การผลิตและการสกัดฮอร์โมนลอกคราบจากแคลลัสของต้นไข่เน่า

(Vitex glabrata R.Br.)

นางสาว บัทมา กาวรนิธิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2533

ISBN 974-577-788-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016757

I 10311993

PRODUCTION AND EXTRACTION OF MOLTING HORMONE FROM CALLUS OF *Vitex glabrata* R.Br.

Miss Pathama Thavornnithi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1990

ISBN 974-577-788-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและการสกัดฮอร์โมนลอกคราบจากแคลลัสของต้นไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.)
โดย	นางสาวปัทมา กาวรนิธิ
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้ใช้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. กาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรดี สหวัชรินทร์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาต สุขสำราญ)

พระจอมเกล้าธนบุรี

ปัทมา ถาวรนิธิ : การผลิตและการสกัดฮอร์โมนลอกคราบจากแคลลัสของต้นไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.) (PRODUCTION AND EXTRACTION OF MOLTING HORMONE FROM CALLUS OF Vitex glabrata R.Br.) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ หนิชยกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร.อรดี สหวัชรินทร์, 147 หน้า, ISBN 974-577-788-9

การนำชิ้นของใบชั้นอีพิเดอร์มิสและส่วนของต้นมาชักนำและเพาะเลี้ยงในอาหาร Murashige และ Skoog (MS) ในสภาวะของการเจริญของกลุ่มเซลล์แคลลัสจำเป็นต้องมีสารควบคุมการเจริญทั้งออกซิน (2,4-D) และไซโตคินิน (BA) อยู่รวมกัน สภาวะที่เหมาะสมของการเจริญคือการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ซึ่งมีแสง 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 ^{o}C การศึกษาคัดเลือกวิธีวิเคราะห์ฮอร์โมนจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของแคลลัสพบว่าวิธีวิเคราะห์ด้วยโครมาโตการฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นวิธีที่ง่ายและมีประสิทธิภาพสูง ระบบตัวชะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารจากชั้นอีพิเดอร์มิสและส่วนของต้นคือ เมธานอล-น้ำ (45:55) ส่วนใบคือ อะซิโตรไนไตรน้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (18.5:81.5) ในขณะที่ระบบซึ่งเหมาะในการวิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนจากแคลลัสคือ อะซิโตรไนไตร –น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (14.5:85.5) ระดับของฮอร์โมนเบตา-เอคไดโซน เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ในแคลลัสส่วนต่าง ๆ จะแปรผันไปบ้าง แต่พบว่าแคลลัสส่วนต้นจะให้สารปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแคลลัสจากใบและชั้นอีพิเดอร์มิส การศึกษาผลกระทบของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญและผลิตเบตา-เอคไดโซน เช่น แหล่งต้นตอคาร์บอน, ไนโตรเจน, ฮอร์โมนและสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ เบตา-เอคไดโซน ทำให้ได้แคลลัสที่สามารถผลิต เบตา-เอคไดโซนได้สูงถึง 0.023 กรัมเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ระบบเอกสารและวิทยานิพนธ์อิเล็กทรอนิกส์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHAMA THAVORNNITHI : PRODUCTION AND EXTRACTION OF MOLTING HORMONE FROM CALLUS OF Vitex glabrata R.Br. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D. AND ASSO. PROF. ORADEE SAHAVACHARIN, Ph.D. 147 PP. ISBN 974-577-788-9.

The callus culture from three parts of Vitex glabrata R.Br. namely leaf, epidermal layer and stem section was induced and propagated in Murashige and Skoog (MS) medium. The presence of growth regulators both auxin (2,4-D) and cytokinin (BA) were found to be essential for the cultivation. The proper condition in growth supporting was established at $\frac{1}{2}$ MS, 16 hours light exposure and 25 $\pm$ 2 ^{o}C temperature. Various methods were tested for the analysis of the hormones. It was found that high performance liquid chromatography (HPLC) was the most suitable for beta-ecdysone assay both qualitatively and quantitatively. Eluting system for analysis of beta-ecdysone extracting from epidermal layer and stem was methanol-water (45:55). Acetonitrile-water with 2% acetic acid (18.5:81.5) was suitable for natural leaf extract while the ratio of acetonitrile-water (14.5:85.5) was appropiated for analysis of the hormone from callus. Beta-ecdysone content in each part of callus cultures. Stem callus, yield the highest level of beta-ecdysone. Optimisation of the callus culture by various kinds of factors such as carbon-, nitrogen-, hormones and precursors given the beta-ecdysone as high as 0.023 gram percent dry weight.

