# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

# การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเพิ่มการผลิต ribosome-inactivating protein ของมะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ


**โดย**

**ผศ.ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล และคณะ**



กันยายน 2554

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

# การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเพิ่มการผลิต ribosome-inactivating protein ของมะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

# Studies on effects of plant growth regulators on the increasing of ribosome-inactivating protein production in a bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) from tissue culture


คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
2. ผศ.ดร.ณิชารัตน์ สวาสดิพันธ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์



โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณ

ประจำปีงบประมาณ 2550 – 2551

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

# บทสรุปผู้บริหาร

## 1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

### 1.1 ชื่อโครงการ

ภาษาไทย : การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเพิ่มการผลิต ribosome-inactivating protein ของมะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ภาษาอังกฤษ : Studies on effects of plant growth regulators on the increasing of ribosome-inactivating protein production in a bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) from tissue culture

### 1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล (หัวหน้าโครงการ)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โทรศัพท์ 0-4528-8380 โทรสาร 0-4528-8380

E-mail : arunyap@ubu.ac.th

ผศ.ดร.ณิชารัตน์ สวาสดิพันธ์ (ผู้ร่วมวิจัย)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โทรศัพท์ 0-4528-8380 โทรสาร 0-4528-8380

E-mail : nswasdipan@yahoo.com

## 2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

มะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ Cucurbitaceae หรือ gourd family มะระขี้นกเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในหลายประเทศแถบร้อน (ชาลี, 2543) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อัฟริกาตะวันออก และอเมริกาใต้ ยอดและผลดิบใช้กินเป็นผัก และถูกบรรจุไว้ในตำรับยาสมุนไพรหลายตำรับในหลายประเทศ เช่นใช้เป็นยาแก้น้ำดีอักสบ แก้ไข้ตัวร้อน บำรุงตับ แก้หอบหืด แก้ฝีพิษไข้ ขับพยาธิ ทำให้อาเจียนและท้องร่วง แก้โรคเบาหวาน-ลดน้ำตาลในเลือด เป็นต้น เนื่องจากทุกส่วนของมะระขี้นกประกอบไปด้วยสารสำคัญทางยาหลายชนิด สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) หรือสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางยาในมะนะขี้นกมีหลายกลุ่ม (อาทิเช่น alkaloids, saponins, proteins) หลายชนิด ได้แก่ charantin, p-insulin, momordin, momordicinel and II, momorcharins, MAP30 และ lectin เป็นต้น สารสำคัญเหล่านี้มีในทุกส่วนของมะระขี้นก ปัจจุบันยังพบว่ามะระขี้นกมีสารประเภท ribosome inactivating proteins (RIPs) หลายชนิด ที่สามารถต่อต้านมะเร็ง และยับยั้งเชื้อ HIV ได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยในมะระขี้นก รวมทั้งมะระจีนในด้านแก้เบาหวาน และ anti-HIV กันแพร่หลาย

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถูกนำมาใช้เพื่อให้เซลล์และเยื้อเยื่อพืชสร้างสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิด เพราะเซลล์มีการเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้

ประกอบกับมีการใช้ elicitor ซึ่งเป็นสารกระตุ้นให้พืชสร้างสารทุติยภูมิออกมาเพื่อป้องกันตัวเอง elicitor มีทั้งเป็น biotic และ abiotic ในจำนวนนั้น jasmonic acid (JA) และ methyl jasmonate (MeJA) เป็น elicitors ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิในพืช แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบว่ามีการศึกษาในมะระขี้นก ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาสาร RIPs ของมะระขี้นก โดยเน้นการศึกษาปริมาณการสร้าง RIPs จากเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มฮอร์โมนพืชเป็น elicitor ในการกระตุ้นการสร้างสาร RIPsผลการศึกษาที่คาดว่าจะได้รับนั้นสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษากระตุ้นการสร้างสาร RIPs ในมะระขี้นกให้สูงขึ้น และใช้ในศึกษากระบวนการการสร้างและควบคุมการสร้างสารเหล่านี้ได้ต่อไป

**3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นก
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ RIPs จากเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง กับมะระขี้นกที่เจริญในธรรมชาติ
3. เพื่อศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินการสร้าง RIPs ในเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

**4. วิธีการดำเนินการวิจัย**

การดำเนินการวิจัยของโครงการได้แบ่งการดำเนินการวิจัยดังนี้

1. ผลของ 2, 4–D และ BA ต่อการเจริญของมะระขี้นกจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ
2. ผลของ 2, 4–D และ kinetin ต่อการเจริญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบและลำต้นมะระขี้น
3. การเปรียบเทียบโปรตีน RIPs ที่มีในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกและเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. อิทธิพลของ 2, 4-D และไคเนตินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นก และการศึกษาโปรตีน RIPs

**5. ผลการวิจัย**

ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 4 ส่วนตามวิธีการดำเนินการวิจัย ดังนี้

1. ผลของ 2, 4–D และ BA ต่อการเจริญของมะระขี้นกจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองนี้เป็นการเลี้ยงเนื้อเยื่อมะระขี้นกบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยทำการศึกษาอิทธิพลของ 2, 4–D (2, 4–Dichlorophenoxyacetic acid) และ BA ($N^6$-Benzyladenine) โดยใช้ความเข้มข้นของ 2, 4–D ที่ 0, 0.1, 1 และ 2 ppm และ BA ที่ 0, 0.1, 1 และ 2 ppm จากการศึกษา พบว่า อาหารสูตรที่ 5 (2, 4–D : BA = 0.1 : 0 ppm) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ไม่มีฮอร์โมน อาหารสูตรที่ 8 (2, 4–D : BA = 0.1 : 2 ppm) สามารถชักนำให้เกิดยอด (multiple shoot) ได้ดีที่สุด อาหารสูตรที่ 4, 7, 8, 12, 15 และ 16 (2, 4–D : BA = 0 : 2, 0.1 : 1, 0.1 : 2, 1 : 2, 2 : 1 และ 2 : 2 ppm ตามลำดับ) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และพบว่า อาหารสูตรที่ 4 (2, 4–D : BA = 0 : 2 ppm) สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีด้วยเช่นกัน ส่วนเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพบว่า อาหารสูตรที่ 11 (2,

4–D : BA = 1 : 1 ppm) มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงสุดคือ 58.33 % การทดลองนี้อาจใช้ประโยชน์ในอนาคตในการผลิตสารสำคัญทางยาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อมะระขี้นกได้

2. ผลของ 2, 4–D และ kinetin ต่อการเจริญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบและลำต้นมะระขี้น

การนำชิ้นส่วนมะระขี้นกมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการนำส่วนของใบและส่วนของลำต้น จากต้นกล้าที่มีอายุ 4 สัปดาห์มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS โดยทำการศึกษาอิทธิพลของ 2, 4–D และ kinetin โดยใช้คู่ฮอร์โมน 2, 4–D ที่ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1.0 mg/l และ kinetin ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 1.0 mg/l จากการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนของใบในสูตรอาหารที่ 6, 7, 8, 9, 10 และ11 (2, 4–D:kinetin = 0.1:0.5, 0.1:1.0, 1.0:0, 1.0:0.25, 1.0:0.5 และ 1.0:1.0 mg/l ตามลำดับ) มีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตรที่ 7, 8 และ 10 (2, 4–D:kinetin = 0.1:1.0, 1.0:0 และ 1.0:0.5 mg/l ตามลำดับ) มีการเจริญเป็นรากได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนของลำต้นในสูตรอาหารที่ 5, 7, 8, 9, 10 และ 11 (2, 4–D:kinetin = 0.1:0.25, 0.1:1.0, 1.0:0, 1.0:0.25, 1.0:0.5 และ 1.0:1.0 mg/l ตามลำดับ) เจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารสูตรที่ 5 และ 6 (2, 4–D:kinetin = 0.1:0.25 และ 0.1:1.0 mg/l ตามลำดับ) มีการเจริญเป็นรากได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์

3. การเปรียบเทียบโปรตีน RIPs ที่มีในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกและเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการทดลองนี้ได้สกัดโปรตีนจากมะระขี้นกในส่วนใบ ราก ลำต้น และเมล็ดจากผลดิบและเมล็ดผลสุกทั้งที่เป็นมะระขี้นกบ้านและมะระขี้นกสวน ด้วย 20 mM Tris-HCl pH 8.0 พบว่าปริมาณโปรตีนส่วนเมล็ดจากผลแก่ของมะระขี้นกบ้านให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือ 11.822 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่างสด (mg/g wet weight) รองลงมาเป็นในส่วนของโปรตีนเมล็ดจากผลแก่มะระขี้นกสวน เมล็ดจากผลดิบมะระขี้นกบ้าน เมล็ดจากผลดิบมะระขี้นกสวน ลำต้นมะระขี้นกบ้าน ใบมะระขี้นกสวน ลำต้นมะระขี้นกสวน ใบมะระขี้นกบ้าน รากมะระขี้นกบ้าน และรากมะระขี้นกสวน มีปริมาณโปรตีนเป็น 9.702, 8.355, 4.607, 2.570, 2.140, 2.136, 1.350, 0.967 และ 0.585 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่างสดตามลำดับ พบว่าปริมาณโปรตีนส่วนเมล็ดจากผลดิบ เมล็ดจากผลแก่ ลำต้น และรากของมะระขี้นกบ้านให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่ามะระขี้นกสวน แต่ส่วนใบ มะระขี้นกสวนให้ปริมาณมากกว่ามะระขี้นกบ้าน การแยกชนิดและหาขนาดโมเลกุลโปรตีนจากตัวอย่างโดยวิธี acrylamind gel electrophoresis สารละลายโปรตีนที่สกัดโดย 20 mM Tris –HCl pH 8.0 พบแบนโปรตีนจากตัวอย่างเมล็ดมะระขี้นกที่เป็นเมล็ดจากผลดิบและเมล็ดจากผลสุกของทั้งมะระขี้นกบ้านและสวน โดยในสารสกัดโปรตีนเมล็ดจากผลแก่ของมะระขี้นกบ้านพบแบนที่น่าจะเป็น RIPs

4. อิทธิพลของ 2, 4-D และไคเนตินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นก และการศึกษาโปรตีน RIPs

การนำมะระขี้นกมาทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการนำส่วนของใบ ข้อ และลำต้น ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS โดยทำการศึกษาอิทธิพลของ 2, 4-D และ kinetin โดยใช้คู่ฮอร์โมน 2, 4-D ที่ความเข้มข้น 0, 0.1 และ1.0 mg/l และ kinetin ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 1.0 mg/l จากการศึกษาพบว่า ชิ้นส่วนของใบและข้อในอาหารสูตรที่ 10 (2, 4-D:kinetin=1.0:0.5 mg/l) มีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนของข้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร 2 (2, 4-D:kinetin=0:0.5 mg/ l) มีการเจริญเป็นยอดได้ดีที่สุด 87.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารสูตรที่ 1 (2, 4-

D:kinetin=0:0.25 mg/l) มีการเจริญเป็นราก 50 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนของลำต้นที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 3 (2, 4-D:kinetin=0:1.0 mg/l) มีการเจริญเป็นราก 25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารสูตรที่ 4 (2, 4-D:kinetin=0.1:0 mg/l) มีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์

การทดลองด้านการศึกษา RIPs โดยการนำแคลลัสที่ได้จากส่วนของใบ ข้อ และลำต้นมะระขี้นก ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาสกัดโปรตีนด้วย 20 mM Tris-HCl เมื่อนำมาหาปริมาณโปรตีนรวม พบว่า แคลลัสที่ได้จากส่วนของข้อในอาหารสูตรที่ 5 (2, 4–D:kinetin = 0.1:0.25 mg/l) มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด คือ 144.660 µg/g tissue รองลงมาคือแคลลัสที่ได้จากส่วนของลำต้นในอาหารสูตรที่ 4 (2, 4–D:kinetin = 0.1:0 mg/l) มีปริมาณโปรตีน 121.436 µg/g tissue และนำมาแยกชนิดและขนาดของโปรตีนโดยวิธี acrylamide gel electrophoresis พบว่า มีแบนที่คาดว่าเป็น RIPs

**6. ข้อเสนอแนะที่ได้จากงานวิจัย**

1. ศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดอื่นเพิ่มขึ้น เช่น jasmonic acid, polyamines หรือ ฮอร์โมนพืชชนิดอื่นๆ เพื่อใช้เป็น elicitor ในการกระตุ้นการสร้าง RIPs ให้มีปริมาณมากขึ้น

2. ศึกษาเพื่อระบุและจำแนกชนิดของ RIPs โดยวิธี SDS-Polyacrylamind Gel Electrophoresis และนำเจลที่ได้ไป Blotted ลงในแผ่น PVDF แล้วส่งเจล ดังกล่าวไปทำ N-terminal Amino Acid Squencing เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้น

**7. การนำไปใช้ประโยชน์**

1. หากการใช้ฮอร์โมนพืช ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญของพืชในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิ กลุ่ม ribosome-inactivating protein (RIPs) ให้สูงขึ้นกว่าในธรรมชาติ จะเป็นประโยชน์ในด้านการผลิตยา เพราะสามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ได้ และได้ปริมาณและคุณภาพสารที่ดี เนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีการเจริญต่อเนื่องตลอดเวลา ดังนั้นก็จะมีการผลิตสารได้อย่างต่อเนื่องเช่นกัน ซึ่งนักเภสัชศาสตร์สามารถนำวิธีการนี้ไปใช้เพื่อเพิ่มการผลิต RIPs เพื่อใช้ในการรักษาโรคเอดส์และโรคมะเร็งได้
2. สามารถใช้เนื้อเยื่อที่ได้จากหลอดทดลองเป็นแหล่งสำหรับการศึกษากระบวนการสร้างและการควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิได้ดีกว่าเนื้อเยื่อที่ได้จากรรมชาติ เพราะสามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ได้ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อนักวิชาการด้านชีวเคมีหรือสรีรวิทยาของพืช
3. ได้องค์ความรู้พื้นฐาน เรื่องการควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิประเภท RIPs ในระดับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และใช้ในศึกษากระบวนการการสร้างและควบคุมการสร้างสารเหล่านี้ได้ต่อไป

## บทคัดย่อ

ผลการศึกษาจากงานวิจัยย่อย 4 เรื่อง มีดังนี้ (1) สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเมล็ดมะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) พัฒนาเป็น แคลลัส multiple shoot และ รากได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อในอาหารที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D (0, 0.1, 1 และ 2 mg/l) และ BA (0, 0.1, 1 และ 2 mg/l) (2) ส่วนของใบและลำต้นของมะระขี้นกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีคู่ฮอร์โมน 2, 4–D (0, 0.1 และ 1.0 mg/l) และ kinetin (0, 0.25, 0.5 และ 1.0 mg/l) สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสและรากได้ (3) โปรตีนรวมที่สกัดได้จากเมล็ดของมะขี้นกผลดิบและผลสุกมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อใบ ราก และลำต้น จาก acrylamide gel electrophoresis และโปรตีนเหล่านี้มีโอกาสเป็น RIPs แม้ว่าจะพบโปรตีนจากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แต่แบนโปรตีนไม่ชัดเจน และ (4) แคลลัส ต้น และราก สามารถพัฒนาได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อ ใบ และลำต้น ของมะระขี้นกบนอาหารที่มีคู่ฮอร์โมน 2, 4-D (0, 0.1 และ 1.0 mg/l) และ kinetin (0, 0.25, 0.5 และ 1.0 mg/l) พบโปรตีนรวมจากเนื้อเยื่อเล่านี้ด้วย และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด โปรตีนเหล่านี้มีโอกาสเป็น RIPs เช่นกัน

## Abstract

The results from four subtopics of this research showed that (1) callus, multiple shoots and roots of bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) could be induced from seed via *in vitro* culture on the medium contained the combinations of 2, 4–D (0, 0.1, 1 and 2 mg/l) and BA (0, 0.1, 1and 2 mg/l). (2) Callus and roots of bitter melon were initiated from the culturing of leaf and stem explants on the medium added with the combination of 2, 4–D (0, 0.1 and 1.0 mg/l) and kinetin (0, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/l). (3) Seeds of ripe and unripe fruits of bitter melon contained high amount of total proteins compared to leaf, root and stem tissues. The results form acrylamide gel electrophoresis showed that these proteins probably were RIPs. This study also found proteins form bitter melon tissues derived from the culture, however the bands of the proteins were unclear. (4) Callus, shoots and roots could be developed from node, leaf and stem explants of bitter melon cultured on the medium contained the combination of 2, 4-D (0, 0.1 and 1.0 mg/l) and kinetin (0, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/l). The amounts of total proteins were found form these samples derived from the culture. The highest amount of total proteins was found in callus derived from node culture. These proteins possibly were RIPs as well.

