บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสจากส่วนต้น ใบ และเปลือกของพืชไข่เน่า

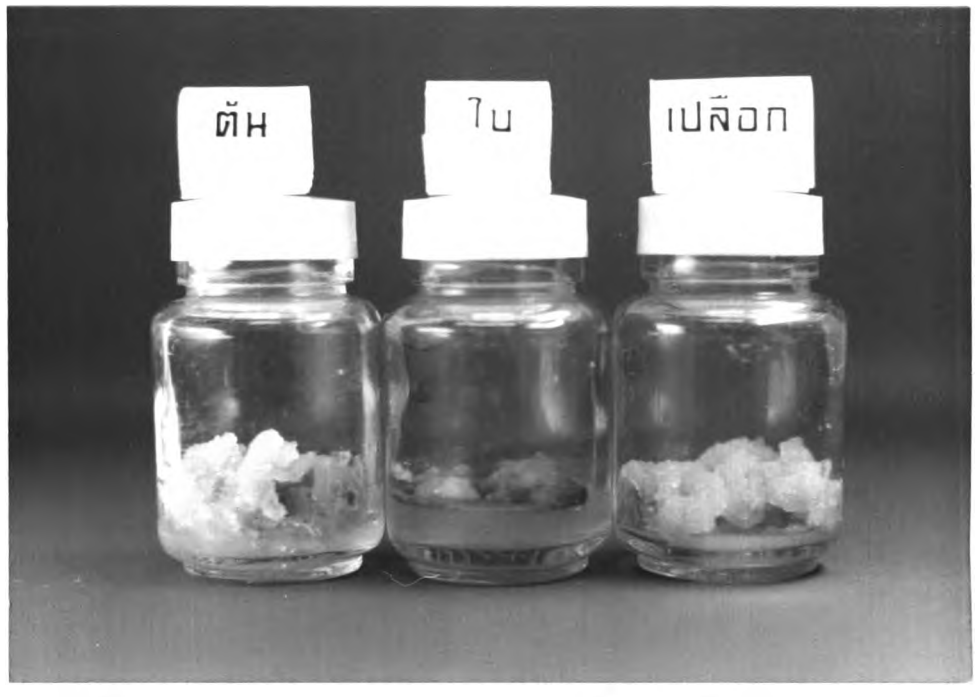
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัส จากส่วนต้น ใบ และเปลือก (วิธี 2.8. และ 2.9) แล้วทำการเปลี่ยนอาหารแข็งสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm อย่างต่อเนื่องทุกๆ 4 สัปดาห์ เป็นเวลาประมาณ 2 เดือน ก้อนแคลลัสมีลักษณะเกาะกันแบบหลวมๆ (friable callus) (รูปที่ 8) แคลลัสจากส่วนใบมีลักษณะนิ่ม เทียบกับแคลลัสจากส่วนต้นและเปลือกซึ่งเซลล์เกาะกลุ่มกันแบบหลวมๆ และมีลักษณะฟูมากกว่า

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า จากส่วนต้น ใบ และเปลือกในอาหารเหลว

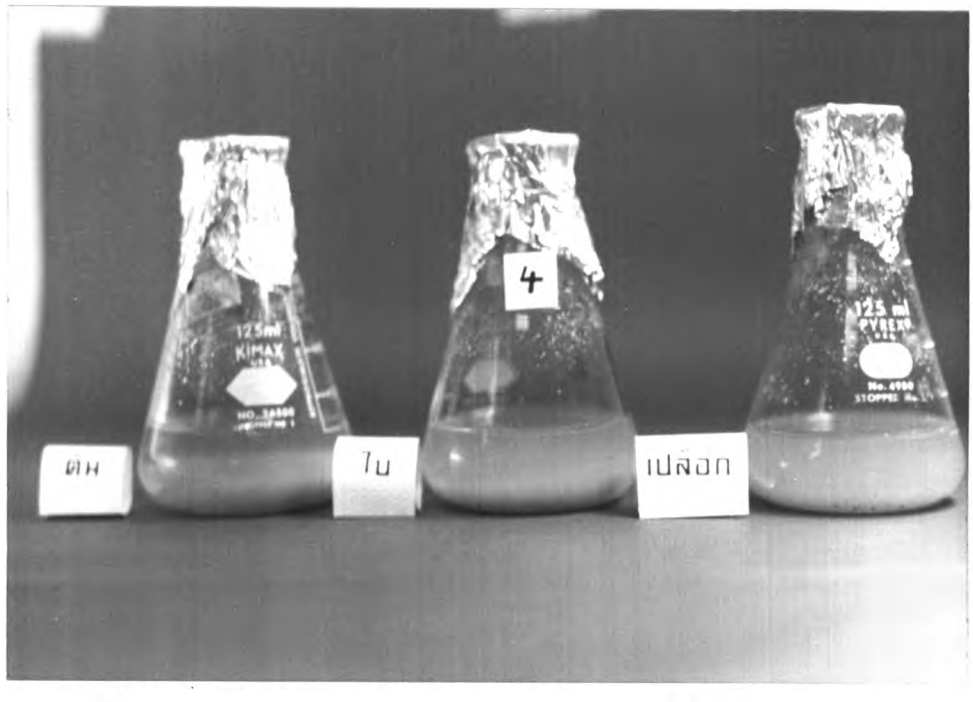
เมื่อนำกลุ่มเซลล์แคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (วิธีข้อ 2.10) พบว่าในระยะเริ่มต้นเซลล์ต้นและเปลือก ส่วนใหญ่มีสีเหลืองสด ในขณะที่เซลล์ใบมีสีเหลืองเข้มกว่าและจะสังเกตพบว่าเซลล์เริ่มเจริญมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นเห็นชัดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนมีความหนาแน่นสูงสุดที่ 5-6 สัปดาห์จากนั้นความหนาแน่นลดลง เซลล์มีสีคล้ำขึ้นและออกสีน้ำตาลในช่วงอายุ 8 สัปดาห์ โดยที่ความหนาแน่นของเซลล์ใบลดลงมากกว่าเซลล์ต้นและเซลล์เปลือก นอกจากนี้สีของเซลล์ใบออกไปทางสีน้ำตาลในขณะที่เซลล์ต้นและเซลล์เปลือกมีสีเหลืองคล้ำ (รูปที่ 9, 10 และ 11)

3.3 วิธีวัดการเจริญของเซลล์พืชแขวนลอย

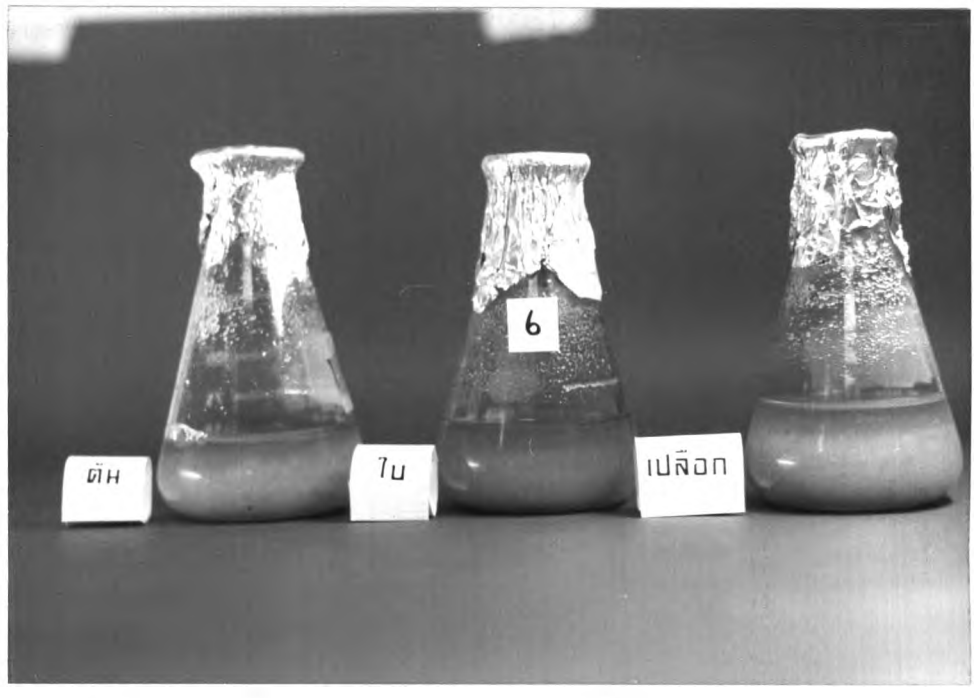
ในการวิจัยนี้ได้ทดลองเปรียบเทียบสหสัมพันธ์ของการเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าซึ่งวัดค่าด้วยค่า PCV น้ำหนักแห้ง และปริมาณโปรตีน ในระหว่างการเจริญเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ในสภาวะมาตรฐาน คือ เขย่าที่ 80-100 รอบต่อ



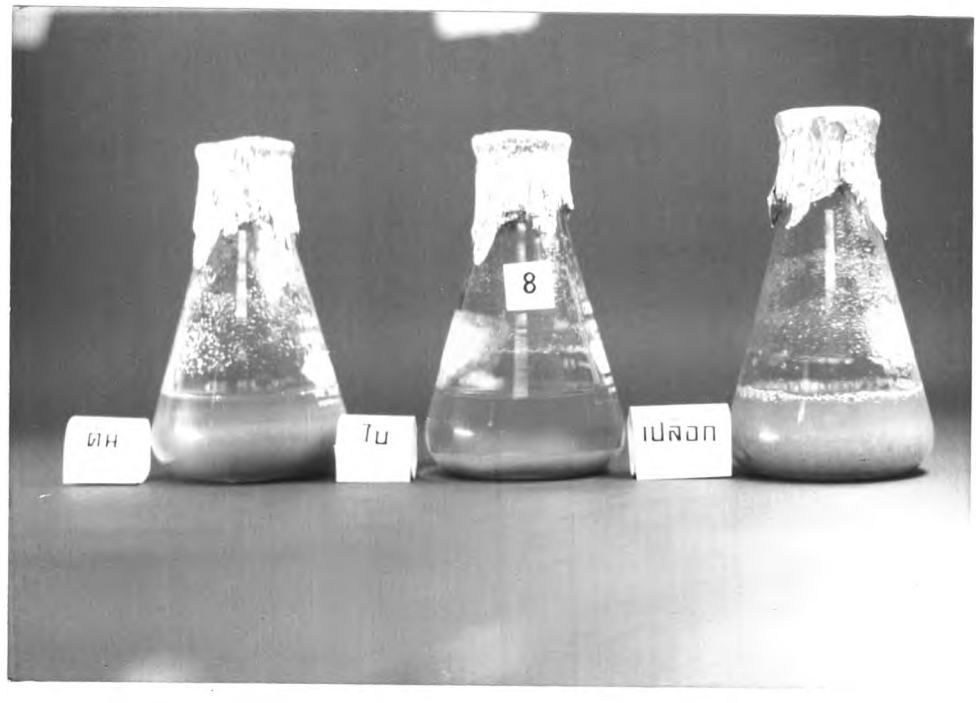
รูปที่ 8 ลักษณะแคลลัสจากส่วนต้น ใบ และเปลือกของพืชไข่เน่า



รูปที่ 9 เซลล์แขวนลอยส่วนต้น ใบ และเปลือกของพืชไข่เน่า ในอาหารเหลวเมื่ออายุ 4 สัปดาห์



รูปที่ 10 เซลล์แขวนลอยส่วนต้น ใบ และเปลือกของพืชไข่เน่า ในอาหารเหลวเมื่ออายุ 6 สัปดาห์



รูปที่ 11 เซลล์แขวนลอยส่วนต้น ใบ และเปลือกของพืชไข่เน่า ในอาหารเหลวเมื่ออายุ 8 สัปดาห์

นาที โดยได้รับแสงที่ 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ ซ ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 125 มล.ใช้ปริมาตรเพาะเลี้ยง 50 มล. เก็บตัวอย่างสัปดาห์ละครั้ง เพื่อศึกษาการเจริญเป็นค่า PCV น้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีน (วิธีข้อ 2.11)

ผลการทดลอง (ตารางที่ 2 และรูปที่ 12) พบว่าการวิเคราะห์ค่าน้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีน โดยใช้ปริมาตรของเซลล์เพาะเลี้ยง 1 มล. หรือมากกว่านี้ 10 เท่า เทียบกับค่า PCV เมื่อใช้ปริมาตร 10 มล. จะให้รูปแบบของการเจริญคล้ายคลึงกันคือเซลล์แขวนลอยที่เริ่มต้นจากค่า PCV 3 % จะมีการเจริญในแบบพหุคูณ (Logarithmic Growth) โดยเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดในเวลาใกล้เคียงกัน ประมาณสัปดาห์ที่ 9 หลังจากนั้นค่าน้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีนจะลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ค่าเปอร์เซนต์ของ PCV ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก เมื่อวิเคราะห์ผลของการติดตามการเจริญโดยใช้ค่าน้ำหนักแห้งจากเซลล์แขวนลอย 1 และ 10 มล. จะให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (วิเคราะห์โดยวิธี Analysis of Variance, ภาคผนวกที่ 5) โดยมีค่า degree of freedom 0.03 ที่ความเชื่อมั่น 99 % ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์แขวนลอย 1 และ 10 มล. พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า degree of freedom 11.24 ที่ความเชื่อมั่น 99 %

3.4 <u>การศึกษาผลกระทบของความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากส่วนต้นของพืชไข่เน่า โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ค่าน้ำหนักแห้งเริ่มต้นในช่วงตั้งแต่ 0.002 กรัม ถึง 0.005 กรัม ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐาน(วิธีข้อ 2.10)

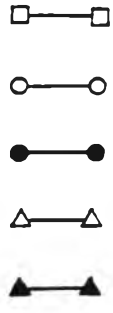
ผลการทดลอง(รูปที่ 13) พบว่าระยะเวลาของช่วง lag phase ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น จะเห็นได้ว่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นระดับต่ำทำให้ระยะ lag phase เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้การเจริญเข้าสู่ระยะ log phase จนถึงการเจริญสูงสุดเป็นเวลาเพิ่มขึ้นเช่นกัน เมื่อค่าน้ำหนักเริ่มต้นอยู่ในช่วง 0.002 - 0.003 กรัม ระยะ lag phase

ตารางที่ 2 การเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไร่เน่าโดยการวัด Packed Cell Volume (PCV) โดยสุ่มตัวอย่างจากเซลล์แขวนลอย 10 มล. ค่าน้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีน โดยสุ่มตัวอย่างจากเซลล์แขวนลอย 1 และ 10 มล.

Week	PCV (%)	Dry Weight (g)/ 1 ml culture	Dry Weight (g)/10 ml culture	Protein (mg)/1 ml culture	Protein mg/10 ml culture
0	3	0.0011*	0.0117*	0.182**	0.960**
1	5	0.0018	0.0145	0.268	1.360
2	6	0.0024	0.0154	0.431	2.234
3	7	0.0029	0.0247	0.529	2.910
4	9	0.0034	0.0319	0.837	7.360
5	15	0.0045	0.0483	1.187	10.800
6	23	0.0069	0.0653	1.922	15.500
7	31	0.0081	0.0927	2.346	17.200
8	35	0.0107	0.1156	2.524	19.140
9	42	0.0129	0.1261	2.808	24.000
10	41	0.0115	0.1120	2.650	21.178
11	37	0.0102	0.0935	2.437	18.216
12	35	0.0086	0.0818	2.177	16.171

* วิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีแวเรียนซ์ ค่า F = 0.03 ที่ความเชื่อมั่น 99%

** วิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีแวเรียนซ์ ค่า F = 11.24 ที่ความเชื่อมั่น 99% (ภาคผนวกที่ 5)



รูปที่ 12 รูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไร่เน่าเมื่อวัดการเจริญในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ในสภาวะมาตรฐานของการทดลอง

□——□ Packed Cell Volume, PCV (%)

○——○ Dry Weight (g)/ 1 ml Culture

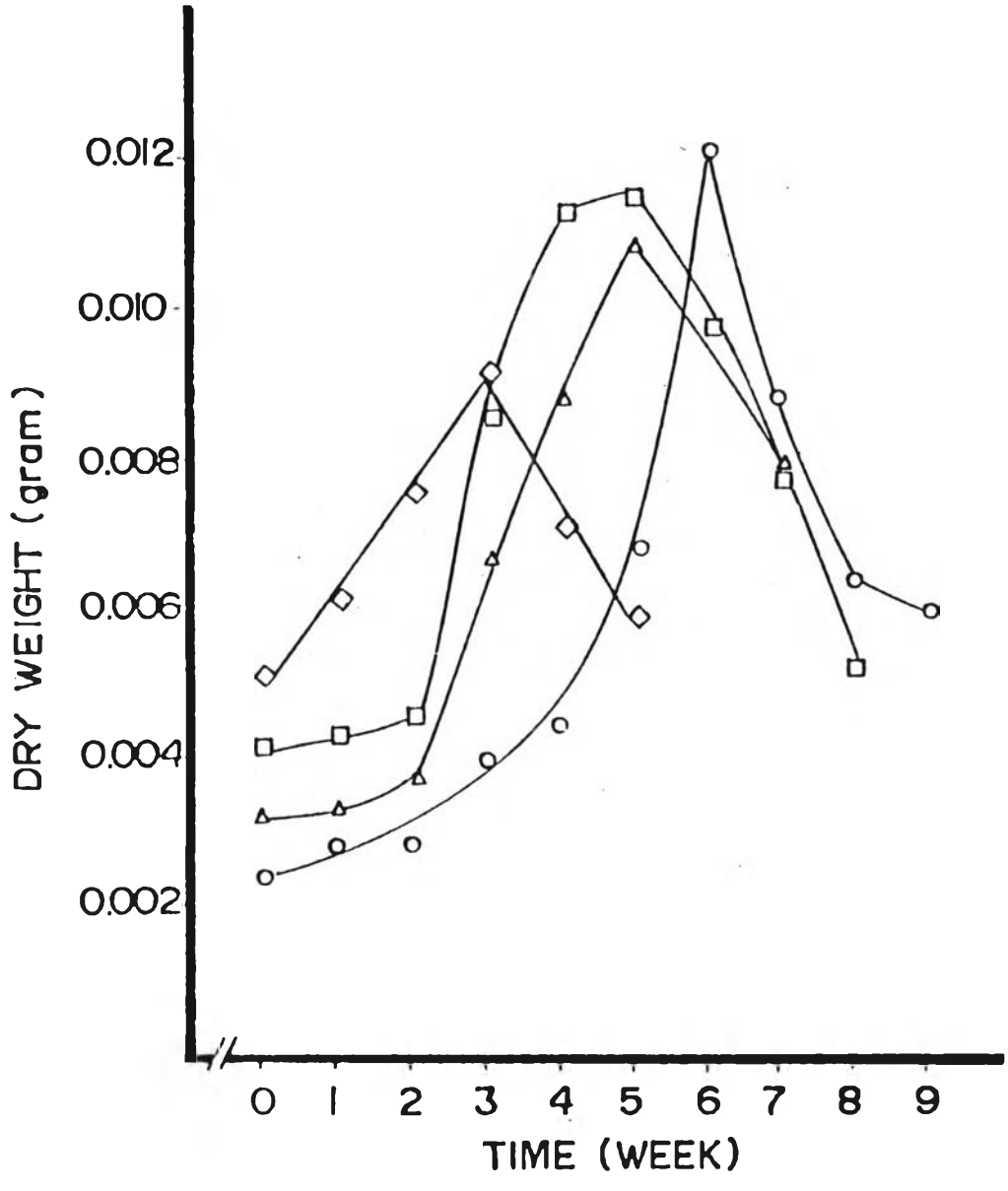
●——● Dry Weight (g)/10 ml Culture

△——△ Protein (mg)/1 ml Culture

▲——▲ Protein (mg)/1 ml Culture

รูปที่ 12

DRY WEIGHT (gram)/ 1 ml CULTURE
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
DRY WEIGHT (gram)/ 10 ml CULTURE
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
PROTEIN (milligram)/ 1 ml CULTURE
30
25
20
15
10
5
PROTEIN (milligram)/ 1 ml CULTURE
60
50
40
30
20
10
PACKED CELL VOLUME (%)
(PCV)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
TIME (WEEK)



รูปที่ 13 การเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไร่เท่าที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นต่างๆ กัน

- น้ำหนักแห้งเริ่มต้น 0.002-0.003 กรัม
- น้ำหนักแห้งเริ่มต้น 0.003-0.004 กรัม
- น้ำหนักแห้งเริ่มต้น 0.004-0.005 กรัม
- น้ำหนักแห้งเริ่มต้น 0.005 กรัมขึ้นไป

