สำนักหอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของปัจจัยบางประการต่อการเกิดแคลลัสของต้นแพงพวยฝรั่ง

นางสาว นีลวรรณ พงศ์ศิลป์

นาย ประมวล ศรีกาหลง

ปพ.
นา๑๔พ
2535

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

6125 8078

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of some factors on callus induction of Catharanthus roseus

Miss Neelawan Pongsilpa

Mister Pramoun Srikalong

A Special Project Submitted in Partial Fulfilment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของปัจจัยบางประการต่อการเกิดแคลลัสของต้นแพงพวยฝรั่ง
โดย	นางสาว นีลวรรณ พงศ์ศิลป์
	นาย ประมวล ศรีกาหลง
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะ วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____

(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม) หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(อาจารย์ อุ่นเรือน ศิริวาณิชกุล)

_____ กรรมการ

(ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต)

_____ กรรมการ

(ผศ.มาลินี ตันติยาภรณ์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของปัจจัยบางประการต่อการเกิดแคลลัสของต้นแพงพวยฝรั่ง
นักศึกษา	นางสาวนีลวรรณ พงศ์ศิลป์
	นายประมวล ศรีกาหลง
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2536

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแพงพวยฝรั่งในครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการเกิดแคลลัส เช่น ชนิดของสูตรอาหาร(MS และ LS),ความเข้มข้นของฮอร์โมน(2,4-D และ Kinetin),อุณหภูมิ และ การปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้ได้ใช้ส่วนของใบ,ก้านใบ และปล้อง ในการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงชนิดของเมล็ด (เมล็ดสด และ เมล็ดแห้ง) ต่อการงอกเป็นต้น ที่ให้แคลลัส รวมทั้งได้พยายามศึกษาถึงจำนวนโครโมโซมในเซลล์ของราก ดอก และ แคลลัส

จากผลการทดลองพบว่าสูตรอาหาร LS ให้ผลดีกว่า MS คือจะเกิดแคลลัสได้เร็วกว่า โดยที่อัตราส่วนของ 2.4-D และ Kinetin ที่ให้ผลดีต่อการเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อใบในสูตรอาหาร MS คือ 0.5 : 0.12 และที่ให้ผลดีต่อการเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อปล้องในสูตรอาหาร LS คือ 1.0 : 0.12 สำหรับอิทธิพลของอุณหภูมิ พบว่าที่อุณหภูมิ 25 c ให้ผลดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ 20 c คือเกิดแคลลัสได้เร็วกว่าและขนาดใหญ่กว่า ส่วนชนิดของราที่ตรวจพบ (เรียงลำดับการเกิดขึ้นมากไปน้อย) ได้แก่ Penicillium sp. , Aspergillus sp., Ascomycetes ที่สร้าง asci 1 ชนิด , Botritis sp. , ราน้ำ 1 ชนิด ส่วนชนิดของเมล็ดที่มีผลต่อการงอกนั้นพบว่า เมล็ดแห้งให้ผลดีกว่าเมล็ดสดทั้งเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส และขนาดเฉลี่ย สำหรับการศึกษาด้านโครโมโซมนั้น เนื่องจากเวลาในการทำวิจัยมีจำกัดจึงไม่อาจศึกษาได้สมบูรณ์ถึงขั้นนับจำนวนโครโมโซมได้ แต่ได้เห็นระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสในเซลล์ราก รวมทั้งได้พบว่าเซลล์ของแคลลัสนั้นมีสองขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Effect of some factors on callus induction of Catharanthus roseus
Name	Miss Neelawan Pongsilpa Mister Pramoun Srikalong
Special Project Advisor	Asst.Prof Pannee Dhitaphichit
Department	Applied Biology
Academic Year	1992

Abstract

The studies on tissue culture of Catharanthus roseus emphasized on factors which may affect callus induction . e.g. types of media (MS and LS) , concentrations of hormones (2.4-D and kinetin) , temperature and microbial contamination . The explants used were leaf , petriole and internode . Types of seeds whether . fresh or commercially dry , were studied for effects in seed germination to give callus . Study on number of chromosome from cells of root tips , flowers and calli was attempted in ordered to prove any mutation occured in cells of calli .

The results showed that LS medium was better than MS in giving quicker result in callus induction . For MS medium , the best combination of the two hormones when using 'leaf' as explant was 0.5 : 0.12 mg/l . In LS medium , when using "internode" as explant , the best combinetion of the 2 hormones was 0.0 : 0.12 mg/l . Temperature at 25 c was proved better in quicker and bigger calli formation than at 20 c . The fungi found contaminated in cultures were as follows in order of frequency occurred : Penicillium sp. , Aspergillus sp. , 1 unidentified ascomycetes (bearing asci with 8 ascospores in each ascus) , Botritis sp. , and 1 unidentified species of water mold . It was found that dry seeds were better in germination

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

than fresh seets , either in percent and size of callus formation Due to limit of time studied , the attempts in counting numbers of chromosomes in cells of root tips , flowers and callus were not successful , but , it was found that the cells of calli were of two sizes .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษ " ผลของปัจจัยบางประการต่อการเกิดแคลลัสของต้นแพงพวยฝรั่ง" สามารถสำเร็จลุล่วงได้ผลดี โดยความช่วยเหลือของบุคคล หลายท่าน หลายฝ่าย ซึ่งให้การอนุเคราะห์ด้านต่างๆ ทางคณะผู้จัดทำโครงงานพิเศษขอกราบขอบพระคุณทุกท่าน ดังรายนามต่อไปนี้

1.ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต อาจารย์ที่ปรึกษาผู้ควบคุมโครงงานพิเศษ ซึ่งกรุณาควบคุมดูแลในขั้นตอนต่างๆ ของการปฏิบัติการ ทั้งให้แนวคิดข้อมูล และ เอกสารประกอบ อันเป็นประโยชน์ ตลอดจนแก้ไขปัญหา และ อุปสรรคต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่

2.ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ซึ่งกรุณาเอื้อเฟื้ออำนวยความสะดวกทั้งในด้านสถานที่ อันมีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นต้น และเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในปฏิบัติการของโครงงาน รวมถึงให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ด้วย

3.อาจารย์ วีรศักดิ์ สุรพัฒน์ ที่กรุณาช่วยเหลือในด้านการวินิจฉัยและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

4.อาจารย์ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนให้โครงงานนี้สัมฤทธิ์ผล

5.เจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านการจัดหาอุปกรณ์ และให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ

6.นักศึกษาทุกท่านและผู้มีอุปการะคุณที่ไม่อาจเอ่ยนามได้

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณมา ณ.ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแพงพวยผรั่ง Catharanthus roseus	3
2.2 การเพาะปลูก	6
2.3 การตลาด	6
2.4 ราคา	7
2.5 คู่แข่ง	7
2.6 ช่องทางการตลาดและการแข่งขันกับผลิตภัณฑ์อื่น	7
2.7 เหตุผลและความเหมาะสมสำหรับการปลูกในประเทศไทย	8
2.8 ข้อกำหนดคุณภาพและลักษณะในการซื้อขาย	8
2.9 แพงพวยผรั่ง สมุนไพรที่ใช้รักษามะเร็ง	9
2.10 การผลิตอัลคาลอยด์โดยการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช	13
2.11 อัลคาลอย (alkaloid)	15
2.12 อินโดล อัลคาลอย (indole alkaloids)	15
2.13 ไอโซควินโนลีน อัลคาลอย (isoquinoline alkaloids)	16
2.14 ข้อได้เปรียบของการผลิตอัลคาลอยด์โดยอาศัยเทคนิคการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช	16
2.15 เอนไซม์ที่แยกได้จากเซลล์ของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สร้างอัลคาลอย	17
2.16 เปรียบเทียบอัลคาลอยที่ได้จากพืชธรรมดากับการเลี้ยงเซลล์เนื่อเยื่อ	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืช

2.17 การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ 21

2.18 การเติมสารตั้งต้นเพื่อการผลิตอัลคาลอยในการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช 21

2.19 บทสรุป 22

2.20 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 23

2.21 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 23

2.22 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 25

2.23 ชนิดของแคลลัส 26

2.23 สารเคมีในการควบคุมการเจริญเติบโต 27

2.24 ประโยชน์ของสารควบคุมการเจริญเติบโต 27

2.25 ออกซิน (auxin) 28

2.26 ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 29

2.27 ไซโตไคนิน (cytokinin) 29

2.28 การสกัดใบแพงพวยฝรั่งด้วยเบนซิน 30

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ 36

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 36

3.2 วิธีการวัดการงอกของเมล็ดแพงพวยฝรั่งในสูตรอาหาร MS ภายใต้ปัจจัยควบคุม ได้แก่ แสง และ ชนิดของเมล็ด (สด,แห้ง) 39

3.3 วิธีการวัดอัตราการเจริญเป็นแคลลัสของชิ้นส่วนพืชในสูตรอาหาร MS และ LS ภายใต้ปัจจัยควบคุมที่ได้แก่ อุณหภูมิ, สูตรอาหาร, ชิ้นส่วนพืช 42

3.4 วิธีการตรวจเชื้อราที่ปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 46

3.5 วิธีการตรวจนับโครโมโซมใน ดอก,รากและแคลลัสของแพงพวยฝรั่ง 46

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 49

4.1 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของเมล็ดแพงพวยฝรั่ง 49

4.2 การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ 53

4.3 การเกิดแคลลัสจากก้านใบ 53

4.4 การเกิดแคลลัสจากปล้อง 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 อิทธิพลของชนิดของอาหารและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเกิดแคลลัส 55

4.6 การศึกษาชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนในระหว่างการทำการทดลอง 64

4.7 การศึกษาโครโมโซมในเซลล์ปลายราก , ดอก และแคลลัส 72

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและการเสนอแนะ 76

ภาคผนวก 78

ภาคผนวก ก แสดงการคำนวณผลทางสถิติของการศึกษาอิทธิพลของชนิดของอาหารและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเกิดแคลลัส 79

ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมอาหารและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 92

เอกสารอ้างอิง 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	แสดงประโยชน์ของ vinblastine และ vincristine ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ	12
2-2	แสดงอาการพิษของ vinblastine และ vincristine	13
2-3	ตัวอย่างอัลคาลอยจากพืชที่มีคุณค่าความสำคัญด้านเภสัช	14
2-4	ตัวอย่างของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยที่แยกมาจากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช	17
2-5	ตัวอย่างของการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชซึ่งสะสมอัลคาลอยในปริมาณที่สูงกว่าพืชที่ใช้เป็นพันธุ์ตั้งต้น	20
2-6	แสดงลักษณะของสารที่ได้จากการสกัดใบแพงพวยฝรั่งด้วยเบนซิน จากตัวทำละลายชนิดต่างๆ	31
3-1	แผนดำเนินงานโดยสังเขปเพื่อหา % การงอกของเมล็ดแพงพวยฝรั่งในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS	41
3-2	การให้คะแนนแคลลัสที่เจริญจากเมล็ด	42
3-3	แสดงความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ kinetin ที่ใช้ในการทดลอง	43
3-4	แผนดำเนินงานโดยสังเขปเพื่อหา % การสร้างแคลลัส	45
3-5	การให้คะแนนแคลลัสที่เจริญจากชิ้นส่วนพืช	46
4-1	แสดงจำนวนเมล็ดที่มีการงอก คิดเป็น % การงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MS	49
4-2	แสดงจำนวนเมล็ดที่งอกแล้วพัฒนาเป็นแคลลัส คิดเป็น % การสร้างแคลลัสเทียบกับจำนวนเมล็ดที่งอก	50
4-3	แสดงจำนวนแคลลัสและค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัส	50
4-4	แสดงขนาดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเมล็ดแพงพวยฝรั่ง และค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัส	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A-1 ผลของการเกิดแคลลัสของแพงพวยฝรั่งเมื่อนำชิ้นส่วนของใบ, ก้านใบ และปล้อง มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4--D และ kinetin ในอัตราส่วนต่างๆ 56

A-2 ผลของการเกิดแคลลัสของแพงพวยฝรั่งเมื่อนำชิ้นส่วนของใบ, ก้านใบ และปล้อง มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4--D และ kinetin ในอัตราส่วนต่างๆ 57

B-1 means for leave (no. callus) based on original scale 58

means for leave (no. callus) based on transformed scale 58

B-2 means for leave (no. callus) based on original scale 59

means for leave (no. callus) based on transformed scale 59

B-3 means for internode (no. callus) based on original scale 60

means for internode (no. callus) based on transformed scale 60

B-4 means for internode (no. callus) based on original scale 61

means for internode (no. callus) based on transformed scale 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะต้นที่ให้แคลลัส (อายุ 10 สัปดาห์)	54
2	แสดงแคลลัสที่เกิดจากใบ (อายุ 5 สัปดาห์)	62
3	แสดงแคลลัสที่เกิดจากก้านใบ (อายุ 5 สัปดาห์)	63
4	แสดงโครงสร้างของ Penicillium sp. (10 X 40)	64
5	แสดงลักษณะของ Penicillium sp. ในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	65
6	แสดงโครงสร้างของ Aspergillus sp. (10 X 40)	66
7	แสดงลักษณะของ Aspergillus sp.ในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	66
8	แสดงเส้นใย Ascomycetes ที่สร้าง asci (10 x 40)	67
9	แสดงลักษณะของ Ascomycetes ที่สร้าง asci ในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	67
10	แสดง asci และ ascospores ของ Ascomycetes ที่สร้าง asci (10 x 40)	68
11	แสดงเส้นใยและสปอร์ของรา Botritis sp. (10 x 40)	68
12	แสดงลักษณะของ Botritis sp. ในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	69
13	แสดงโครงสร้างภายนอกของราน้ำชนิดหนึ่ง (10 x 40)	70
14	แสดงลักษณะของ Bacteria ชนิดหนึ่งที่ตรวจพบในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	71
15	ดอกแพงพวยฝรั่ง	73
16	แสดง pollen mother cells ในระยะ tetrad เพราะการแบ่งไมโอซิสได้สิ้นสุดลงพอดี	74
17	เซลล์แคลลัสขนาดใหญ่	75
18	เซลล์แคลลัสขนาดเล็ก	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

การศึกษาผลของปัจจัยบางประการต่อการเกิดแคลลัสของต้นแพงพวยฝรั่ง ซึ่งจะเป็นแนวทางสำหรับผู้ที่ต้องการที่จะศึกษาค้นคว้าต่อไปอีก เหตุจูงใจการศึกษานี้ คือ ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาพบว่าแพงพวยฝรั่งมีคุณสมบัติทางยา โดยได้มีการนำต้นที่อยู่ในธรรมชาติมาสกัดทางเคมี ซึ่งต้องใช้ต้นแพงพวยฝรั่งในปริมาณมากจึงจะได้สารเคมีที่ต้องการ ดังนั้น ทางคณะผู้ศึกษามีความคิดว่า เทคนิคทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ น่าที่จะนำมาพัฒนาในด้าน การผลิตสารเคมีแทนที่ได้จากการสกัดจากธรรมชาติ จึงได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยพื้นฐานเบื้องต้นที่จำเป็น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยบางประการ(ประเภทของเมล็ด (สด,แห้ง),ปริมาณแสง) ที่มีต่อการงอกของเมล็ดแพงพวยฝรั่งในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตร MS เปรียบเทียบผลที่ได้ของปัจจัยร่วมในด้าน เปอร์เซนต์การงอก

2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ ของฮอร์โมน (2,4-D และ kinetin) , อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง , สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (MS และ LS) ต่อการชักนำชิ้นส่วนพืชให้เจริญเป็นแคลลัส พร้อมทั้งคำนวณหา เปอร์เซนต์การสร้างแคลลัส

3. ศึกษาชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนมาในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4. ตรวจนับจำนวน ของโครโมโซมในดอก, ราก และ แคลลัส ของแพงพวยฝรั่ง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงปัจจัยร่วมที่เหมาะสม สามารถเลือกปริมาณแสง,ประเภทของเมล็ดที่ให้ เปอร์เซนต์ การงอกสูงสุด

2. ทำให้ทราบถึงปัจจัยร่วมที่เหมาะสม สามารถเลือกความเข้มข้นของ ฮอร์โมน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2,4-D และ kinetin และ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS และLS ที่ให้ เปอร์เซนต์การสร้างแคลลัส สูงสุด

3.ทำให้ทราบถึงชนิดของเชื้อราที่มักปนเปื้อนกับชิ้นส่วนของต้นแพงพวยฝรั่ง เพื่อเป็นประโยชน์ในการหาวิธีการทำความสะอาดพื้นผิวที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมต่อไป

4.ทำให้ทราบถึงจำนวน ของโครโมโซมในดอก,ราก และ แคลลัสของแพงพวยฝรั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

แพงพวยฝรั่ง

Catharanthus roseus G.Don

แพงพวยฝรั่ง Catharanthus roseus G.Don เป็นพืชซึ่งมักจะเรียกชื่อสับสน เป็น Vinca rosea L. หรือ Lochnera rosea L. พืชในตระกูล Catharanthus มีอยู่ 6 species คือ C. Lanceus Pich

C. Longifolius Pich

C. Trichophyllus Pich

C. roseus G.Don

C. pusillus G.Don และ

C. scitulus Pich

เนื่องจากความสับสนเรื่องชื่อตระกูลดังกล่าว Steam จึงได้ศึกษาและยืนยันว่าชื่อตระกูลที่ถูกต้องคือ Catharanthus

C. Lanceus Pich, C. Longifolius Pich, C. Trichophyllus Pich, C. scitulus Pich เป็นชนิดที่พบใน Madagascar

C. pusillus Pich เป็นชนิดที่พบในอินเดีย ส่วน C. roseus เป็นไม้ประดับปลูกทั่วไป ที่ปลูกเชิงการค้ามี Madagascar, อินเดีย, อิสราเอล และ สหรัฐอเมริกา

แพงพวยฝรั่งเป็นพืชเมืองร้อนอาจจะมีต้นกำเนิดใน Madagascar แล้วขยายพันธุ์ไปทางอินเดีย, อินโดจีน, อินโดนีเซีย, ฟิลิปปินส์, ออสเตรเลีย, อาฟริกาใต้ และประเทศทางตะวันออก, อเมริกาเหนือ, หมู่เกาะอินเดียตะวันตก แพงพวยฝรั่งมีมากในเกาะ Madagascar (เรียกกันว่า Madagasear Periwinkle) ประเทศโรมแซมบิค, อิสราเอล, อินเดีย และ ศรีลังกา, Guiana, บราซิล เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก โตเร็ว ขนาดสูง 40-80 ซม. ใบเป็นชนิด oblong จัดเรียงตัวแบบตรงข้าม ฐานใบแหลม ปลายใบมน ใบมันโดยเฉพาะใบอ่อน ดอกสีม่วง ชมพู หรือ ขาว แต่อาจจะมีสายพันธุ์อื่นๆ อีกที่ได้จากการผสมพันธุ์ แต่ form ที่ยอมรับคือ F. albus G.Don เป็นดอกสีขาว และ F. ocellatus G.Don ดอกสีชมพู ผลเป็นชนิด fllicle ขนาดยาว 2.5-4 ซม. และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว้าง 2-3 ซม. มีเมล็ด 12-20 เมล็ด เมล็ดมีเปลือกหุ้มบางๆ สีดำแพงพวยฝรั่งในตำรายาไทย ใช้พอกผิวหนังพุพอง ปวดแสบ ปวดร้อน หรือ รักษาเริม ในต่างประเทศมีรายงานการใช้ใบรักษาเบาหวาน มีผู้พยายามทดลองฤทธิ์ในการรักษาเบาหวานแต่ผลที่ได้ไม่แน่นอน ใช้รากเป็นยาทำให้แท้ง ในเวียดนามใต้ใช้เป็นยาฝาดสมานและยาขม ยาฆ่าบิด ขับเหงื่อ ลดการขับน้ำนม แก้อาการอาหารไม่ย่อย แก้ไข้มาลาเรียโรคผิวหนัง ทำให้ประจำเดือนปกติ แต่ในทางแผนปัจจุบันแพงพวยมีความสำคัญมาก เนื่องจากมีผู้สกัดเอา Vinblastine (Vincaleukoblastine) และ Vincristine (leurocristine) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งบางชนิด Vinblastine sulfate ใช้รักษาโรค Hodgkin's disease และรักษามะเร็งในต่อมน้ำเหลือง choriocarcinoma เนื้องอกในระบบประสาท(Neuro blastoma) เนื้องอกในเต้านม ปอด และ รักษามะเร็งในเม็ดเลือด ทั้งชนิดเรื้อรัง และเฉียบพลัน Vincristine sulfate ใช้รักษามะเร็งในเม็ดเลือดในเด็ก และ มะเร็งในต่อมน้ำเหลือง และ ใช้รักษา Hodgkin's disease, Wilms' tumour, มะเร็งในระบบประสาท เนื้องอกชนิด Sarcoma

อัลคาลอยอื่นๆ ก็มีผู้ตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง แต่ผลไม่ดีเท่า Vindesine ซึ่งเป็นอัลคาลอยที่สกัดจากเมล็ด และ ใบ มีฤทธิ์ทั้ง myelosuppressive และ ฤทธิ์ต่อประสาทกำลังอยู่ในระหว่างทดลอง อัลคาลอยที่มีความสำคัญในทางยาอีกชนิดหนึ่ง คือ ajmalicine (raubasine) ซึ่งได้จากรากแพงพวยฝรั่ง มีฤทธิ์เป็น Vasodillator และใช้เป็นยาลดความดันโลหิต แต่มีในธรรมชาติน้อย ส่วนใหญ่ได้จากวิธีการกึ่งสังเคราะห์จาก alkaloid serpentine นอกจากอัลคาลอยดังกล่าวยังพบอัลคาลอย catharanthine, catharine, isoleurosine, leurosine, lochnerisine, lochneridine, lochnerine, pervinine, reserpine, tetrahydroserpentine (Ajmalicine), vincaleukoblastine, vinblastine, vincamajoridine, vincamidine, vindoline, vindolinine 2 HCl, virosine ซึ่งในจำนวนอัลคาลอยกว่า 66 ชนิด นอกจาก VLB และ VCR มี 4 ชนิดที่มีฤทธิ์เป็น anticancer แต่มีประสิทธิภาพต่างๆ กัน ได้แก่

leurisine (Vinleurosine, VLR)

leurisidine (Vinrosidine)

leurosivine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

rovidine

ดังนั้นปริมาณอัลคาลอยทั้งหมดในใบ อยู่ระหว่าง 0.7-0.82 % การแยกค่อนข้างซับซ้อน ปัจจุบันนี้ผลในการสกัดแยกอัลคาลอยยังต่ำอยู่ กล่าวคือใบ 1 ตันจะได้ vincristine 50 มิลลิกรัม และ vinblastine 2 กรัม

ส่วนของพืชที่เอามาใช้ คือ ใบ, ลำต้น และ ราก ในครั้งแรกทางการวิทยาศาสตร์นำพืชชนิดนี้ มาทดสอบหาคุณสมบัติในการลดน้ำตาลในเลือด เพื่อใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน ตามที่ชาวพื้นเมืองนิยมใช้กัน ทำให้ค้นพบโดยบังเอิญ (ในปี ค.ศ.1955)ว่าพืชนี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (tumor) ได้ จึงได้ทำการค้นคว้าขนานใหญ่ ทำให้สามารถสกัดอัลคาลอยออกมาได้จากราก, ลำต้น และ ใบของCatharanthus roseus ได้ถึง 66 ชนิด

อัลคาลอยที่สำคัญ 2 ชนิด ที่นำมาใช้ผลิตยารักษาโรคมะเร็ง (มี antineoplastic action) คือ Vincaleukoblastine หรือ Vinblastine (ซึ่งแยกได้ในปี 1960) Vinblastine นั้นได้ใช้ประโยชน์ในการรักษาโรค Monocytic leukemia, Hodgkin's disease และlymphomas Carcinomas, Seminoma และ embryonal tumors ของ testis. Methotrxate resistany chorio-carcinoma และ Histiocytosis

