รายงานการวิจัย

อิทธิพลของโคลชิซิน

ต่อการปรับปรุงพันธุ์ผักหวานบ้านที่เลี้ยงในหลอดทดลอง*

มานี เตื้อสกุล **

ในปัจจุบันมนุษย์ได้หันมาสนใจธรรมชาติโดยเฉพาะพืชผักที่ใช้รับประทาน รวมทั้งยา รักษาโรค ผักที่ใช้รับประทานจะหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี ยาฆ่าแมลง ส่วนยารักษาโรคพยายามใช้ยาสมุนไพร ยาสมุนไพรที่เป็นยาแผนโบราณสามารถนำมาใช้รักษาโรคได้ผลดี แต่ให้ผลช้า และต้องใช้ในปริมาณที่มาก ได้มีนักวิทยาศาสตร์พยายามสกัดสารเพื่อนำมาใช้เป็นยาโดยวิธีการต่าง ๆ แต่ยังต้องใช้พืชสมุนไพรจำนวนมากเช่นเดิม มีพืชอยู่หลายร้อยชนิดที่เป็นทั้งพืชผักและเป็นพืชสมุนไพร เช่น มะกรูด พลู ตะไคร้ และยังมีพืชอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ ได้แก่ ผักหวานบ้าน ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sauropus androgynus* Linn. Merr. ผักหวานบ้านเป็นพืชผักใช้ รับประทานเป็นอาหารคาว เช่น ใส่ในแกงเขียวหวาน แกงเลียง ทำให้อาหารมีสีเขียวน่ารับประทาน ลำต้นปลูกแทนรั้วบ้าน ปลูกง่ายไม่ต้องใช้ยาฆ่าแมลง ยังใช้เป็นยารักษาโรคได้หลายชนิด เช่น รากใช้รักษาโรคอีสา แก้โรคมะเร็งคุด แก้ไข้ รักษาโรคคางทูม ใบรับประทานแก้ปวดเมื่อยร่างกาย เป็นยาบำรุงสุขภาพหลังคลอดบุตร สารสกัดที่ได้จากใบและลำต้นโดยใช้แอลกอฮอล์จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase เล็กน้อย และมีสาร papaverine รับประทานมากจะมีอาการเวียนศีรษะและท้องผูก (มหาวิทยาลัยมหิดล 2539, วุฒิ 2540) จากการวิเคราะห์

***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำโปรแกรมวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏสงขลา*

**งานวิจัยเมื่อปี 2542-2546*

หาปริมาณโปรวิตามินเอ โดยใช้ ลิคควิด โครมาโตกราฟีในพืชผักหลายชนิด จากประเทศอินโดเนเซีย พบว่าปริมาณของโปรวิตามินเอ ต่อ 100 กรัม ที่รับประทานได้ในผักหวานบ้านมีค่ามากที่สุด คือ 1889 RE (retinol equivalents) เมื่อเทียบกับมะม่วงซึ่งมีเพียง 250 RE มะละกอ 992 RE และมันสำปะหลัง 1776 RE (Hulshof et al, 1997) ปัจจุบันผักหวานบ้านมีราคาแพง ตามศูนย์การค้า ขาย 15 ยอด ราคา 10 บาท ในตลาด 20 ยอด ราคา 7 บาท และยังขึ้นอยู่กับฤดูกาล

จะเห็นได้ว่าผักหวานบ้านเป็นพืชที่มีความสำคัญมาก เป็นทั้งพืชผักและยาสมุนไพร แต่การนำผักหวานบ้านมาใช้ยังไม่กว้างขวาง ทั้งนี้เนื่องจากมีผู้สนใจปลูกน้อย คุณภาพยังไม่ดี ดังนั้นในปี พ.ศ.2542-2544 ได้นำผักหวานบ้านมาปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้สารโคลชิซิน ที่มีความเข้มข้น และความยาวนานในการให้สารแตกต่างกัน เพื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซม จากผักหวานบ้านที่มีโครโมโซม 2n เป็นผักหวานบ้านที่มีโครโมโซม 4n ซึ่งตามทฤษฎีทราบว่าพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจาก 2n เป็น 4n จะมีคุณลักษณะแตกต่างกัน โดยพืช 4n ส่วนใหญ่จะมีผลผลิตดี เช่น ใบโต ผลโต มีรสดี มีสารอาหารเพิ่มขึ้น ตามปกติการปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้รังสีทำให้โครโมโซมแตกหัก การตัดต่อยีนเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ต้องการ การใช้สารเคมี เป็นต้น แต่การเพิ่มจำนวนโครโมโซมสามารถทำได้โดยใช้สารโคลชิซิน เป็นวิธีที่ง่ายและปลอดภัยเสีย ค่าใช้จ่ายน้อย

การให้สารโคลชิซินแก่พืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การหยดสารลงบนบริเวณปลายยอด การนำสารที่เป็นครีมป้ายที่ตายอดหรือตาข้างของต้นพืช และการให้สารกับเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นต้น การให้สารโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่ดี เพราะใช้สารเคมีจำนวนน้อย ให้ผลรวดเร็ว ใช้เนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อยสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ด้วยเหตุนี้ในการปรับปรุงพันธุ์ผักหวานบ้านที่ทำการทดลองครั้งนี้จึงใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำตายอดและตาข้างมาชักนำให้เกิดแคลลัส และต้นจำนวนมาก นำต้นที่ได้มาให้สารโคลชิซิน แล้วนำเซลล์มาชักนำให้เกิดต้น เพื่อเป็นผักหวานบ้านที่มีโครโมโซม 4

