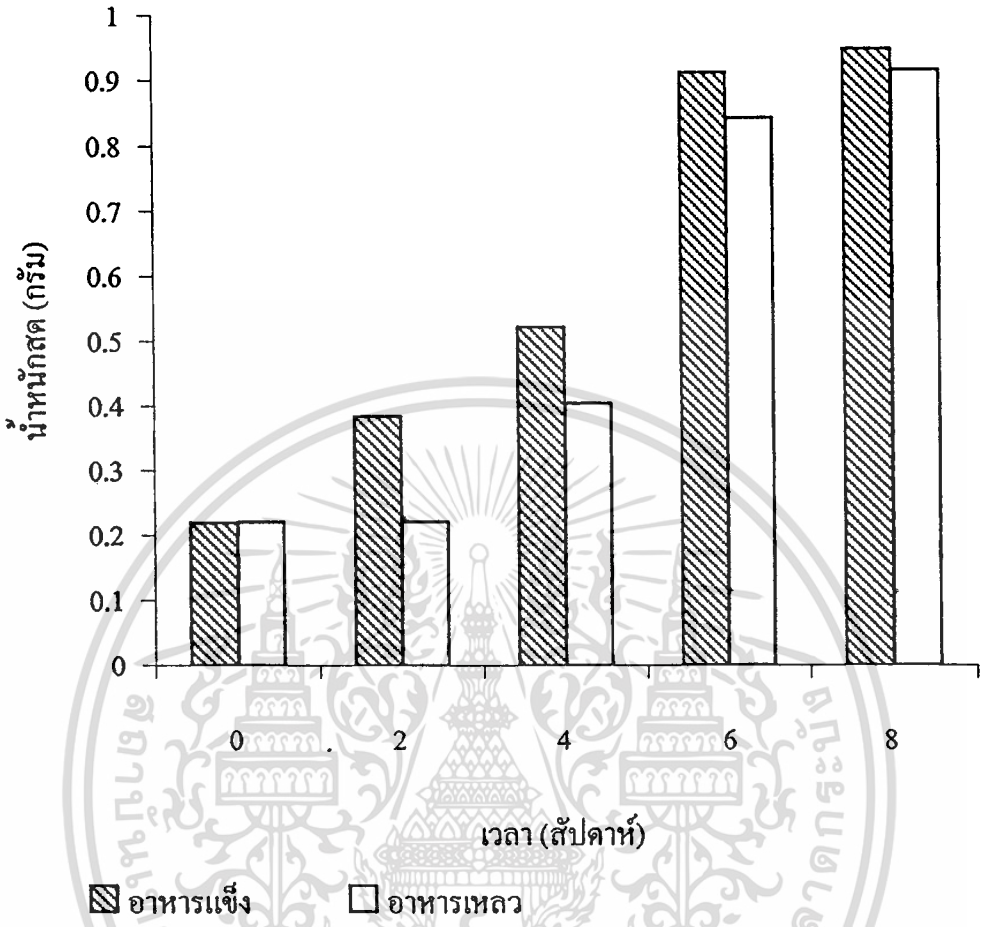
ตารางที่ 4.9 ผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง

เวลา (สัปดาห์)	ปริมาณสารโคลชิซีน (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	
	อาหารแข็ง MS	อาหารเหลว MS
2	0.124d*	0.115c*
4	0.231c*	0.125b*
6	0.272b*	0.126b*
8	0.612a*	0.142a*

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

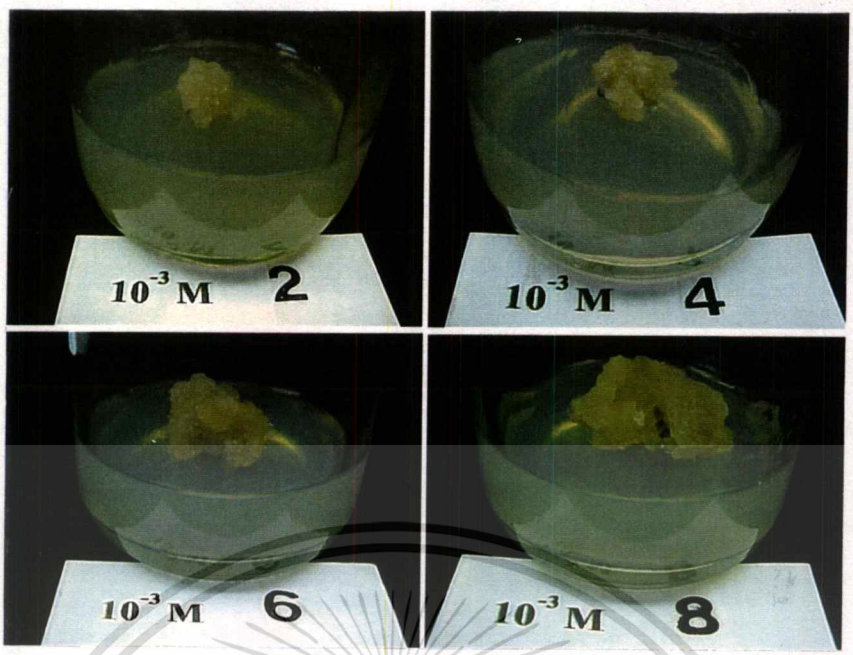
ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วย * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

