ผลของ Jasmonic acid และ Yeast extract ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ

โดย

นางสาวรัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Ref. code: 25595709032527ELH

ผลของ Jasmonic acid และ Yeast extract ต่อปริมาณสารทุติยภูมิ ของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ

โดย

นางสาวรัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Ref. code: 25595709032527ELH

EFFECTS OF JASMONIC ACID AND YEAST EXTRACT ON SECONDARY METABOLITE CONTENTS IN SHOOT CULTURE OF *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill

BY

MISS RATCHANEEWAN JIRAPONGPATTANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (AGRICULTURAL TECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2016

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

Ref. code: 25595709032527ELH

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวรัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา

เรื่อง

ผลของ Jasmonic acid และ Yeast extract ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)

เมื่อ วันที่ 5 เมษายน พ.ศ. 2560

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ _____
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณพร อิฐรัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก _____
(รองศาสตราจารย์ ดร.เยาวพา จิระเกียรติกุล)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม _____
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุมาศ ฤทธิไชย)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ _____
(อาจารย์ ดร.นงลักษณ์ เทียนเสรี)

คณบดี _____
(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของ Jasmonic acid และ Yeast extract ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวรัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	เทคโนโลยีการเกษตร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.เยาวพา จิระเกียรติกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุมาศ ฤทธิไชย
ปีการศึกษา	2559

บทคัดย่อ

หัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ส่วนเหง้าร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในการรักษาโรคมะเร็ง โรคน้ำเหลืองเสีย และเอดส์ พืชชนิดนี้สามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่การเพิ่มจำนวนยอดยังไม่ดีพอ ดังนั้นจึงศึกษาผลของน้ำมะพร้าว (CW) และ indole-3-acetic acid (IAA) ต่อการเพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ นอกจากนี้ ศึกษาการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของยอดที่พัฒนาโดยใช้สารกระตุ้น jasmonic acid (JA) และ yeast extract (YE) รวมถึงศึกษาผลของระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นต่อปริมาณสารทุติยภูมิ

การเพิ่มจำนวนยอดโดยเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติมผงถ่าน (activated charcoal: AC) ความเข้มข้น 0.01% 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 15 และ 20% ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 mg/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 20% และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) มากที่สุด โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรดังกล่าวมีจำนวนยอด 1.85±0.11 ยอด และจำนวนข้อ 2.04±0.13 ข้อต่อยอด

การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิด้วยสารกระตุ้นโดยเติม JA ความเข้มข้น 50 100 และ 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2 3 และ 4 g/l ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า YE

Ref. code: 25595709032527ELH

ความเข้มข้น 3 g/l ส่งผลให้ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) มีการสร้าง และสะสมสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 1,254.76±72.06 µg diosgenin/g dry extract หรือ 1.99 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100 µM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 17.94±3.42 - 18.98±3.59 µg/ml) ดีกว่าสิ่งทดลองควบคุม และ YE ทุกความเข้มข้น (EC_{50} เท่ากับ 28.73±3.06 – 53.66±2.25 µg/ml)

การศึกษาระยะเวลาในการกระตุ้นให้สร้างสารทุติยภูมิ โดยเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมหรือไม่เติม YE ความเข้มข้น 3 g/l เป็นระยะเวลานาน 1 2 4 และ 6 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่มี YE ความเข้มข้น 3 g/l นาน 2 สัปดาห์ มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 1,233.33±47.15 µg diosgenin/g dry extract หรือเพิ่มขึ้น 1.93 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ YE นาน 2 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม YE ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

คำสำคัญ: หัวข้าวเย็น, *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, ซาโปนินทั้งหมด, jasmonic acid, yeast extract, สารกระตุ้น

Ref. code: 25595709032527ELH

Thesis Title	EFFECTS OF JASMONIC ACID AND YEAST EXTRACT ON SECONDARY METABOLITE CONTENTS IN SHOOT CULTURE OF *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill
Author	Miss Ratchaneewan Jirapongpattana
Degree	Master of science (Agricultural Technology)
Major Field/Faculty/University	Agricultural Technology Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Associate Professor Yaowapha Jirakiattikul, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Panumart Rithichai, Dr.Agr.Sci
Academic Years	2016

ABSTRACT

Dioscorea birmanica Prain & Burkill is a medicinal plant which its rhizome has been used with other medicinal plants for the treatment of cancers, lymphatic diseases and AIDS. This plant species could be propagated by plant tissue culture technique but the shoot multiplication rate was not high enough. Therefore, the effects of coconut water (CW) and indole-3-acetic acid (IAA) on shoot multiplication was examined. In addition, the enhancement of secondary metabolites in the regenerated shoots by elicitation with jasmonic acid (JA) and yeast extract (YE) was investigated. The effect of YE culture period was also determined.

For shoot multiplication, node explants were cultured on MS medium supplemented with 0.01% activated charcoal (AC), 2 mg/l 6-benzyladenine (BA), 15 and 20% CW, and 0.1, 0.5, 1 and 2 mg/l IAA for 6 weeks. The results showed that MS medium supplemented with 0.01% AC, 2 mg/l BA, 20% CW and 0.1 mg/l IAA was the most suitable medium for shoot multiplication of *D. birmanica* Prain & Burkill. The regenerated shoots on this medium exhibited the numbers of shoots and nodes/shoot of 1.85 ± 0.11 and 2.04 ± 0.13, respectively.

Ref. code: 25595709032527ELH

For secondary metabolite enhancement using elicitation method, 50, 100 and 150 μM JA, and 2, 3 and 4 g/l YE were added into the culture medium and shoots were cultured for 4 weeks. The result revealed that the amount of total saponin accumulation was significantly increased (1,254.76 ± 72.06 μg diosgenin/g dry extract) in *D. birmanica* Prain & Burkill shoots at 3 g/l YE or 1.99 times of that of the control treatment. However, the shoots cultured on MS medium supplemented with 50 and 100 μM JA had the greatest DPPH radical scavenging activities (EC_{50} = 17.94±3.42 and 18.98±3.59 μg/ml, respectively.) while EC_{50} of the control treatment and YE at all concentrations were 28.73 ± 3.06 - 53.66 ±. 2.25 μg/ml.

Culture period for the induction of secondary metabolites was investigated by culturing *D. birmanica* Prain & Burkill shoots on MS medium supplemented with or without 3 g/l YE for 1, 2, 4 and 6 weeks. It was indicated that the shoots cultured on medium supplemented with 3 g/l YE for 2 weeks contained the highest total saponin content of 1,233.33 ± 47.15 μg diosgenin/g DW or 1.93 times higher than the non-YE shoots cultured for 2 weeks. However, YE had no effect on total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of *D. birmanica* Prain & Burkill shoots cultured under aseptic conditions.

Keywords: Hua-Khao-Yen, *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, total saponin, jasmonic acid, yeast extract, elicitor

Ref. code: 25595709032527ELH

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เยาวพา จิระเกียรติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าให้ความรู้ แนวคิด คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่ดี ตลอดจนแก้ไขปัญหาต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุมาศ ฤทธิไชย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษา ช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และข้อเสนอแนะต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณพร อิฐรัตน์ และอาจารย์ ดร. นงลักษณ์ เทียนเสรี ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการเป็นกรรมการ และตรวจสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ และแก้ไขงานวิจัยฉบับนี้ให้ดี และสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2557 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ช่วยเหลือค่าอุปกรณ์ต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ศรีโสภา เรืองหนู และนายวรวัฒน์ สุราฤทธิ์ ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำในการทำการทดลอง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และบุคลากรของสถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทย์ศาสตร์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา รวมทั้งเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย คุณพิสมัย โพธิ์ศรี ที่ช่วยติดต่อประสานงานกับคณะจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และบุคลากรของภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ และช่วยเหลือในทุกๆ ด้านเป็นอย่างดี

ท้ายสุด ขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัว พี่ และเพื่อนที่ช่วยให้มีกำลังใจ ช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์นี้ ขอขอบคุณทุกคำพูด ทุกข้อความ ทุกกำลังใจที่ส่งมาเพื่อให้สามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

นางสาวรัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา

Ref. code: 25595709032527ELH

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 หัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill)	5
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	5
2.1.2 สารทุติยภูมิที่พบ	5
2.1.3 สรรพคุณในการรักษาโรค	6
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	9
2.3 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites)	13

Ref. code: 25595709032527ELH

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.1 ซาโปนินไกลโคไซด์ หรือซาโปนิน	14
2.3.2 สารประกอบฟีนอลิก	16
2.4 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	17
2.5 การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ	19
2.5.1 สารกระตุ้น (elicitors)	20
2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้น	23
2.5.3 กลไกระดับโมเลกุลในการสร้างสารทุติยภูมิโดยสารกระตุ้น	26
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	28
3.1 พืชทดลองและสภาพการเพาะเลี้ยง	28
3.2 อาหารเพาะเลี้ยงและวิธีการเตรียม	28
3.3 สารกระตุ้นและการเตรียม	29
3.4 การทดลองที่ 1 ผลของ CW และ IAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ	30
3.5 การทดลองที่ 2 ผลของ JA และ YE ความเข้มข้นต่างๆต่อปริมาณสารทุติยภูมิ	31
3.5.1 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด	32
3.5.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	33
3.5.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity	34
3.6 การทดลองที่ 3 ผลของ YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิ	35
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	35
3.8 สถานที่ทำการทดลอง	35
3.9 ระยะเวลาในการทดลอง	36

Ref. code: 25595709032527ELH

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	37
4.1 การทดลองที่ 1 ผลของ CW และ IAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ	37
4.2 การทดลองที่ 2 ผลของ JA และ YE ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารทุติยภูมิ	42
4.2.1 น้ำหนักสดและแห้งยอด	42
4.2.2 % น้ำหนักแห้ง	43
4.2.3 % yield	45
4.2.4 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด	46
4.2.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	48
4.2.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50})	49
4.3 การทดลองที่ 3 ผลของ YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิ	53
4.3.1 น้ำหนักสดและแห้งยอด	53
4.3.2 % น้ำหนักแห้ง	56
4.3.3 % yield	57
4.3.4 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด	57
4.3.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	60
4.3.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50})	61
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	64
5.1 สรุปผลการทดลอง	64
5.2 ข้อเสนอแนะ	65
รายการอ้างอิง	66

Ref. code: 25595709032527ELH

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	77
ก. ขั้นตอนการเตรียมอาหาร	78
ก-1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS	78
ก-2 การเตรียม stock solution ของ PGR	80
ก-3 วิธีคำนวณ และการเตรียมสาร JA	80
ข. วิธีการวิเคราะห์ซาโปนิน	82
ข-1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง	82
ข-2 การเตรียมสารละลาย	83
ข-3 วิธีทดสอบ	83
ข-4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด	84
ค. กราฟมาตรฐานของ BHT	85
ง. น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % yield ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	86
ประวัติผู้เขียน	88

Ref. code: 25595709032527ELH

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ฮอร์โมนในน้ำมะพร้าวอ่อน 13

3.1 ส่วนประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog) 29

3.2 ความเข้มข้นของ CW และ IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลองที่ 1 30

4.1 การเกิดยอด (%) จำนวนยอดที่พัฒนา จำนวนข้อต่อยอด ความยาวยอด (cm) เมื่อเพาะเลี้ยงข้อของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) บนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 15 และ 20% และ IAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 mg/l เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ 38

4.2 อัตราการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (D. birmanica Prain & Burkill) บนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 15 และ 20% และ IAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 mg/l เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ 41

4.3 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % yield ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 52

4.4 % yield ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1-6 สัปดาห์ 58

4.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1-6 สัปดาห์ 60

ตารางผนวกที่

ก.1 การเตรียม stock อาหารสูตร MS (Murashige & Skoog) 79

ง.1 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % yield ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ 86

ง.2 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ 87

Ref. code: 25595709032527ELH

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 หัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill): A ลำต้นเหนือดิน, B เหง้า	6
2.2 ต้นตัวผู้ของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) : A ลักษณะช่อดอก; B หนาม; C ช่อดอก; D ดอกย่อย; E กลีบประดับของดอกย่อย; F, G ดอกตัวผู้; H, J กลีบประดับและกลีบประดับย่อยที่ติดกับโคนก้านดอก; K, L ภายนอกและภายในของกลีบ แสดงตำแหน่งของเกสรตัวผู้; M หนามด้านข้างข้อ; N เหง้า	7
2.3 ต้นตัวเมียของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) : A ช่อดอก; B ด้านข้างของดอก; C ด้านบนของดอก; D แสดงส่วนของเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน ก้านเกสรตัวเมียและยอดเกสรตัวเมีย; E, F กลีบประดับและกลีบประดับย่อยที่ติดกับโคนก้านดอก; G, H ภาย นอกและภายในของกลีบรวม, แสดงตำแหน่งของเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน; J ผลแก่ แสดงตำแหน่งของเมล็ดที่อยู่ภายในผล; K เมล็ด	8
2.4 โครงสร้างของ Jasmonic acid	21
2.5 ลำดับเหตุการณ์การตอบสนองของพืชต่อสิ่งรบกวน	27
3.1 ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	28
3.2 การสกัดตัวอย่างแห้งของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ตามวิธีของ Jaiarree et al. (2010)	32
3.3 กราฟมาตรฐานของซาโปนิน	33
3.4 กราฟมาตรฐานของ gallic acid	34
4.1 ลักษณะของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์	39
4.2 เปรียบเทียบลักษณะของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ระหว่างสิ่งทดลองควบคุม และสูตรอาหารที่ดีที่สุด ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ A) อาหารสูตรพื้นฐาน) B) MS ที่เติม 0.01% AC ร่วมกับ 20% CW 2 mg/l และ 0.1 mg/l IAA	40
4.3 ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) เป็นเวลา 4 สัปดาห์	43

Ref. code: 25595709032527ELH

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.4 น้ำหนักสดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์	44
4.5 น้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์	44
4.6 % น้ำหนักแห้ง ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์	45
4.7 % yield ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์	46
4.8 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์	47
4.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์	49
4.10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์	50
4.11 ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติมหรือไม่เติม YE ความเข้นข้น 3 g/l เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์	54
4.12 น้ำหนักสดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมหรือไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์	55
4.13 น้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมหรือไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์	55

Ref. code: 25595709032527ELH

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.14 % น้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมหรือไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์ 57

4.15 ปริมาณซาโปนินทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมหรือไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์ 58

4.16 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมหรือไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์ 63

ภาพผนวกที่

ค.1 กราฟมาตรฐานของ BHT 85

Ref. code: 25595709032527ELH

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

หัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Dioscoreaceae เป็นไม้เถาเลื้อย มีลำต้นใต้ดิน สะสมอาหารในเหง้า และทุกส่วนมีหนาม พบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยในประเทศไทยพบบริเวณป่าดิบเขาและป่าโปร่ง (Wilkin and Thapyai, 2009) นิยมใช้ส่วนของเหง้าร่วมกันกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ หรือเป็นส่วนประกอบของยาจีนโบราณ (Attele et al., 1999) เพื่อรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคน้ำเหลืองเสีย โรคเอดส์ (Itharat et al., 2010) โรคเรื้อน โรคผิวหนัง โรคระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบตา หู คอ จมูก ระบบกล้ามเนื้อและกระดูก โรคระบบทางเดินปัสสาวะ (Itharat et al., 1999) โรคโลหิตเป็นพิษ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ระงับปวด ลดไข้ ต้านเซลล์มะเร็งปอด (อาทิมา และคณะ, 2548; วันทนา และคณะ, 2550) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Jaiarree et al., 2010) มีการใช้พืชชนิดนี้ในการรักษามะเร็งในกลุ่มแพทย์พื้นบ้านสูงถึง 52.2% (Itharat et al., 1999) โดยสารสกัดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในชั้นเอทานอล เมื่อแยกสารบริสุทธิ์พบสารในกลุ่มซาโปนิน (saponin) คือ sapogenin ที่เรียกว่า diosgenin ซึ่งมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ (Jaiarree et al., 2010)