ส่วน Vincristine นั้นใช้รักษา Acute leukemia, Hodgkin's disease, Lymphosarcoma, Carcinomas, Astroytomas, Neuroblastoma, Phabdmyosarcoma, Wilm's tumour

อัลคาลอยทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำเป็นรูปยาฉีด เป็นสารที่มีพิษ (toxicity) จึงจำเป็นต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง ปริมาณอัลคาลอยในพืชนี้มีต่ำมาก ใบแพงพวยผรั่งที่ตากแห้งและบดละเอียดแล้วจำนวน 2 ตัน จะให้อัลคาลอยที่รักษาโรคได้ จำนวน 1 กรัมเท่านั้นซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้ทำยารักษาเด็กคนหนึ่งๆ ได้เพียง 6 สัปดาห์ แพงพวยผรั่งปลูกจากภูมิอากาศแตกต่างกัน จะให้อัลคาลอยได้ไม่เท่ากัน เช่น ที่มาจากอิสราเอล จะให้อัลคาลอยสูงกว่าที่มาจากแหล่งอื่น

ประเทศที่ปลูกแพงพวยผรั่งเป็นจำนวนมากเพื่อส่งออกคือ มาดากัสการ์ แต่ไม่มีรายงานละเอียดเกี่ยวกับการปลูกพืชนี้จากประเทศใดๆ ได้เคยมีการทดลองปลูก ในประเทศสหรัฐฯ พบว่าสามารถเก็บใบมาทำยาได้ในช่วงเวลา 3-4 ปี หลังจากนั้นต้นจะแก่เกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงค่อยถอนต้นขึ้น นำเอาส่วนรากมาตากแห้งเป็นยาต่อไป

การเพาะปลูก

แพงพวยฝรั่งสามารถปลูกได้ในดินร่วน หรือ ดินบนทราย การขยายพันธุ์ทำได้โดยใช้เมล็ดเพาะในกระบะฝังเมล็ดประมาณ 2 ซม. แล้วทิ้งไว้ในที่ร่ม ประมาณ 1 อาทิตย์เมล็ดจะงอก เมื่อกล้าได้ขนาด 7.5-10.5 ซม. จึงนำไปปลูกเป็นแถวห่างกัน 30 ซม. และระหว่างแถว 45 ซม. ใส่ปุ๋ยดอกผสมกับ di- ammonium phosphate และ K หลังจากปลูกได้ประมาณ 2 เดือน จะเริ่มออกดอก และ ดอกจะออกเรื่อยไป ประมาณ 4-5 เดือน จะเริ่มการเก็บเกี่ยวครั้งแรก เมื่อแพงพวยฝรั่งอายุได้ 6 เดือน และ หลังจากนั้นอีกทุก 3 เดือน ส่วนรากจะเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุ 1 ปี การตากแห้งใบใช้ตากในที่ร่ม ส่วนราก ตากแดดแล้วเอามาผึ่งในที่ร่ม

การตลาด

เนื่องจากแพงพวยฝรั่งไม่ใช่เป็นสินค้าที่ซื้อขายกันมาก จึงไม่มีรายงานปริมาณความต้องการของตลาดที่แน่นอน บริษัทที่ผลิตยาจากแพงพวยฝรั่งมี 2 แห่ง คือ ในสหรัฐอเมริกา ซึ่งก็ปลูกแพงพวยฝรั่ง อีกแห่งหนึ่งคือ ในยุโรปตะวันออก ซึ่งได้แพงพวยฝรั่งจาก มาดากัส-การ์. อินเดีย. อิสราเอล และ ปลูกเอง สำหรับรากแพงพวยฝรั่ง เยอรมัน, ฝรั่งเศส, และ อิตาลี นำไปผลิต ajmalicine แต่เนื่องจากความต้องการ ajmalicine ลดลง ทำให้ความต้องการแพงพวยฝรั่งลดลง ขณะนี้มีบริษัท Boehringer Mamheim (เยอรมัน) และ Inverni della Beffa (อิตาลี) ที่ผลิต ajmalicine

รายละเอียดเกี่ยวกับการผลิตและการค้าของ Catharanthus roseus นั้น ยังหาไม่ได้ เนื่องจากยังไม่มีรายงานการค้าออกมาจากประเทศใด ผู้ขาย และ บริษัทยาที่ซื้อไปทำการสกัดก็ให้รายละเอียดได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งพบว่าผู้ซื้อรายใหญ่ สำหรับใบแพงพวยฝรั่งคือ บริษัทยา อิล ไลลิลลี่ ของสหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นผู้ถือสิทธิบัตรในการสกัด vinblastine การซื้อเข้าโดยผ่านบริษัทการค้าแห่งหนึ่ง เป็นปริมาณใบ 600 ตัน ต่อปี แต่ปริมาณที่บริษัทยาต้องการใช้ทั้งหมดใน 1 ปี นั้นเป็น 2 เท่าของจำนวนนี้ ในจำนวน 600 ตัน พบว่าสั่งมาจาก มาดากัสการ์ 300 ตัน อีก300 ตัน มาจากประเทศอื่นซึ่งคงเป็นจากอินเดีย โรมแซมบิค และ จำนวนอีกเล็กน้อยจากอิสราเอล สหรัฐอเมริกาเป็นตลาดสำคัญ สำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบแพงพวยฝรั่ง ประเทศในยุโรปบางประเทศก็ต้องการซื้อเหมือนกัน ได้แก่ สหราชอาณาจักร, เยอรมัน, เนเธอร์แลนด์ และ ฮังการี ในสหราชอาณาจักรนั้น บริษัทหนึ่งสั่งเข้ามาปีละ 10 ตัน และ บริษัทนำเข้าอื่นๆ อีกหลายราย นำเข้าปีละหลายร้อยกิโลกรัมต่อบริษัท

ซึ่งทั้งนี้ได้นำส่งออกขายต่อให้แก่ประเทศในทวีปยุโรป ในเยอรมันมีหลายรายที่สนใจจะสั่งซื้อรากแพงพวยฝรั่งและ ประเทศฮังการีจะเป็นตลาดสำคัญสำหรับใบ (รัฏฐาภิรักษ์,2521)

ราคา

ราคาไม่มีใน Hamburg Price แต่มีรายงานว่ารากกิโลกรัมละ 1 ปอนด์

ราคาที่ได้จากสหรัฐอเมริกาในปี1972 ซื้อขายกันในราคา 0.40-0.50 ปอนด์/กก. ในสหราชอาณาจักร ราคา 250 ปอนด์/ตัน สำหรับใบจากอินเดีย และ 300 ปอนด์/ตัน สำหรับใบแพงพวยจากอิสราเอล ทั้งหมดนี้เป็นราคา C.I.F. ในเยอรมันให้ราคา DM 1.20/kg. สำหรับใบ และ DM 1.75/kg. สำหรับรากจากประเทศต่างๆ (รัฏฐาภิรักษ์, 2521)

คู่แข่ง

เนื่องจาก vincristine มีน้อยในธรรมชาติ จึงได้มีผู้พยายามศึกษาหาวิธีเปลี่ยน vinblastine ไปเป็น vincristine และ การเปลี่ยน monomeric alkaloid เช่น Catharanthine, Vindoline ไปเป็น dimeric alkaloid และ มีการศึกษาวิธีการปลูกโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งถ้าการศึกษาเหล่านี้ได้ผลดีก็จะทำให้ความต้องการแพงพวยฝรั่งลดลง

สำหรับความต้องการใช้แพงพวยฝรั่งเพื่อผลิต ajmalicine ก็ลดลงเช่นกัน เนื่องจาก ajmalicine อาจได้มาจาก Rauwolfia หรือ Voacanga สรุปแล้วความต้องการแพงพวยฝรั่งในตลาดโลกมีแนวโน้มที่จะลดลง

ช่องทางการตลาดและการแข่งขันกับผลิตภัณฑ์อื่น

ตั้งแต่ค้นพบมาจนบัดนี้ ยังไม่มีใครสังเคราะห์อัลคาลอยจาก Catharanthus ได้ การค้นคว้าหายารักษามะเร็งที่เป็นไปอย่างจริงจังและกว้างขวาง ทำให้พบสารต่างๆ เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันมากรวมทั้ง สิ่งที่ได้จากพืชด้วย โดยเฉพาะยาที่ได้มาจากพืชพวก fungi แต่ผลิตภัณฑ์แต่ละอย่างก็แสดงฤทธิ์ต่อมะเร็งเฉพาะชนิด ยังไม่มีสิ่งที่สกัดจากพืชอื่นหรือยาสังเคราะห์ใดให้ผลเช่นเดียวกับ vincristine และ vinblastine

บริษัทยาที่ค้นพบอัลคาลอยทั้งสองของสหรัฐอเมริกา ต้องการใช้วัตถุดิบ ในการสกัดเป็นจำนวนมหาศาลต่อปี มีรายงานว่าบริษัทนี้ได้ลงทุนในการปลูกพืชชนิดนี้เองแต่ก็ยังต้องซื้อเข้าเป็นจำนวนมากจากตลาดโลก โดยผ่านบริษัทการค้า ผู้ผลิตใหม่ อาจถือเป็นช่องทางสำหรับขายได้ทางหนึ่ง ตลาดใหญ่อีกแห่งหนึ่ง คือ ฮังการี ซึ่งยังซื้อจากบริษัทการค้าในยุโรป รวมทั้งประเทศสหราชอาณาจักร และ เยอรมันก็จะเป็นผู้ซื้อสำหรับพืชนี้ด้วย (รัฐฐาภิรักษ์,2521)

<u>เหตุผลและความเหมาะสมสำหรับการปลูกในประเทศไทย</u>

ภูมิอากาศของประเทศไทย เหมาะสมต่อการปลูกพืชชนิดนี้ จะเห็นได้ว่าแพงพวยฝรั่งหรือแพงพวยบกนี้ ปลูกเป็นไม้ประดับกันโดยทั่วไป เป็นพืชที่ขึ้นง่าย และ ทนต่อโรคพืช หากเกษตรกรจะทดลองปลูกให้เป็นการจริงจัง ปลูกต้นแพงพวยฝรั่ง ห่างกันต้นละ 50 เซนติเมตร พื้นที่ 1 ไร่จะสามารถปลูกได้ถึง 6.400 ต้น ซึ่งคาดว่าจะให้ใบแห้งราว 1,000-1.500 กิโลกรัม ซึ่งจะทำเงินได้นับหมื่นบาท/ไร่ ด้วยเหตุที่ตลาดโลกต้องการใบแพงพวยฝรั่งเป็นจำนวนมากต่อปีและผู้แข่งขันในการส่งออกมีน้อย อาจมีช่องทางหาตลาดได้ดี ประกอบกับเป็นพืชที่ขึ้นง่ายปลูกได้ในประเทศไทยทุกภาค ทั้งทำรายได้ดีพอสมควร หากสนับสนุนให้มีการปลูก เชื่อว่าจะเป็นพืชเศรษฐกิจได้อีกชนิดหนึ่ง (รัฐฐาภิรักษ์,2521)

<u>ข้อกำหนดคุณภาพและลักษณะในการซื้อขาย</u>

ไม่มีข้อกำหนดที่แน่นอน โดยที่พืชในสภาพที่ยังไม่ได้สกัดตัวยาออกมานั้นไม่ได้เข้าอยู่ในตำรับยาของประเทศใดๆ แม้แต่ใน European Pharmacopoeia หรือ International Pharmacopoeia ก็ตามแต่ alkaloid vinblastine และ vincristine มีข้อกำหนดไว้ใน United States Pharmacopoeia XVIII และใน British Pharmacopoeia ดังนั้นการซื้อขายจึงขึ้นกับตัวอย่างที่นำมาแสดงเป็นหลัก และ การทดสอบหาปริมาณอัลคาลอย อย่างไรก็ดี ใบแพงพวยฝรั่งจะต้องนำมาทำให้แห้งจนเหลือปริมาณความชื้นไม่เกิน 9 % แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรจุอัดแน่นในตระกร้าหรือถังเพื่อส่งออก (รัฏฐาภิรักษ์, 2521)

แพงพวยฝรั่ง สมุนไพรที่ใช้รักษามะเร็ง

ปัจจุบันในประเทศไทย ได้มีการตื่นตัวสนใจศึกษา และวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรกันอย่างกว้างขวาง รัฐบาลและหน่วยงานหลายแห่งของรัฐก็ได้สนับสนุน และจัดเป็นนโยบายที่สำคัญอย่างหนึ่ง พืชชนิดหนึ่งที่ประชาชนคุ้นเคยเป็นอย่างดี และ พบเห็นอยู่เสมอไม่ว่าในท้องถิ่นภาคเหนือ ใต้ กลาง อีสาน ตะวันออก หรือ ตะวันตกของประเทศ พืชชนิดนี้มีชื่อเรียกต่างๆ กัน ชาวบ้านโดยทั่วๆ ไปเรียกว่า "แพงพวยฝรั่ง" หรือ "พังพวยฝรั่ง" บ้างก็เรียกว่า "แพงพวยบก" หรือ "พังพวยบก" เพราะมีใบคล้ายแพงพวยซึ่งขึ้นในน้ำทั่วๆ ไป ชาวจังหวัดสุราษฎร์เรียกว่า "นมอินทร์" ส่วนชาวเกาะสมุย, เกาะพงันเรียกว่า "ดอกขี้หมู" ฯลฯ ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ คือ Periwinkle, Rose Periwinkle หรือ Madagascar Periwinkle สำหรับชื่อทางพฤกษศาสตร์ได้แก่ Catharanthus roseus พืชชนิดนี้อยู่ในวงศ์ Apacyanaceae (The Dogbane Family) แพงพวยฝรั่งหรือแพงพวยบก เป็นต้นไม้พุ่มเตี้ยๆ ชนิดหนึ่ง มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกากลาง ต่อมาได้กระจายพันธุ์เข้ามาในประเทศภูมิภาคแถบร้อน รวมทั้งประเทศไทย และแพร่พันธุ์ออกมามากมายจนถึงขนาดประเทศอเมริกา และประเทศในทวีปยุโรปต้องสั่งซื้อแพงพวยฝรั่งจากประเทศไทย ทั้งนี้เพราะมันมีสารพวกอัลคาลอยบางชนิดที่ใช้บำบัดโรคมะเร็ง

แพงพวยฝรั่ง เป็นไม้เนื้ออ่อนสูงไม่เกิน 3 ฟุต มีกิ่งก้านสาขามาก ใบค่อนข้างหนา ขนาดใบยาวประมาณ 4 ซม. มีสีเขียวเข้มเป็นมัน ออกเป็นคู่ๆ สลับกันตามข้อต้น เมื่อขยี้ดมดูจะมีกลิ่นเหม็นเขียว ไม้พุ่มเตี้ยชนิดนี้จะออกดอกครั้งแรกเมื่ออายุประมาณ 70 วัน หลังจากนั้นจะมีดอกสะพรั่งตลอดปี โดยมีดอกออกที่ยอดและมักติดกันเป็นกลุ่ม หรือช่อๆ ละ 3-6 ดอก แต่ละดอกมี 5 กลีบเท่าๆ กัน ขนาดของดอกกว้างประมาณ 7 ซม. ดอกมีสองสีสดมาก คือ ชนิดสีขาว ซึ่งจะมีวงในดอกสีเหลือง และ ชนิดสีชมพูบนม่วงมีวงในดอกสีม่วงแดง กลิ่นไม่หอม และถ้าขยี้ดมดูจะมีกลิ่นเหม็นเขียว ดอกแต่ละดอก บานนานประมาณ 3-5 วัน แล้วก็จะเหี่ยวเฉาและร่วงหล่นไป ต่อจากนั้นจะมีผลเป็นฝักแผดติดกัน ยืดยาวออกมาแทนเป็นคู่ๆ บนฐานรองดอก แต่ละฝักมีขนาดเท่าๆ กับ ไส้ดินสอดำยาวประมาณ 3 ซม. ปลายฝักเรียว ข้างในมีเมล็ดขนาดเล็กเรียงเป็นตับ ประมาณ 7-21 เมล็ด เมื่อฝักแก่จะมีสีดำ ถ้าฝักแตกเมล็ดจะร่วงหล่นลงดิน ซึ่งถ้าได้รับความชื้น ก็จะงอกเจริญเติบโตเป็นต้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แพงพวยผรั่งนับว่าเป็นต้นไม้ที่ขยายพันธุ์ได้ง่ายโดยใช้เมล็ดเพาะ สามารถขึ้นได้ในดินเกือบทุกชนิด แม้แต่ตามดินทรายแถบชายทะเล แต่ถ้าต้องการปลูกให้ได้ผลดีหรือเพื่อขายแล้ว ก็ควรปลูกกลางแจ้ง ในดินร่วนซุย ตามริมสองฝั่งแม่น้ำหรือคลองหรือในทำเลที่มีปุ๋ยธรรมชาติอยู่บ้างตามสมควร โดยเหตุที่มันมีกลิ่นเหม็นเขียวจึงทำให้มันปลอดจากแมลงและศัตรูพืชอื่นๆ ในสมัยก่อนชาวพื้นเมืองในอาฟริกาใต้, อินเดีย, ฟิลิปปินส์ และ ออสเตรเลีย นิยมเอาใบแพงพวยผรั่งไปตากแห้ง แล้วนำมาชงกับน้ำร้อน (คล้ายกับชงน้ำชา) ให้ผู้ที่เป็นโรคเบาหวานดื่ม เพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือด จนกระทั่งมีนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษสนใจได้เอาใบแพงพวยผรั่งไปจากชาวจาไมก้า ไปทดลองให้กระต่ายกิน ผลปรากฏว่าระดับน้ำตาลในเลือดไม่เปลี่ยนแปลงเลย และแม้ว่าเขาจะสกัดเอาอัลคาลอยจากใบแพงพวยผรั่งไปฉีดให้กระต่าย ก็ไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดเช่นกัน แต่กลับปรากฏว่า ในเวลาต่อไปไม่นานกระต่ายที่ใช้ในการทดลองตายหมด เมื่อตรวจชากศพดูจึงพบว่า กระต่ายทุกตัวมีโรคติดเชื้อแบคทีเรียซูโดโมนาส (Pseudomonas) จึงได้ค้นหาสาเหตุและสรุปว่า การที่สัตว์ตายด้วยโรคติดเชื้อ หลังจากได้รับอัลคาลอยจากใบของแพงพวยผรั่ง อาจเนื่องจากร่างกายสูญเสียความต้านทานเพราะเม็ดเลือดขาวมีจำนวนลดน้อยลงมาก แต่ก็ไม่กระทบกระเทือนต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงและระบบอื่นๆ ผลการทดลองครั้งนี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ชาวต่างประเทศที่กำลังสนใจค้นหาสมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษามะเร็ง ได้พุ่งความสนใจแพงพวยมากขึ้น จนสามารถสกัดอัลคาลอย จากแพงพวยผรั่งมากกว่า 62 ชนิด โดยสกัดได้ครั้งแรกเมื่อ ค.ศ.1949 จนกระทั่ง ดร. C.T.Beer แห่งมหาวิทยาลัย Western Ontario สามารถสกัด Vivcaleublastine ,VLB จากต้นแพงพวยผรั่งเป็นคนแรก และ ต่อมาได้ทดลองใช้ vinblastine ที่ได้จากอัลคาลอย VLB รักษาผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งชนิดหนึ่ง (Hodgkin 's disease) ที่ต่อมน้ำเหลือง ม้าม และ ตับ ซึ่งไม่สามารถใช้ยาใดๆ มาบำบัดให้หายได้ เมื่อได้รับการรักษาโดย vinblastine ปรากฏว่าผู้ป่วยมีอาการกระเตื้องขึ้นเป็นลำดับ น้ำหนักเพิ่มขึ้นสามารถกลับบ้านไปทำงานได้ตามปกติ หลังจากได้รับการเยียวยาอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 4 เดือน และ หายจากโรคมะเร็งไปได้ 2 ปี 6 เดือน หลังจากนั้น อาการก็กลับปรากฏขึ้นอีก จึงได้มีผู้ทดลองให้ Vincristine รักษาผู้ป่วยคนเดิม ซึ่งทำให้ผู้ป่วยหายจากโรคมะเร็งไปได้อีกนานกว่า 1 ปี การทดลองครั้งนี้แม้ว่าไม่สามารถทำให้ผู้ป่วยหายขาดจากโรคมะเร็ง แต่ก็นับว่าเป็นการบุกเบิก เพื่อค้นคว้าวิจัยหาสมุนไพรมาใช้รักษามะเร็งต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัลคาลอย Vincristine และ Vinblastine ที่สกัดได้จากแพงพวยฝรั่ง มีสูตรโครงสร้างและ คุณสมบัติทางเคมีคล้ายๆ กัน แต่มีผลทางชีววิทยา และ ประโยชน์ที่ใช้ในการรักษามะเร็งแต่ละชนิดตลอดจนฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์ต่างกัน Vincristine ใช้รักษาโรคมะเร็งได้มากชนิดกว่า และฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งได้แรงและนานกว่า เป็นพิษต่อไขกระดูกและเซลล์ปกติอื่นน้อยมาก แต่ Vinblastine กดการทำงานของไขกระดูก ทำให้โลหิตมีเม็ดเลือดขาวน้อยกว่าปกติ และ เกล็ดเลือดน้อยกว่าปกติ (Thrombocytopenia) ปัจจุบันแพทย์ไม่นิยมใช้ยาทั้งสองตัวใดตัวหนึ่งแต่เพียงลำพังขนานเดียว โดยทั่วไปมักนิยมให้ร่วมกับยารักษามะเร็งขนานอื่นๆ หลายๆ ขนาน ซึ่งปรากฏว่าได้ผลดี การให้ยาโดยมากมักให้โดยฉีดเข้าหลอดโลหิตดำ ซึ่งยาฉีดประเภทนี้ มีราคาค่อนข้างแพง ประมาณเข็มละ 600 -1,000 บาท อัลคาลอย ที่มีอยู่ในแพงพวยฝรั่ง ซึ่งมีผลในการรักษาโรคมะเร็ง นับว่ามีปริมาณน้อยมาก ตัวอย่างเช่น Vincristine มีอยู่ในใบเพียง 0.00005 % ถ้าต้องการ Vincristine 1 กรัม เพื่อฉีดให้ผู้ป่วยโรคมะเร็ง ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ คงจะต้องสกัดจากใบแพงพวยฝรั่งหนักถึง 2,000 กิโลกรัม หรือ 2 ตัน มิฉะนั้น ก็ต้องสกัดจากรากแพงพวยฝรั่งหนัก 400 กิโลกรัมในปีหนึ่งๆ บริษัทยาใหญ่ๆ ในประเทศเยอรมัน, ฝรั่งเศส, อิตาลี และ สหรัฐอเมริกา ได้สั่งซื้อรากแพงพวยฝรั่งจากอาฟริกา, ออสเตรเลีย, อินเดีย และประเทศไทย ประมาณปีละ 4,000 ตัน สำหรับประเทศอิตาลีได้มีบริษัทผลิตยาใหญ่แห่งหนึ่งสั่งซื้อรากแพงพวยฝรั่งตากแห้งจากไทยเราปีละประมาณ 150 ตัน ในราคากิโลกรัมละ 25 บาท (ราคาส่งถึงท่าเรืออิตาลี เมื่อ พ.ศ.2519) ซึ่งราคานี้จะเปลี่ยนแปลง ตามสภาวะตลาดโลก (นพมาศ,2523)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-1 แสดงประโยชน์ของ Vinblastine และ Vincristine ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ