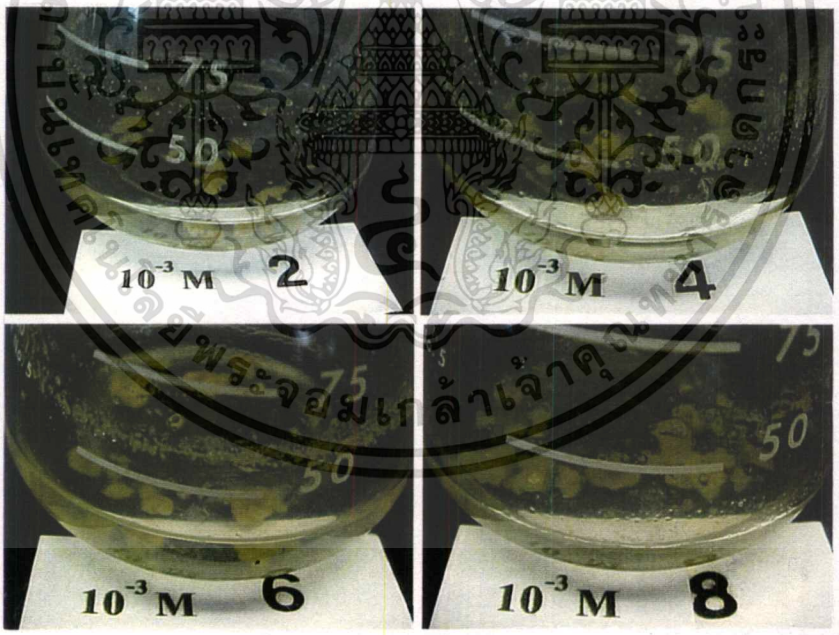


รูปที่ 4.15 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

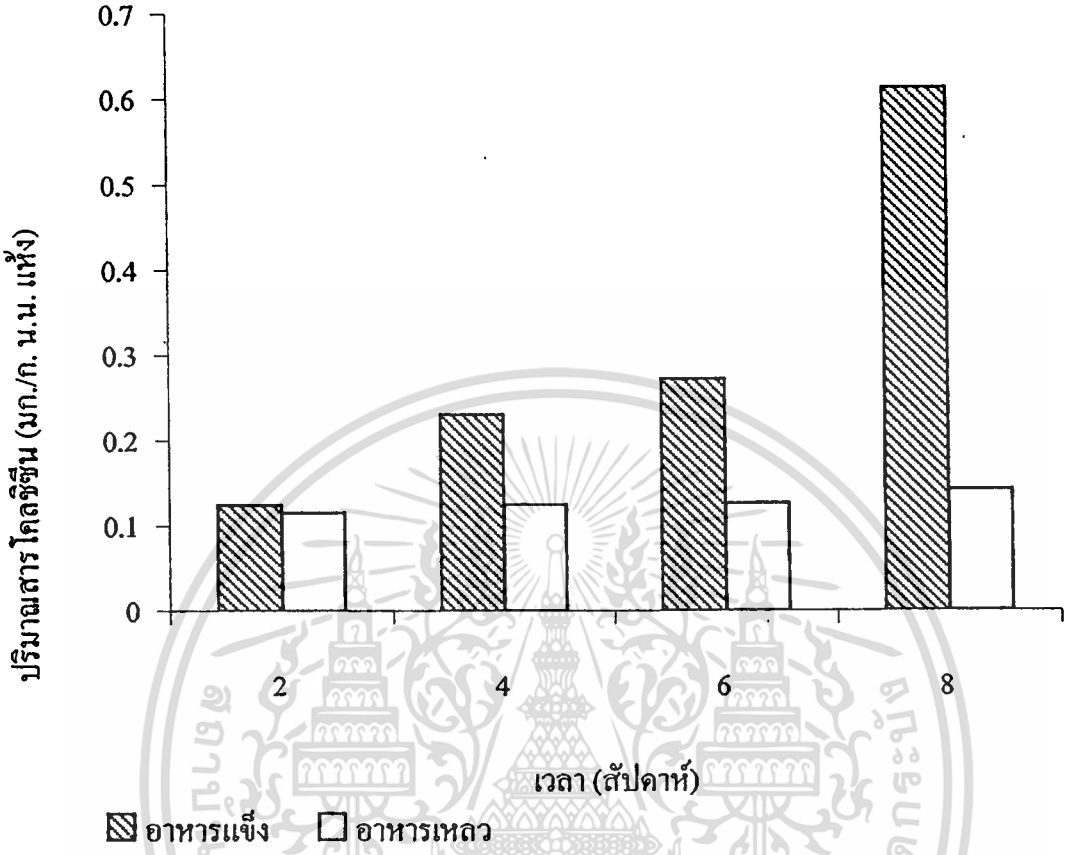


รูปที่ 4.16 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง



รูปที่ 4.17 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการผลิตสารโคลชีซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

จากการศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในกลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารโคบอลคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.902 กรัม ส่วนในกลุ่มทดลอง (เติมสารโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีน้ำหนัก 0.986 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.226 กรัม และ 0.222 กรัม ตามลำดับ ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 นั้น พบว่าในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 2.108 กรัม และกลุ่มทดลอง มีน้ำหนัก 2.481 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุม ในทุกๆ 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะในกลุ่มทดลอง ในทุกๆ 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน แสดงดังตารางที่ 4.10 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.19 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเข้มปนขาวแสดงดังรูปที่ 4.21 ส่วนการศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในกลุ่มควบคุมคือไม่เติมโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.768 กรัม ส่วนในกลุ่มทดลองคือเติมโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.797 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้น 0.225 กรัม และ 0.224 กรัม ตามลำดับ ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า ในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนัก 1.981 กรัม และกลุ่มทดลองมีน้ำหนัก 1.996 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเช่นเดียวกันกับเมื่อเลี้ยงในที่มืดคือ การเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุม ในทุกๆ 4 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางทางสถิติ และการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มทดลอง ในทุกๆ 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน แสดงดังตารางที่ 4.10 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.20 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเข้มปนขาว แสดงดังรูปที่ 4.21 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง ในกลุ่มควบคุม พบว่าในสัปดาห์ที่เริ่มเลี้ยงไม่มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในที่มืดดีกว่าในที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่มทดลอง พบว่ามีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงเป็นเช่นเดียวกันกับในกลุ่มควบคุม แสดงดังตารางที่ 4.10

จากการศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมเมื่อเลี้ยงในที่มืดมีเท่ากับ 0.120 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และในที่ให้แสงมีเท่ากับ 0.133 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนในกลุ่มทดลองเมื่อเลี้ยงในที่มืด มีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.123 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และในที่ให้แสงมีเท่ากับ 0.140 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยง ทั้งในที่มืดและที่ให้แสงแสดงดังตารางที่ 4.11 ปริมาณสารโคลชิซีนแสดงดังรูปที่ 4.22 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารโคลชิซีนที่ได้จากแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองแสดงดังตารางที่ 4.11

จากการศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.433 กรัม ส่วนในกลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.527 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.223 กรัม และ 0.227 กรัม ตามลำดับ ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.956 กรัม และกลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.020 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุม ในทุกๆ 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกลุ่มทดลองการเจริญเติบโตดีที่สุดในสัปดาห์ที่ 8 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่เริ่มเลี้ยงซึ่งมีการเจริญเติบโตรองมา ตามลำดับ ซึ่งสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่เริ่มเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงดังตารางที่ 4.12 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.23 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเข้มปนขาวแสดงดังรูปที่ 4.25 ส่วนการศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.300 กรัม ส่วนในกลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.406 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้น 0.236 กรัม และ 0.223 กรัม ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.866 กรัม และในกลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.943 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเมื่อเลี้ยงในกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แคลลัสมีการเจริญเติบโตดีที่สุดและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่เริ่มเลี้ยงซึ่งมีการเจริญเติบโตรองมา ตามลำดับ ซึ่งการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงในสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่เริ่มเลี้ยง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเลี้ยงในกลุ่มทดลอง พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตเป็นเช่นเดียวกันกับเมื่อเลี้ยงในกลุ่มควบคุม แสดงดังตารางที่ 4.12 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.24 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเข้มปนขาวมีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ปนกัน แสดงดังรูปที่ 4.25 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสเมื่อเลี้ยงในกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่เริ่มเลี้ยงและสัปดาห์ที่ 8 ไม่มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสัปดาห์ที่4 มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เลี้ยงในที่มืดดีกว่าที่เลี้ยงในที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเจริญเติบโตของแคลลัสเมื่อเลี้ยงในกลุ่มทดลอง พบว่ามีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงเป็นเช่นเดียวกันกับเมื่อเลี้ยงในกลุ่มควบคุมแสดงดังตารางที่ 4.12

จากการศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมในที่มืดมีเท่ากับ 0.104 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และในที่ให้แสงมีเท่ากับ 0.104 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนในกลุ่มทดลอง ที่เลี้ยงในที่มืดมีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.113 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และในที่ให้แสงมีเท่ากับ 0.122 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมทั้งในที่มืดและที่ให้แสง แสดงดังตารางที่ 4.13 ปริมาณสารโคลชิซีนแสดงดังรูปที่ 4.26 และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง พบว่าในกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างระหว่างสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในกลุ่มทดลอง พบว่าผลิตสารโคลชิซีนในสภาวะการเลี้ยงในที่ให้แสงมากกว่าในที่มืดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.13

จากการทดลอง พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมสารกระตุ้นอชีวภาพคือ โคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสผลิตสารโคลชิซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มากกว่าที่ไม่เติมโคบอลคลอไรด์ เนื่องจาก Limsirichaikul (1995) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบปริมาณโคลชิซีนของดองดึงหัวขวาน จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับสารกระตุ้นอชีวภาพ และต้นที่พบตามธรรมชาติ พบว่าการเติมโคบอลคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณโคลชิซีน 0.6024 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารกระตุ้นโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ไม่เติมโคบอลคลอไรด์ ได้ปริมาณสารโคลชิซีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในที่มืดและที่ให้แสง ซึ่งอาจเป็นเพราะโคบอลคลอไรด์ทำให้เกิดการแตกของเหง้าได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง (กาญจนา และกิ่งกาญจน์, 2538) แต่ในการทดลองนี้เลี้ยงแคลลัส ซึ่งอาจเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นของโคบอลคลอไรด์ให้ผลิตสารโคลชิซีน ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมสารกระตุ้นโคบอล-คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ไม่เติมโคบอลคลอไรด์ ได้ปริมาณสารโคลชิซีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในที่มืดและที่ให้แสง แสดงว่าโคบอลคลอไรด์สามารถกระตุ้นให้แคลลัสผลิตโคลชิซีนได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS ดีกว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ดังกล่าว

จากการทดลอง พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลิตสารโคลชิซีนได้สูงสุด 0.612 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะเดียวกัน ซึ่งมีปริมาณสารโคลชิซีน 0.142 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็น 1.2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลของโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสด (กรัม)			
	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
0	0.226c	0.225c	0.222c	0.224c
4	0.902b*	0.768b*	0.986b*	0.797b*
8	2.108a*	1.981a*	2.481a*	1.996a*

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนของสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง ในแต่ละกลุ่มทดลองคือกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ตามด้วย * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

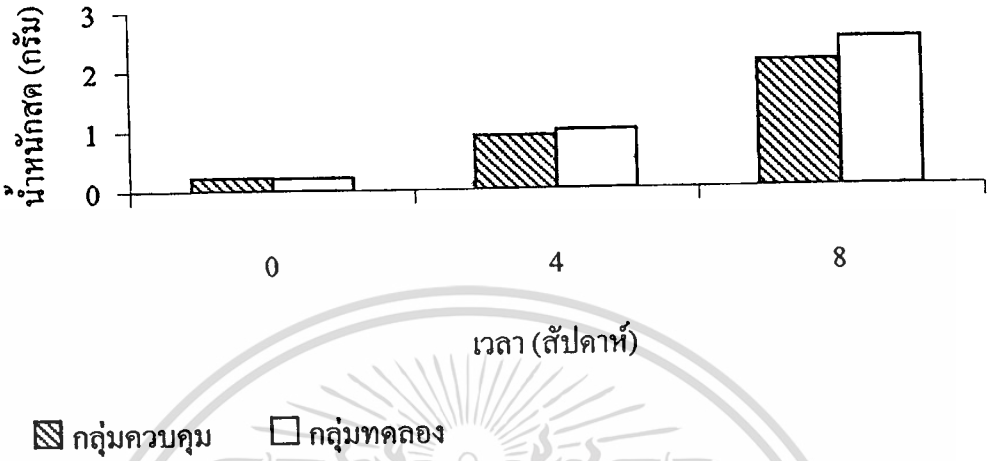
ตารางที่ 4.11 ผลของโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลอง	ปริมาณสารโคลชิซีน (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
กลุ่มควบคุม	0.120a	0.133a
กลุ่มที่เติมสารโคบอลคลอไรด์	0.123a	0.140a