จากสรรพคุณดังกล่าว ทำให้ความต้องการใช้พืชชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น จึงได้ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการ มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) แล้วโดยอรอุมา (2556) พบว่าข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 2 mg/l สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้สูงสุด 80.95% โดยมีจำนวนยอดที่พัฒนา 2.8±0.5 ยอด เมื่อเพิ่มจำนวนยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 0.1 mg/l และผงถ่าน (activated charcoal; AC) ความเข้มข้น 0.01% พบว่า เกิดยอด 100% แต่ยอดใหม่พัฒนาเพียง 1.0±0.0 ยอด จากการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่า จำนวนยอดที่พัฒนายังค่อนข้างน้อย จึงจำเป็นต้องศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ซึ่งปริมาณและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินและไซโทไคนิน เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์, 2545; วราภรณ์, 2551) โดยน้ำมะพร้าวเป็นสารควบคุมการ

Ref. code: 25595709032527ELH

เจริญเติบโตในกลุ่มของ ไซโทไคนินชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดยอด (คำนูณ, 2542; ชวนพิศ, 2544) มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชหลายชนิด ที่เติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนยอด เช่น มะกอก (*Olea europaea* L.) (Peixe et al., 2007), เฮเซลนัท (*Corylus avellana* L.) (Prando et al., 2014) กีวี (*Actinidia deliciosa*) (Nasib et al., 2008) และข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia*) (Jirakiattikul et al., 2013) ส่วน IAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่นิยมเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง แต่เติมในความเข้มข้นที่น้อยกว่าสารในกลุ่มไซโทไคนินเพื่อเพิ่มจำนวนยอด (Bhojwani and Razdan, 1996) ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงข้อหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เพื่อเพิ่มจำนวนยอด มีรายงานโดยอรอุมา (2556) ได้เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l แต่ความเข้มข้นที่ใช้อาจจะยังไม่เหมาะสมเนื่องจากมียอดพัฒนาเพียง 1 ยอดดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ดังนั้นในงานวิจัยส่วนนี้จึงศึกษาผลของการเติมน้ำมะพร้าว และ IAA ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี AC ความเข้มข้น 0.1% และ BA ความเข้มข้น 2 mg/l ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill)

นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อการผลิตสารทุติยภูมิทดแทนการผลิตสารจากการเพาะปลูกในสภาพธรรมชาติของพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น จอกหูหนูยักษ์ (*Salvinia molesta* D.S. Mitchel) และผักตบชวา (*Eichornia crassipes* C. Mart. Solms) (Chantiratikul et al., 2009), มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) (Liu et al., 2008), *Dorystoechas hastate* Boiss. & Heldr. (Karagozler et al., 2008) และ *Dioscorea spp*. (Bhandari and Kawabata, 2003) ซึ่งพืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้นั้น เนื่องจากเซลล์พืชมียีนครบถ้วน สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการชีวสังเคราะห์ต่างๆ และสร้างสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ การผลิตสารจึงสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง (Buitelaar and Tramper, 1992; Banthorpe, 1994) ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้มีรายงานแล้วโดยพบว่ามีปริมาณสาร Diosgenin-3-O-**α**-L-rhamnopyranosyl (1->2)-**β**-D glucopyranoside (DBS1) 0.37% (w/w) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) 95.29 mg GAE/g dry extract และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) เท่ากับ 51.46 µg/ml แต่ปริมาณสารที่สกัดได้จากยอดในสภาพปลอดเชื้อนี้มีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเหง้าแม่ที่ปลูกในแปลงที่มีปริมาณ DBS1 3.27% (w/w) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 259.27 mg GAE/g dry extract และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) 11.42 µg/ml (อรอุมา, 2556) อย่างไรก็ตามในการผลิตสารทุติยภูมิด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นสามารถเติมสารกระตุ้น (elicitors) บางชนิดลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิ (วราภรณ์, 2551) โดย Jasmonic acid

Ref. code: 25595709032527ELH

(JA) และ yeast extract (YE) เป็นสารกระตุ้นที่นิยมใช้ และประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณสาร ทุติยภูมิโดยเฉพาะสารในกลุ่มซาโปนิน ในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น *Dioscorea membranacea* (Jirakiattikul et al., 2016) *Bacopa monnieri* L. (Kamonwannasit et al., 2008) และ *Panax ginseng* (Lu et al., 2001) JA เป็นสารสำคัญในระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการที่หลากหลายในพืช โดยกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวของพืชจากการทำลายของจุลชีพ แมลงต่างๆ รวมถึงความเครียดจากภายนอก นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมในบางขั้นตอนของกระบวนการเกิดสารทุติยภูมิ และ YE เป็นสารกระตุ้นการตอบสนองของพืชโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคในเซลล์พืช รวมไปถึงการสะสมสารทุติยภูมิ (วราภรณ์, 2551) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาผลของ JA และ YE รวมถึงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของน้ำมะพร้าว และ IAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ
2. เพื่อศึกษาผลของ JA และ YE ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด (total saponin) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ
3. เพื่อศึกษาผลของ YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาผลของน้ำมะพร้าว และ IAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารที่มีน้ำมะพร้าว และ IAA ความเข้มข้นต่างกัน จากนั้นศึกษาผลของ JA และ YE ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม JA และ YE ความเข้มข้นต่างกัน วิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เปรียบเทียบกับยอดที่ไม่ได้รับสาร แล้วศึกษาผลของ YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain

Ref. code: 25595709032527ELH

& Burkill) โดยเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่มี YE ความเข้มข้น 3 g/l เป็นระยะเวลานานต่างกัน เปรียบเทียบกับยอดที่ไม่ได้รับสาร วิเคราะห์หาปริมาณสาร และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลของน้ำมะพร้าว และ IAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ

2. ทราบผลของ JA และ YE ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

3. ทราบผลของ YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

Ref. code: 25595709032527ELH

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill)

หัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) อยู่ในวงศ์ Dioscoreaceae (Huber, 1988; Caddick et al., 2002) ถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนและกึ่งร้อน มีชื่อเรียกอื่นๆ ตามภาษาถิ่นหลายชื่อ เช่น กลอยเขา มันจ๊วก มันนก และหัวยั้ง (Boonyaratanakornkit and Chantarateptawan, 1993) พบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยในประเทศไทยพบบริเวณป่าดิบเขาและป่าโปร่ง เช่น แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ พะเยา ตาก พิษณุโลก และพระนครศรีอยุธยา (Wilkin and Thapyai, 2009)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มีลำต้นเหนือดินเป็นไม้เถาเลื้อย (ภาพที่ 2.1A) เลื้อยพันกับต้นอื่นในทิศทางเวียนไปทางซ้ายหรือตามเข็มนาฬิกา ส่วนของลำต้น ใบและเหง้ามีหนาม ลำต้นมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 - 10 mm เถายาวประมาณ 15 m มีข้อปล้อง เถามีสีเขียว กิ่งก้านแตกออกตามเถา ไม่มีมือเกาะ ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ มีขนาดใหญ่ ฐานใบกว้างและปลายใบแหลม ลักษณะเป็นรูปหัวใจ ขนาดความยาวใบมากกว่า 15 cm ความกว้างใบมีขนาดตั้งแต่ 10-16 cm มีเส้นใบ 7-9 เส้น เป็นแบบ palmately vein ออกจากฐานใบยาวไปถึงปลายใบ มีเหง้าสะสมอาหารใต้ดิน (ภาพที่ 2.1B) เปลือกภายนอกแข็ง เนื้อในมี fiber มาก และมีสีแดง ช่อดอกเป็นแบบไม่สมบูรณ์เพศ ลักษณะช่อดอกจะมีทั้งตัวผู้ (ภาพที่ 2.2) และตัวเมีย (ภาพที่ 2.3) เป็นชนิด spike ผลเป็นแบบ capsule มีปีก 3 ปีก เมล็ดมีลักษณะรูปไข่กว้างประมาณ 4.5-5.5 mm และมีปีกรอบขอบเมล็ดกว้าง 11-12 mm (Boonyaratanakornkit and Chantarateptawan, 1993; Wilkin and Thapyai, 2009)

2.1.2 สารทุติยภูมิที่พบ

จากการศึกษาของ Jaiarree (2010) ในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ต่อเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A 549 และ COR-L23 พบว่า มีค่า IC_{50} เป็น 6.14±0.08 และ 16.44±1.23 μg/ml ตามลำดับ แต่มีพิษน้อยต่อเซลล์ปกติชนิด MRC-5 จึงได้นำสารสกัดมาสกัดเพื่อแยกสารอีกครั้ง พบ Diosgenin-3-O-**α**-L-rhamnopyranosyl (1->2)-**β**-D glucopyranoside หรือ Prosapogenin A of dioscin (DBS1) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มซาโปนิน (saponin) พบว่า มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดสูงสุด โดยมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดชนิด A 549 และ COR-L23 (IC_{50} = 1.81±0.03 และ 1.84±0.05 μg/ml ตามลำดับ) รวมทั้งมีฤทธิ์น้อยในการต้าน

Ref. code: 25595709032527ELH

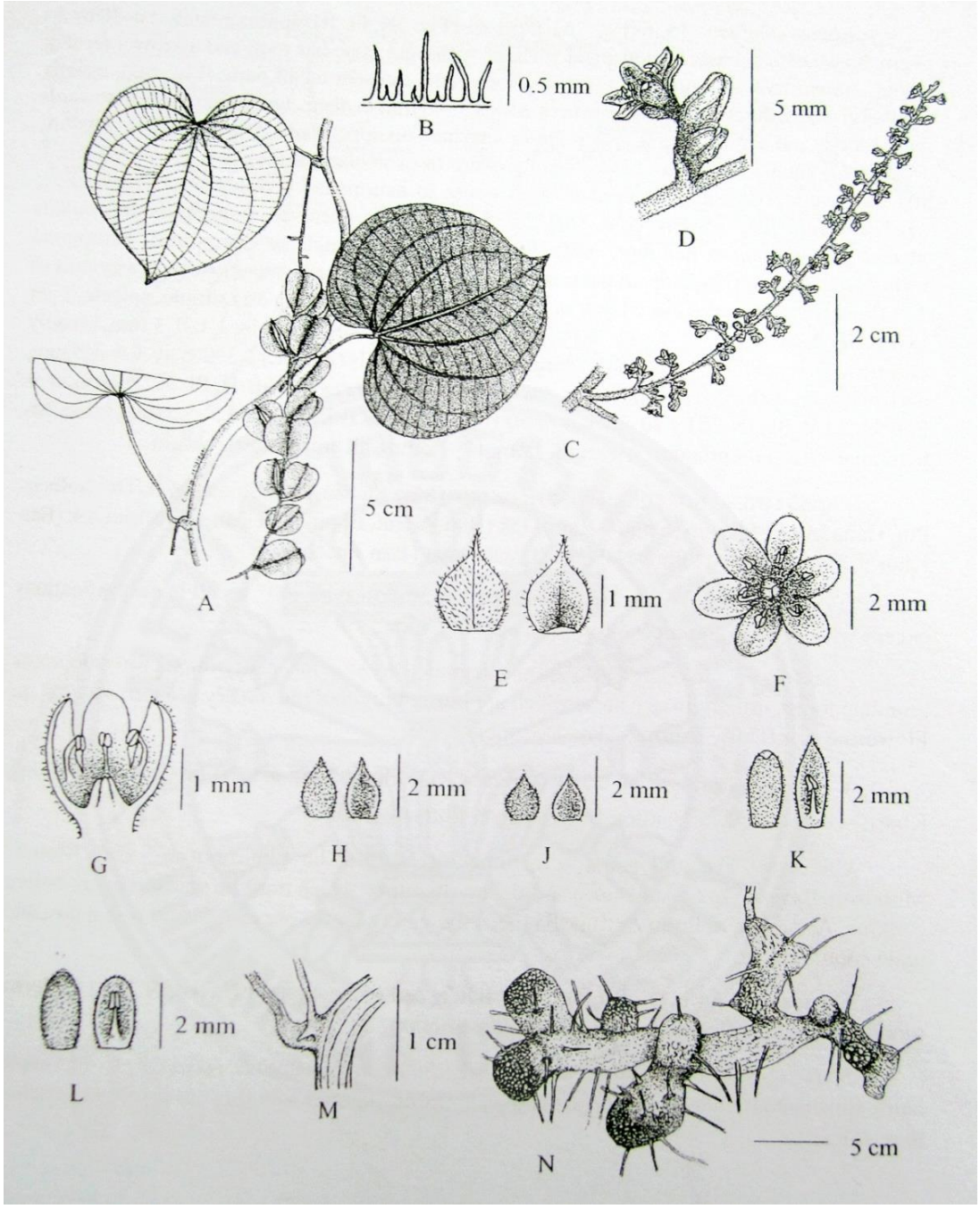
เซลล์ปกติที่ปอดชนิด MRC-5 (IC_{50} = 37.09±0.67 μg/ml) นอกจากนี้ปิยาภัทร์ (2556) ได้ศึกษาการเจริญเติบโต และการสะสมสารทุติยภูมิในหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ตั้งแต่ปลูกจนถึงอายุ 18 เดือนหลังปลูก พบว่า เหง้าหัวแม่มีปริมาณสาร DBS1 และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าเหง้าหัวลูกทุกอายุเก็บเกี่ยวรวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าเหง้าหัวลูก โดยเหง้าหัวลูกมีปริมาณสาร DBS1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำเมื่ออายุ 3 เดือนหลังปลูก หลังจากนั้นมีค่าสูงขึ้น และคงที่ในช่วงอายุ 9-18 เดือนหลังปลูก ส่วนปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้รายงานแล้วโดยอรอุมา (2556) พบว่า มีปริมาณสาร DBS1 0.37% (w/w) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 95.29 mg GAE/g dry extract และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 51.46 μg/ml ซึ่งมีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเหง้าแม่ที่ปลูกในแปลงอายุมากกว่า 1 ปี มีปริมาณ DBS1 3.27% (w/w) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 259.27 mg GAE/g dry extract และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 11.42 μg/ml

ภาพที่ 2.1 หัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill): A ลำต้นเหนือดิน, B เหง้า

2.1.3 สรรพคุณในการรักษาโรค

นิยมใช้ส่วนของเหง้าหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ เป็นส่วนประกอบของยาจีนโบราณ (Attele et al., 1999) เพื่อรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคน้ำเหลืองเสีย โรคเอดส์ (Itharat et al., 2010) โรคเรื้อน โรคผิวหนัง โรคระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบตา หู คอ จมูก ระบบกล้ามเนื้อและกระดูก โรคระบบทางเดินปัสสาวะ (Itharat et al., 1999) โรคโลหิตเป็นพิษ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ระงับปวด ลดไข้