วิธีการทดลอง

การทดลอง การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนคือ

1. การชักนำให้เนื้อเยื่อผักหวานบ้านเกิดแคลลัส โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของ บีเอ (6-benzylaminopurine) และไอเอเอ (indole-3-acetic acid) ที่เหมาะสมในการชักนำให้เนื้อเยื่อตายอดเกิดแคลลัส ใช้สูตรอาหาร เอ็มเอส (Murashige and Skoog : 1962) โดยมี บีเอ เข้มข้น 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ ไอเอเอ เข้มข้น 0.01 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

2. การชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดโพลีพลอยด์โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซินกับความยาวนานในการให้สารโคลชิซินแก่เนื้อเยื่อแคลลัสของผักหวานบ้าน ใช้ความเข้มข้น 0.0 0.1 0.5 1.0 เปอร์เซ็นต์ ความยาวนานในการให้สาร 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยนำเนื้อเยื่อแคลลัสของผักหวานบ้านมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ได้

จากการทดลองในข้อ 1 ร่วมกับโคลชิซิน ในระดับความเข้มข้นและความยาวนานที่แตกต่างกัน ตามที่กำหนด

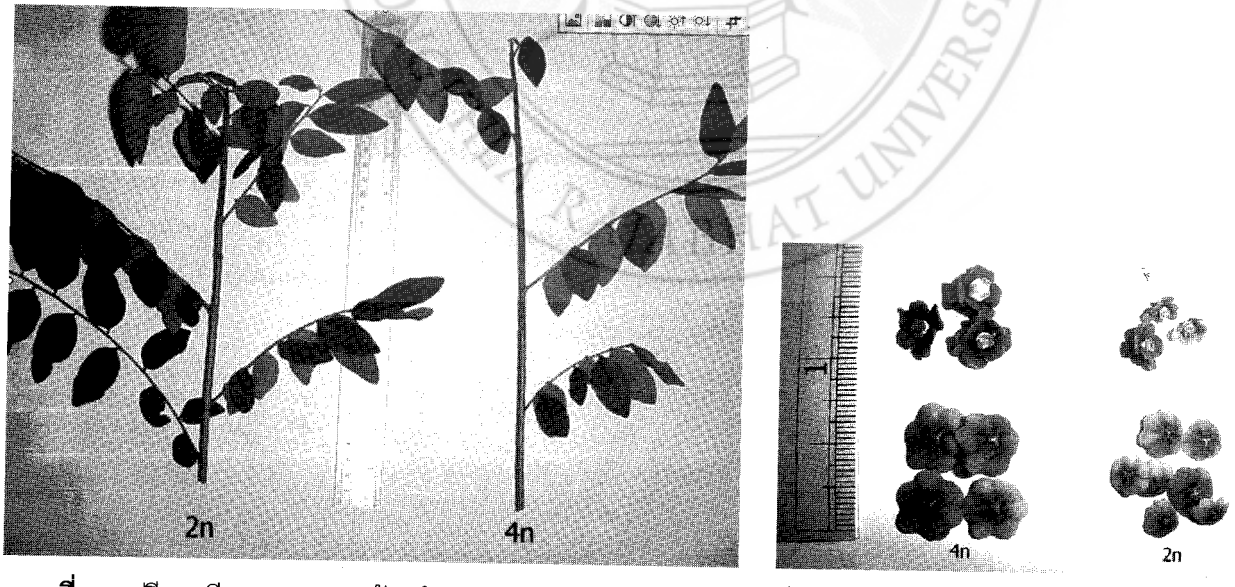
3.ชักนำให้เนื้อเยื่อที่ได้รับสารโคลชิซินจากข้อ 2 ให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร เอ็มเอส ที่มีความเข้มข้นของ บีเอ และไอเอเอ ที่เหมาะสม ใช้เวลา 3 เดือน

4.นำต้นผักหวานบ้านที่ได้จากการให้สารโคลชิซิน และไม่ได้รับสารโคลชิซินออกจากขวดทดลองมาเลี้ยงในวัสดุปลูกสภาพแวดล้อมภายนอก ใช้เวลา 4 เดือน