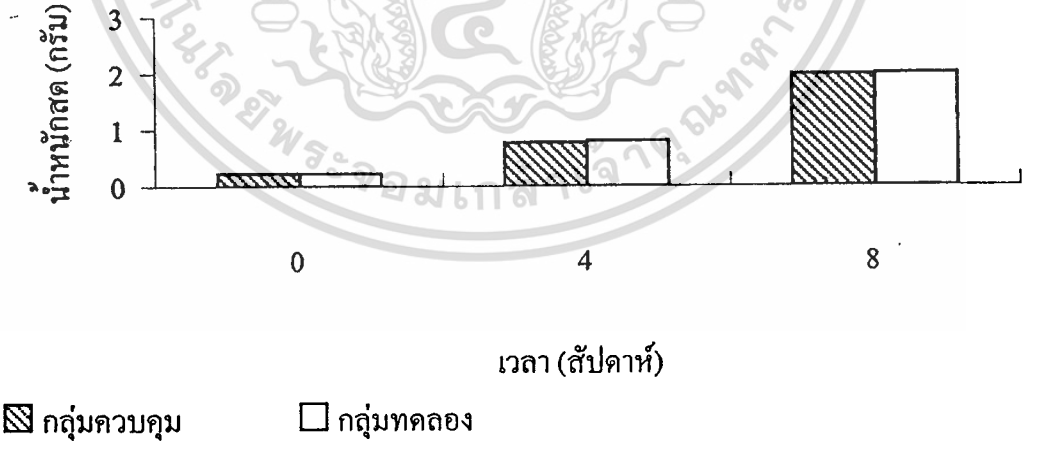
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วย * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

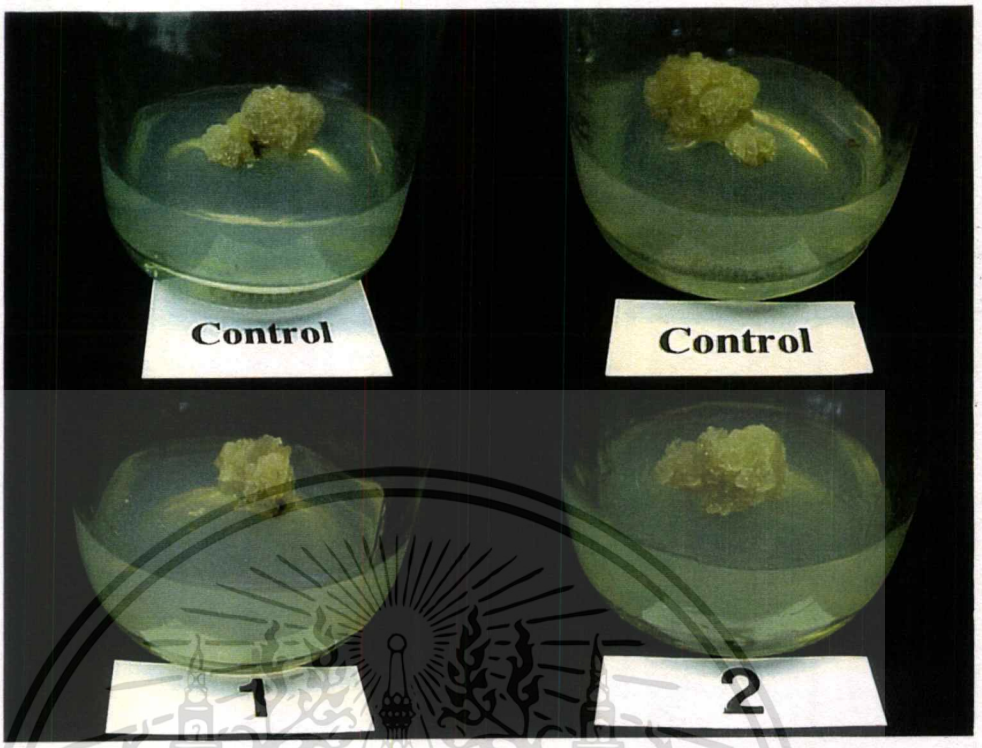


รูปที่ 4.19 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด



รูปที่ 4.20 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง

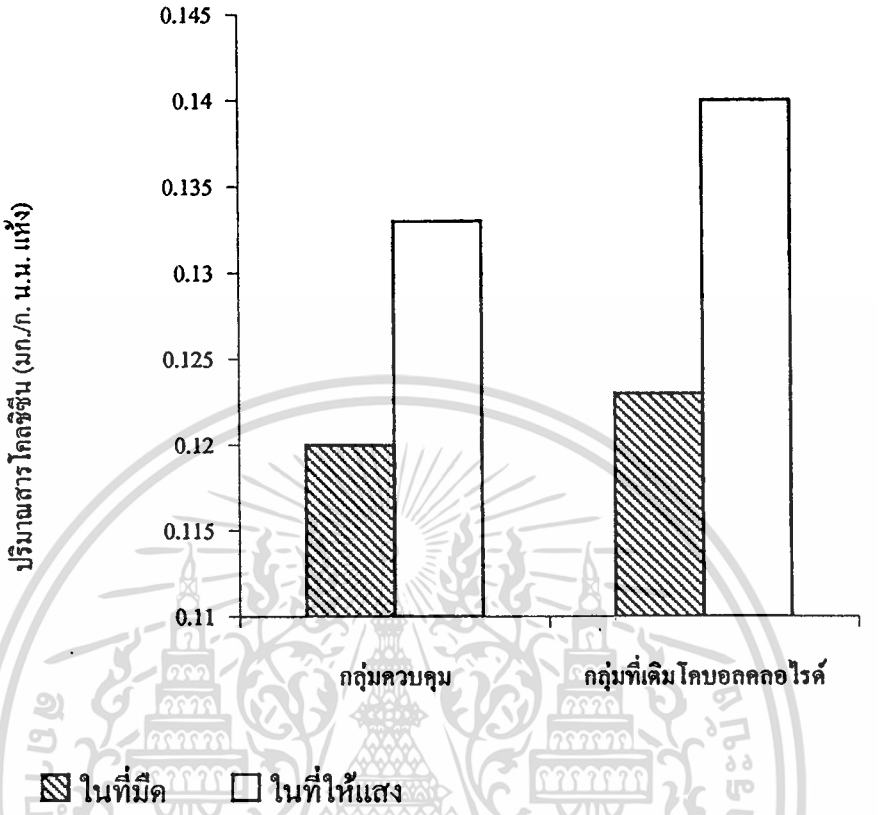
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง

1 : ในที่ให้แสง 2 : ในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ผลของโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญ เติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักสด (กรัม)			
	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
0	0.223c	0.236b	0.227b	0.223b
4	0.433b*	0.300b*	0.527b*	0.406b*
8	0.956a	0.866a	1.020a	0.943a

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนของสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง ในแต่ละกลุ่มทดลองคือกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ตามด้วย * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