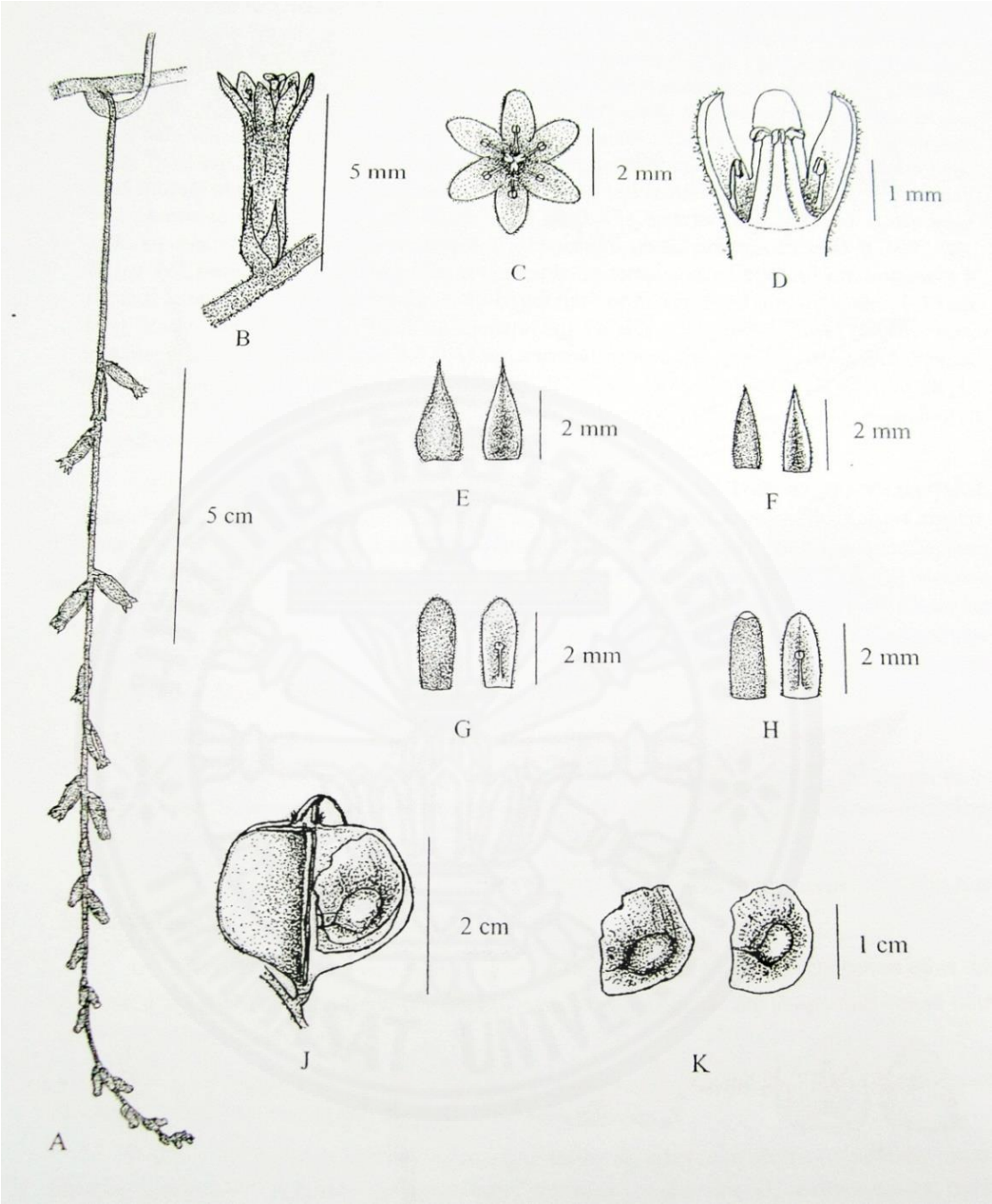
Ref. code: 25595709032527ELH



ภาพที่ 2.2 ต้นตัวผู้ของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) : A ลักษณะช่อดอก; B หนาม; C ช่อดอก; D ดอกย่อย; E กลีบประดับของดอกย่อย; F, G ดอกตัวผู้; H, J กลีบประดับและกลีบประดับย่อยที่ติดกับโคนก้านดอก; K, L ภายนอกและภายในของกลีบ แสดงตำแหน่งของเกสรตัวผู้; M หนามด้านข้างข้อ; N เหง้า

ที่มา: Wilkin และ Thapyai (2009)

Ref. code: 25595709032527ELH



ภาพที่ 2.3 ต้นตัวเมียของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) : A ช่อดอก; B ด้านข้างของดอก; C ด้านบนของดอก; D แสดงส่วนของเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน ก้านเกสรตัวเมียและยอดเกสรตัวเมีย; E, F กลีบประดับและกลีบประดับย่อยที่ติดกับโคนก้านดอก; G, H ภายนอกและภายในของกลีบรวม, แสดงตำแหน่งของเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน; J ผลแก่ แสดงตำแหน่งของเมล็ดที่อยู่ภายในผล; K เมล็ด

ที่มา: Wilkin และ Thapyai (2009)

Ref. code: 25595709032527ELH

ต้านเซลล์มะเร็งปอด (อาทิมา และคณะ, 2548; วันทนา และคณะ, 2550) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Jaiarree et al., 2010) ในการรักษาโรคมะเร็งมีการใช้พืชชนิดนี้สูงสุดในกลุ่มแพทย์พื้นบ้านถึง 52.2% (Itharat et al., 1999) โดยมีรายงานว่าสารสกัดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในชั้นเอทานอล มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ (Jaiarree et. al, 2010) นอกจากนี้ Jaiarree et al. (2010) รายงานว่า สาร DBS1 ที่สกัดจากเหง้าหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A 549 และ COR-L23 แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ด้วยสรรพคุณในการรักษาโรคมะเร็งและโรคต่างๆ จึงจำเป็นต้องขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต้นพืชสมุนไพรชนิดนี้ให้มากขึ้น โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชรวมถึงผลิตสารทุติยภูมิในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้สามารถผลิตสารได้อย่างต่อเนื่อง และมีเพียงพอต่อความต้องการ

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการนำเอาชิ้นส่วนของพืช เช่น โพรโทพลาสต์ (protoplast) เซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะ มาเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสง แล้วชิ้นส่วนพืชดังกล่าวสามารถพัฒนาไปเป็นอวัยวะ แคลลัส (callus) หรือเอมบริออยด์ (embryoid) (คำนูณ, 2542; อรดี, 2542) มีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เพื่อการขยายพันธุ์แล้ว โดยอรอุมา (2556) ซึ่งพบว่า การฟอกกำจัดเชื้อในสารละลาย tetracycline ร่วมกับการ sonicate นาน 30 นาที แล้วแช่ในสารละลาย คลอร็อกซ์ความเข้มข้น 15% นาน 20 นาที และ 10% นาน 15 นาที มีผลทำให้ชิ้นส่วนข้อมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด นอกจากนี้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l สามารถชักนำให้ข้อพัฒนาไปเป็นยอดได้ดีที่สุด และสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ 1.0±0.0 ยอด บนอาหารสูตร WPM (woody Plant Medium) ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/l และอาหารสูตร MS หรือ WPM ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/l และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l ส่วนการชักนำให้เกิดราก พบว่า อาหารสูตร ½MS (half strength MS) ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ NAA (naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 4 mg/l สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 100% โดยมีจำนวนราก และความยาวรากเหมาะสมต่อการออกปลูก อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาดังกล่าวพบว่า มียอดที่พัฒนาบนอาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรเพียง 1.0±0.0 ยอด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาสูตรอาหารในการเพิ่มจำนวนยอดที่เหมาะสมเพื่อให้มีการพัฒนาของยอดเพิ่มมากขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ

Ref. code: 25595709032527ELH

อาหารเพาะเลี้ยงนั้นประกอบไปด้วยธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน กรดอะมิโน วิตามิน ในปริมาณที่แตกต่างกันไป โดยปริมาณและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน และไซโทไคนินที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ เช่น เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ปลายยอดหรือตาข้าง (วราภรณ์, 2551) นอกจากนี้ Bhojwani and Razdan (1996) ได้กล่าวไว้ว่า ชิ้นส่วนพืชจะใช้สารทั้ง 2 กลุ่มในสัดส่วนที่เหมาะสมเพื่อกระตุ้นการเกิดหรือเพิ่มจำนวนยอด โดยมักมีความเข้มข้นของไซโทไคนินสูงกว่าออกซิน อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงปริมาณฮอร์โมนที่มีอยู่ในพืชด้วย ดังนั้นความเข้มข้นของออกซินและไซโทไคนินที่ใช้จึงแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดพืช สายพันธุ์ อายุของชิ้นส่วนพืช ระยะเวลาการพัฒนา เป้าหมายของการเพาะเลี้ยง และสถานะของอาหาร (รังสฤษดิ์, 2545) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Dioscorea* ชนิดอื่นเพื่อเพิ่มจำนวนยอดก็มีรายงานบ้างแล้ว เช่น การเพาะเลี้ยงข้อของ *D. oppositifolia* L. และ *D. pentaphylla* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP (benzylaminopurine) ความเข้มข้น 2 mg/l และ AC ความเข้มข้น 0.3% (w/v) พบว่า มีการพัฒนาของยอด 89.3 และ 87.8% โดยมียอดใหม่พัฒนา 7.5 และ 5.16 ยอด ตามลำดับ (Poornima and Ravishankar, 2007) หรือใน *D. zingiberensis* C.H. Wright พบว่า ข้อสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ถึง 88.9% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 g/l NAA ความเข้มข้น 1.1 μM และ BAP ความเข้มข้น 4.4 μM เป็นเวลา 20 วัน (Chen et al., 2003) และเมื่อเพาะเลี้ยงข้อของ *D. hispida* บนอาหารสูตร WPM ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดและมีจำนวนข้อมากที่สุด (Shukla and Shukla, 2013) จากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าพืชในสกุลนี้ สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ดีเมื่อเติม BA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน และอาจเติมสารในกลุ่มออกซินร่วมด้วย แต่ความเข้มข้นของสารที่ใช้จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน มีคุณสมบัติดังนี้

สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (auxins) เป็นกลุ่มของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ให้มีการแบ่ง และยืดตัวของเซลล์ แหล่งสังเคราะห์ออกซินในพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก ปลายโคลิออฟไทล์ (coleoptile) ใบอ่อน ดอก ผล และคัพภะ (คำนูณ, 2542; ชวนพิศ, 2544) โดยออกซินที่สร้างบริเวณปลายยอดจะควบคุมการแตกตาข้าง ส่งเสริมหรือชักนำการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ ออกซินที่พืชสร้างได้ตามธรรมชาติมี 3 ชนิด คือ IAA PAA (phenylacetic acid) และ 4-chloro-IAA (4-chloro-indoleacetic acid) ส่วนออกซินที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้แก่ NAA 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) และ IBA (indole butyric acid) ออกซินที่นิยมใช้มากที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ IAA เนื่องจากมีผลเสียต่อการเกิดอวัยวะน้อยกว่าออกซินชนิดอื่นเมื่อเปรียบเทียบกับ NAA PAA และ 4-chloro-IAA (รังสฤษดิ์, 2545) จากการที่ IAA ถูกทำลายได้ง่ายด้วยแสง และเอนไซม์ ดังนั้น

Ref. code: 25595709032527ELH

การใช้ IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงจึงใช้ความเข้มข้นสูง เช่น 1-30 mg/l อย่างไรก็ตาม NAA และ IBA พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่า IAA (นพดล, 2537) โดย NAA จะใช้ในปริมาณที่น้อยประมาณ 0.1-0.2 mg/l (คำนูณ, 2542) ส่วน 2,4-D ก็เป็นอีกชนิดหนึ่งที่ใช้อย่างแพร่หลาย มีคุณสมบัติในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะ และใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนและรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ แต่ 2,4-D มีข้อจำกัดคือ ไม่นิยมใช้กับพืชใบเลี้ยงคู่ เนื่องจากสารชนิดนี้นิยมใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทใบกว้าง (รังสฤษดิ์, 2545)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สารในกลุ่มออกซินจะกระตุ้นการยืดยาวของรากพืช โดยใช้ความเข้มข้นในระดับต่ำ เพราะหากใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น การยืดยาวของรากจะถูกยับยั้ง ออกซินมีผลกระตุ้นให้เกิดรากหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับสมดุลของฮอร์โมนภายในต้นพืชนั้นๆ ด้วย (นพดล, 2537) นอกจากนี้ การเติมออกซินที่ความเข้มข้นต่ำกว่าไซโทไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถส่งเสริมการเกิดยอดของพืชในสภาพปลอดเชื้อได้ (Bhojwani and Razdan, 1996) ดังรายงานการเพาะเลี้ยงข้อของ *Bambusa arundinacea* (Retz.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5-5 mg/l ร่วมกับ IBA NAA และ IAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3 mg/l ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด (87.2%) และมีจำนวนยอดสูงที่สุด (24 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) (Venkatachalam et al., 2015) นอกจากนี้ Beena et al. (2003) ได้เพาะเลี้ยงตาข้างของ *Ceropegia candelabrum* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2.46 μM เป็นเวลา 40 วัน พบว่า มียอดพัฒนาสูงสุด เท่ากับ 7.8 ยอด เช่นเดียวกันกับพืชในสกุล *Dioscorea* ตามที่ได้รายงานไปแล้วข้างต้นใน *D. zingiberensis* C.H. Wright (Chen et al., 2003)

สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน (cytokinins) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พบมากบริเวณปลายราก เอมบริโอ ผลอ่อน และในน้ำมะพร้าว สามารถเคลื่อนย้ายไปในส่วนของใบ ลำต้น และส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ หรือ xylem (สมบุญ, 2544) ไซโทไคนินที่พบในธรรมชาติสามารถพบได้ทั้งในพืช และแบคทีเรีย อยู่ในรูปอิสระ หรือรูปที่จับกับโมเลกุลอื่นๆ และเป็นองค์ประกอบของ tRNA (วันทนี, 2542) สารสังเคราะห์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไคเนติน (kinetin) 2-iP (N6-isopentenyladenine) และ BA เป็นต้น ความเข้มข้นของไซโทไคนินที่นิยมใช้อยู่ระหว่าง 1-10 mg/l (รังสฤษดิ์, 2545) หน้าที่หลักของไซโทไคนิน คือ ช่วยให้ไซโตพลาสซึมของเซลล์เกิดการแบ่งตัวในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ลำต้น และราก (นิตย์, 2541) เร่งการขยายตัวของเซลล์ ส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์ในส่วนที่ตัดจากแผ่นใบ และใบเลี้ยง (สมบุญ, 2544) ส่งเสริมการสร้างและการเจริญของตา เป็นต้น (คำนูณ, 2542) โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน และไซโทไคนินมีปฏิกิริยาร่วมกัน และอัตราส่วนระหว่างออกซิน และไซโทไคนินมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนพืช คือ ถ้ามีออกซินมากเกินไปเนื้อเยื่อจะมีการพัฒนาเป็นรากจำนวนมาก มีการเจริญของ

Ref. code: 25595709032527ELH

ตาเพียงเล็กน้อย และในทางกลับกันถ้าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีไซโทไคนินมาก เนื้อเยื่อจะมีการเจริญของตามาก และมีการเจริญของรากน้อย (รังสฤษดิ์, 2545)

ในขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนยอดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น มักนิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งนอกจากสารสังเคราะห์จำพวก BA และ kinetin ที่นิยมใช้แล้ว ยังนิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มนี้ในรูปอินทรียสารหรือสารธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว ซึ่งมี zeatin อยู่มาก (วราภรณ์, 2553) โดยสารประกอบที่แยกได้จากน้ำมะพร้าว ได้แก่ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ กรดนิวคลีอิก พิวรีน (Purine) น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และธาตุอาหาร เป็นต้น (Uphade et al., 2008) สารควบคุมการเจริญเติบโตในน้ำมะพร้าวมีทั้งออกซิน ไซโทไคนิน จิบเบอเรลลิน (gibberellins) และกรดแอบไซซิก (abscisic acid) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (ปรียา, 2556)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด มีรายงานการใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมน้ำมะพร้าวเพื่อส่งเสริมการเกิดยอด หรือเพิ่มจำนวนยอด เช่น มะกอก (*O. europaea* L.) พบว่า ยอดมีการพัฒนา 3.4 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร olive medium ที่เติมน้ำมะพร้าว 50 ml/l ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 8.87 mM เป็นเวลา 30 วัน (Peixe et al., 2007) หรือในต้นเฮเซลนัท (*C. avellana* L.) พบว่า ข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½DKW (basal Juglans medium) ที่เติมน้ำมะพร้าว 20% (v/v) BAP ความเข้มข้น 2 mg/l IAA ความเข้มข้น 0.01 mg/l และ GA_3 (gibberellic acid) ความเข้มข้น 0.5 mg/l สามารถเพิ่มจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชได้สูงสุด (Prando et al., 2014) ส่วนในกีวี (*A. deliciosa*) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 20% (v/v) ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2 mg/l ส่งผลให้ความยาวยอด จำนวนยอด และจำนวนข้อสูงสุดเท่ากับ 7.2 ± 0.16 cm 11.5 ± 1.5 ยอด และ 4.6 ± 0.22 ข้อ ตามลำดับ (Nasib et al., 2008) นอกจากนี้ในข้าวเย็นเหนือ (*S. corbularia*) พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงถึง 95-100% โดยมีจำนวนยอดและจำนวนข้อสูง 1.0-1.3 ยอด และ 4.4-5.0 ข้อ/ยอด ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร ½MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/l หรืออาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/l และ IAA ความเข้มข้น 0.5-1 mg/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (Jirakiattikul et al., 2013) จะเห็นได้ว่าการเติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถส่งเสริมการเพิ่มจำนวนยอดของพืชแต่ละชนิดได้ โดยมักใช้น้ำมะพร้าวที่ความเข้มข้น 15% หรือ 20% อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนยอดจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด

Ref. code: 25595709032527ELH

ตารางที่ 2.1 ฮอร์โมนในน้ำมะพร้าวอ่อน

สารควบคุมการเจริญเติบโต	nM	สารควบคุมการเจริญเติบโต	nM
auxin			
indole-3-acetic acid	150.6		
cytokinins			
N^6-isopentenyladenine	0.26	trans-zeatin O-glucoside	48.7
dihydrozeatin	0.14	trans-zeatin riboside	76.2
trans-zeatin	0.09	kinetin riboside	0.33
kinetin	0.31	trans-zeatin riboside-5'-	10.2
ortho-topolin	3.29	monophosphate	
dihydrozeatin O-glucoside	46.6		
gibberellins			
gibberellins 1	16.7	gibberellins 3	37.8
abscisic acid	65.5		

ที่มา: ปรียา (2556)

2.3 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

สารทุติยภูมิมีในสิ่งมีชีวิตบางจำพวกเท่านั้น และไม่จำเป็นต่อการดำรงชีพ แต่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารนั้นๆ เช่น อาจจะเป็นสารที่ใช้ในกระบวนการป้องกันตัวเอง (self-defense) จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณที่มากขึ้น เช่น แทนนิน ที่มีรสฝาดทำให้ศัตรูพืชไม่กินใบพืชชนิดนั้นอีก หรือเกิดกระบวนการ Systemic Acquired Resistance (SAR) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นหลังจากที่ได้รับสัญญาณที่มาจาก hypersensitive response (HR) นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถของสารทุติยภูมิเป็น free radical-scavenger หรือ antioxidant หรือ chemoresistance agent หรือ antimutative agent อย่างกว้างขวาง ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นหลังกระบวนการติดเชื้อ และพืชสามารถรอดตายจากการติดเชื้อ (Taiz and Zeiger, 2006) พืชแต่ละชนิดมีกลไกการป้องกันตัวเองที่แตกต่างออกไปเมื่อถูกรบกวนโดยสิ่งมีชีวิตกินพืช (ศุภวรรณ, 2549) สิ่งมีชีวิตที่สามารถพบสารทุติยภูมิได้ เช่น สัตว์ เชื้อรา สาหร่าย แบคทีเรีย และพืช ซึ่งสร้างมาจากสารปฐมภูมิเพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ กรดอะมิโนอัลฟ่า (**α**-amino acid) อะเซททิลโคเอนไซม์-เอ (acetyl coenzyme A) กรดเมวาโลนิค (mevalonic acid) และ

Ref. code: 25595709032527ELH

สารประกอบที่อยู่กลางเส้นทางสังเคราะห์กรดซิกิมิค (shikimic acid) สารทุติยภูมิที่ผลิตมีความจำเพาะเจาะจงสูงกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารนั้นๆ ซึ่งสารทุติยภูมิที่พบในพืชมีหลายกลุ่ม เช่น แอลคาลอยด์ (alkaloid) เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ฟีนอลิก (phenolic) สเตียรอยด์ (steroid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นต้น (Schmeda-Hirschmann et al., 2005) โดยการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืชมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโตของพืช สารทุติยภูมิอาจสร้างขึ้นมากในระยะที่พืชยังอายุน้อย (juvenile phase) หรือในช่วงที่พืชเข้าสู่ระยะเจริญเติบโตเต็มที่ (mature phase) (Banthorpe, 1994) นอกจากนี้ พืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถสร้างสารทุติยภูมิได้เหมือนกับต้นแม่ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์พืชมียีนครบถ้วน สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการ ชีวสังเคราะห์ต่างๆ และสร้างสารทุติยภูมิได้ (Buitelaar and Tramper, 1992; Banthorpe, 1994) โดยการผลิตสารนั้นไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพภูมิศาสตร์ ฤดูกาล หรือสภาพแวดล้อมอื่นๆ เพราะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในสภาวะควบคุมในห้องทดลอง (วราภรณ์, 2551)

จากที่ได้รายงานมาแล้วข้างต้น หัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) มีสารทุติยภูมิที่สำคัญ คือ diosgenin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มซาโปนิน นอกจากนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งรายละเอียดของสารดังกล่าว และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีดังนี้

2.3.1 ซาโปนินไกลโคไซด์ หรือซาโปนิน

ซาโปนินเป็นสารในกลุ่มไกลโคไซด์ที่มีมวลโมเลกุลสูง คุณสมบัติของซาโปนินโดยรวมเป็นสารซักล้าง (detergent) เมื่ออยู่ในน้ำ ซาโปนินจะเกิดสารละลายคอลลอยด์ ซึ่งเมื่อเขย่าจะเกิดฟอง เนื่องจากสวนอะไกลโคน (aglycone) เป็นสารโมเลกุลใหญ่มีจำนวนคาร์บอน 27–30 อะตอม ทำให้ส่วนอะไกลโคนมีคุณสมบัติ lipophillic และมีส่วนของน้ำตาลซึ่งละลายน้ำได้ ที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophillic จากการที่ซาโปนินมีคุณสมบัติ lipophillic/hydrophillic อยู่ในโมเลกุลจึงมีความสามารถในการลดแรงตึงผิว และใช้ในการชะล้างได้ (Kimura et al., 1983) ส่วนคุณสมบัติด้านอื่น มีความแตกต่างกันตามชนิดของพืช ซึ่งชนิดของซาโปนินแบ่งตามลักษณะโครงสร้างของอะไกลโคน ได้ 2 ชนิด (Hostettmann and Marston, 1995) คือ

1. ไตรเทอร์ปีนซาโปนิน (triterpenoid saponin) ในธรรมชาติพบได้ทั้งไกลโคไซด์ และซาโปจีนิน (sapogenin) อิสระ ส่วนมากพบในพืชใบเลี้ยงคู่ โดยเฉพาะในวงศ์ Caryophyllaceae Sapindaceae Polygonaceae และ Sapotaceae ตัวอย่างของไตรเทอร์ปี

Ref. code: 25595709032527ELH

นอยด์ซาโปนิน ได้แก่ glycyrrhizic acid (glycyrrhetinic acid + 2 glucuronic acid) พบในรากชะเอม (*Glycyrrhiza glaba*) (Hostettmann and Marston, 1995)

2. สเตรียรอยด์ซาโปนิน (steroidal saponin) มีโครงสร้างคล้ายกับสเตรียรอยด์นิวเคลียส (steroid nucleus) พบได้น้อยในธรรมชาติ แต่สามารถพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น พืชในวงศ์ Dioscoraceae (genus *Dioscorea*) Liliaceae (genus *Yucca* และ *Trillium*) ในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของไกลโคไซด์ (ในขณะที่ไตรเทอร์ปีนซาโปนินในธรรมชาติจะอยู่ในรูปไกลโคไซด์ และรูปอิสระ) โครงสร้างของสเตรียรอยด์ซาโปนินมีความสัมพันธ์กับสารจำพวกฮอร์โมนเพศคอร์ติโซน (cortisone) และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ จึงใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตรียรอยด์ (steroid hormones) ตัวอยางสเตรียรอยด์ซาโปนิน เชน sarsaponin พบใน *Yucca spp.* sarmentogenin พบใน *Strophanthus spp.* ginsenoside พบในโสม และ diosgenin พบใน *Dioscorea* หลายชนิด (species) (Hostettmann and Marston, 1995) รวมถึงหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ด้วย โดย diosgenin ที่แยกได้จากการศึกษาของ Jaiarree (2010) มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดชนิด A 549 และ COR-L23 คือ Diosgenin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1->2)-β-D glucopyranoside หรือ Prosapogenin A of dioscin (DBS1) ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

การวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนิน สามารถวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) หรือ spectrophotometer ซึ่ง Lin and Yang (2008) วิเคราะห์หาปริมาณสารสเตรียรอยด์ซาโปนินในส่วนต่างๆ ของ *Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้อัตราส่วนของ methanol ต่อ water เป็น 62:38 (v/v) ที่เวลา 0-20 นาที และเปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 71:29 (v/v) ที่เวลา 21-65 นาที มีอัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 ml/นาที พบว่า สารสกัดชั้น ethanol ของแต่ละส่วนมีปริมาณสารสเตรียรอยด์ซาโปนินแตกต่างกันไป โดยเปลือก tuber มีปริมาณซาโปนินสูงที่สุด เท่ากับ 582.53 μg/g DW ซึ่งสูงกว่าในหัวสด 2.55 เท่า (227.86 μg/g DW) ส่วนปริมาณซาโปนินใน rhizophor ใบ และ เถา เท่ากับ 29.39 24.41 และ 23.96 μg/g DW ตามลำดับ นอกจากนี้ Manuhara et al. (2015) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์รากขนของ *Talinum paniculatum* Gaertn บนอาหารที่มีน้ำตาล และโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกันต่อปริมาณสารซาโปนิน โดยเพาะเลี้ยงเซลล์รากขนบนอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% 4% 5% และ 6% (w/v) และปริมาณโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เท่า เป็นเวลา 14 วัน วิเคราะห์หาปริมาณซาโปนิน โดยใช้เครื่อง HPLC ซึ่งมีอัตราส่วนของ 0.1% formic acid ในน้ำ ต่อ acetonitrile เป็น 40:60 (v/v) โดยฉีดสารละลายตัวอย่าง 0.2 ml วิเคราะห์ปริมาณซาโปนินที่ความยาวคลื่น 299 nm พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีซูโครส 5% ส่งผลให้เซลล์รากขนมีการสะสมปริมาณสารซาโปนินสูงสุด เท่ากับ 71,365

Ref. code: 25595709032527ELH

mg/l/g DW แต่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีซูโครส 6% ทำให้ปริมาณซาโปนินต่ำสุด เท่ากับ 44,030 mg/l/g DW การเติมโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 1-2 เท่า พบว่า ปริมาณสารซาโปนินสูงขึ้น (70,717-70,730 mg/l/g DW) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 0.5 เท่า (63,299 mg/l/g DW) ส่วนการวิเคราะห์โดยใช้ spectrophotometer นั้นได้รายงานโดย Pasaribu et al. (2014) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินทั้งหมดของมะคำดีควาย (*Sapindus rarak*) ด้วยวิธีการดัดแปลงจาก Hiai et al. (1976) ซึ่งหลักการในการวิเคราะห์ของ Hiai et al. (1976) คือสารซาโปนินทั้งหมด (total saponins) steroidal sapogenins ที่มีหรือไม่มีพันธะคู่ที่ C-5, triterpenoid sapogenins, sterol และกรดน้ำดี (bile acids) ที่มีกลุ่ม OH ตำแหน่ง C-3 จะทำปฏิกิริยากับ vanillin ในกรด แล้วให้สารที่มีสี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 455-460 หรือ 460-480 หรือ 544 nM ขึ้นอยู่กับชนิดของซาโปนิน โดยสารที่ทำให้เกิดสีไม่เกี่ยวข้องกับชนิดของน้ำตาลที่จับกับ sapogenin วิธีการวิเคราห์สามารถทำได้โดยชั่งสารสกัดตัวอย่าง 10 mg นำไปละลายใน absolute methanol ปริมาตร 20 ml ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ซาโปนิน ปริมาตร 0.25 ml vanillin reagent (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ปริมาตร 0.25 ml และ 72% H_2SO_4 ปริมาตร 2.5 ml ลงในหลอดทดลอง นำไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 544 nm โดยใช้ diosgenin เป็นสารมาตรฐาน และผลการทดลองพบว่า เปลือกเมล็ดของมะคำดีควายขนาด 75 µm มีปริมาณซาโปนินทั้งหมดสูงที่สุด (43.52%) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเปลือกเมล็ดของมะคำดีควายขนาด 300 และ 600 µm (37.54 และ 21.71% ตามลำดับ) (Pasaribu et al., 2014)

2.3.2 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกพบได้ในพืชทั่วไป มีฤทธิ์เป็นกรด สูตรโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลกรุ๊ป (hydroxyl group, –OH) อย่างน้อย 1 หมู่ หรือจับกับสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่า 1 หมู่เรียกว่า สารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenol compounds) หรือรวมกับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ มักพบอยู่ใน vacuole ของเซลล์ น้ำตาลดังกล่าวอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) หรือออลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า มีการรวมตัวกันกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก กรดอินทรีย์ หมู่เอมีน และไขมัน (Sato et al., 1996) สารประกอบในธรรมชาติมีสารจำพวกฟีนอลิกอยู่หลายชนิด เช่น สารประกอบฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก กรดไฮดรอกซินามิกและอนุพันธ์ หรือสารลิกนิน เป็นต้น (Rice-Evans et al., 1997)

Ref. code: 25595709032527ELH

สารประกอบฟีนอลิกมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูง เพราะมีหมู่ที่ให้อิเล็กตรอนแก่สารอนุมูลอิสระได้รวดเร็ว เมื่อสารประกอบฟีนอลิกเสียอิเล็กตรอนไป จะเกิดเรโซแนนท์ (resonance) ทำให้โมเลกุลเสถียร อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นต่อไปได้อีกด้วย ทำให้ลดจำนวนอนุมูลอิสระได้มากขึ้น (Rice-Evans et al., 1997; Williamson et al., 2000) นอกจากนี้ยังสามารถดักจับไอออนของโลหะได้ ยับยั้งการเกิดลิปิดเพอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation) ช่วยลดการเกิดอนุมูลไฮโดรเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ (Sato et al., 1996; Meyer et al., 1997; Soobrattee et al., 2005) ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ซึ่งมีหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phophomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm (Folin and Ciocalteu, 1927; Singelton et al., 1999)

มีรายงานการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) แล้วโดย ปิยาภัทร์ (2556) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเหง้าหัวแม่ในระยะก่อนปลูก และหลังปลูก (84.38±10.01 และ 39.68±17.63 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ) ซึ่งพบว่าสูงกว่าเหง้าหัวลูกทุกอายุการเก็บเกี่ยว โดยเหง้าหัวลูกที่อายุ 3 และ 6 เดือนหลังปลูกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 9.52±4.74 และ 17.07±6.91 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ เมื่ออายุเก็บเกี่ยว 9-18 เดือนหลังปลูกพบว่า สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าสูงขึ้นเท่ากับ 26.27±3.81 – 34.18±8.50 mg GAE/g dry extract นอกจากนี้ อรอุมา (2556) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 2 เดือน พบว่า สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 44.24±8.47 mg GAE/g dry extract ในขณะที่สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเหง้า ลำต้นเหนือดิน และกิ่งอ่อนมีค่าเท่ากับ 259.27±7.34 32.25±1.05 และ 34.65±0.45 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ

2.4 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ เป็นสารที่ร่างกายสร้างขึ้นจากกระบวนการสันดาปที่ใช้ออกซิเจนภายในเซลล์ หรือเรียกว่าปฏิกิริยาออกซิเดชัน (นิทราพร, 2542; วิโรจน์, 2551) ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นอะตอมโมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่ในวงอิเล็กตรอนนอกสุดของวงโคจร ทำให้โมเลกุลไม่เสถียร และเป็นสารที่มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสูงมาก (วิโรจน์, 2551;

Ref. code: 25595709032527ELH

โอภา, 2549) โดยอนุมูลอิสระจะไปรับอิเล็กตรอนจากสารที่อยู่ใกล้เคียงเพื่อให้ตัวเองเสถียร ในขณะที่สารใกล้เคียงที่สูญเสียอิเล็กตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จึงกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระตัวใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ (Halliwell et al., 1992) เซลล์ที่ถูกดึงเอาอิเล็กตรอนไปจะเสียหาย และสูญเสียหน้าที่ (นิทราพร, 2542) ส่งผลให้เกิดความเสียหายกับโมเลกุล เยื่อบุผนังเซลล์ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในการสร้างเซลล์ ทำให้เซลล์ต่างไปจากเดิม กลายเป็นเซลล์มะเร็ง (เอมอร, 2551) การเกิดกลไกดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตมักเกี่ยวข้องกับการใช้ออกซิเจนในการเผาผลาญเพื่อสร้างพลังงาน โดยผ่านทางปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และหน้าที่การทำงานของสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น โปรตีน ไขมัน ดีเอ็นเอ และเอนไซม์ เป็นต้น และยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความจำเสื่อม ความบกพร่องของเซลล์ประสาท และการอักเสบต่างๆ (โอภา, 2549) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าร่างกายจะมีการสร้างอนุมูลอิสระจากกระบวนการเผาผลาญต่างๆ แต่ร่างกายก็มีระบบที่ป้องกันความเสียหายจากปฏิกิริยาดังกล่าวด้วย