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล และรองศาสตราจารย์ ดร.อรดี สหวัชรินทร์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาต สุขสำราญ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจแก่ผู้เขียนในระหว่างการทำวิจัย และกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ที่กรุณารับเป็นประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความเมตตาแก่ผู้เขียนมาโดยตลอด

กราบขอบพระคุณ หลวงลุงเลียบ วัดเกาะสุวรรณาราม ที่เอื้อเฟื้อต้นไข่เน่าในการทำวิจัย และให้ความเมตตาแก่ผู้เขียนมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมีที่ให้การสนับสนุนด้านสารเคมี เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีและที่ศูนย์เครื่องมือฯ ในความช่วยเหลือทุกๆอย่าง ระหว่างทำวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยและ STDB ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ขอขอบคุณคุณมนต์ชัย ภักดีเจริญ ที่ให้แนวทางและกำลังใจแก่ผู้เขียน

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนใคร่ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ-คุณแม่ เพื่อน พี่และน้องในภาควิชาชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพทุกๆคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ความอบอุ่นและกำลังใจอันมีค่าตลอดระยะเวลาในการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

คำย่อ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วิธีการทดลอง..... 9

2.1 ครุภัณฑ์..... 9

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์..... 10

2.2.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง..... 10

2.2.2 โครมาโตกราฟีเพื่อการวิเคราะห์..... 10

2.2.3 สารเคมี..... 12

2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 13

2.4 สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 13

2.5 การเตรียมอาหารแข็ง 1/2 MS 14

2.6 การเตรียมและฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืช..... 14

2.7 วิธีและอาหารมาตรฐานในการชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส..... 14

2.8 การติดตามการเจริญของแคลลัส..... 16

2.9 การศึกษาเซลล์..... 16

2.9.1 รูปร่างของเซลล์..... 16

2.9.2 ขนาดของเซลล์..... 16

2.9.3 โครโมโซมภายในเซลล์..... 16

2.10 การเก็บตัวอย่าง..... 17

หน้า

2.11 การเตรียมสารละลาย anisaldehyde..... 17

2.12 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน..... 17

2.12.1 สารสกัดจากองค์ประกอบส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า..... 17

2.12.2 สารสกัดจากแคลลัสไข่เน่า..... 18

2.13 การวิเคราะห์ชนิดสารเบตา-เอคไดโซนด้วย TLC..... 18

2.14 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ด้วยเทคนิค HPLC..... 18

2.15 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเบตา-เอคไดโซนในองค์ประกอบของต้นไข่เน่าและแคลลัสด้วยเทคนิค HPLC..... 19

2.16 การแยกเบตา-เอคไดโซนจากเปลือกต้นไข่เน่าบริสุทธิ์บางส่วน..... 20

3 ผลการทดลอง..... 21

3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส..... 21

3.1.1 ปริมาณความเข้มข้นของสารอาหาร..... 21

3.1.2 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต..... 21

3.1.3 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญของต้นไข่เน่า..... 28

3.1.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารอาหารต่อการชักนำการสร้างและการเจริญเติบโตของแคลลัส..... 32

3.1.5 อิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส..... 32

3.1.6 ผลกระทบของแสงต่อการเจริญของแคลลัส..... 35

3.2 การศึกษาของแคลลัส..... 35

3.2.1 ลักษณะภายนอก..... 35

3.2.2 ลักษณะภายในเซลล์..... 38

3.2.3 ปริมาณน้ำ(water content) ในแคลลัส..... 38

3.3 การพัฒนาวิธีสกัดแยกเบา-เอคไดโซน..... 38

3.4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตัวอย่างกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์..... 41