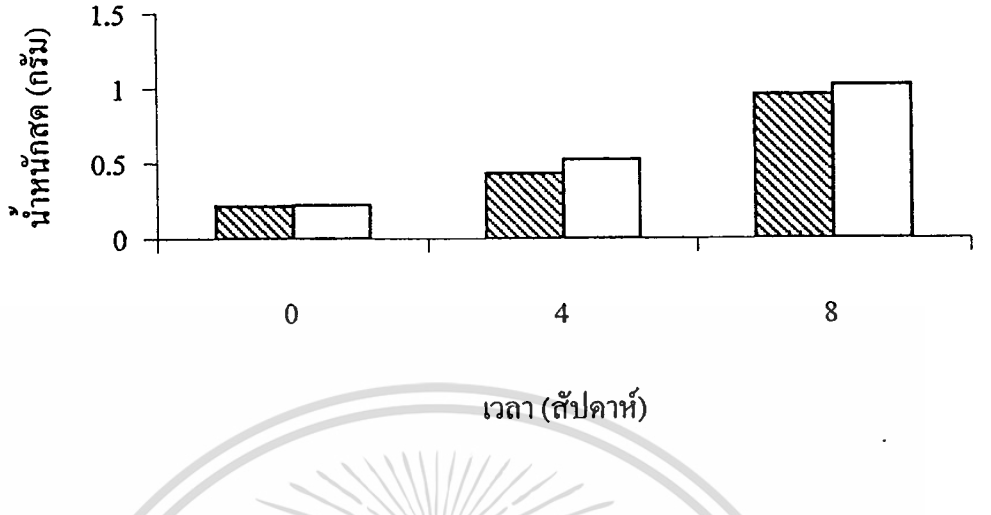
ตารางที่ 4.13 ผลของโคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลอง	ปริมาณสารโคลชิซีน (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	
	ในที่มืด	ในที่ให้แสง
กลุ่มควบคุม	0.104b	0.104b
กลุ่มที่เติมสารโคบอลคลอไรด์	0.113a*	0.122a*

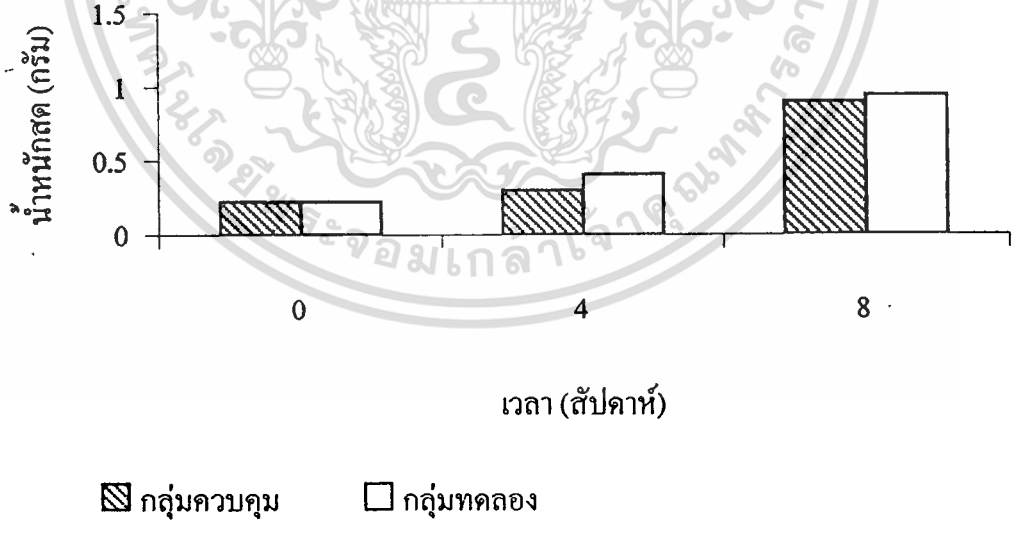
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วย * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด



รูปที่ 4.24 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

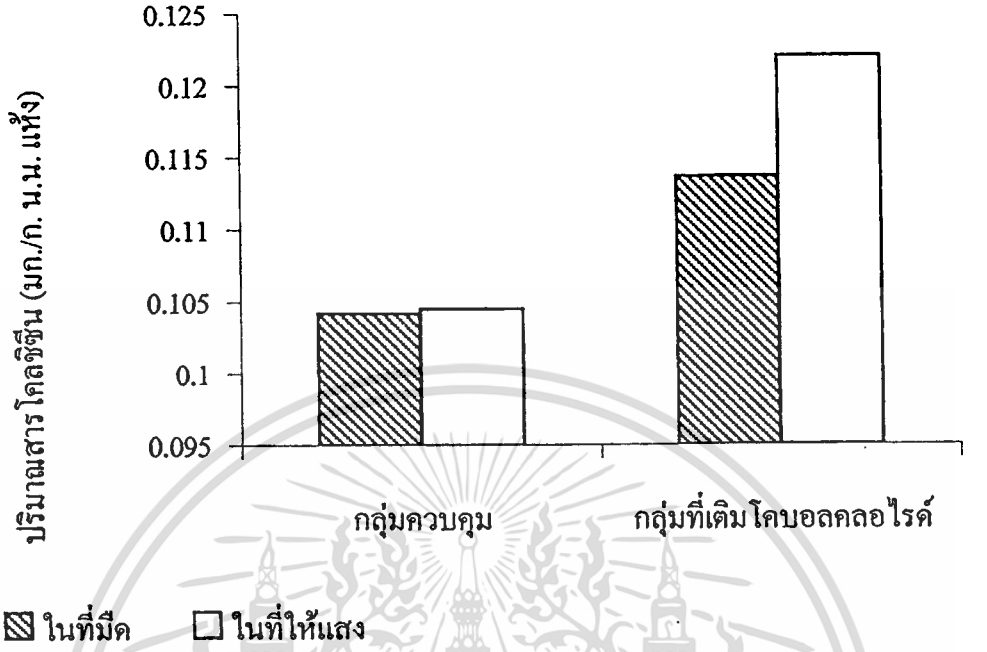
ก ข

รูปที่ 4.25 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง

ก บน : กลุ่มควบคุม ล่าง : กลุ่มทดลอง (ในที่ให้แสง)

ข บน : กลุ่มควบคุม ล่าง : กลุ่มทดลอง (ในที่มืด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.26 ผลของโคบอลคลอไรด์ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดและที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