เป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ จึงเข้าสู่ระยะ log phase จนเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 ในขณะที่ค่าน้ำหนักแห้งเริ่มต้นในช่วง 0.003 - 0.005 กรัม มีระยะ lag phase ไม่เกิน 2 สัปดาห์ และเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 และเมื่อค่าน้ำหนักแห้งเริ่มต้นสูงตั้งแต่ 0.005 กรัม ขึ้นไปพบว่าไม่มีช่วง lag phase เซลล์เจริญเข้าสู่ระยะ log phase จนมีค่าการเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 การที่ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์แตกต่างกันไม่ได้มีผลกระทบต่อการเจริญในระยะ log phase โดยที่เซลล์ยังมีแบบแผนการเจริญจากระยะ log phase จนเข้าสู่ระยะ stationary phase เหมือนกัน คือ ระยะเวลาจาก log phase จนมีการเจริญสูงสุด ประมาณ 3 สัปดาห์

3.5 การเจริญ การผลิตเบตา-เอคไดโซน และลักษณะเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า

3.5.1 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (วิธีข้อ 2.10) เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่า PCV เท่ากับ 15 % มล. วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์และวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ตามช่วงการเจริญ

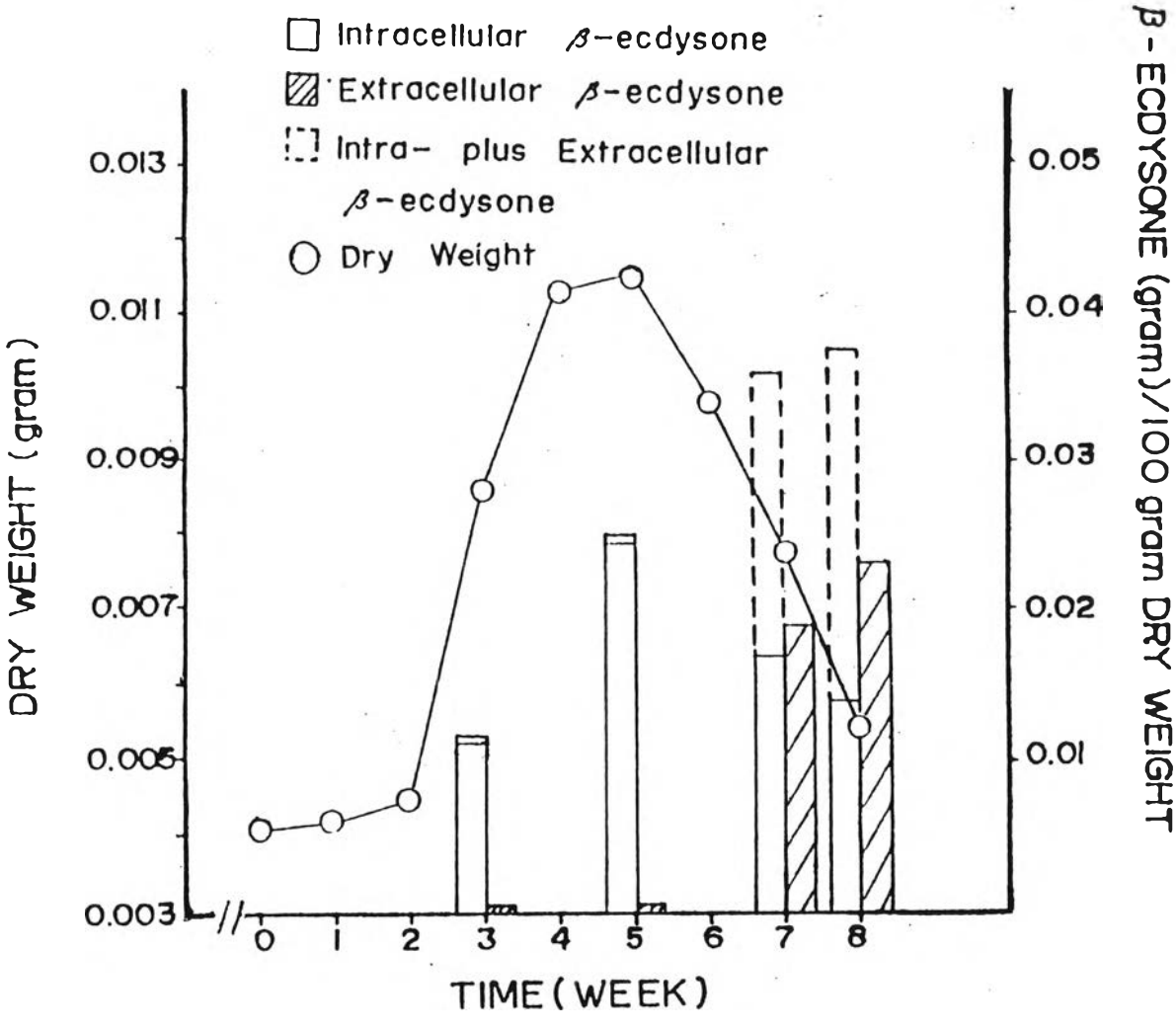
ผลการทดลอง (ตารางที่ 3 และรูปที่ 14) พบว่าเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าเริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 5 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.0117 กรัม จากนั้นลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 0.0078 กรัม ในสัปดาห์ที่ 7

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน พบว่าเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ (Intracellular β-ecdysone) เพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดในช่วงเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 5 โดยมีค่า 0.0245 กรัมเปอร์เซ็นต์ จากนั้นปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วจนเหลือเพียง 0.0171 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 7 สำหรับปริมาณ เบตา-เอคไดโซน ภายนอกเซลล์ (Extra cellular β-ecdysone) ที่การ

ตารางที่ 3 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular ß-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra Cellular ß-ecdysone (g)/ 100 g Dry weight	Total ß-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0041 ±0.0003	<---------- ND* ---------->				
1	0.0042 ±0.0005	<----------ND*---------->				
2	0.0045 ±0.0009	<----------ND*---------->				
3	0.0086 ±0.0011	3.63	130	0.0114	0.0004	0.0118
4	0.0113 ±0.0009	<----------ND*---------->				
5	0.0115 ±0.0007	1.24	45	0.0245	0.0005	0.0250
6	0.0098 ±0.0004	<----------ND*---------->				
7	0.0078 ±0.0005	1.32	72	0.0171	0.0189	0.0361
8	0.0052 ±0.0002	1.18	105	0.0142	0.0232	0.0374

* not determined value



รูปที่ 14 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm วิเคราะห์การเจริญและผลิตภัณฑ์ตามวิธีมาตรฐานของการทดลอง

เจริญระยะ log phase จนถึงระยะก่อนเข้าสู่ stationary phase ตรวจวิเคราะห์ได้ค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ ปริมาณเบตาเอค-ไดโซนภายนอกเซลล์จะเพิ่มขึ้นมากอย่างเห็นชัดในสัปดาห์ที่ 7 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณภายในเซลล์ และ ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 0.0232 กรัมเปอร์เซนต์ในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งมีค่าเป็น 1.6 เท่า ของปริมาณภายในเซลล์ ผลรวมของเบตา-เอคไดโซน ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ประมาณ 0.0374 กรัมเปอร์เซนต์ในสัปดาห์ที่ 8

3.5.2 ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า

ลักษณะเซลล์ส่วนต้นในช่วง log phase ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นว่ามีเซลล์รูปร่างและขนาดต่าง ๆ กัน ทั้งรูปกลมและรูปยาว (รูปที่ 15 ก) โดยมีเซลล์รูปกลมจำนวนมากกว่ารูปยาว เซลล์รูปร่างกลมส่วนใหญ่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 100 ไมโครเมตร ภายในเซลล์เห็นบริเวณที่เป็นนิวเคลียสตรงกลางเด่นชัด ส่วนน้อยเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 100 ไมโครเมตรขึ้นไป ซึ่งภายในเซลล์มีไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และบริเวณที่เป็นนิวเคลียส (nucleus) ชัดเจน (รูปที่ 15 ข)

ลักษณะเซลล์ส่วนต้นในช่วง stationary phase มีเซลล์รูปกลม และรูปยาวเช่นเดียวกัน เซลล์รูปกลมมีทั้งขนาดใหญ่และเล็ก นอกจากนี้มีรูปร่างผิดปกติ ขอบเซลล์ไม่เป็นรูปร่างที่แน่นอน ตลอดจนเซลล์ที่แตกสลายเหลือแต่เศษเซลล์ (รูปที่ 16 ก) และนิวเคลียสในเซลล์ส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็กลงจนสังเกตไม่ค่อยชัด ไซโตพลาสซึมมีสีเข้มขึ้น สังเกตเห็นช่องว่างระหว่างขอบเซลล์กับไซโตพลาสซึมเพิ่มขึ้น (รูปที่ 16 ข)

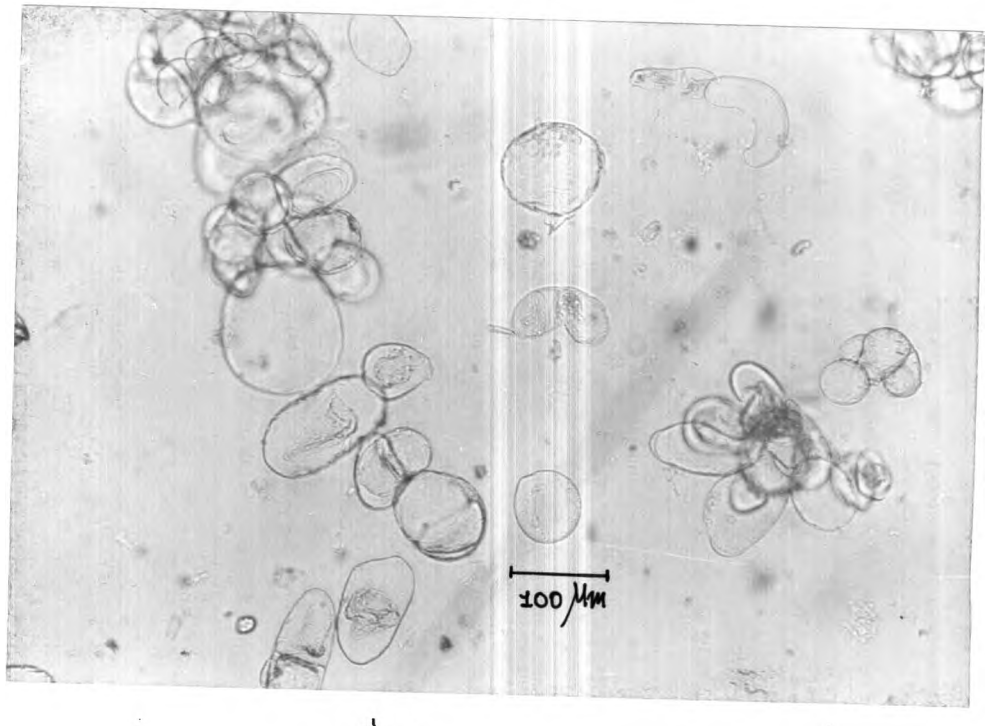
3.5.3 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนใบของพืชไข่เน่า

เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่า PCV 15 % วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์ และวิเคราะห์หาปริมาณ เบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC ตามช่วงการเจริญ ผลการทดลอง (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 17) พบว่าเซลล์เริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 5 มีค่าน้ำหนัก

รูปที่ 15 ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในระยะการเจริญช่วง log phase ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-11

ก. กำลังขยาย 2.5x10

ข. กำลังขยาย 2.5x20



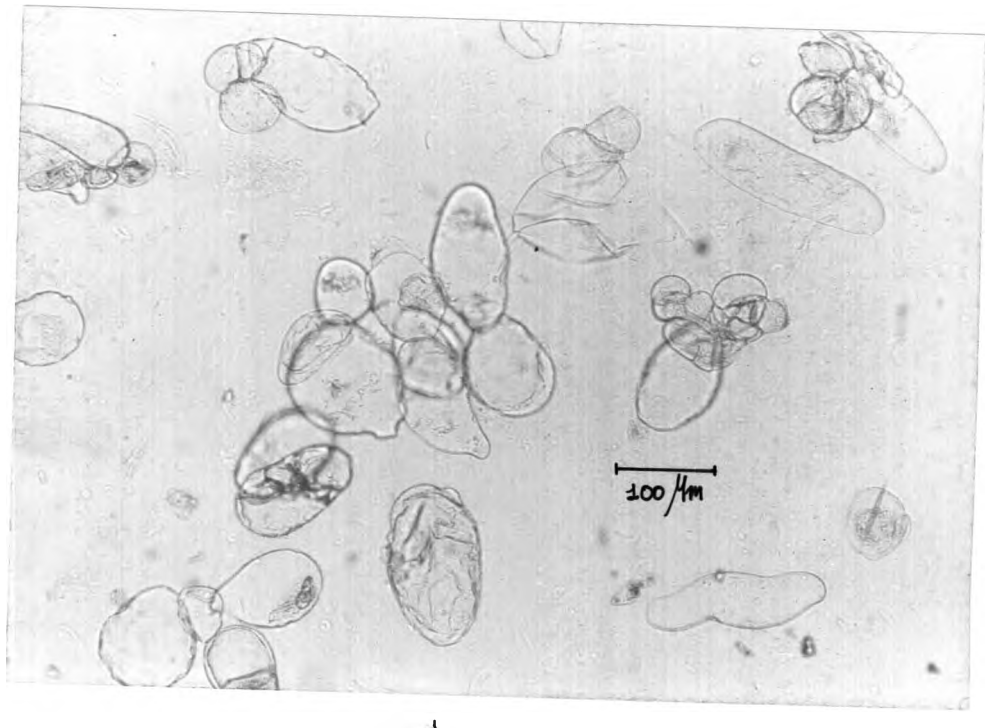
รูปที่ 15 ก

รูปที่ 15 ข

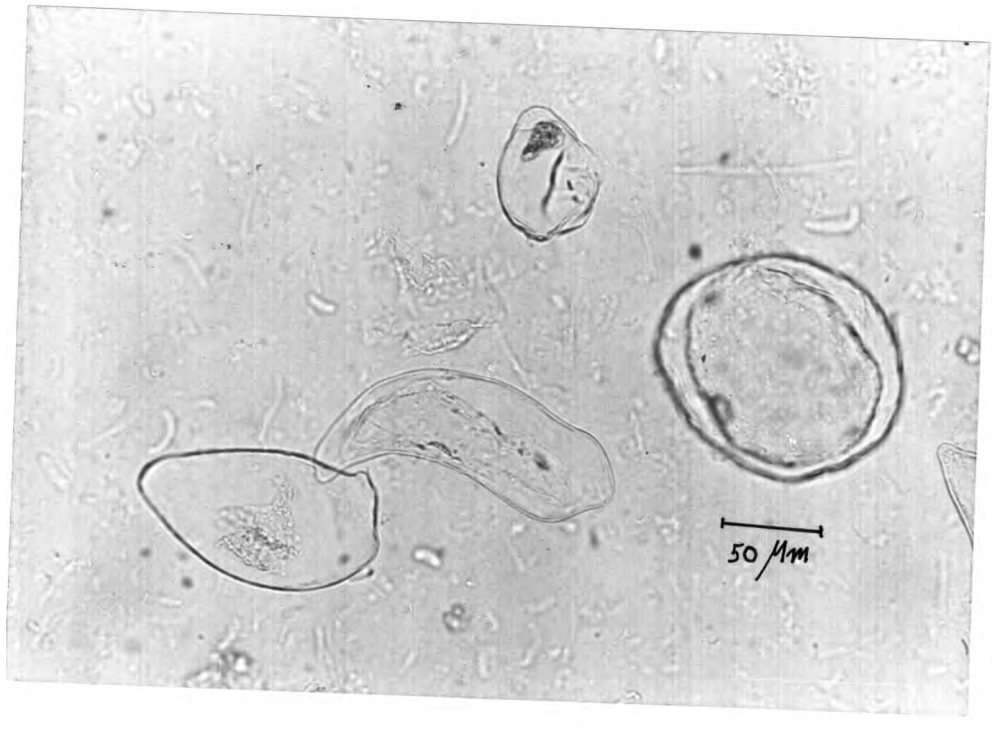
รูปที่ 16 ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในระยะการเจริญช่วง stationary phase ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-11

ก. กำลังขยาย 2.5x10

ข. กำลังขยาย 2.5x20



รูปที่ 16 ก



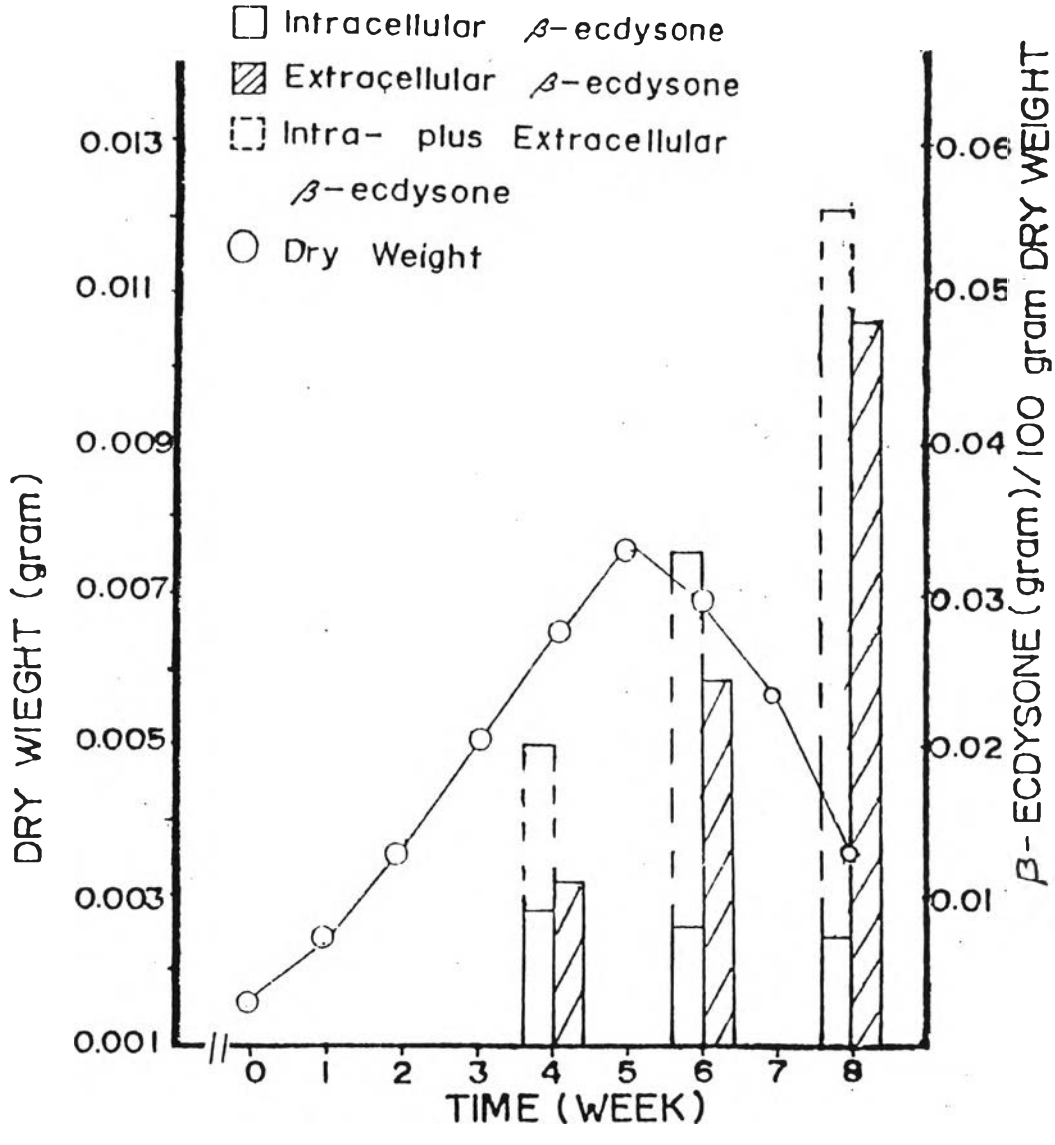
รูปที่ 16 ข

ตารางที่ 4 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนใบของพืช ไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ในสภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g) ±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0018 ±0.0003	<----------ND*---------->				
1	0.0025 ±0.0002	<----------ND*---------->				
2	0.0035 ±0.0004	<----------ND*---------->				
3	0.0051 ±0.0003	<----------ND*---------->				
4	0.0066 ±0.0003	1.93	190	0.0093	0.0110	0.0203
5	0.0077 ±0.0003	<----------ND*---------->				
6	0.0069 ±0.0007	1.65	200	0.0083	0.0246	0.0329
7	0.0057 ±0.0003	<----------ND*---------->				
8	0.0036 ±0.0003	1.57	223	0.0074	0.0483	0.0557