## สารบัญ

**เรื่อง** **หน้า**

บทสรุปผู้บริหาร ก
บทคัดย่อ ฉ
สารบัญภาพ ฌ
สารบัญตาราง ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย ผลการวิจัย และ การอภิปรายผลการวิจัย 10
1. ผลของ 2, 4–D และ BA ต่อการเจริญของมะระขี้นกจาก การเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ 10
2. ผลของ 2, 4–D และ kinetin ต่อการเจริญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ และลำต้นมะระขี้ 16
3. การเปรียบเทียบโปรตีน RIPs ที่มีในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกและเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 21
4. อิทธิพลของ 2, 4-D และไคเนตินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นก และการศึกษาโปรตีน RIPs 35
เอกสารอ้างอิง 45

## สารบัญภาพ

**ภาพที่** **หน้า**

2.1 ลักษณะของต้นมะระขี้นก 7
2.2 ลักษณะของดอกมะระขี้นก 7
2.3 ลักษณะของเมล็ดมะระขี้นก 8
3.1.1 เจริญของการเนื้อเยื่อมะระขี้นกในอาหาร MS สูตรที่ 1 – 4 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 13
3.1.2 การเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นกในอาหาร MS สูตรที่ 5 – 8 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 13
3.1.3 การเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นกในอาหาร MS สูตรที่ 9 – 12 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 14
3.1.4 การเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นกในอาหาร MS สูตรที่ 13 – 16เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 14
3.1.5 การเจริญเป็นแคลลัส multiple shoot ในอาหารสูตรที่ 8 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 15
3.1.6 การเจริญเป็นแคลลัสในอาหารสูตรที่ 16 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 15
3.2.1 การเจริญเป็นแคลลัสและรากจากส่วนของใบในอาหาร MS ที่เติมคู่ 20
ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin อัตราส่วน 1.0:1.0 mg/l (DK11)
3.2.2 การเจริญเป็นแคลลัสและรากจากส่วนของลำต้นในอาหาร MS ที่เติมคู่ 20
ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin อัตราส่วน 0.1:0.25 mg/l (DK5)
3.3.1 Electrophoresis 23
3.3.2 โครงสร้างโมเลกุลของ agarose gel เปรียบเทียบกับ polyacrylamide gel 24
3.3.3 อุปกรณ์สำหรับแยกโปรตีนบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มี SDS เป็นองค์ประกอบ 24
3.3.4 กราฟมาตรฐานของ BSA 27
3.3.5 ตัวอย่างสารสกัดโปรตีนจากตัวอย่างสดในส่วนเมล็ดและเมล็ดแก่ของมะระขี้นก 30
3.3.6 ตัวอย่างสารสกัดจากตัวอย่างสดในส่วนที่เป็นใบ ราก ลำต้น ของมะระขี้นก 31
3.3.7 ตัวอย่างสารสกัดจากมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน 32
ใบ ราก และลำต้น (ยังไม่นำไปเพิ่มปริมาณโปรตีน)
3.3.8 ตัวอย่างสารสกัดจากมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ ราก และลำต้น 33
(ที่มีการนำไปเพิ่มปริมาณโปรตีนโดย Microsep Centrifugal Devices*)
3.3.9 Proteins Marker Mix ที่หมายเลข 4 34
3.4.1 การเจริญเป็นแคลลัสในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4 – D 39
และ kinetin อัตราส่วน 1.0:0.5 mg/l
3.4.2 การเจริญเป็นยอดและรากในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4 – D 40
และ kinetin 0:0.5 mg/l
3.4.3 การเจริญเป็นรากในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4 – D 40
และ kinetin 0:1.0 mg/l
3.4.4 กราฟมาตรฐานของ BSA 41

## สารบัญภาพ (ต่อ)

**ภาพที่** **หน้า**

3.4.5 กราฟปริมาณ total protein ของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของ ใบ ข้อ และลำต้น ของมะระขี้นก 43
3.4.6 ตัวอย่างสารสกัดจากส่วนของ ใบ ข้อ และลำต้น ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะระขี้นก 44

## สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**

3.1.1 สูตรอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ 11
3.1.2 ผลของ 2, 4–D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อเมล็ดมะระขี้นก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 12
3.2.1 ความเข้มข้นคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin 16
3.2.2 การเจริญของชิ้นส่วนของใบมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4–D และ kinetinความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 18
3.2.3 การเจริญของชิ้นส่วนของลำต้นมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4–D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 19
3.3.1 แสดงชนิดของสีย้อมโปรตีน และความไว 26
3.3.2 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm กับความเข้มข้นของ Standard BSA เข้มข้น 0.05-0.5 mg/ml 27
3.3.3 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm และปริมาณโปรตีนที่พบในตัวอย่างมะระขี้นกในส่วนต่างๆ 28
3.3.4 ปริมาณโปรตีนจากส่วนใบ ราก และลำต้นของมะระขี้นก ในการชักนำให้เกิดสารประกอบโปรตีนในอาหาร MS ที่มีการเติมคู่ฮอร์โมน NAA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1,1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 28
3.4.1 ความเข้มข้นคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin 35
3.4.2 การเจริญของชิ้นส่วนของใบมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4–D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 38
3.4.3 การเจริญของชิ้นส่วนของข้อมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4–D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 38
3.4.4 การเจริญของชิ้นส่วนของลำต้นมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4–D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 39
3.4.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm กับความเข้มข้นของ Standard BSA เข้มข้น 0-0.025 mg/ml 41
3.4.6 ปริมาณโปรตีนของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของใบ ข้อ และลำต้น มะระขี้นกในอาหาร MS ที่เติมคู่ความเข้มข้นฮอร์โมน 2, 4-D และ kinetin 42

# บทที่ 1

# บทนำ

มะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ Cucurbitaceae หรือ gourd family มะระขี้นกเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในหลายประเทศแถบร้อน (ชาลี ทองเรือง, 2543) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อัฟริกาตะวันออก และอเมริกาใต้ ยอดและผลดิบใช้กินเป็นผัก และถูกบรรจุไว้ในตำรับยาสมุนไพรหลายตำรับในหลายประเทศ เช่นใช้เป็นยาแก้น้ำดีอักสบ แก้ไข้ตัวร้อน บำรุงตับ แก้หอบหืด แก้ฝีพิษไข้ ขับพยาธิ ทำให้อาเจียนและท้องร่วง แก้โรคเบาหวาน-ลดน้ำตาลในเลือด เป็นต้น เนื่องจากทุกส่วนของมะระขี้นกประกอบไปด้วยสารสำคัญทางยาหลายชนิด สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) หรือสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางยาในมะนะขี้นกมีหลายกลุ่ม (อาทิเช่น alkaloids, saponins, proteins) หลายชนิด ได้แก่ charantin, p-insulin, momordin, momordicine I, momordicine II, momorcharins, MAP30 และ lectin เป็นต้น สารสำคัญเหล่านี้มีในทุกส่วนของมะระขี้นก ปัจจุบันยังพบว่ามะระขี้นกมีสารประเภท ribosome inactivating proteins (RIPs) หลายชนิด ที่สามารถต่อต้านมะเร็ง และยับยั้งเชื้อ HIV ได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยในมะระขี้นก รวมทั้งมะระจีนในด้านแก้เบาหวาน และ anti-HIV กันแพร่หลาย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) คือการนำเอาส่วนของพืช ได้แก่ protoplastเซลล์เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ในสภาพปลอดเชื้อ องค์ประกอบสำคัญที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยง คือ ฮอร์โมนออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งฮอร์โมนสองกลุ่มนี้ประกอบด้วยฮอร์โมนย่อยอีกหลายชนิดด้วยกัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเปลี่ยนแปลงได้หลายอย่างขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนิน เช่น อาจเปลี่ยนเป็นต้นใหม่ (regeneration) เจริญเป็นราก หรืออาจมีการเจริญเป็นกลุ่มของเนื้อเยื่อที่ยังไม่พัฒนาไปเป็นต้น เรียกว่า แคลลัส (callus) อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังขึ้นกับ ชนิดของเนื้อเยื่อ ชนิดของอวัยวะ หรือชนิดของพืชอีกด้วย

ปัจจุบันนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จอย่างกว้างขวาง และมีพืชหลายชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ จึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ ด้านการขยายพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์พืช การผลิตพืชที่ปลอดโรค การเก็บรักษาพันธุ์พืช การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ และการผลิตสารทุติยภูมิ

สารทุติยภูมิจากพืชที่ได้มีการผลิตเป็นการค้าแล้ว ได้แก่ สารสมุนไพร สี สารแต่งกลิ่นอาหาร และเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดอาจจะผลิตสารได้น้อยไม่เพียงพอ มีปัญหาด้านเพาะปลูก หรือมีการสร้างสารไม่สม่ำเสมอ นอกจากนั้นหากพืชสร้างสารได้น้อย เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจช่วยปรับปรุงให้พืชนี้มีการสร้างสารให้มากขึ้นได้ (Dodds and Roberts, 1995) การผลิตสารทุติยภูมิโดยใช้เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนั้น เราสามารถควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้มีการผลิตสารได้ปริมาณมากกว่าในธรรมชาติ ทราบอัตราการผลิตที่แน่นอน ผลิตได้ทุกฤดูกาล ใช้พื้นที่น้อยกว่าการเพาะปลูก (เกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล, 2546) การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยในการผลิตสารจะลดปัญหาด้าน political boundaries หรือด้านภูมิประเทศได้ เช่น การสร้างสารพวก anthocyanin ในธรรมชาตินั้น ต้องมีความเข้มแสงสูง หรือการสร้างสารสำคัญในพืชป่า พืชหายากที่ใกล้สูญพันธุ์ (Smith, 1996)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถูกนำมาใช้เพื่อให้เซลล์และเยื้อเยื่อพืชสร้างสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิด เพราะเซลล์มีการเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ ประกอบกับมีการใช้ elicitor ซึ่งเป็นสารกระตุ้นให้พืชสร้างสารทุติยภูมิออกมาเพื่อป้องกันตัวเอง elicitor มีทั้งเป็น biotic และ abiotic ในจำนวนนั้น jasmonic acid (JA) และ methyl jasmonate (MeJA) เป็น elicitors ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิในพืช แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีการศึกษาในมะระขี้นก ดังนั้นผู้วิจัยและคณะจึงได้มีความสนใจศึกษาการสร้าง RIPs ของมะระขี้นกที่ได้จากการเพราะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการใช้ JA เป็น elicitor ผลการศึกษาที่คาดว่าจะได้รับนั้นสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษากระตุ้นการสร้างสาร RIPs ในมะระขี้นกให้สูงขึ้นและใช้ในศึกษากระบวนการการสร้างและควบคุมการสร้างสารเหล่านี้ได้ต่อไป

โมเลกุลที่กระตุ้นให้มีการสร้างสารทุติยภูมิในพืช เรียกว่า elicitor ซึ่งอาจเป็นสารภายในหรือภายนอกพืช อาจเป็นสารประเภท biotic (ได้แก่ jasmonic (JA) และอนุพันธ์, chitin, chitosan, glucans, pectin และ cellulose เป็นต้น) หรือ abiotic (ได้แก่ UV เกลือ, โลหะหนัก และสารเคมีที่ทำลายคุณสมบัติของ membrane) JA และอนุพันธ์ของมันจัดว่าเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction ซึ่งจะกระตุ้นให้มีการสร้างสารทุติยภูมิในที่สุด (Dornenburg and Knorr, 1995)

Jasmonic acid (JA) และ methyl jasmonate (MeJA) ซึ่งเป็น methyl ester ของ JA เป็นสารที่พบในพืชหลายชนิด เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตนเองของพืช เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด เช่น ในสภาวะอาการไม่เหมาะ หรือการทำลายด้วยโรคและแมลง โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการ signal transduction ยังมีผลยับยั้งการเจริญ กระตุ้นให้เกิด senscence, abscission การสร้างหัว การม้วนของมือเกาะ การสุกของผล การสร้างรงควัตถุ (Staswick, 1995) ปัจจุบันได้มีดารใช้ JA และ MeJA เพื่อกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิกันอย่างแพร่หลายทั้งในพืชเอง และในระดับการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ

สารที่จัดอยู่ในกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนอกเหนือจาก JA และ MeJA ยังมีสารอีกหลายชนิด เช่น สารกำจัดวัชพืช สารชะลอการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงฮอร์โมนพืชด้วย ฮอร์โมนพืชที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ ฮอร์โมน 2 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนิน ฮอร์โมนเหล่านี้อาจจะมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิในพืชได้

มะระขี้นกมีสรรพคุณทางสมุนไพรหลายอย่าง ที่สำคัญและกำลังเป็นประเด็นที่นักวิจัยให้ความสนใจ ได้แก่ การลดน้ำตาลในเลือด รักษาเบาหวาน ต้านมะเร็ง และต้านเอดส์ มีสารสำคัญหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง และเอดส์ โดยเฉพาะที่เป็น RIPs ซึ่งสามารถพบได้จากทุกส่วนของมะระขี้นก จากความสำคัญเหล่านี้ผู้ทำวิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการสร้าง RIPs ในเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษานี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเพิ่มปริมาณการผลิตสารทุติยภูมิ และเป็นแนวทางในการศึกษากระบวนการสร้างและการควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิในมะระขี้นกต่อไปได้

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาสาร RIPs ของมะระขี้นก โดยเน้นการศึกษาปริมาณการสร้าง RIPs จากเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มฮอร์โมนพืชเป็น eliitor ในการกระตุ้นการสร้างสาร RIPs

1. **วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**
    1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นก
    2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ RIPs จากเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง กับมะระขี้นกที่เจริญในธรรมชาติ
    3. เพื่อศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินการสร้าง RIPs ในเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

2. **ขอบเขตของโครงการวิจัย**
    1. ศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ต่อการสร้าง RIPs ในเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ได้แก่ แคลลัส ต้นใหม่ และราก
    2. เปรียบเทียบปริมาณ RIPs จากเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง กับส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกที่เจริญในธรรมชาติ ได้แก่ ใบ ราก ผลดิบ และเมล็ด

3. **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์**
    1. หากการใช้ฮอร์โมนพืช ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญของพืชในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิ กลุ่ม ribosome-inactivating protein (RIPs) ให้สูงขึ้นกว่าในธรรมชาติ จะเป็นประโยชน์ในด้านการผลิตยา เพราะสามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ได้ และได้ปริมาณและคุณภาพสารที่ดี เนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีการเจริญต่อเนื่องตลอดเวลา ดังนั้นก็จะมีการผลิตสารได้อย่างต่อเนื่องเช่นกัน ซึ่งนักเภสัชศาสตร์สามารถนำวิธีการนี้ไปใช้เพื่อเพิ่มการผลิต RIPs เพื่อใช้ในการรักษาโรคเอดส์และโรคมะเร็งได้
    2. สามารถใช้เนื้อเยื่อที่ได้จากหลอดทดลองเป็นแหล่งสำหรับการศึกษากระบวนการสร้างและการควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิได้ดีกว่าเนื้อเยื่อที่ได้จากรรมชาติ เพราะสามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ ได้ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อนักวิชาการด้านชีวเคมีหรือสรีรวิทยาของพืช
    3. ได้องค์ความรู้พื้นฐาน เรื่องการควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิประเภท RIPs ในระดับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และใช้ในศึกษากระบวนการการสร้างและควบคุมการสร้างสารเหล่านี้ได้ต่อไป

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การสร้างสารทุติยภูมิจากการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช

มีรายงานว่ามีการควบคุมให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงผลิตสารทุติยภูมิได้ปริมาณสูงขึ้น โดยการควบคุมสภาวะให้เหมาะสม เช่น การใช้สิ่งกระตุ้นที่เป็น biotic และ abiotic อย่างไรก็ตามมีจำนวนพืชไม่กี่ชนิดที่สามารถใช้เทคนิคนี้เพื่อการค้า ได้แก่ shikonin จาก *Lithospermum erythrorhizon,* berberine จาก *Coptis japonica*, biomass จาก *Panax ginseng*, peroxidase enzyme จาก radish, geraniol จาก Geranium, tuberose polysaccharide จาก *Polianthes tubcerosa* L., rosmarinic acid จาก *Coleus blumei*, digoxin จาก *Digitalis lanata* และ paclitaxel จาก *Taxus Baccat* (Chrispeels and Sadava, 1994) ถึงแม้จะมีพืชเพียงไม่กี่ชนิดที่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อสร้างสารสำคัญในเชิงการค้า นักวิจัยยังคงมีการศึกษาเรื่องการสร้างสารสำคัญโดยใช้เทคนิคนี้ในพืชหลายอีกชนิดอย่างต่อเนื่อง ทั้งในแง่ของการเพิ่มปริมาณการผลิตและการควบคุมกระบวนการการสร้างสารทุติยภูมิ เนื่องจากมีพืชที่เป็นสมุนไพรอีกมากมาย และสารสำคัญที่ยังไม่ได้ศึกษาอีกมากเช่นกัน

การผลิตสีของ cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait*)* ของสายพันธุ์ที่ผลิตสีปริมาณมากในธรรมชาติ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเป็นแคลลัสกลับไม่ผลิตสี แต่ตรงกันข้ามสายพันธุ์ที่ผลิตสีไม่ดีกลับมีการผลิตสีได้ดีในเนื้อเยื่อแคลลัส (Smith, 1996) การผลิตสารสำคัญจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ประสบความสำเร็จในเชิงการค้าแล้ว ได้แก่ saponines จากโสม shikonin และ berberine ปัจจุบันเทคนิคนี้ได้รับความสนใจศึกษาในแง่ของการผลิตสารทุติยภูมิกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ สารที่มีกลิ่นจากหอมและกระเทียม peppermint และ spearmint กลิ่นของผลไม้ กลิ่นชอคโกแลต กลิ่นสาหร่ายทะเล วานิลา celery กาแฟ เครื่องเทศ สีสำหรับอาหารและยา ได้แก่ betalains และ anthocyanins สีสำหรับเครื่องสำอางและสิ่งทอ ได้แก่ shikonin, berberine และอื่นๆ ยากำจัดแมลง และ phytoalexins ก็กำลังมีการศึกษากันมาก และที่ศึกษากันกว้างขวางมาก คือ สารสำคัญทางยาโดยเฉพาะสาร ajmalicine ที่ช่วยรักษาระบบหมุนเวียนเลือดจากต้น *Catharanthus roseus* และยารักษามะเร็งจากต้น yews (*Taxus* spp.) (Smith, 1996)

Ribosome-inactivation proteins (RIPs)

RIPs เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ยับยั้งการสร้างโปรตีนใน eukaryotic cell โดยการเปลี่ยนแปลง ribosome กระบวนการยับยั้งมี 2 แบบ แบบแรกนั้น RIPs เช่น ricin จะทำหน้าที่เป็น *N*-glycosidase จะย่อย glycosidic bond ระหว่าง adenine กับ ribose ใน rRNA large subunit แบบแรกนี้จะพบใน RIPs ของพืชและ bacteria เป็นส่วนใหญ่ อีกแบบเป็น RIPs ของรา เช่น $\alpha$-sarcin ทำหน้าที่เป็น ribonuclease จะย่อย phosphodiester bond ระหว่าง G4325 กับ A4326 ใน 28S (Mock et al., 1996) จากคุณสมบัติของโปรตีนเหล่านี้ พบว่ามันมีคุณสมบัติเป็น antiHIV โปรตีน RIPs พบในพืชหลายชนิด รวมทั้งมะระจีน และมะระขี้นกด้วย เช่น $\alpha$- และ $\beta$-momorcharin มีกิจกรรมในการย่อย ribosome เป็นแบบแรก