3.4.1 วิธีการวิเคราะห์ชนิดของเอคไดโซนโดยใช้โครมาโตกราฟีแผ่นบาง..... 41

หน้า

3.4.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดของสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ในเนื้อเยื่อพืชโดยวิธี HPLC..... 49

3.5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า..... 62

3.6 การทำให้สารเบตา-เอคไดโซนจากเปลือกต้นไข่เน่าบริสุทธิ์..... 62

3.7 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเบตา-เอคไดโซนในแคลลัสต้นไข่เน่า. 62

3.8 การศึกษาความเสถียรของแคลลัสในการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซน... 69

3.9 การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อการเจริญและการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนของแคลลัสของต้นไข่เน่า..... 69

3.9.1 แหล่งต้นตอคาร์บอน..... 71

3.9.2 แหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 72

3.9.3 กรดอะมิโนไธโรซีน..... 72

3.9.4 โคเลสเตอรอล..... 73

3.9.5 กรดเมวาโลนิค..... 73

3.9.6 สติกมาสเตอรอลและเบตา-ซิโตสเตอรอล..... 73

3.9.7 จิบเบอเรริค แอซิด..... 74

3.9.8 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid..... 74

3.9.9 Benzyladenine..... 75

4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 91

บรรณานุกรม..... 114

ภาคผนวก..... 125

1. ต้นไข่เน่า..... 125

2. ส่วนประกอบของต้นไข่เน่า..... 127

3. พืชในสกุล Vitex..... 128

4. สูตรอาหาร Murashige and Skoog..... 130

5. การเตรียม Stock MS..... 131

6. HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเอคไดสเตอรอยด์ในระบบตัวชะ

ต่างกัน..... 133
7. HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเอคไดสเตอรอยด์ ในสภาวะดังนี้ คอลัมน์ Zorbax C_{18} (4.6 มม.x 25 ซม.) ระบบตัวชะ:เมธานอล-น้ำ (45:55)..... 134
8. HPLC โครมาโตแกรมของส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า ในสภาวะดังนี้ คอลัมน์ Zorbax C_{18} (4.6 มม.x 25 ซม.) ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ(45:55). 135
9. HPLC โครมาโตแกรมของส่วนใบของต้นไข่เน่า ในสภาวะดังนี้ คอลัมน์: Zorbax C_{18} (4.6 มม.x 25 ซม.) ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์ -น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (18.5:81.5)..... 136
10. HPLC โครมาโตแกรมส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า ในสภาวะดังนี้ คอลัมน์: Zorbax C_{18} (4.6 มม.x 25 ซม.) ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์ -น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (18.5:81.5)..... 137
11. HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสของต้นไข่เน่า ในสภาวะดังนี้ คอลัมน์: Zorbax C_{18} (4.6 มม.x 25 ซม.) ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ (45:55)..... 138
12. HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสของต้นไข่เน่า ในสภาวะดังนี้ คอลัมน์: Zorbax C_{18} (4.6 มม.x 25 ซม.) ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ with กรดอะซิติค 2% (45:55)..... 139
13. HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสของต้นไข่เน่า ในสภาวะดังนี้ คอลัมน์: Zorbax C_{18} (4.6 มม.x 25 ซม.) ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์ -น้ำ(14.5:85.5)..... 140
14. HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสของต้นไข่เน่า ในสภาวะดังนี้ คอลัมน์: Zorbax C_{18} (4.6 มม.x 25 ซม.) ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์ -น้ำ(14.5:85.5)..... 141
15. ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสชิ้นส่วนของใบที่ ระยะต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล..... 142

หน้า

16. ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสส่วนของต้นที่ระยะต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล..... 143

17. ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสชั้นอีพิเดอร์มิสที่ระยะต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล..... 144

18. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วย HPLC สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ตัวชะ : อะซิโตรไนไตรล์-น้ำ ที่มีกรดอะซิติค 2% (18.5:81.5) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 156

19. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วย HPLC สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ตัวชะ : เมธานอล-น้ำ (45:55) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 157