* not determined value

i 2305944



รูปที่ 17 การเจริญและการผลิตสารเบคา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนใบของพืชไข่เน่า ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm วิเคราะห์การเจริญและผลิตภัณฑ์ตามวิธีมาตรฐานของการทดลอง

แห้งสูงสุดของเซลล์ต่ำกว่าค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดของเซลล์ต้นประมาณ 30 เปอร์เซนต์ จากนั้นการเจริญลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกับเซลล์แขวนลอยส่วนต้น

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของ เบตา-เอคไคโซน พบว่าเบตา-เอคไคโซนภายในเซลล์ระยะ log phase ในสัปดาห์ที่ 4 มีค่าน้อยกว่าปริมาณในเซลล์ต้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ระดับเบตา-เอคไคโซนภายในเซลล์ลดลงเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase ในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 ตามลำดับ เมื่อติดตามการผลิตเบตา-เอคไคโซนภายนอกเซลล์จะเห็นได้ว่าเซลล์แขวนลอยส่วนใบจะผลิตเบตา-เอคไคโซนภายนอกเซลล์ได้สูงกว่าระดับที่วัดได้ภายในเซลล์ซึ่งเมื่อเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 6 ปริมาณเบตา-เอคไคโซนภายนอกเซลล์ซึ่งเพิ่มสูงมากกว่าภายในเซลล์ถึงเกือบ 3 เท่า การวัดระดับเบตา-เอคไคโซนในสัปดาห์ที่ 8 ให้ผลยืนยันว่าเซลล์แขวนลอยส่วนใบของพืชไข่เน่าจะปล่อยฮอร์โมนออกสู่ภายนอกเซลล์มากกว่า ที่มีภายในเซลล์ถึง 6.5 เท่า ปริมาณเบตา-เอคไคโซน ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ของเซลล์ใบรวมกันใน สัปดาห์ที่ 8 เพิ่มขึ้นสูงถึง 0.0557 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าปริมาณสูงสุดในเซลล์ต้นถึงเกือบ 50 เปอร์เซ็นต์

3.5.4. <u>ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนใบของพืชไข่เน่า</u>

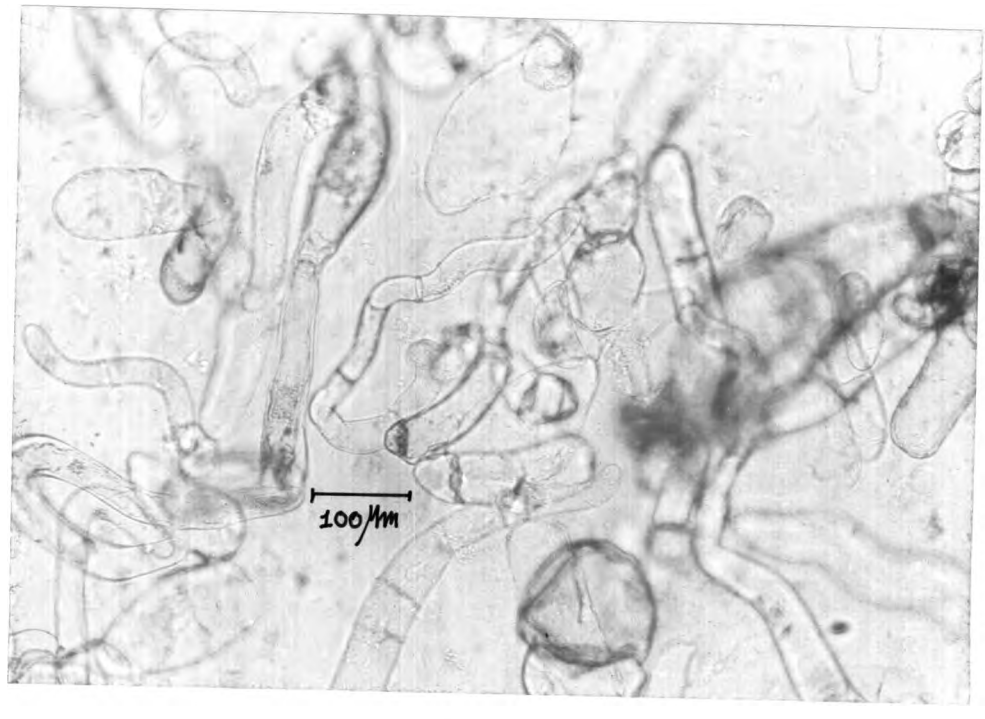
ลักษณะของเซลล์แขวนลอยส่วนใบของพืชไข่เน่าในช่วงการเจริญ log phase ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์จะเห็นว่ามีเซลล์รูปร่างและขนาดต่างๆ กัน ทั้งรูปกลมและรูปยาว โดยส่วนใหญ่เป็นเซลล์รูปยาวต่อกันเป็นสาย (รูปที่ 18 ก) ภายในเซลล์เห็นบริเวณที่เป็นนิวเคลียสอยู่บริเวณกลางเซลล์ และไซโตพลาสซึมของเต็มเซลล์ (รูปที่ 18 ข)

ลักษณะเซลล์ส่วนใหญ่ในช่วง stationary phase มีเซลล์ทั้งรูปกลมและรูปยาวโดยส่วนใหญ่เป็นเซลล์รูปยาวต่อกันเป็นสายเช่นกัน สังเกตเห็นผนังเซลล์ชัดเจนขึ้น (รูปที่ 19 ก) ภายในเซลล์ไซโตพลาสซึมมีสีเข้มขึ้น มีช่องว่างระหว่างขอบเซลล์ และไซโตพลาสซึมมากขึ้น ขอบเซลล์ธรุขระมากขึ้น และขนาดของนิวเคลียสเล็กจนเกือบมองไม่เห็น (รูปที่ 19 ข)

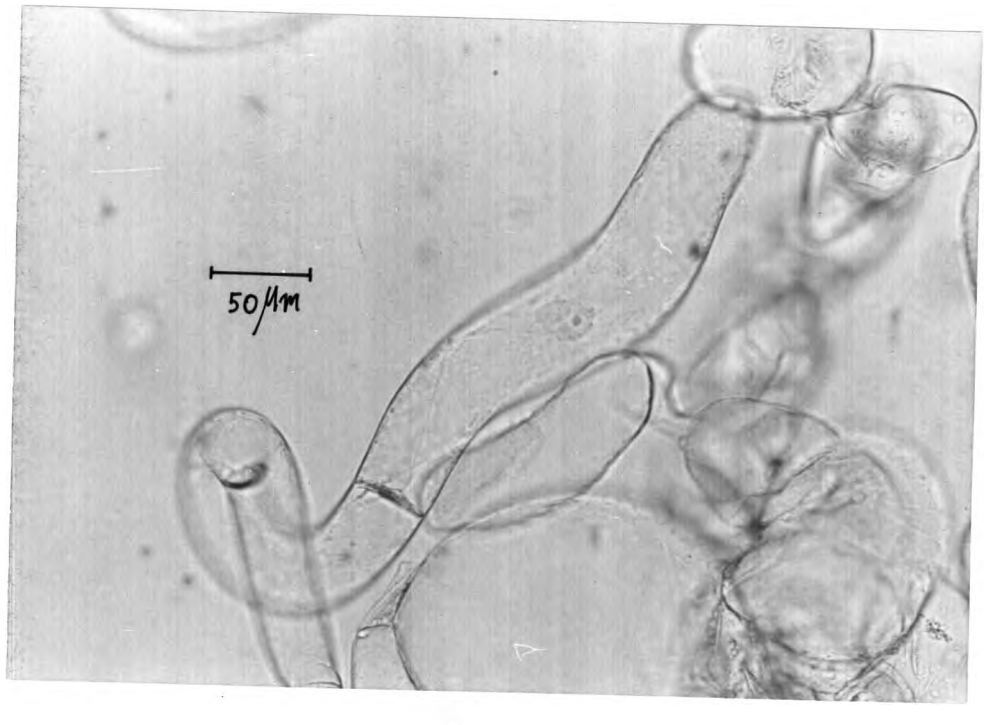
รูปที่ 18 ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนใบของพืชไข่เน่าจากส่วนในช่วง log phase ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-11

ก. กำลังขยาย 2.5 X 10

ข. กำลังขยาย 2.5 X 20



รูปที่ 18 ก

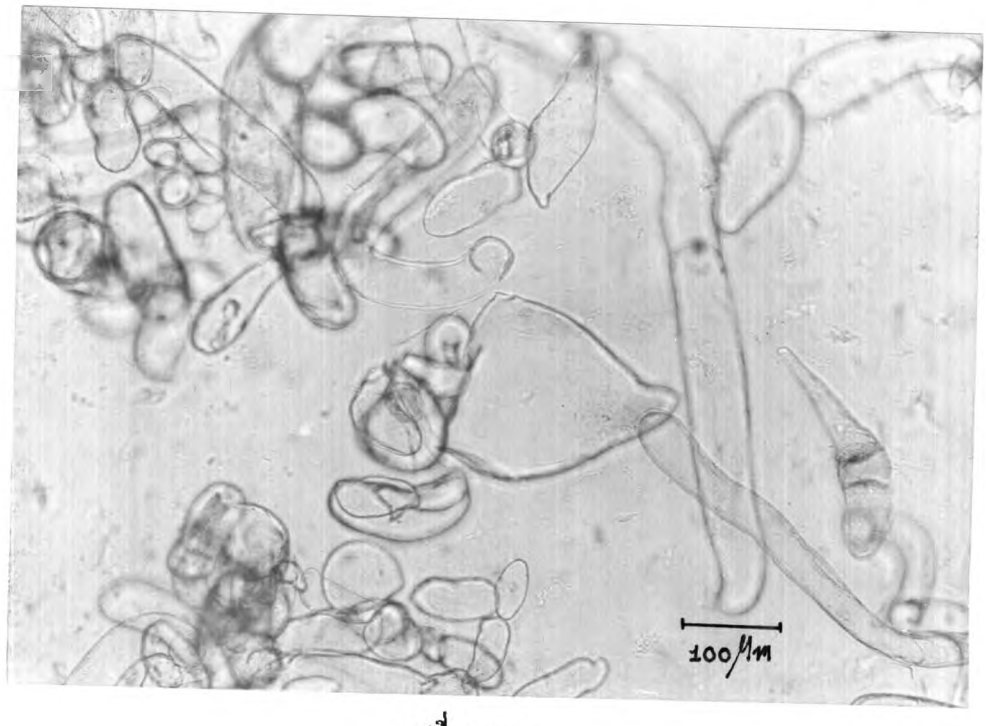


รูปที่ 18 ข

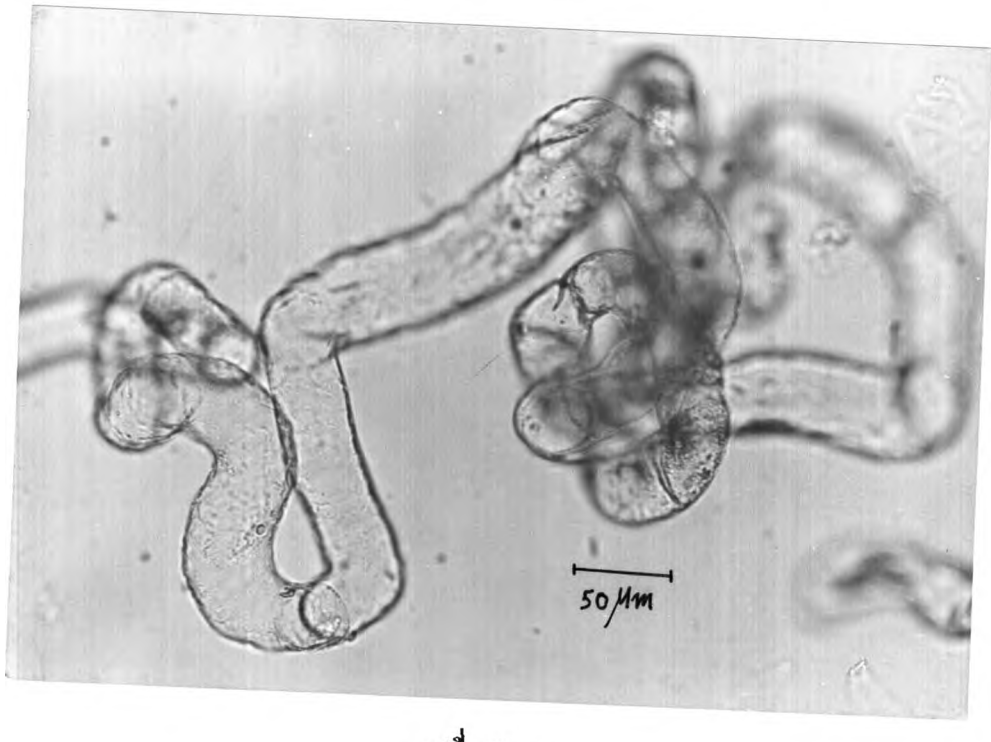
รูปที่ 19 ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนใบของพืชไข่เน่าจากในช่วง stationary phase ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-11

ก. กำลังขยาย 2.5 X 10

ข. กำลังขยาย 2.5 X 20



รูปที่ 19 ก



รูปที่ 19 ข

3.5.5 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนเปลือกของพืชไข่เน่า

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนเปลือกของพืชไข่เน่าในอาหารเหลว 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่า PCV 15 % วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์และวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC ตามช่วงการเจริญ 7 สัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 5 และรูปที่ 20) พบว่าเซลล์เปลือกเริ่มเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 3-4 มีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุด 0.0121 กรัม ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ต้น หลังจากเจริญสูงสุดแล้วการเจริญลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่าน้ำหนักแห้ง เหลือเพียง 0.0085 กรัม ในสัปดาห์ที่ 7

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน พบว่าเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ที่สัปดาห์ที่ 3 ซึ่งเริ่มเข้าสู่ช่วงปลายของ log phase มีค่าใกล้เคียงกับในเซลล์ต้น เมื่อเริ่มเข้าสู่ stationaryphase ในสัปดาห์ที่ 5 ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ค่อยๆ ลดลงจนมีค่าเท่ากับ 0.0236 กรัมเปอร์เซ็นต์เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 7 ซึ่งค่านี้สูงกว่าที่วัดได้ในเซลล์ต้นในสัปดาห์ที่ 7 เกือบ 38 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนมีการเพิ่มแบบเดียวกับในเซลล์คือในช่วง log pahse มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลในสัปดาห์ที่ 6 และ 7 ตามลำดับ โดยที่ปริมาณภายนอกเซลล์และภายในเซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน

อย่างไรก็ตามผลรวมของปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ที่วิเคราะห์ได้จากเซลล์เปลือกเพาะเลี้ยงมีค่าสูงกว่าที่วัดได้จากเซลล์ต้นเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 7 ซึ่งมีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์

3.5.6 ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนเปลือกของพืชไข่เน่า

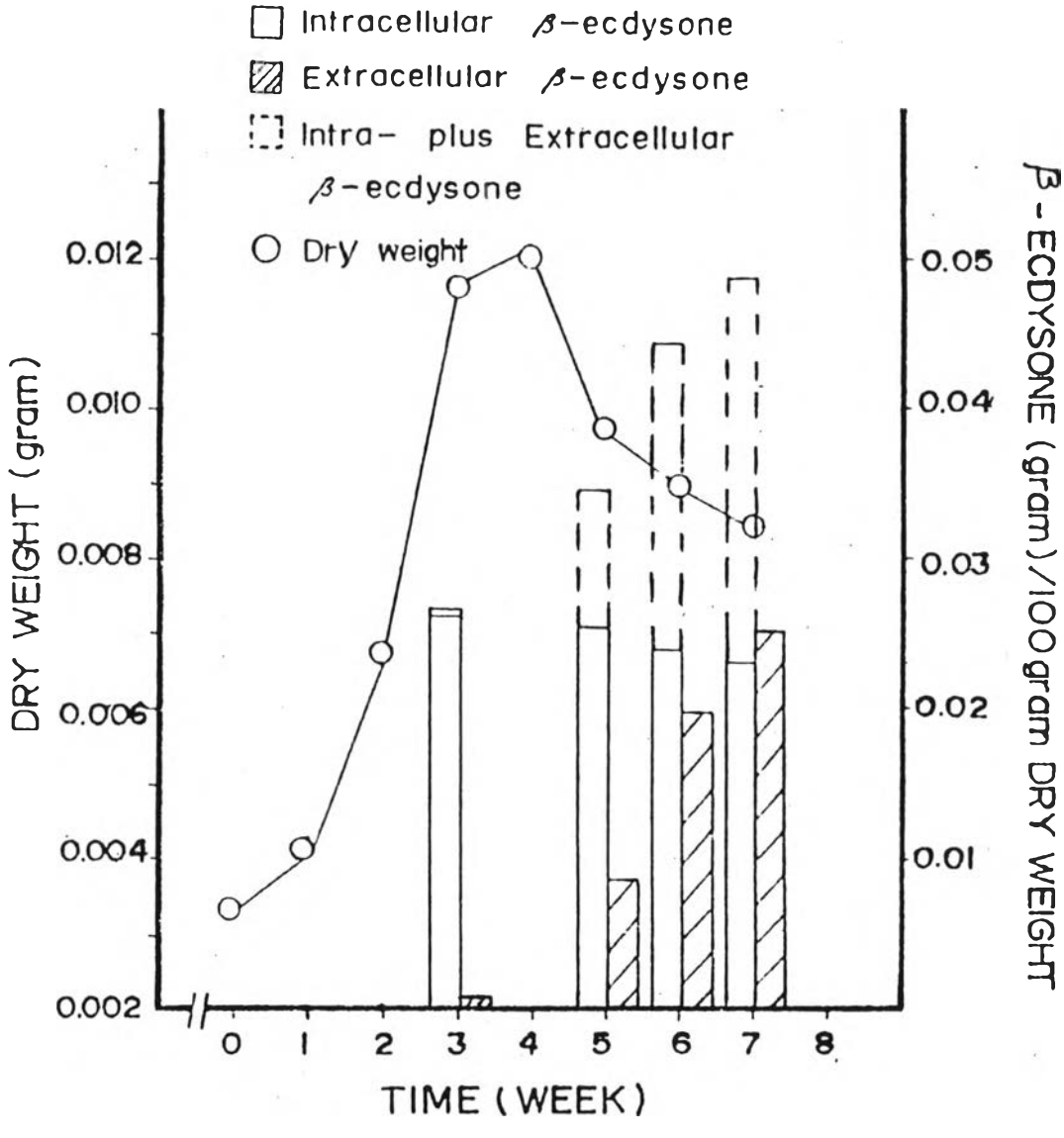
ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนเปลือกของพืชไข่เน่าในช่วงการเจริญ log phase จากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นว่ามีเซลล์รูปร่างและขนาดต่างๆ คละกันไปทั้งรูปกลมและรูปยาว (รูปที่ 21 ก) โดยที่บางเซลล์เห็นบริเวณที่เป็นนิวเคลียสค่อนข้างชัด (รูปที่ 21 ข)

ลักษณะเซลล์ส่วนเปลือกในช่วง stationary phase จะเห็นขอบเขตของ

ตารางที่ 5 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนเปลือกของพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g) ± S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0034 ±0.0004	<----------ND*---------->				
1	0.0041 ±0.0004	<----------ND*---------->				
2	0.0068 ±0.0003	<----------ND*---------->				
3	0.0117 ±0.0005	3.16	72	0.0272	0.0008	0.0280
4	0.0121 ±0.0003	<----------ND*---------->				
5	0.0098 ±0.0012	2.09	100	0.0258	0.0091	0.0349
6	0.0090 ±0.0008	1.05	45	0.0244	0.0205	0.0449
7	0.0085 ±0.0001	1.74	60	0.0236	0.0255	0.0491