ยา	ผลการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ		
	ดีมาก	ดี	ปานกลาง
Vinblastine	Hodgkin's disease	Chorio-carci-noma มะเร็งที่อัณฑะ	มะเร็งที่ไต
Vincristine	Acute lymphatic leukemia	Ewing's	มะเร็งที่เต้านม
	Wilm's tumor มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma)	Neuroblastoma	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-2 แสดงอาการพิษของ Vinblastine และ Vincristine

ยา	พิษอย่างเฉียบพลัน	พิษที่เกิดอย่างช้าๆ
Vinblastine	คลื่นไส้ อาเจียน หลอดโลหิตดำบริเวณที่ฉีดยาอักเสบถ้าฉีดยาไม่เข้า	กดไขกระดูก ผมร่วง ปากอักเสบ สูญเสียการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อเอ็นถูกกระตุ้น ปวดคาง
Vincristine	หลอดโลหิตดำบริเวณที่ฉีดยาอักเสบถ้าฉีดยาไม่เข้า	ปลายเส้นประสาทนอกสมองอักเสบ ปวดเกี่ยวกับประสาทอักเสบ ผมร่วง กดไขกระดูก ท้องผูกอย่างแรง

<u>การผลิต alkaloid โดยการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช</u>

ในช่วงเวลาประมาณสิบกว่าปีที่ผ่านมานี้ ค้นพบว่าการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งสามารถใช้ได้ในการผลิตสารทุติยสารเพื่อประโยชน์ทางการค้าได้ แนวโน้มในการได้เปรียบเหนือการปลูกตามธรรมชาติแบบดั้งเดิมได้เป็นที่ปรากฏแล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในข้อที่ว่าการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชไม่ขึ้นกับภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และ ปัญหาทางการเมือง นอกจากนี้ การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชยังสามารถควบคุมสภาวะการเจริญเติบโตให้เกิดสูงสุดได้ การควบคุมคุณภาพให้คงที่ และ การสกัดแยกสารกระทำได้ง่ายกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-3 ตัวอย่างอัลคาลอยจากพืชที่มีคุณค่าความสำคัญด้านเภสัช (Anderson, 1986)

การออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	ตัวอย่างอัลคาลอย
ระบบประสาทส่วนกลาง	Reserpine, Caffeine
ระบบประสาทอัตโนมัติ	
โคลิเนอร์จิค(Cholinergic)	Physostigmine, Pilocarpine
สกัดกั้นโคลิเนอร์จิค(Cholinergic blocking)	Atropine, Hyoscyamine
แอดดริเนอร์จิค(Adrenergic)	Ephedrine
สกัดกั้นแกงเกลียน(Ganglion blocking)	Nicotine
การบำบัดโดยสารเคมี	
ยาต้านมะเร็ง	Vinblastine, Vincristine Harringtonine, Camptothecin
ยาบำบัดโรคบิด	Emertine
ยาต้านมาลาเรีย	Quinine
ยาต้านจุลชีพ	Barberine
ระบบหัวใจและหลอดเลือด	
ยาขยายหลอดลม	Papaverine, Theophyline Vincamine
ยาลดความดัน	Reserpine, Rescinnamine Protoveratrines A and B
ยารักษาโรคหัวใจ	Quinidine, Ajmaline
ยาระงับปวด	Morphine, Codeine
ยาแก้ไอ	Glaucine, Noscapine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-3 ตัวอย่างอัลคาลอยจากพืชที่มีคุณค่าความสำคัญด้านเภสัช (Anderson, 1986)(ต่อ)

การออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	ตัวอย่างอัลคาลอย
ยาลดอักเสบ	Colchicine
ยาคลายกล้ามเนื้อลาย	Tubocurarine
ยาชาเฉพาะที่	Cocaine

จากเอกสารทางวิทยาศาสตร์ในช่วงสิบปีนี้ได้ตรวจพบอัลคาลอยจำนวนมากจากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช โดยครอบคลุมประเภทของอัลคาลอยเกือบทั้งหมด ตัวอย่าง เช่น อินโดลส์ (indoles) isoquinolines, quinolines, quinolizidines tropanes acridones และ purines ความสนใจส่วนใหญ่มุ่งอยู่ที่ indole และ isoquinolines ซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่อัลคาลอยจากพืช

อัลคาลอย

โดยทั่วไป หมายถึง สารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic) ที่มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุลตั้งแต่หนึ่งอะตอมขึ้นไป มีรสขม มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง ถ้าใช้มากมักเป็นพิษ เช่น สตริกนิน หรือ บางชนิดใช้เป็นยาเสพติด เช่น มอร์ฟีน โคเคอีน ปัจจุบันมีอัลคาลอยหลายชนิดที่ใช้เป็นยารักษาโรค เช่น reserpine, vinblastine ฯลฯ ดังนั้น การสำรวจพืชเพื่อหาอัลคาลอยจึงอาจเป็นแนวทางที่จะทำให้ค้นพบตัวยาใหม่ๆ ได้ (พเยาว์และคณะ, 2524)

อินโดล อัลคาลอย (indole alkaloids)

จนถึงปัจจุบันนี้ ได้ตรวจพบสารประมาณ 47 ชนิดของ indole alkaloids จากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช บางชนิดเป็นประเภท non-iridoid และ canthin-6-one แต่ส่วนใหญ่แล้วเป็นสารซึ่งได้มาจากสารตั้งต้นประเภทอีริดอย (iridoid precusors)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเป็นตัวแทนของประเภทหลัก ที่ได้มีการตรวจพบแล้ว การศึกษาเกี่ยวกับแพงพวยฝรั่ง Catharanthus roseus เป็นศูนย์กลางใหญ่ของการศึกษาทางวิทยาศาสตร์มาตลอด อินโดลอื่นๆ ที่มีการผลิตโดยพันธุ์พืชอื่นๆ ได้มีการศึกษาบ้างเท่านั้น งานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งไปที่การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อของแพงพวยฝรั่ง จากการศึกษาที่มีมาแล้วจนถึงปัจจุบัน พบว่าเซลล์แพงพวยฝรั่งที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่สามารถที่จะสร้างสารสำคัญต้านมะเร็งประเภท dimeric indole ได้แก่ vinblastine และ vincristine แต่ว่าได้มีรายงานว่ามี dimeric indole 2 ชนิด แยกออกมาได้ โดยการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อของพืชอาร์บไซนาเซียส (Apocynaceous plant) คือ โวแคนก้า (Vocanga) ซึ่งเป็นข้อมูลที่แน่ชัดว่าอัลคาลอยประเภทไดเมอริค สามารถสร้างได้โดยเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ไอโซควินโนลีน อัลคาลอย (Isoquinoline alkaloids)

ไอโซควินโนลีน อัลคาลอย เป็นอีกตัวอย่างหนึ่ง ที่ได้มีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวาง ประมาณ 45 ชนิดของไอโซควินโนลีน ที่ได้มีการแยกจากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช เป็นตัวแทนของอัลคาลอยประเภทไอโซควินโนลีนส่วนใหญ่ทั้งหมด ความสำเร็จส่วนใหญ่ในการแยกสารทุติยภูมิจากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช ทั้งในแง่ของผลผลิตสูงสุด และ การศึกษาถึงขบวนการทางชีวสังเคราะห์ก็ได้มาจากอัลคาลอยในกลุ่มไอโซควินโนลีนนี้ แต่ว่าอัลคาลอยที่สำคัญที่สุดในแง่ของผลผลิตเภสัชภัณฑ์ คือ มอร์ฟีแนนส์ (morphinans) พบว่าสร้างขึ้นในเซลล์เนื้อเยื่อค่อนข้างยาก

ข้อได้เปรียบของการผลิตอัลคาลอยโดยอาศัยเทคนิคการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช

การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชนั้น มีข้อดีต่อการศึกษาด้านชีวสังเคราะห์ เหนือกว่าพืชธรรมดา เช่นสามารถกำหนดสภาวะมาตรฐานในการเจริญเติบโต ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการแปรผันของฤดูกาลและยังมีโครงสร้างที่ไม่ยุ่งยาก ดังนั้นจึงทำให้ไม่มีปัญหาในการรวมตัวกัน ซึ่งเป็นปัญหาในพืชธรรมดา เนื่องจากจำเป็นต้องใช้สภาวะปราศจากเชื้อ ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นจึงขจัดปัญหาของการบนเปื้อนจากจุลชีพ นอกจากนี้การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และระบบเซลล์อิสระสามารถตระเตรียมขึ้นได้โดยง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เอนไซม์ที่แยกได้จากเซลล์ของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สร้างอัลคาลอย

ในขบวนการชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยจากการเลี้ยงเซลล์พืช จากการศึกษาพบข้อเท็จจริงว่ามีเอนไซม์ ซึ่งเป็นกุญแจสำคัญไม่ต่ำกว่า 15 ตัว ได้ถูกแยกออกมาในระยะเวลาไม่กี่ปีมานี้

ตารางที่ 2-4 ตัวอย่างของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอย ที่แยกมาจากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช (Anderson et al. 1986 (2))

เอ็นไซม์	แหล่งที่มา
Strictosidine synthase	Catharanthus roseus
Strictosidine glucosidase I and II	Catharanthus roseus
Geissoschiizine dehydrogenase	Catharanthus roseus
Polynruridine aldehyde esterase	Raivolfia serpentina
Vellosimine reductase	Raivolfia serpentina
Vinorine synthase	Raivolfia serpentina
(S)-Norlaudanosoline synthase	ตย.Berberis, Eschscholtzia
SAM:(R),(S)-norlaudanosoline--6-0-methyltransferase	ตย.Berberis, Argemone
SAM:(6-0-methylnorlaudano-soline)- 4-0-methyltransferase	ตย.Berberis, Argemone
SAM:(R),(S)-norreticuline-N-methyltransferase	ตย.Berberis, Eschscholtzia, Fumaria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-4 ตัวอย่างของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอย ที่แยกมาจากการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช (Anderson et al. 1986 (2))(ต่อ)

เอ็นไซม์	แหล่งที่มา
SAM:(6-O-methylnorlaudano-soline)-5-O-methyltransferase	ตย.Argemone
Berberine bridge-forming enz.	ตย.Macleaya, Berberis
SAM:(S)-scoulerine-9-O-methyl-transferase	ตย.Berberis
(S)-Tetrahydroprotoberberineo-xidase(STOX)	ตย.Berberis
Methylenedioxy-ring-forming enz.	ตย.Berberis, Thalictrum

ตัวอย่างหนึ่งของการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช แสดงให้เห็นถึงการชีวสังเคราะห์ของเบอร์บีรีนจากสารตั้งต้นธรรมดา โดปามีน (dopamine) และ 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde ตามทางผ่านในการชีวสังเคราะห์ (intermediates) ต้องใช้เอ็นไซม์ถึง 8 ตัวช่วยกัน ซึ่งได้มีการตรวจพิเคราะห์ลักษณะแล้ว เบอร์เบอรีน เป็นอัลคาลอยที่ใช้เป็นยาตัวแรกที่ทราบถึงขบวนการชีวสังเคราะห์ในระดับเอ็นไซม์ และ ความก้าวหน้าที่ผ่านมานี้ เป็นสิ่งสำคัญมากในความเข้าใจ ต่อการใช้เซลล์พืช จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในการให้ความกระจ่าง ของแต่ละขั้นตอนในการชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ

เปรียบเทียบอัลคาลอยที่ได้จากพืชธรรมดากับการเลี้ยงเซลล์เนื่อเยื่อพืช

นอกจากการพิจารณาในแง่เศรษฐกิจแล้ว สาเหตุหลักในการขัดขวางไม่ให้การเลี้ยงเซลล์เนื่อเยื่อพืชแทนที่พืชธรรมดาตามธรรมชาติได้ในการผลิตอัลคาลอย เนื่องจากความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิต่ำกว่าพืชที่ปลูกตามธรรมชาติซึ่งเป็นพันธุ์ตั้งต้น ผลผลิตของเซลล์จากกการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกตามธรรมชาติ จึงจำเป็นต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบอย่างลึกซึ้ง มิฉะนั้นจะทำให้เข้าใจผิดพลาดว่า การเลี้ยงเซลล์เนื่อเยื่อพืช ให้ผลผลิตต่ำ ตัวอย่างเช่น เปลือกชิงโคน่าชั้นดี ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตควินีน และ ควินีนีตีนให้อัลคาลอยรวมมากกว่า 10% ของน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตาม ต้องคิดว่าผลผลิตนี้ คิดจาก หน่วยน้ำหนักของเปลือก ต้นซึ่งเป็นที่สะสมอัลคาลอย ไม่ใช่จากพืชทั้งต้น นอกจากนี้ ยังต้องคำนึงอีกว่า ในการเพาะปลูกที่อัฟริกาต้องใช้เวลาอย่างต่ำ 7 ปี ในการเพาะปลูก กว่าจะได้เก็บเกี่ยวเปลือกต้น และในบางสถานการณ์การสะสมอัลคาลอย ในปริมาณสูงสุด กินเวลานานถึง 20 ปี

ในช่วงเวลาประมาณ 10 ปีที่ผ่านมานี้ โดยเฉพาะการพัฒนาในความเข้าใจเกี่ยว กับสิ่งที่จำเป็น และ ต้องการในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ วิธีการคัดเลือกเซลล์ (cell selection) ทำให้มีตัวอย่างมากมายที่เนื้อเยื่อพืช สามารถสร้างสารทุติยภูมิ ได้มาก กว่าพืชธรรมดาที่ปลูกตามธรรมชาติด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-5 ตัวอย่างของการเลี้ยงเซลล์เนื่อเยื่อพืชซึ่งสะสมอัลคาลอยในปริมาณที่สูงกว่าพืชที่ใช้เป็นพันธุ์ตั้งต้น(Anderson et al. 1986 (2))

อัลคาลอย	พันธุ์	ผลผลิต(% นน.แห้ง)	
		เซลล์เนื้อเยื่อ	พันธุ์ตั้งต้น
Caffeine	Coffea	1.60	1.60
Pseudoephe-drine	Ephedra	2.25	0.60
Nicotine	Nicotina	3.40	2.50
Protopine	Macleaya	0.40	0.32
Biscoclaurines	Stephania	2.29	0.92
Ajmalicine & Serpenyine	Catharanthus	1.30	0.26
Canthin-6-Ones	Ailanthus	1.27	0.01
Berberine	Coptis	11.40	10.00
Jatrorrhizine	Berberis	10.00	1-2

ในปี ค.ศ.1982 ประมาณการว่าได้สารไม่น้อยกว่า 30 ชนิดพบสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อในระดับสูงกว่าพืชที่ใช้เป็นพันธุ์ตั้งต้น ในบางกรณีปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นได้ จากการคัดพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ (cell lines) ที่ให้ผลผลิตสูง ตัวอย่าง เช่น ajmalicine และ serpentine จากแพงพวยฝรั่ง (Catharanthus) และ Jatrorrhizine จากพืชตระกูล เบอร์บีรีส (Berberis species) ผลผลิตของจาโทรไรซีนจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเบอร์บีรีส ผลิตได้ 10% น้ำหนักแห้งของเซลล์ซึ่งคิดเป็น 2.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงสุดเหนือรายงานอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ในการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ โดยเฉพาะอัลคาลอย มีข้อควรคำนึงที่มีนัยสำคัญหลายประการ พันธุ์พืชที่ใช้ตั้งต้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงล้วนมีผลที่เห็นได้ต่อส่วนประกอบของอัลคาลอย และ ผลผลิตที่ได้ มีความจำเป็นต้องพัฒนาสายพันธุ์ของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงให้มีสมรรถภาพในการสังเคราะห์อัลคาลอย แต่ต้องเห็นความสำคัญของความสามารถของเซลล์หรือเนื้อเยื่อในการเก็บอัลคาลอยเหล่านี้ไว้ด้วย

สิ่งสำคัญที่น่าสนใจได้รวบรวมไว้มีดังต่อไปนี้คือ

(1)ความเข้าใจต่อขบวนการทั้งหลายในการพัฒนาให้เกิดสายพันธุ์ซึ่งให้ผลผลิตสูง

(2)สูตรอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและผลิตสาร

(3)อัลคาลอย และ สารทุติยภูมิบางชนิด ผลิตได้ในการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช แต่บางชนิดมีความจำเป็นต้องบังคับให้สร้างสารโดยการทำให้เกิดความเครียด (stress) หรือ ใส่สารกระตุ้น (elicitors) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารขึ้น

(4)ขบวนการทั้งหลายซึ่งอัลคาลอยถูกสร้างขึ้นและเก็บสะสมไว้ รวมทั้งสิ่งต่างๆ ซึ่งมีอิทธิพลต่อการสะสมของอัลคาลอยและการขับถ่าย สิ่งเหล่านี้มีความจำเป็นต้องศึกษาต่อไป

(5)มีความจำเป็นต้องเข้าใจถึงวิถีทางของการชีวสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอัลคาลอย และรวมถึง การพิสูจน์หาเอนไซม์ที่มีผลกระทบต่อกลไกการชีวสังเคราะห์

(6)ทราบถึงยีนส์พืชที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ต่างๆ ที่มีผลต่อ การสร้างสารทุติยภูมิ รวมทั้งการแยกยีนส์เหล่านี้เพื่อถ่ายเทไปยังเซลล์ที่เหมาะสมได้

การเติมสารตั้งต้นเพื่อการผลิตอัลคาลอยในการเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช

ในบางกรณีพบว่าการเติมสารตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถเพิ่มการผลิตอัลคาลอยได้ สามารถเพิ่มผลผลิตของอัลคาลอยที่ผลิตโดยเซลล์เนื้อเยื่อ อิแลนตุส (Ailanthus) และเนื้อเยื่อรากของชิงโคน่า ที่เลี้ยงโดยเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการเติม แอล-ทริปโตแฟน (L-tryptophan) ทำการทดลองโดยใช้สารตั้งต้นในสภาพกัมมันตภาพรังสี L-(methylene- ^{14}C)- tryptophan พบว่าเนื้อเยื่อของอิแลนทุส และ ชิงโคน่า สามารถใช้อัลคาลอยแคนทีโนน (canthinone) ควินนีน และ ควินนิดีน ตามลำดับ เซลล์เนื้อเยื่อของอิแลนทุส สามารถใช้กัมมันตรังสีอย่างรวดเร็ว ภายใน 15 นาที ครึ่งหนึ่งของสารตั้งต้นที่มีกัมมันตรังสีจะถูกใช้ไป แต่อัลคาลอยที่สร้างขึ้นโดยใช้สาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กัมมันตรังสีนี้ตรวจพบได้ในเวลาไม่ต่ำกว่า 48 ชั่วโมง แอล-ทริปโตแฟน ในปริมาณ 500 มก./ล. สามารถเพิ่มการผลิตอัลคาลอยได้ถึง 76 % การเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพรากของชิงโคน่า (Cinchona ledgeriana) ผลิตควินโนลีน อัลคาลอย คือ ควินนีน และควินนิดีน ซึ่งเป็นอัลคาลอยหลักในปริมาณต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับเปลือกชิงโคน่าที่ปลูกตามธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามเซลล์เนื้อเยื่อนี้มีความคงตัวในความสามารถที่จะผลิตอัลคาลอยนับเวลาเป็นปี เนื้อเยื่อรากชิงโคน่าเหล่านี้ สามารถขยายจำนวนกลุ่มได้ง่าย โดยกลุ่มของรากเดิมแตกออกมาเองและเจริญเป็นกลุ่มใหม่ เมื่อได้ขนาดประมาณ 0.5 ซม. ก็สามารถแตกตัวต่อไปได้อีก ดังนั้นจึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลว และ ในสภาพอิมโมบิไลส์ (immobilise) บนที่รองรับ

บทสรุป

ศักยภาพในการใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อผลิตอัลคาลอยและสารทุติยภูมิที่มีประโยชน์ แทนพืชทั้งต้นที่ปลูกตามธรรมชาติ มีแนวโน้มที่เป็นไปได้ อย่างไรก็ดีงานวิจัยด้านนี้ยังมีความจำเป็นต้องศึกษาวิจัยหาข้อมูลอีกมากเพื่อให้บรรลุถึงเป้าหมายที่ต้องการ เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็เป็นอีกวิธีหนึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ทั้งนี้เพราะในขณะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อมีโอกาสเกิด mutation หรือ variationได้ตลอดเวลาเช่นเดียวกับที่เกิดในธรรมชาติ ยิ่งกว่านั้น variation ที่เกิดในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีโอกาสแสดงออกได้มากกว่า เนื่องจากเซลล์พืชมีคุณสมบัติของ totipotency ทั้งค่าของ sheer number ของประชากรเซลล์ที่เลี้ยงในขวดแก้วนั้น มีค่าสูงกว่าในต้นพืชตามธรรมชาติมาก นักวิทยาศาสตร์จึงอาศัยหลักการนี้มาเพื่อใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการปรับปรุงพันธุ์ (Vajrabhaya, 1988 อ้างโดย สุภาภรณ์, 2531) การแปร (variation) ที่เกิดขึ้นโดยการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ เรียกว่า somaclonal variation พืชที่เกิดจากการกลายพันธุ์นั้น มีโอกาสที่จะได้ลักษณะดีขึ้น หรือ เลวลงกว่าต้นเก่า ซึ่งการกลายพันธุ์นี้อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) หรือบังคับให้เกิดขึ้นโดยใช้สารเคมี รังสี หรือ ปัจจัยทางธรรมชาติก็ได้ (Vajrabhaya, 1977 อ้างโดย สุภาภรณ์, 2531) ในอดีต การจะเกิดพันธุ์พืชใหม่ ต้องอาศัยการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์พืชเท่านั้น และโอกาสของการเกิดการกลายพันธุ์โดยธรรมชาติมีน้อยมาก ต่อมาถึงแม้ว่าจะมีการใช้รังสีหรือสารเคมีเพื่อเพิ่มอัตราการเกิด mutation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก็ยังได้รับพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้นน้อยอยู่ เพราะลักษณะการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น จะต้องเกิดที่เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) เท่านั้น จึงมีโอกาสแสดงออก แต่ในปัจจุบันนี้ได้อาศัยเทคโน-โลยีชีวภาพสมัยใหม่ คือ เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งการเกิดการกลายพันธุ์ ขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เซลล์ของแคลลัสมีโอกาสที่จะเจริญต่อไปเป็น growing point หรือ เจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ต่อไปได้ ด้วยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ ลักษณะการกลายพันธุ์ของพืชก็มีโอกาสแสดงออกได้มากกว่า (Vajrabhaya et al, 1983 อ้างโดย สุภาภรณ์,2531) และยิ่งใช้รังสีหรือ สารเคมีในขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะเพิ่มโอกาสของการเกิด mutation ได้มากขึ้น (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1974 ; นิด ธนาบริบูรณ์, 2527 อ้างโดย สุภาภรณ์,2531) ซึ่งวิธีการนี้จะช่วยประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย และ พื้นที่ในการคัดเลือกพันธุ์ใหม่ได้อย่างมาก นอกจากนี้การผันแปรที่เกิดขึ้น จากการกลายในระดับโครโม-โซม (chromosomal mutation) จะมีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์อย่างมาก โดยเราสามารถทำการคัดเลือกพันธุ์ใหม่ให้ได้ตามต้องการ เพื่อใช้ขยายพันธุ์โดยตรง หรือใช้เป็นแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (สุภาภรณ์, 2531)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

<u>ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u>

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การนำโปรโตพลาสต์ เซลล์ หรือเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะบางส่วนของพืช เช่น ยอด ลำต้น ราก ใบส่วนต่างๆ ของดอก หรือ ส่วนของผล มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ และ สภาพแวดล้อมเหมาะสม อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งได้ 2 ชนิด คือ อาหารแข็ง และ อาหารเหลว