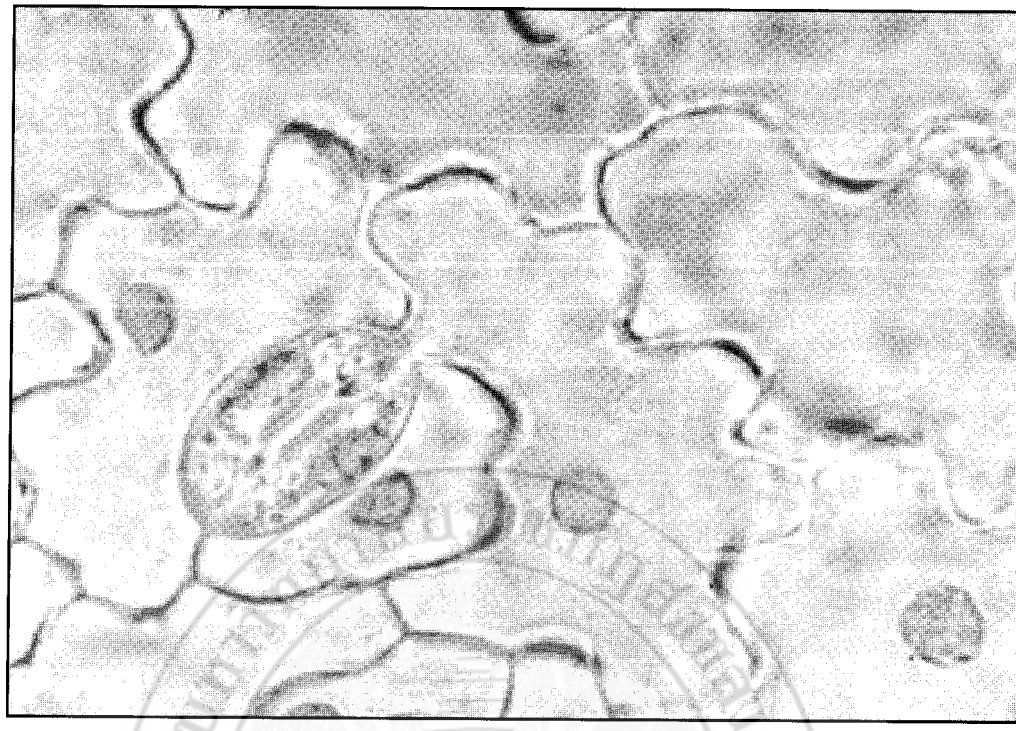
ผลการทดลอง

จากการทดลองปรากฏว่าอิทธิพลของโคลชิซินสามารถปรับปรุงพันธุ์ผักหวานบ้าน ที่เลี้ยงในหลอดทดลองได้ ทำให้ได้ผักหวานบ้านพันธุ์ใหม่ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากเดิม เป็น 2 เท่า เดิมผักหวานบ้านมีโครโมโซม 2n มีจำนวน 52 เส้น เมื่อได้รับสารโคลชิซิน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง ได้ผักหวานบ้านมีโครโมโซม 4n จำนวน 104 เส้น นอกจากแตกต่างในจำนวนของโครโมโซมแล้วปรากฏว่าลักษณะที่ปรากฏออกมาให้เห็น ยังมีความแตกต่างกัน ได้แก่ ขนาดของใบ ใบหนา มีสีเขียวเข้มเกือบเป็นสีน้ำเงิน มีน้ำหนักใบมากกว่าในปริมาณที่เท่ากัน ลำต้นแข็งแรง ปล้องยาว ดอกมีขนาดโต สามารถออกดอกได้ มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียในต้นเดียวกัน เช่นเดียวกับพันธุ์เดิม สามารถติดผลได้

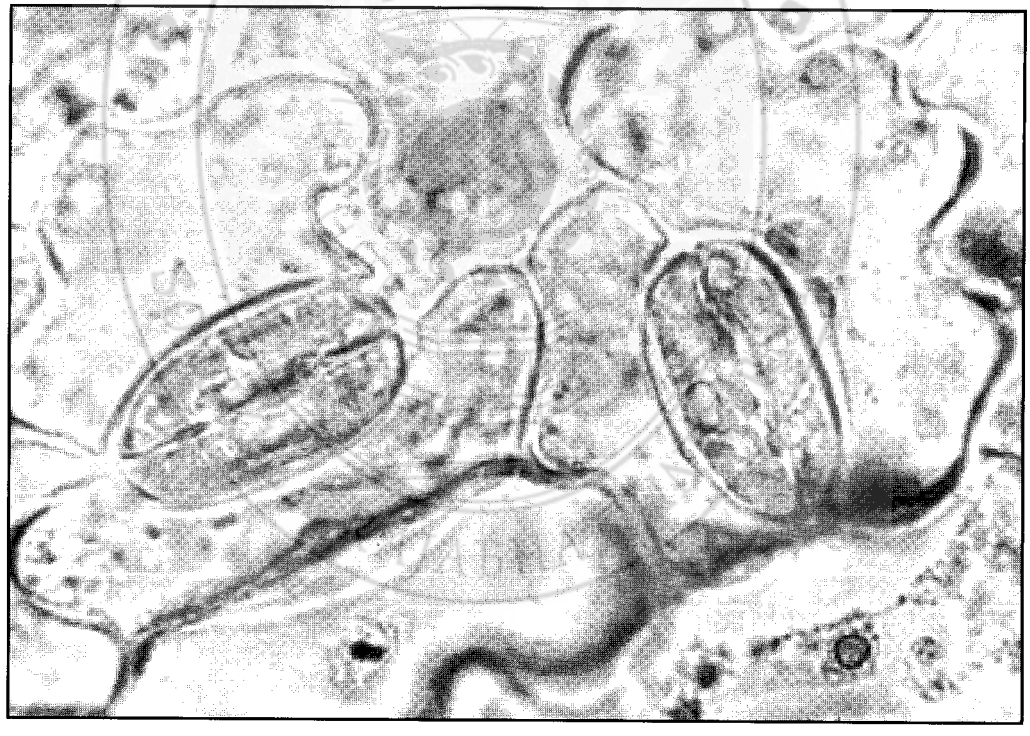
เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อ พบว่าขนาดของเซลล์และขนาดของปากใบบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวด้านหลังใบและท้องใบมีขนาดโตกว่าพันธุ์เดิมเกือบ 2 เท่า เห็นข้อแตกต่างได้ชัดเจน โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X และ 40 X ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 2