RIPs ของพืชมี 2 ชนิด คือ Type I (30 kDa) เป็น single chain protein และ Type II (60 kDa) เป็น double chain protein มี active A chain (คล้ายกับ type I RIP) ต่อกับ B chain ซึ่งคุณสมบัติของ lectin ส่วนใหญ่ type II มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า (Strip, 2004)

RIPs มีคุณสมบัติในการยับยั้งไวรัส HIV กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้เป็นหมัน ยับยั้งการสร้างโปรตีน เป็น deoxyribonuclease, ribonuclease และ *N*-glycosidase RIPs ในมะระขี้นกมีหลายชนิด ได้แก่ $\alpha$- และ $\beta$-momorcharin (29 kDa), MAP30 (30 kDa) เป็น type I RIP มีบทบาทหลายอย่าง เช่น ทำให้แท้งลูก ยับยั้งการเจริญของ trophoblastic cells และยับยั้งการแสดงออกของภูมิคุ้มกันและยับยั้ง HIV replication (Ng et al., 1997) นอกจากนั้นยังมี MRK (28.6 kDa) และ lectin (Putnam and Tainer, 2000; Jiratchariyakul et al., 2001; Wang and Ng, 2001)

สารสกัดจากใบมะระขี้นกสามารถเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสได้ และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ด้วย $\alpha$- และ $\beta$-momorcharin จากเมล็ด ผล และ ใบ มีฤทธิ์การต้าน HIV ในระดับหลอดทดลอง (Zheng et al., 1999; Au et al., 2000) โดยที่มันยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของ HIV-1 integrase (Au et al., 2000) lectins และ MRK29 จากมะระขี้นกสามารถยับยั้งเอ็นไซม์ reverse transcriptase ของไวรัสได้ (Wang and Ng, 2001; Jiratchariyakul et al., 2001) ส่วนของ salt-precipitated fraction ของ MRK29 สามารถลดการแสดงออกของ viral protein p24 ได้ถึง 82% ในเซลล์ที่มีเชื้อ HIV และสามารถเพิ่ม TNF activity ด้วย (Jiratchariyakul et al., 2001)

Silva et al. (2003) ได้ชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของ *Abrus pulchellus* ในความเข้มข้นต่างๆ ของฮอร์โมนออกซิน ไซโตไคนิน ABA และน้ำตาลซูโครส พบว่าแคลลัสเจริญได้ดีในอาหาร MS ที่เติม 2.2 mg/l BA และ 0.6 mg/l ABA และมีน้ำตาลซูโครส 30 g/l จึงได้สกัด RIP ชื่อ pulchellin ได้ จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารดังกล่าว และจากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ใน haemagglutinating activity against rabbit blood cells ได้ และได้นำสารสกัดหยาบไปแยกด้วย affinity chromatography (Sepharose-4B column) นำส่วนที่แยกได้ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ weatern blot analysis พบว่าโปรตีนที่ได้เป็น pulchellin เช่นเดียวกันกับ pulchellin ที่สกัดได้จากเมล็ด

<u>การกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช</u>

Jasmonic acid (JA) และ methyl jasmonate (MeJA) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ JA เป็น elicitor ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิด ทั้งในพืชเอง และในระดับการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในหลอดแก้ว ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในแง่ของความต้องการให้พืชผลิตสารในปริมาณมาก และเพื่อความเข้าใจกระบวนการสร้างและการควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิ

หลังจากเติม MeJA ร่วมกับ chitin และ chitosan ในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Taxus canadensis* พบว่า MeJA, chitin และ chitosan ที่เติม 8 วันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยมีการผลิตสาร paclitaxel หรือ taxol สูงขึ้น โดยสูงขึ้นอย่างเป็นเส้นตรงเมื่อเติม MeJA ตั้งแต่ 0-200 $\mu$M แต่ที่ความเข้มข้นมากกว่า 200 $\mu$M จะยับยั้งการสร้าง ถ้าเติม *N*-acetylchitohexaose และ MeJA 100 $\mu$M ในอาหารที่มี kinetin จะยับยั้งการสร้างสาร อย่างไรก็ตามสาร paclitaxal จะสูงถึง

10 เท่าจากปกติเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี MeJA 100 μM อย่างเดียว (Linden and Phisalaphong, 2000)

สาร ginsenoside เพิ่มขึ้นในรากเพาะเลี้ยงของโสม (*Panax ginseng*) ที่เติม JA 10 mg/l ในอาหารที่เลี้ยง แต่ก็พบว่ารากเจริญไม่ดีเมื่อมี JA ความเข้มข้นสูงขึ้น ปริมาณ ginsenoside สูงสุดถึง 2.0 mg/l เพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า หลังจากเติม JA เป็นเวลา 7 วัน (Yu et al., 2002)

Sanchez-Sampedro et al. (2005) ได้ศึกษาการผลการให้ yeast extract (YE), chitin และ chitosan ต่อการสร้างสาร silymarin ในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Silybum marianum* พบว่า YE เท่านั้นที่กระตุ้นการสร้างสาร เมื่อให้ JA และ MeJA ร่วมกับ YE พบว่า JA, MeJA และ YE จะกระตุ้นการสร้างสาร silymarin ได้ดียิ่งขึ้น โดยที่ MeJA ร่วมกับ YE ให้ผลดีที่สุด

ในการศึกษาการเจริญของเซลล์ และการสร้างสาร anthraquinone (AQ) ในเซลล์แขวนลอยของยอ (*Morinda elliptica*) โดยการให้ elicitor หลายชนิด ได้แก่ YE, JA เส้นใยปั่นของ *Aspergillus niger* and *A. flavus*, chitosan และ glucan ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ พบว่า JA ให้ผลดีที่สุด และ JA ที่ให้ในช่วงต้นๆ และช่วง exponential growth phase จะให้ผลผลิตของ QA ได้ดีกว่าการให้ในช่วง stationary phase และ JA 50 μM ในวันที่ 12 และเก็บผลวันที่ 15 จะให้ AQ ปริมาณสูงถึง 39.6 mg/g DW ซึ่งสูงกว่าที่ควบคุม 2.1 เท่า JA 100 μM ที่ให้ในวันที่ 6 และ 12 และเก็บผลหลังจากนั้น 5 วัน ให้ผลผลิตของ AQ 26.6 และ 21.9 mg/g DW ตามลำดับ (Chong et al., 2005)

Dunaeva et al. (1991) พบว่า JA สามารถกระตุ้นการสร้าง RIPs ชนิด jasmonate-incduced protein 60 (JIP60) ในข้าวบาร์เลย์ได้ และ JIP60 มีกิจกรรมของ *N*-glycosidase ซึ่งจะยับยั้งการสร้างโปรตีนในขั้นตอน elongation โดยที่โปรตีนในกลุ่ม RIPs มีกิจกรรมของ *N*-glycosidase จะย่อย adenosine residue ของ conserved loop ของ large rRNA subunit (α-sarcin loop) α-sarcin เกี่ยวข้องกับการจับของ elongation factors (Efs) กับ ribosome ดังนั้นหากมีการเปลี่ยนแปลงของ loop นี้ จะทำให้ large ribosome subunit ไม่สามารถทำงานได้ จึงทำให้การสร้างโปรตีนหยุดชะงักลง

<u>มะระขี้นก</u>

มะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ Cucurbitaceae หรือ gourd family มะระขี้นกเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในหลายประเทศแถบร้อน (ชาลี ทองเรือง, 2543) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินเดีย จีน ไทย อัฟริกาตะวันออก และอเมริกาใต้ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปแต่ละภาษา เช่น Karela (Hindi), Ku Kua (Chinese), Koo Kwa Kan (Malay) เป็นต้น ส่วนภาษาอังกฤษมีชื่อเรียกต่างๆ กัน เช่น bitter ground, bitter cucumber, bitter momordica, maiden apple, bitter melon และ balsam pear ในประเทศไทย มะระขี้นกมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น ผักไซ (อุบลราชธานี) ผักใส่ (มุดกาหาร) ผักไห่ (สงขลา) มะไห่ (ภูเก็ต) มะห่อย (กำแพงแสน) มะร้อยรู และ มะนอย เป็นต้น มะระขี้นกเป็นไม้เถาไม้เลื้อย ใบเดี่ยวสีเขียว เป็นรูปฝ่ามือ ผลมีผิวขรุขระ รูปร่างคล้ายกระสวยสั้น ผลแก่มีเหลืองข้างในมีสีแดง เมล็ดมีเมือกสีแดงหุ้มอยู่ เมล็ดมีความแข็งและผิวขรุขระ (ภาพที่ 2.1–2.3)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะของต้นมะระขี้นก

ภาพที่ 2.2 ลักษณะของดอกมะระขี้นก

ภาพที่ 2.3 ลักษณะของเมล็ดมะระขี้นก

ยอดและผลดิบของมะระขี้นกนอกจากใช้กินส่วนเป็นผักแล้ว ทุกส่วนของมะระขี้นกยังถูกบรรจุไว้ในตำรับยาสมุนไพรหลายตำรับ วุฒิ วุฒิธรรมเวช (2540) ได้บรรยายสรรพคุณของมะระขี้นกไว้หลายอย่าง เช่น

ใบ - ใช้แก้ท่อน้ำดีอักเสบ เจริญอาหาร แก้ไข้ตัวร้อน ดับพิษร้อน แก้ปากเปื่อย แก้ตับม้ามพิการ แก้อักเสบ

ดอก - ใช้แก้หอบหืด

ผล - ใช้บำรุงน้ำดี เจริญอาหาร บำรุงร่างกาย บำรุงโลหิตระดู แก้ตับม้ามอักเสบ แก้พิษฝี แก้เจ็บปวดอักเสบจากพิษต่างๆ ขับพยาธิ เป็นยาระบายอ่อนๆ แก้ปากเปื่อย แก้เบาหวาน ทำให้แท้งได้

ผลสุก - เป็นพิษ ทำให้อาเจียนและท้องร่วง

เมล็ด - ขับพยาธิตัวกลม

ราก - แก้ไข้ แก้ริดสีดวงทวาร แก้แผลอักเสบ บำรุงธาตุ สมานแผล

ใบและราก – แก้โรคเบาหวาน

ในแต่ละส่วนของมะระขี้นกมีสารทุติยภูมิหลายชนิด ดังนี้ (ปัทมา สุนทรศารทูล, 2541)

ทั้งต้น - มีสาร alkaloids, saponnins และ sterols ชื่อ charantin

เมล็ด - มีสารประเภทโปรตีนหลายชนิด ได้แก่

mAP30 (30 kDa)

momordin (24 kDa)

momordica charantia agglutinin (32 kDa)

momordica charantia inhibitor (23 kDa)

momordica charantia lectin (115 kDa)

momordica charantia cytostatic factor (40 kDa)

α-momorcharin (32 kDa)
β-momorcharin (29 kDa)
p-insulin (11 kDa)
amino acid เช่น a-aminobutyric acid
triterpense ได้แก่ momordicoside A-E, vicine

ผล มี alkaloids, saponins, amino acid (citrulline, 5-hydroxytryptamine), sterols ( charantin, β- stisterol, stigmasterol, acylgucosterols) , triterpenes ( cucurbitacin glycosides, momordicoside F1, F2, G, I, K และ L), polypeptide (p-insulin) มีปริมาณวิตามินซี วิตามินเอ ธาตุฟอสฟอรัส และธาตุเหล็กในปริมาณ

ใบ มีสารพวก triterpenes ได้แก่ momordicine, momordicine I, II และ cucurbitan

ราก มี alkaloids และ saponins

<u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะระขี้นก</u>

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะระขี้นกบนอาหารแข็งสูตร MS โดยใช้ชนิดฮอร์โมนในความเข้มข้นต่างๆ ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2, 4–D และ NAA กลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ kinetin และ BA และ GA ผลการทดลองพบว่า NAA 1 μg/ml สามารถทำให้เนื้อเยื่อมะระขี้นกไทยเจริญได้ดีที่สุด (พรรณพิไล แซ่โง้ว และคณะ, 2524) ชาลี ทองเรือง (2543) ได้ชักนำให้เกิดรากจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรากของมะระขี้นกบนอาหาร Gamborg’B5 ที่มี 2, 4–D 1 mg/l kinetin 0.2 mg/l GA3 0.1 mg/l และมีน้ำตาลทราย 30 g/l จากการศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นก โดยการเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS พบว่าอาหารที่เติม NAA 0.1 mg/l เหมาะต่อการเจริญเป็นต้นอ่อน และอาหารที่เติม NAA 0.1 mg/l และ BA 1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี และพบว่าเมล็ดมะระขี้นกไม่สามารถเจริญได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA 1 mg/l เพียงอย่างเดียว (ชลระวี อัมรานนท์, 2545)

Thiruvengadam *et al*. (2006) พบว่าเมื่อนำใบของมะระขี้มาทำการเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมฮอร์โมน 2, 4 –D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใบสามารถเจริญเป็นแคลลัสเกาะกันอย่างหลวมๆ เมื่อย้ายแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมฮอร์โมน 2, 4 –D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเจริญของเอมบริโอในระยะ globular 24.6% เมื่อย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติมฮอร์โมน 2, 4 –D พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็น heart stages และ torpedo stages ได้ นอกจากนั้นยังได้ศึกษาองค์ประกอบอื่นๆที่มีผลต่อการเกิด embryos ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโน โดยอาหารเต็มส่วนของ MS ที่เติม PVP 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ที่เติม glutamine 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เกิด somatic embryos เจริญต่อไปได้มาก

จากการค้นคว้าเอกสารยังไม่พบรายงานการศึกษาการสร้างสารทุติยภูมิในระดับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะระขี้นก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาอิทธิพลของออกซินและไซโตไคนินต่อการเจริญของมะระขี้นก และการสร้างสาร RIPs ของมะระขี้นก โดยเน้นการศึกษาปริมาณการสร้าง RIPs จากเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยง และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชหรือฮอร์โมนพืชเป็น elicitor เพื่อกระตุ้นการเสร้างสาร RIPs ของมะระขี้นก

# บทที่ 3
# การดำเนินการวิจัย ผลการวิจัย และการอภิปรายผลการวิจัย

การดำเนินการวิจัยของโครงการได้แบ่งการดำเนินการวิจัยดังนี้

1. ผลของ 2, 4–D และ BA ต่อการเจริญของมะระขี้นกจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ
2. ผลของ 2, 4–D และ kinetin ต่อการเจริญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบและลำต้นมะระขี้น
3. การเปรียบเทียบโปรตีน RIPs ที่มีในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกและเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. อิทธิพลของ 2, 4-D และไคเนตินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นก และการศึกษาโปรตีน RIPs

## 1. ผลของ 2, 4–D และ BA ต่อการเจริญของมะระขี้นกจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

<u>วัตถุประสงค์</u>

เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของฮอร์โมน ออกซิน ชนิด 2, 4–Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4–D) และ ไซโตไคนิน ชนิด $N^6$-Benzyladenine (BA) ในการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นก

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เตรียมเมล็ดมะระขี้นก (*Momordica charantia* L.)
   - เก็บผลสุกของมะระขี้นกจากจังหวัดอุบลราชธานี
   - แกะผลและล้างเอาเมือกสีแดงที่หุ้มเมล็ดออก นำเมล็ดตากแดดให้แห้ง ใส่ขวดและปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อทำการทดลองต่อไป
2. เตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งหมด 16 สูตร (ตารางที่ 3.1.1) ทุกสูตรเติมน้ำตาล 30 g/l, pH 5.6 – 5.8 และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 °C เป็นเวลา 20 นาที
3. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดมะระขี้นก โดยฆ่าเชื้อเมล็ดมะระขี้นกที่มีเปลือกแข็งหุ้มใน ethyl alcohol 95% นาน 3 นาที หลังจากนั้นแช่ใน Clorox 10% ที่เติม Tween 20 2-3 หยด นาน 30 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดที่ผ่านการเชื้อแล้วมาแกะเปลือกแข็งหุ้มเมล็ดออกและเลี้ยงบนอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร ที่ความเข้มแสง 2,000-3,000 ลักซ์ โดยเลี้ยง 4 เมล็ด / 1ขวด สูตรละ 3 ซ้ำ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ วัดการเจริญของมะระขี้นก โดยวัดเปอร์เซ็นการงอก เปอร์เซ็นการเกิดยอด การเกิดราก และการเกิดแคลลัส

ตารางที่ 3.1.1 สูตรอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ

| สูตรที่ | 2, 4–D ppm | BA ppm |
|---|---|---|
| 1* | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0.1 |
| 3 | 0 | 1 |
| 4 | 0 | 2 |
| 5 | 0.1 | 0 |
| 6 | 0.1 | 0.1 |
| 7 | 0.1 | 1 |
| 8 | 0.1 | 2 |
| 9 | 1 | 0 |
| 10 | 1 | 0.1 |
| 11 | 1 | 1 |
| 12 | 1 | 2 |
| 13 | 2 | 0 |
| 14 | 2 | 0.1 |
| 15 | 2 | 1 |
| 16 | 2 | 2 |