<u>ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>

ปัจจุบันนักวิจัยในสาขาต่างๆ ทั้งทางด้านการเกษตร เภสัชวิทยา วิทยาศาสตร์ เช่น ชีวเคมี สรีรวิทยาของพืช เป็นต้น ต่างหันมาให้ความสนใจการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกันมาก เนื่องจาก เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยในสาขาต่างๆ ดังกล่าวได้เป็นอย่างดียิ่ง โดยสามารถทำให้ประหยัดเวลา แรงงานและงบประมาณ เมื่อเปรียบเทียบกับการวิจัยแบบวิธีเดิมที่เคยทำกันมา ประโยชน์ที่เห็นได้ชัดเจนและนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน ได้แก่

1.การผสมพันธุ์ ทั้งชนิดเดียวและต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การคัดเลือกพันธุ์พืช เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ต้านทาน หรือ ทนต่อโรค, แมลง, ยากำจัดวัชชพืช ทนต่อดินกรด หรือ ดินเค็ม

3.การขยายพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว

4.การผลิตพืชให้ปราศจากโรคไวรัส

5.การเก็บรวบรวมพันธุ์พืช และ แลกเปลี่ยนพันธุ์พืชระหว่างประเทศ

6.การผลิตยาจากพืชสมุนไพร

7.การศึกษาทางชีวเคมี และ สรีรวิทยาของพืช

ความประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่

1.อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งขึ้นอยู่กับ

ก.องค์ประกอบ ความเข้มข้น และ สัดส่วนของธาตุอาหารอนินทรีย์ ซึ่งได้แก่ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง

ข.องค์ประกอบ ความเข้มข้น และ สัดส่วนของธาตุอาหารอินทรีย์ ซึ่งได้แก่ วิตามิน กรดอะมิโนต่างๆ รวมทั้งสารควบคุมการเจริญ คือ สารกลุ่มออกซิน และ ไซโตไคนิน ซึ่งมีความสำคัญต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก นอกจากนี้ยังรวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ที่ยังไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน

ค.แรงดันออสโมซิส และ ความสมดุลย์ของอิออนในอาหาร

2.สิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้แก่

ก.แสง ขึ้นอยู่กับ ความเข้มแสง ความยาวคลื่น และ ช่วงแสง

ข.อุณหภูมิ

ค.ความชื้น

ง.ก๊าซ เช่น ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และ เอทิลีน เป็นต้น

3.ชนิดของพืชที่นำมาเลี้ยง

4.ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของพืช

5.อายุ และ ส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเลี้ยง

6.ระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ

7.ชนิดของเชลล์ที่เจริญในอาหาร

8.เทคนิคของการทำให้ปลอดเชื้อ

(สุภาภรณ์, 2531)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง และ สิ่งที่สำคัญมากอย่างหนึ่ง คือ สูตรอาหารที่เหมาะสม ซึ่งต้องประกอบด้วยอาหารที่พืช สามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ ใช้ได้กว้างขวางกับพืชตระกูลต่างๆ

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบไปด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

สารอนินทรีย์ (inorganic salts)

สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds)

สารที่ได้จากธรรมชาติ (complex natural products)

สารไม่ออกฤทธิ์ (inert material)

1.สารอนินทรีย์ (inorganic salts) ได้แก่ ธาตุอาหารหลัก (macro elements) คือธาตุอาหารที่พืชจำเป็นต้องใช้ในปริมาณมาก ได้แก่ N, P, K, Ca และ Mg เป็นต้น และธาตุอาหารรอง (micro elements) คือธาตุอาหารที่พืชจำเป็นต้องใช้ในปริมาณน้อยได้แก่ Mn. Zn. Cu. Mo. Co และ I เป็นต้น

2.สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds)

แบ่งได้เป็นหลายพวก คือ

2.1 Carbon source โดยทั่วไปได้แก่ sucrose ที่ความเข้มข้น 2-3 % ในบางกรณีอาจใช้ glucose เช่น พืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledon)

2.2 Vitamins ชนิดที่มีความสำคัญ ได้แก่ thiamine

2.3 Amino acid ได้แก่ glycine

2.4 Hormonal substance ที่ใช้กันมาก คือ auxin ในระดับ 0.1-10 มก./ล. และ cytokinin ในระดับ 0.03-3 มก./ล. ส่วน gibberellins ใช้ในบางกรณีเช่น shoot tip culture เพื่อผลิตต้นปราศจากโรคไวรัส

auxins ที่นิยมใช้ได้แก่

IAA (3-Indoleacetic acid)

IBA (3-Indolebutyric acid)

NAA (1-Naphthaleneacetic acid)

CPA (4-Chlorophenoxyacetic acid)

2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cytokinin ที่นิยมใช้ได้แก่

BA (N^6-Benzylaminopurine)

2ip (N^6-Dimethylallylamino purine)

kinetin (N^6-Furfurylaminopurine)

2.5 Organic addenda เช่น inositol โดยทั่วไป ใช้ในระดับ 100 มก./ล. ส่วนในระดับ 5,000 มก./ล. ใช้ในกรณีผลิต haploid embryo จาก isolated microspore ส่วน adenine หรือ adenine sulfate ช่วยส่งเสริมให้เกิด shoot formation ได้ดีขึ้น citric acid และ/หรือ ascorbic acid ช่วยลดสีน้ำตาลที่บริเวณชิ้นส่วนพืช

3.สารที่ได้จากธรรมชาติ (complex natural products) เช่น กล้วยบด 150 กรัม/ลิตร, น้ำมะพร้าว 10-20 % โดยปริมาตร, fish emulsion 1ช้อนชา/ลิตร Malt extract 500 มก./ล., น้ำส้มคั้น 3-30 % โดยปริมาตร, น้ำมะเขือเทศ 30 % โดยปริมาตร

4.สารไม่ออกฤทธิ์ (inert materials) ช่วยทำให้ต้นพืชตั้งอยู่บนอาหารได้ เช่น agar 0.5-1.3 % และ filter paper ส่วน charcoal 0.1-1.0 % ช่วยดูดสารที่พืชขับออกมาแล้วเป็นพิษต่อพืชเอง

ชนิดของแคลลัส

Meada(1980) รายงานว่า แคลลัสมี 2 ชนิด แคลลัสชนิดแรก เรียกว่า non-embryogenic (NE) แคลลัสประกอบด้วยเซลล์รูปร่างยาว ขนาดใหญ่ เกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ ไม่มีคุณลักษณะเป็น somatic embryo แคลลัสอีกชนิดหนึ่ง คือ embryogenic (E) แคลลัสประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็ก เกาะกันแน่น มีสีขาว หรือ ฟางอ่อน ผิวแห้งมีปุ่มเล็กๆ จำนวนมาก เจริญเติบโตช้ากว่าแคลลัสชนิด NE สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่าย แม้จะผ่านการเลี้ยงชั่วระยะเวลาหนึ่ง

Inoué และ Maeda(1980) รายงานว่า การเกิดพื้นที่สีเขียวบนแคลลัสขึ้นอยู่กับสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนิน ความสามารถในการเกิดพื้นที่สีเขียว และ พัฒนาไปเป็นยอดได้ดีนั้น พบในแคลลัสชนิด E มากกว่า NE

Nabors และ คณะ(1983) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในธัญญพืชต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ต้องเป็นแคลลัสชนิด E ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 31ไมครอน ส่วนแคลลัสชนิด NE ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างยาว กว้าง 52 ไมครอน ยาว 355 ไมครอน ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นพืชต้นใหม่ของแคลลัสทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกัน (Ling และคณะ, 1983) อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงทั่วไปมักส่งเสริมการเจริญของแคลลัสชนิด NE แต่ยับยั้งการเจริญของแคลลัสชนิด E

Dykes และ Nabors(1986) รายงานว่า ปัจจัยสำคัญต่อการสร้างแคลลัสชนิด E และสามารถกระตุ้นให้เกิดต้นใหม่ได้ มีดังนี้

1.ชนิด(genotype)ของพืช

2.อายุและชนิดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง

3.องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของการเพาะเลี้ยง

4.สภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง

5.สภาพของอาหารสงเคราะห์

(สุภาภรณ์,2531)

สารเคมีในการควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโต หรือ ที่เรียกโดยทั่วไปว่า ฮอร์โมนจัดเป็นกลุ่มของสารที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันนี้ เนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง และเห็นผลได้ค่อนข้างเด่นชัด โดยมากใช้ในการติดผลเร่ง หรือ ชะลอการแก่ การสุก ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้ ถูกควบคุมโดยสารแต่ละชนิดแตกต่างกันไป ดังนั้น ถ้ามีการเลือกใช้ได้อย่างถูกต้อง ก็จะทำให้เราสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้ตามต้องการ

ประโยชน์ของสารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งทางด้านการเพิ่มผลผลิต การผลิตพืชนอกฤดู ลดแรงงานในการผลิตพืช เป็นต้น การใช้สารให้ได้ผลตามต้องการนั้นจะต้องทราบคุณสมบัติของสารแต่ละชนิด และเลือกใช้ให้ถูกกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลองนี้ มี 2 กลุ่ม คือ

1.ออกซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.ไซโตไคนิน

โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ออกซิน (auxin)

ออกซินเป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่มีอัตราส่วนของไฮโดรเจน และ ออกซิเจน แตกต่างกันตามชนิดของออกซิน บางชนิดอาจมีไนโตรเจน หรือ คลอรีนเป็นองค์ประกอบ (Weaver.1972 ; สมศักดิ์, 2531 อ้างโดย สุภาภรณ์, 2531) สารที่แสดงคุณสมบัติเป็นออกซินมีดังนี้

indoleacetic acid (IAA), indolepropionic acid (IPA), indole butyric acid (IBA), naphthaleneacetic acid (NAA), naphtoxyacetic acid (NOA), 4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA), 2,4-dichlorophe noxyacetic acid (2,4-D), 2,4,6-trichlorobenzoic acid (2,4,6-TBA), 2,3,6-trichlorobenzoic acid (2,3,6-TBA) และ 4-amino-3.5.6-trichlo robenzoic acid(สมศักดิ์ ,2531 อ้างโดย สุภาภรณ์, 2531)

ออกซิน มีผลกระตุ้นการเกิดราก และ การเจริญของราก จึงได้มีการนำออกซินมาใช้กับกิ่งปักชำหรือกิ่งตอนของพืชทั่ว ๆ ไป เพื่อเร่งให้เกิดรากเร็วขึ้นและมากขึ้น นอกจากนี้พืชบางชนิดออกรากได้ยาก แต่ถ้ามีการใช้ออกซินเข้าช่วยก็จะทำให้ออกรากได้ง่ายขึ้น สารที่นิยมใช้ในการเร่งราก คือ IAA และ IBA ซึ่งทั้งสองชนิดนี้จัดว่าเป็นออกซินอย่างอ่อน มีพิษต่อพืชน้อย รากที่เกิดขึ้นจากการใช้สาร 2 ชนิดนี้จึงมักไม่มีอาการผิดปกติ คือ กุดสั้น รากหนา เป็นกระจุก ประโยชน์ของออกซิน อีกข้อหนึ่ง คือ ใช้ป้องกันผลร่วงได้ในพืชหลายชนิด เช่น มะม่วง, ส้ม, ลางสาด, ขนุน, มะละกอ เนื่องจากออกซินมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างรอยแตกในบริเวณขั้วผลได้ อย่างไรก็ตาม ออกซินไม่สามารถยับยั้งการร่วงของผลได้ในบางกรณี เช่น การร่วงเนื่องจากโรคและแมลงเข้าทำลายการร่วงของผลที่ไม่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น หรือ การร่วงเนื่องจากความผิดปกติของผล ออกซินที่นิยมใช้ในการป้องกันการร่วงของผล คือ NAA,2-4 D และ 4-CPA แต่จะไม่ใช้ IBA เนื่องจาก IBA ก่อให้เกิดพิษกับใบพืช ผลทางด้านอื่นๆ ของออกซิน ได้แก่ การเปลี่ยนเพศดอก ซึ่งปัจจุบันชาวสวนเงาะใช้กันอยู่ทุกแห่ง โดยใช้ NAA พ่นไปที่ช่อดอกเงาะบางส่วน ทำให้ช่อดอกที่ถูกสารเปลี่ยนจากดอกสมบูรณ์ที่ทำหน้าที่ตัวเมียกลายเป็นดอกตัวผู้ขึ้นมาแทน ซึ่งทำให้เกิดการปฏิสนธิขึ้นได้ การใช้ออกซินความเข้มข้นสูงไม่ว่าชนิดใดก็ตาม มักจะก่อให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดความเป็นพิษกับพืช เช่น ใบร่วง ต้นชะงักการเจริญเติบโต จนกระทั่งทำให้ต้นตายได้ ดังนั้นจึงมีการใช้สาร 2,4 D ซึ่งมีฤทธิ์ออกซินสูงมาก เป็นยากำจัดวัชพืช

ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.เร่งการขยายตัวของเซลล์ โดยช่วยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ที่ไม่มีเซลลูโลส (มนตรี .2530;สมศักดิ์, 2531 อ้างโดย สุภาภรณ์, 2531)

2.ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์ โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิค

3.กระตุ้นการเกิดรากของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้เกิดราก เป็นขั้นตอนที่ทำให้พืชเป็นต้นที่สมบูรณ์ก่อนนำออกปลูก การเกิดรากมีความสัมพันธ์กับระดับของออกซินภายในต้นกับสภาพแวดล้อม ถ้าออกซินภายในต้นมีระดับต่ำ ก็สามารถเพิ่มออกซินให้แก่พืชเพื่อการเกิดรากที่สมบูรณ์ (Fonesbench และ Fonesbench, 1980 ; สมศักดิ์ ,2531 อ้างโดย สุภาภรณ์, 2531)

ไซโตไคนิน

ไซโตไคนิน เป็นฮอร์โมนพืชอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับ การกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ การควบคุมการสร้างอวัยวะ สารไซโตไคนินในธรรมชาติ ส่วนใหญ่เป็นพวกอนุพันธุ์ของ 6-amino-purine สารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธุ์ของ 6-amino-purine ก็สามารถทำหน้าที่เป็นไซโตไคนินได้อย่างดีเช่นกัน เช่น kinetin,6-benzyl-amino-purine(6 BAP) แต่สารสังเคราะห์บางตัว ก็ไม่แสดงคุณสมบัติการเป็นไซโตไคนินเลย เช่น 6-dimethyl-amino-purine และ 2-dimethyl-amino-6-hydroxy-purine ปกติเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฮอร์โมนออกซินอยู่ด้วยเมื่อใส่ฮอร์โมนไซโตไคนินเข้าไป จะช่วยให้มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว(พรทิพย์ ,2528) มีประโยชน์ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาก โดยผสมเข้าไปในสูตรอาหาร เพื่อช่วยการเจริญเติบโตของแคลลัส และ กระตุ้นให้แคลลัสพัฒนากลายเป็นต้นได้ ส่วนประโยชน์ทางด้านอื่นมีจำกัดนอกจากการนำมาใช้เร่งการแตกตาของพืช ซึ่งมีประโยชน์ในด้านการควบคุมทรงพุ่ม และเร่งการแตกตาของพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยการติดตาแล้ว ยังสามารถชะลอการแก่ชราของพืชได้ แต่ก็ยังไม่แน่นอนนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดใบแพงพวยฝรั่งด้วยเบนซิน

เมื่อนำใบแพงพวยฝรั่งที่บดละเอียด และแห้ง มารีฟลักซ์ในเบนซิน แล้วละลายส่วนที่เป็นอัลคาลอยออกไปด้วยกรดเกลือ นำส่วนที่เหลือมาละลายในเบนซิน จะได้ส่วนที่ไม่ละลายเป็นของแข็ง ซึ่งเมื่อนำมาล้างด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ และ ตกผลึกจากแอลกอฮอล์ผสม จะได้ ursolic acid จุดหลอมเหลว 279-280 องศาเซลเซียส ส่วนที่ละลายในเบนซินนำมาผ่านคอลัมน์จะได้ผลึก 2 ชนิด (myricyl alcohol) จุดหลอมเหลว 88 องศาเซลเซียส กับ ɤ-sitosterol จุดหลอมเหลว 138-139 องศาเซลเซียส

การสกัด นำใบแพงพวยฝรั่งที่แห้งและบดละเอียด 1,600 กรัม (จากใบสด 9 กิโลกรัม) มารีฟลักซ์ในเบนซิน ในเครื่อง Soxhlet นาน 30 ชั่วโมง กลั่นไล่ตัวทำละลายได้ crude สีดำเหนียวหนัก 69.0 กรัม (4.31 % โดยน้ำหนัก ของใบแพงพวยฝรั่งแห้ง) นำไปละลายในกรดไฮโดรคลอริก 0.5 % กรองได้ส่วนที่ไม่ละลายในกรด เป็น crude สีดำ (34.78 % ของ crude extractเดิม)

การแยกสาร ละลาย crude สีดำ 20 กรัม ในเบนซิน 200 cm^3 ผ่านลงใน column แก้วซึ่งบรรจุ Aluminium Oxide S จำนวน 300 กรัมเป็น absorbent มีเบนซินเป็นตัวทำละลาย elute benzene ด้วยส่วนผสมของ benzene และ chloroform 3:1, 2:1, 1:1 และ chloroform ตามลำดับ เก็บ elute ครั้งละ 1,000 cm^3 กลั่นเอาตัวทำละลายออกจนเหลือ 20 cm^3 ถ่ายใส่ flask แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ได้ผลดังตาราง ต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-5 แสดงลักษณะของสารที่ได้จากการสกัดใบแพงพวยผรั่งด้วยเบนซิน จากตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดของตัวทำละลาย	fraction	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว	น้ำหนักสาร (กรัม)
benzene	1-2	semisolid และน้ำมันสีเหลือง	-
	3	ผลึกเกล็ดรูปหกเหลี่ยม mp.210-215	2-3 เกล็ด
	4-6	ผลึกฝอย mp.75-83	0.10
	7-10	น้ำมันสีเหลือง	-
	11-16	ผลึกรูปเข็ม mp.129-135	0.08
	17-29	น้ำมันสีเหลือง	-
benzene : chloroform 3:1	30-34	น้ำมันสีเหลือง	-
benzene : chloroform 2:1	35-39	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	-
benzene : chloroform 7:1	40-42	น้ำมันสีน้ำตาล	-
chloroform	43-47	น้ำมันสีเขียว	-

เพื่อจะแยกผลึกที่มีจุดหลอมเหลว 210-215 ให้ได้มากขึ้น จึงใช้ crude สีดำ จากการสกัด 25.0 กรัม และ Aluminium oxide S 400 กรัม เป็น absorbent ทำ column chromatography โดยเปลี่ยน eluent แต่ก็ไม่ได้ผลึกของสาร ที่มีจุดหลอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลว 210-215 เพิ่มขึ้น จึงไม่สามารถศึกษาต่อไปได้

ส่วนที่ติดอยู่ใน column ทั้ง 2 ครั้ง เอาออกมาสกัดด้วย acetone 2 ลิตร นาน 7 วัน แล้วกรอง นำส่วนที่กรองได้ มาระเหยตัวทำละลายออกจนเหลือ 50 cm^3 จะได้ตะกอนสีเขียวอ่อน จุดหลอมเหลว 250-257

การทำให้บริสุทธิ์

ก.สารที่มีจุดหลอมเหลว 75-83

นำสารที่มีจุดหลอมเหลว 75-83 หนัก 1.5 กรัม ล้างด้วย petroleum ether จำนวนเล็กน้อย แล้วตกผลึกใน petroleum ether ซ้ำหลายๆ ครั้ง จะได้ผลึกผงสีขาว หนัก 500 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลวคงที่ ที่ 88 กำหนดให้เป็นสาร ก.

ข.สารที่มีจุดหลอมเหลว 129-135

นำสารที่มีจุดหลอมเหลว 129-135 หนัก 1.5 กรัม ละลายใน methanol ร้อน เมื่อตั้งให้เย็นจะได้ผลึกรูปเข็มผอย เป็นกระจุก กรอง และ ตกผลึกได้ใน petroleum ether หลายๆ ครั้ง จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว เบา และ มีวาว หนัก 500 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลวคงที่ ที่ 138-139 กำหนดให้เป็นสาร ข.

ค.สารที่มีจุดหลอมเหลว 250-257

นำสารที่เป็นผงสีเขียว จุดหลอมเหลว 250-257 หนัก 27.6 กรัม มาล้างด้วย petroleum ether เย็นหลายๆ ครั้ง จนไม่มีสี แล้วล้างด้วย chloroform เย็นจน สารละลายมีสีจางลงและเหลือตะกอนเพียง 18.0 กรัม ละลายตะกอนนี้ใน chloroform เย็นต่อไปอีก 10 ครั้ง แต่ละครั้งกรองเอาส่วนที่ละลายออกมาปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยออกไป แล้วนำผลึกที่ได้มาตกผลึก ในตัวทำละลายผสมของ ethanol และ methanol หลายๆ ครั้ง จนเหลือแต่ผลึกรูปเข็มเบา มีวุ้นปนบ้าง จุดหลอมเหลว 250-257 หนัก 7 กรัม ต่อไปนำสารนี้ไปตกผลึกใน ethanol ซึ่งแต่ละครั้งจะมีวุ้นตกออกมาพร้อมผลึก แยกวุ้นออก ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง โดยใช้ absolute ethanol จนได้ผลึกรูปเข็ม หนัก 5.13 กรัม จุดหลอมเหลวคงที่ ที่ 279-280 กำหนดให้เป็นสาร ค.