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบขนาดของต้น ใบ และดอก ของผักหวานบ้านที่มีจำนวนโครโมโซม 2n และ 4n



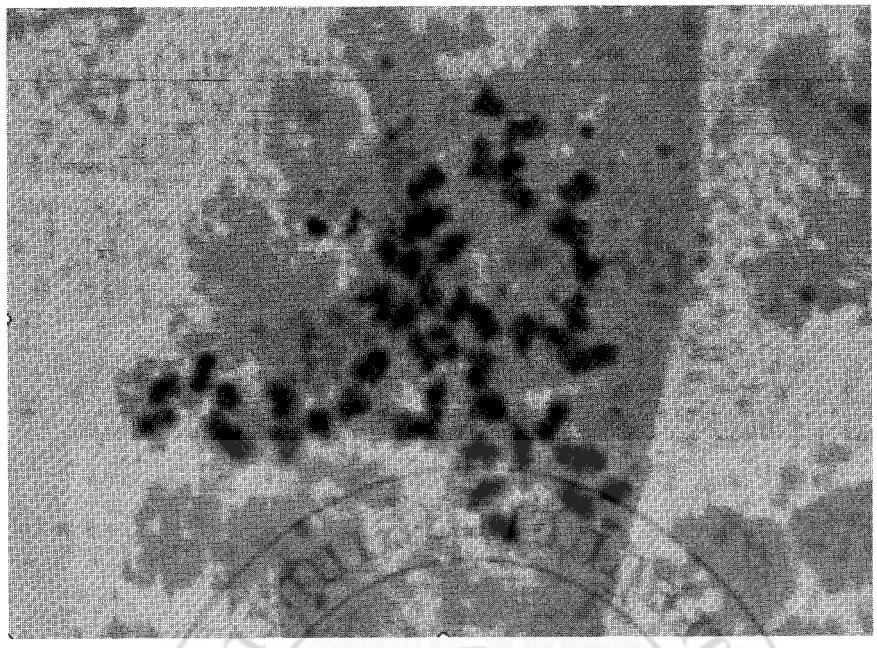
(ข)



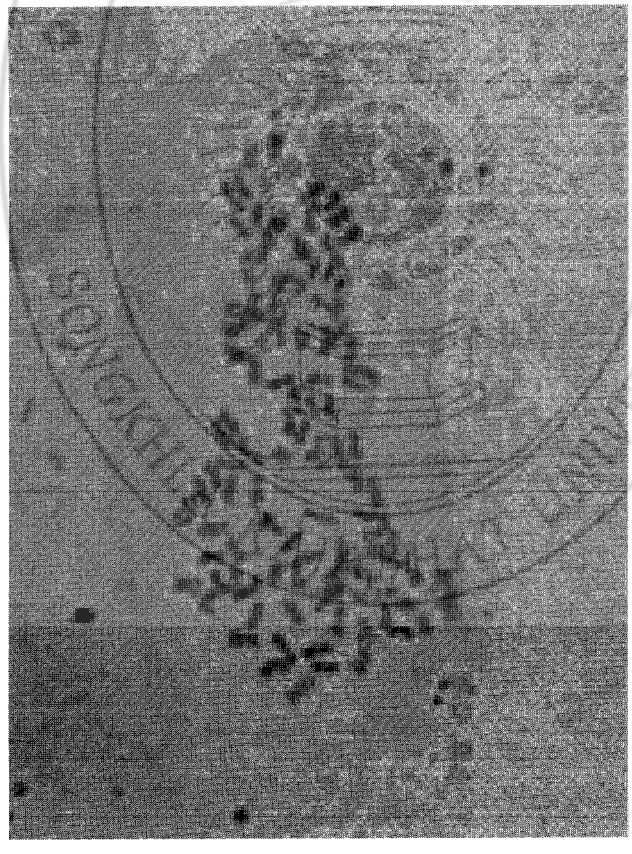
ภาพที่ 2 เปรียบเทียบขนาดของปากใบ ของผักหวานบ้านที่มีจำนวนโครโมโซม 2n (ภาพ ก) และ 4n (ภาพ ข) (100X)

ภาพ ก ค่าเฉลี่ย ความกว้าง 0.01727 มิลลิเมตร ความยาว 0.02706 มิลลิเมตร

ภาพ ข ค่าเฉลี่ย ความกว้าง 0.02387 มิลลิเมตร ความยาว 0.03950 มิลลิเมตร



(ก)



(ข)

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนโครโมโซม ของผักหวานบ้านที่มีจำนวนโครโมโซม 2n (ภาพ ก) และ 4n (ภาพ ข) (100X)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความแตกต่างของผักหวานบ้านพันธุ์เดิม มีโครโมโซม 2n กับพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยการใช้สารโคลชิซิน มีโครโมโซม 4n