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

การเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดมะระขี้นกในอาหาร MS ที่มีคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ 16 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้ผลตารางที่ 3.2 ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงสุด (58.33%) ในอาหารสูตรที่ 11 ซึ่งมีอัตราส่วน 2, 4–D : BA เท่ากับ 1 : 1 ppm ส่วนเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นยอดสูงสุด (29.17%) พบในอาหารสูตรที่ 8 (ภาพที่ 3.1.5) ซึ่งมีอัตราส่วน 2, 4–D : BA เท่ากับ 0.1 : 2 ppm ซึ่งลักษณะของยอดเป็นแบบ multiple shoot และมีการพัฒนาเป็นแคลลัสด้วย รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 4 (2, 4–D : BA เท่ากับ 0 : 2 ppm) สำหรับสูตรอาหารสูตรที่ 5 (ภาพที่ 3.1.1) ที่มีอัตราส่วน 2, 4–D : BA เท่ากับ 0.1 : 0 ppm ชักนำให้เจริญเป็นรากได้ดีที่สุด (45.83%) ส่วนสูตรที่ให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นรากรองลงมาคือสูตรที่ 1 (ภาพที่ 3.1.1) ซึ่งเป็นชุดควบคุม ให้เปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นราก 27.08% การพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดพบได้ในหลายสูตร ได้แก่ สูตรที่ 4, 7, 8, 12, 15 และ 16 (ภาพที่ 3.1.6) ซึ่งมีอัตราส่วนของ 2, 4–D : BA เท่ากับ 0 : 2, 0.1 : 1, 0.1 : 2, 1 : 2, 2 : 1 และ 2 : 2 ppm ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1.2 ผลของ 2, 4–D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อเมล็ดมะระขี้นก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

| อาหารสูตรที่ | อัตราส่วน 2, 4–D : BA (ppm) | % การงอกของเมล็ด | % ต่อจำนวนต้นที่งอกในการเจริญเป็น | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | ยอด | ราก | แคลลัส |
| 1 | 0 : 0 | 41.67 | 10.42 | 27.08 | 0.00 |
| 2 | 0 : 0.1 | 33.33 | 8.33 | 20.83 | 8.33 |
| 3 | 0 : 1.0 | 25.00 | 6.25 | 0.00 | 12.50 |
| 4 | 0 : 2.0 | 8.33 | 25.00 | 0. 00 | **25.00**[4] |
| 5 | 0.1 : 0 | 50.00 | 12.50 | **45.83**[3] | 0.00 |
| 6 | 0.1 : 0.1 | 41.67 | 10.42 | 12.50 | 0.00 |
| 7 | 0.1 : 1.0 | 41.67 | 12.50 | 0.00 | 22.92 |
| 8 | 0.1 : 2.0 | 33.33 | **29.17**[2] | 2.08 | **25.00**[4] |
| 9 | 1.0 : 0 | 8.33 | 6.25 | 12.50 | 0.00 |
| 10 | 1.0 : 0.1 | 8.33 | 6.25 | 18.75 | 12.50 |
| 11 | 1.0 : 1.0 | **58.33**[1] | 14.58 | 20.83 | 20.83 |
| 12 | 1.0 : 2.0 | 50.00 | 10.42 | 6.25 | 22.92 |
| 13 | 2.0 : 0 | 33.33 | 8.33 | 20.83 | 0.00 |
| 14 | 2.0 : 0.1 | 8.33 | 8.33 | 20.83 | 14.58 |
| 15 | 2.0 : 1.0 | 50.00 | 12.50 | 25.00 | **25.00**[4] |
| 16 | 2.0 : 2.0 | 25.00 | 6.25 | 0.00 | **25.00**[4] |

หมายเหตุ [1] % การงอกของเมล็ดสูงที่สุด [2] % เจริญเป็นยอดสูงที่สุด
[3] % เจริญเป็นรากสูงที่สุด [4] % เจริญเป็นแคลลัสสูงที่สุด

จากการทดลองจะเห็นว่า เปอร์เซ็นต์ในการเจริญเป็นยอดได้สูงในอาหารที่มีอัตราส่วนของ 2, 4–D ต่ำ BA สูง เปอร์เซ็นต์ในการเจริญเป็นรากจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีอัตราส่วนของ 2, 4–D ต่ำ (0-0.1 ppm) ส่วนการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นกไปเป็นแคลลัสได้ดีนั้นต้องมีส่วนผสมของ BA ด้วย จากตารางที่ 3.1.2 จะเห็นได้ว่าสูตรที่ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงได้แก่สูตรที่ 4, 7, 8, 12, 15 และ 16 ซึ่งเป็นสูตรที่มีปริมาณ BA สูง แม้ว่าจะมีหรือไม่มี 2, 4–D ก็ตามก็สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ส่วนเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดนั้นยังอยู่ในระดับปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ ชลระวี อัมรานนท์ (2545) พบว่ามีความแตกต่างกันอยู่บ้าง โดยการทดลองของ ชลระวีซึ่งใช้ฮอร์โมน NAA : BA พบว่า NAA 0.1 ppm เพียงอย่างเดียว มีผลในการชักนำให้เกิดเป็นต้นมากที่สุด และอัตราส่วนของ NAA : BA ที่ใช้และชักนำให้เกิดรากมีปริมาณ BA แตกต่างกันด้วย และจากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าปริมาณ BA สูงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีซึ่งคล้ายกับผลการทดลองในพืชอื่นๆ เช่น สัปปะ

รดสี (สิทธิศักดิ์ ไทยจรรยา, 2536) มะลิลา (กาญจนา กิระศักดิ์, 2540) และ ส้มเขียวหวานกับส้มโชกุน (จารุวรรณ จาติเสถียร, 2544)

ข้อเสนอแนะสำหรับการทดลองต่อไปคือ การเลี้ยงส่วนต่างๆ เช่น ใบ ยอด ลำต้น และราก ของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเลี้ยงในอาหารทั้ง 16 สูตรนี้ เพื่อทดลองว่าให้ผลการทดลองเหมือนกับการเลี้ยงด้วยเมล็ดหรือไม่ และอาจจะมีการปรับปรุงสูตรอาหารโดยการเติมน้ำมะพร้าว น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ หรืออาหารเสริมอื่นๆ เพื่อศึกษาการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นกในอาหารเสริมที่ต่างกัน ในการทดลองนี้อาจนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญทางยาในมะระขี้นกได้ เพราะฮอร์โมนพืชนับว่าเป็นสาร elicitor เช่นกัน

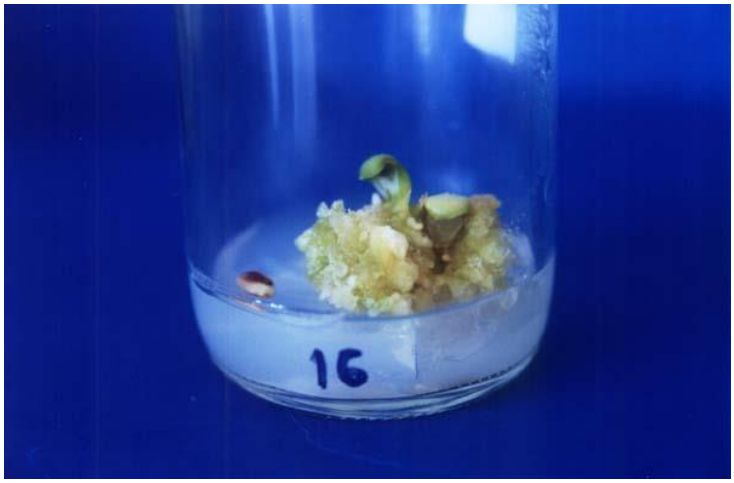
ภาพที่ 3.1.1 เจริญของการเนื้อเยื่อมะระขี้นกในอาหาร MS สูตรที่ 1–4 เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพที่ 3.1.2 การเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นกในอาหาร MS สูตรที่ 5–8 เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพที่ 3.1.3 การเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นกในอาหาร MS สูตรที่ 9 – 12 เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพที่ 3.1.4 การเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นกในอาหาร MS สูตรที่ 13–16 เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพที่ 3.1.5 การเจริญเป็นแคลลัส multiple shoot ในอาหารสูตรที่ 8 เป็นเวลา 4 สัปดาห์




ภาพที่ 3.1.6 การเจริญเป็นแคลลัสในอาหารสูตรที่ 16 เป็นเวลา 4 สัปดาห์

**2. ผลของ 2, 4–D และ kinetin ต่อการเจริญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบและลำต้นมะระขี้นก**

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอิทธิพลของคู่ฮอร์โมน 2, 4–Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4–D) และ kinetin ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อใบและลำต้นมะระขี้นกจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างพืช : เมล็ดมะระขี้นก (*Momordica charantia* L.) ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 -10 องศาเซลเซียส
2. การเพาะเมล็ดมะระขี้นกในสภาพปลอดเชื้อ
   2.1 นำเมล็ดมะระขี้นกที่มีเปลือกหุ้มแข็งนำมาแช่ใน เอธิลแอลกอฮอล์ 95 % นาน 1 นาที
   2.2 แช่เมล็ดใน Clorox 10% ที่เติม Tween 20 2-3 หยด เป็นเวลา 20 นาที โดยทำการเขย่าตลอดเวลา หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง
   2.3 แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกและเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีน้ำตาล 30 g/l ไม่เติมฮอร์โมน ความเข้มแสง 2,000-3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส (2 เมล็ด/1 ขวด) เป็นเวลา 4 สัปดาห์
3. การศึกษาผลของฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin ต่อการเจริญของมะระขี้นกในสภาพปลอดเชื้อ
   3.1 ใช้อาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1.0 mg/l และ 0, 0.25 และ1.0 mg/l (ตารางที่ 3.2.1)

ตารางที่ 3.2.1 ความเข้มข้นคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin

| **Kinetin (mg/l)** | **2, 4–D (mg/l)** | | |
|---|---|---|---|
| | 0 | 0.1 | 1.0 |
| 0 | DK0 | DK4 | DK8 |
| 0.25 | DK1 | DK5 | DK9 |
| 0.5 | DK2 | DK6 | DK10 |
| 1.0 | DK3 | DK7 | DK11 |

   3.2 นำส่วนของใบและลำต้นของต้นกล้ามะระขี้นกอายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และไคเนติน ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของมะระขี้นก ชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองโดยการนำส่วนใบและลำต้นของต้นกล้ามะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า จากตารางที่ 3.2.2 ในอาหารสูตรที่ 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 (2, 4–D:kinetin = 0.1:0.5, 0.1:1.0, 1.0:0, 1.0:0.25, 1.0:0.5 และ 1.0:1.0 mg/l ตามลำดับ) มีการเจริญเป็นแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตรที่ 7, 8 และ10 (2, 4–D:kinetin = 0.1:1.0, 1.0:0 และ 1.0:0.5 mg/l ตามลำดับ) มีการเจริญเป็นราก 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะใหญ่ ผิวขรุขระ มีสีน้ำตาลอ่อน ในสูตรอาหารที่ 11 (2, 4–D:kinetin = 1.0:1.0 mg/l) น้ำหนักสด คือ 426±183.37 mg/ชิ้น ในสูตรอาหารที่ 11 (2, 4–D:kinetin = 1.0:1.0 mg/l) มีค่าน้ำหนักแห้ง คือ 59±12.41 mg/ชิ้น (ภาพที่ 3.2.1)

จากตารางที่ 3.2.3 พบว่า ในสูตรอาหารที่ 5, 7, 8, 9, 10 และ 11 (2, 4–D:kinetin = 0.1:0.25, 0.1:1.0, 1.0:0, 1.0:0.25, 1.0:0.5 และ 1.0:1.0 mg/l ตามลำดับ) เจริญเป็นแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารสูตรที่ 5, 6 (2, 4–D:kinetin = 0.1:0.25 และ 0.1:0.5 mg/l) มีการเจริญเป็นราก 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะเล็ก ผิวเรียบ มีสีน้ำตาลอ่อน ในสูตรอาหารที่ 5 มีน้ำหนักสด คือ 189±31.53 mg/ชิ้น มีน้ำหนักแห้ง ในสูตรอาหารที่ 5 (2, 4–D:kinetin = 0.1:0.25 mg/l) คือ 27±4 mg/ชิ้น (ภาพที่ 3.2.1)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าในส่วนของใบเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นแคลลัสและรากได้ดีในอาหารที่มีอัตราส่วนของ 2, 4–D สูง พบว่าอาหารสูตรที่มี 2, 4–D เพียงอย่างเดียวก็สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและรากได้ ส่วนลำต้นเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่มีอัตราส่วนของ 2, 4–D สูง แต่เจริญเป็นรากได้ดีในอาหารที่มีอัตราส่วนของ 2, 4–D ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ คณิตา ดวงจันทร์ (2546) มีความแตกต่างกันอยู่บ้าง โดยการทดลองของ คณิตา ดวงจันทร์ ซึ่งใช้ฮอร์โมน 2, 4–D และ BA พบว่าอาหารสูตรที่มี BA เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด และจากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า ในส่วนของใบสามารถเจริญเป็นแคลลัสและรากได้ดี ในอาหารที่มีอัตราส่วนของ 2, 4–D สูง และในลำต้นการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารที่มีอัตราส่วนของ 2, 4–D สูง แต่เจริญเป็นรากได้ดีในอาหารที่มีอัตราส่วนของ 2, 4–D ต่ำ

ตารางที่ 3.2.2 การเจริญของชิ้นส่วนของใบมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4–D และ kinetinความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

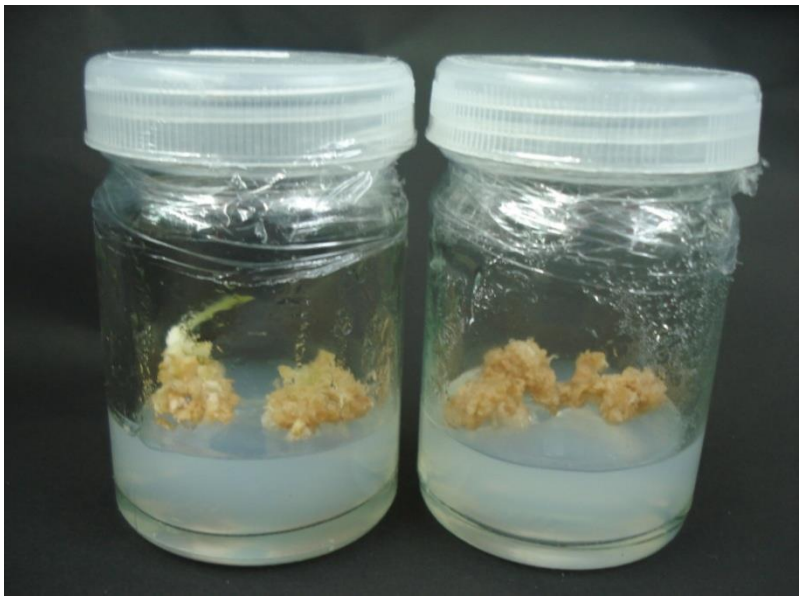
| Treatment | อัตราส่วน 2, 4–D:kinetin (mg/l) | การเจริญของส่วนใบมะระขี้นก | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % การเจริญเป็นแคลลัส | %การเจริญเป็นราก | น้ำหนักสด | น้ำหนักแห้ง |
| DK0 | 0:0 | 0 | 0 | - | - |
| DK1 | 0:0.25 | 0 | 0 | 44±6.63* | 5 |
| DK2 | 0:0.5 | 0 | 0 | 33±5.09 | 5 |
| DK3 | 0:1.0 | 0 | 0 | 37±6.78 | 8±2.45 |
| DK4 | 0.1:0 | 0 | 0 | 54±24.16 | 7±2.45 |
| DK5 | 0.1:0.25 | 30±24.49 | 20±40 | 157±130.10 | 17±11.66 |
| DK6 | 0.1:0.5 | 100 | 20±40 | 141± 68.07 | 21±14.63 |
| DK7 | 0.1:1.0 | 100 | 100 | 406±107.30 | 38±10.29 |
| DK8 | 1.0:0 | 100 | 100 | 404±151.04 | 46±15.30 |
| DK9 | 1.0:0.25 | 100 | 80±24.49 | 373±11.78 | 34±15.62 |
| DK10 | 1.0:0.5 | 100 | 100 | 329±50.54 | 41±6.63 |
| DK11 | 1.0:1.0 | 100 | 80±40 | 426±183.37 | 59±12.41 |

**หมายเหตุ** * ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

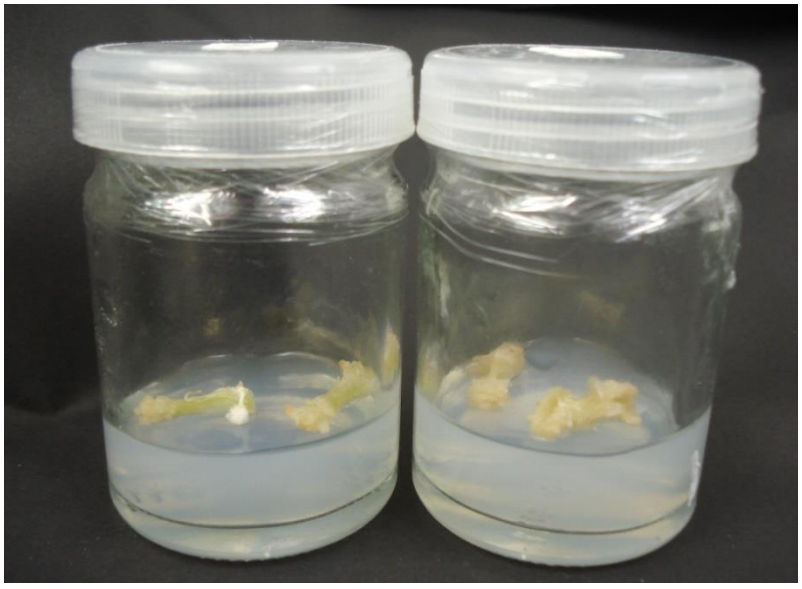
ตารางที่ 3.2.3 การเจริญของชิ้นส่วนของลำต้นมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4–D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

| treatment | อัตราส่วน 2, 4–D:kinetin (mg/l) | การเจริญของส่วนลำต้นมะระขี้นก | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % การเจริญเป็นแคลลัส | %การเจริญเป็นราก | น้ำหนักสด | น้ำหนักแห้ง |
| DK0 | 0:0 | 0 | 0 | - | - |
| DK1 | 0:0.25 | 0 | 0 | 27±2.45* | 5 |
| DK2 | 0:0.5 | 0 | 10±20 | 47±17.77 | 6±2 |
| DK3 | 0:1.0 | 0 | 0 | 31±7.35 | 6±2 |
| DK4 | 0.1:0 | 50 | 80±40 | 138±31.08 | 17±2.45 |
| DK5 | 0.1:0.25 | 100 | 100 | 189±31.53 | 27±4 |
| DK6 | 0.1:0.5 | 50 | 100 | 118±12.88 | 17±2.45 |
| DK7 | 0.1:1.0 | 100 | 60±48.99 | 129±20.59 | 19±3.74 |
| DK8 | 1.0:0 | 100 | 0 | 117±21.12 | 16±2 |
| DK9 | 1.0:0.25 | 100 | 0 | 174±35.69 | 19±3.74 |
| DK10 | 1.0:0.5 | 100 | 0 | 154±13.19 | 18±2.45 |
| DK11 | 1.0:1.0 | 100 | 0 | 116±13.93 | 15 |