ประวัติผู้เขียน..... 158

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของความเข้มข้นของสารอาหาร MS ต่อเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าส่วนต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	22
2	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการเกิดแคลลัส.....	25
3	ผลของความเข้มข้นของสารอาหารต่อการชักนำการสร้างแคลลัส เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS และ 1/2 MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ระยะเวลาทดลองนาน 4 สัปดาห์.....	33
4	แสดงผลของแสงต่อการชักนำการสร้างแคลลัส เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ในที่มีแสง 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืดตลอดเวลา ระยะเวลาทดลองนาน 4 สัปดาห์.....	34
5	ปริมาณน้ำในแคลลัสส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า.....	40
6	ปริมาณเบตา-เอคไดโซนในส่วนเปลือก เมื่อทดลองสกัดแยกด้วยวิธีการและสภาวะต่างๆกัน แล้วนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC.....	42
7	แสดงปริมาณเบตา-เอคไดโซนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ในส่วนเปลือกเมื่อสกัดด้วย เอธานอล 95% โดยใช้ Soxhlet apparatus ที่ระยะเวลาต่างๆกัน.....	43
8	แสดงชนิดของตัวทำละลาย ซึ่งใช้ในการแยกสารประกอบเอคไดโซนด้วยเทคนิค TLC บนแผ่นแก้วฉาบด้วยสารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม.....	45
9	แสดง Sensitivity ของวิธีการที่ใช้ทดสอบสารประกอบในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์เมื่อแยกด้วยเทคนิค TLC บนแผ่นอลูมิเนียมฉาบด้วยซิลิกาเจล 60 เอฟ$_{254}$ ตัวชะคือ คลอโรฟอร์ม-เมธานอล (4:1).....	51

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขบวนการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนจากโคเลสเตอรอลในพืชที่น่าเป็นไปได้.....	2
2	แสดงสูตรโครงสร้างของฮอร์โมนลอกคราบบางชนิด.....	3
3	ต้นไข่เน่าที่ใช้เป็นพืชทดลอง.....	11
4	การตัดแยกชิ้นเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์.....	15
5	ภาพแสดงมาตรฐานของลักษณะและขนาดแคลลัสที่ใช้เป็นเกณฑ์กำหนดคะแนนการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อต้นไข่เน่า.....	24
6	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต(2,4-D และ BA) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ต่อการชักนำการเกิดแคลลัสจากใบของต้นไข่เน่า อายุ 4 สัปดาห์.....	26
7	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต(2,4-D และ BA) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันต่อการชักนำการเกิดแคลลัสจากต้นไข่เน่า อายุ 4 สัปดาห์.....	27
8	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เกิดจากใบบนอาหาร 1/2 MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1,2,3,4 มก./ล. และ BA 2 มก./ล	29
9	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เกิดจากต้นต้น บนอาหาร 1/2 MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1,2,3,4 มก./ล.และ BA 3 มก./ล. เทียบกับสูตรที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.....	30
10	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เกิดจากใบ เปลือก และส่วนของต้นบนอาหาร 1/2 MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.....	31
11	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เกิดจากต้น บนอาหาร 1/2 MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล ในที่ได้รับแสง 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวันและในที่มืดตลอดเวลา.....	36
12	แสดงลักษณะของเซลล์ของแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า.....	37
13	แสดงระยะการแบ่งตัวของเซลล์แคลลัสที่เกิดจากต้นไข่เน่า A:early prophase B:middle prophase C:metaphase D,E:anaphase	

หน้า

F,G:telophase..... 39

14 กราฟแท่งแสดงปริมาณเบตา-เอคไดโซนในส่วนเปลือกของต้นไข่เน่า เมื่อสกัดแยกด้วยเอธานอล 95%ใน Soxhlet apparatus และวิเคราะห์สารด้วย HPLC 44

15.1 TLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากส่วนเปลือกของต้นไข่เน่าเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์บนแผ่นแก้วฉาบด้วยสารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม. ระบบตัวชะ: คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(3:1)..... 46

15.2 TLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากส่วนเปลือกของต้นไข่เน่าเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์บนแผ่นแก้วฉาบด้วยสารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม. ระบบตัวชะ: คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(4:1)..... 47