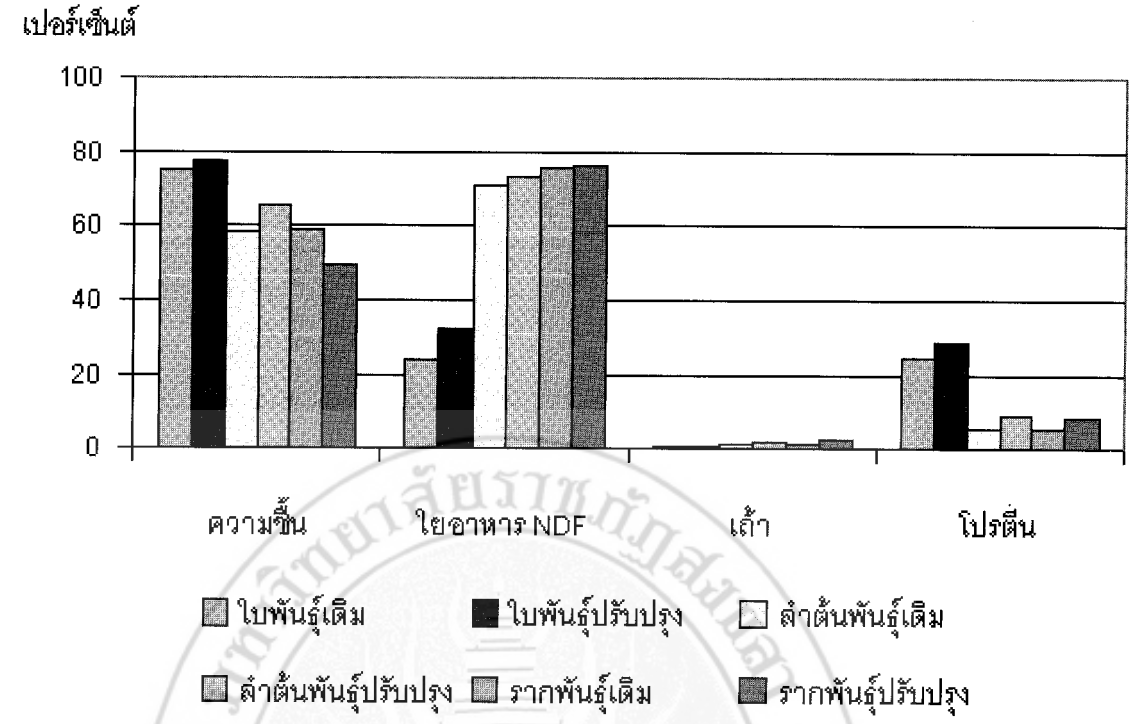
ลักษณะที่ปรากฏ	พันธุ์เดิม	พันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุง
1.ค่าเฉลี่ยความสูงของต้น (เซนติเมตร)	41.21	42.69
2. ค่าเฉลี่ยความกว้างของใบ (เซนติเมตร)	2.37	2.42
3. ค่าเฉลี่ยความยาวของใบ (เซนติเมตร)	5.46	5.43
4. ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของใบ (มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตร)	12.73	19.27
5. ค่าเฉลี่ยจำนวนปากใบ (ปาก/ตารางมิลลิเมตร)	175.85	112.95
6. ค่าเฉลี่ยความกว้างของปากใบ (มิลลิเมตร)	0.01787	0.02292
7. ค่าเฉลี่ยความยาวของปากใบ (มิลลิเมตร)	0.02636	0.04007
8. ค่าเฉลี่ยความกว้างของเซลล์ในเนื้อเยื่อบุผิวบริเวณหลังใบ (มิลลิเมตร)	0.04055	0.05623
9. ค่าเฉลี่ยความยาวของเซลล์ในเนื้อเยื่อบุผิวบริเวณหลังใบ (มิลลิเมตร)	0.06646	0.08453
10. ค่าเฉลี่ยความกว้างของเซลล์ในเนื้อเยื่อบุผิวบริเวณท้องใบ (มิลลิเมตร)	0.04321	0.05575
11. ค่าเฉลี่ยความยาวของเซลล์ในเนื้อเยื่อบุผิวบริเวณท้องใบ (มิลลิเมตร)	0.06445	0.09228
12. จำนวนโครโมโซม	2n จำนวน 52 เส้น	4n จำนวน 104 เส้น

หลังจากการปรับปรุงพันธุ์ผักหวานบ้าน ได้ผักหวานบ้านที่มีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์เดิมเมื่อทำการตรวจสอบทางกายวิภาคศาสตร์ ทางสัณฐานวิทยา และจำนวนของโครโมโซมแล้ว จึงได้ทำการวิจัยต่อ โดยศึกษาเปรียบเทียบคุณค่าทางอาหาร และฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากผักหวานบ้าน ทั้งสองพันธุ์ พบว่าผักหวานบ้านทั้งสองพันธุ์มีคุณค่าของสารแตกต่างกัน