* not determined value

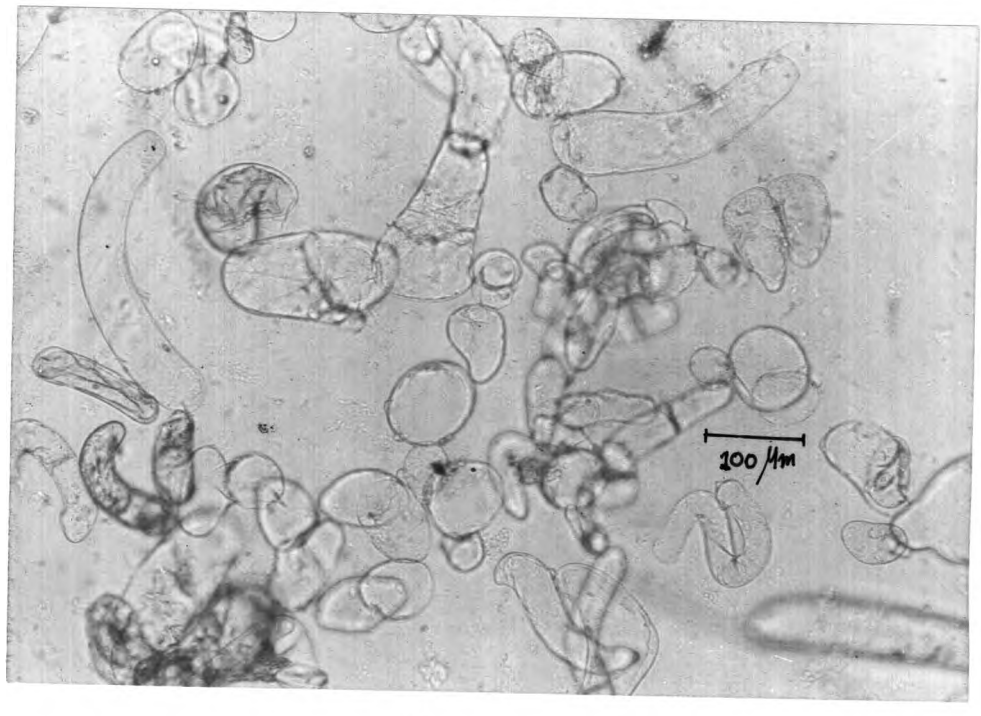


รูปที่ 20 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนเปลือกของพืชไข่เน่า ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm วิเคราะห์การเจริญและผลิตภัณฑ์ตามวิธีมาตรฐานของการทดลอง

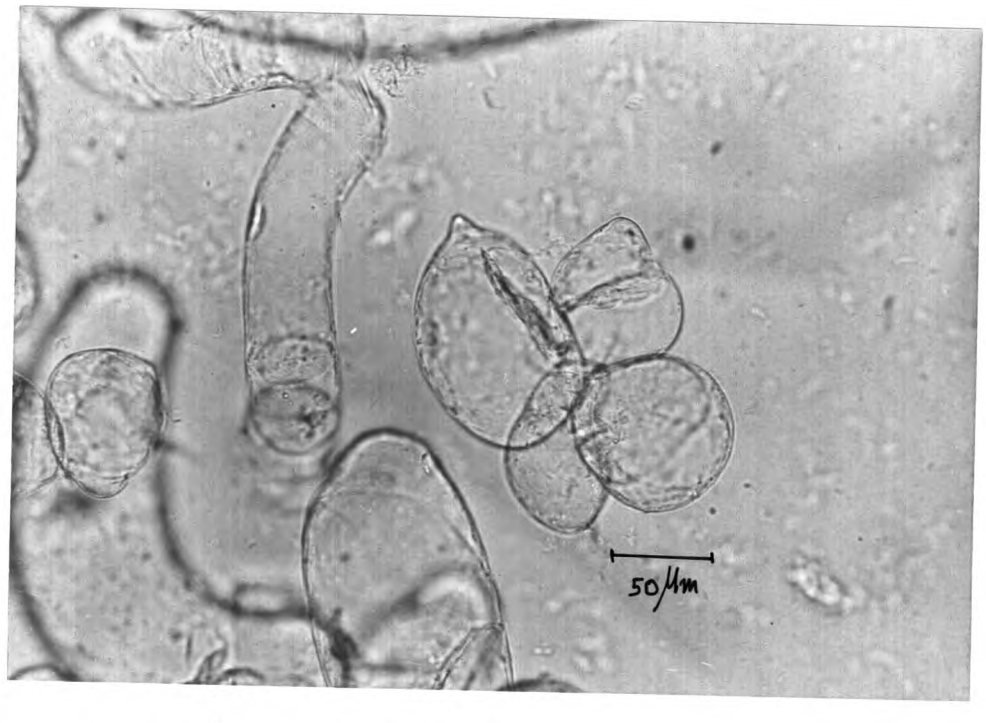
รูปที่ 21 ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนเปลือกของพืชไข่เน่าในช่วง log phase ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-11

ก. กำลังขยาย 2.5 X 10

ข. กำลังขยาย 2.5 X 20



รูปที่ 21 ก



รูปที่ 21ข

ไซโตพลาสซึม ลดลง มีช่องว่างระหว่างขอบเซลล์ และไซโตพลาสซึมมากขึ้น ไซโตพลาสซึมมีสีเข้มขึ้น เซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอนมีมากขึ้น มีเซลล์ที่ต่อกันเป็นสายยาวน้อยกว่าเซลล์ใบ มีเศษเซลล์แตกสลายที่มองเห็นชัดเจน แต่ดูเหมือนว่าขนาดเฉลี่ยของเซลล์จะใหญ่ขึ้นกว่าในช่วงการเจริญระยะ log pahase (รูปที่ 22 ก และข)

สำหรับการผลิตเบตา-เอคไคโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้น ใบ และเปลือกของพืชไข่เน่า สามารถสรุปโดยให้ปริมาณเบตา-เอคไคโซนของเซลล์ต้น เป็นปริมาณหลักมีค่า 1.00 (ตารางที่ 6)

สำหรับเซลล์ส่วนเปลือกถึงแม้จะมีการผลิตเบตา-เอคไดโซน ได้สูงกว่าเซลล์ต้นเล็กน้อย แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์จำนวนมาก ปรากฏว่าเซลล์เปลือกเจริญได้เพียง 2 สัปดาห์ ก็กลายเป็นสีน้ำตาลและตายไป แม้จะทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทันทีที่เซลล์เริ่มมีสีเข้มขึ้น แต่เซลล์ก็ยังคงเป็นสีน้ำตาลเช่นเดิม โดยที่ไม่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อน ดังนั้นจึงเลิกใช้เซลล์เปลือกในการทดลองต่อๆ ไป เนื่องจากต้องการเซลล์ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็วจึงเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นซึ่งไม่มีปัญหาเหมือนในเซลล์เปลือก ส่วนเซลล์ใบมีการเจริญค่อนข้างต่ำ ไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บเซลล์ปริมาณมาก เพื่อนำไปสกัดให้ได้เบตา-เอคไคโซน ระดับสูงตามปริมาณเซลล์ จึงไม่เลือกใช้เซลล์ใบทำการทดลองอื่นๆ ต่อไป

3.6 การศึกษาผลกระทบของสารควบคุมการเจริญต่อการเจริญ และการผลิตเบตา-เอคไคโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า

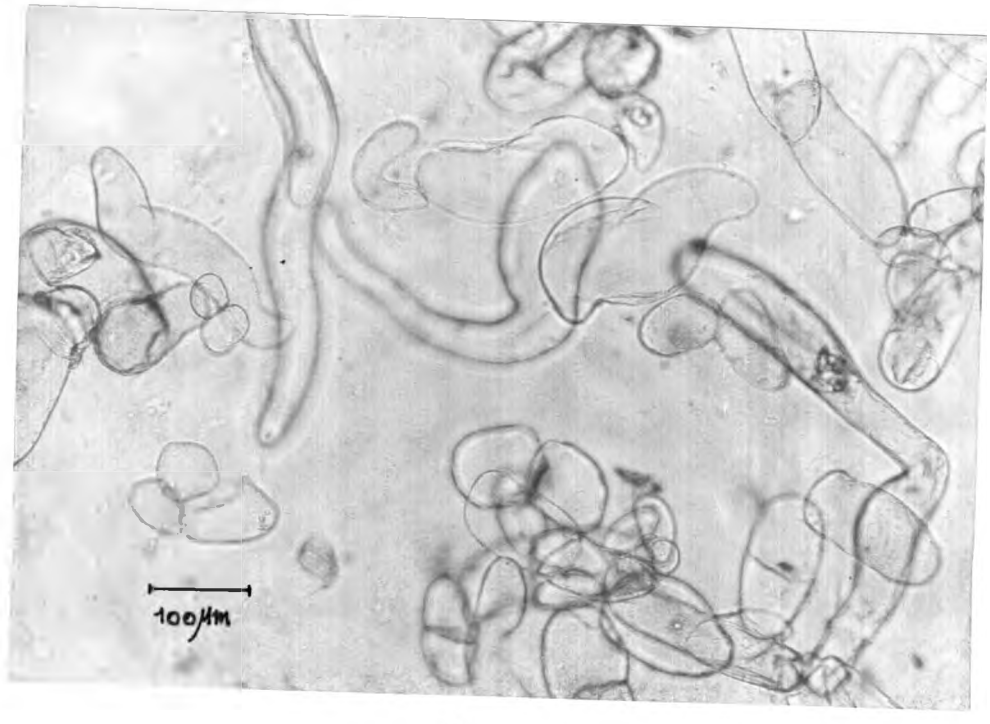
3.6.1 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไคโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตรควบคุม(1/2 เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1กับ 2 ppm)

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า ในอาหารสูตรควบคุม วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์ และวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไคโซนด้วยเทคนิค HPLC ตามช่วงการเจริญ ผลการทดลอง (ตารางที่ 7 และรูปที่ 23) พบว่าเซลล์แขวนลอยส่วนต้นเริ่มเจริญเข้าสู่ช่วง log phase เมื่อสัปดาห์ที่ 2 จนกระทั่งเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 6 ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.0121 กรัม จากนั้นการเจริญลดลงอย่าง

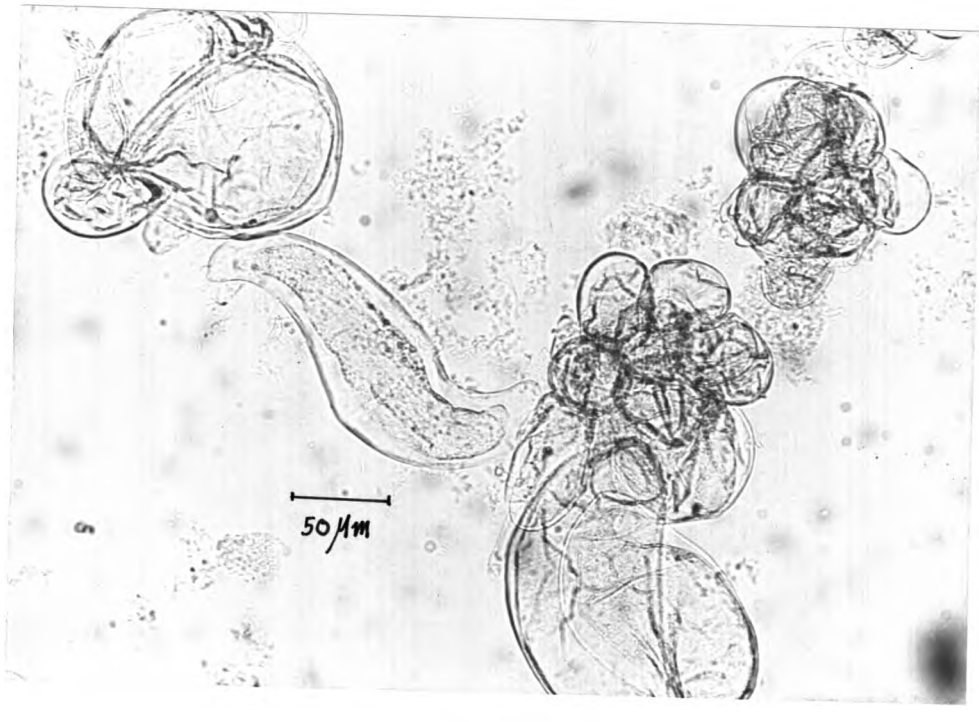
รูปที่ 22 ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนเปลือกของพืชไข่เน่าในช่วง stationary phase ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-11

ก. กำลังขยาย 2.5 X 10

ข. กำลังขยาย 2.5 X 20



รูปที่ 22 ก



รูปที่ 22 ข

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณเบตา-เอคไดโซน ภายใน ภายนอกเซลล์ และปริมาณทั้งหมด ในช่วง log phase และ stationary phase ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้น ใบ และเปลือกในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Growth period	Cell type	Intra cellular β-ecdysone (fold)	Extra cellular β-ecdysone (fold)	Total β-ecdysone (fold)
Log Phase	stem	1.00**	1.00**	1.00**
	leaf	0.38	22.00	0.81
	bark	1.11	1.60	1.12
Stationary Phase	stem	1.00**	1.00**	1.00**
	leaf	0.48	1.30	0.91
	bark	1.42	1.08	1.24

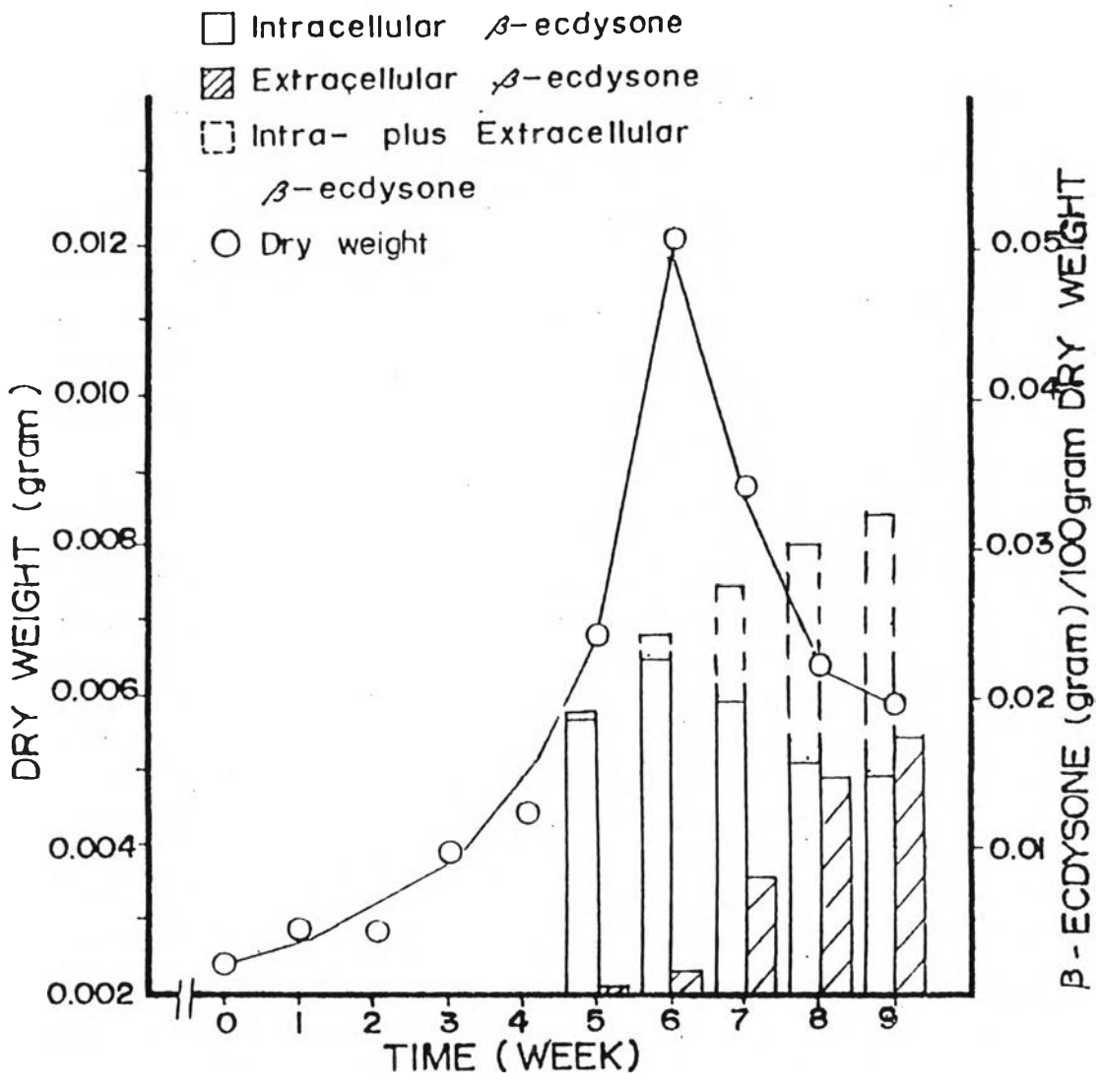
* ปริมาณ β-ecdysone ในเซลล์ต้นให้เป็นค่าหลักของการเปรียบเทียบ เท่ากับ 1.00

** การคำนวณค่าตัวเลขเหล่านี้แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 6 ซึ่งค่าเปรียบเทียบแบบนี้ในตารางที่ 11, 14, และ 25 ก็คำนวณด้วยหลักการเดียวกัน

ตารางที่ 7 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (อาหารสูตรควบคุมเพื่อเปรียบเทียบการใช้ 2,4-D กับ IAA) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g) ±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nnte (ml)	Intra-Cellular ß-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra Cellular ß-ecdysone (g)/ 100 g Dry weight	Total ß-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0024 ±0.0003	<----------ND*---------->				
1	0.0028 ±0.0003	<----------ND*---------->				
2	0.0028 ±0.0001	<----------ND*---------->				
3	0.0039 ±0.0001	<----------ND*---------->				
4	0.0044 ±0.0002	<----------ND*---------->				
5	0.0068 ±0.0003	1.39	108	0.0188	0.0002	0.0187
6	0.0121 ±0.0008	9.00	97	0.0228	0.0016	0.0242
7	0.0088 ±0.0002	0.50	18	0.0197	0.0077	0.0274
8	0.0064 ±0.0001	0.87	49	0.0156	0.0146	0.0302
9	0.0059 ±0.0002	0.99	68	0.0148	0.0173	0.0321

* not determined value



รูปที่ 23 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

รวดเร็วจนค่าน้ำหนักแห้งเหลือเพียง 0.0059 กรัม ในสัปดาห์ที่ 9

ผลการวิเคราะห์การเจริญและปริมาณเบตา-เอคไดโซน เนื่องจากเซลล์แขวนลอยส่วนต้นไข่เน่าที่ใช้ทดลองเป็นเซลล์คนละชุดกับที่ใช้ในการศึกษาการเจริญและการผลิตฮอร์โมนในการทดลองที่ผ่านมาเบื้องต้น (ผลการทดลองที่ 3.5.1) จะให้ผลผลิตของเซลล์และรูปแบบการเจริญแตกต่างไปจากเดิมบ้าง คือ อัตราการเจริญของเซลล์กลุ่มนี้จะช้าลงไปเล็กน้อย เวลาของการเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด เป็น 6 สัปดาห์ แทนที่จะเป็น 5 สัปดาห์ แต่สามารถเจริญได้สูงสุดใกล้เคียงกับเซลล์กลุ่มเดิม นอกจากนี้ความสามารถในการผลิต เบตา-เอคไดโซน ต่ำกว่าเล็กน้อย และช่วงเวลาของการผลิตฮอร์โมนสูงสุด (ภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์) ช้าไปประมาณ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 9) อย่างไรก็ตามเซลล์ดังกล่าวนี้ก็จะใช้เป็นกลุ่มเซลล์เริ่มต้นของการศึกษาผลกระทบของสารควบคุมการเจริญต่อไป เพราะเซลล์กลุ่มนี้เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมานาน 6 เดือน จนกระทั่งเชื่อว่าระดับการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนและการเจริญเป็นรูปแบบคงที่ ซึ่งเกิดจากอิทธิพลขององค์ประกอบของสูตรอาหาร และสภาวะของการเพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐานของการทดลอง เบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 0.0226 กรัม) เปอร์เซ็นต์