15.3 TLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากส่วนเปลือกของต้นไข่เน่าเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์บนแผ่นแก้วฉาบด้วยสารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ หนา 0.25 มม. ระบบตัวชะ: คลอโรฟอร์ม-เอธานอล(65:35)..... 48

16 TLC โครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นไข่เน่าเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซนบนแผ่นอลูมิเนียมฉาบด้วย ซิลิกาเจล 60 เอฟ$_{254}$ ตัวชะคือ คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(3:1)..... 50

17 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเอคไดสเตอรอยด์ในระบบตัวชะต่างกันคือ
A: เมธานอล-น้ำ (38:62) B: เมธานอล-น้ำ (40-60)
C: เมธานอล-น้ำ (45-55) D: เมธานอล-น้ำ (50-50)..... 53

18 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเอคไดสเตอรอยด์ในสภาวะดังนี้
คอลัมน์:Zorbax C$_{18}$ (4.6 มม.x25 ซม.)ระบบตัวชะ:เมธานอล-น้ำ (45:55) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 54

19 HPLC โครมาโตแกรมส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า สภาวะที่ใช้คือ
คอลัมน์:Zorbax C$_{18}$ (4.6 มม.x25 ซม.)ระบบตัวชะ:เมธานอล-น้ำ (45:55) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 55

20 HPLC โครมาโตแกรมส่วนใบของต้นไข่เน่า สภาวะที่ใช้คือ คอลัมน์: Zorbax C$_{18}$ ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (18.5:81.5) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 56

หน้า

21 HPLC โครมาโตแกรมส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า สภาวะที่ใช้คือ คอลัมน์:Zorbax C_{18} ระบบตัวชะ:อะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (18.5:81.5) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 57

22 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสของต้นไข่เน่า สภาวะที่ใช้คือ คอลัมน์: Zorbax C_{18} (4.6 มม.x25 ซม.) ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำ (45:55) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 58

23.1 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสส่วนของต้นของต้นไข่เน่าที่อายุ 4 สัปดาห์ สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ระบบตัวชะ: เมธานอล-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (45:55) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 59

23.2 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสส่วนของต้นของต้นไข่เน่าที่อายุ 4 สัปดาห์ สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์-น้ำ (14.5:85.5) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 60

23.3 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสส่วนของต้นของต้นไข่เน่าที่อายุ 4 สัปดาห์ สภาวะที่ใช้คือคอลัมน์: Zorbax C_{18}, ระบบตัวชะ: อะซิโตรไนไตรล์-น้ำที่มีกรดอะซิติค 2% (14.5:85.5) อัตราการไหล: 1 มล./นาที..... 61

24 กราฟแท่งแสดงปริมาณเบตา-เอคไดโซนในส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า..... 63

25 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสชั้นส่วนของใบ ที่ระยะต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.ที่อุณหภูมิ 25±2° ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน..... 65

26 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสชั้นอีพิเดอร์มิส ที่ระยะต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.ที่อุณหภูมิ 25±2° ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน..... 66

27 ลักษณะ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสส่วนของต้น ที่ระยะต่างๆกันเพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ 2 มก./ล. BA ที่อุณหภูมิ 25±2° ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ต่อวัน..... 67

28 แสดงปริมาณเบตา-เอคไดโซนของแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า ที่เจริญในช่วงระยะต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2°ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน..... 68

29 กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณสารเบตา-เอคไดโซนของแคลลัสที่เกิดจากส่วนของต้น อายุ 4 สัปดาห์เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS ที่มี 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2° ซ ในที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานานต่างกัน..... 70

30 รูปถ่ายเปรียบเทียบลักษณะแคลลัสส่วนของต้นของต้นไข่เน่า ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. 76

31 กราฟแสดงการเจริญเติบโตและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล..... 81

คำย่อ

°ซ	องศาเซลเซียส(degree celcius)
ซม.	เซนติเมตร
มก./ล.	มิลลิกรัม/ลิตร
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
BA	benzyladenine
b.p.	boiling point
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
g.	gram.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
min.	minute
N	normal
nm.	nanometer
Rt.	retention time
TLC	Thin Layer Chromatography
wt.	Weight