**หมายเหตุ** * ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)



ภาพที่ 3.2.1 การเจริญเป็นแคลลัสและรากจากส่วนของใบในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin อัตราส่วน 1.0:1.0 mg/l (DK11)



ภาพที่ 3.2.2 การเจริญเป็นแคลลัสและรากจากส่วนของลำต้นในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin อัตราส่วน 0.1:0.25 mg/l (DK5)

**3. การเปรียบเทียบโปรตีน RIPs ที่มีในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกและเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

<u>วัตถุประสงค์</u>

เพื่อเปรียบเทียบโปรตีน RIPs ที่มีในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกและเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ขั้นตอนการสกัดโปรตีน

ตัวย่างสดของใบ ราก ลำต้น และเมล็ด

1. บดตัวอย่างด้วยโกร่งบดสาร
2. เติม20 mM Tris-HCl pH 8.0
3. กวน 2 ชม. ที่ 4 องศาเซลเซียส
4. กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น เก็บสารละลาย
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 45 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
6. กรองผ่าน nitrocellulose membrane 0.45 ไมโครเมตร ได้สารละลายโปรตีนสีเหลืองใส

2. ขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีนโดย Lowry-folin Method

หลักการ

Lowry method หรือ Folin’s Ciocalteau method เป็นวิธีที่ดัดแปลงให้มี sensitivelty เพิ่มขึ้นกว่าวิธี Biuret โดย pretreatment โปรตีนด้วย alkaline copper reagent

ปฏิกิริยาระหว่าง Folin’s reagent (phosphomolybdic–phosphotungstic acid) และโปรตีนจะได้สีน้ำเงินเนื่องจาก Folin’s Ciocalteau reagent ถูกรีดิวซ์โดยหมู่ฟีนอลิก (phenolic group) ของกรดแอมิโนไทโรซีน (tyrosine) และทริปโตเฟน (tryptophan) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration on curve)

Lowry method เป็นวิธีหนึ่งที่มีการนำมาใช้มากในทางชีวเคมี ใช้ในการวิเคราะห์หาโปรตีนปริมาณน้อยๆ 2-100 ไมโครกรัมต่อ ลบ.ซม. เนื่องจากมีความไว (sensitive) กว่าวิธี Biuret ประมาณ 50-100 เท่า และไม่มีปัญหาเนื่องจากความขุ่นของตัวอย่าง ในทางอาหารใช้วิธีนี้ไม่กว้างขวาง เพราะการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน โปรตีนต่างชนิดในปริมาณเท่ากันอาจให้ความเข้มของสีไม่เท่ากัน

สารเคมี

1. สารละลาย A : 2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate : $Na_2CO_3$) ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดร็อกไซด์ (NaOH)
2. สารละลาย B : 0.5 เปอร์เซ็นต์ คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate : $CuSO_4.5H_2O$) ใน 1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate : $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$)
3. สารละลาย C : 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
4. สารละลาย D : 4% (w/v) โซเดียมไบคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$)
5. สารละลาย E : (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง) ได้จากสารละลาย C 49 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย D 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A และ B อย่างละ 1 มิลลิลิตร
6. สารละลาย F : Folin-ciocalteau reagent

วิธีการเตรียมสารละลาย

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C 49 ml กับสารละลาย D 49 ml จากนั้นเติมสารละลาย A 1ml และสารละลาย B 1ml สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง
2. เจือจาง Folin-Ciocalteu ในอัตรา 1 : 1 ด้วยน้ำกลั่นเป็นสารละลาย F

การเตรียม standard curve โดยใช้สาละลาย BSA เข้มข้น 2.0 mg/ml.

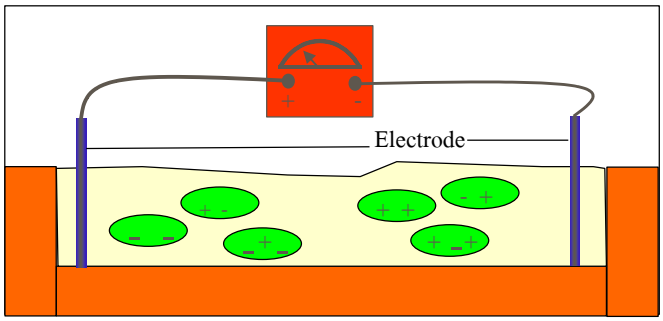
1. เจือจางให้สารละลาย BSA เข้มข้นระหว่าง 0.05 – 0.5 µg/ml
2. ปิเปตสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้นมาความเข้มข้นละ 0.5 µl เติมสารละลาย E 2.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 10 นาที ส่วน Blank ให้เติมน้ำกลั่น 0.5 µl แทน BSA
3. เติมสารละลาย F 0.25 µl เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 30 นาที
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm นำค่าที่ได้ไป plot กราฟโดยให้ค่าดูดกลืนแสงเป็นแกน Y ส่วนความเข้มข้นเป็นแกน X

การเตรียมตัวอย่าง

1. เจือจางสารละลายโปรตีนที่ได้ให้มีความเข้มข้นเหมาะสม
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง แต่ละความเข้มข้นมาความเข้มข้นละ 0.5 µl เติมสารละลาย E 2.5 ml. เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 10 นาที ส่วน Blank ให้เติมน้ำกลั่น0.5 µl แทนสารละลายตัวอย่าง
3. เติมสารละลาย F 0.25 µl เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 30 นาที
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

3. ขั้นตอนการศึกษาขนาดของโปรตีนโดย Acrylamide gel electrophoresis

คำว่า Electrophoresis หมายถึงการเคลื่อนที่ของสารที่มีขั้ว (ไม่ว่าจะเป็น solutes หรือ particles) ใน support medium ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า



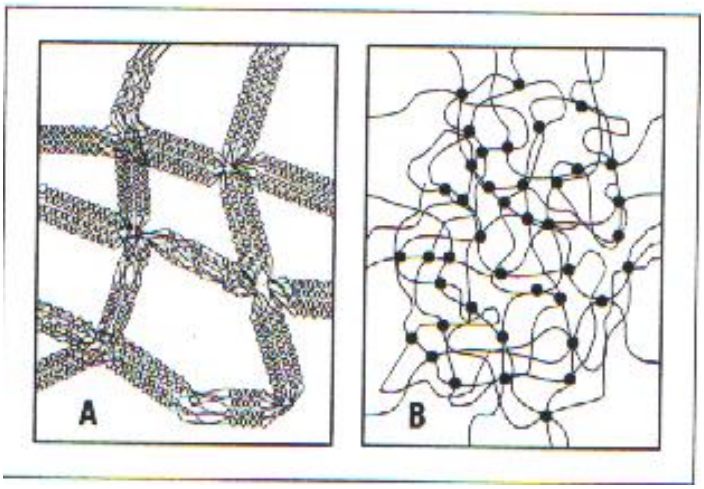

ภาพที่ 3.3.1 Electrophoresis

( ที่มา : http://www.cofc.edu/~delliss/virtuallabbook/AcrylGelElect/AcrylGel2.html)

Polyacrylamide

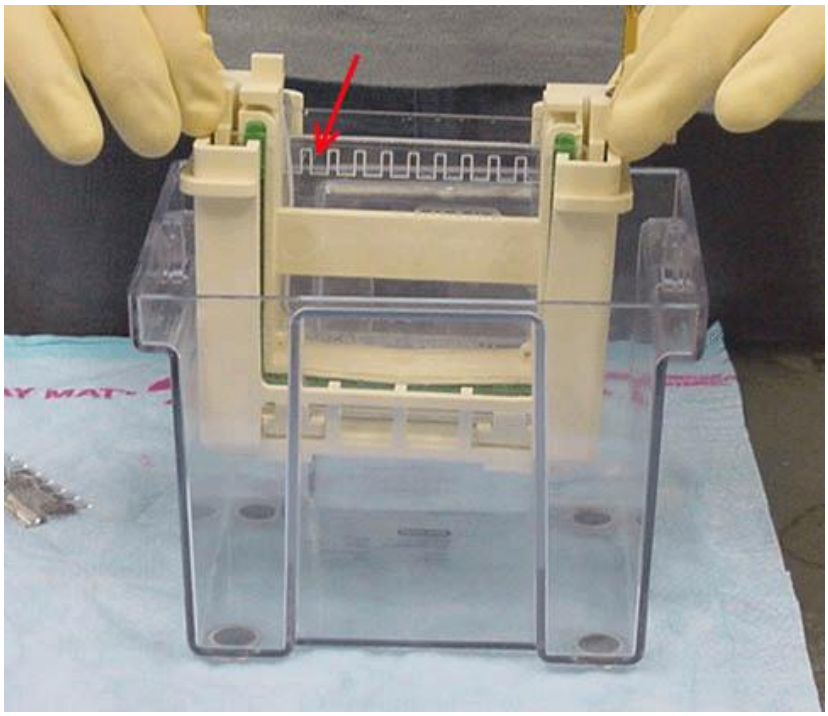
Polyacrylamide คือ polymer ของ acrylamide ตัวเจลของ polyacrylamide มีคุณสมบัติทนความร้อน (thermostable) โปร่งแสง แข็งแรง และค่อนข้างที่จะเฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้ gel ชนิดนี้ไม่มีขั้ว จึงไม่ทำให้เกิด ‘eletroendosmosis’ และสามารถเตรียมให้มี pore size ขนาดต่างๆ ได้ polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 7.5% จะมีขนาดของ pore size พอๆ กับของ agarose gel คือประมาณ 5 nm ซึ่งใหญ่พอ ที่จะให้โปรตีนเกือบทั้งหมดใน serum ผ่านได้โดยไม่ถูกขัดขวาง อย่างไรก็ตาม โปรตีนที่มีขนาดเส้นผ่า ศูนย์กลางหรือความยาวเกินกว่านี้จะถูกต้านไว้ ดังนั้นโปรตีนจะถูกแยกโดยอาศัยทั้งขนาดและประจุต่อมวล (charge to mass ratio) เรียกลักษณะแบบนี้ว่า “Molecular sieving” acrylamide เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) จึงควรระมัดระวัง เป็นพิเศษขณะทำการเตรียมเจล

Polyacrylamide สามารถใช้ในการแยก DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน ได้น้อยสุดถึง 0.2% ของความยาว (1 bp ใน 500 bp) นอกจากนี้ DNA ที่ได้จากการแยกด้วย polyacrylamide gel ยังมีความบริสุทธิ์ไม่มีส่วนของ enzyme inhibitor ปนเปื้อนด้วย จึงนิยมใช้ เจลชนิดนี้ในการแยก DNA




**A. Agarose gel  B. Polyacrylamide gel**

ภาพที่ 3.3.2 โครงสร้างโมเลกุลของ agarose gel เปรียบเทียบกับ polyacrylamide gel
( ที่มา : http://www.cofc.edu/~delliss/virtuallabbook/AcrylGelElect/AcrylGel2.html)



ภาพที่ 3.3.3 อุปกรณ์สำหรับแยกโปรตีนบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มี SDS เป็นองค์ประกอบ
(ลูกศรสีแดงในภาพ แสดงความจุของช่องสำหรับใส่ตัวอย่างบนเจลพอลิอะคริลาไมด์)
(ที่มา:http://www.cofc.edu/~delliss/virtuallabbook/AcrylGelElect/AcrylGel2.html)

วัสดุอุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์ของ Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)
2. เครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้า (Power supplies)
3. eppendorp
4. autopipette
5. vertexer
6. heat block/water bath
7. ice block
8. shaker

สารเคมี

1. 30% Acrylamide gel (w/v)
2. 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (separating gel buffer)
3. 1 M Tris-HCl pH 6.8 (stacking gel buffer )
4. 10% SDS
5. 10% Ammonium persulfate
6. 2X SDS gel loading buffer
7. 5X Tris-glycine (SDS-page running buffer)
8. 0.25% Coomassie staining solution
9. Destaining solution
10. TEMED

การเตรียม Gel

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจก แผ่นกั้นกระจกและหวี ด้วยน้ำสบู่ ล้างให้สะอาดด้วยน้ำเปล่า และเช็ดด้วย 70%Ethylalcohol ใช้กระดาษเช็ดให้แห้ง
2. ประกอบกระจกเข้ากับ chamber ทดสอบการรั่ว เมื่อไม่รั่วแล้วจึงเตรียม 12% separating gel ซึ่งประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| - 30% Acrylamide ge | 4.0 ml |
| - น้ำกลั่นปลอดเชื้อ | 3.3 ml |
| - 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 | 2.5 ml |
| - 10% SDS | 0.1 ml |
| - 10% Ammonium persulfate | 0.1 ml |
| - TEMED | 5.0 µl |

   ผสมกันอย่าให้มีฟองอากาศ
3. เท 12% separating gel ในช่องว่างระหว่างกระจกให้ห่างจากขอบล่างของหวี 1.5 cm รอให้เจลแข็ง

4. เตรียม stacking gel ซึ่งประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| - 30% Acrylamide gel | 0.83 ml |
| - น้ำกลั่นปลอดเชื้อ | 3.4 ml |
| - 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 | 0.63 ml |
| - 10% SDS | 0.05 ml |
| - 10% Ammonium persulfate | 0.05 ml |
| - TEMED | 5.0 µl |

ผสมกันอย่าให้มีฟองอากาศ

5. เท stacking gel บน separating gel
6. ใส่หวีลงไปรอเจลแข็ง จากนั้นดึงหวีออก ล้างหลุมเจลด้วย running buffer

การเตรียมตัวอย่างและแยกตัวอย่าง

1. ผสม 2X SDS gel loading buffer กับตัวอย่างในอัตรา 1: 1 ใน eppendorp
2. vertexer
3. ต้มให้เดือดด้วย heat block/water bath นาน 3 นาที จากนั้นแช่ใน ice block ทันที
4. แช่ chamber ลงในเครื่องเติม 1X SDS-page running buffer
5. หยอดตัวอย่างลงในหลุม ปิดฝา ต่อกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ปรับ current ไม่เกิน 45 และ voltage ไม่เกิน 225 โวลต์
6. รอจนกระทั่งแบนสีน้ำเงินเคลื่อนที่ไปประมาณ ¾ ของเจล ปิดเครื่อง นำเจลไปย้อมสี

การย้อมสี

1. ใส่เจลในภาชนะเติม 0.25% Coomassie staining solution เขย่าด้วย shaker ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง
2. ล้างสีส่วนเกินด้วย Destaining solution เขย่าด้วย shaker ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน (overnight)
3. เก็บเจลโดยทำให้แห้งโดยตรึงด้วยแผ่นเซลโลเฟน ทิ้งไว้ให้แห้ง

ตารางที่ 3.3.1 แสดงชนิดของสีย้อมโปรตีน และความไว

| Stain | Detection limit | Comment |
|---|---|---|
| Ponceau S | 1– 2 mg | reversible |
| Amido Black | 1– 2 mg | permanent; low background |
| Coomassie Blue | 1.5 mg | permanent; high background |
| India Ink | 100 ng | permanent |
| Silver stain | 10 ng | permanent |
| Colloidal gold | 3 ng | permanent |

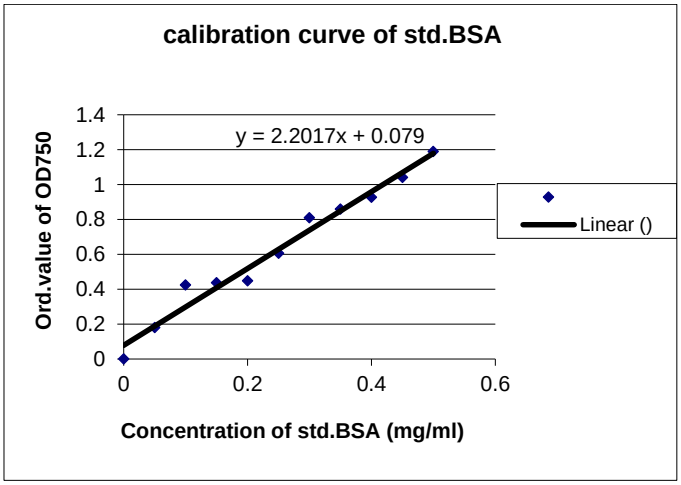
**ที่มา :** http://www.cofc.edu/~delliss/virtuallabbook/AcrylGelElect/AcrylGel2.html

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่าง

ตารางที่ 3.3.2 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm กับความเข้มข้นของ Standard BSA เข้มข้น 0.05-0.5 mg/ml

| Concentration of std.BSA ( mg/ml ) | Absorbance 750 |
|---|---|
| 0 | 0.0001 |
| 0.05 | 0.1805 |
| 0.10 | 0.4242 |
| 0.15 | 0.4366 |
| 0.20 | 0.4486 |
| 0.25 | 0.6056 |
| 0.30 | 0.8105 |
| 0.35 | 0.8601 |
| 0.40 | 0.9277 |
| 0.45 | 1.0403 |
| 0.50 | 1.1902 |