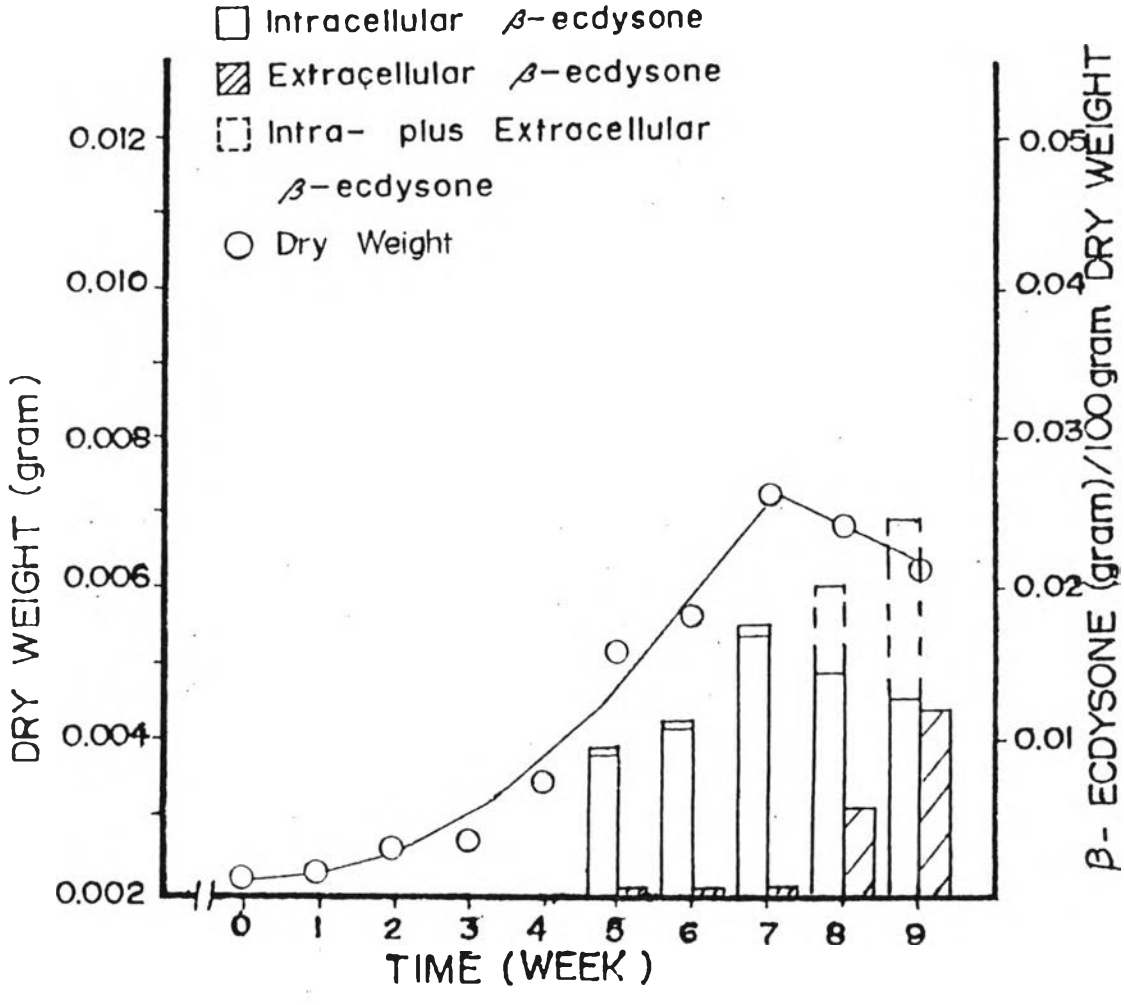
3.6.2 <u>ผลกระทบของสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซินต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้น</u>

เมื่อเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย IAA และ BA 1 กับ 2 ppm , 2 กับ 2 และ 2,4-D, IAA และ BA 1, 1 กับ 2 ppm ตามลำดับ วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์ และวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ตามช่วงการเจริญ ผลการทดลอง (ตารางที่ 8, 9 และ 10 และ รูปที่ 24, 25 และ 26) เปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในกลุ่มควบคุมแสดงให้เห็นว่าการใช้ IAA ซึ่งเป็นสารควบคุมในกลุ่มออกซิน ที่ความเข้มข้น 1 ppm ขึ้นไปจะไปมีผลยับยั้งทั้งการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ต้นไข่เน่า ยิ่งความเข้มข้นของ IAA สูงยิ่งเห็นผลกระทบชัดเจนยิ่งขึ้น ที่ความเข้มข้น IAA 2 ppm ในขณะที่ความเข้มข้น BA คงที่ 2 ppm เหมือนในกลุ่มควบคุมจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความสามารถในการสังเคราะห์เบตา-

ตารางที่ 8 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย IAA และ BA 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g) ± S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0022 ±0.0002	<----------ND*---------->				
1	0.0023 ±0.0001	<----------ND*---------->				
2	0.0026 ±0.0002	<----------ND*---------->				
3	0.0027 ±0.0001	<----------ND*---------->				
4	0.0035 ±0.0002	<----------ND*---------->				
5	0.0052 ±0.0006	0.81	76	0.0092	0.0003	0.0095
6	0.0057 ±0.0001	0.94	78	0.0112	0.0004	0.0116
7	0.0073 ±0.0005	0.50	35	0.0171	0.0008	0.0179
8	0.0069 ±0.0005	0.84	51	0.0147	0.0054	0.0201
9	0.0063 ±0.0004	1.15	82	0.0129	0.0120	0.0249

* not determined value

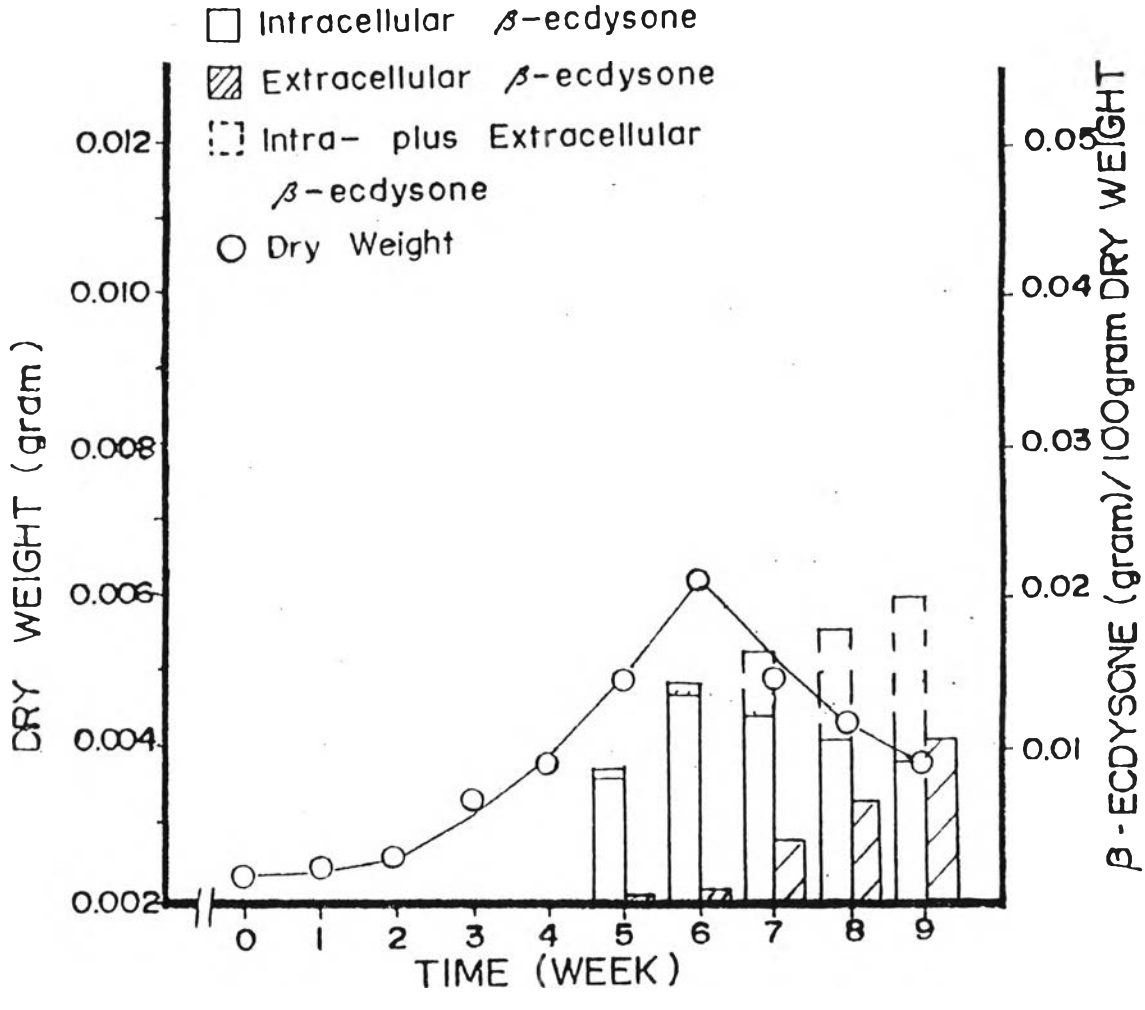


รูปที่ 24 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไผ่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย IAA และ BA 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ตารางที่ 9 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไซเน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย IAA และ BA 2 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0023 ±0.0002	(----------ND*----------)				
1	0.0024 ±0.0003	(----------ND*----------)				
2	0.0025 ±0.0001	(----------ND*----------)				
3	0.0033 ±0.0002	(----------ND*----------)				
4	0.0038 ±0.0002	(----------ND*----------)				
5	0.0049 ±0.0005	0.67	73	0.0082	0.0002	0.0084
6	0.0063 ±0.0004	0.95	74	0.0134	0.0017	0.0154
7	0.0049 ±0.0005	0.84	86	0.0121	0.0042	0.0163
8	0.0044 ±0.0001	1.24	100	0.0108	0.0071	0.0177
9	0.0039 ±0.0002	1.00	80	0.0092	0.0107	0.0199

* not determined value

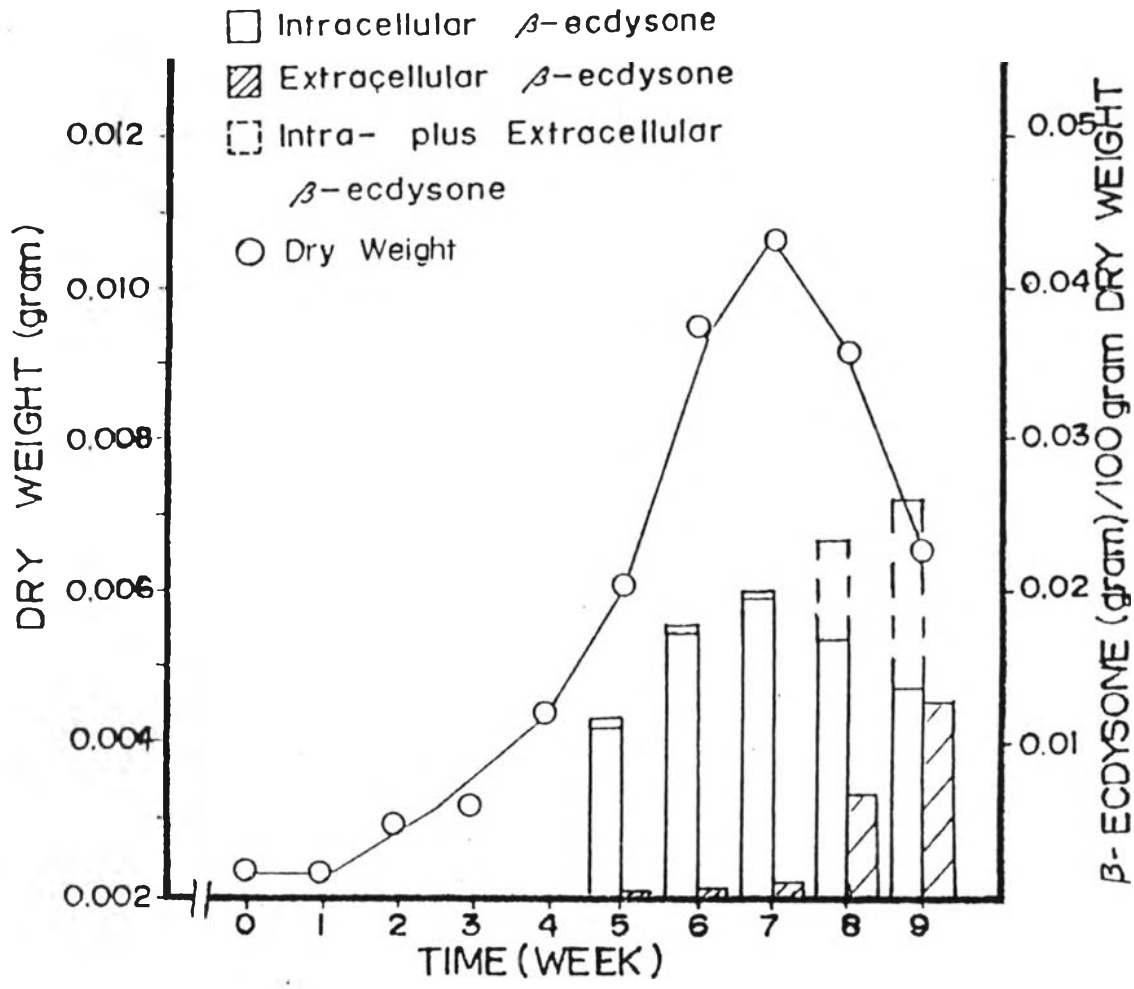


รูปที่ 25 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย IAA และ BA 2 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ตารางที่ 10 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของหน่อไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D, IAA และ BA 1, 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g) ±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Supernate (ml)	Intra-Cellular ß-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular ß-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total ß-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0023 ±0.0002	<----------ND--------->				
1	0.0023 ±0.0002	<----------ND*--------->				
2	0.0029 ±0.0002	<----------ND*--------->				
3	0.0032 ±0.0001	<----------ND*--------->				
4	0.0044 ±0.0002	<----------ND*--------->				
5	0.0061 ±0.0004	0.88	57	0.0113	0.0003	0.0116
6	0.0095 ±0.0004	0.88	53	0.0174	0.0009	0.0183
7	0.0107 ±0.0003	0.95	67	0.0195	0.0014	0.0209
8	0.0092 ±0.0008	0.92	89	0.0167	0.0065	0.0232
9	0.0065 ±0.0002	0.96	104	0.0134	0.0126	0.0260

* not determined value



รูปที่ 26 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นจากพืชไผ่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D, IAA, และ BA 1,1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

เอคไดโซน ที่ทุกช่วงระยะเวลาของการเจริญไม่ว่าจะเป็นภายในหรือภายนอกเซลล์ลดลงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 23 และ 25) อิทธิพลของ IAA ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนยังแสดงให้เห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 23 และ 26) ว่า IAA เพียง 1 ppm ในอาหารสูตรควบคุมที่มี 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm จะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การผลิตเบตา-เอคไดโซนลดลงจากกลุ่มควบคุมทั้งภายในและภายนอกเซลล์ถึงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าเมื่อใช้ IAA และ BA 1 กับ 2, 2 กับ 2, 2,4-D , IAA และ BA 1, 1 กับ 2 ppm เปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุมที่มี 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm สามารถสรุปโดยให้ปริมาณเบตา-เอคไดโซน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรควบคุมเป็นปริมาณหลักมีค่า 1.00 (ตารางที่ 11)

3.7 <u>ผลกระทบของชนิดอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร B-5 เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เป็นอาหารสูตรควบคุม ผลการทดลอง(ตารางที่ 12, 13 และ รูปที่ 27 ก,ข) พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร B-5 เซลล์ต้นเริ่มเจริญเข้าสู่ log phase เมื่อเลี้ยงไปนาน1สัปดาห์เช่นเดียวกับในอาหารสูตรควบคุม จากนั้นเจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ stationary phase เมื่อสัปดาห์ที่ 3 มีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดมากกว่าค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดของอาหารสูตรควบคุมในสัปดาห์ที่ 4 เล็กน้อย จากนั้นการเจริญลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกับในอาหารสูตรควบคุม จนมีค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.0075 กรัมในสัปดาห์ที่ 5

การผลิตเบตดา-เอคไดโซน ภายในเซลล์ซึ่งเจริญในอาหารสูตร B-5 มีค่าเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุด ในช่วงเริ่มเข้าสู่ Stationary phase ในสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งมีค่าสูงถึง 0.0423 กรัม เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าระดับของเบตา-เอคไดโซนที่ผลิตในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ สำหรับจากนั้นปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอก

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณเบตา-เอคไดโซน ภายในเซลล์ ภายนอกเซลล์ และปริมาณทั้งหมดในช่วง log phase และ stationary phase ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm, IAA และ BA 1 กับ 2 ppm, IAA และ BA 2 กับ 2 ppm และ 2,4-D , IAA และBA 1, 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Growth Period	Plant Regulator	Intra cellular β-ecdysone (fold)	Extra cellular β-ecdysone (fold)	Total β-ecdysone (fold)
Log Phase	2,4-D:BA=1:2	1.00*	1.00*	1.00*
	IAA:BA =1:2	0.60	2.00	0.62
	IAA:BA =2:2	0.44	1.00	0.45
	2,4-D:IAA:BA =1:1:2	0.93	4.50	0.98
Stationary Phase	2,4-D:BA=1:2	1.00*	1.00*	1.00*
	IAA:BA=1:2	0.87	0.69	0.77
	IAA:BA=2:2	0.72	0.41	0.51
	2,4-D:IAA:BA= =1:1:2	0.90	0.73	0.81

* ปริมาณ β-ecdysone ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ให้เป็นค่าหลักของการเปรียบเทียบเท่ากับ 1.00

ตารางที่ 12 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารสูตร B-5 เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0040 ±0.0002	<----------ND*---------->				
1	0.0047 ±0.0004	<----------ND*---------->				
2	0.0084 ±0.0002	2.50	80	0.0112	0.0004	0.0116
3	0.0137 ±0.0009	0.51	41	0.0423	0.0005	0.0425
4	0.0090 ±0.0005	0.45	58	0.0324	0.0138	0.0462
5	0.0075 ±0.0001	0.36	71	0.0104	0.0383	0.0487

* not determined value

ตารางที่ 13 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหาร สูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (อาหารสูตรควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร B-5) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

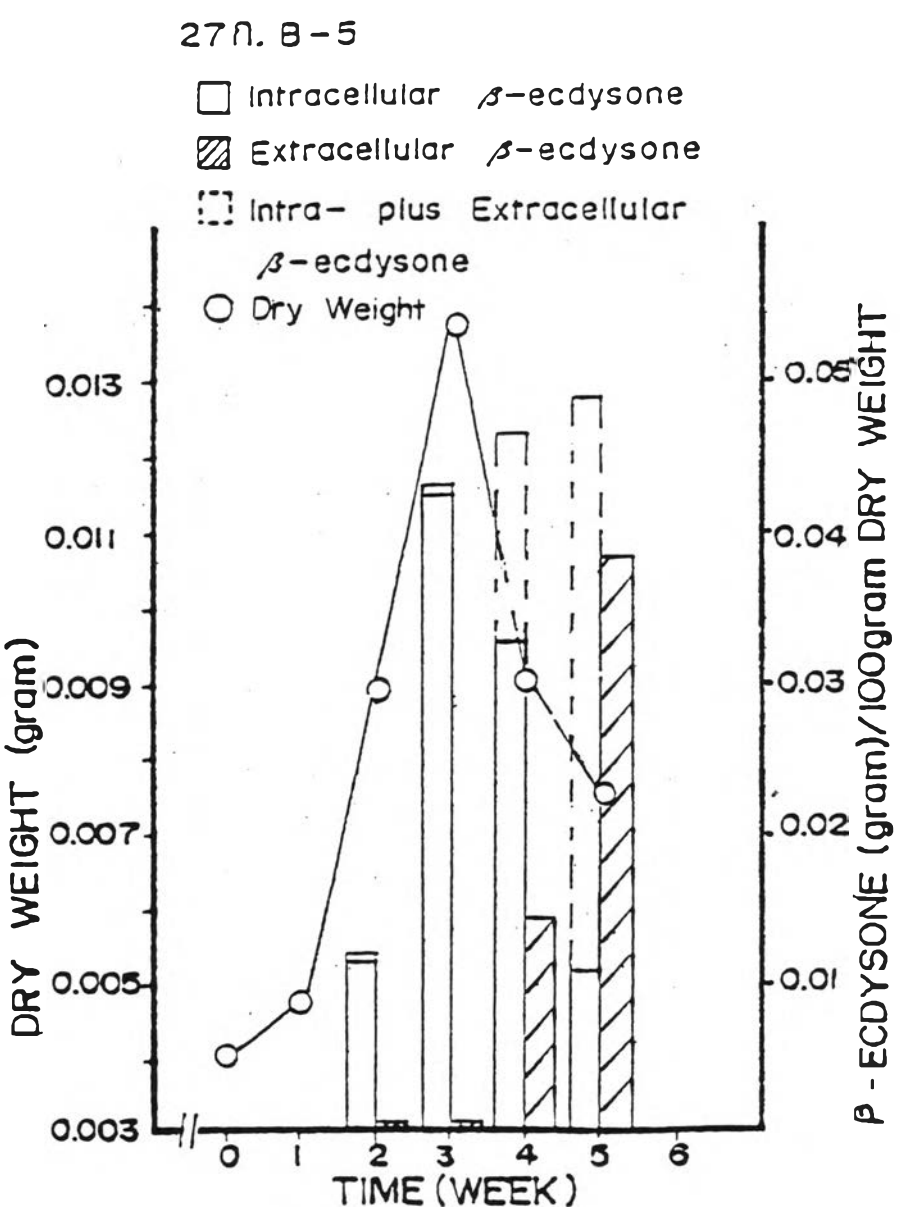
Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0034 ±0.0005	<----------ND*---------->				
1	0.0039 ±0.0002	<----------ND*---------->				
2	0.0061 ±0.0003	0.76	42	0.0076	0.0003	0.0079
3	0.0109 ±0.0003	0.49	38	0.0262	0.0005	0.0267
4	0.0131 ±0.0001	1.02	71	0.0293	0.0008	0.0301
5	0.0094 ±0.0004	0.81	109	0.0241	0.0106	0.0347