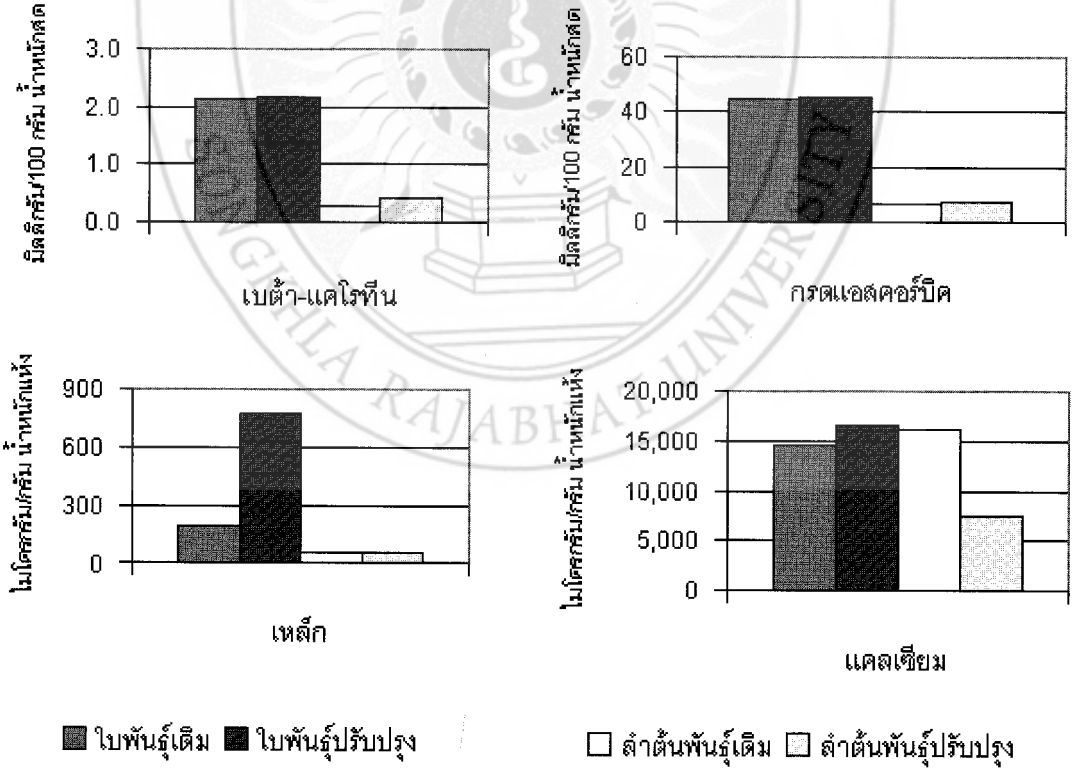
จากการศึกษาเปรียบเทียบคุณค่าทางอาหาร และฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากผักหวานบ้านพันธุ์เดิมกับพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงโดยใช้สารโคลชิซินซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณค่าทางอาหารและฤทธิ์ทางชีววิทยาของสารสกัดที่ได้จากผักหวานบ้านทั้งสองพันธุ์ โดยนำใบ ลำต้นและราก มาศึกษาหา ความชื้น ใยอาหาร เถ้า โปรตีน เบต้า-แคโรทีน กรดแอสคอร์บิค เหล็ก แคลเซียม อัลคาร์ลอยด์ ไกลโคไซด์ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอนตี้ออกซิแดนซ์ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และ Brine Shrimp Lethallity Test

ปรากฏผลการทดลองดังนี้ ผักหวานบ้านพันธุ์ปรับปรุงโดยใช้สารโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์ ความชื้น โปรตีน ใยอาหาร เบต้า-แคโรทีน กรดแอสคอร์บิค และเหล็กสูงกว่าผักหวานบ้านพันธุ์เดิม ใบของผักหวานบ้านมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่า ลำต้นและราก ในใบ ลำต้น และราก ของผักหวานบ้านทั้งสองพันธุ์ พบสารสำคัญได้แก่ reducing compound, alkaloid sterol/ triterpene ส่วน tannin พบรากและใบ saponin พบใน ลำต้นและราก ของผักหวานบ้านทั้งสองพันธุ์ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH Radical Scarvenging Assay สารสกัดจากผักหวานบ้านพันธุ์เดิมมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าพันธุ์ปรับปรุง และจากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม พบว่าสารสกัดจากผักหวานบ้านพันธุ์เดิมมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มสูงกว่าผักหวานบ้านพันธุ์ปรับปรุง การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดจากรากของผักหวานบ้านทั้งสองพันธุ์ ที่สกัดโดยใช้แอลกอฮอล์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus Bacillus subtilis Proteus vulgalic* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยผักหวานบ้านพันธุ์ปรับปรุงมีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสกว้างกว่าผักหวานบ้านพันธุ์เดิม

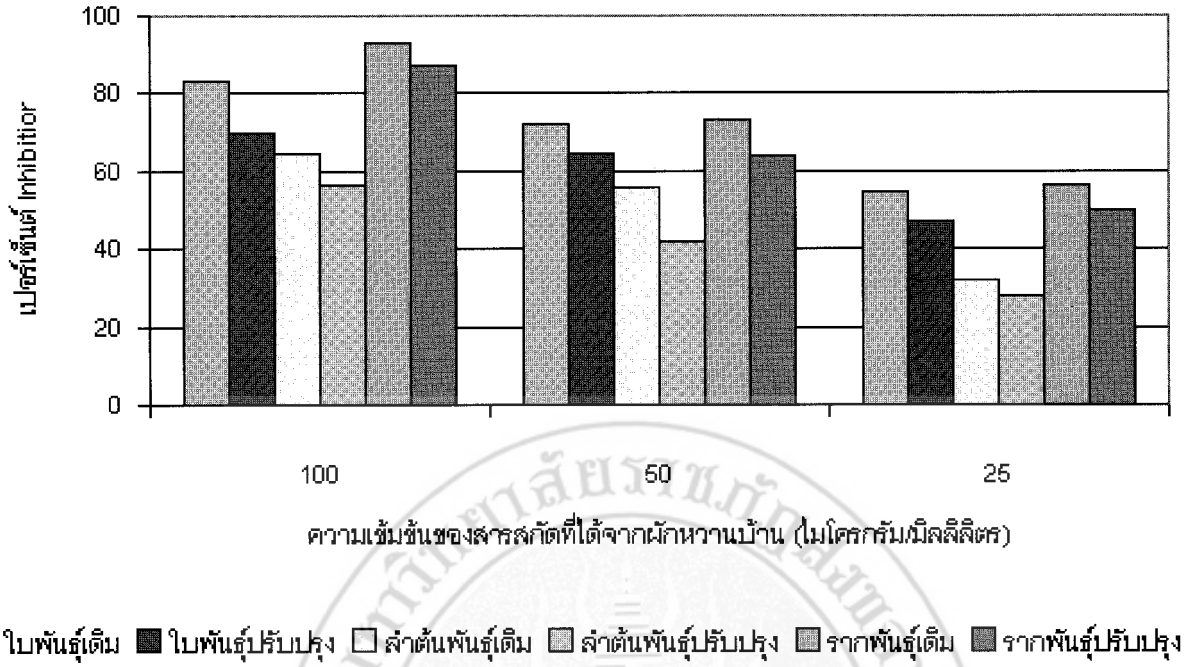
จากผลการทดลองนี้ได้นำมาเผยแพร่โดยจัดการฝึกอบรมนักวิชาการที่สนใจเพื่อจะได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป



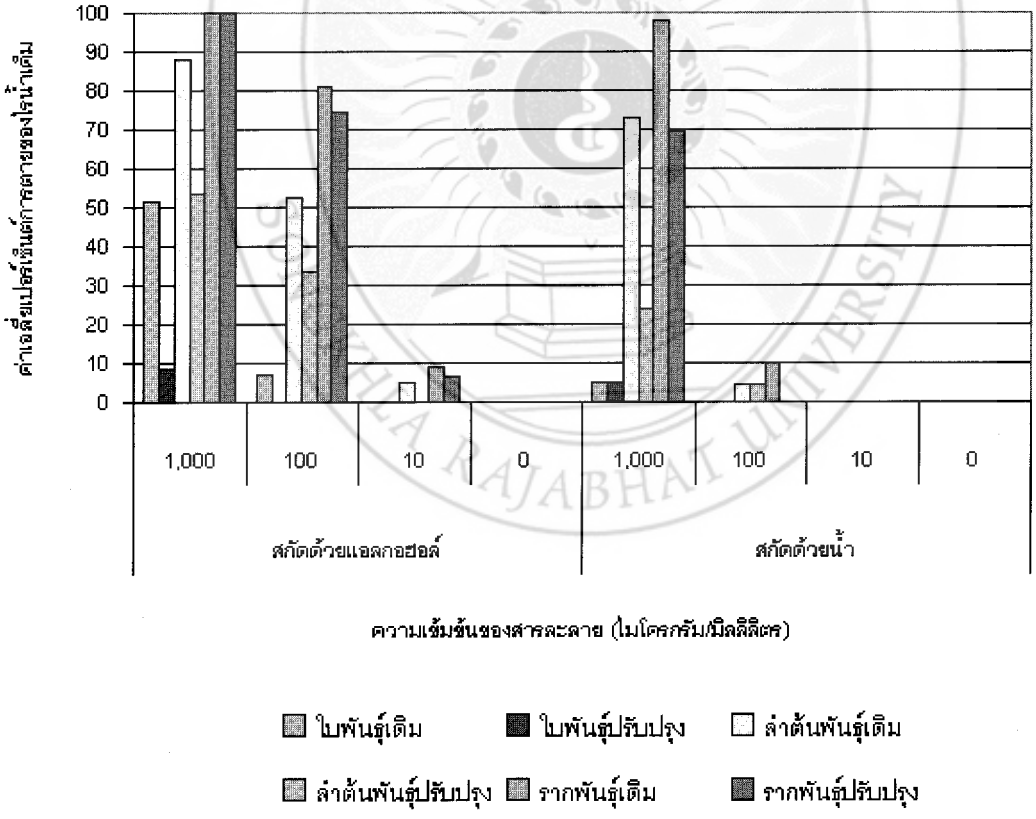
ภาพที่ 4 ปริมาณ ความชื้น ใยอาหาร เถ้า และโปรตีน ของผักหวานบ้านพันธุ์เดิมกับพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงโดยใช้สารโคลชิซิน



ภาพที่ 5 ปริมาณ เบต้า-แคโรทีน กรดแอสคอร์บิค เหล็กและแคลเซียมของผักหวานบ้านพันธุ์เดิมกับพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงโดยใช้สารโคลชิซิน



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ Inhibition ของผักหวานบ้านพันธุ์เดิมกับพันธุ์ ปรับปรุงโดยใช้สารโคลชิซิน เมื่อมีความเข้มข้น 100 50 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็มเมื่อเลี้ยงในสารสกัดที่ได้จากผักหวานบ้านพันธุ์เดิมกับพันธุ์ปรับปรุง ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า อิทธิพลของโคลชิซินมีผลต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของผักหวานบ้าน ทำให้ต้นผักหวานบ้านที่มีโครโมโซม 2n พัฒนาไปเป็นต้นผักหวานบ้านที่มีโครโมโซม 4n เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่นๆ เช่น เชอรี่ แอปเปิล คาร์เนชัน (Krishnamoorthy, 1981) เป็นต้น ในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์นี้ยังขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้น และความยาวนานในการให้สาร การให้สารที่มีความเข้มข้นสูงและให้สารนานเกินไป ทำให้พืชไม่เจริญเติบโต หรือเจริญเติบโตช้า สังเกตได้จากผลการทดลอง เมื่อให้สารเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง เนื้อเยื่อเจริญเติบโตช้า เมื่อเลี้ยงจนเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ นำมาตรวจสอบพันธุ์ จากการสุ่มตัวอย่าง พบว่า ทุกต้นมีโครโมโซม 2n ซึ่งเป็นผักหวานบ้านพันธุ์เดิม และจากการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าโคลชิซินยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตช้าลง ถ้าให้สารที่มีความเข้มข้นสูง และใช้เวลานาน จะทำให้เนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต (Elgsti and Dustins, 1955)