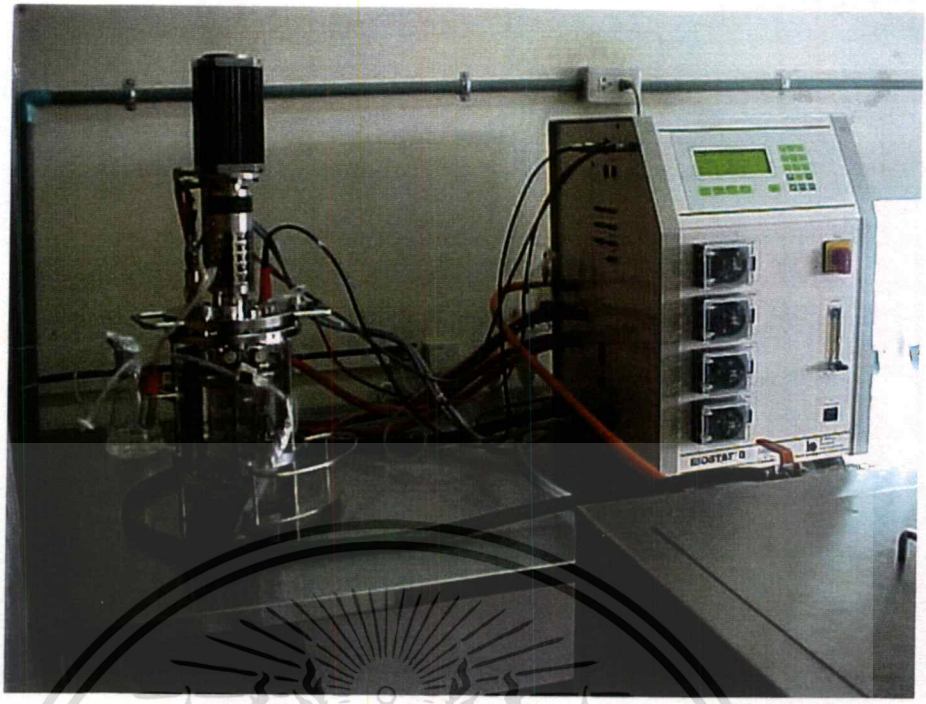
4.7 ผลการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร แสดงดังรูปที่ 4.27 ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 มีน้ำหนัก 1.210 กรัม จากน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้น 1.000 กรัม ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเข้มปนขาว และแคลลัสบางก้อนมีสีเหลืองเข้มปนน้ำตาล ขนาดของก้อนแคลลัสมีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ปนกัน ซึ่งแคลลัสที่มีขนาดใหญ่มักเกาะอยู่ตามขอบถังหมักบริเวณบัฟเฟิล (baffle) ส่วนแคลลัสที่มีขนาดเล็กมักกระจายอยู่ทั่วไป และส่วนใหญ่มักอยู่ใกล้ที่พ่นอากาศ แสดงดังรูปที่ 4.28 ลักษณะการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.29

จากการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ระดับถังหมัก ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้เท่ากับ 0.117 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แสดงดังรูปที่ 4.30

จากการทดลอง พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลิตสารโคลชิซีนได้เท่ากับ 0.117 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งได้น้อยกว่าที่เลี้ยงในระดับฟลาสก์เขย่าเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากใช้ถังหมักที่ไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์พืช โดยถังหมักที่ใช้ในการทดลองเป็นแบบมีใบพัดอาจทำให้เซลล์แตกหักเสียหายได้ (Hens *et al.*, 1994) และอาจเป็นเพราะระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงยังไม่เหมาะสมต่อการสร้างอัลคาลอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Khanna *et al.* (1977) ได้ศึกษาการสร้างอัลคาลอยด์ atropine ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Atropa belladonna* Linn. ปรากฏว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณ atropine สูงสุดถึง 0.53 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อแคลลัสมีอายุ 8 สัปดาห์

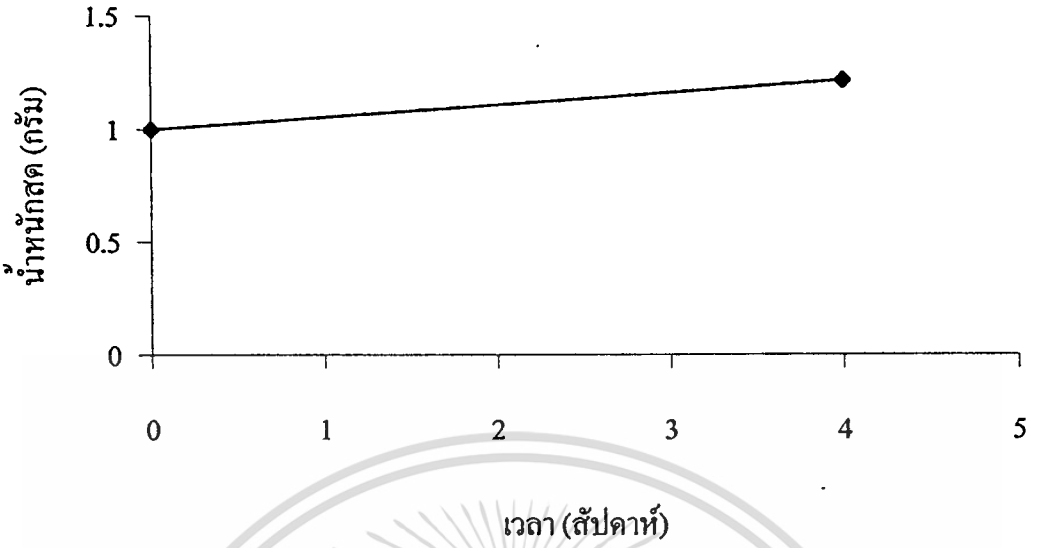
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