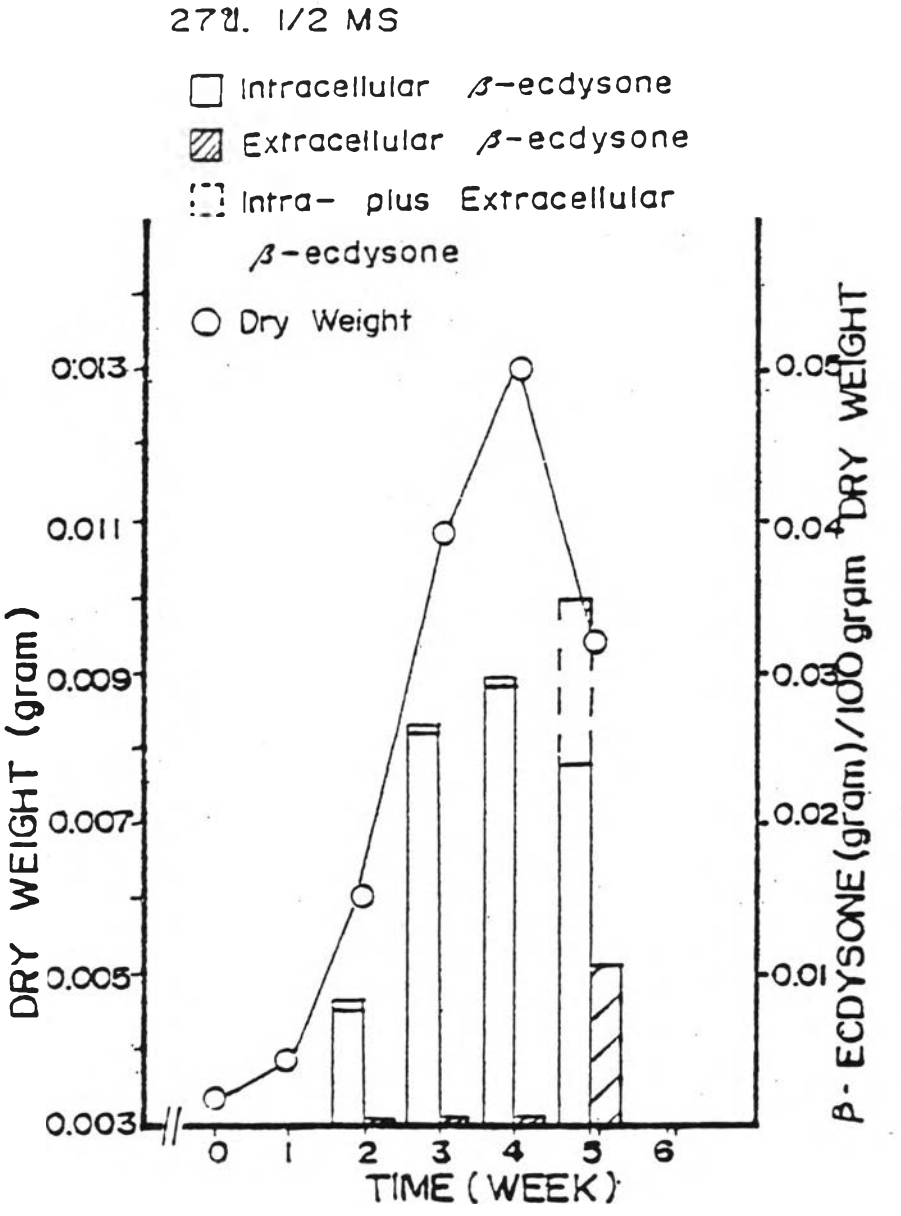
* not determined value

รูปที่ 27 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอฟไฟโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไข่เน่าในอาหารสูตร B-5 และอาหารสูตร 1/2 MS ทั้งสองสูตรเสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก. อาหารสูตร B-5

ข. อาหารสูตร 1/2 MS


27ก. B-5
Intracellular β-ecdysone
Extracellular β-ecdysone
Intra- plus Extracellular β-ecdysone
Dry Weight
DRY WEIGHT (gram)
β-ECDYSONE (gram)/100gram DRY WEIGHT
TIME (WEEK)
0.003
0.005
0.007
0.009
0.011
0.013
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0 1 2 3 4 5 6


27ข. 1/2 MS
Intracellular β-ecdysone
Extracellular β-ecdysone
Intra- plus Extracellular β-ecdysone
Dry Weight
DRY WEIGHT (gram)
β-ECDYSONE (gram)/100 gram DRY WEIGHT
TIME (WEEK)
0.003
0.005
0.007
0.009
0.011
0.013
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0 1 2 3 4 5 6

เซลล์เริ่มทดสอบได้ตั้งแต่การเจริญช่วง log phase จนเริ่มเข้าสู่ stationary phase ซึ่งมีระดับต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ ระดับเบตา-เอคไดโซน ภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในสัปดาห์ที่ 4 แต่ก็ยังน้อยกว่าปริมาณภายในเซลล์ ในสัปดาห์ที่ 5 ปริมาณฮอร์โมนภายนอกเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นกว่าปริมาณภายในเซลล์ถึง 3.7 เท่า

เมื่อรวมปริมาณ เบตา-เอคไดโซน ทั้งภายในและภายนอกเซลล์เข้าด้วยกันพบว่าอาหารสูตร B-5 จะให้ค่าการผลิตฮอร์โมนในสัปดาห์ที่ 5 สูงสุด เท่ากับ 0.0487 กรัมเปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าผลรวมของเบตา-เอคไดโซนที่ผลิต ในอาหารสูตรควบคุมในสัปดาห์ที่ 5 ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B-5 เปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุม สามารถสรุปโดยให้ปริมาณเบตา-เอคไดโซนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรควบคุมเป็นปริมาณหลักมีค่า 1.00 (ตารางที่ 14)

3.8 <u>ผลกระทบของโคเลสเตอรอลต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วยโคเลสเตอรอล 100และ200 มก/ล 2,4-D และ BA 1กับ2 ppm วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์ วัดระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซน ตามช่วงการเจริญโดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เป็นอาหารสูตรควบคุม ผลการทดลอง (ตารางที่ 15, 16 และรูปที่ 28 ก,ข) โคเลสเตอรอล 100 มก/ล มีอิทธิพลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์แขวนลอยอย่างชัดเจนสังเกตุได้จากการเจริญสูงสุด สัปดาห์ที่ 6 ลดลงถึง 50 เปอร์เซนต์ แต่รูปแบบของการเจริญไม่แตกต่างกันนักสำหรับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงทั้งสองสภาวะ

เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเบตา-เอคไดโซนพบว่าปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เมื่อมีโคเลสเตอรอล 100 มก/ล และไม่มีโคเลสเตอรอลจะเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์ จนมีปริมาณสูงสุดในช่วงเริ่มเข้าสู่ stationary phase และระดับของการสังเคราะห์ฮอร์โมนต่อน้ำหนักแห้งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ก็มีค่าใกล้เคียงกันทั้ง

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ ภายนอกเซลล์ และปริมาณทั้งหมดในช่วง log phase และ stationary phase ของเซลล์แขวนลอย ส่วนต้นของพืชใช่เน่าพืชในอาหารสูตร B-5 และสูตร 1/2 MS (อาหารสูตรควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Growth Period	Media	Intra cellular β-ecdysone (fold)	Extra cellular β-ecdysone (fold)	Total β-ecdysone (fold)
Log Phase	1/2 MS	1.00*	1.00*	1.00*
	B-5	1.47	1.25	1.47
Stationary Phase	1/2 Ms	1.00*	1.00*	1.00*
	B-5	1.34	1.30	1.33

* ปริมาณเบตาเอคไดโซนในอาหารสูตรควบคุมให้เป็นค่าหลักของการเปรียบเทียบเท่ากับ 1.00

ตารางที่ 15 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไซเน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm และโคเลสเตอรอล 100 มก/ล

Week	Dry Weight in 1 ml (g) ±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0043 ±0.0002	<----------ND*---------->				
1	0.0045 ±0.0005	<----------ND*---------->				
2	0.0046 ±0.0002	<----------ND*---------->				
3	0.0050 ±0.0003	<----------ND*---------->				
4	0.0062 ±0.0004	1.50	165	0.0318	0.0011	0.0329
5	0.0069 ±0.0003	1.01	98	0.0324	0.0037	0.0361
6	0.0082 ±0.0001	1.71	153	0.0338	0.0048	0.0386
7	0.0052 ±0.0005	1.12	131	0.0103	0.0302	0.0405

* not determined value

ตารางที่ 16 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลว 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (อาหารสูตรควบคุมเปรียบเทียบกับอาหารที่มีโคเลสเตอรอล 100 มก/ล) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

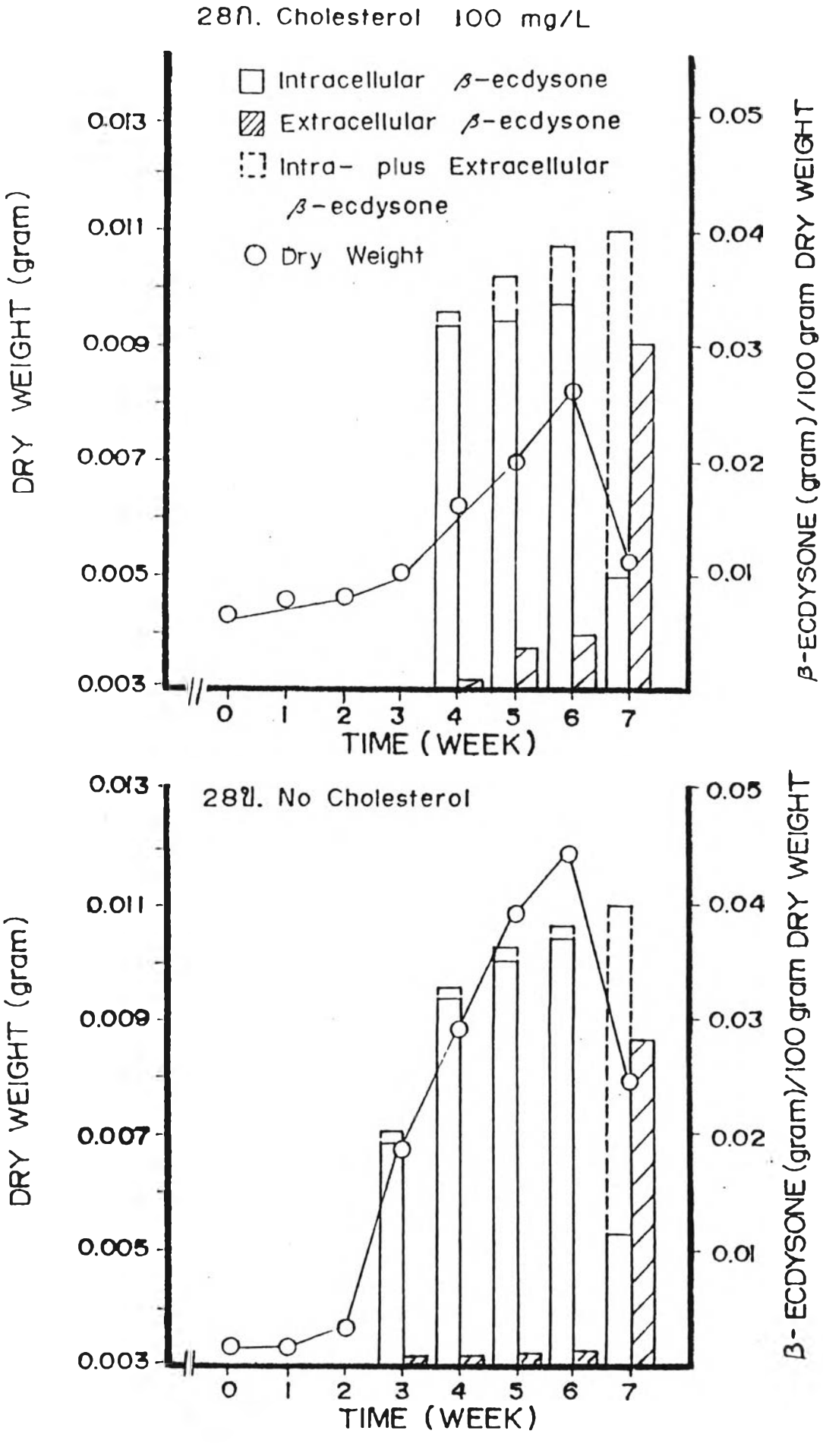
Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0032 ±0.0002	<----------ND--------->				
1	0.0033 ±0.0003	<----------ND*--------->				
2	0.0037 ±0.0005	<----------ND*--------->				
3	0.0067 ±0.0003	0.83	125	0.0192	0.0003	0.0195
4	0.0088 ±0.0001	1.75	124	0.0317	0.0005	0.0322
5	0.0109 ±0.0005	0.88	50	0.0352	0.0009	0.0361
6	0.0119 ±0.0004	1.84	124	0.0366	0.0013	0.0379
7	0.0079 ±0.0002	0.06	97	0.0113	0.0282	0.0395

* not determined value

รูปที่ 28 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไช่เน่าจากส่วนต้นในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่มีโคเลสเตอรอล 100 มก/ล และไม่มีโคเลสเตอรอล (อาหารสูตรควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก. โคเลสเตอรอล 200 มก/ล

ข. ไม่มีโคเลสเตอรอล


28ก. Cholesterol 100 mg/L
Intracellular β-ecdysone
Extracellular β-ecdysone
Intra- plus Extracellular β-ecdysone
Dry Weight
DRY WEIGHT (gram)
β-ECDYSONE (gram)/100 gram DRY WEIGHT
0.013
0.011
0.009
0.007
0.005
0.003
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0 1 2 3 4 5 6 7
TIME (WEEK)
28ข. No Cholesterol
DRY WEIGHT (gram)
β- ECDYSONE (gram)/100 gram DRY WEIGHT
TIME (WEEK)

สองการทดลอง

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลในอาหารเพาะเลี้ยงจาก 100 เป็น 200 มก/ล ผลการทดลอง (ตารางที่ 17, 18 และรูปที่ 29 ก ,ข) จะเห็นได้ว่าโคเลสเตอรอลมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าจริงๆ แต่ผลของการยับยั้งจะไม่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลมากขึ้นอีก 2 เท่า เมื่อเทียบกับการเจริญของเซลล์ในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลอีก 2 เท่า ก็เกือบไม่มีผลในการเพิ่มระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าอย่างชัดเจนแต่อย่างใด

3.9 <u>ผลกระทบของสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอลต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วยสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 และ 200 มก/ล 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์ วัดระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซนตามช่วงการเจริญโดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เป็นอาหารสูตรควบคุม ผลการทดลอง (ตารางที่ 19, 20 และรูปที่ 30) พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเสริมด้วยสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก /ล เซลล์ต้นเริ่มเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ในสัปดาห์ที่ 3 จนเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 6 มีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดน้อยกว่าในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญของเซลล์เมื่อมีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล มีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 เป็นระยะเซลล์เริ่มเจริญเข้าสู่ stationary phase ซึ่งมากกว่าปริมาณสูงสุดในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปริมาณภายในเซลล์ค่อย ๆ ลดลง ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ภายนอกเซลล์ทั้งในอาหารที่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล และอาหารสูตรควบคุมก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน คือ ในช่วงเริ่มเข้าสู่ stationary phase มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ในช่วงหลัง staionary phase ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมากทั้งในอาหารที่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล และ

ตารางที่ 17 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm และโคเลสเตอรอล 200 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0034 ±0.0002	<----------ND*---------->				
1	0.0036 ±0.0005	<----------ND*---------->				
2	0.0036 ±0.0004	<----------ND*---------->				
3	0.0038 ±0.0007	<----------ND*---------->				
4	0.0044 ±0.0005	<----------ND*---------->				
5	0.0055 ±0.0004	0.82	105	0.0273	0.0004	0.0277
6	0.0082 ±0.0007	0.80	129	0.0307	0.0019	0.0326
7	0.0056 ±0.0004	1.50	250	0.0191	0.0163	0.0354

* not determined value

ตารางที่ 18 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไซเน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (อาหารสูตรควบคุมเปรียบเทียบกับอาหารที่มีโคเลสเตอรอล 200 มก/ล) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

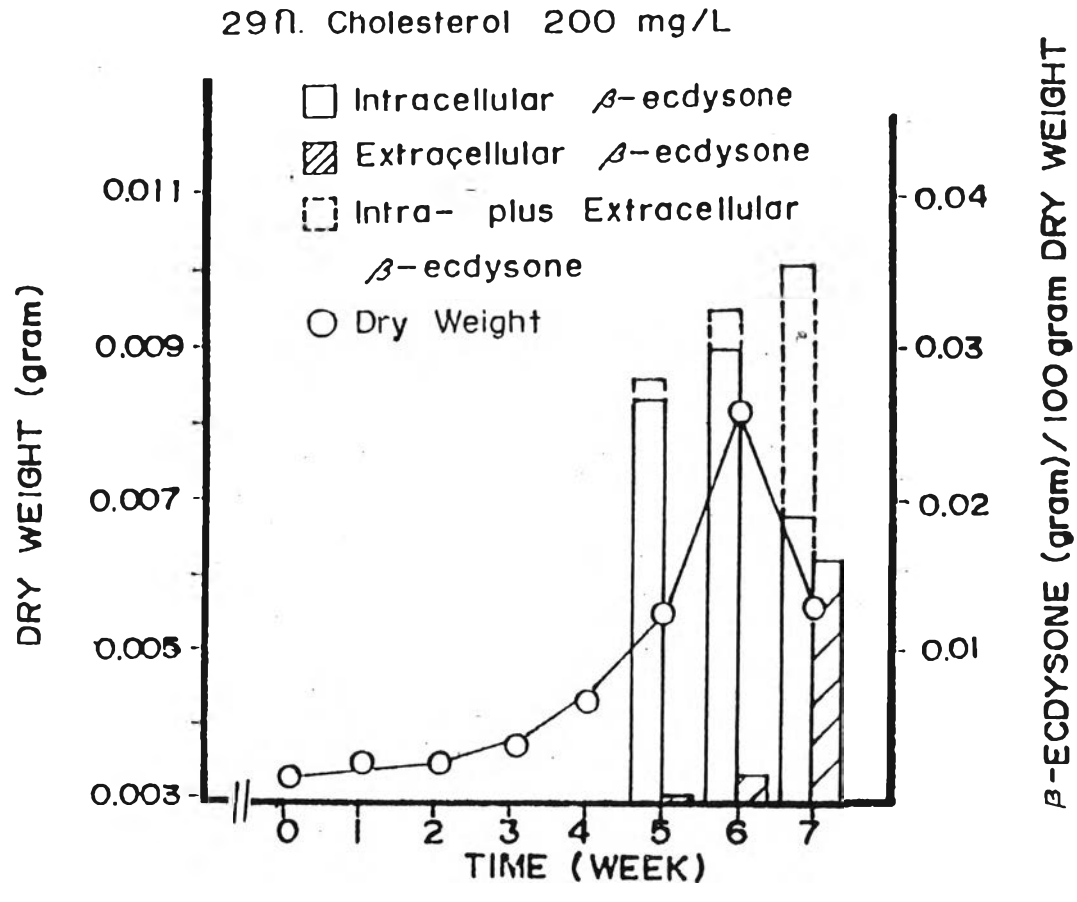
Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0034 ±0.0003	<----------ND*---------->				
1	0.0034 ±0.0006	<----------ND*---------->				
2	0.0035 ±0.0005	<----------ND*---------->				
3	0.0042 ±0.0006	<----------ND*---------->				
4	0.0059 ±0.0003	<----------ND*---------->				
5	0.0075 ±0.0002	0.89	96	0.0212	0.0005	0.0217
6	0.0097 ±0.0002	1.10	105	0.0305	0.0008	0.0313
7	0.0061 ±0.0003	0.91	119	0.0223	0.0114	0.0337