ในการให้สารโคลชิซินเพื่อกระตุ้นให้ได้ต้นพืชมีโครโมโซมเป็นโพลีพลอยด์ ควรให้สารที่มีความเข้มข้น และความยาวนานที่เหมาะสม สำหรับผักหวานบ้านควรให้สารเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 หรือ 24 ชั่วโมง แตกต่างจากการให้สารโดยการเตรียมในรูปครีม แล้วนำไปป้ายที่ซอกใบ ซึ่งใช้ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (Sacristan, 1971) การให้สารโคลชิซินโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ ทำให้เนื้อเยื่อได้รับสารเคมีได้อย่างทั่วถึง ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารโคลชิซินได้อย่างมาก และสามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้อย่างรวดเร็ว ในเวลาสั้น การเกิดโพลีพลอยด์ไม่ได้เกิดกับเซลล์ทุกเซลล์ จะเกิดเฉพาะบางเซลล์เท่านั้น สังเกตได้จากงานทดลอง พบว่าเนื้อเยื่อที่ได้รับสารโคลชิซิน ไม่ได้เกิดต้นที่เป็นโพลีพลอยด์ทุกต้น และใน 1 กอ ซึ่งประกอบด้วยต้นจำนวนมาก มีทั้งต้นที่เป็น 2n และ 4n

พืชที่มีโครโมโซม 4n จะมีความแตกต่างจากพืชที่มีโครโมโซม 2n อย่างชัดเจน ทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาของพืช และขนาดของเซลล์โดยเฉพาะ ขนาดของปากใบ และเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อบุผิวใบ ต้นที่มีโครโมโซม 4n จะมี ขนาดของปากใบโตกว่าเกือบ 2 เท่า ดังนั้นในการตรวจสอบพันธุ์พืช นอกจากใช้วิธีนับจำนวนของโครโมโซมแล้ว ยังสามารถใช้วิธี วัดขนาดของปากใบ นับจำนวนปากใบได้ นอกจากนี้ผักหวานบ้านที่มีโครโมโซม 4n มีสารอาหารบางชนิดเพิ่มขึ้นจากเดิม เช่น โปรตีน เหล็ก กรดแอสคอร์บิค เบต้า-แคโรทีน และความชื้น

จากการตรวจสอบหาสารสำคัญ ในผักหวานบ้านทั้งสองพันธุ์พบว่ามี Alkaloid Flavonoid Sterol / triterpene ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญทางเภสัช สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่พบว่าในผักหวานบ้านมีสารที่มีฤทธิ์อยู่ 6 ชนิด (Wang, Perng-Haur-Lee, Shoei-Sheng, 1997) สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ อวัยวะของพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุดคือราก เพราะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นยาได้ดีกว่าใบและลำต้น

จากการวิจัยครั้งนี้ทำให้เห็นข้อแตกต่างของผักหวานบ้านทั้งสองพันธุ์ โดยผัก

หวานบ้านพันธุ์ใหม่มีประโยชน์ทางคุณค่าอาหารมากกว่าพันธุ์เดิม ควรนำมาใช้เป็นอาหาร หรือผลิตเป็นอาหารเสริม เพราะให้ธาตุเหล็กและโปรตีน สูงกว่า และปลอดภัยต่อผู้บริโภค เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มน้อยกว่า สำหรับผักหวานบ้านพันธุ์เดิมมีค่าเปอร์เซ็นต์ Inhibition สูงกว่าผักหวานบ้านพันธุ์ปรับปรุง ดังนั้นจึงควรนำมาใช้เป็นยา โดยเฉพาะส่วนของราก

เอกสารอ้างอิง

Elgsti, O.J. and Dustin, P. *Colchicine in Agriculture Medicine Biology and Chemistry.* USA : Iowa State College Press. Ames. 1955.

Hulshof,P.J.M,Xu,C., Bovenkamp,P.,Van de,Muhilal,West,C.E. "Application of a Validated method for the determination of provitamin A carotenoids in Indonesian foods of different maturity and origin" *Agricultural and food chemistry* (USA),V.45(4) (1997) : 1174-1179.

Krishnamoorthy, H.N. *Plant Growth Substances.* New Delhi :Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 1981.

Murashige, T. and Skoog, F."A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture ." *Physiol Plant* 15(1962) ; 473-497.

Sacristan, M. D. "Karyotypic Changes in Callus Cultures from Haploid Plants of Crepis capillaris (L.) Wallr." *Chromosoma,* 33(1971) ; 273-283.

Wang Perng-Haur, Lee, Shoei-Sheng. "Active Chemical Constituents from *Sauropus androgynus." J. Chiny Chem. Soc. (Taipei)* 44(2) (1997) : 145-149.