ผลการวิจัย

จากการศึกษาสารประกอบที่ได้จากการสกัดใบแพงพวยฝรั่งด้วยเบนซิน แล้วนำส่วนที่ไม่ละลายในกรดเกลือมาศึกษาต่อพบสารบริสุทธิ์ 3 ชนิด ได้ศึกษาสมบัติทางเคมีและทราบสูตรโครงสร้าง ว่าเป็น สารที่เคยพบในพืชอื่นๆ ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.สารก.จุดหลอมเหลว 88 เป็นผลึกสีขาว เป็นกระจก ละลายได้ดีใน chloro form, ether, benzene และ methanol ไม่ละลายน้ำ petroleum ether ไม่ให้สีกับ Licbermann-Burchard reagent ไม่ฟอกสี Br_4 ใน CCl_4 ค่า Rf ใน benzene : petroleum ether 1:9 ได้ 0.74 ซึ่งเท่ากับของ myricyl alcohol

จากการวิเคราะห์ธาตุ สาร ก. มี C = 82.31 % H = 14.19 % จากการคำนวณสำหรับ $C_{30}H_{62}O$ ได้ C = 82.11 % H = 14.24 % IR spectrum แสดง absorption peaks ของ -OH primary ที่ 3600-3200 cm^{-1} และ 1050 cm^{-1} ของ $-CH_3$ และ $-CH_2$ ที่ 2910, 2850, 1465 และ 720 cm^{-1} ไม่มี absorption peaks ของ alkene, branched chain skeleton หรือ carbonyl group เลย แสดงว่าสารนี้เป็น saturated long chain alcohol จากผลการวิเคราะห์สาร ก. อาจเป็น myricyl alcohol ซึ่งเมื่อนำมาหา mixed m.p.ปรากฏว่าไม่เปลี่ยนแปลง และ IR spectrum ก็ identical กับ standard spectrum ของ myricyl alcohol

เมื่อนำสารก.ไป acetylate ได้สารจุดหลอมเหลว 73-74 IR spectrum ไม่มี character ของ -OH เหลืออยู่ แต่แสดง C = O (1730 cm^{-1}) เด่นชัด และ OAc (1240, 1030 cm^{-1}) ซึ่ง identical กับ IR spectrum ของ myricyl acetate จากเหตุผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าสารก. คือ myricyl alcohol

ข.สารข.จุดหลอมเหลว 138-139 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว เบาและเป็นเงา ละลายได้ใน benzene, chloroform, ether และ acetone แต่ไม่ละลายน้ำ ค่า Rf ใน benzene : petroleum ether 1:9 ได้ 0.23 ซึ่งเท่ากับของ β-sitosterol ทำปฏิกริยากับ Licbermann-Burchard reagent ได้สีแดง ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินและเขียวตามลำดับ ฟอกสี Br_4 ใน CCl_4 ได้โดยไม่ให้ฟองอากาศ HBr ฟอกสี $KMnO_4$ ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4-dinitro pheny Phydrazine ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย $FeCl_3$

จากการวิเคราะห์ธาตุ สาร ข. มี C = 83.89 % H = 12.05 % จากการคำนวณสำหรับ $C_{29}H_{50}$ ได้ C = 84.05 % H = 12.07 % IR spectrum แสดง characteristic peaks ของ 3β-hydroxyl group (3600-3200 cm^{-1}) tri

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

substituted ethylene (1650 cm^{-1}) แสดงว่าสารนี้เป็น unsaturated steroid compound เมื่อนำมาหา mixed m.p. กับ ɤ-sitosterol พบว่าไม่เปลี่ยนแปลง และ IR spectrum ก็ identical กับ standard spectrum ของ ɤ-sitosterol

เมื่อนำสารข. ไป acetylate ได้สารจุดหลอมเหลว 129-130 ซึ่งแสดง IR spectrum ของ C = 0 (1730 cm^{-1}) และ OAc (1240, 1030 cm^{-1}) เพิ่มขึ้น และไม่มี characteristic peaks ของ -OH เหลืออยู่ นอกจากนี้ IR spectrum ของ acetyl derivative ยัง identical กับ spectrum ของ ɤ-sitosterol เมื่อทำ mixed m.p.กับ ɤ-sitosterol พบว่าไม่เปลี่ยนแปลง ค่า Rf ของacetate ของสารข. เท่ากับค่า Rf ของ ɤ-sitosterol acetate ด้วย จากเหตุผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าสารข. คือ ɤ-sitosterol มีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O$

ค.สารค. จุดหลอมเหลว 279-280 เป็นผลึกรูปเข็มใส ละลายได้ใน ethanol ร้อน acetic acid ร้อน ละลายได้บ้างใน ether acetone ethylacetate chloroform ไม่ละลายน้ำและ petroleum ether ทำปฏิกริยากับ Licbermann-Burchard reagent ให้สีม่วงซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินและเขียวตามลำดับ ค่า Rf ใน 1- butanol : acetic acid : water 7:1:1 ได้ 0.76 ฟอกสี Br_4 ใน CCl_4 ได้ดีและไม่ให้ฟองอากาศ HBr ฟอกสี $KMnO_4$ ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4-dinitro pheny Phydrazine ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย $FeCl_3$

จากการวิเคราะห์ธาตุ สาร ค. มี C = 78.39 % H = 10.59 % จากการคำนวณสำหรับ $C_{30}H_{48}O_3$ ได้ C = 78.95 % H = 10.53 % เมื่อเปรียบเทียบสารที่ Roy และ ChaHerjee สกัดได้จากต้นแพงพวยฝรั่งด้วย ethanol คือ ursolic acid (0.12 % โดยน้ำหนักของต้นแพงพวยฝรั่งแห้ง) มีสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{48}O_3$ จุดหลอมเหลว 280 และ คำนวณร้อยละของธาตุได้ C = 78.95 % H = 10.53 % จึงคาดว่าสารค. ควรเป็น ursolic acid

IR spectrum ของสารค. แสดง characteristic absorption peaksของ 3ɤ-hydroxyl group ของ triterpene (3540, 1040 cm^{-1}) -COOH (2950, 2890 cm^{-1}) และ Insubstituted ethylene (1680, 835 cm^{-1}) แสดงว่าสารค.เป็น ursolic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำสารค.ไป acetylate ได้สารจุดหลอมเหลว 278-279 ซึ่งใกล้เคียงกับของสารค. แต่เมื่อทำ mixed mp. กับสาร ค. พบว่าจุดหลอมเหลวต่ำลงมาก เหลือเพียง 246.53 แสดงว่าสารที่ได้ไม่ใช่สารค.เดิม เมื่อนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์หาธาตุได้ C = 77.15 % H = 9.93 % เมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับ acetylursolate ซึ่งมีสูตร $C_{32}H_{50}O_4$ ได้ C = 77.11 % H = 10.04 % และ มีจุดหลอมเหลว 283 IR spectrum ของ acetate ของสารค. ไม่มี peak ของ 3°-OH (3540, 1040 cm^{-1}) เหลืออยู่ แต่มี -OAC (1250 cm^{-1}) เพิ่มขึ้น เมื่อนำสารค.ไปเตรียม methyl ester ได้สารจุดหลอมเหลว 171 วิเคราะห์ธาตุ ได้ C = 79.57 % H = 10.82 % คำนวณเปรียบเทียบกับ methyl ursolate ซึ่งมีสูตร $C_{31}H_{50}O_3$ ได้ C = 79.15% H = 10.64 % และ มีจุดหลอมเหลว 171-172 IR spectrum ของmethyl ester ของ สารค. แสดง characteristic peaks ของ R-$COOCH_3$ (1150 cm^{-1}), 3°-OH (3540, 1040 cm^{-1}) และ C = O (1700 cm^{-1}) ยังคงอยู่ แสดงว่าสาร ค. มี -COOH 1 หมู่และถูก methylate ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

1.เมล็ดแพงพวยฝรั่ง

โดยแยกออกเป็น 2 ประเภทคือ

-เมล็ดสด จากต้นแพงพวยฝรั่งซึ่งเป็นเมล็ดที่มีความชื้นอยู่ โดยใช้เมล็ดอ่อน เมล็ดมีสีเขียว

-เมล็ดแห้งเป็นเมล็ดซึ่งบรรจุซองขายเป็นการค้า เป็นเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มีความชื้นอยู่น้อย เมล็ดมีสีดำ

2.ชิ้นส่วนพืช(explants) ของต้นแพงพวยฝรั่ง 3 ส่วน คือ

-ปล้อง (internode) เป็นส่วนระหว่างข้อของกิ่งแพงพวยฝรั่ง ตัดแต่ละชิ้นให้มีความยาวประมาณ 5 มม.

-ก้านใบ (petiole) ตัดแต่ละชิ้นให้มีความยาวประมาณ 5 มม.

-ใบ (midleaf) ตัดใบแพงพวยเป็นสี่เหลี่ยมจตุรัสรอบเส้นกลางใบ ให้มีขนาดประมาณ 5 x 5 มม.

2.<u>สารเคมี</u>

2.1สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้เกลือซึ่งเป็นธาตุอาหารหลัก (macronutrients) และ ธาตุอาหารรอง (micronutrients) ชนิด AR (analytical reagent) ตามสูตร MS และ LS ในภาคผนวกที่ ข.

2.2 สารควบคุมการเจริญ

NAA (⍺-napthaleneacetic acid)

2,4-D (2,4 -dichlorophenoxyacetic acid)

Kinetin (6-furfurylaminopurine)

2.3 สารอินทรีย์

วุ้นผง

2.4 สารที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อ

ยาฆ่ารา authozide 1 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

clorox (ซึ่งมี sodium hypochlorite 2.25 %)

เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % และ 70 %

tween -20

2.5 สารที่ใช้ในการปรับ pH ได้แก่ HCl, NaOH

2.6 สีย้อมจุลินทรีย์ ได้แก่ เมทิลีน - บลู (methylene bule)

2.7 สารที่ใช้ในการตรึงโครโมโซม ได้แก่ Farmer's fixative หรือ Mc Clintock solution ประกอบด้วย

- absolute ethyl alcohol 3 ส่วน
- glacial acetic acid 1 ส่วน

2.8 สีย้อมโครโมโซม ได้แก่ อาร์ซีโต - ออร์ซีน

3.<u>อุปกรณ์</u>

3.1 เครื่องแก้ว

3.1.1 บีกเกอร์ (beaker) ปริมาตร 100 ml.

3.1.2 กระบอกตวง (cylinder) ปริมาตร 10 ml. และ 100 ml.

3.1.3 pipette ปริมาตร 0.1 ml., 1.0 ml., 5.0 ml. และ 10 ml.

3.1.4 volumetric pipette ปริมาตร 0.01 ml., 0.1 ml., 1.0 ml. , 5.0 ml. และ 10 ml.

3.1.5 erlenmeyer flask ปริมาตร 100 ml. ,500 ml.และ 1000 ml.

3.1.6 volumetric flask ปริมาตร 100 ml. ,500 ml.และ 1000 ml.

3.1.7 ขวดสีชาปริมาตร 100 ml., 500 ml. และ 1,000 ml. สำหรับเก็บ stock solution

3.1.8 ขวดหยด บรรจุกรด-ด่างที่ใช้ในการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.9 ขวดแก้วใส่อาหารพร้อมฝาพลาสติกทนความร้อน

3.1.10 slide และ แผ่นกระจกปิดสไลด์ (coverslide)

3.1.11 petri dish

3.2 <u>เครื่องมือ</u>

3.2.1 hot plate สำหรับหลอมละลายวุ้น,สารเคมี

3.2.2 magnetic stirrer สำหรับกวนสารละลาย อาหารให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 เครื่องชั่งหยาบ และเครื่องชั่งละเอียด

3.2.4 เครื่องวัด pH (pH meter)

3.2.5 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

3.2.6 ตู้เย็น

3.2.7 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar flow)

3.2.8 มีดตัดเนื้อเยื่อ

3.2.9 ปากคีบ

3.2.10 thong

3.2.11 autopipette

3.2.12 ultrasonication

3.2.13 กล้องจุลทรรศน์

3.2.14 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.2.15 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.16 กล้องถ่ายรูป

4.<u>ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>

ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

อุณหภูมิห้อง 20 องศาเซลเซียส

ชั้นสว่าง ใช้หลอดไฟ ฟลูออเรสเซนต์ ชนิด ความเข้มแสงประมาณ 750 ลักซ์ ช่วงแสงตลอด 24 ชั่วโมง (continuous light)

ชั้นมืด ใช้กล่องกระดาษที่ปิดมิดชิด

วิธีดำเนินการทดลอง

วิธีดำเนินการทดลอง แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ

1.วัดอัตราการงอกของเมล็ดแพงพวยฝรั่ง ในสูตรอาหาร MS ภายใต้ปัจจัยควบคุม คือ แสงสว่างและชนิดของเมล็ด

2.วัดอัตราการเจริญเป็นแคลัสของชิ้นส่วนพืช ในสูตรอาหาร MS และ LS ภายใต้ปัจจัยควบคุมที่ได้แก่ อุณหภูมิ ,ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อและสัดส่วนของ 2,4-D และ kinetin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ตรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.ตรวจนับโครโมโซมของดอก. รากของแพงพวยฝรั่ง และ ทำการเปรียบเทียบกับของแคลลัส

ขั้นตอนที่1

วัดอัตราการงอกของเมล็ดแพงพวยฝรั่ง ในสูตรอาหาร MS ภายใต้ปัจจัยควบคุม

1.การเตรียมเมล็ดพืชทดลอง

เมล็ดพืชทดลองที่ใช้มี 2 ประเภท คือ

1.1 เมล็ดสด แกะจากฝักของต้นแพงพวยฝรั่ง ใช้มีดกรีดฝัก แกะเมล็ด ซึ่งจะเรียงเป็นแถวอยู่ในฝัก เลือกเฉพาะเมล็ดอ่อน เป็นเมล็ดที่มีสีเขียว มีความชื้นภายในเมล็ด

1.2 เมล็ดแห้งเป็นเมล็ดสำเร็จรูป ซึ่งบรรจุซองขายเป็นการค้าเป็นเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มีความชื้นอยู่น้อย เมล็ดมีสีดำ

2.การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สูตร MS (Murashige and Skoog) ตามภาคผนวก ข โดยใช้อัตราส่วนฮอร์โมน NAA : kinetin = 1:1 มก./ล.

3.การฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของเมล็ด (surface sterilization)

3.1 นำเมล็ดแพงพวยฝรั่งเทลงในปีกเกอร์ที่บรรจุ alcohol 70 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 100 มล. แช่เมล็ดทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที

3.2 นำเมล็ดที่ได้จากข้อ 3.1 มาเทลงในปีกเกอร์ที่บรรจุ clorox 15เปอร์เซนต์ ปริมาตร 100 มล. + tween-20 3-4 หยด แช่เมล็ดทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ขณะแช่อาจเขย่าปีกเกอร์เป็นระยะๆ

3.3 นำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

4.การถ่ายเมล็ดลงขวดอาหาร

4.1 การถ่ายเมล็ดลงในขวดอาหารทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อที่มีอากาศปลอดเชื้อจุลินทรีย์ (laminar flow)โดยใช้ปากคีบที่สะอาดชุบแอลกอฮอล์ลนไฟแล้ว คีบเมล็ดวางลงบนผิวหน้าของอาหาร ทำการเพาะ 1 เมล็ดต่อ 1ขวด

4.2 ลนไฟบริเวณปากขวดก่อนปิดฝาขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.การเก็บเนื้อเยื่อ

นำขวดที่ทำการเพาะเมล็ดแล้ว ไปเก็บในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

โดยทำการแบ่งเมล็ดสด และ เมล็ดแห้ง เป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน

ส่วนที่ 1 เก็บขวดเพาะเมล็ดในกล่องที่ปิดมิดชิด

ส่วนที่ 2 นำขวดเพาะเมล็ดไปวางบนชั้นให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงประมาณ 750 ลักซ์ ช่วงแสงตลอด 24 ชั่วโมง (continuous light)

ดังนั้นจะได้

เมล็ดสดเก็บในที่มืด 25 ขวด

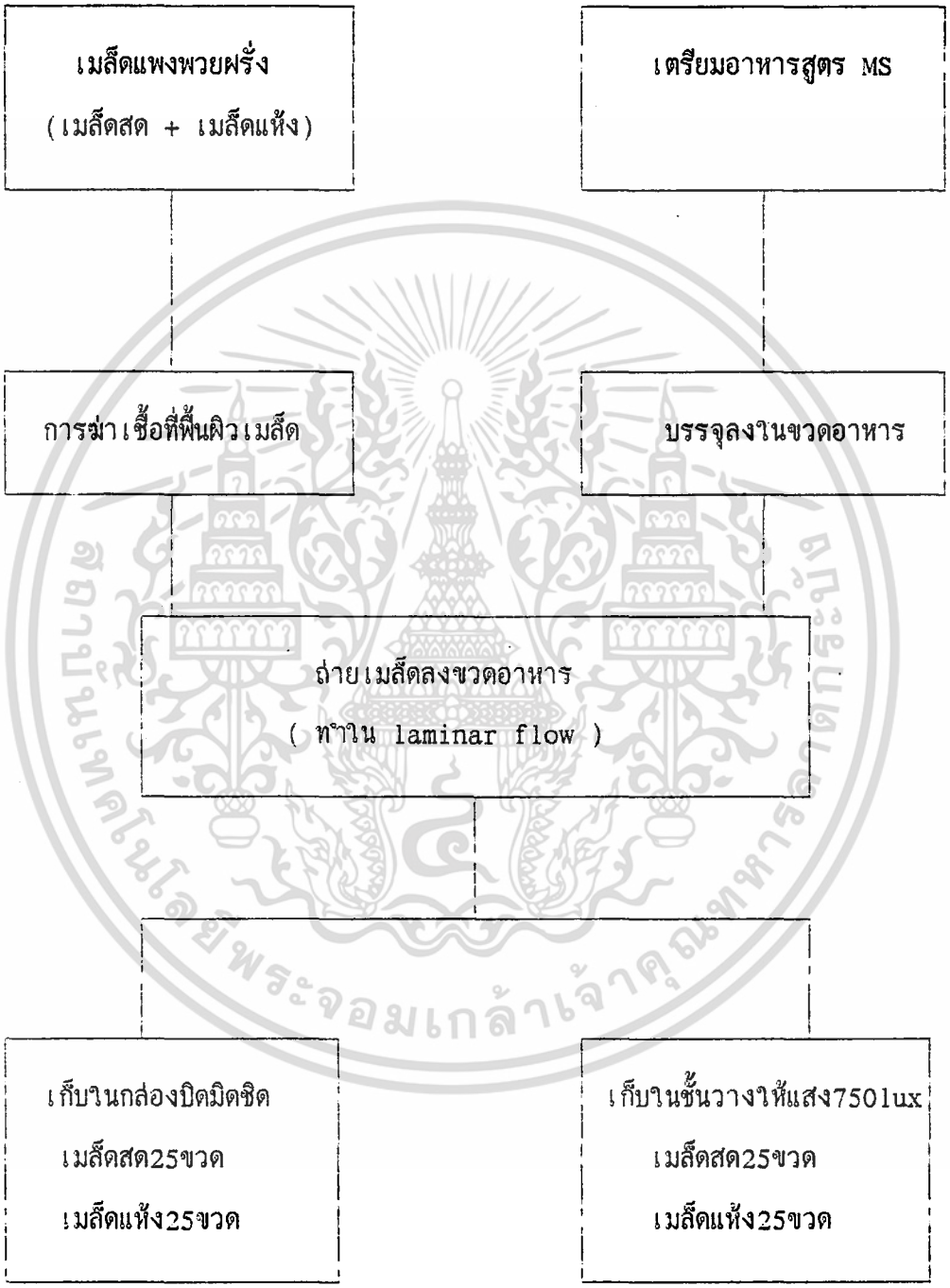
เมล็ดสดเก็บในที่มีแสง 25 ขวด

เมล็ดแห้งเก็บในที่มืด 25 ขวด

เมล็ดแห้งเก็บในที่มีแสง 25 ขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3-1 แผนภาพรูปโดยสังเขปเพื่อหาอัตราการงอกของเมล็ดแพงพวยผรั่ง ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ภายใต้ปัจจัยควบคุม



6. <u>การเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลอง</u>

ในรูครงงานพิเศษนี้ได้ศึกษาถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ของเมล็ด, ขนาดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสที่ได้, สีของแคลลัส, การเจริญเป็นลำต้น ใบและราก

ตารางที่ 3-2 การให้คะแนนแคลลัส ที่เจริญจากเมล็ด

ลักษณะแคลลัส	คะแนน				
	1 น้อยที่สุด	2 น้อย	3 พอใช้	4 ดี	5 ดีมาก
ขนาด(เส้นผ่าศูนย์กลาง,มม.)	<5	5>10	10>15	15>20	20>25

ขั้นตอนที่2

วัดอัตราการเจริญเป็นแคลัสของชิ้นส่วนพืชในสูตรอาหาร MSและLSภายใต้ปัจจัยควบคุม

1.การเตรียมชิ้นส่วนพืช

เตรียมชิ้นส่วนพืช(explants) ของต้นแพงพวยฝรั่ง 3 ส่วน คือ

ปล้อง (internode) เป็นส่วนระหว่างข้อของกิ่งแพงพวยฝรั่ง ตัดแต่ละชิ้น ให้มีความยาวประมาณ 5 มม.

ก้านใบ (petiole) ตัดแต่ละชิ้นให้มีความยาวประมาณ 5 มม.

ใบ (midleaf) ตัดใบแพงพวยเป็นสี่เหลี่ยมจตุรัสรอบเส้นกลางใบ ให้มีขนาดประมาณ 5 x 5 มม.

2.การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS และ LS ตามภาคผนวก ข. และ ใช้ความเข้มข้น และ ชนิดของฮอร์โมน ดังนี้

สูตรอาหารที่ 1 ความเข้มข้นของ 2,4-D 0 มก./ล.

ความเข้มข้นของ kinetin 0 มก./ล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารที่ 2 ความเข้มข้นของ 2.4-D 0.5 มก./ล.
ความเข้มข้นของ kinetin 0 มก./ล.
สูตรอาหารที่ 3 ความเข้มข้นของ 2.4-D 1.0 มก./ล.
ความเข้มข้นของ kinetin 0 มก./ล.
สูตรอาหารที่ 4 ความเข้มข้นของ 2,4-D 1.5 มก./ล.
ความเข้มข้นของ kinetin 0 มก./ล.
สูตรอาหารที่ 5 ความเข้มข้นของ 2,4-D 0 มก./ล.
ความเข้มข้นของ kinetin 0.12มก./ล.
สูตรอาหารที่ 6 ความเข้มข้นของ 2,4-D 0.5 มก./ล.
ความเข้มข้นของ kinetin 0.12มก./ล.
สูตรอาหารที่ 7 ความเข้มข้นของ 2,4-D 1.0 มก./ล.
ความเข้มข้นของ kinetin 0.12มก./ล.
สูตรอาหารที่ 8 ความเข้มข้นของ 2,4-D 1.5 มก./ล.
ความเข้มข้นของ kinetin 0.12มก./ล.