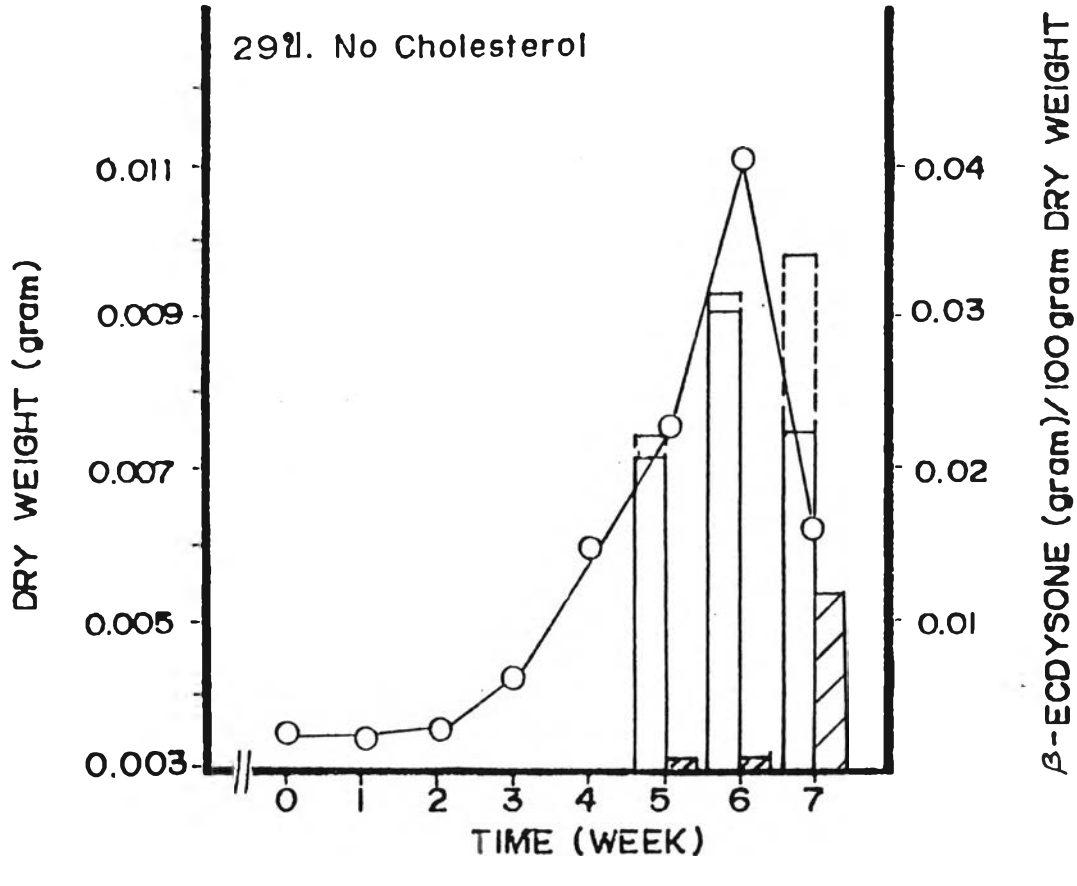
* not determined value

รูปที่ 29 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไคโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่มี โคเลสเตอรอล 200 มก/ล และไม่มีโคเลสเตอรอล (อาหารสูตรควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก. โคเลสเตอรอล 200 มก/ล

ข. ไม่มีโคเลสเตอรอล


29ก. Cholesterol 200 mg/L
Intracellular β-ecdysone
Extracellular β-ecdysone
Intra- plus Extracellular β-ecdysone
Dry Weight
DRY WEIGHT (gram)
0.011
0.009
0.007
0.005
0.003
0.04
0.03
0.02
0.01
β-ECDYSONE (gram)/100 gram DRY WEIGHT
0 1 2 3 4 5 6 7
TIME (WEEK)


29ข. No Cholesterol
DRY WEIGHT (gram)
0.011
0.009
0.007
0.005
0.003
0.04
0.03
0.02
0.01
β-ECDYSONE (gram)/100 gram DRY WEIGHT
0 1 2 3 4 5 6 7
TIME (WEEK)

ตารางที่ 19 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm และสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0037 ±0.0001	<----------ND*---------->				
1	0.0038 ±0.0001	<----------ND*---------->				
2	0.0039 ±0.0001	<----------ND*---------->				
3	0.0040 ±0.0003	<----------ND*---------->				
4	0.0047 ±0.0002	<----------ND*---------->				
5	0.0069 ±0.0008	<----------ND*---------->				
6	0.0081 ±0.0005	1.26	140	0.0298	0.0012	0.0310
7	0.0068 ±0.0002	1.14	184	0.0217	0.0132	0.0349
8	0.0082 ±0.0002	1.76	150	0.0180	0.0198	0.0378

* not determined value

ตารางที่ 20 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไธ่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (อาหารสูตรควบคุมเปรียบเทียบกับอาหารที่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

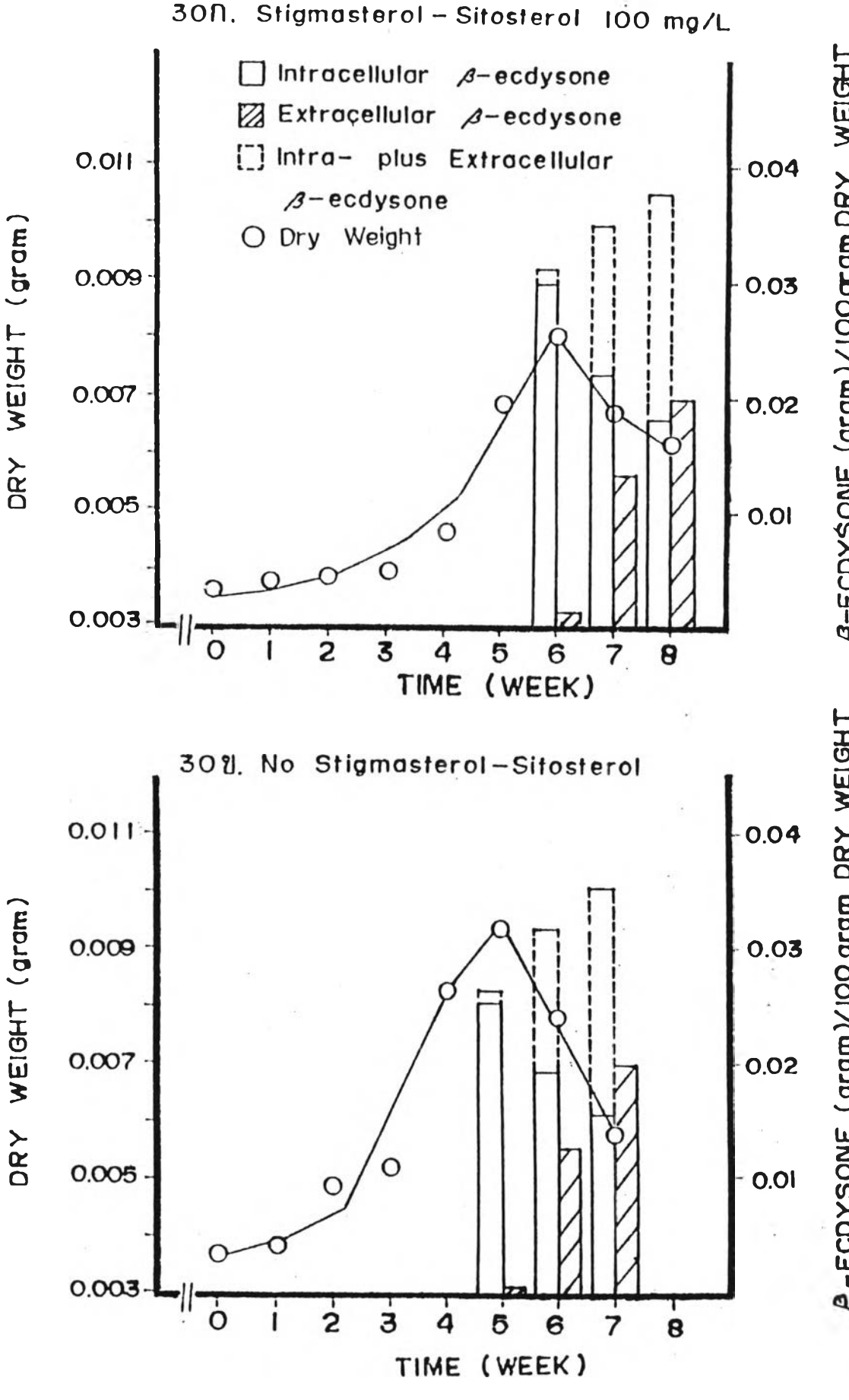
Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0037 ±0.0001	<----------ND*---------->				
1	0.0038 ±0.0002	<----------ND*---------->				
2	0.0049 ±0.0002	<----------ND*---------->				
3	0.0052 ±0.0001	<----------ND*---------->				
4	0.0083 ±0.0002	<----------ND*---------->				
5	0.0094 ±0.0003	1.35	108	0.0254	0.0005	0.0259
6	0.0078 ±0.0004	1.43	150	0.0193	0.0124	0.0317
7	0.0058 ±0.0008	1.39	150	0.0154	0.0190	0.0352

* not determined value

รูปที่ 30 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล และไม่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก. สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล

ข. ไม่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล


30ก. Stigmasterol – Sitosterol 100 mg/L
Intracellular β-ecdysone
Extracellular β-ecdysone
Intra- plus Extracellular β-ecdysone
Dry Weight
DRY WEIGHT (gram)
0.011
0.009
0.007
0.005
0.003
0.04
0.03
0.02
0.01
β-ECDYSONE (gram)/100gram DRY WEIGHT
0 1 2 3 4 5 6 7 8
TIME (WEEK)
30ข. No Stigmasterol–Sitosterol
DRY WEIGHT (gram)
0.011
0.009
0.007
0.005
0.003
0.04
0.03
0.02
0.01
β-ECDYSONE (gram)/100 gram DRY WEIGHT
0 1 2 3 4 5 6 7 8
TIME (WEEK)

อาหารสูตรควบคุม

ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ทั้งภายในและภายนอกเซลล์รวมทั้งหมดในอาหารที่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล ในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าสูงกว่าปริมาณทั้งหมดในสูตรควบคุมประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารและสภาวะเดียวกันแต่เพิ่มความเข้มข้นสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล เป็น 200 มก/ล ผลการทดลอง (ตารางที่ 21, 22 และรูปที่ 31 ก,ข,) แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล ขึ้นไปมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นได้บ้างเล็กน้อยและคงที่ ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นไปสูงถึง 200 มก/ล ก็จะไม่มีผลในการลดการเจริญของเซลล์ต้นไข่เน่าลงไปกว่าเดิม

สำหรับการผลิตเบตา-เอคไดโซน จะให้ผลคล้ายกันกับเมื่อมีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล คือ เกือบจะไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงระดับการผลิตฮอร์โมนชนิดนี้ หรือหากมีก็จะไปยับยั้งการผลิตให้ต่ำลงกว่ากลุ่มควบคุมบ้างเล็กน้อย

ในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ต้น ในอาหารที่มีสติกสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 200 มก/ล นี้ ได้ใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นสูงมาก คือค่าน้ำหนักแห้งเริ่มต้นเท่ากับ 0.005 กรัม ดังนั้นเซลล์ จึงเจริญผ่านระยะ lag phase เข้าสู่ log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และเซลล์เจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้น อัตราการเจริญลดลงอย่างรวดเร็วพอ ๆ กับ อัตราการเพิ่มการเจริญ ซึ่งเป็นผลของระดับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ดังได้ทำการศึกษามาแล้ว (ผลการทดลองที่ 3.4)

3.10 ผลกระทบของกรดเมวาโลนิคต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วยกรดเมวาโลนิค 100 มก/ล 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์ วัดระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซน ตามช่วงการเจริญโดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เป็น

ตารางที่ 21 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm และสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 200 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0054 ±0.0002	<----------ND*----------				
1	0.0067 ±0.0004	<----------ND*----------				
2	0.0073 ±0.0004	<----------ND*----------				
3	0.0084 ±0.0003	1.11	170	0.0263	0.0014	0.0277
4	0.0064 ±0.0002	1.34	198	0.0196	0.0129	0.0325
5	0.0053 ±0.0005	1.21	162	0.0169	0.0230	0.0399

* not determined value

ตารางที่ 22 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (อาหารสูตรควบคุมเปรียบเทียบกับอาหารที่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 200 มก/ล กรดเมวาโลนิค 100 มก/ล และอาหารสูตร B-5 ที่มีโคเลส-เตอรอล 100 มก/ล) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0050 ±0.0002	<----------ND*----------				
1	0.0061 ±0.0003	<----------ND*----------				
2	0.0076 ±0.0003	<----------ND*----------				
3	0.0092 ±0.0004	1.16	117	0.298	0.0009	0.0307
4	0.0071 ±0.0005	1.20	129	0.0215	0.0131	0.0346
5	0.0059 ±0.0004	1.08	133	0.0204	0.0181	0.0385

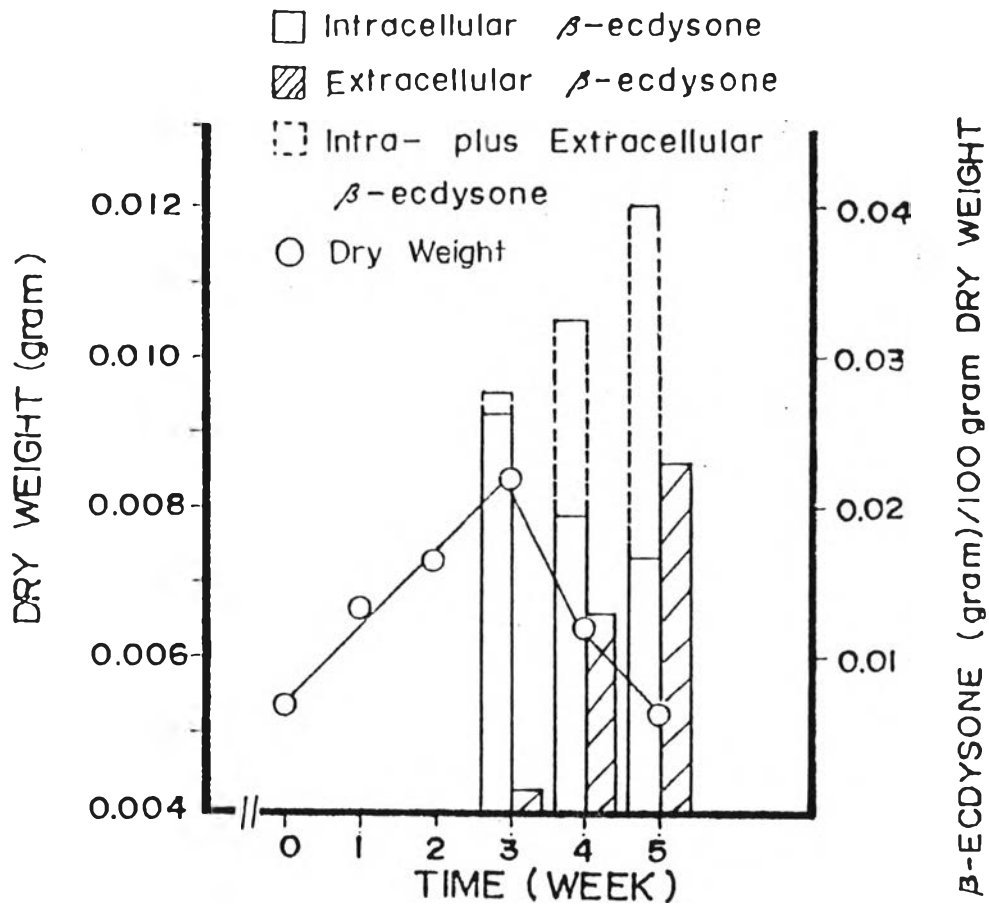
* not determined value

รูปที่ 31 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไซเน่ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 200 มก/ล และไม่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล (อาหารสูตรควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

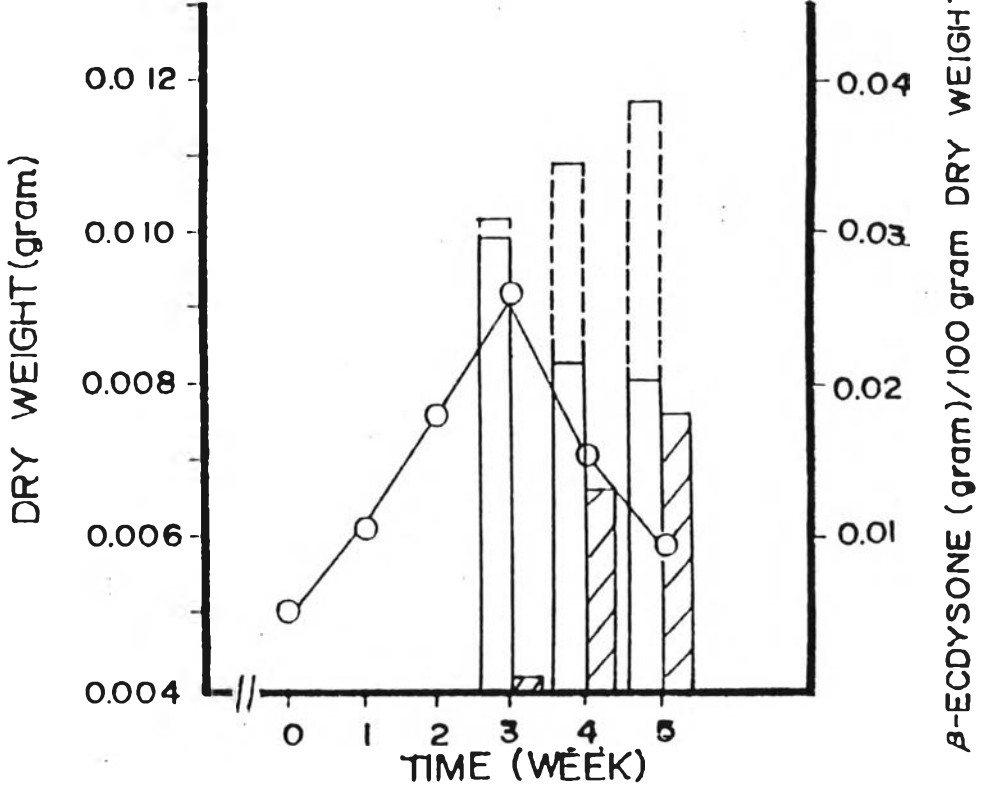
ก. สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 200 มก/ล

ข. ไม่มีสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล

31ก. Stigmasterol – Sitosterol 200 mg/L



31ข. No Stigmasterol–Sitosterol



อาหารสูตรควบคุม ผลการทดลอง (ตารางที่ 22, 23 และรูปที่ 32 ก,ข) พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยกรดเมวาโลนิค 100 มก/ล หรือในอาหารสูตรควบคุมที่ไม่มีกรดเมวาโลนิค ก็จะให้รูปแบบของการเจริญคล้ายคลึงกันและการเจริญของเซลล์สูงสุดที่เวลาและค่าน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน

ในการทดลองนี้ได้ใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นสูงมาก ดังนั้นเซลล์จึงเจริญผ่านระยะ lag phase เข้าสู่ log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และ เซลล์เจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้นอัตราการเจริญลดลงอย่างรวดเร็วพอ ๆ กับอัตราการเพิ่มการเจริญ ซึ่งเป็นผลของระดับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นดังได้ทำการศึกษามาแล้ว (ผลการทดลองที่ 3.4)

เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเบตา-เอคไดโซน ทั้งภายใน ภายนอกเซลล์และผลรวมทั้งหมดของเซลล์ต้นไซ่เน่าเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดเมวาโลนิค 100 มก/ล ในสัปดาห์ที่ 3 และ 5 จะเห็นได้ว่าเซลล์ต้นไซ่เน่าผลิตเบตา-เอคไดโซน ได้น้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 10 %

3.11 <u>การเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอย ส่วนต้น ของพืชไซ่เน่าในอาหารเหลวสูตร B-5 เสริมด้วย โคเลสเตอรอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไซ่เน่าในอาหารเหลวสูตร B-5เสริมด้วยโคเลสเตอรอล 100 มก/ล 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์ และวัดระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซน ตามช่วงการเจริญโดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เป็นอาหารสูตรควบคุม

ผลการทดลอง (ตารางที่ 22, 24 และรูปที่ 33 ก,ข) พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร B-5 เสริมด้วยโคเลสเตอรอล 100 มก/ล และอาหารสูตร 1/2 MS เป็นอาหารสูตรควบคุมโดยใช้เซลล์เริ่มต้น ที่ความหนาแน่นสูง รูปแบบของการเจริญคล้ายคลึงกัน คือ เซลล์เจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 3 แต่เซลล์ที่เจริญในอาหารสูตร B-5 ที่เสริมด้วยโคเลสเตอรอลจะให้ค่าการเจริญสูงกว่าในเซลล์ควบคุมประมาณ 10 เปอร์-