ภาพที่ 3.3.4 กราฟมาตรฐานของ BSA

ตารางที่ 3.3.3 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm และปริมาณโปรตีนที่พบในตัวอย่างมะระขี้นกในส่วนต่างๆ

| ตัวอย่างมะระขี้นก | ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 (nm) | | ปริมาณโปรตีน (mg/ml) | | ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | มะระขี้นกสวน | มะระขี้นกบ้าน | มะระขี้นกสวน | มะระขี้นกบ้าน | มะระขี้นกสวน | มะระขี้นกบ้าน |
| สารสกัดโปรตีนใบมะระขี้นก | 0.6476 | 0.5127 | 2.5825 | 1.9698 | 2.140 | 1.350 |
| สารสกัดโปรตีนลำต้นมะระขี้นก | 0.4905 | 0.5144 | 1.8690 | 1.9776 | 2.136 | 2.570 |
| สารสกัดโปรตีนรากมะระขี้นก | 0.2135 | 0.2923 | 0.6109 | 0.9688 | 0.585 | 0.967 |
| สารสกัดโปรตีนเมล็ดจากผลดิบของมะระขี้นก | 0.7552 | 1.3053 | 3.0713 | 5.5698 | 4.607 | 8.355 |
| สารสกัดโปรตีนเมล็ดจากผลสุกของมะระขี้นก | 1.5030 | 1.8143 | 6.4677 | 7.8816 | 9.702 | 11.822 |
| โปรตีนเมล็ดมะระขี้นก | 0.4037 | - | 1.4747 | - | - | - |

ตารางที่ 3.3.4 ปริมาณโปรตีนจากส่วนใบ ราก และลำต้นของมะระขี้นก ในการชักนำให้เกิดสารประกอบโปรตีนในอาหาร MS ที่มีการเติมคู่ฮอร์โมน NAA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1,1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

| Treatment | คู่ฮอร์โมน | | ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในชิ้นส่วนใบ (mg/ml) | ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight) |
|---|---|---|---|---|
| | NAA | TDZ | | |
| LTN6 | 2.0 | 1.0 | 19.44 | 19.44 |
| LTN8 | 1.0 | 2.0 | 17.58 | 17.58 |
| RTN2 | 1.0 | 0.1 | 18.08 | 18.08 |
| RTN9 | 2.0 | 0.1 | 12.91 | 12.91 |
| STN3 | 2.0 | 0.1 | 11.07 | 11.07 |
| STN8 | 1.0 | 2.0 | 12.92 | 12.92 |

LTN6 และ LTN8 คือตัวอย่างโปรตีนจากแคลลัสบริเวณใบ

RTN2 และ RTN9 คือตัวอย่างโปรตีนจากแคลลัสบริเณราก

STN3 และ STN8 คือตัวอย่างโปรตีนจากแคลลัสบริเวณลำต้น

ปริมาณโปรตีนจากส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกที่เป็นตัวอย่างสด พบว่าปริมาณโปรตีนส่วนเมล็ดจากผลแก่ของมะระขี้นกบ้านให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือ 11.822 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่างสด (mg/g wet weight) รองลงมาเป็นในส่วนของโปรตีนเมล็ดจากผลแก่มะระขี้นกสวน เมล็ดจากผลดิบมะระขี้นกบ้าน เมล็ดจากผลดิบมะระขี้นกสวน ลำต้นมะระขี้นกบ้าน ใบมะระขี้นกสวน ลำต้นมะระขี้นกสวน ใบมะระขี้นกบ้าน รากมะระขี้นกบ้าน และรากมะระขี้นกสวน มีปริมาณโปรตีนเป็น 9.702, 8.355, 4.607, 2.570, 2.140, 2.136, 1.350, 0.967 และ 0.585 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่างสดตามลำดับ (ตารางที่ 3.3.3 และภาพที่ 3.3.5) พบว่าปริมาณโปรตีนส่วนเมล็ดจากผลดิบ เมล็ดจากผลแก่ ลำต้น และรากของมะระขี้นกบ้านให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่ามะระขี้นกสวน แต่ส่วนใบ มะระขี้นกสวนให้ปริมาณมากกว่ามะระขี้นกบ้าน

การแยกชนิดและตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนโดย Acrylamind Gel Electrophoresis

จากการทดลองนำสารสกัดโปรตีน ในแต่ละตัวอย่างมาแยก ชนิดโปรตีนโดยอาศัยขนาดของโปรตีนที่มีในตัวอย่าง และดูว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด เป็นการประมาณว่าอาจจะมีโปรตีนในกลุ่ม RIPs หรือไม่โดยเทียบจาก Proteins Marker Mix ที่ทราบขนาดโมเลกุลแน่นอน ซึ่งให้ผลดังภาพ

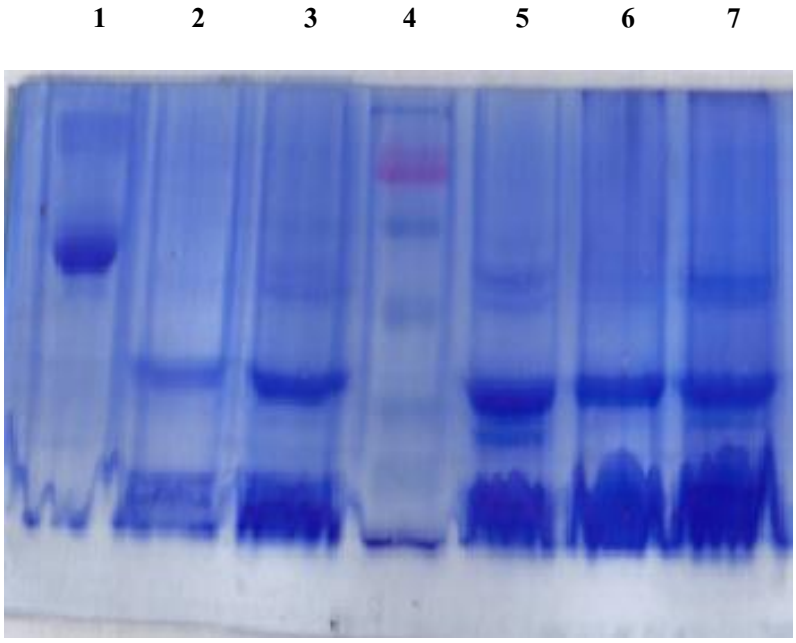
การแยกชนิดและหาขนาดโมเลกุลโปรตีนจากตัวอย่างโดยวิธี Acrylamind gel electrophoresis สารละลายโปรตีนที่สกัดโดย 20 mM Tris–HCl pH 8.0 พบแบนโปรตีนจากตัวอย่างเมล็ดมะระขี้นกที่เป็นเมล็ดจากผลดิบและเมล็ดจากผลสุกของทั้งมะระขี้นกบ้านและสวน โดยในสารสกัดโปรตีนเมล็ดจากผลแก่ของมะระขี้นกบ้านพบแบนที่น่าจะเป็น RIPs โดยเทียบจาก Proteins Marker Mix (ภาพที่ 3.3.9) จากงานวิจัยของ Weena et.al (2000) พบว่า RIPs มีขนาดประมาณ 15 kD (Polypeptide – p), 23 kD, 24 kD, 26-28 kD, 28-32 kD และ 115 kD โดยแบนดังกล่าวมีตำแหน่งใกล้เคียง Carbinic anhydrase ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 31.6 kD

ในส่วนของ ใบ ราก และลำต้น ทั้งของมะระขี้นกบ้านและมะระขี้นกสวน ไม่พบแบนโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น RIPs (ภาพที่ 3.3.6) และในตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ยังไม่ได้ทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นพบแบนจางๆ ในตัวอย่าง (ภาพที่ 3.3.7) แต่เมื่อนำสารสกัดจากส่วนต่างๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนพบแบนชัดเจนขึ้น (ภาพที่ 3.3.8) ในตัวอย่างของส่วนใบในอาหาร TN6 สกัดครั้งที่ 1 ส่วนใบในอาหาร TN8 สกัดครั้งที่ 1 ส่วนลำต้นในอาหาร TN8 สกัดครั้งที่ 3 และส่วนรากในอาหาร TN9 สกัดครั้งที่ 2 แต่ยังไม่ทราบขนาดแน่ชัดเพราะแบนไม่แยกจากันชัดเจน

จะเห็นว่าแบนที่ได้ในเจลรูปภาพที่ 3.3.8 นั้นแยกไม่ชัดเจน และแบนขนาดใหญ่เนื่องจากแบนดังกล่าวมีปริมาณสารอยู่มาก ต้องเจือจางตัวอย่างในความเข้มข้นเหมาะสม ส่วนในตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบนไม่ชัดเจนเนื่องจากมีโปรตีนที่ต้องการในตัวอย่างน้อย ส่วนการวัดโปรตีนจากแบนที่ได้นั้นต้องอาศัยเครื่องมือที่เรียกว่า Densitometer หรือเทียบจากแบนโปรตีนที่ทราบชนิดและความเข้มข้นที่แน่นอน จะสามารถทราบปริมาณโปรตีนในแบนที่เห็นได้

การระบุและจำแนกชนิดของ RIPs นั้น Fong et al. (1996) ได้รายงานไว้ว่าสามารถทำได้โดยวิธี SDS-Polyacrylamind Gel Electrophoresis และนำเจลที่ได้ไป Blotted ลงในแผ่น PVDF

แล้วส่งเจล ดังกล่าวไปทำ N-terminal Amino Acid Squencing ก็สามารถทราบว่าโปรตีนที่ได้เป็นโปรตีนชนิดใด เทคนิคนี้อาจนำมาใช้เพื่อให้ทราบชนิดของ RIPs ของโครงการวิจัยได้ต่อไป




ภาพที่ 3.3.5 ตัวอย่างสารสกัดโปรตีนจากตัวอย่างสดในส่วนเมล็ดและเมล็ดแก่ของมะระขี้นก

เลนส์ที่ 1 คือ BSA (เข้มข้น 0.2 mg/ml)

เลนส์ที่ 2 คือสารสกัดโปรตีนเมล็ดมะระขี้นกสวน

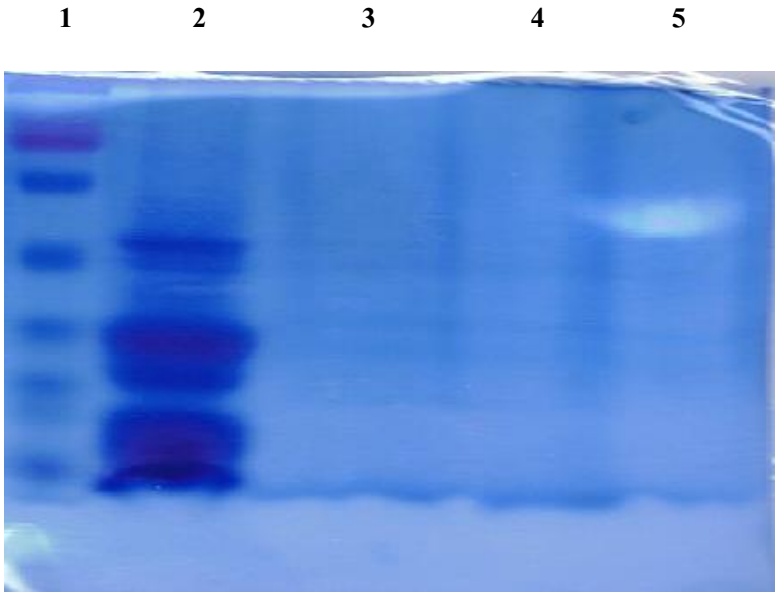
เลนส์ที่ 3 คือ สารสกัดโปรตีนเมล็ดมะระขี้นกบ้าน

เลนส์ที่ 4 คือ Proteins Marker Mix

เลนส์ที่ 5 คือโปรตีนเมล็ดมะระขี้นก

เลนส์ที่ 6 คือ สารสกัดโปรตีนเมล็ด (แก่) มะระขี้นกสวน

เลนส์ที่ 7 คือสารสกัดโปรตีนเมล็ด (แก่) มะระขี้นกบ้าน




ภาพที่ 3.3.6 ตัวอย่างสารสกัดจากตัวอย่างสดในส่วนที่เป็นใบ ราก ลำต้น ของมะระขี้นก

เลนส์ที่ 1 คือ Proteins Marker Mix

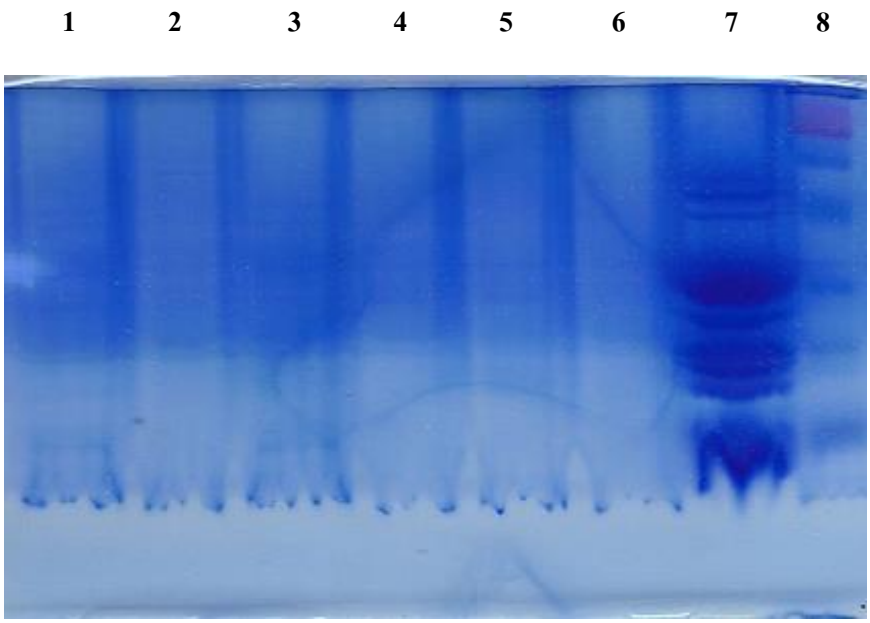
เลนส์ที่ 2 คือโปรตีนเมล็ดมะระขี้นกบ้าน

เลนส์ที่ 3 คือ สารสกัดโปรตีนใบมะระขี้นกบ้าน

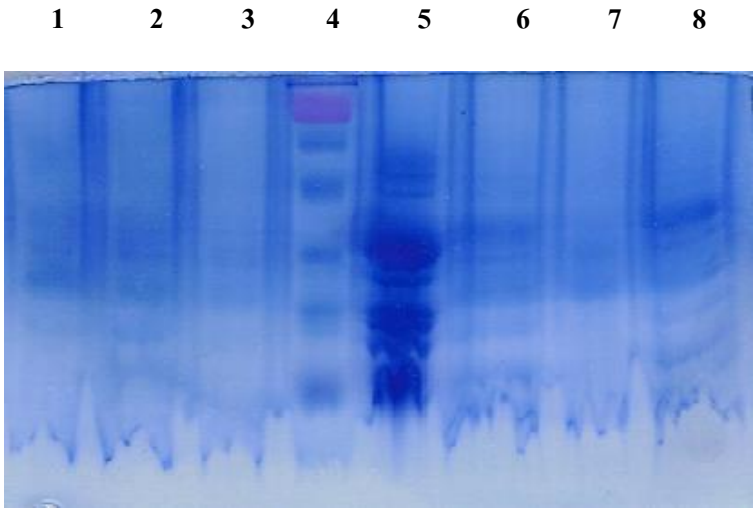
เลนส์ที่ 4 คือ สารสกัดโปรตีนลำต้นมะระขี้นกบ้าน

เลนส์ที่ 5 คือ สารสกัดโปรตีนรากมะระขี้นก

(ในมะระขี้นกสวนและมะระขี้นกบ้านให้ผลเช่นเดียวกัน)




ภาพที่ 3.3.7 ตัวอย่างสารสกัดจากมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน ใบ ราก และลำต้น (ยังไม่นำไปเพิ่มปริมาณโปรตีน)
เลนส์ที่ 1 คือ ส่วนรากในอาหาร TN 9 สกัดครั้งที่ 2
เลนส์ที่ 2 คือ ส่วนรากในอาหาร TN 2 สกัดครั้งที่ 1
เลนส์ที่ 3 คือ ส่วนลำต้นในอาหาร TN 8 สกัดครั้งที่ 3
เลนส์ที่ 4 คือ ส่วนลำต้นในอาหาร TN 3 สกัดครั้งที่ 1
เลนส์ที่ 5 คือ ส่วนใบในอาหาร TN 8 สกัดครั้งที่ 1
เลนส์ที่ 6 คือ ส่วนใบในอาหาร TN 6 สกัดครั้งที่ 1
เลนส์ที่ 7 คือ โปรตีนเมล็ดมะระขี้นก
เลนส์ที่ 8 คือ Proteins Marker Mix




ภาพที่ 3.3.8 ตัวอย่างสารสกัดจากมะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ ราก และลำต้น (ที่มีการนำไปเพิ่มปริมาณโปรตีนโดย Microsep Centrifugal Devices*)