ตารางที่ 3-3 แสดงความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ kinetin ที่ใช้ในการทดลอง

2,4-D / kinetin	0	0.5	1.0	1.5
0	1	2	3	4
0.12	5	6	7	8

3.<u>การฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของชิ้นส่วนพืช (surface sterilization)</u>

3.1 นำชิ้นส่วนพืชหุ้มด้วยผ้าขาวบางแล้วแช่ในยาฆ่าราา orthozide 1 เปอร์เซนต์ ทำการปั่น บน stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

3.3 นำชิ้นส่วนพืชเทลงในบีกเกอร์ที่บรรจุ alcohol 70 เปอร์เซนต์ปริมาตร 100 มล. แช่เมล็ดทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที

3.4 นำเมล็ดที่ได้จากข้อ 3.3 มาเทลงในบีกเกอร์ที่บรรจุ clorox 20 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 100 มล. + tween-20 3-4 หยด แช่เมล็ดทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ขณะแช่อาจเขย่าบีกเกอร์เป็นระยะๆ

3.5 นำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

4.<u>การถ่ายเนื้อเยื่อลงขวดอาหาร</u>

4.1 การถ่ายเนื้อเยื่อลงในขวดอาหาร ทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ ที่มีอากาศปลอดเชื้อจุลินทรีย์ (laminar flow) โดยใช้มีดผ่าตัดที่สะอาดชุบแอลกอฮอล์ลนไฟ ทิ้งไว้สักครู่ ตัดบริเวณขอบทั้งสี่ด้านของชิ้นส่วนใบ และ ส่วนปลายทั้งสองด้านของ ปล้อง และก้านใบออก ทำการตัดบน petri dish ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

4.2 ใช้ปากคีบที่สะอาดโดยชุบแอลกอฮอล์ลนไฟแล้ว คีบชิ้นส่วนพืชวางลงบนผิวหน้าของอาหารที่เตรียมไว้ในขวดเรียบร้อยแล้ว ใช้ 1 ชิ้นส่วนพืช ต่อ 1ขวดอาหาร

4.3 ลนไฟบริเวณปากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนปิดฝาขวด

5.<u>การเก็บเนื้อเยื่อ</u>

แยกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอาหารแต่ละสูตร (MS และ LS สูตร 1-8)เก็บในกล่องที่ปิดมิดชิด โดยแยกเก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ในแต่ละอุณหภูมิการเก็บของอาหารแต่ละสูตรจะเป็น

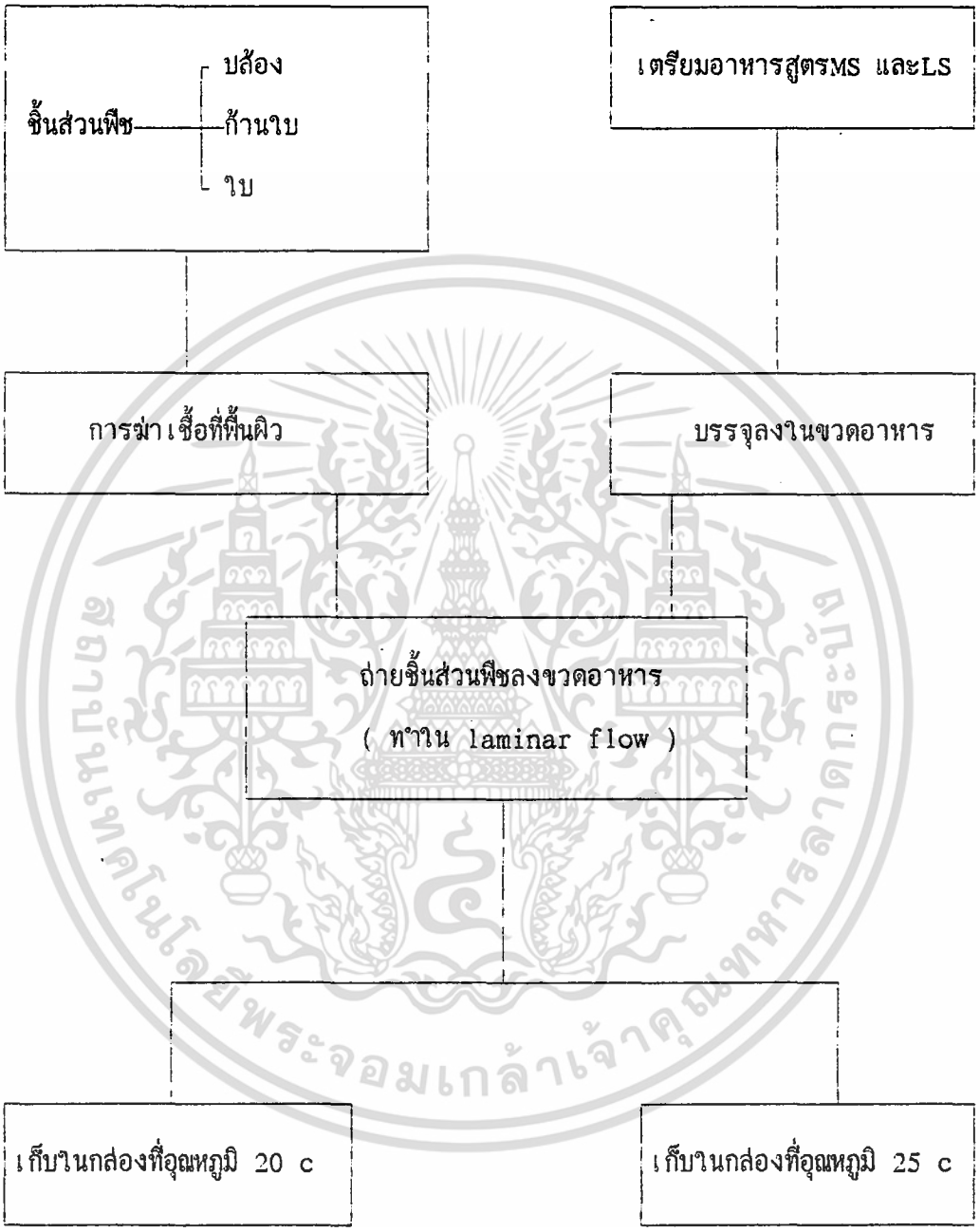
ปล้อง สูตร 1-8 สูตรละ 5 ขวด รวม 40 ขวด

ก้านใบ สูตร 1-8 สูตรละ 5 ขวด รวม 40 ขวด

ใบ สูตร 1-8 สูตรละ 5 ขวด รวม 40 ขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3-4 แผนดำเนินงานโดยสังเขปเพื่อหาเปอร์เซนต์การสร้างแคลลัส



6.การเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลอง

ในโครงงานพิเศษนี้ ได้ศึกษาถึง ลักษณะการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ของ ชิ้นส่วนพืช , ขนาดของแคลลัสที่ได้, สีของแคลลัส, การเจริญเป็นลำต้น ใบ และ ราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3-5 การให้คะแนนแคลลัส ที่เจริญจากชิ้นส่วนฟีช

ลักษณะแคลลัส	คะแนน				
	1 น้อยที่สุด	2 น้อย	3 พอใช้	4 ดี	5 ดีมาก
ขนาด(เส้นผ่าศูนย์กลาง,มม.)	<5	5>10	10>15	15>20	20>25

ขั้นตอนที่3

ตรวจเชื้อราที่ปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. คัดเลือกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการเจริญของเชื้อรา คัดเลือกตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนเป็นจำนวนมาก โดยนับจำนวนขวดเปรียบเทียบกัน

2. บันทึกลักษณะของเชื้อ เช่น สี, เส้นใย, ลักษณะและ สีของสปอร์

3. ทำการย้อมสี โดยใช้ เมทิลีน - บลู (Methyleneblue)

4. นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะ เพื่อบ่งบอกชนิดของเชื้อรา เช่น septate, asci, ลักษณะ spore, จำนวน spore ใน ascus , foot cell

5. identified ชนิดของเชื้อจากลักษณะที่สังเกตได้ อ้างอิงจาก " Introduction to Food - Borne Fungi " , Robert A. Samson, Ellen S. Van Reenen-Hockstra .1988

ขั้นตอนที่4

ตรวจนับจำนวน ของโครโมโซมในดอก,ราก และแคลลัสแพงพวยฝรั่ง

การเก็บดอกเพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์ไมโอซีส

ต้องเก็บดอกที่มีขนาดต่างๆ กัน เพื่อจะได้อับละอองเกสร (anther) ที่ประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยเซลล์ที่แบ่งเซลล์ไมโอซีสในระยะต่างๆ และ คงสภาพเช่นนั้นตลอดไป ด้วยน้ำยาคงสภาพ (fixative) แต่อย่างไรก็ตาม ดอกที่เก็บมานั้นจะต้องยังไม่บาน เพราะถ้าดอกบานแล้ว ทุกเซลล์จะสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ไมโอซีส หรือได้ละอองเกสรทั้งหมด นอกจากนี้ระยะเวลาที่เก็บดอกก็เป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถ้าต้องการศึกษาจำนวนโครโม-โซม ต้องใช้เซลล์ในระยะ metaphase จึงจำเป็นต้องเก็บดอกในระยะเวลาต่างๆ กัน เพื่อจะได้ทราบว่าระยะเวลาช่วงไหนที่เซลล์อยู่ในระยะ metaphase มากที่สุด ในพืชส่วนใหญ่ จะพบระยะ metaphase มาก ในช่วงเช้าจาก 6 นาฬิกา ถึง 11 นาฬิกา ทำการเก็บดอกที่ยังไม่บานขนาดต่างๆ กันในช่วงเวลาดังกล่าว นำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ Mc Clintock 's fixative หรือ carnoy's fixative นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปใส่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ เก็บไว้ในตู้เย็น วิธีการนี้อาจรักษาให้คงสภาพได้นานถึง 2-3 ปี

<u>การเก็บรากและแคลลัสเพื่อตรวจนับโครโมโซม</u>

รากที่นำมาตรวจนับโครโมโซม ใช้บริเวณปลายรากซึ่งมีลักษณะขุ่น มีความยาว 1-2 ซม. และ แคลลัสที่นำมาตรวจนับโครโมโซม เลือกจากแคลลัส ที่เจริญมาจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช โดยแคลลัสจะต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ นำราก และแคลลัสไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ และเก็บรักษาไว้ โดยวิธีการเช่นเดียวกับการคงสภาพของดอก

<u>วิธีปฏิบัติ</u>

สำหรับการย้อมโครโมโซมดอก

1. แยกเอาส่วนของ อับละอองเกสรตัวผู้ ที่มีสีขาว จากดอกที่แช่ในน้ำยาคงสภาพเรียบร้อยแล้วมาวางบนสไลด์ที่สะอาด

2. หยดสีย้อม อาซีโตคาร์มีน ลงไป 1-2 หยด

3. ใช้เข็มเขี่ยขยี้อับละอองเกสรตัวผู้ให้ละเอียด เพื่อให้เซลล์ที่อยู่ภายในหลุดออกมาทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

4. ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปอังบนเปลวไฟให้ร้อนพออุ่นๆ หรือพอมือทนได้ เพื่อให้เซลล์ติดกับสไลด์และโครโมโซมกระจายดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำสไลด์ไปคว่ำบนกระดาษซับ ซับสีส่วนเกินออกให้หมด

6. ใช้หัวแม่มือกดลงบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ เพื่อให้เซลล์แบนราบ นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

สำหรับการย้อมโครโมโซมรากและแคลลัส

1. นำปลายรากที่แช่น้ำยาคงสภาพเรียบร้อยแล้วยาว 2-3 มม. มาวางบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 ราก

2. หยดกรดไฮโดรคลอริกลงบนราก 1-2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

3. ซับกรดออกให้หมด และหยดสีย้อมโครโมโซมลงไป 1-2 หยด

4. ใช้เข็มเขี่ยขยี้ปลายรากให้ละเอียดที่สุด เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันได้มากที่สุด และแยกเอาส่วนของรากที่มีขนาดใหญ่ทิ้งไป ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

5. นำสไลด์ไปลนเหนือเปลวไฟ (พออุ่นๆ) เพื่อให้เซลล์ของรากติดกับสไลด์ และโครโมโซมแผ่กระจายดีขึ้น แล้วนำไปคว่ำบนกระดาษซับ ซับสีส่วนเกินออก

6. ใช้หัวแม่มือกดลงบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ เพื่อให้เซลล์แบนราบ แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง และ วิจารณ์ผล

ก.การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของเมล็ดแพงพวยฝรั่ง

เมล็ดแพงพวยฝรั่งเริ่มมีการงอกในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเมล็ด ส่วนที่งอกจากเมล็ดมีสีขาวมีลักษณะคล้ายราก (อาจเป็นรากหรือลำต้น) และจะมีความยาวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เริ่มมีลักษณะพองบวม อาจมีการสร้างใบเกิดขึ้นด้วย บริเวณส่วนปลายจะกลายเป็นปุ่มเกิดเป็นแคลลัสขนาดเล็กสีขาวในสัปดาห์ที่ 5 ของการเพาะเมล็ด จากนั้นแคลลัสจะขยายขนาดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในสัปดาห์ที่ 10 บางแคลลัสจะเริ่มมีการสร้างรากด้วย

ตารางที่ 4-1 แสดง จำนวนเมล็ดที่มีการงอกคิดเป็นเปอร์เซนต์การงอกในอาหารสูตร MS

ปัจจัยควบคุม	จำนวนเมล็ดทั้งหมด	จำนวนเมล็ดที่มีการงอก									
		สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4		สัปดาห์ที่ 6		สัปดาห์ที่ 8		สัปดาห์ที่ 10	
		จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
เมล็ดสดที่มืด	25	-	-	4	16	7	28	11	44	13	52
เมล็ดสดที่มีแสง	25	-	-	4	16	8	32	13	52	18	72
เมล็ดแห้งที่มืด	25	-	-	4	16	5	20	6	24	7	28
เมล็ดแห้งที่มีแสง	25	-	-	2	8	3	12	3	12	3	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-2 แสดงจำนวนเมล็ดที่งอกแล้วพัฒนาเป็นแคลลัส คิดเป็นเปอร์เซนต์การสร้างแคลลัส เทียบกับจำนวนเมล็ดที่งอก

ปัจจัยควบคุม	จำนวนเมล็ดที่กลายเป็นแคลลัส											
	สัปดาห์ที่ 4			สัปดาห์ที่ 6			สัปดาห์ที่ 8			สัปดาห์ที่ 10		
	จน. เมล็ดที่งอก	จน. เป็นแคลลัส	%	จน. เมล็ดที่งอก	จน. เป็นแคลลัส	%	จน. เมล็ดที่งอก	จน. เป็นแคลลัส	%	จน. เมล็ดที่งอก	จน. เป็นแคลลัส	%
เมล็ดสดที่มืด	4	0	0	7	4	57.14	11	6	54.55	13	10	76.92
เมล็ดสดที่มีแสง	4	0	0	8	0	0	13	6	46.15	18	15	83.33
เมล็ดแห้งที่มืด	4	0	0	5	2	40	6	5	83.33	7	6	85.71
เมล็ดแห้งที่มีแสง	2	0	0	3	0	0	3	2	66.67	3	3	100

ตารางที่ 4-3 แสดงจำนวนแคลลัสและค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัส

ปัจจัยควบคุม	จำนวนแคลลัสและค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัส (มม.)									
	สัปดาห์ที่2		สัปดาห์ที่4		สัปดาห์ที่6		สัปดาห์ที่8		สัปดาห์ที่10	
	จน.	ขนาด	จน.	ขนาด	จน.	ขนาด	จน.	ขนาด	จน.	ขนาด
เมล็ดสดที่มืด	-	-	-	-	4	1.25	6	2.00	10	3.80
เมล็ดสดที่มีแสง	-	-	-	-	-	-	6	1.50	15	4.20
เมล็ดแห้งที่มืด	-	-	-	-	2	1	5	2.60	6	15.00
เมล็ดแห้งที่มีแสง	-	-	-	-	-	-	2	1.00	3	4.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-4 แสดงขนาดของแคลล้สที่ได้จากการเพาะเมล็ดของแพงพวยฝรั่ง และ ค่าเฉลี่ยของขนาดแคลล้ส

สัปดาห์ที่	ขนาดแคลล้ส (มม.)			
	เมล็ดสดที่มืด	เมล็ดสดที่มีแสง	เมล็ดแห้งที่มืด	เมล็ดแห้งที่มีแสง
6	2	-	1	-
	1	-	1	-
	1	-	-	-
	1	-	-	-
ค่าเฉลี่ย	1.25	0	1.00	0
8	2	1	5	1
	2	1	5	1
	5	2	1	-
	1	3	1	-
	1	1	1	-
	1	1	-	-
ค่าเฉลี่ย	2.00	1.50	2.60	1.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-4 แสดงขนาดของแคลล้สที่ได้จากการเพาะเมล็ดของแพงพวยฝรั่ง และ ค่าเฉลี่ยของขนาดแคลล้ส(ต่อ)

สัปดาห์ที่	ขนาดแคลล้ส (มม.)			
	เมล็ดสดที่มีด	เมล็ดสดที่มีแสง	เมล็ดแห้งที่มีด	เมล็ดแห้งที่มีแสง
10	5	10	15	3
	5	10	5	1
	10	5	25	8
	5	10	15	-
	3	10	10	-
	2	5	20	-
	2	3	-	-
	2	2	-	-
	2	2	-	-
	3	1	-	-
	-	1	-	-
	-	1	-	-
	-	2	-	-
	-	1	-	-
ค่าเฉลี่ย	3.80	4.20	15.00	4.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

เริ่มมีการสร้างแคลลัส บนชิ้นส่วนใบแพงพวยฝรั่ง ที่สัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยแคลลัสเป็นปุ่มขนาดเล็กสีขาวขึ้นบนบริเวณใด บริเวณหนึ่งของชิ้นส่วนใบ จากนั้นจะขยายเต็มชิ้นส่วนใบและกลายเป็นก้อนแคลลัสและเพิ่มขนาดขึ้นเรื่อยๆ

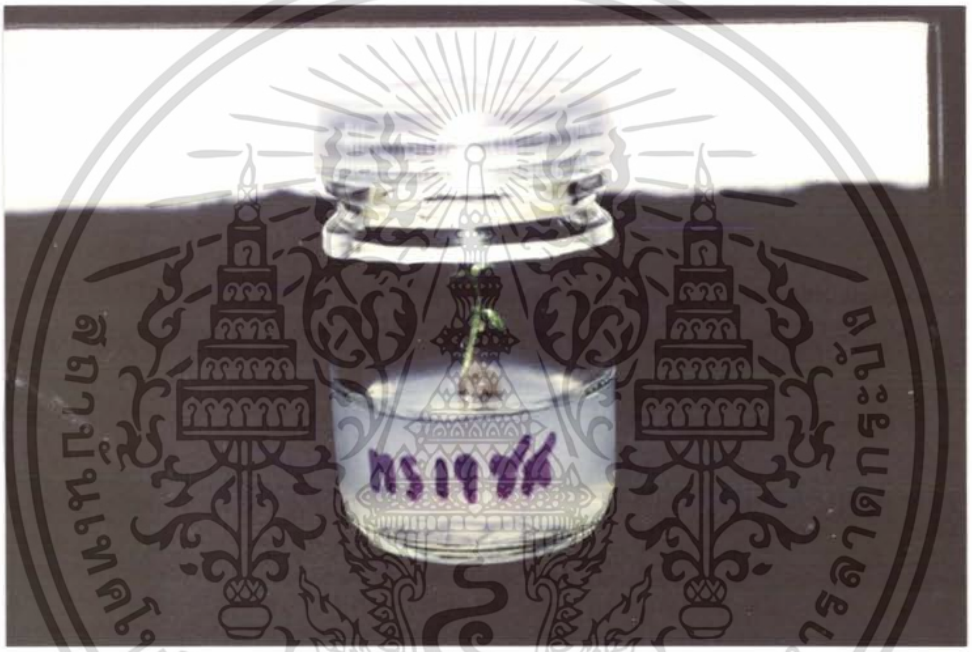
การเกิดแคลลัสจากก้านใบ

เริ่มมีการสร้างแคลลัสในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัสเป็นก้อนขนาดเล็กสีขาวใส เกิดขึ้นที่บริเวณปลายของก้านใบ อาจเกิดที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง หรือทั้งสองด้านพร้อมกันก็ได้ จากนั้นแคลลัสก็จะขยายขนาดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

การเกิดแคลลัสจากปล้อง

เริ่มมีการสร้างแคลลัสในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัสเป็นก้อนขนาดเล็กสีขาวใส เกิดขึ้นที่บริเวณปลายของปล้อง อาจเกิดที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ งหรือทั้งสองด้านพร้อมกันก็ได้ จากนั้นแคลลัสก็จะขยายขนาดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 แสดงลักษณะต้นที่ให้แคลลัส (อายุ 10 สัปดาห์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข อิทธิพลของชนิดของอาหารและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเกิดแคลลัส

ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตาราง A-1,A-2,B-1,B-2,B-3,B-4

การทดลองในสูตรอาหาร MS ที่ทดลองใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อของ ก้านใบ และ ปล้อง ในที่มืด ทั้งที่เพาะเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ (20 องศาเซลเซียส) และ ที่อุณหภูมิปรกติ (25 องศาเซลเซียส) จะไม่ให้ผลคือไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นในอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน 2,4-D และ Kinetin ทั้งแปดอัตราส่วนคือ 0:0 , 0.5:0 , 1.0:0 , 1.5:0 , 0:0.12 , 0.5: 0.12 , 1.0:0.12 , 1.5:0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร(ตารางที่ A-1)

การที่ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงใน MS อาจมีสาเหตุดังต่อไปนี้

ปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดและปริมาณ ของฮอร์โมน อุณหภูมิ และ สูตรอาหารไม่เหมาะสม เพราะเนื้อเยื่อต่างชนิดกันย่อมมีความต้องการปัจจัยต่างกัน

เนื่องจากเนื้อเยื่อของส่วนที่เป็นก้านใบ และ ปล้อง เป็นชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็ก จึงอาจที่จะไม่สามารถทนต่อการทำลาย ของ คลอลอกส์ ได้ดีเท่าชิ้นเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่กว่าเช่น ใบ

สำหรับการใช้ใบมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS นั้นจากผลการคำนวณทางสถิติแสดงผลออกมาทั้งในที่อุณหภูมิต่ำ และที่อุณหภูมิปรกติ ซึ่งพบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นในอัตราส่วนฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เป็น 1.0 : 0.0 , 0.5 : 0.12 และ 1.0 : 0.12(ดังตารางที่ B-1)

สำหรับใบในสูตรอาหาร LS ได้ผลคือ ฮอร์โมนทุกอัตราส่วนให้ผลไม่แตกต่างกันทั้งๆ ที่ในอัตราส่วนฮอร์โมนที่1.5 : 0.0 , 1.5 : 0.12 เกิดเป็นแคลลัสถึง 30 เปอร์เซนต์

สำหรับก้านใบในสูตรอาหาร LS ก็ให้ผลเช่นเดียวกับ ใบในสูตรอาหาร LS คือไม่แตกต่างในแต่ละอัตราส่วนฮอร์โมน

สำหรับ ปล้อง ในสูตรอาหาร LS ที่มีอัตราส่วนฮอร์โมนที่ 0.0 : 0.0 , 0.5 : 0.0 , 0.0 : 0.12 ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ อัตราส่วนฮอร์โมนที่ 1.5 : 0.0 , 1.0 : 0.12 , 1.5 : 0.12 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และ อัตราส่วนฮอร์โมนที่ 1.0 : 0.0 , 1.5 : 0.0 , 0.5 : 0.12 , 1.5 : 0.12 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ A-1

ผลของการเกิดแคลลัสของแพงพวยฝรั่งเมื่อนำชิ้นส่วนของใบ ก้านใบ และปล้อง มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ Kinetin ในอัตราส่วนต่างๆกัน โดยวัดผลเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ผลของการเกิดแคลลัสแสดงเป็นจำนวนขวดที่มีแคลลัสเกิดขึ้น(ทำ treatment ละ 5 ขวด โดยใส่เนื้อเยื่อขวดละ 1 ชิ้น)

2,4D/ Kinetin	MS					
	อุณหภูมิห้อง (25 c)			อุณหภูมิต่ำ (20 c)		
	ใบ	ก้านใบ	ปล้อง	ใบ	ก้านใบ	ปล้อง
0/0	-	-	-	-	-	-
0.5/0	-	-	-	-	-	-
1.0/0	-	-	-	1	-	-
1.5/0	-	-	-	-	-	-
0/0.12	-	-	-	-	-	-
0.5/0.12	3	-	-	1	-	-
1.0/0.12	1	-	-	1	-	-
1.5/0.12	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ A-2

ผลของการเกิดแคลลัสของแพงพวยฝรั่งเมื่อนำชิ้นส่วนของใบ ก้านใบ และปล้อง มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D และ Kinetin ในอัตราส่วนต่างๆกัน โดยวัดผลเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ผลของการเกิดแคลลัสแสดงเป็นจำนวนขวดที่มีแคลลัสเกิดขึ้น(ทำ treatment ละ 5 ขวด โดยใส่เนื้อเยื่อขวดละ 1 ชิ้น)

2,4D / Kinetin	LS					
	อุณหภูมิห้อง (25 c)			อุณหภูมิต่ำ (20 c)		
	ใบ	ก้านใบ	ปล้อง	ใบ	ก้านใบ	ปล้อง
0/0	-	-	-	-	-	-
0.5/0	1	-	-	-	-	-
1.0/0	-	-	-	-	-	-
1.5/0	1	1	1	2	-	1
0/0.12	-	-	-	-	-	-
0.5/0.12	1	3	-	-	-	1
1.0/0.12	-	2	2	2	1	3
1.5/0.12	2	2	3	1	-	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B-1

TABLE OF a (a) MEANS FOR leave (no.callus)
BASED ON ORIGINAL SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	4	0.0 c
a2	4	0.0 c
a3	3	10.0 bc
a4	4	0.0 c
a5	4	0.0 c
a6	1	40.0 a
a7	2	20.0 ab
a8	4	0.0 c
MEAN		8.8

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

TABLE OF a (a) MEANS FOR leave (no.callus)
BASED ON TRANSFORMED SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	4	1.2813 c
a2	4	1.2813 c
a3	3	13.9231 bc
a4	4	1.2813 c
a5	4	1.2813 c
a6	1	38.6667 a
a7	2	26.5650 ab
a8	4	1.2813 c
MEAN		10.6952