ตารางที่ 23 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไช่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm และกรดเมวาโลนิค 100 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0047 ±0.0006	<----------ND"---------->				
1	0.0069 ±0.0002	<----------ND"---------->				
2	0.0081 ±0.0008	<----------ND"---------->				
3	0.0089 ±0.0006	1.11	148	0.0262	0.0010	0.0272
4	0.0065 ±0.0005	1.28	170	0.0194	0.0117	0.0311
5	0.0055 ±0.0006	1.05	192	0.0168	0.0175	0.0343

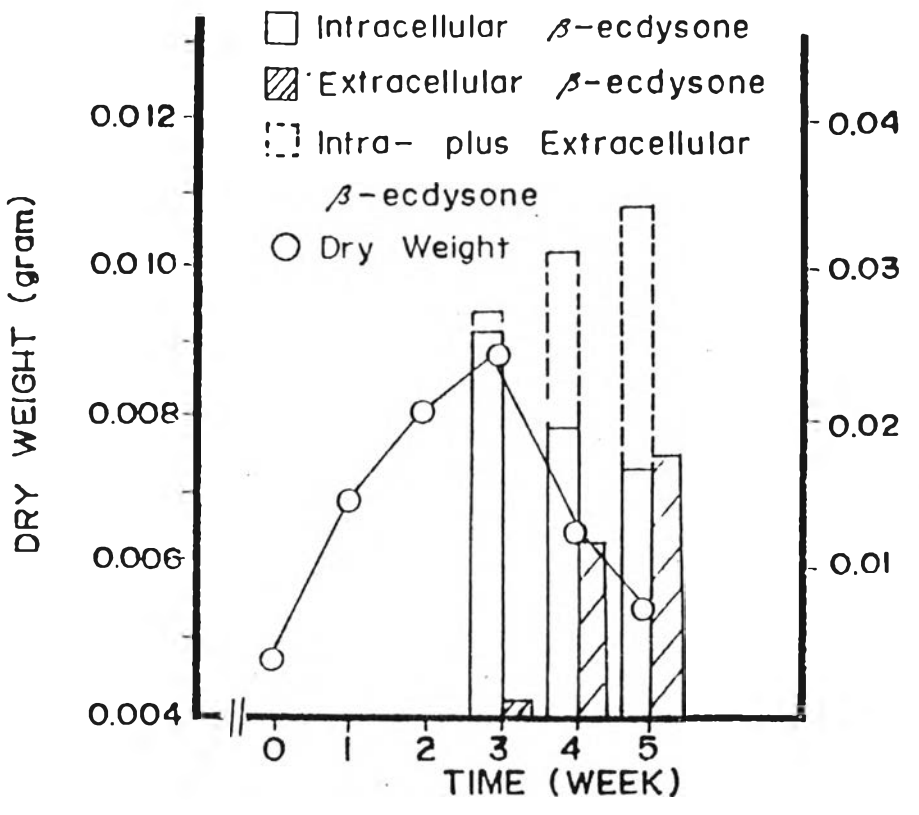
" not determined value

รูปที่ 32 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไคโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่มีกรดเมวาโลนิก 100 มก/ล และไม่มีกรดเมวาโลนิค (อาหารสูตรควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

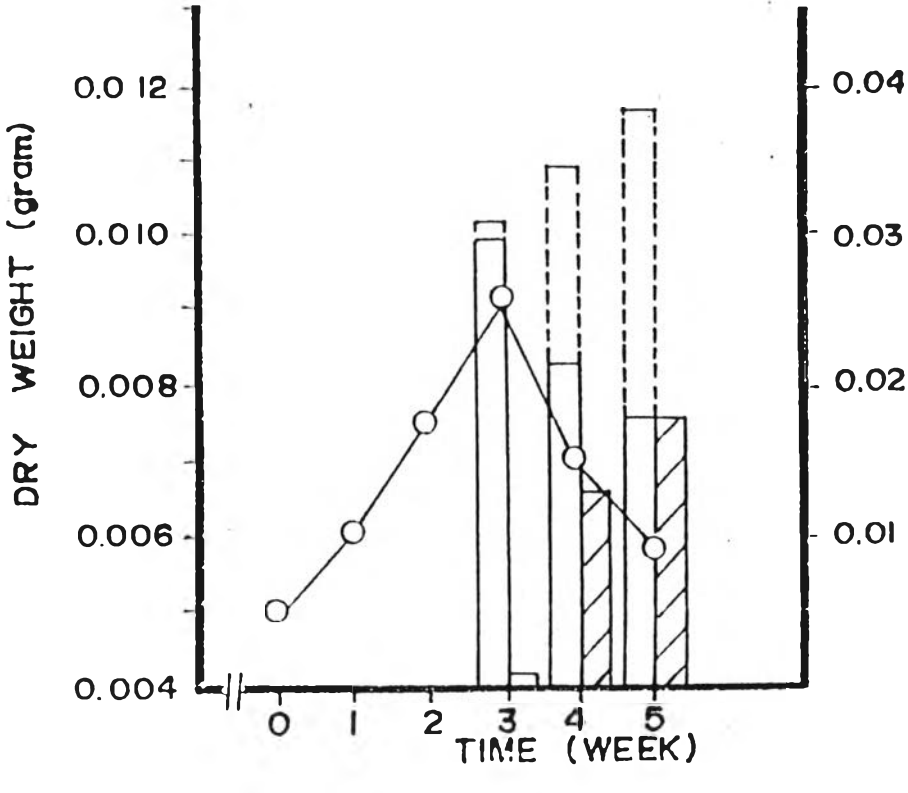
ก. กรดเมวาโลนิค 100 มก/ล

ข. ไม่มีกรดเมวาโลนิค

32ก. Mevalonic Acid 100 mg/L



32ข. No Mevalonic Acid



ตารางที่ 24 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร B-5 เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm และโคเลสเตอรอล 100 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry Weight in 1 ml (g)±S.D.	Total Dry Weight (g)	Volume Super-nate (ml)	Intra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Extra-Cellular β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight	Total β-ecdysone (g)/ 100 g Dry Weight
0	0.0055 ±0.0003	<----------ND*----------				
1	0.0061 ±0.0002	<----------ND*----------				
2	0.0074 ±0.0008	<----------ND*----------				
3	0.0101 ±0.0006	0.94	104	0.0392	0.0014	0.0406
4	0.0078 ±0.0005	1.16	144	0.0341	0.0081	0.0422
5	0.0053 ±0.0004	1.07	152	0.0112	0.0345	0.0457

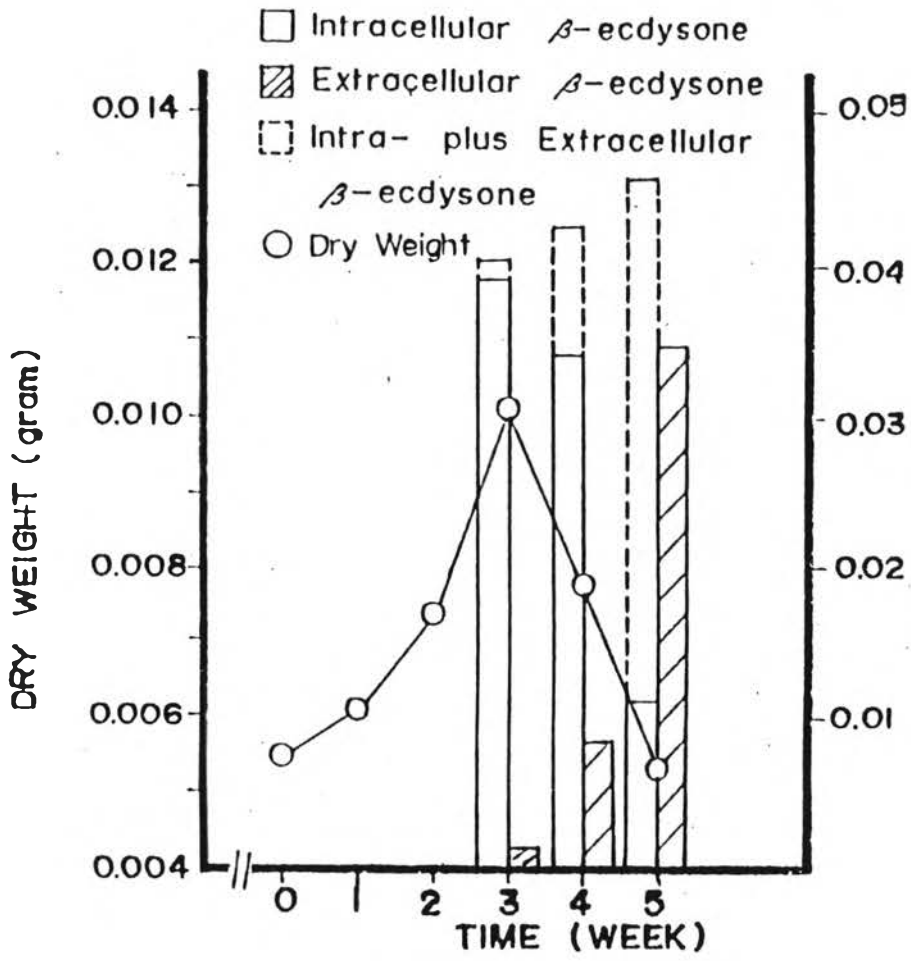
* not determined value

รูปที่ 33 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไคโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืช ไข่เน่าในอาหารสูตร B-5 ที่มีโคเลสเตอรอล 100 มก/ล เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm และอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (อาหารสูตรควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

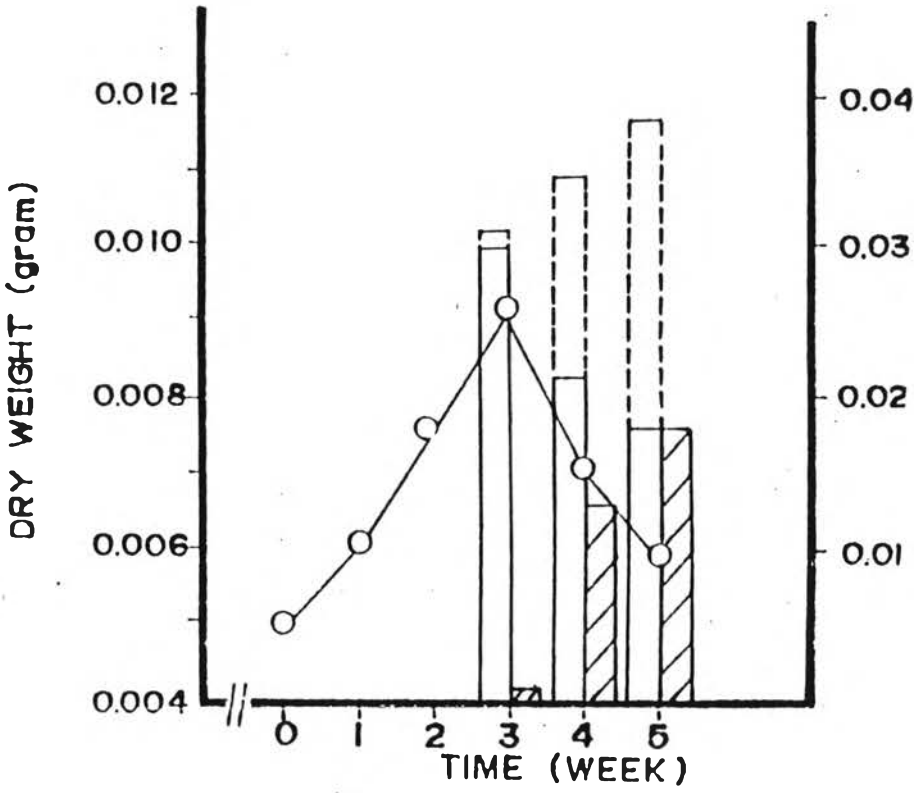
ก. อาหารสูตร B-5 ที่มีโคเลสเตอรอล 100 มก/ล

ข. อาหารสูตร 1/2 MS

33ก. B-5 plus Cholesterol 100 mg/L



33ข. 1/2 MS



เซ็นต์และมีรูปแบบของการลดลงของน้ำหนักแห้งแบบเดียวกันเมื่อเจริญในอาหารทั้งสองสูตร

ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ภายในเซลล์ในอาหารสูตร B-5 เสริมด้วยโคเลสเตอรอล 100 มก/ล มีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งเริ่มเข้าสู่ stationary phase ซึ่งมากกว่าระดับสูงสุด ในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซน ภายนอกเซลล์ทั้งในอาหารสูตร B-5 ที่เสริมด้วยโคเลสเตอรอล 100 มก/ล และในอาหารสูตรควบคุมก็มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน คือในช่วงเริ่มเจริญเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 5 ปริมาณภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมากโดยมีค่าสูงถึง 0.0345 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร B-5 เสริมด้วยโคเลสเตอรอล 100 มก/ล ซึ่งสูงประมาณ 4 เท่าของปริมาณภายในเซลล์ รูปแบบของการผลิตฮอร์โมนเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ในอาหารสูตร B-5 ที่เสริมด้วยโคเลสเตอรอล 100 มก/ล และอาหารสูตรควบคุมก็มีลักษณะคล้ายคลึงกัน

ระดับปริมาณเบตา-เอคไดโซน ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์รวมกันในอาหารสูตร B-5 ที่เสริมด้วย โคเลสเตอรอล 100 มก/ล ในสัปดาห์ที่ 5 มีค่าสูงกว่าระดับที่ผลิตได้ในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าเมื่อเสริมด้วยโคเลสเตอรอล สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล และกรดเมวาโลนิคในอาหารสูตร 1/2 MS และสูตร B-5 (ผลการทดลองที่ 3.8-3.11) สามารถสรุปโดยให้ปริมาณเบตา-เอคไดโซนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรควบคุมเป็นปริมาณหลักมีค่า 1.00 (ตารางที่ 25)

3.12 <u>การศึกษาความเสถียรของการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง</u>

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ในสภาวะที่มีแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เขย่าที่ความเร็ว 80-100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 $^{+}$ 2 $^{\circ}$ ซ แล้วทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 3-4 สัปดาห์ อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน 7 เดือน จะเห็นได้ว่าการเจริญสูงสุดของเซลล์ต้นไข่เน่าเพาะเลี้ยงในช่วงการทดลอง จะมีการแปรผันไปจากเดิมได้โดย

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ ภายนอกเซลล์ และปริมาณทั้งหมดในช่วง log phase และ stationary phase ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นในอาหารสูตร 1/2 MS และอาหารสูตร B-5 ที่เสริมด้วยสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Growth Period	Medium	Precursor (mg/l)	Intra cellular β-ecdysone (fold)	Extra cellular β-ecdysone (fold)	Total β-ecdysone (fold)
Log Phase	1/2 MS	no	1.00*	1.00*	1.00*
	1/2 MS	ch-100	1.03	7.40	1.12
	1/2 MS	ch-200	1.29	0.80	1.28
	1/2 MS	st-100	1.17	2.40	1.19
	1/2 MS	st-200	0.88	1.55	0.90
	1/2 MS	mv-100	0.88	1.11	0.88
	B-5	no	1.47	1.25	1.47
	B-5	ch-100	1.31	1.55	1.32
Stationary Phase	1/2 MS	no	1.00*	1.00*	1.00*
	1/2 MS	ch-100	0.91	1.07	1.02
	1/2 MS	ch-200	0.86	1.43	1.05
	1/2 MS	st-100	1.17	1.04	1.07
	1/2 MS	st-200	0.83	1.27	1.04
	1/2 MS	mv-100	0.82	0.97	0.89
	B-5	no	1.34	1.30	1.33
	B-5	ch-100	0.55	1.91	1.19

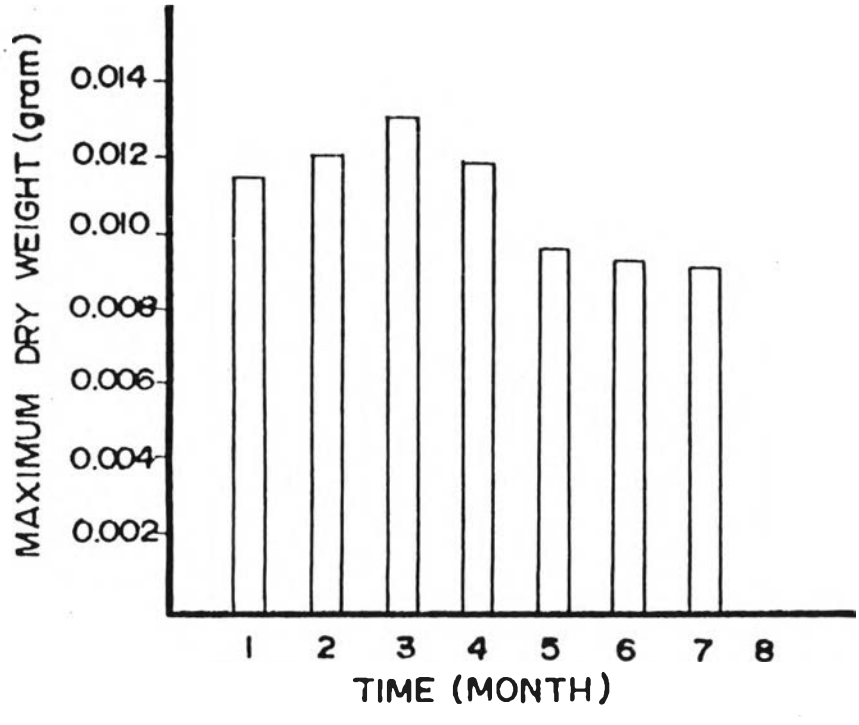
* ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ในอาหารสูตรควบคุมให้เป็นค่าหลักของการเปรียบเทียบเท่ากับ 1.00

ch = cholesterol st = stigmasterol-sitosterol

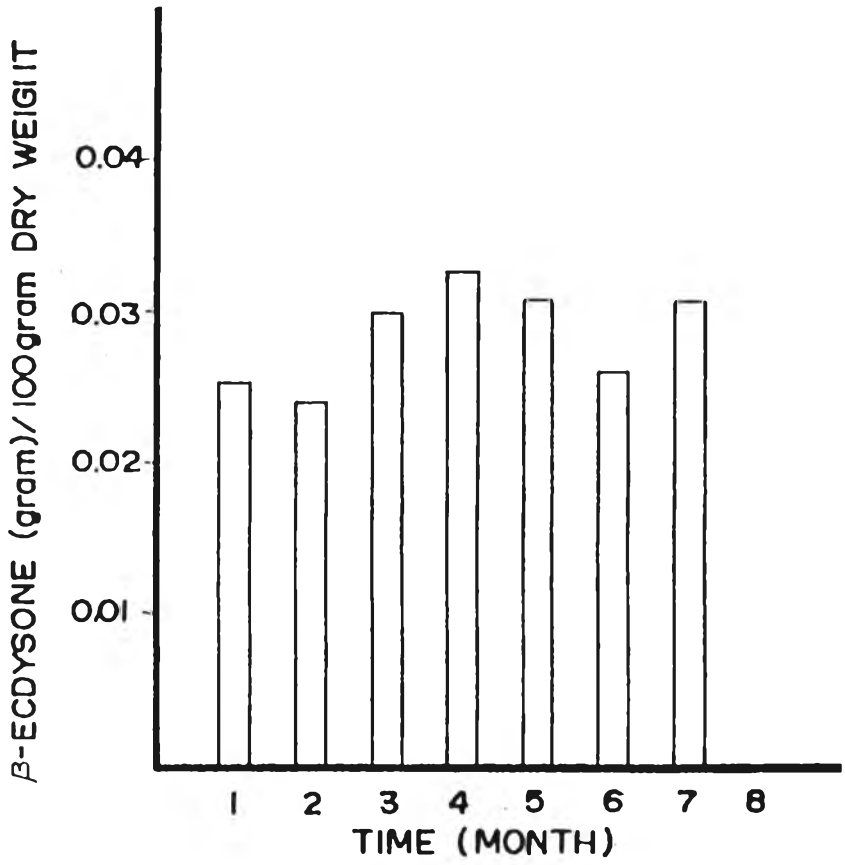
mv = mevalonic acid

สังเกตพบว่าการเจริญของเซลล์จะไม่เปลี่ยนแปลงมากนักในช่วงประมาณ 4 เดือนแรก หลังจากนั้น จะมีแนวโน้มลดลงไปบ้างประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 3 เดือนหลัง (รูปที่ 34)

สำหรับระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซน ที่ติดตามภายในระยะเวลา 7 เดือน มีค่าเป็นกรัมเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน คือ มีค่าไม่แน่นอนนัก แต่โดยเฉลี่ยประมาณ 0.0242 4-0.0379 กรัมเปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 35)



รูปที่ 34 ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นเมื่อเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในอาหารสูตรควบคุม เป็นเวลา 7 เดือน



รูปที่ 35 การผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นเมื่อเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในอาหารสูตรควบคุม เป็นเวลา 7 เดือน