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารเคมีที่ถูกผลิตขึ้นภายในร่างกาย และมีอยู่ตามธรรมชาติในอาหารทั่วๆ ไปที่รับประทานทุกวัน ซึ่งมีสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่มีความเข้มข้นต่ำ สารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่ในการยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อรักษาสมดุลในร่างกายป้องกันไม่ให้เกิดการดึงอิเล็กตรอน โดยการจับกับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความคงตัว และหมดฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ในร่างกาย หากสารต้านอนุมูลอิสระมากก็จะสามารถจับกับอนุมูลอิสระได้มาก ระดับที่เซลล์ถูกทำลายก็จะช้าลง เป็นการชะลอความเสื่อมโทรมของร่างกาย (ศวรรณี, 2549) อย่างไรก็ตาม เมื่อเกิดการเสียสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ และระบบต้านอนุมูลอิสระ หรือภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากกว่าที่ระบบสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันได้ จะเกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นมา (Bonnefont, 2002) ซึ่งอนุมูลอิสระที่เหลือจะทำลายเซลล์ทำให้เกิดความเสียหาย (Ames et al., 1993) กลายเป็นสาเหตุของความเสื่อมโทรมและเกิดโรคต่างๆ เนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษและมลภาวะต่างๆ ซึ่งเกินความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่จะกำจัดออกไปได้หมด (นิทราพร, 2542)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณนั้น สามารถทำได้หลายวิธี โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity นั้นเป็นวิธีหนึ่งที่นิยม โดยมีหลักการ คือ สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรมีสีม่วง เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอล (สารให้อิเล็กตรอน) ทำให้ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระ ไฮโดรเจนจะเปลี่ยนเป็น DPPH:H หากสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จะทำให้ DPPH ที่มีสีม่วงค่อยๆ จางลงจนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง

Ref. code: 25595709032527ELH

ต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดี ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm (Yamasaki et al., 1994)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ได้มีรายงานแล้ว โดยอรอุมา (2556) พบว่า ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 2 เดือน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ค่า EC_{50} เท่ากับ 53.67±4.16 μg/ml ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าส่วนของกิ่งอ่อน และลำต้นเหนือดินที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 115.41±13.59 และ 113.91±22.56 μg/ml แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าเหง้าที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 11.42±3.25 μg/ml นอกจากนี้ ปิยาภัทร์ (2556) พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเหง้าหัวแม่ และเหง้าหัวลูกของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 8.53±1.15 – 26.42±18.41 และ 16.48±3.30 – 32.16±8.81 μg/ml ตามลำดับ ส่วน Jaiarree et al. (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเหง้าของ *D. birmanica* Prain & Burkill โดยใช้วิธี DPPH พบว่า สารสกัดชั้นเอทธานอลมีฤทธิ์ดี โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 9.35±0.62 μg/ml

2.5 การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ

การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถทำได้โดยเริ่มจากการคัดเลือกสายพันธุ์ของพืชที่มีการสร้างสารที่สนใจ หาความหลากหลายของพืชในบริเวณต่างๆ ที่เพาะปลูก ทำการตรวจสอบ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณสารสูงเป็นสารพันธุ์ตั้งต้น เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงโดยเปลี่ยนอาหาร (subculture) หลายรอบ จนได้ต้นที่มีความคงตัวของยีน และการสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งต้องคัดเลือกสายพันธุ์ (cell line) ที่มีการเจริญเติบโตดี และสร้างสารได้ในปริมาณมาก จากนั้นทำการควบคุมอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง สภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการสร้างสาร และการเจริญเติบโต และใช้เทคนิคอื่นๆ ร่วมด้วยเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารในปริมาณที่มากขึ้น เช่น การเติมสารกระตุ้น (elicitation) การตรึงเซลล์ (immobilization) การซึมผ่าน (permeabilization) การดัดแปลงพันธุกรรม (genetic modification) หรือควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิในวิถีชีวสังเคราะห์ของพืช (biosynthesis pathways) (Ramachandra Rao and Ravishankar 2002) ซึ่งการเติมสารกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืชนั้น เป็นหนึ่งในหลายวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาทางด้านนี้ โดยการสร้างสารทุติยภูมิในพืชเกิดจากกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจากการบุกรุกโดย จุลชีพ ได้แก่ แบคทีเรีย รา ไวรัส ดังนั้น การเติมสารบางชนิดสามารถกระตุ้นให้พืชเกิดการตอบสนองได้เหมือนกลไกการป้องกันตัวเองที่เกิดจากจุลชีพ (วราภรณ์, 2551) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคการเติมสารกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) โดยรายละเอียดของสารกระตุ้นมีดังนี้

Ref. code: 25595709032527ELH

2.5.1 สารกระตุ้น (elicitors) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (วราภรณ์, 2551) คือ

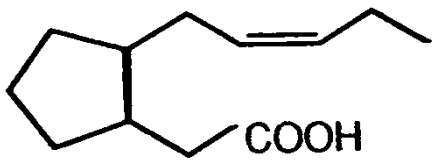
1. สารกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitors) เป็นสารกระตุ้นที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตที่ลดความซับซ้อนของโมเลกุลลง ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract; YE) รวมไปถึงที่ได้จากเซลล์พืช ได้แก่ methyl jasmonate (MeJA) Jasmonic acid (JA) salicylic acid (SA) หรือได้จากเปลือกของสัตว์ ได้แก่ chitosan เป็นต้น

2. สารกระตุ้นอชีวภาพ (abiotic elicitor) เป็นสารกระตุ้นที่ได้มาจากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ อุณหภูมิ ไอออนของธาตุต่างๆ เกลือของโลหะหนัก หรือ UV เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มของสารเคมีหรือสภาพแวดล้อม

สารกระตุ้นที่นำมาใช้แต่ละชนิด จะทำให้เกิดกลไกการตอบสนองแตกต่างกัน ดังนั้นการใช้สารกระตุ้นในการเพิ่มสารทุติยภูมิในการเพาะเลี้ยงเซลล์อาจใช้การกระตุ้นแบบชนิดเดียว หรืออาจใช้สารกระตุ้นหลายๆ ชนิดร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารทุติยภูมิ เนื่องจากกระบวนการส่งสัญญาณ และกลไกการตอบสนองที่หลากหลายของสารกระตุ้น สารกระตุ้นที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ MeJA JA chitosan แบคทีเรีย เชื้อรา และ YE (วราภรณ์, 2551) โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ JA และ YE เป็นสารกระตุ้น ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติดังนี้

Jasmonic acid เป็นสารชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อกระตุ้นให้เพิ่มการสร้าง และสะสมสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 2.4) สารชนิดนี้เป็นฮอร์โมนในกลุ่ม Jasmonate ได้มาจากน้ำมันหอมระเหยของต้น *Jasminum grandiflorum* และพบทั่วไปในพืชหลายชนิด รวมถึงมอส และเฟิร์น พืชจะสังเคราะห์ jasmonate จาก linolenic acid โดยผ่านปฏิกิริยาและกระบวนการเมตาบอลิซึม อย่างไรก็ตาม การลำเลียง ตำแหน่งที่อยู่ของสารภายในเซลล์ และการควบคุมการสังเคราะห์ของ JA ยังไม่เป็นที่ชัดเจน ในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานใดระบุว่ามีการลำเลียงจากตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ไปสู่บริเวณที่มีการตอบสนอง (Sembdner and Parthier, 1993) JA มีผลต่อการพัฒนาการของพืช เช่น การเจริญของราก การแก่ของพืช การสุกแก่ของผล และการเจริญของเมล็ด กระตุ้นกลไกการป้องกันตัวจากการทำลายของจุลชีพ และแมลงต่างๆ รวมไปถึงความเครียดจากสภาพแวดล้อม (วราภรณ์, 2551) จึงมีการใช้ JA เป็นสารกระตุ้นในการศึกษาเพื่อเพิ่มการสร้าง และสะสมสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Cheong and Choi, 2003)

Ref. code: 25595709032527ELH



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของ Jasmonic acid
ที่มา : วราภรณ์ (2551)

ในการศึกษาการกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิด้วย JA ในสภาพปลอดเชื้อนั้น มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น Zaheer and Giri (2015) พบว่า การเติม JA ที่ความเข้มข้น 1 μM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอดของ *Andrographis paniculata* และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ส่งผลให้ปริมาณสาร andrographolide เพิ่มขึ้นจาก 0.508% DW เป็น 1.322% DW ซึ่งสูงขึ้น 2.6 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม หรือจากการเพาะเลี้ยงยอดของ *Leucojum aestivum* ในอาหารเหลวที่มี JA ความเข้มข้น 25 μM เป็นเวลา 28 วัน พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสาร galanthamine และ lycorine ได้สูงถึง 226.9 μg/flask และ 491.4 g/flask ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.36 และ 1.67 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (Ivanova et al., 2013) นอกจากนี้ Siva et al. (2015) ได้เติม JA ความเข้มข้น 150 μM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงใบ และรากของ *Psoralea corylifolia* L. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสาร psoralen เพิ่มสูงขึ้น เท่ากับ 1.17 mg/ml และ 3.93 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่สิ่งทดลองควบคุมมีปริมาณสารเท่ากับ 0.56 mg/ml ส่วน Walker et al. (2002) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Hypericum perforatum* L. พบว่า เมื่อกระตุ้นด้วย JA ความเข้มข้น 250 μM ทำให้ปริมาณสาร hypericin เพิ่มขึ้นจาก 1,098.8±81.75 mg/l DW basis เป็น 2,090±156.5 mg/l DW basis ซึ่งสูงขึ้น 1.9 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Morinda elliptica* พบว่า การเติม JA ความเข้มข้น 50 μM และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน สามารถเพิ่มปริมาณสาร anthraquinone ได้สูงถึง 39.6 mg/g DW ซึ่งสูงถึง 2.1 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม และการเติม JA ความเข้มข้น 100 μM และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 และ 12 วัน พบว่า ปริมาณสาร anthraquinone เพิ่มขึ้นเท่ากับ 26.6 และ 21.9 mg/g DW ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 2.9 และ 1.4 เท่าตามลำดับ (Chong et al., 2005) หรือในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Calendula officinalis* L. พบว่า เมื่อกระตุ้นด้วย JA ความเข้มข้น 50 100 และ 150 μM เป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณ oleanolic acid (OA) ในเซลล์สูงสุด เมื่อกระตุ้นด้วย JA ความเข้มข้น 50

Ref. code: 25595709032527ELH

และ 100 μM นาน 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.68 และ 0.84 mg/g DW ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้น 7.6 และ 9.4 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (Wiktorowska et al., 2010) ส่วนพืชในสกุล *Dioscorea* ได้มีการศึกษาผลของ JA ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ JA ความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ส่งผลให้มีการสร้าง และสะสมสาร dioscorealide B ในปริมาณสูงสุด 0.59±0.08% (w/w) ซึ่งสูงกว่าปริมาณสารที่พบในยอดที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นที่มีค่า เท่ากับ 0.39±0.17% (w/w) หรือสูงกว่า 1.51 เท่า (ทิพย์สุคนธ์, 2557) ซึ่งจากการศึกษาผลของ JA ต่อปริมาณสารทุติยภูมิในสภาพปลอดเชื้อของพืชชนิดต่างๆ จะเห็นได้ว่า JA เป็นสารกระตุ้นชนิดหนึ่งที่ส่งเสริมให้พืชสร้าง และสะสมสารทุติยภูมิหลายชนิดเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด

สารสกัดยีสต์ (yeast extract: YE) เกิดจากการที่เซลล์ยีสต์ตาย จากนั้นเกิดกระบวนการย่อยสลายตัวเองขึ้นตามธรรมชาติ เรียกว่า ออโตไลซิส (autolysis) ในระหว่างกระบวนการดังกล่าว เอนไซม์ของยีสต์จะย่อยโปรตีน และส่วนต่างๆ ของเซลล์ และปลดปล่อยเพปไทด์ (peptide) กรดอะมิโน (amino acid) วิตามิน (vitamin) รวมถึงส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์ออกมา และเมื่อแยกเอาส่วนที่ไม่ละลายน้ำหรือส่วนที่เป็นกากเซลล์ออกไป ก็จะได้ยีสต์สกัด องค์ประกอบหลักของ YE ได้แก่ ไนโตรเจน 8-12%, โปรตีน 50-75%, อะมิโนไนโตรเจน 3-5%, คาร์โบไฮเดรต 4-13% และไขมันที่มีในปริมาณน้อยมากหรือไม่มีเลย จากองค์ประกอบหลักของ YE ที่อุดมไปด้วยไนโตรเจน วิตามิน และสารส่งเสริมการเจริญเติบโต จึงถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมการผลิตสารปฏิชีวนะ ยา และอาหารเสริม อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากนม (Querol and Fleet, 2006) นอกจากนี้ยังมีการนำ YE มาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ เนื่องจากเป็นสารสกัดของยีสต์มีแหล่งที่มาจากจุลชีพ เช่นเดียวกับการเติมผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา เมื่อเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง จึงสามารถกระตุ้นให้พืชเกิดการตอบสนองได้เหมือนกลไกการป้องกันตัวเองที่เกิดขึ้นจากจุลชีพ โดยพืชจะตอบสนองเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคในเซลล์พืช ซึ่งการตอบสนองนี้รวมไปถึงการสะสมสารทุติยภูมิด้วย (วราภรณ์, 2551)

การศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิโดยใช้ YE ได้มีรายงานแล้ว เช่น Kamonwannasit et al. (2008) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดของ *Bacopa monnieri* L. บนอาหารที่เติม YE ความเข้มข้น 2 mg/ml เป็นเวลา 7 วัน พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสาร pseudojujubogenin glycosides เท่ากับ 40.05±2.37 mg/g DW ซึ่งสูงถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม หรือในการเพาะเลี้ยงเซลล์รากขนของ *Silybum marianum* L. พบว่า

Ref. code: 25595709032527ELH

สามารถเพิ่มการสะสมสาร silymarin ได้สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 0.476 mg/g DW หลังเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี YE ความเข้มข้น 2.5 mg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Hasanloo et al., 2009)

Zaker et al. (2015) ศึกษาผลของสารกระตุ้น YE MeJA $AgNO_3$ และ sorbitol ต่อปริมาณสาร cryptotanshinone (CT) และ tanshinone IIA (Tan IIA) ในการเพาะเลี้ยงรากพิเศษของ *Perovskia abrotanoides* Karel พบว่า ปริมาณสาร CT สูงสุด 443.62g/g DW หรือเท่ากับ 3.6 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม YE ความเข้มข้น 200 mg/l เป็นเวลา 7 วัน ส่วน YE ความเข้มข้น 100 และ 200 mg/l สามารถเพิ่มปริมาณสาร Tan IIA ได้ 1.3 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม แต่เพิ่มขึ้นในปริมาณที่คงที่ ซึ่งน้อยกว่าการเติม $AgNO_3$ ที่ความเข้มข้น 25 μM ที่เพิ่มขึ้น 2 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม หรือเท่ากับ 6.79g/g DW เช่นเดียวกันกับ Wiktorowska et al. (2010) ที่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *C. officinalis* L. โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นทั้งหมด 5 ชนิด คือ Chitosan JA YE Pectin และเชื้อรา *Trichoderma viride* เป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณ OA ในเซลล์สูงสุด เมื่อกระตุ้นด้วย JA ความเข้มข้น 50 และ 100 μM นาน 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.68 และ 0.84 mg/g DW ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้น 7.6 และ 9.4 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม ส่วน YE ความเข้มข้น 300 mg/l ที่เพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง มีปริมาณ OA เพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 0.21 mg/g DW หรือ 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม นอกจากนี้ Lu et al. (2001) ได้เติม YE ความเข้มข้น 0.5-3.0 g/l ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย *Panax ginseng* C.A. Meyer เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 0 5 10 และ 15 วัน และเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 25 วันหลังจากเติม YE เปรียบเทียบกับเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงนาน 0 วัน ในอาหารที่ไม่มี YE เป็นเวลา 25 วัน (สิ่งทดลองควบคุม) พบว่า การเติม YE ความเข้มข้น 3 g/l เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 0 วัน มีปริมาณสารซาโปนินเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 1.61% หรือ 20 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม

2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้น

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ มีดังนี้

1. ความจำเพาะเจาะจงของสารกระตุ้น พืชมีการตอบสนองต่อสารกระตุ้นแตกต่างกัน ขึ้นกับความจำเพาะของเซลล์พืชนั้นๆ รวมไปถึงกลไกในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของสารจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสารกระตุ้น ระยะเวลาที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับสารกระตุ้น และกลไกการสร้างสารที่สารกระตุ้นทำให้เกิดขึ้น ดังเช่น ในการเพาะเลี้ยงรากพิเศษของ *P. abrotanoides* Karel เมื่อกระตุ้นด้วย YE MeJA $AgNO_3$ และ sorbitol พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม YE ความเข้มข้น 200 mg/l เป็นเวลา 7 วัน ทำให้รากพิเศษมีปริมาณสาร CT สูงสุด เท่ากับ 443.62g/g DW หรือเท่ากับ 3.6 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม แต่ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 25 μM

Ref. code: 25595709032527ELH

สามารถกระตุ้นการสร้างสาร tan IIA ได้สูงสุด เท่ากับ 6.79g/g DW ซึ่งมากกว่าสิ่งทดลองควบคุมถึง 2 เท่า (Zaker et al., 2015) ส่วน Chong et al. (2005) ได้ทดสอบสารกระตุ้นหลายชนิด คือ YE JA chitosan glucan และเส้นใยแขวนลอย (fungal mycelium homogenates) ของ *Aspergillus niger* และ *A. flavus* ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *M. elliptica* พบว่า JA ความเข้มข้น 50 μM สามารถเพิ่มปริมาณสาร anthraquinone ได้ถึง 2.1 เท่า (39.6 mg/g DW) ของสิ่งทดลองควบคุม นอกจากนี้ ทิพย์สุคนธ์ (2557) ศึกษาปริมาณสาร dioscorealide B ของยอดหัวข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม JA ความเข้มข้น 100-500 μM และ SA ความเข้มข้น 50-200 μM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า การเติม JA ความเข้มข้น 100 μM ทำให้ยอดมีการสะสมสาร dioscorealide B ในปริมาณสูงสุด 0.59±0.08% (w/w) ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.51 เท่า ส่วน SA ทุกความเข้มข้นส่งผลให้มีปริมาณสาร dioscorealide B ลดลง

2. ความเข้มข้นและช่วงเวลาในการได้รับสารกระตุ้น ความเข้มข้นของสารกระตุ้นเป็นปัจจัยที่มีผลเป็นอย่างมากในการตอบสนอง ซึ่งการตอบสนองดังกล่าวจะแตกต่างกันไป ความเข้มข้นของสารกระตุ้นอาจส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกับพืชชนิดหนึ่ง แต่อาจไม่ส่งผลกับพืชอีกชนิดหนึ่ง สำหรับช่วงเวลาในการกระตุ้นนั้น สารกระตุ้นสามารถกระตุ้นเซลล์พืชได้ตลอดเวลาที่เพาะเลี้ยง และมีการสัมผัสสารจนกว่าจะมีการเก็บเกี่ยว ดังนั้น การหาสภาวะที่เหมาะสมของระยะเวลา และความเข้มข้นของสารกระตุ้นเป็นสิ่งที่สำคัญ จำเป็นต้องศึกษาถึงรายละเอียดในการเพาะเลี้ยงพืชแต่ละชนิด ดังการเพาะเลี้ยงรากของ *P. ginseng* C.A. Meyer ที่เติม JA ความเข้มข้น 0 1 2 5 และ 10 mg/l เป็นเวลา 0-9 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณสาร ginsenoside จากการทดลองพบว่า สาร ginsenoside เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงรากในอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 2 mg/l เป็นเวลา 7 วัน หรือเพิ่มขึ้น 5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (Yu et al., 2002) Wiktorowska et al. (2010) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *C. officinalis* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นทั้งหมด 5 ชนิด คือ Chitosan ความเข้มข้น 50 100 และ 150 mg/l JA ความเข้มข้น 50 100 และ 150 μM YE ความเข้มข้น 100 200 และ 300 mg/l Pectin ความเข้มข้น 2 4 และ 6 mg/l และเชื้อรา *T. viride* ความเข้มข้น 0.5 mg/l เป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า เซลล์แขวนลอยของ *C. officinalis* L. ตอบสนองต่อ JA ได้ดีที่สุด แต่สารกระตุ้นทุกชนิดก็สามารถชักนำให้เซลล์แขวนลอยสร้าง และสะสมสารในปริมาณที่ต่างกัน ปริมาณ OA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับ JA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ปริมาณ OA ในเซลล์สูงสุด เมื่อกระตุ้นด้วย JA ความเข้มข้น 50 และ 100 μM นาน 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.68 และ 0.84 mg/g DW ตามลำดับ หรือเพิ่มขึ้น 7.6 และ 9.4 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม ส่วน chitosan ชักนำให้มีการสะสม OA เพิ่มอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง และระดับ OA ภายในเซลล์ ยังคงสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมหลังได้รับ chitosan 96 ชั่วโมง การกระตุ้นด้วย YE ทุก

Ref. code: 25595709032527ELH

ความเข้มข้น พบว่า การสะสม OA ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 96 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ปริมาณ OA เพิ่มขึ้นสูงสุด 0.21 mg/g DW หรือ 2.5 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม เมื่อกระตุ้นด้วย YE ความเข้มข้น 300 mg/l นาน 72 ชั่วโมง ส่วนการเติม pectin ความเข้มข้น 2 และ 4 mg/l นาน 48 ชั่วโมง พบว่า มีการสะสม OA เพิ่มขึ้นในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการใช้ YE ที่ความเข้มข้น 200 และ 300 mg/l และเซลล์ที่กระตุ้นด้วยเชื้อรา *T. viride* พบว่า มีการสะสม OA เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 0.12 mg/g DW หลังจากกระตุ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ ทิพย์สุคนธ์ (2557) ได้เพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) บนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 100-500 μM และ SA ความเข้มข้น 50-200 μM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ยอดหัวข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ตอบสนองต่อ JA ได้ดีกว่า SA โดย JA ความเข้มข้น 100 μM ส่งผลให้ยอดข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) สร้าง และสะสมสาร dioscorealide B สูงสุด

3. ระยะการเจริญเติบโต และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงของพืช โดยช่วงระยะที่พืชมีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase) พบว่า เป็นระยะที่พืชอยู่ในสภาพที่เอมไซม์พร้อมทำงาน ทำให้การตอบสนองของพืชต่อสารกระตุ้นมีประสิทธิภาพสูงสุด (วราภรณ์, 2551) ดังรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *M. elliptica* เป็นเวลา 6 วัน (ระยะ early exponential phase) 12 วัน (ระยะ mid exponential phase) และ 18 วัน (ระยะ stationary phase) จากนั้นเติม YE JA chitosan glucan และเส้นใยแขวนลอย (fungal mycelium homogenates) ของ *A. niger* และ *A. flavus* ลงในอาหารเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์ปริมาณสาร anthraquinone หลังจากเติมสารแล้ว 1 2 และ 5 วัน พบว่า การให้ JA ความเข้มข้น 100 μM กับเซลล์แขวนลอยอายุ 6 และ 12 วัน และเพาะเลี้ยงหลังจากได้รับสารแล้ว 5 วัน มีการสะสมสาร anthraquinone เท่ากับ 26.6 mg/g DW และ 21.9 mg/g DW ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้น 2-3 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม โดยเซลล์แขวนลอยของ *M. elliptica* นี้ไม่สามารถสร้างและสะสมสาร anthraquinone ได้ที่ระยะ stationary phase หรือที่อายุ 18 วัน แสดงให้เห็นว่า เซลล์แขวนลอยของ *M. elliptica* ตอบสนองต่อสารกระตุ้นในระยะ early และ mid-exponential phase มากกว่าระยะ stationary phase (Chong et al., 2005) ส่วนสภาวะในการเพาะเลี้ยงก็มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการเพิ่มสารทุติยภูมิด้วยเช่นกันตามรายงานของทิพย์สุคนธ์ (2557) ที่ศึกษาปริมาณสาร dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเหลวที่เติม JA ความเข้มข้น 100 μM โดยมีระยะเวลาในการได้รับสาร 2-5 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งมีปริมาณสาร dioscorealide B (0.57±0.35% w/w) สูงกว่าในอาหารเหลว (0.36±0.40% w/w) นอกจากนี้ มีรายงานการกระตุ้นให้พืชเกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิด้วยแสง เช่น การเติม SA JA และเชื้อรา *Phytophthora cinnamon* ความ

Ref. code: 25595709032527ELH

เข้มข้นต่างๆ ในเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *H. perforatum* L. อายุ 28 วัน ในสภาวะมีแสง และไม่มีแสง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีแสงมีปริมาณสาร hypericin สูงกว่าที่มีแสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสภาวะไม่มีแสงที่เติม JA ความเข้มข้น 250 μM เซลล์แขวนลอยมีการสร้างและสะสมสาร hypericin ในปริมาณสูงสุด 0.318 mg/g DW ในขณะที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีแสง เซลล์แขวนลอยมีการสร้างและสะสมสารเพียง 0.089 mg/g DW (Walker et al., 2002)

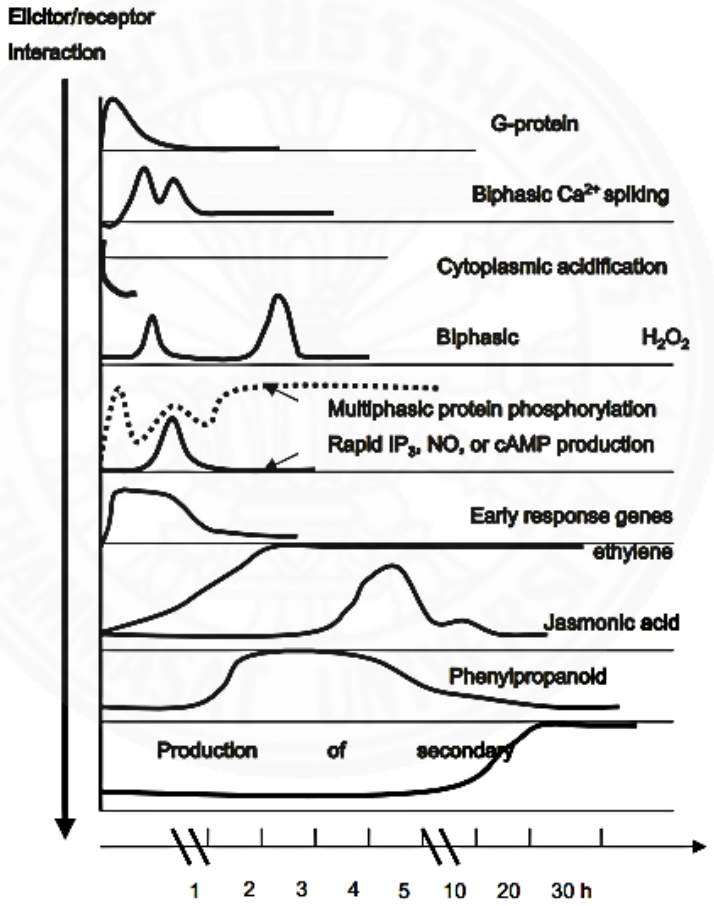
2.5.3 กลไกระดับโมเลกุลในการสร้างสารทุติยภูมิโดยสารกระตุ้น

การให้สารกระตุ้นแก่พืช หรือเมื่อพืชถูกเชื้อโรครุกราน พืชจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพ และชีวเคมี ซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันการรุกรานของเชื้อโรค และสิ่งต่างๆ โดยการตอบสนองของพืชนี้ จะรวมไปถึงการสะสมของสารทุติยภูมิที่ใช้เป็นกลไกในการป้องกันตนเองด้วย กระบวนการในการป้องกันตนเองนี้ มักเกี่ยวข้องกับการต่อต้านที่ผนังเซลล์พืช (Cunha et al., 2006; Huckenlhoven, 2007) แต่ยังมีอีกหลายกระบวนการที่เกิดจากการตอบสนองของพืชต่อสิ่งบุกรุก ซึ่งสารกระตุ้นแต่ละชนิดจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของพืชในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิได้หลายกระบวนการ (วราภรณ์, 2551) โดยกลไกในการสร้างสารทุติยภูมิด้วยสารกระตุ้นมีดังนี้

การรับสัญญาณของการกระตุ้น (elicitor signal perception) จากการที่สารกระตุ้นแต่ละชนิดมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ดังนั้นสารกระตุ้นจึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิในพืชชนิดหนึ่งแต่อาจไม่มีผลในพืชอีกชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ตาม พืชต่างชนิดกันก็อาจตอบสนองต่อสารกระตุ้นชนิดเดียวกันได้ ทั้งนี้เกิดจากกระบวนการที่พืชสามารถจดจำสารกระตุ้น ซึ่งเป็นโมเลกุลแปลกปลอมให้เป็นสัญญาณของการกระตุ้น และมีตัวรับที่จำเพาะต่อสารกระตุ้นแต่ละชนิดในพืช การรับรู้ของสัญญาณการกระตุ้นถือเป็นกระบวนการแรกของการกระตุ้น ก่อนการถ่ายทอดสัญญาณผ่านหลายกลไกของบริเวณที่จับกับสารกระตุ้น (binding sites) เหล่านี้ ส่วนมากจะอยู่บริเวณพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของเซลล์พืช (Blein et al., 2002; Zhao et al., 2005; Vasconsuelo and Boland, 2007) สารกระตุ้นหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็น avirulence determinants ต่อพันธุกรรมของพืช ทำให้เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันพืชโดยผ่าน resistance genes (R genes) ที่อยู่ในพืชด้วยการจับกับ avirulence (avr) gene ที่มีในสารกระตุ้น สารกระตุ้นจะถูกตัวรับ (receptor) ของพืชหรือ R proteins ที่อยู่บริเวณพลาสมาเมมเบรนจดจำ จากนั้นจะส่งสัญญาณจากเนื้อเยื่อหนึ่งไปยังที่อื่นๆ ซึ่งจะทำให้เกิดกระบวนการในการต่อต้านสารเหล่านี้ด้วยการสังเคราะห์ pathogenesis-related proteins (PR) หรือสร้างสารทุติยภูมิที่ใช้ในการต่อต้านการบุกรุก กลไกการจดจำในระดับโมเลกุล และปฏิกิริยาในทางกายภาพระหว่างสารกระตุ้นและตัวรับในพืชที่จำเพาะนี้เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน และจำเป็นในการส่งสัญญาณที่จำเพาะของสารกระตุ้น (วราภรณ์, 2551)

Ref. code: 25595709032527ELH

ส่วนการถ่ายโอนสัญญาณของการกระตุ้น (elicitor signal transduction) เกิดขึ้นหลังจากที่พืชได้รับสัญญาณจากตัวกระตุ้น ตัวรับสัญญาณการกระตุ้นจะถูกกระตุ้นให้เกิดการทำงาน และไปกระตุ้นตัวแสดงผล เช่น ion channels, G-proteins, lipases และ protein kinases ตัวแสดงผลที่ถูกกระตุ้นจะโอนสัญญาณที่ได้จากตัวกระตุ้นให้เป็นตัวส่งสัญญาณที่สอง (second messengers) ซึ่งจะขยายสัญญาณไปยังกระบวนการตอบสนองอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงระดับ Ca^{2+} เกิด cytoplasmic acidification ตามภาพที่ 2.5 โดยจะมีการสร้าง ethylene และ jasmonic acid ก่อนจะเกิดการสะสมของสารทุติยภูมิขึ้น (Zhao et al., 2005)