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B-2

TABLE OF a (a) MEANS FOR leave (no.callus)
BASED ON ORIGINAL SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	4	0.0 a
a2	3	10.0 a
a3	4	0.0 a
a4	1	30.0 a
a5	4	0.0 a
a6	3	10.0 a
a7	2	20.0 a
a8	1	30.0 a
MEAN		12.5

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

TABLE OF a (a) MEANS FOR leave (no.callus)
BASED ON TRANSFORMED SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	4	1.2813 a
a2	3	13.9231 a
a3	4	1.2813 a
a4	1	32.8982 a
a5	4	1.2813 a
a6	3	13.9231 a
a7	2	20.2563 a
a8	1	32.8982 a
MEAN		14.7179

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B-3

TABLE OF a (a) MEANS FOR node (no.callus)
BASED ON ORIGINAL SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	5	0.0 a
a2	5	0.0 a
a3	5	0.0 a
a4	4	10.0 a
a5	5	0.0 a
a6	2	30.0 a
a7	1	30.0 a
a8	3	20.0 a
MEAN		11.3

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

TABLE OF a (a) MEANS FOR node (no.callus)
BASED ON TRANSFORMED SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	5	1.2813 a
a2	5	1.2813 a
a3	5	1.2813 a
a4	4	13.9231 a
a5	5	1.2813 a
a6	2	26.0248 a
a7	1	32.8982 a
a8	3	20.2563 a
MEAN		12.2785

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B-4

TABLE OF a (a) MEANS FOR internode (no.callus)
BASED ON ORIGINAL SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	5	0.0 c
a2	5	0.0 c
a3	4	10.0 bc
a4	3	20.0 abc
a5	5	0.0 c
a6	4	10.0 bc
a7	1	50.0 a
a8	2	40.0 ab
MEAN		16.3

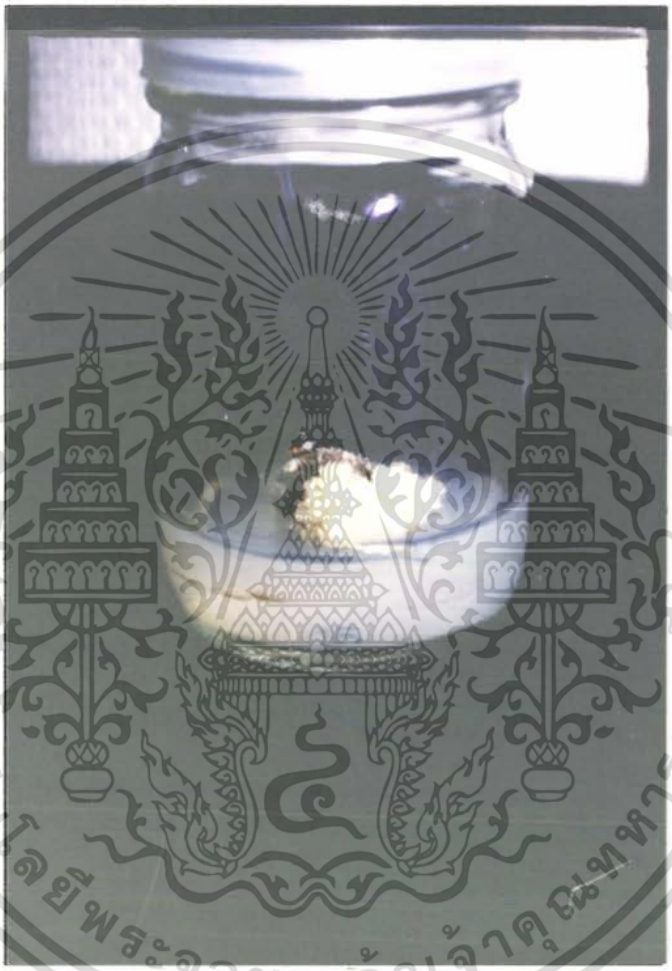
In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

TABLE OF a (a) MEANS FOR internode (no.callus)
BASED ON TRANSFORMED SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	5	1.2813 c
a2	5	1.2813 c
a3	4	13.9231 bc
a4	3	26.5650 abc
a5	5	1.2813 c
a6	4	13.9231 bc
a7	1	44.9999 a
a8	2	38.6667 ab
MEAN		17.7402

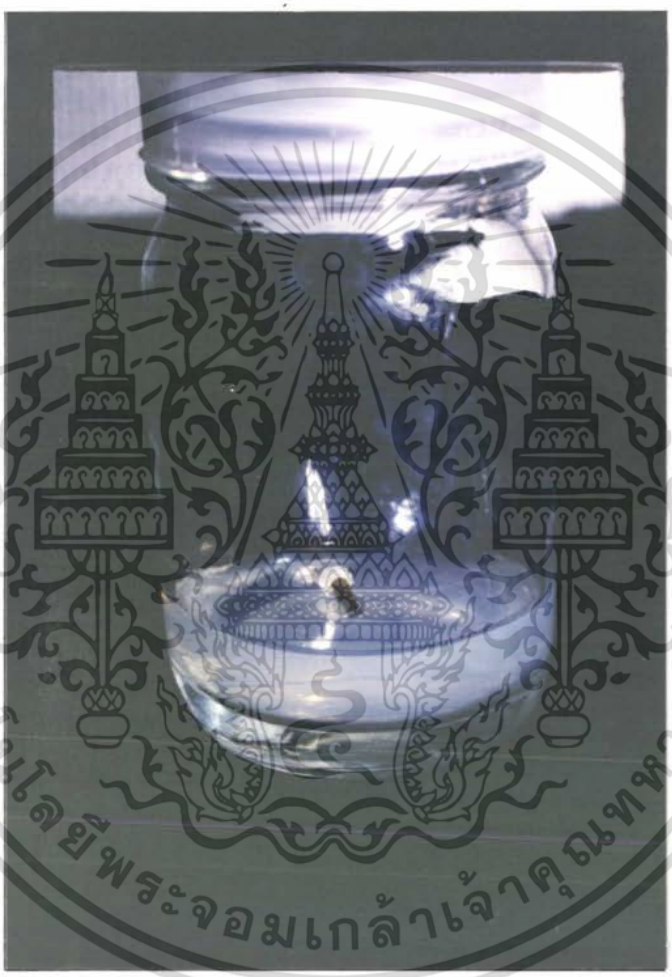
In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงลักษณะแคลลัสที่เกิดจากใบ (อายุ 5 สัปดาห์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงลักษณะแคลลัสที่เกิดจากก้านใบ (อายุ 5 สัปดาห์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค การศึกษาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างทำการทดลอง

พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา มีแบคทีเรียบ้างแต่เนื่องจากมีเวลาจำกัดจึงไม่ได้จำแนกเอาไว้ ส่วนเชื้อรานั้นก็เลือกเฉพาะขวดเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วยเชื้อราที่เป็น pure culture และเกิดขึ้นบ่อยเท่านั้น สำหรับเชื้อราที่ได้ตรวจสอบและเรียงตามลำดับการเกิดขึ้นในปริมาณมากไปน้อยมีดังต่อไปนี้

1) Penicillium sp.

2) Aspergillus sp.

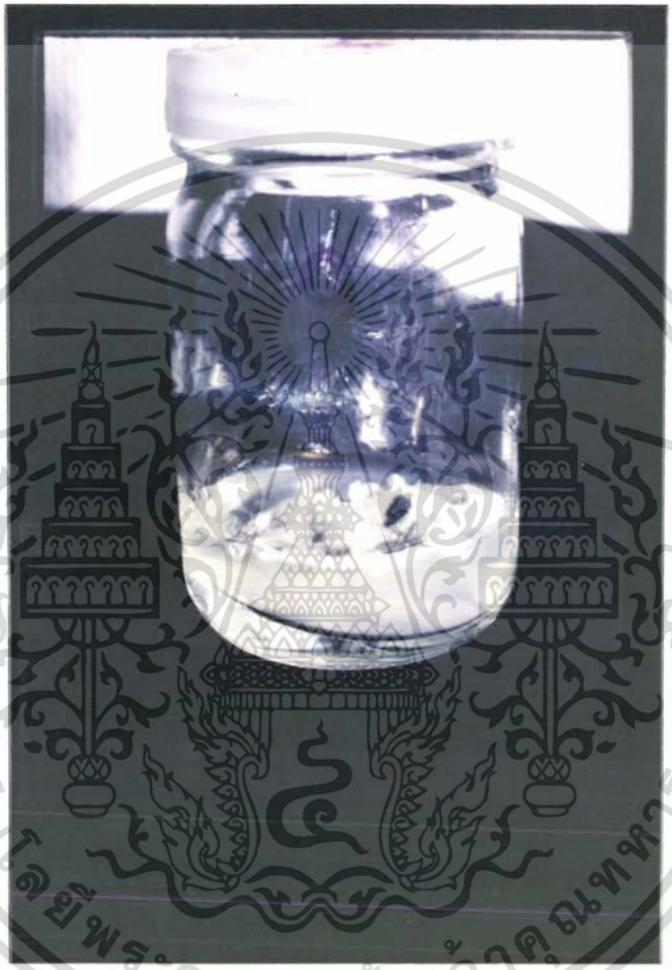
3) Ascomycetes ที่สร้าง asci 1 ชนิด

4) Botritis sp.

5) ราน้ำ 1 ชนิด

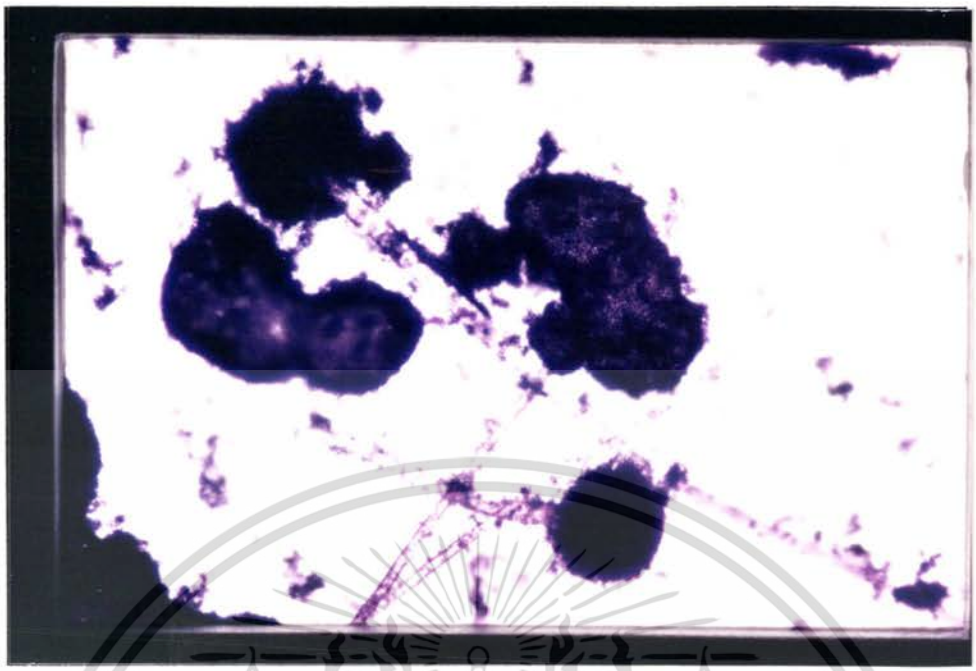
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ Penicillium sp. (10 x 40)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

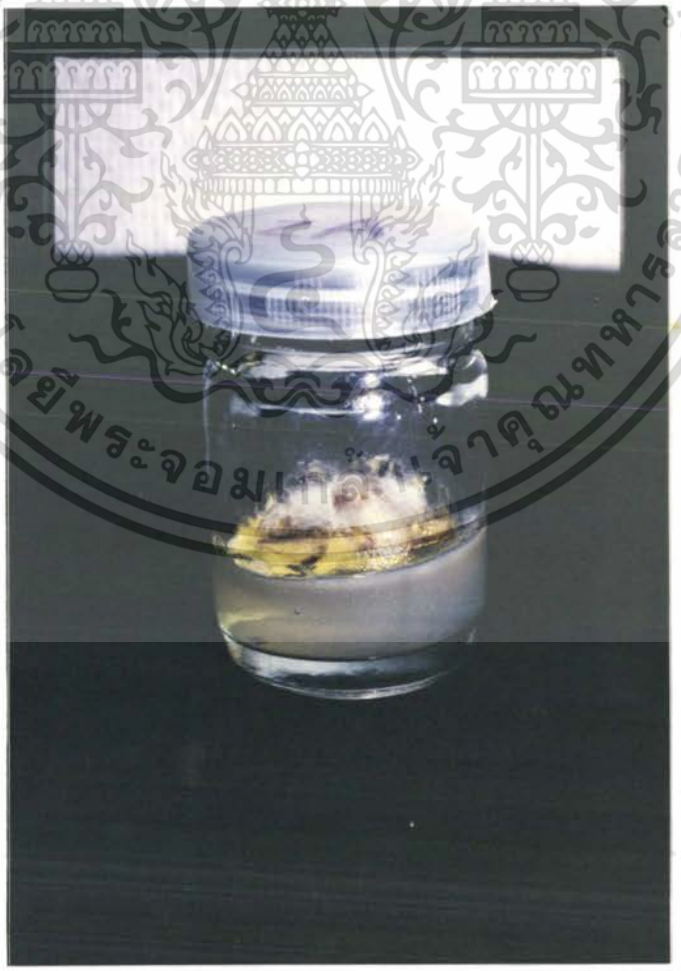


รูปที่ 5 แสดงลักษณะของ Penicillium sp. ในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

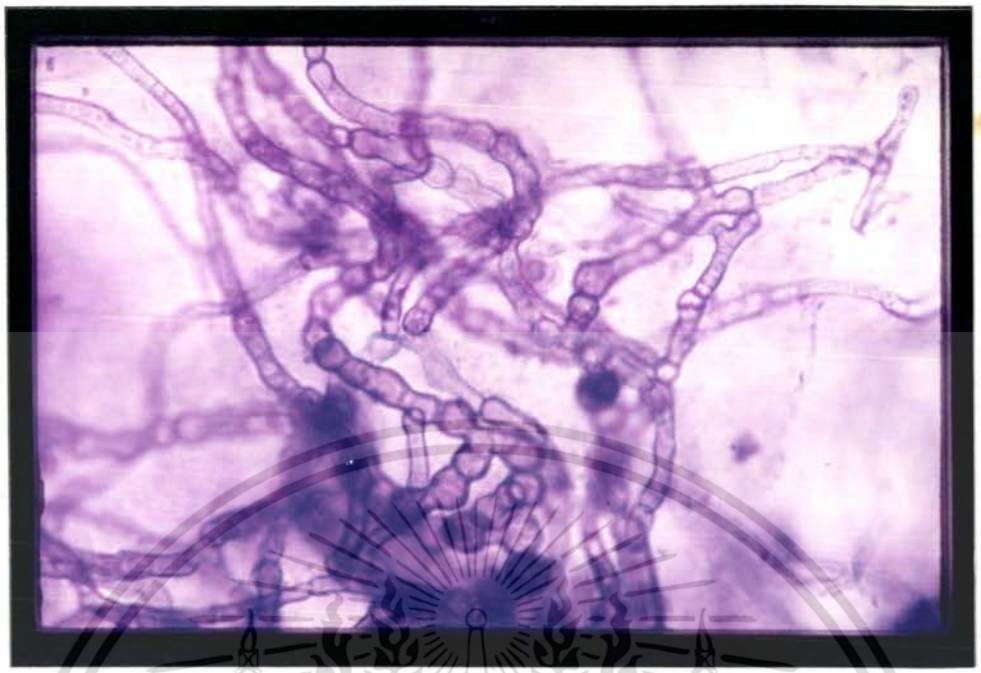


รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของ Aspergillus sp. (10 x 40)



รูปที่ 7 แสดงลักษณะของ Aspergillus sp. ในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

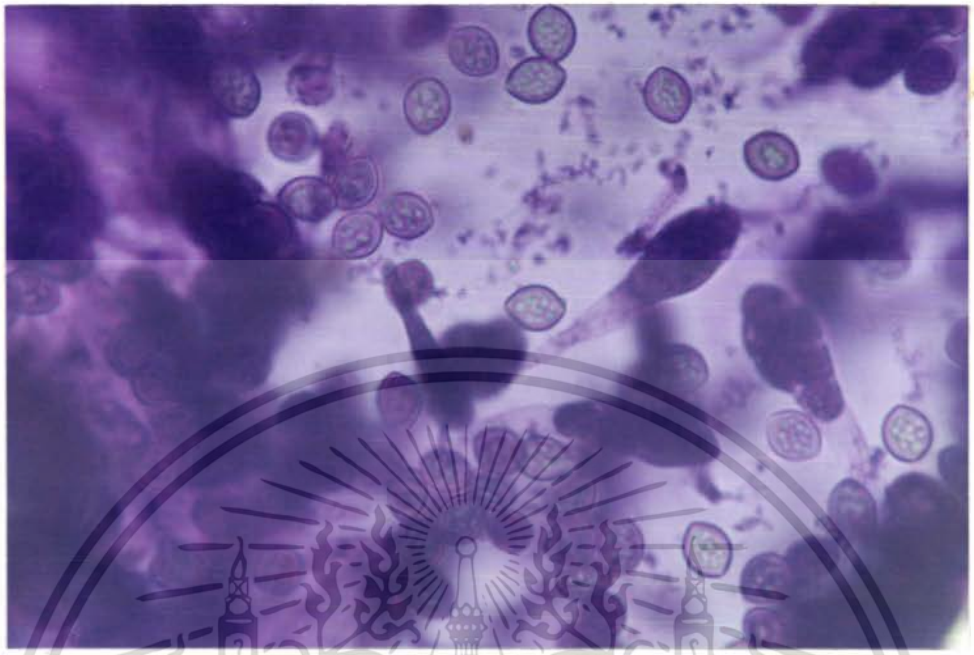
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 แสดงเส้นใย Ascomycetes ที่สร้าง asci (10 x 40)

รูปที่ 9 แสดงลักษณะของ Ascomycetes ที่สร้าง asci ในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

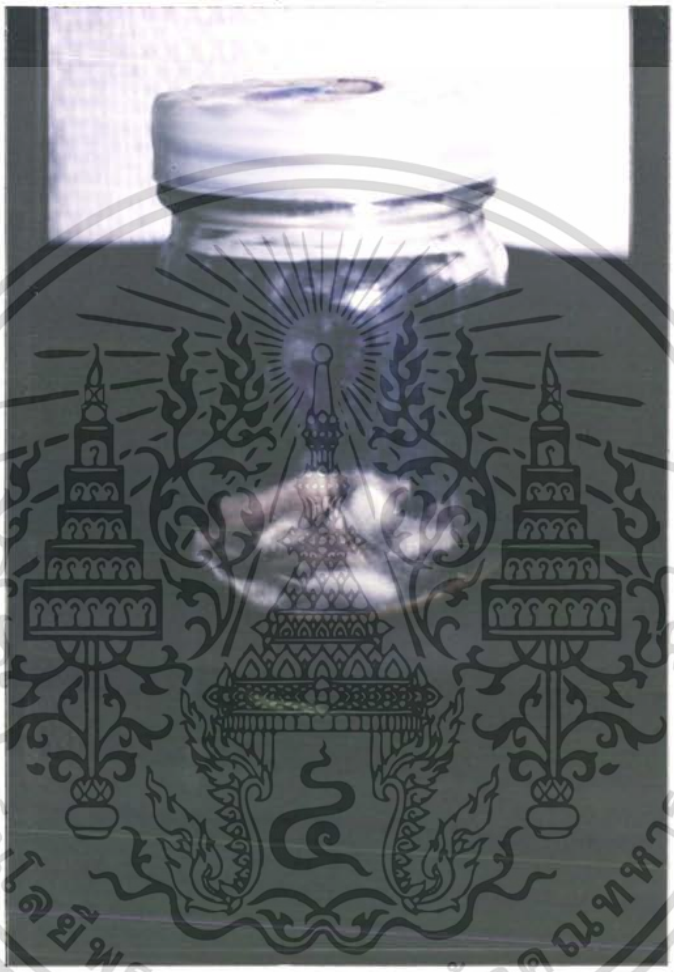
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 แสดง asci และ ascospores ของ Ascomycetes ที่สร้าง asci (10 x 40)

รูปที่ 11 แสดงเส้นใยและสปอร์ของรา Botritis sp. (10 x 40)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

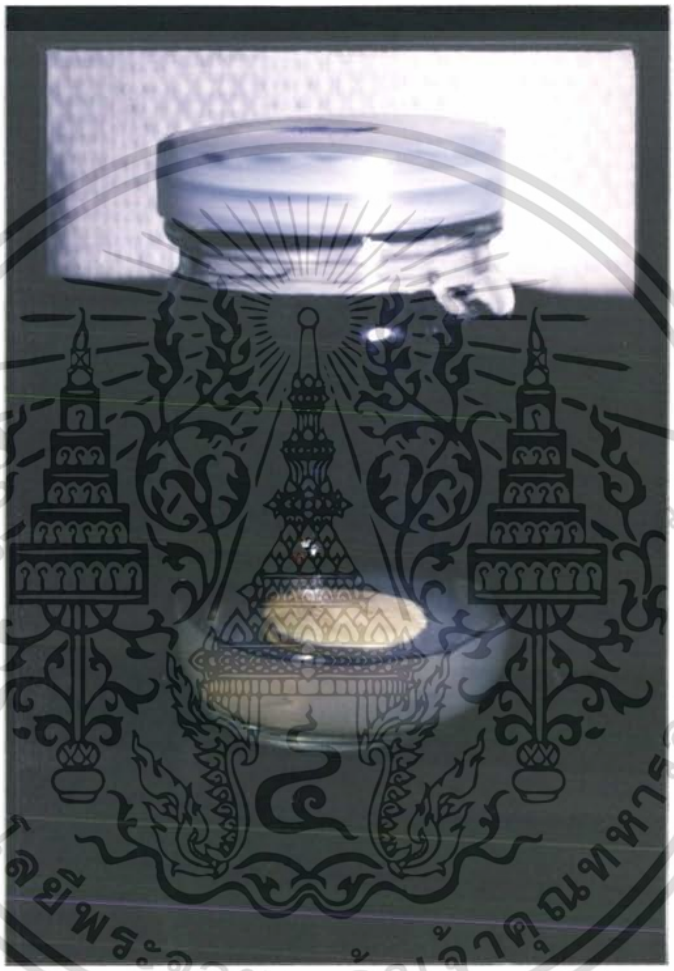


รูปที่ 12 แสดงลักษณะของ Botritis sp. ในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 13 แสดงโครงสร้างภายนอกของ ราน้ำ ชนิดหนึ่ง (10 x 40)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 แสดงลักษณะของ Bacteria ชนิดหนึ่งที่ตรวจพบในชวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง การศึกษาโครโมโซม ในเซลล์ปลายราก ดอก และแคลลัส

จากการศึกษาโครโมโซมในเซลล์ ที่ปลายรากซึ่ง มีการแบ่งเซลล์ แบบไมโตซิส (mitosis) พบว่ามีทุกระยะ(stage)ของการแบ่งไมโตซิสแต่ยังนับโครโมโซมได้ไม่แน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์มีขนาดเล็ก(โครโมโซมมีขนาดเล็ก) และเนื่องจากเวลาในการศึกษามีจำกัด อย่างไรก็ตามจากการพยายามตรวจนับ พบว่าน่าจะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 16 (2n = 16) แต่ทั้งนี้ผู้วิจัยไม่อาจรับรองความถูกต้อง การศึกษาในอนาคตทางด้านจำนวนโครโมโซมของแพงพวยฝรั่งจึงมีความจำเป็นต้องกระทำ