เลนส์ที่ 1 คือ ส่วนใบในอาหาร TN 6 สกัดครั้งที่ 1

เลนส์ที่ 2 คือ ส่วนใบในอาหาร TN 8 สกัดครั้งที่ 1

เลนส์ที่ 3 คือ ส่วนลำต้นในอาหาร TN 3 สกัดครั้งที่ 1

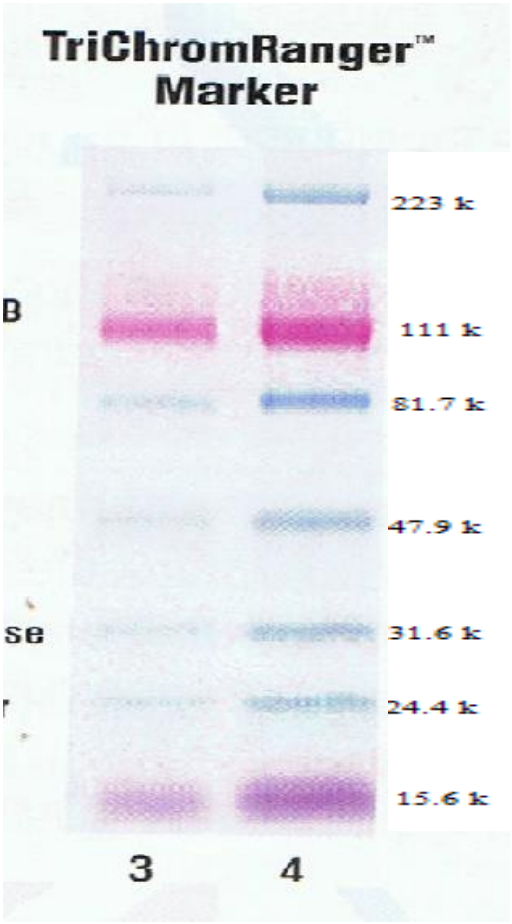
เลนส์ที่ 4 คือ Proteins Marker Mix

เลนส์ที่ 5 คือ โปรตีนเมล็ดมะระขี้นก

เลนส์ที่ 6 คือ ส่วนลำต้นในอาหาร TN 8 สกัดครั้งที่ 3

เลนส์ที่ 7 คือ ส่วนรากในอาหาร TN 2 สกัดครั้งที่ 1

เลนส์ที่ 8 คือ ส่วนรากในอาหาร TN 9 สกัดครั้งที่ 2




ภาพที่ 3.3.9 Proteins Marker Mix ที่หมายเลข 4

แบนที่ 1 Myosin 223 K

แบนที่ 2 Phosphorylase B 111K

แบนที่ 3 BSA 81.7K

แบนที่ 4 Ovalbumin 47.9K

แบนที่ 5 Carbonic anhydrase 31.6K

แบนที่ 6 Trypsin Inhibitor 24.4K

แบนที่ 7 Lysozyme 15.6K

**4. อิทธิพลของ 2, 4-D และ kinetin ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อมะระขี้นก และการศึกษาโปรตีน RIPs**

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนออกซิน (2, 4–Dichlorophenoxyacetic acid ; 2, 4–D) และไคเนติน (kinetin) ต่อการเจริญของส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อศึกษาปริมาณโปรตีน และแยกชนิดของโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น RIPs

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. พืชตัวอย่าง

เมล็ดมะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส

2. การเพาะเมล็ดมะระขี้นก

2.1 ทำการทดลองใน laminar air flow โดยนำเมล็ดมะระขี้นกที่มีเปลือกหุ้มแข็งนำมาแช่alcohol 95% นาน 1 นาที

2.2 นำเมล็ดแช่ Clorox 10% ที่เติม Tween 20 2-3 หยด นาน 20 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

2.3 แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกและเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ความเข้มแสง 2,000-3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (4 เมล็ด /1 ขวด) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3. การศึกษาผลของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่อการเจริญของมะระขี้นกในสภาพปลอดเชื้อ

3.1 ฮอร์โมนที่ใช้คือ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) และ kinetin

3.2 ใช้อาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4-D และ kinetin ความเข้มข้น 0, 0.1, 1.0 และ 0, 0.25, 0.5, 1.0 mg/l (ตารางที่ 3.4.1)

ตารางที่ 3.4.1 ความเข้มข้นคู่ฮอร์โมน 2, 4-D และ kinetin

| **kinetin (mg/l)** | **2, 4–D (mg/l)** | | |
|---|---|---|---|
| | 0 | 0.1 | 1.0 |
| 0 | DK0 | DK4 | DK8 |
| 0.25 | DK1 | DK5 | DK9 |
| 0.5 | DK2 | DK6 | DK10 |
| 1.0 | DK3 | DK7 | DK11 |

3.3 นำส่วนของ ใบ ข้อ และลำต้นของต้นกล้ามะระขี้นกอายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4-D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเข้มแสง 2,000-3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ25˚C แล้วสังเกตการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของมะระขี้นกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.4 ชั่งน้ำหนักสด

3.5 นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

3.6 ชั่งน้ำหนักแห้ง

3.6 เก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

4. การสกัดโปรตีน

4.1 นำแคลลัสที่อบแห้งและเก็บที่ 0 องศาเซลเซียส ใส่ลงใน eppendorf แล้วบดด้วยแท่งพลาสติกให้ละเอียด

4.2 เติม 20 mM Tris-HCl pH 8.0 300 µl บดด้วยแท่งพลาสติกให้ละเอียดอีกครั้ง

4.3 เติม 20 mM Tris-HCl pH 8.0 700 µl

4.4 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.5 ดูดส่วนใสใสลงใน eppendorf ใหม่

4.6 เติม diethyl ether 300 µl

4.7 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.8 ดูดเอาส่วนใสสีเหลืองที่อยู่ใต้ diethyl ether ใส่ลงใน eppendorf ใหม่

4.9 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bio-Rad protein assay

5.1 การเตรียม standard curve โดยใช้สารละลาย BSA เข้มข้น 1 mg/ml

1. เจือจาง dye reagent 1:5 ด้วยน้ำ DI หรือ DW ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
2. เจือจางสารละลาย BSA เข้มข้นระหว่าง 0-0.025 mg/ml
3. เติมโปรตีนตัวอย่าง 20 ml ผสมกับ dye reagent 980 µl บ่ม 5 นาที
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm

6. ขั้นตอนการศึกษาขนาดของโปรตีนโดย acrylamide gel electrophoresis

6.1 การเตรียมตัวอย่างและแยกตัวอย่าง

1. ผสม 2X dye reagent กับตัวอย่างในอัตรา 1:1 ใน eppendorf ผสมส่วนผสมด้วย vortex mixer
2. ต้มให้เดือดด้วย heat block นาน 3 นาที จากนั้นแช่ใน ice block ทันที
3. แช่ chamber ลงในเครื่อง เติม 1X SDS-page running buffer
4. load ตัวอย่างลงใน ลงใน gel ปิดฝา ต่อกับเครื่องจ่ายกระแสไฟ ปรับ current ไม่เกิน 45 และ voltage ไม่เกิน 225 โวลต์
5. รอจนกระทั่งแบนสีน้ำเงินเคลื่อนที่ไปประมาณ ¾ ของเจล ปิดเครื่องนำเจลไปย้อมสี

6.2 การย้อมสี

1. ใส่เจลในภาชนะเติม 0.25 % coomassie staining solution นาน 3 ชั่วโมง
2. ล้างสีส่วนเกินด้วย destaining solution นาน 24 ชั่วโมง
3. เก็บเจลโดยทำให้แห้งโดยตรึงด้วยแผ่น cellophane ทิ้งไว้ให้แห้ง

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. ผลของ 2, 4 – D และ kinetin ต่อการเลี้ยง ใบ ข้อ และลำต้น ของมะระขี้นกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการทดลองโดยการนำส่วนต่างๆ ของต้นกล้ามะระขี้นกที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4-D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า จากตารางที่ 2 ในอาหารสูตรที่ 4 (2, 4-D:kinetin=0:0.5 mg/l) และอาหารสูตรที่ 5 (2, 4–D :kinetin=0.1:0.25 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นราก 12.5±21.65 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารสูตรที่ 10 (2, 4-D:kinetin=1.0:0.5 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ และมีแคลลัสขนาด 0.8±0.23 cm. แคลลัสมีลักษณะใหญ่ ผิวขรุขระ มีสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 3.4.1)

จากตารางที่ 3.4.3 ในอาหารสูตรที่ 1 (2, 4–D:kinetin=0:0.5 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นราก 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ในอาหารสูตรที่ 2 (2, 4-D:kinetin=0:0.25 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นราก 37.5±21.65 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตรที่ 2 (2, 4-D:kinetin=0:0.25 mg/l) ยังมีการเจริญไปเป็นยอด 87.5±21.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลักษณะของยอดเป็นแบบ multiple (ภาพที่ 3.4.2) และในอาหารสูตรที่ 10 (2, 4-D:kinetin=1.0:0.5 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ และมีแคลลัสขนาด 1.35±0.16 cm. แคลลัสมีลักษณะใหญ่ ผิวขรุขระ มีสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 3.4.1)

จากตารางที่ 3.4.4 ในอาหารสูตรที่ 3 (2, 4-D:kinetin=0:0.1 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นราก 25±43.30 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.4.3) และในอาหารสูตรที่ 4 (2, 4-D:kinetin=0.1:0 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ และมีแคลลัสขนาด 1.088±0.15 cm. แคลลัสมีลักษณะใหญ่ ผิวขรุขระ มีสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 3.4.1) เช่นเดียวกับในอาหารสูตรที่ 10

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นรากจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีอัตราส่วนของ 2, 4-D ต่ำ ส่วนเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นยอดนั้น พบว่าจะมีเปอร์เซ็นต์ในการเจริญไปเป็นยอดได้สูงในอาหารที่มีส่วนผสมของ 2, 4-D ต่ำ เช่นเดียวกับการเจริญไปเป็นราก และการเจริญไปเป็นแคลลัสของเนื้อเยื่อมะระขี้นกที่ดีนั้นจะต้องมีปริมาณ 2, 4-D สูง กว่า kinetin จากตารางที่ 3.4.4 แม้ว่าจะมีฮอร์โมน 2, 4-D เพียงอย่างเดียวก็ตามเนื้อเยื่อของมะระขี้นกยังสามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ คณิตา ดวงจันทร์ (2546) พบว่ามีความแตกต่างกันอยู่บ้าง โดยการทดลองของคณิตาซึ่งใช้ฮอร์โมน 2, 4-D และ BA พบว่าอาหารสูตรที่มี BA เพียงอย่างเดียวมีผลชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด และจากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า ปริมาณ 2, 4-D สูงสามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดี และ 2, 4-D ต่ำ สามารถเจริญไปเป็นรากและยอดได้ดี

จากการทดลองโดยการนำชิ้นส่วนของใบ ข้อ และลำต้น มะระขี้นก จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4-D และ kinetin มาหาปริมาณ total protein พบว่าปริมาณ total protein ที่สูงที่สุด คือ 144.660 µg/ g tissues ได้จากแคลลัสจากส่วนของข้อมะระขี้นกในอาหารสูตรที่ 5 (2, 4-D:kinetin=0.1:0.25 mg/l) รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 4 (2, 4-D:kinetin=0.1:0 mg/l) และอาหารสูตรที่ 6 (2, 4-D:kinetin=1.0:0.25 mg/l) ซึ่งได้จากแคลลัสจากส่วนของลำต้นมะระขี้นก มีปริมาณ total protein 121.436 µg/g tissues และ 119.743 µg/g tissues ตามลำดับ และเมื่อนำไปแยกชนิดและตรวจสอบคุณภาพของโปรตีน พบว่า มีแบนที่คาดว่าจะเป็น RIPs (ภาพที่ 3.4.6)

ตารางที่ 3.4.2 การเจริญของชิ้นส่วนของใบมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4 – D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

| Treatment | อัตราส่วน 2, 4–D:kinetin (mg/ l) | % การเจริญของส่วนใบมะระขี้นก | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % การเจริญเป็นยอด | % การเจริญเป็นราก | จำนวนชิ้นที่เกิดแคลลัส | ขนาดแคลลัส/ชิ้น (cm.) |
| DK 1 | 0:0.25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DK 2 | 0:0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DK 3 | 0:1.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DK 4 | 0.1:0 | 0 | **12.5±21.65*** | 0 | 0 |
| DK 5 | 0.1:0.25 | 0 | **12.5±21.65** | 37.5±21.65 | 0.0875±0.01 |
| DK 6 | 0.1:0.5 | 0 | 0 | 87.5±21.65 | 1.375±0.47 |
| DK 7 | 0.1:1.0 | 0 | 0 | 75±25 | 1.0125±0.33 |
| DK 8 | 1.0:0 | 0 | 0 | 75±43.30 | 0.7125±0.44 |
| DK 9 | 1.0:0.25 | 0 | 0 | 12.5±21.65 | 0.1±0.17 |
| DK 10 | 1.0:0.5 | 0 | 0 | **100** | **0.8±0.23** |
| DK 11 | 1.0:1.0 | 0 | 0 | 75±43.30 | 0.988±0.84 |

**หมายเหตุ** * ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

ตารางที่ 3.4.3 การเจริญของชิ้นส่วนของข้อมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4 – D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

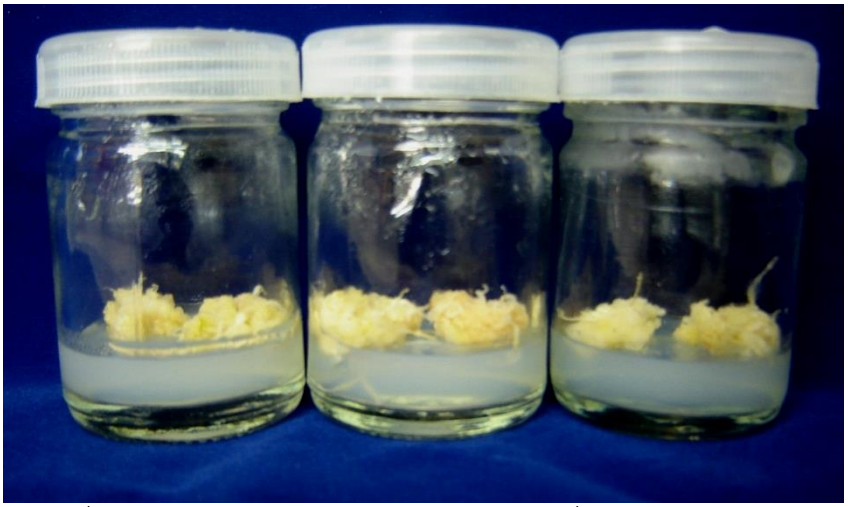
| Treatment | อัตราส่วน 2, 4–D:kinetin (mg/ l) | % การเจริญของส่วนข้อมะระขี้นก | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | % การเจริญเป็นยอด | จำนวนยอด/ชิ้น | % การเจริญเป็นราก | จำนวนชิ้นที่เกิดแคลลัส | ขนาดแคลลัส/ชิ้น(cm.) |
| DK 1 | 0:0.25 | 75±25* | 0.75±0.25 | **50±0** | 0 | 0 |
| DK 2 | 0:0.5 | **87.5±21.65** | **1.125±0.54** | 37.5±21.65 | 37.5±41.45 | 0.163±0.16 |
| DK 3 | 0:1.0 | 75±43.30 | 0.875±0.54 | 25±43.30 | 0 | 0 |
| DK 4 | 0.1:0 | 50±50 | 0.5±0.5 | 0 | 100 | 0.363±0.15 |
| DK 5 | 0.1:0.25 | 0 | 0 | 0 | 100 | 1.008±0.12 |
| DK 6 | 0.1:0.5 | 50±50 | 0.75±0.83 | 0 | 100 | 1.175±0.21 |
| DK 7 | 0.1:1.0 | 37.5±21.65 | 0.5±0.35 | 0 | 100 | 0.713±0.21 |
| DK 8 | 1.0:0 | 0 | 0 | 0 | 87.5±21.65 | 0.888±0.30 |
| DK 9 | 1.0:0.25 | 75±43.30 | 1.375±0.96 | 0 | 100 | 0.975±0.57 |
| DK 10 | 1.0:0.5 | 37.5±41.45 | 0.375±0.41 | 0 | **100** | **1.35±0.16** |
| DK 11 | 1.0:1.0 | 25±25 | 0 | 0 | 100 | 1.275±0.32 |

**หมายเหตุ** * ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

ตารางที่ 3.4.4 การเจริญของชิ้นส่วนของลำต้นมะระขี้นกที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4 – D และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 4 สัปดาห์

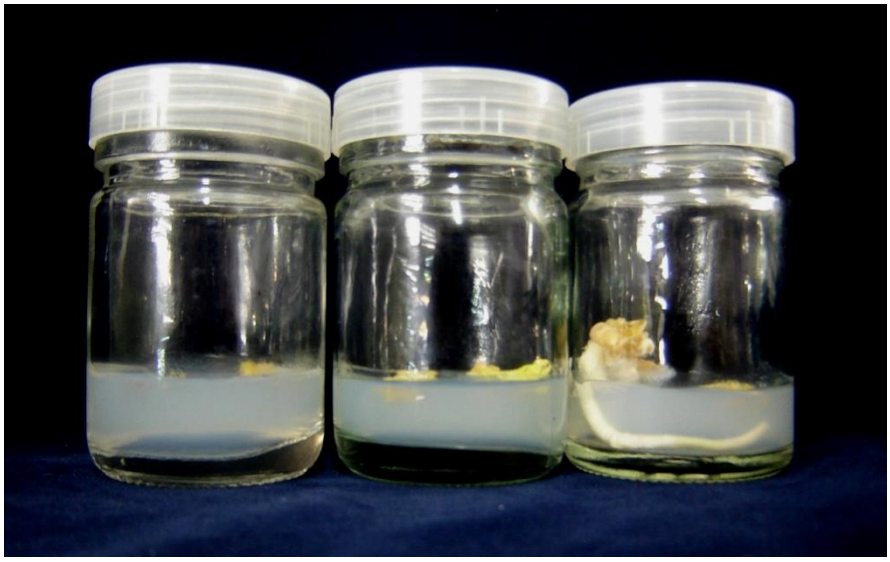
| Treatment | อัตราส่วน 2, 4-D:kinetin (mg/l) | % การเจริญของส่วนลำต้นมะระขี้นก | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % การเจริญเป็นยอด | % การเจริญเป็นราก | จำนวนชิ้นที่เกิดแคลลัส | ขนาดแคลลัส/ชิ้น (cm.) |
| DK 1 | 0:0.25 | 0 | 12.5±21.65* | 0 | 0 |
| DK 2 | 0:0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DK 3 | 0:1.0 | 0 | **25±43.30** | 0 | 0 |
| DK 4 | 0.1:0 | 0 | 0 | **100** | **1.088±0.15** |
| DK 5 | 0.1:0.25 | 0 | 0 | 100 | 1.075±0.14 |
| DK 6 | 0.1:0.5 | 0 | 0 | 75±43.30 | 0.788±0.55 |
| DK 7 | 0.1:1.0 | 0 | 0 | 100 | 0.95±0.13 |
| DK 8 | 1.0:0 | 0 | 0 | 75±43.30 | 0.8±0.50 |
| DK 9 | 1.0:0.25 | 0 | 0 | 100 | 0.688±0.11 |
| DK 10 | 1.0:0.5 | 0 | 0 | 75±43.30 | 0.7125±0.43 |
| DK 11 | 1.0:1.0 | 0 | 0 | 100 | 0.688±0.09 |