ภาพที่ 2.5 ลำดับเหตุการณ์การตอบสนองของพืชต่อสิ่งรบกวน
ที่มา : Zhao et al. (2005)

Ref. code: 25595709032527ELH

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 พืชทดลองและสภาพการเพาะเลี้ยง

ใช้ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพที่ 3.1) โดยเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 °C ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 3,000 lux ด้วยหลอดไฟ fluorescence ชนิด cool white ทำการย้ายเลี้ยง (subculture) ทุกๆ 6-8 สัปดาห์ จนกระทั่งมียอดมากเพียงพอในแต่ละการทดลอง

ภาพที่ 3.1 ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 อาหารเพาะเลี้ยงและวิธีการเตรียม

อาหารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ อาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog หรือ MS (ตารางที่ 3.1) โดยอาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลทราย ความเข้มข้น 3% วุ้น ความเข้มข้น 0.8% สารควบคุมการเจริญเติบโต (PGR) หรือน้ำมะพร้าว (CW) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามการทดลอง และเติมผงถ่าน (AC) ความเข้มข้น 0.01% ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ปรับค่า pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8 ด้วย 1 N NaOH และนึ่งกำจัดเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปล่อยให้อาหารเพาะเลี้ยงเย็นก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

Ref. code: 25595709032527ELH

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog)

สารเคมี	ปริมาณสารที่ใช้ (mg/l)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
H_3BO_3	6.2
KH_2PO_4	170
Kl	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0.25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
$MnSO_4 \cdot H_2O$	6.9
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	6.14
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
Na_2ETDA	37.25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85
myo-inosotal	100
glycine	2
nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
thiamine-HCl	0.1

3.3 สารกระตุ้นและการเตรียม

เตรียม JA ที่ความเข้มข้น 1.902 mM ปริมาตร 250 ml โดยละลาย JA 100 mg ด้วย ethanol จนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เมื่อนำมาใช้ทดลองต้องกรองสารละลาย JA ด้วย filter membrane ขนาด 0.22 μm (Wiktorowska et al., 2010) ก่อนเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการนึ่งกำจัดเชื้อแล้ว โดยอาหารมีอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 $^{\circ}$C เพื่อป้องกันการเสื่อมคุณสมบัติของ JA

Ref. code: 25595709032527ELH

การเตรียม YE ละลาย YE ในน้ำกลั่น และคนจนกว่าจะเป็นสารละลายใส (Peltonen et al., 1997) จากนั้นเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงตามความเข้มข้นที่ต้องการ ปรับค่า pH ของอาหาร และนำอาหารไปนึ่งกำจัดเชื้อตามที่ได้กล่าวมาแล้วในอาหารเพาะเลี้ยง และวิธีการเตรียม

3.4 การทดลองที่ 1 ผลของ CW และ IAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ

นำข้อหัวข้าวเย็น (*D. birmanica Prain* & Burkill) ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l มาตัดเป็นท่อน แต่ละท่อนมี 1 ข้อ จากนั้นเพาะเลี้ยงแต่ละข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 15% และ 20% และ IAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 mg/l เปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/l และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l (สิ่งทดลองควบคุม) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 9 สูตรอาหาร ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นของ CW และ IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลองที่ 1

สิ่งทดลอง	AC (%)	BA (mg/l)	CW (%)	IAA (mg/l)
1 (สิ่งทดลองควบคุม)	0.01	2	-	0.1
2	0.01	2	15	0.1
3	0.01	2	15	0.5
4	0.01	2	15	1
5	0.01	2	15	2
6	0.01	2	20	0.1
7	0.01	2	20	0.5
8	0.01	2	20	1
9	0.01	2	20	2

แต่ละสูตรอาหารมี 10 ซ้ำ 1 ซ้ำ มี 2 ขวด แต่ละขวดมี 1 ข้อ นำข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรไปวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองดังนี้

Ref. code: 25595709032527ELH

1. การเกิดยอด (%)
2. จำนวนยอดที่พัฒนาต่อข้อ เมื่อยอดมีความยาวมากกว่า 3 mm
3. จำนวนข้อต่อยอด นับจำนวนข้อของทุกยอดที่พัฒนาแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย
4. ความยาวยอด (cm) วัดความยาวยอดของทุกยอดที่พัฒนาแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.5 การทดลองที่ 2 ผลของ JA และ YE ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารทุติยภูมิ

นำยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% CW ความเข้มข้น 20% BA ความเข้มข้น 2 mg/l และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่พัฒนาจากการทดลองที่ 1 (โดยอาหารสูตรนี้ในการทดลองที่ 2 และ 3 จะเรียกว่าอาหารสูตรพื้นฐาน) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มาตัดเป็นท่อนๆ ให้มีความยาวประมาณ 1 cm จากนั้นนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 100 และ 150 µM และ YE ความเข้มข้น 2 3 และ 4 g/l เปรียบเทียบกับอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) โดยเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 7 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวนยอดมากพอที่จะให้น้ำหนักแห้ง 2 g

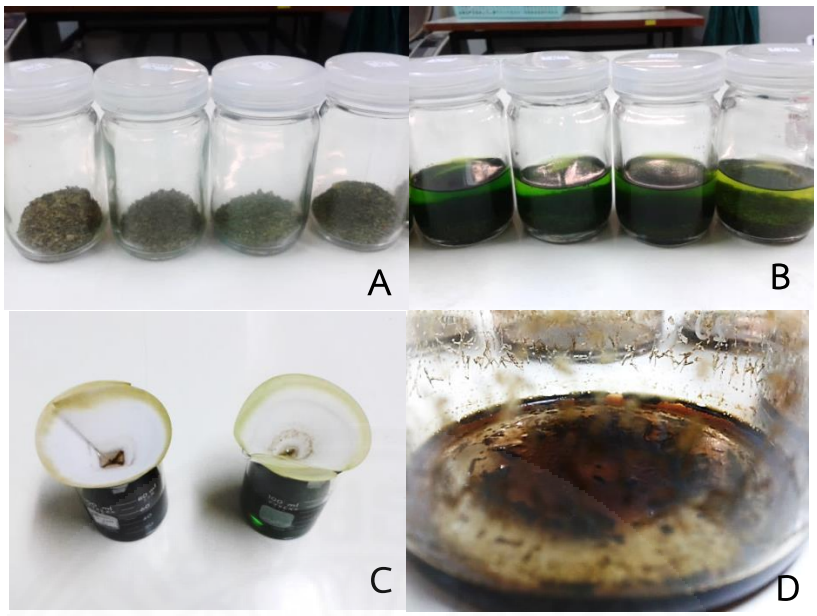
เมื่อครบกำหนดเวลาเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักสดยอด จากนั้นนำยอดที่พัฒนามาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้งของยอด (ภาพที่ 3.2 A) และสกัดตัวอย่างแห้งตามวิธีของ Jaiarree et al. (2010) ด้วย ethanol ความเข้มข้น 95% โดยใช้อัตราส่วนพืช และ ethanol 1:3 โดยปริมาตร สกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งสกัดนาน 3 วัน (ภาพที่ 3.2 B) แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาด 11 µm (ภาพที่ 3.2 C) นำสารสกัดที่ได้มาระเหยใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลานาน 2-3 วัน จนกว่าสารสกัดตัวอย่างแห้งหรือมีน้ำหนักคงที่ (ภาพที่ 3.2 D) คำนวณหา % น้ำหนักแห้งยอด และ % yield จากสูตร

% น้ำหนักแห้ง = (น้ำหนักแห้งของยอด/น้ำหนักสดของยอด) X 100

% yield = (น้ำหนักสารสกัด/น้ำหนักเริ่มต้นที่ใช้หมัก) X 100

จากนั้นศึกษาหาปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มี และไม่มีสารกระตุ้นเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ด้วยวิธีการดังนี้

Ref. code: 25595709032527ELH

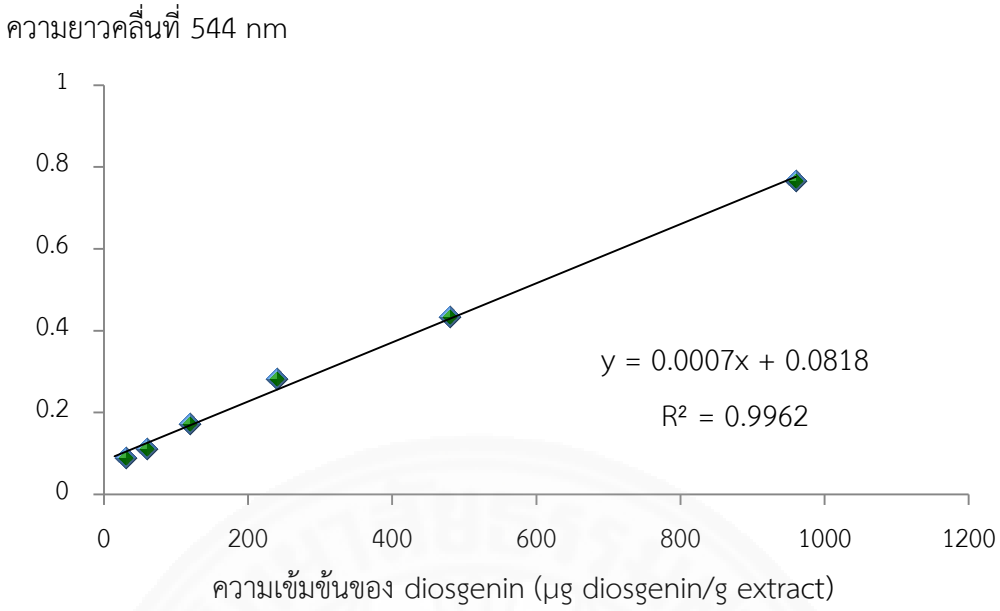


ภาพที่ 3.2 การสกัดตัวอย่างแห้งของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ตามวิธีของ Jaiarree et al. (2010): A) ตัวอย่างแห้งที่ใช้ในการสกัด B) สกัดในอัตราส่วนพืช : ethanol 1:3 โดยปริมาตร C) กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาด 11 µm D) สารสกัดตัวอย่างแห้งที่ได้จากการระเหย

3.5.1 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด

วิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hiai et al. (1976) ละลายสารสกัด 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute metanol ปริมาตร 2 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.25 ml Vanillin reagent ความเข้มข้น 8% (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ปริมาตร 0.25 ml และ H_2SO_4 ความเข้มข้น 72% ปริมาตร 2.5 ml ลงในหลอดทดลอง นำไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 544 nm และใช้ diosgenin ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เป็นสารมาตรฐาน (ภาพที่ 3.3)

Ref. code: 25595709032527ELH

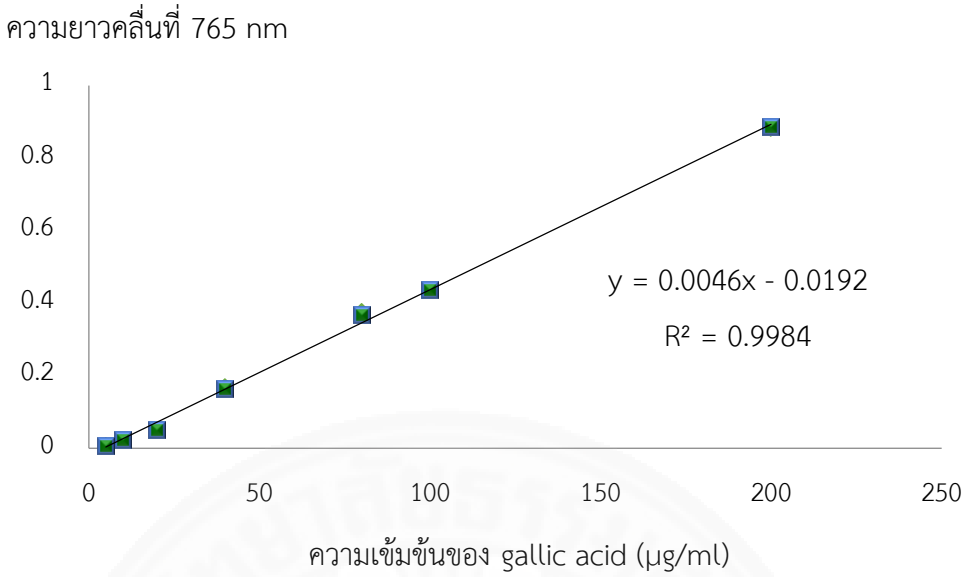


ภาพที่ 3.3 กราฟมาตรฐานของ diosgenin

3.5.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยดัดแปลงจากวิธีของ Folin and Ciocalteu (1927) ละลายสารสกัด 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายปริมาตร 20 µl ใส่ในหลุม 96-well plate readers เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 100 µl และเติมสารละลาย 7.5% w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 80 µl ทำซ้ำ 4 หลุม microplate จากนั้นตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดยใช้ absolute ethanol ปริมาตร 20 µl ร่วมกับ Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 100 µl และ 7.5% w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 80 µl เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารตัวอย่าง โดยนำค่า OD ของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ มากำหนดจุดในกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) และ OD ของ gallic acid (แกน y) จากนั้นคำนวณค่าจากสมการเส้นตรงเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (ภาพที่ 3.4) ให้อยู่ในหน่วย mg ของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อสารสกัดชั้น ethanol 1 g (mg GAE/g dry extract)

Ref. code: 25595709032527ELH



ภาพที่ 3.4 กราฟมาตรฐานของ gallic acid

3.5.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity

การวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีของ Yamasaki et al. (1994) นำสารสกัด มาละลายด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol อัตราส่วน 1 mg/ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 100 50 และ 25 µg/ml นำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 µl ใส่ลงในหลุม 96-well plate และเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ปริมาตร 100 µl ทำซ้ำ 3 หลุม microplate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µl และเติม absolute ethanol ปริมาตร 100 µl เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง และใช้ absolute ethanol ปริมาตร 100 µl ร่วมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µl เป็น control คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH จากสมการ

% inhibition = (OD control – OD sample)/(OD control) X 100

เมื่อ OD control = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

OD sample = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

คำนวณหาค่า EC_{50} (ค่าความสามารถของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ที่ 50% โดยนำค่า % inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ มากำหนดจุดในกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของ

Ref. code: 25595709032527ELH

สารละลายมาตรฐานหรือสารสกัด (แกน x) และ % inhibition (แกน y) คำนวณค่าจากสมการลอการิทึมเปรียบเทียบค่าความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน

3.6 การทดลองที่ 3 ผลของ YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิ

นำยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มาตัดเป็นท่อนๆ ให้มีความยาวประมาณ 1 cm จากนั้นเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชดังกล่าวบนอาหารสูตรพื้นฐานร่วมกับ YE ความเข้มข้น 3 g/l ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 วางแผนการทดลองแบบ 2X4 Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย โดย

ปัจจัยที่ 1 คือ ไม่เติมสารกระตุ้น และเติม YE ความเข้มข้น 3 g/l

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 1 2 4 และ 6 สัปดาห์

แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวนยอดมากพอที่จะให้น้ำหนักแห้ง 2 g เมื่อครบระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง นำยอดไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}$C นาน 48 ชั่วโมง ทำการสกัดสาร คำนวณ % น้ำหนักแห้งยอด % yield และวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตามวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติการทดลองที่ 1 และ 2 นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ส่วนการทดลองที่ 3 วิเคราะห์ความแปรปรวนตามวิธี 2X4 Factorial in CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Dancan’s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS

3.8 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัย และอาหาร สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Ref. code: 25595709032527ELH