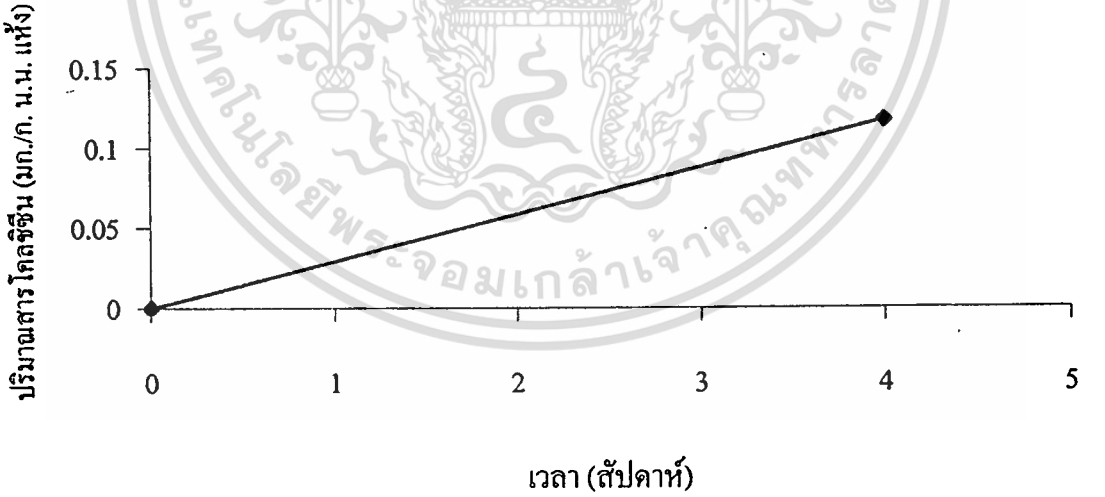
รูปที่ 4.27 การเพาะเลี้ยงแคลลัสดองดึงในอาหารเหลว MS ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

รูปที่ 4.28 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง



รูปที่ 4.30 ผลของแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ในที่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การศึกษาผลของฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ต่อการเจริญเป็นแคลลัสของเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS

จากการศึกษาผลของฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเป็นแคลลัสของเหง้าดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักเริ่มต้น 0.362 กรัม เมื่อเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 1.286 กรัม และเมื่อเลี้ยง 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.210 กรัม นำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ได้จากทุกๆ 4 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.1.2 การศึกษาผลของสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสง ต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

จากการศึกษาสภาวะการเลี้ยงในที่มืดและให้แสง ต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.766 กรัม เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัส เมื่อเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 8 สัปดาห์ที่ 12 และสัปดาห์ที่ 16 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.1.3 การศึกษาผลของฮอร์โมนต่อการเจริญของแคลลัสดองดึงในอาหารเหลว MS

จากการศึกษาผลของฮอร์โมนต่อการเจริญของแคลลัสดองดึง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS พบว่าสูตรอาหารที่ 11 คือเติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตดีที่สุด มีน้ำหนัก 0.670 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้น 0.230 กรัม น้ำหนักเพิ่มขึ้น 0.440 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.4 การศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

จากการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิ-ซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสเจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในที่มืด ที่ความเข้มข้นของแอลฟีนิลอะลานีน 0 โมลาร์ (กลุ่มควบคุม) เวลาในการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.62 กรัม ส่วนการผลิตสารโคลชิซีน พบว่าปริมาณสารโคลชิซีนมีมากที่สุดเท่ากับ 0.612 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

5.1.5 การศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการ เจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ในที่ให้แสง

จากการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็น เวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS มีการเจริญเติบโตดีกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS โดยสัปดาห์ที่ 8 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด มีน้ำหนัก 0.948 กรัม และ 0.916 กรัม ตามลำดับ ส่วนการผลิตสารโคลชิซีน พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS มีการผลิตสารโคลชิซีนมากกว่าที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS มีเท่ากับ 0.612 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.142 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

5.1.6 การศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP

จากการศึกษาผลของโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมโคบอลคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก 2.481 กรัม ส่วนการผลิตสารโคลชิซีนมากที่สุด 0.140 มิลลิ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมโคบอลคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

5.1.7 การศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ระดับถังหมัก ขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาผลของสารต้นตอแอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโคลชิซีนของแคลลัสดองดึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีน้ำหนักสดเท่ากับ 1.210 กรัม จากน้ำหนักสดเริ่มต้น 1.000 กรัม การผลิตสารโคลชิซีน พบว่ามีปริมาณสารโคลชิซีนเท่ากับ 0.117 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองนี้ พบว่าปริมาณสารโคลชิซีนที่ผลิตได้จากแคลลัสมีปริมาณน้อยกว่าเหง้าธรรมชาติมาก ดังนั้น ควรมีการศึกษาการเลี้ยงเซลล์ดองดึงด้วยวิธีอื่นอีก เช่น วิธีเลี้ยงเซลล์ราก หรือชักนำให้เป็นต้นพืช และควรจะหาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงในถังหมัก เพื่อประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

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." **ธรรมชาติศึกษาฉบับแนะดอกไม้ป่าของประเทศ.** ส.ประสิทธิ์การพิมพ์. ฉบับประจำเดือนพฤษภาคม. หน้า 453.

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

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

เต็ม สมิตินันทน์. 2523. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.** ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง : กรุงเทพฯ. 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.** ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 158 หน้า.

ปรีดี เอกะวิภาต. 2523. "กลอริโอซา." **ในชีวิตที่ต้องรดน้ำ.** กรุงสยามการพิมพ์. หน้า 29.

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

พรพรหม พรหมเมศร์ , ชัยฤกษ์ สงวนทรัพยากร , ยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา และนิรันดร์ จันทวงศ์. 2538. "การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของดองดึง." **วารสารสมุนไพร.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์. 2(2) : 27-33.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรทิพา พิชา , กัลยา ปรีชานุกูล และผ่องพรรณ ศิริพงษ์. 2528. "การทดสอบสมุนไพรเพื่อหาสารต้านมะเร็ง." การประชุมวิชาการเรื่องการพัฒนายาจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ. หน้า 129-130.

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. หน้า 43-46.

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

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

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

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

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

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

สมสุข ศรีจักรวาฬ และปราโมทย์ เกิดศรี. 2541. "การพัฒนาของดอกดองดึงเมื่อปลูกในช่วงเวลาต่างๆ ." **วารสารวิชาการเกษตร.** 16(1) : 42-48.

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

สุนทรี สิงหบุตรา. 2535. **สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด.** คุณ 39 : กรุงเทพฯ. 160 หน้า.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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 หน้า.

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 : New York. 1221 p.

Butcher, D.N. 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. Springer-Verlag : New York. Berlin Heidelberg. p 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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.

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." 727-743. **in** Sharp , W.R. (ed.). **Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications.** Ohio State University Press : Columbus.

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

Dvorackova, S. , Sedmeera, P. , Potesilova, H. , Santavy, F. and Simanek, 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. and Dustin, J.P. 1955. **Colchicine in Agriculture , Medicine , Biology and Chemistry.** The Lowa State College Press : 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Evan, W.C. 1939. "Drugs of biological origin." **English language book society. in :** Pharmacognocy , 13th ed. Baillier : London. 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. Springer-Verlag : Berlin : 146-166.