**หมายเหตุ** * ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)



ภาพที่ 3.4.1 การเจริญเป็นแคลลัสในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin อัตราส่วน 1.0:0.5 mg/l

ภาพที่ 3.4.2 การเจริญเป็นยอดและรากในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin 0:0.5 mg/l

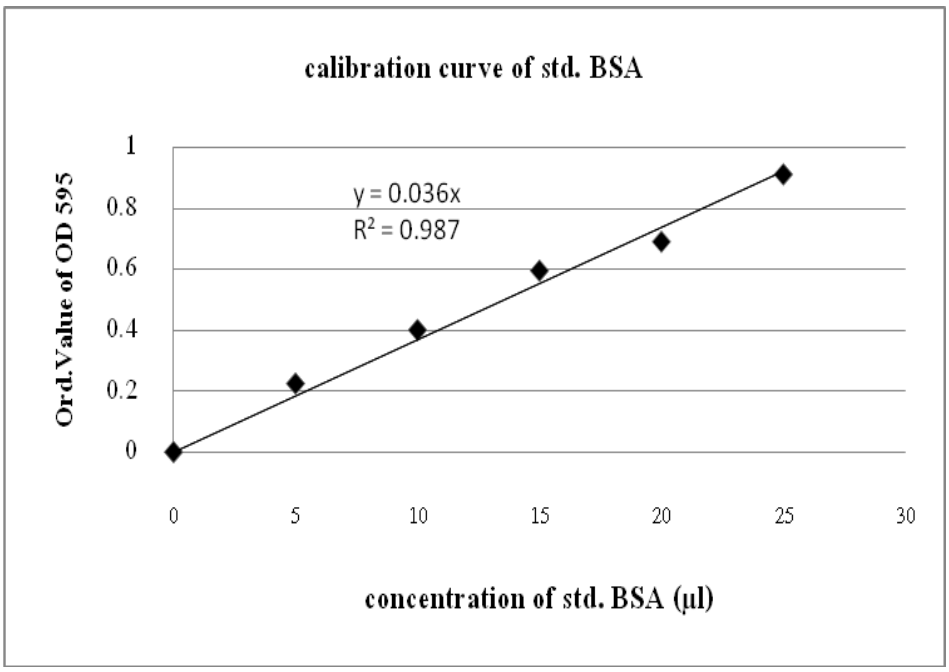


ภาพที่ 3.4.3 การเจริญเป็นรากในอาหาร MS ที่เติมคู่ฮอร์โมน 2, 4–D และ kinetin 0:1.0 mg/l

2. ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่าง

ตารางที่ 3.4.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm กับความเข้มข้นของ Standard BSA เข้มข้น 0-0.025 mg/ml

| concentration of std.BSA (µl) | Absorbance 595 |
|---|---|
| 0 | 0.0026 |
| 5 | 0.2266 |
| 10 | 0.4019 |
| 15 | 0.5961 |
| 20 | 0.6911 |
| 25 | 0.9115 |

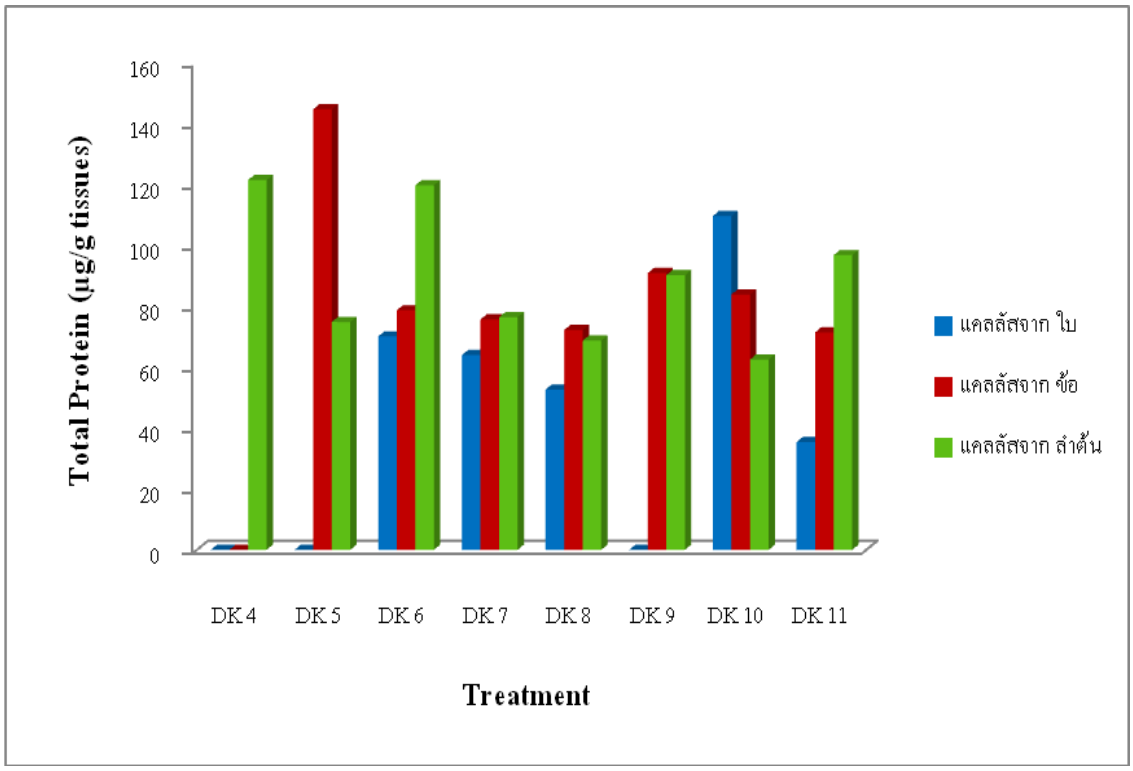



ภาพที่ 3.4.4 กราฟมาตรฐานของ BSA

ตารางที่ 3.4.6 ปริมาณโปรตีนของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของใบ ข้อ และลำต้น มะระขี้นก ในอาหาร MS ที่เติมคู่ความเข้มข้นฮอร์โมน 2, 4-D และ kinetin

| **Sample** | **อัตราส่วน 2, 4-D:kinetin (mg/ l)** | **Total protein (µg/ g tissues)** |
|---|---|---|
| Mc | - | 823.030 |
| LDK 6 | 0.1:0.5 | 70.067 |
| LDK 7 | 0.1:1.0 | 63.947 |
| LDK 8 | 1.0:0 | 52.630 |
| LDK 10 | 1.0:0.5 | 109.632 |
| LDK 11 | 1.0:1.0 | 35.388 |
| NDK 5 | 0.1:0.25 | 144.660 |
| NDK 6 | 0.1:0.5 | 78.671 |
| NDK 7 | 0.1:1.0 | 75.668 |
| NDK 8 | 1.0:0 | 72.190 |
| NDK 9 | 1.0:0.25 | 90.887 |
| NDK 10 | 1.0:0.5 | 83.865 |
| NDK 11 | 1.0:1.0 | 71.432 |
| SDK 4 | 0.1:0 | 121.436 |
| SDK 5 | 0.1:0.25 | 74.818 |
| SDK 6 | 0.1:0.5 | 119.743 |
| SDK 7 | 0.1:1.0 | 76.406 |
| SDK 8 | 1.0:0 | 68.702 |
| SDK 9 | 1.0:0.25 | 90.197 |
| SDK 10 | 1.0:0.5 | 62.497 |
| SDK 11 | 1.0:1.0 | 96.780 |

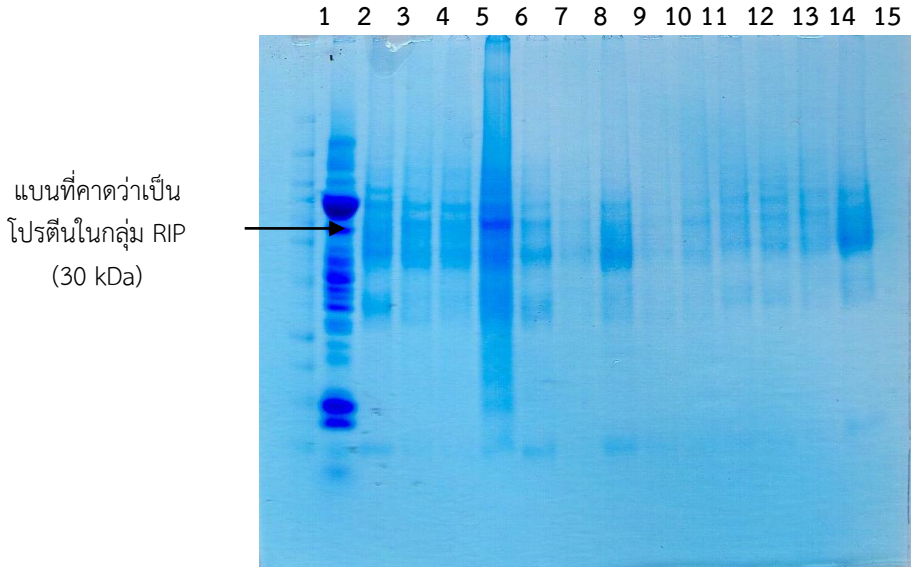
**หมายเหตุ** Mc คือ เมล็ดมะระขี้นก
LDK คือ ตัวอย่างโปรตีนแคลลัสที่ได้จากส่วนของใบ
NDK คือ ตัวอย่างโปรตีนแคลลัสที่ได้จากส่วนของข้อ
SDK คือ ตัวอย่างโปรตีนแคลลัสที่ได้จากส่วนของลำต้น




ภาพที่ 3.4.5 กราฟปริมาณ total protein ของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของ ใบ ข้อ และลำต้น ของมะระขี้นก

3. การแยกชนิดและตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนโดย acrylamide gel electrophoresis

จากการทดลองนำสารสกัดโปรตีนในแต่ละตัวอย่างมาแยกชนิดโปรตีน โดยอาศัยขนาดของโปรตีนที่มีในตัวอย่าง และดูว่าโปรตีนมีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด เป็นการประมาณค่าว่าอาจจะมีโปรตีนในกลุ่ม RIPs หรือไม่ โดยเทียบจาก Protein Marker Mix ที่ทราบขนาดโมเลกุลแน่นอน ซึ่งให้ผลดังภาพที่ 3.4.6 โดยที่แบนที่คาดว่าเป็น RIPs มีขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน




ภาพที่ 3.4.6 ตัวอย่างสารสกัดจากส่วนของ ใบ ข้อ และลำต้น ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะระ

เลนที่ 1 คือ Protein Marker Mix
เลนที่ 2 คือ เมล็ดมะระขี้นก
เลนที่ 3 คือ ส่วนของข้อในอาหาร DK 5
เลนที่ 4 คือ ส่วนของลำต้นในอาหาร DK 9
เลนที่ 5 คือ ส่วนของลำต้นในอาหาร DK 4
เลนที่ 6 คือ ส่วนของลำต้นในอาหาร DK 6
เลนที่ 7 คือ ส่วนของใบในอาหาร DK 6
เลนที่ 8 คือ ส่วนของลำต้นในอาหาร DK 11
เลนที่ 9 คือ ส่วนของข้อในอาหาร DK 9
เลนที่ 10 คือ ส่วนของใบในอาหาร DK 10
เลนที่ 11 คือ ส่วนของลำต้นในอาหาร DK 8
เลนที่ 12 คือ ส่วนของลำต้นในอาหาร DK 5
เลนที่ 13 คือ ส่วนของลำต้นในอาหาร DK 11
เลนที่ 14 คือ ส่วนของลำต้นในอาหาร DK 10
เลนที่ 15 คือ ส่วนของข้อในอาหาร DK 10

# เอกสารอ้างอิง


กาญจนา กิระศักดิ์. 2540. อิทธิพลของแร่ธาตุอาหาร น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะลิลาและน้ำมันหอมระเหย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

เกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล. 2546. การใช้เซลล์พืชเพาะเลี้ยงสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง. **Lab. Today**. 2:20-24.

คณิตา ดวงจันทร์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะระขี้นก. สารนิพนธ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. อุบลราชธานี.

จารุวรรณ จาติเสถียร. 2544. การสร้างต้นอ่อนส้มเขียวหวานและส้มโชกุนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. **ว.วิชาการเกษตร** 19 : 44-56.

ชาลี ทองเรือง. 2543. การชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงและการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพจากสารสกัดจากรากเพาะเลี้ยงมะระขี้นก. **วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร** 8(1):42-55.

ชลระวี อัมรานนท์. 2545. การเลี้ยงเนื้อเยื่อมะระขี้นก. สารนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปัทมา สุนทรศารทูล. 2541. มะระขี้นก. **จุลสารข้อมูลสมุนไพร** 15 (2) : 6-10.

พรรณพิไล แซ่โง้ว เสาวคนธ์ รัตนวิจิตราศิลป์ และอนุพงศ์ กมลกุลาจารย์. 2524 การเลี้ยงเนื้อเยื่อและการตรวจหาสาร diosgenin และ sterol ใน *Momordica charantia* Linn. ปริญญานิพนธ์เภสัชบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล.

สิทธิศักดิ์ ไทยจรรยา. 2536. การศึกษาการเพิ่มปริมาณของสัปปะรดสี. **บทคัดย่องานวิจัยของนักศึกษาปริญญาตรี ปีการศึกษา 2536**. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.กรุงเทพฯ.

สโรชา กรีธาพล ปรัชญา คงทวีเลิศ และมณีฉัตร นิกรพันธุ์. 2547. การหาโปรตีนขนาด 30 กิโลดัน และลักษณะทางพืชสวนของมะระขี้นก. **วารสารเกษตร** 20(2) : 159-167.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. **เภสัชกรรมไทย รวบรวมสมุนไพร.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

Au, T.K., R. A. Collins, T.L. Lam, T. B. Ng., W. P. Fong, and D.C. Wan. 2000. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. **FEBS Letters** 471:169-172.

Chong. T. M., M. A. Abdullah, O. M. Lai, F. M. Nor' Aini and N. H. Lajis. 2005. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. **Process Biochemistry** 40:3397-3405.

Chrispeels, M. J. and D.e. Sadava. 1994. "Valuable chemicals from plant cell and tissue culture." **In: Plant, genes and agriculture**. Jones & Bartlett publisher. Pp.384-399.

Dodds, J. H. and L. W. Roberts. 1995. **Experiments in plant tissue culture**, 3rd ed. Cambridge University Press, NY.

Dornenburg, H. and D. Knorr. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell culture. **Enzyme and Microbial Technology** 17:674-684.

Duanchan, K. and A. Pimmongkol. 2003. Tissue culture of bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) 29th **Congress on Science and Technology of Thailand**, Khon Kaen, Thailand.

Dunaeva, M. C., C. Goebel, C. Wasternack, B. Parthier and E. Goerschen. 1999. The jasmonate induced 60 kDa protein of barlay exhibits *N*-glycosidase activity in vivo. **FEBS Letters** 452:263-266.

Fong, W. P., Y. T. Poon, T. M. Wong, J. W. Y. Mock, T. B. Ng, R. N. S. Wong, Q. Z. Yao and H. W. Yeung. 1996. **Life Sciences** 59:901-909.

Jiratchariyakul, W., C. Wiwat, M. Vongsakul, A. Somanabandhu, W. Leelamanit. I. Fujii, N. Suwannaroj and Y. Ebizuka. 2001. HIV inhibitor from Thai bitter gourd. **Planta Medica** 67:350-353.

Linden, J.C. and M. Phisalaphong. 2000. Oligosaccharides potentiate methyl jasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. **Plant Science** 158:41-51.

Mock, J. W. Y.,T. B. Ng, R. N. S. Wong, Q.Z Yao, H. W. Yeung and W. P. Fong. 1996. Demonstration of ribonuclease activity in the plant ribosom-inactivating proteins alpha-and beta-momorcharins. **Life Sciences** 59:1853-1859.

Ng, T. B., B. Huang, W. P. Fong and H. W. Yeung. 1997. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors (Minireview). **Life Sciences** 61:933-949.

Putnam, C. D. and J. A. Tainer. 2000. The food of sweet and bitter fancy. **Natural and Structure Biology** 7:17-18.

Silva, A. L. C.,A. C.G. Horta. R. A. Moreira. L. M. Beltramini and A. P. U. Araujo. 2003. Production of *Abrus pulchellus* ribosome-inactivating protein from seeds callus culture. **Toxicon** 41:841-849.

Sanchez- Sampedro, M. A., J. Fernandez-Tarrago and P. Corchete. 2005. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaernt. **Journal of Biotechnology** 119:60-69.

Smith, M. A. L. 1996. "Secondary product expression in vitro." In : **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. (Trigiono and Gray). CRC Press, NY. pp.305-309.

Staswick, P.E. 1995. "Jasmonates, salicylic acid and brassinolides." In : **Plant hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular biology**. 2nd ed. (Davies, P.J.) Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. Pp.179-205.

Stirpe, F. 2004. Ribosom-inactivating proteins (Review). **Toxicon** 44:371-383.

Thiruvengadam, M., Varisai Mohamed,S., Yang, C.H. and Jayabalan, N.2006. Development of an embryogenic suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L.). **J. Hort. Sci**.109:123-129.

Wang. H. X. and T. B. Ng. 2001. Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases. **Planta Medica** 67:669-672.

Yu, K., W. Gao, E. Hahn and K. Paek. 2002. Jasmonic acid improve ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. **Biochemical Engineering Journal** 11:211-215.

Zheng, Y. T., K. L. Ben and S. W. Jin. 1999. Alpha-momorcharin inhibits HIV-1 replication in acutely but not chronically infected T-lymphocyte. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**. 20:239-243.