สำหรับการศึกษาในดอกนั้น ก็พบอุปสรรคทางด้าน เวลา เช่นเดียวกับในราก กล่าวคือได้พยายามเอาดอกที่มีขนาดแตกต่างกันมาศึกษาหลายๆขนาดแต่ยังพบว่าขนาดโตเกินกว่าที่จะพบการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส(meiosis) ซึ่งถ้ามีเวลาศึกษามากพอก็อาจจะได้ศึกษาไมโอซิส(และอาจจะนับจำนวนโครโมโซมได้) จากดอกที่มีอายุไม่แก่เกินไป(ขนาดไม่โตเกินไป) การศึกษาไมโอซิสศึกษาจาก pollen mother cells ในอับละอองเกสรตัวผู้ (anther)ของดอก

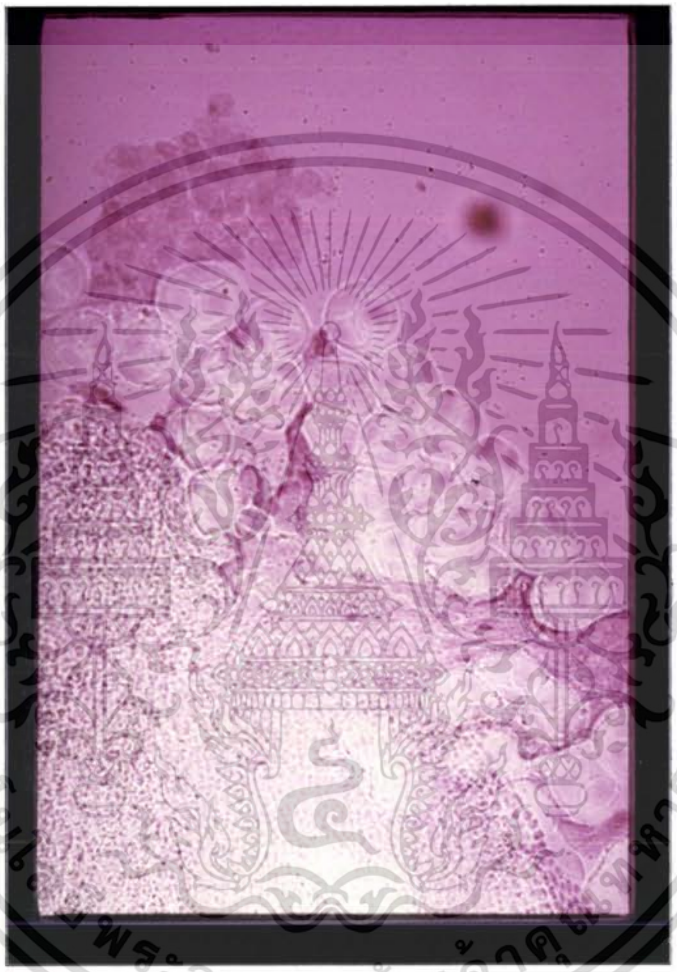
สำหรับการศึกษาในเซลล์ของแคลลัสนั้น พบว่า มีเซลล์อยู่สองชนิดที่แตกต่างกันทางด้านขนาด พวกที่มีขนาดใหญ่น่าจะเป็นพวกที่มีการแบ่งเซลล์ได้มากกว่าพวกที่มีขนาดเล็ก แต่ก็เช่นกัน การศึกษาในครั้งนี้ยังไม่อาจนับจำนวนโครโมโซมในเซลล์ของแคลลัส

การศึกษาจำนวนโครโมโซมในแคลลัสมีวัตถุประสงค์เมื่อจะดูว่าเซลล์ของแคลลัส ในอาหารที่มีสูตรชนิดต่างๆนั้นมีการเกิดการกลายพันธุ์(mutation)หรือไม่โดยเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมกับที่ตรวจพบในรากหรือในดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

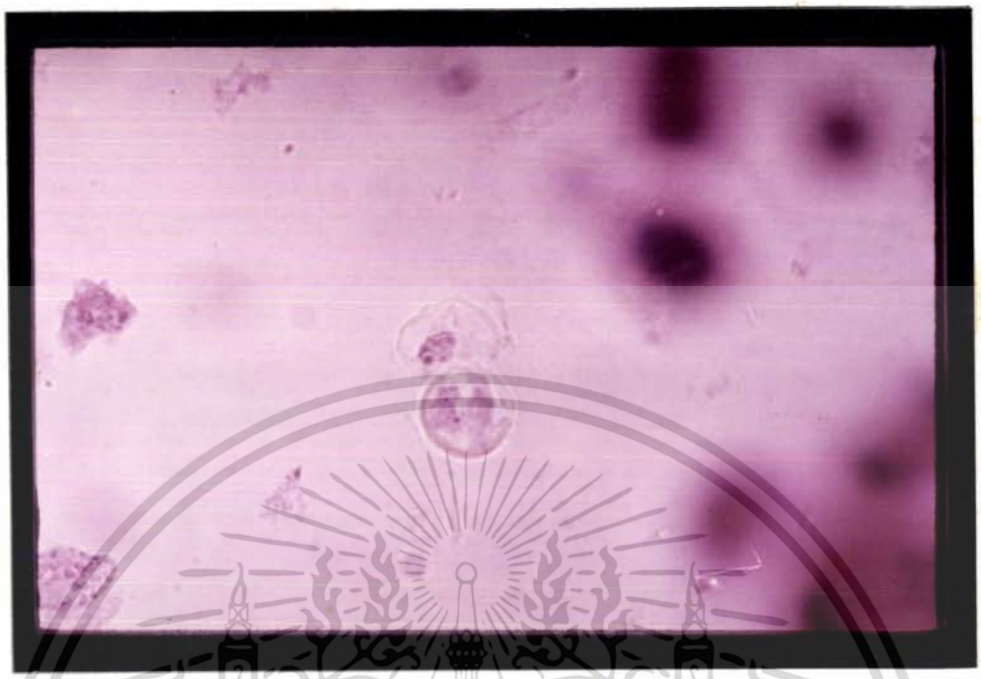
รูปที่ 15 ดอกแพงพวยฝรั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดง pollen mother cells ในระยะ tetrad เพราะการแบ่งไมโอซิสได้สิ้นสุดลงพอดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 เซลล์แคลล้สขนาดใหญ่

รูปที่ 18 เซลล์แคลล้สขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของแพงพวยฝรั่ง ซึ่งอาจแบ่งปัจจัยเหล่านี้ออกเป็น 2 กลุ่ม

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด ซึ่งได้แก่

ก) ชนิดของเมล็ด ซึ่งได้แก่เมล็ดสด ที่เก็บจากต้น และเมล็ดแห้งที่ขายตามท้องตลาด

ข) แสงสว่าง ซึ่งได้แก่ การเพาะเมล็ดในที่มีแสง และ ไม่มีแสง

จากการศึกษาพบว่าสำหรับการงอกของเมล็ดนั้น เมล็ดแห้งมีเปอร์เซนต์การงอกสูงกว่าเมล็ดสด ,การเพาะเลี้ยงในที่สว่างให้ผลดีกว่าเพาะในที่มืด

2. ปัจจัยที่มีต่อการเกิดแคลลัส ซึ่งได้แก่

ก) ชนิดของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งได้แก่ ส่วนของใบ,ก้านใบ และปล้อง

ข) อุณหภูมิ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ 20 c และที่ 25 c

ค) สูตรอาหาร ซึ่งได้แก่ MS และ LS

ง) สัดส่วนของ 2,4-D ต่อ Kinetin 8 ระดับ คือ

0.0 : 0.0 , 0.5 : 0.0 , 1.0 : 0.0 , 1.5 : 0.0

0.0 : 0.12 , 0.5 : 0.12 , 1.0 : 0.12 , 1.5 : 0.12

ผลการศึกษาการเกิดแคลลัสนั้น ได้พบว่า แต่ละปัจจัยมีความสัมพันธ์ต่อกัน กล่าวคือ

ก) สูตรอาหาร MS จะให้ผลกับเฉพาะส่วนของใบ และที่อัตราส่วนของฮอร์โมน 2,4-D ต่อ Kinetin เป็น 0.5 : 0.12 โดยจะให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงสุด(ประมาณ 40 เปอร์เซนต์)

ข) สูตรอาหาร LS สำหรับชิ้นส่วนที่เป็นใบ และก้านใบ จะให้ผลในการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ค) สูตรอาหาร LS สำหรับชิ้นส่วนที่เป็นปล้องของแพงพวยฝรั่งจะให้ เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงสุดที่สัดส่วนของ 2,4-D ต่อ Kinetin เป็น 1.0 : 0.12 โดยจะให้แคลลัสสูงถึง 50 เปอร์เซนต์

3. การศึกษาถึงปัจจัยภายนอกที่มีอิทธิพลต่อการทดลอง คือศึกษาชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์ ที่ปนเปื้อนในขณะทำการทดลอง เพื่อหาแหล่งที่มาและวิธีป้องกัน ซึ่งผลการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า Penicillium sp. จะเป็นปัญหามากที่สุด ในการเพาะเลี้ยงเยื่อเพราะว่ามีความถี่ในการเกิดการปนเปื้อนมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งในกรณีนี้ จะมีผลกระทบต่อการเก็บผล

4. การศึกษาโครโมโซมของ เซลล์ปลายราก, เซลล์ดอก และ เซลล์ของแคลลัส เพื่อต้องการเปรียบเทียบโครโมโซม ของปลายรากหรือดอก(ซึ่งควรเท่ากัน) กับ โครโมโซมของแคลลัส เพื่อต้องการที่จะทราบว่า แคลลัสที่เกิดขึ้นกลายพันธุ์หรือไม่ ซึ่งจะมีผลต่อการสร้างสารเคมีที่ต้องการ กล่าวคือถ้า โครโมโซมของแคลลัส เปลี่ยนแปลงไปจากธรรมชาติ อาจมีการสร้างสารในปริมาณที่เพิ่มขึ้นกว่า ต้นที่อยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งเคยมีตัวอย่างว่า ใบและต้นของแพงพวยฝรั่งสายพันธุ์จากประเทศอินเดียจะให้สารเคมีที่ต้องการสูงกว่าสายพันธุ์ที่มาจากประเทศอื่น ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ เป็นที่น่าเสียดายว่าไม่สามารถศึกษาถึงจำนวนโครโมโซมที่แน่นอนเนื่องจากเวลามีจำกัด แต่ได้พยายามนับจำนวนโครโมโซมในเซลล์ราก พบว่าอาจมีประมาณ 16 แท่ง(8 คู่ , 2n = 16) สำหรับขนาดของเซลล์ในแคลลัส พบว่ามีสองขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

แสดงการคำนวณผลทางสถิติ ของการศึกษาอิทธิพลของชนิดของอาหารและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเกิดแคลลัส (คำนวณผลในตารางที่ A-1 และ A-2)

```
FILENAME : msleave
TITLE    : bioproject

                    RANDOMIZED COMPLETE BLOCK DESIGN

              REPLICATION (r)  =  2

              TREATMENT  = a (a)  =  8
                   a1  = a1
                   a2  = a2
                   a3  = a3
                   a4  = a4
                   a5  = a5
                   a6  = a6
                   a7  = a7
                   a8  = a8
```

leave (no.callus)

	r1	r2
a1	0	0
a2	0	0
a3	0	20
a4	0	0
a5	0	0
a6	60	20
a7	20	20
a8	0	0
REP TOTALS	80	60
REP MEANS	10	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1

leave (no.callus) IN ARCSINE SCALE

	r1	r2
a1	1.2813	1.2813
a2	1.2813	1.2813
a3	1.2813	26.5650
a4	1.2813	1.2813
a5	1.2813	1.2813
a6	50.7684	26.5650
a7	26.5650	26.5650
a8	1.2813	1.2813
REP TOTALS	85.0211	86.1014
REP MEANS	10.6276	10.7627

1

Arcsine(Sqr(X/100)) ---->

MORE...

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANALYSIS OF VARIANCE FOR leave (no.callus)
BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine(Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
r (r)	1	0.072943	0.072943	<1
a (a)	7	2975.568819	425.081260	4.86 *
ERROR	7	612.462591	87.494656	
TOTAL	15	3588.104354		

* = significant at 5% level

TABLE OF a (a) MEANS FOR leave (no.callus)
BASED ON ORIGINAL SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	4	0.0 c
a2	4	0.0 c
a3	3	10.0 bc
a4	4	0.0 c
a5	4	0.0 c
a6	1	40.0 a
a7	2	20.0 ab
a8	4	0.0 c
MEAN		8.8

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

TABLE OF a (a) MEANS FOR leave (no.callus)
BASED ON TRANSFORMED SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	4	1.2813 c
a2	4	1.2813 c
a3	3	13.9231 bc
a4	4	1.2813 c
a5	4	1.2813 c
a6	1	38.6667 a
a7	2	26.5650 ab
a8	4	1.2813 c
MEAN		10.6952

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FILENAME : ls
TITLE : bioproject

RANDOMIZED COMPLETE BLOCK DESIGN

REPLICATION (r) = 2

TREATMENT = a (a) = 8
a1 = a1
a2 = a2
a3 = a3
a4 = a4
a5 = a5
a6 = a6
a7 = a7
a8 = a8

leave (no.callus)

	r1	r2
a1	0	0
a2	20	0
a3	0	0
a4	20	40
a5	0	0
a6	20	0
a7	0	40
a8	40	20
REP TOTALS	100	100
REP MEANS	13	13

1

leave (no.callus) IN ARCSINE SCALE

	r1	r2
a1	1.2813	1.2813
a2	26.5650	1.2813
a3	1.2813	1.2813
a4	26.5650	39.2314
a5	1.2813	1.2813
a6	26.5650	1.2813
a7	1.2813	39.2314
a8	39.2314	26.5650
REP TOTALS	124.0515	111.4342
REP MEANS	15.5064	13.9293

1

Arcsine(Sqr(X/100))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MORE...

ANALYSIS OF VARIANCE FOR leave (no.callus)
BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine(Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
r (r)	1	9.949798	9.949798	<1
a (a)	7	2469.224984	352.746426	1.64 ns
ERROR	7	1509.860192	215.694313	
TOTAL	15	3989.034974		

ns = not significant

TABLE OF a (a) MEANS FOR leave (no.callus)
BASED ON ORIGINAL SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	4	0.0 a
a2	3	10.0 a
a3	4	0.0 a
a4	1	30.0 a
a5	4	0.0 a
a6	3	10.0 a
a7	2	20.0 a
a8	1	30.0 a
MEAN		12.5

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

TABLE OF a (a) MEANS FOR leave (no.callus)
BASED ON TRANSFORMED SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	4	1.2813 a
a2	3	13.9231 a
a3	4	1.2813 a
a4	1	32.8982 a
a5	4	1.2813 a
a6	3	13.9231 a
a7	2	20.2563 a
a8	1	32.8982 a
MEAN		14.7179

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FILENAME : ls
TITLE : bioproject

RANDOMIZED COMPLETE BLOCK DESIGN

REPLICATION (r) = 2

TREATMENT = a (a) = 8
a1 = a1
a2 = a2
a3 = a3
a4 = a4
a5 = a5
a6 = a6
a7 = a7
a8 = a8

node (no.callus)

	r1	r2
a1	0	0
a2	0	0
a3	0	0
a4	20	0
a5	0	0
a6	60	0
a7	40	20
a8	40	0
REP TOTALS	160	20
REP MEANS	20	3

1

node (no.callus) IN ARCSINE SCALE

	r1	r2
a1	1.2813	1.2813
a2	1.2813	1.2813
a3	1.2813	1.2813
a4	26.5650	1.2813
a5	1.2813	1.2813
a6	50.7684	1.2813
a7	39.2314	26.5650
a8	39.2314	1.2813
REP TOTALS	160.9213	35.5340
REP MEANS	20.1152	4.4417

1

Arcsine(Sqr(X/100))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MORE...

ANALYSIS OF VARIANCE FOR node (no.callus)
BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine(Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
r (r)	1	982.624378	982.624378	5.05 ns
a (a)	7	2328.480108	332.640015	1.71 ns
ERROR	7	1361.821042	194.545863	
TOTAL	15	4672.925528		

ns = not significant

TABLE OF a (a) MEANS FOR node (no.callus)
BASED ON ORIGINAL SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	5	0.0 a
a2	5	0.0 a
a3	5	0.0 a
a4	4	10.0 a
a5	5	0.0 a
a6	2	30.0 a
a7	1	30.0 a
a8	3	20.0 a
MEAN		11.3

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

TABLE OF a (a) MEANS FOR node (no.callus)
BASED ON TRANSFORMED SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	5	1.2813 a
a2	5	1.2813 a
a3	5	1.2813 a
a4	4	13.9231 a
a5	5	1.2813 a
a6	2	26.0248 a
a7	1	32.8982 a
a8	3	20.2563 a
MEAN		12.2785

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FILENAME : ls
TITLE : bioproject

RANDOMIZED COMPLETE BLOCK DESIGN

REPLICATION (r) = 2

TREATMENT = a (a) = 8
a1 = a1
a2 = a2
a3 = a3
a4 = a4
a5 = a5
a6 = a6
a7 = a7
a8 = a8

internode (no.callus)

	r1	r2
a1	0	0
a2	0	0
a3	20	0
a4	20	20
a5	0	0
a6	0	20
a7	40	60
a8	60	20
REP TOTALS	140	120
REP MEANS	18	15

1

internode (no.callus) IN ARCSINE SCALE

	r1	r2
a1	1.2813	1.2813
a2	1.2813	1.2813
a3	26.5650	1.2813
a4	26.5650	26.5650
a5	1.2813	1.2813
a6	1.2813	26.5650
a7	39.2314	50.7684
a8	50.7684	26.5650
REP TOTALS	148.2549	135.5885
REP MEANS	18.5319	16.9486

---

1 :
Arcsine(Sqr(X/100))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MORE...

ANALYSIS OF VARIANCE FOR internode (no.callus)
BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine(Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
r (r)	1	10.027356	10.027356	<1
a (a)	7	4201.429556	600.204222	4.25 *
ERROR	7	988.692612	141.241802	
TOTAL	15	5200.149524		

* = significant at 5% level

TABLE OF a (a) MEANS FOR internode (no.callus)
BASED ON ORIGINAL SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	5	0.0 c
a2	5	0.0 c
a3	4	10.0 bc
a4	3	20.0 abc
a5	5	0.0 c
a6	4	10.0 bc
a7	1	50.0 a
a8	2	40.0 ab
MEAN		16.3

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

TABLE OF a (a) MEANS FOR internode (no.callus)
BASED ON TRANSFORMED SCALE
(AVE. OVER 2 REPS)

a	RANKS	MEANS
a1	5	1.2813 c
a2	5	1.2813 c
a3	4	13.9231 bc
a4	3	26.5650 abc
a5	5	1.2813 c
a6	4	13.9231 bc
a7	1	44.9999 a
a8	2	38.6667 ab
MEAN		17.7402

In a column, means followed by a common letter
are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

วิธีการเตรียมอาหาร

ทำเป็น stock solution คือ สารละลายที่มีความเข้มข้นมากๆ เป็นหลายเท่าของความเข้มข้นที่จะใช้จริงในสูตรอาหารก่อน แล้วจึงนำมาเตรียมอาหารอีกทีหนึ่ง

วิธีเตรียม stock solution สูตร MS

1)ชั่งสารเคมีสูตร MS โดยแบ่งออกเป็น 4 stock คือ

stock solution 1 inorganic salt (10 x)	กรัม
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	165
Potassium nitrate (KNO_3)	190
Calcium Chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	44
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	17
Boric acid (H_3BO_3)	0.62
Manganese sulfate ($MnSO_4.H_2O$)	0.69
Zinc sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.614
Potassium iodide (KI)	0.083
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.025
Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.0025
Cobalt chloride ($CoCl_2.6H_2O$)	0.0025
stock solution 2 (100 x)	
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	37
stock solution 3 chelated (200 x)	
Sodium EDTA (Na_2EDTA)	7.45
Ferous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$)	5.75
stock solution 4 vitamivs (1000 x)	
Inositol	10.00
Glycine	0.200
Nicotinic acid	0.050

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pyridoxine HCl	0.050
Thiamine HCl	0.010

2)เมื่อชั่งครบจำนวนแล้ว นำสารเคมีแต่ละตัวมาละลาย เมื่อละลายหมดแล้วเทผสมรวมกันตามลำดับก่อนหลัง เติมน้ำให้ครบปริมาตรที่ต้องการ

3)จะได้ stock solution 1,2,3,4 ตามลำดับ

จากนั้นนำมาใช้เวลาเตรียมอาหาร

วิธีเตรียมอาหาร 1 ลิตร ดังนี้

1.เติม stock solution I 100 มล.

2.เติม stock solution II 10 มล.

3.เติม stock solution III 5 มล.

4.เติม stock solution IV 1 มล.

5.ใส่รวมกันในภาชนะที่เตรียมไว้ เติมน้ำตาล 30 กรัม/ล. คนต่อไปจนละลาย

6.นำมาวัด pH โดยใช้เครื่อง pH meter ปรับ pH ให้ได้ 5.6-5.8

7.นำมาต้มเมื่อเริ่มร้อน ใส่วุ้นประมาณ 7.5 กรัม/ล. คนต่อไปจนละลาย

8.นำอาหารมากรอกใส่ขวด ปิดฝา

9.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยความดัน 15 ปอนด์ /ตารางนิ้ว ที่ 121 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

	MS	LS
Macroelement		
NH_4NO_3	1,650.0	1,650.0
KNO_3	1.900.0	1.900.0
KH_2PO_4	170.0	170.0
$MgSO_4.7H_2O$	370.0	370.0
$CaCl_2.2H_2O$	440.0	440.0
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.8
Na_2EDTA	37.3	37.3
Microelements		
H_3BO_3	6.2	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	22.3
$ZnSO_4.4H_2O$	8.6	8.6
KI	0.83	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25
$CoCL_2.6H_2O$	0.025	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025
Organic constituents		
Sucrose	3 %	3 %
Inositol	100	100
Nicotinic acid	0.5	-
Thiamine.HCL	0.1	0.4
Glycine	2.0	-
Agar	0.7 %	0.7 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ค้นพบรากแพงพวยรักษาโรคมะเร็งได้ ข่าวพาณิชย์ 27(7150) 29 ตุลาคม 2519:3

ต้นสมุนไพรรักษาโรคมะเร็ง แพงพวย-ประโยชน์ ข่าวงานวิจัยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์(11) พฤศจิกายน 2520

ธัญญา เตชะศีลพิทักษ์ , " ดอกไม้กับแมลง (แพงพวย) " , นิตยสาร " ดิฉัน "เล่มที่ 364 . เดือน เมษายน พ.ศ. 2535

นพมาศ ว่องวิทย์เดชา" แพงพวยฝรั่งที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง "วารสารวิทยาศาสตร์ 34(6) มิถุนายน 2523 : 469-472

พรทิพย์ ธนูทอง , 2528 " วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช "

พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ, เอมอร รสมนะพันธุ์และรุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล " การวิเคราะห์หาอัลกาลอยในสมุนไพรไทยภาค 1" วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 8(4) ตุลาคม-ธันวาคม 2524: 109-115

รัฏฐาภิรักษ์ "แพงพวยฝรั่ง-ลักษณะและประโยชน์แพงพวยฝรั่ง(Catharanthus roseus)" 20(2)เมษายน 2521 : 58-63

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม , 2531 " แพงพวยบก " , พจนานุกรมสมุนไพรไทย

สุภาพร วัฒนวีรเดช "ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสข้าวไปเป็นต้นใหม่" วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ,ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ,2531.

อาจเสรี, เสรี ,สมุนไพร ,สำนักพิมพ์พิทยาคาร ,กรุงเทพฯ,หน้า 35.

Anderson et al. 1986 (2) อ้างอิงโดย พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ , 2524

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้