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

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.

Hens, J.G. , Walter, M. , Jurriaan, E. , Paulo, R.H. , Vinke, J.L. , Heijnen, J.J. and Robert , V. 1994. "Ajmalicine production by cell cultures of *Catharanthus roseus* : from shake flask to bioreactor." **Plant cell. Tissue and organ culture.** 38 : 85-91.

Hooker, J.D. 1894. **Flora of British India.** Vol Vl. Kent. Reeve, L : England.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Hussey, G. 1975. "Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae and Amaryllidaceae. **J. Exp. Bot.** 26 : 253-262.

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 l. Clearendon Prees : Oxford:.

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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. p 14.

Marshall, J.G. andi Staba, E.J. 1976. "Hormonal effects on diosgenin biosynthesis and growth in *Dioscorea deltoidea* tissue cultures." **Phytochem.** 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 : Florida. 167-190.

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

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "Arevsed medlum for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." **Physiol. Plant.** 15 : 473-497.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nickell, L.G. 1980. "Products." **in** Staba, J. (ed.). **Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals.** CRC Press : 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.

Salisbury, F.B. 1969. **Plant Physiology.** Belmont : California. 747 p.

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 : 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.

Street, 1969. "Growth and organized systems-knowledge gained by culture of organs and tissue explants." **Plant Phyiology.** Academic Press : New York. 5(B) : 3-224.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Street, H.E. 1973. "Old Problems and New Perspectives." **Plant Tissue and Cell Culture.** University of California Press : 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. and Bibliogy. Nonformal. Public.** 21 : 183.

Tabata, M. , Yamamoto, H. , Hiraoka, N. and Konoshima, M. 1972. "Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Scopolia parviflora.*" **Phytochem.** 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.

Waraporn, P. and Boonyean, K. 2001. "Production of colchicine from root cultures of *Gloriosa Superba* Linn." **Thai J. Pharm. Sci.** 25(1-2) : 75-80.

Wildman, W.C. 1960. "Colchicine and related compounds" 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 ก
อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog , 1962)

สูตรอาหาร MS ประกอบด้วย

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

1.2 การเตรียมอาหาร

1.2.1 ดูดสารละลายจาก Stock solutions ต่างๆ ที่เตรียมไว้มารวมกัน โดยใช้ปริมาตรตามที่คำนวณไว้ตามต้องการ

1.2.2 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาล แล้วแต่สูตรอาหารที่ใช้ ซึ่งในการทดลองนี้นี้ใช้ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

1.2.3 เติมฮอร์โมน หรือสารเคมีอื่นๆ ตามความต้องการของสูตรอาหาร

1.2.4 ปรับปริมาตรสารละลายอาหารให้ได้ครบตามที่ต้องการเตรียม

1.2.5 ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยกรดเกลือ (HCl) และ KOH ให้ได้ค่าประมาณ 5.5-5.8

1.2.6 เติมวุ้น (กรณีอาหารกึ่งแข็ง และอาหารแข็ง) ในการทดลองนี้เติมวุ้น 8 กรัมต่อลิตร กรณีเตรียมอาหารแข็ง และไม่ใส่วุ้นกรณีเตรียมอาหารเหลว

1.2.7 เคี่ยวอาหารเพื่อหลอมละลายวุ้นโดยใช้ Hot plate เตาแก๊ส หรือเตาไมโครเวฟ

1.2.8 เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยง

1.2.9 นำภาชนะอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นลง

2. สารต้นตอและสารกระตุ้นอชีวภาพที่เติมในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 การเตรียมสารต้นตอ (precursor) คือแอลฟีนิลอะลานีน

สารละลายความเข้มข้น 1 โมลาร์ (M) คือ สารละลาย 1 ลิตร มีสารแอลฟีนิลอะลานีน 1 โมล (แอลฟีนิลอะลานีน 1 โมล เท่ากับ มวลโมเลกุลของแอลฟีนิลอะลานีน คือเท่ากับ 165.19) ดังนั้น ในสารละลาย 1 ลิตร มีสารแอลฟีนิลอะลานีน เท่ากับ 165.19 กรัม

ในการทดลองนี้ เตรียมสารต้นตอคือ แอลฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 10^{-1} โมลาร์ เป็น stock solution ซึ่งทำดังนี้

0.1 โมล ชั่งสารมา 16.519 กรัม ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ในการทดลองนี้เตรียม 100 มิลลิลิตร ดังนั้น ชั่งสารมา 1.6519 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate) กับชุดกรองมิลลิพอร์ โดยกรองในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

2.2. การเตรียมสารกระตุ้นอชีวภาพ (abiotic elicitor) คือ โคบอลคลอไรด์

สารละลาย 0.1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock sulution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

1. การหาน้ำหนักสดของเซลล์(fresh weight)

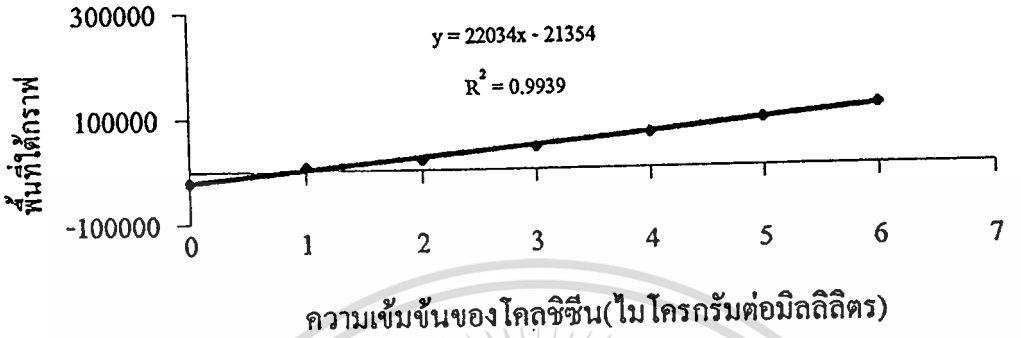
ทำได้โดยการกรองเซลล์แขวนลอยด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วล้างเซลล์ออกจากกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์ไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ แล้วชั่งหาน้ำหนัก

2. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (dry weight)

ทำได้โดยกรองเซลล์แขวนลอยด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง บันทึกน้ำหนักเซลล์ครั้งสุดท้าย (ประศาสตร์ , 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค



ภาพภาคผนวก ค แสดงกราฟมาตรฐานของสารโคลชิซีน

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