3.9 ระยะเวลาในการทดลอง

ตั้งแต่เดือนกันยายน 2558 ถึงเดือน ตุลาคม 2559 ใช้ระยะเวลา 1 ปี 2 เดือน

Ref. code: 25595709032527ELH

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 ผลของ CW และ IAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงข้อหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) บนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 15% และ 20% ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 mg/l เปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/l และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l (สิ่งทดลองควบคุม) พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรสามารถชักนำให้ตาข้างของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) พัฒนาเป็นยอดได้ โดยมีการเกิดยอด 100±0.00% ในทุกๆ สูตรอาหาร (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1) แสดงให้เห็นว่า ตาข้างของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) พร้อมจะพัฒนาไปเป็นยอดใหม่ อย่างไรก็ตาม จำนวนยอดที่พัฒนา จำนวนข้อต่อยอด และความยาวยอดพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 20% และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีจำนวนยอดที่พัฒนาสูงสุด เท่ากับ 1.85±0.11 ยอด ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 15% และ IAA ความเข้มข้น 0.1 1 และ 2 mg/l หรือ CW ความเข้มข้น 20% และ IAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l (ตารางที่ 4.1) ส่วนจำนวนข้อต่อยอด พบว่า ยอดที่พัฒนามีจำนวนข้อต่อยอดสูงสุด (2.83±0.20) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 20% และ IAA ความเข้มข้น 1 mg/l แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l (สิ่งทดลองควบคุม) และอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 20% และ IAA ความเข้มข้น 2 mg/l นอกจากนี้ จากการทดลองพบว่า ยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 20% และ IAA ความเข้มข้น 1 mg/l มีความยาวยอดสูงสุด เท่ากับ 2.07±0.15 cm ซึ่งสูงกว่า และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความยาวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม CW ความเข้มข้น 15% ทุกสูตร

Ref. code: 25595709032527ELH

ตารางที่ 4.1 การเกิดยอด (%) จำนวนยอดที่พัฒนา จำนวนข้อต่อยอด ความยาวยอด (cm) เมื่อเพาะเลี้ยงข้อของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) บนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 15 และ 20% ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 mg/l เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์

สูตรที่	AC (%)	BA (mg/l)	CW (%)	IAA (mg/l)	การเกิดยอด (%)	จำนวนยอดที่พัฒนา/ข้อ	จำนวนข้อ/ยอด	ความยาวยอด (cm)
1	0.01	2	-	0.1	100±0.00[1/]	1.30±0.11[c]	2.50±0.18[ab]	1.57±0.08[bc]
2	0.01	2	15	0.1	100±0.00	1.50±0.11[abc]	2.33±0.16[bc]	1.50±0.10[cd]
3	0.01	2	15	0.5	100±0.00	1.45±0.11[bc]	2.28±0.15[bc]	1.47±0.11[cd]
4	0.01	2	15	1	100±0.00	1.80±0.14[ab]	1.96±0.08[c]	1.12±0.07[d]
5	0.01	2	15	2	100±0.00	1.65±0.11[abc]	2.28±0.11[bc]	1.49±0.08[cd]
6	0.01	2	20	0.1	100±0.00	1.85±0.11[a]	2.04±0.13[bc]	1.95±0.22[ab]
7	0.01	2	20	0.5	100±0.00	1.80±0.16[ab]	2.06±0.11[bc]	1.69±0.12[abc]
8	0.01	2	20	1	100±0.00	1.30±0.11[c]	2.83±0.20[a]	2.07±0.15[a]
9	0.01	2	20	2	100±0.00	1.35±0.13[c]	2.44±0.18[ab]	1.73±0.15[abc]
F-test					ns	*	*	*

[1/] ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

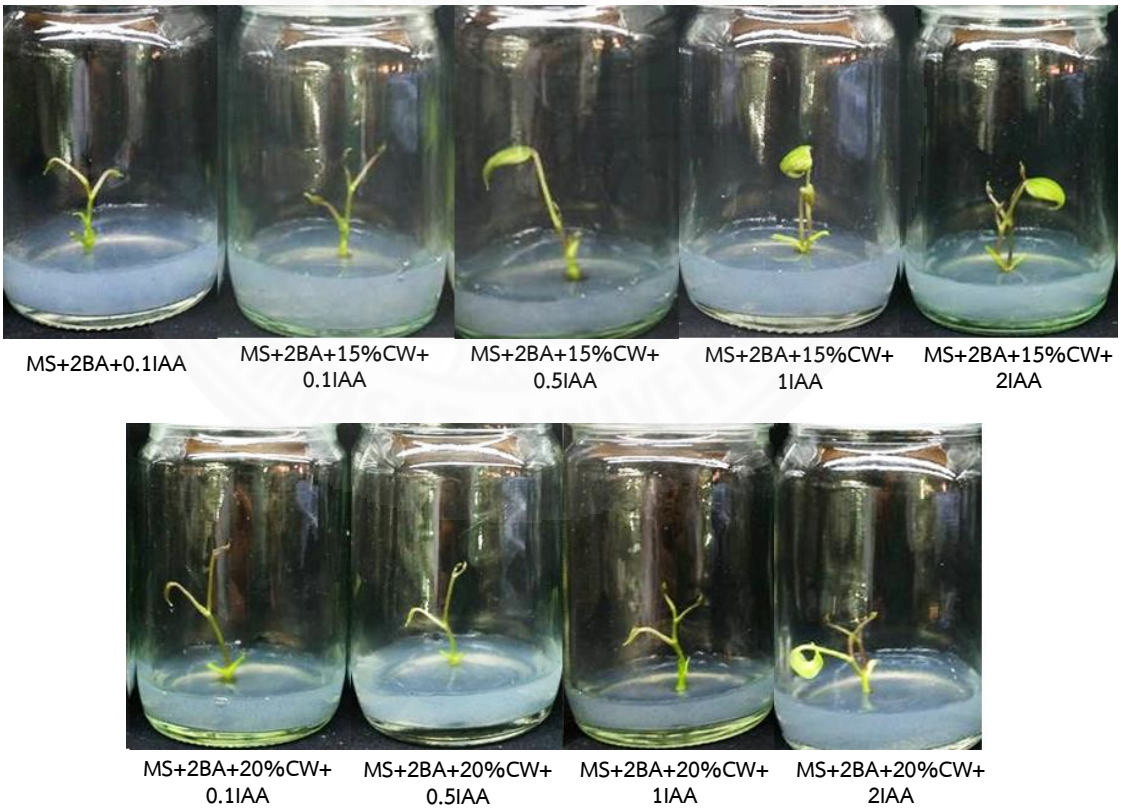
* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า CW และ IAA มีผลต่อจำนวนยอดที่พัฒนา จำนวนข้อต่อยอด และความยาวยอด ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสูตรอาหารที่เติม CW จะส่งผลดีต่อการพัฒนาของยอดเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่ไม่มี CW (สิ่งทดลองควบคุม) แต่ยอดที่พัฒนามีความแข็งแรง (ภาพที่ 4.2) และสามารถย้ายเลี้ยง (subculture) ได้ง่าย ทั้งนี้อาจเนื่องจากใน CW มี zeatin ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชในปริมาณมาก (วราภรณ์, 2553) นอกจากนี้ยังมี ออกซิน ไซโทไคนิน และจิบเบอเรลลิน (gibberellins) (ปรียา, 2556) รวมถึงมีสารประกอบชนิดอื่นจำนวนมาก เช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ กรดนิวคลีอิก พิวรีน (purine) น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ วิตามิน และธาตุอาหาร เป็นต้น (Uphade et al., 2008) จึงส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอดได้ ซึ่งจากการทดลองนี้ CW ความเข้มข้น 20% ให้ผลดีต่อการ

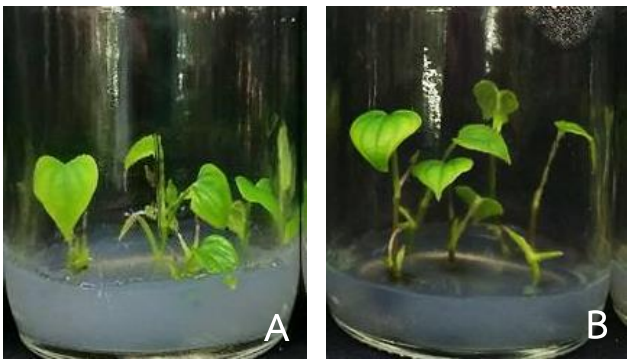
Ref. code: 25595709032527ELH

เจริญเติบโตของยอดในแง่ของความยาวยอด สอดคล้องกับรายงานการเพิ่มจำนวนยอดของเฮเซลนัท (*C. avellana* L.) ที่พบว่า ข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½DKW ที่เติม CW ความเข้มข้น 20% BAP ความเข้มข้น 2 mg/l IAA ความเข้มข้น 0.01 mg/l และ GA_3 ความเข้มข้น 0.5 mg/l สามารถเพิ่มจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชได้สูงสุด (Prando et al., 2014) และในกีวี (*A. deliciosa*) พบว่า ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม CW ความเข้มข้น 20% ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2 mg/l มีความยาวยอด จำนวนยอด และจำนวนข้อสูงสุด (Nasib et al., 2008) ซึ่งความเข้มข้นของ CW ที่ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนยอดในพืชแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันไป เช่น ข้าวเย็นเหนือ (*S. corbularia*) สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ดีบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม CW ความเข้มข้น 15% และ BA ความเข้มข้น 1 mg/l หรืออาหารสูตร MS ที่เติม CW ความเข้มข้น 15% BA ความเข้มข้น 1 mg/l และ IAA ความเข้มข้น 0.5-1 mg/l (Jirakiattikul et al., 2013) และในมะกอก (*O. europaea* L.) สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ดีบนอาหารสูตร olive medium ที่เติม CW ความเข้มข้น 5% และ BAP ความเข้มข้น 8.87 μM (Peixe et al., 2007)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตรต่างๆ

Ref. code: 25595709032527ELH



ภาพที่ 4.2 ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาบนอาหาร A) สิ่งทดลองควบคุม สูตร MS ที่เติม 0.01% AC 2 mg/l BA และ 0.1 mg/l IAA B) สูตร MS ที่เติม 0.01% AC 2 mg/l BA 20% CW และ 0.1 mg/l IAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์

จากการทดลองนี้ พบว่า จำนวนยอดที่พัฒนาให้ผลดีเมื่อเติม CW ความเข้มข้น 20% ร่วมกับ IAA ความเข้มข้นต่ำ (0.1 และ 0.5 mg/l) โดย IAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตให้มีการแบ่งและยืดตัวของเซลล์ (คำนูณ, 2542; ชวนพิศ, 2544) ออกซินที่สร้างบริเวณปลายยอดจะควบคุมการแตกตาข้าง ส่งเสริมหรือชักนำการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (รังสฤษดิ์, 2545) การเติมออกซินที่ความเข้มข้นต่ำกว่าไซโทไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถส่งเสริมการเกิดยอดของพืชในสภาพปลอดเชื้อได้ (Venkatachalam et al., 2015) ซึ่งการเติม IAA หรือออกซินชนิดอื่นลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนยอดนั้นได้มีรายงานใน *Dioscorea* ชนิด (species) อื่นด้วย เช่น *D. zingiberensis* C.H. Wright พบว่า ข้อสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS น้ำตาลซูโครส 20 g/l ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.1 μM และ BAP ความเข้มข้น 4.4 μM เป็นเวลา 20 วัน (Chen et al., 2003) หรือใน *D. opposita* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5-1.0 mg/l และ NAA ความเข้มข้น 1.0 mg/l (Shin et al., 2004)

จากผลการทดลอง พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 15% และ IAA ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/l หรือ เติม CW ความเข้มข้น 20% ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) โดยนำค่าของจำนวนยอดที่พัฒนาคูณกับจำนวนข้อต่อยอดตามที่ได้รายงานโดย Jirakiattikul et al. (2013) (ตารางที่ 4.2) อย่างไรก็ตาม ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม CW ความเข้มข้น 20% มีความยาวยอดสูงกว่ายอดที่พัฒนาบนอาหารที่มี CW ความเข้มข้น 15% จึงทำให้ย้ายเลี้ยงได้ง่าย รวมถึงสามารถนำยอดไปชักนำให้เกิดรากได้โดยไม่ต้องเพิ่ม

Ref. code: 25595709032527ELH

ขั้นตอนในการทำให้ยอดยืดยาว อย่างไรก็ตาม การใช้ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l จะช่วยลดต้นทุนในการผลิต เนื่องจากใช้ IAA ในความเข้มข้นที่น้อยกว่า แต่ให้ผลไม่แตกต่างกันในแง่ของอัตราการเพิ่มจำนวนยอด การศึกษาครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า อาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% CW ความเข้มข้น 20% BA ความเข้มข้น 2 mg/l และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ซึ่งอาหารสูตรนี้จะนำไปใช้ในการทดลองที่ 2 และ 3 ต่อไป โดยจะเรียกอาหารสูตรนี้ในการทดลองต่อไปว่าอาหารสูตรพื้นฐาน

ตารางที่ 4.2 อัตราการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) บนอาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 15 และ 20% ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 mg/l เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์

สูตรที่	สูตรอาหาร				อัตราการเพิ่มจำนวนยอด
	AC (%)	BA (mg/l)	CW (%)	IAA (mg/l)	
1	0.01	2	-	0.1	3.05±0.18
2	0.01	2	15	0.1	3.20±0.14
3	0.01	2	15	0.5	3.10±0.18
4	0.01	2	15	1	3.45±0.26
5	0.01	2	15	2	3.60±0.20
6	0.01	2	20	0.1	3.55±0.20
7	0.01	2	20	0.5	3.35±0.24
8	0.01	2	20	1	3.00±0.13
9	0.01	2	20	2	3.31±0.16
F-test					ns

Ref. code: 25595709032527ELH

4.2 การทดลองที่ 2 ผลของ JA และ YE ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารทุติยภูมิ

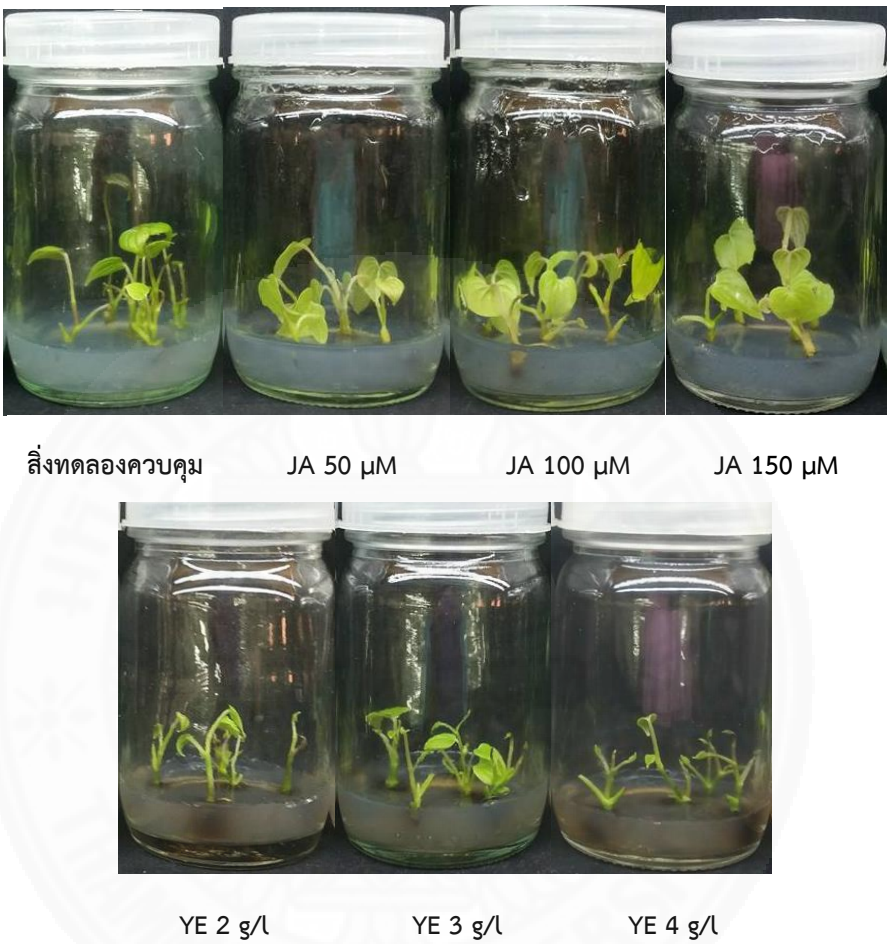
4.2.1 น้ำหนักสดและแห้งยอด

จากการทดลองพบว่า ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 100 และ 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2 3 และ 4 g/l และยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งยอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.3 4.4 4.5 และตารางที่ 4.3) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100 μM มีน้ำหนักสดและแห้งยอดสูงสุดเท่ากับ 49.01±2.25 และ 48.43±1.62 mg และ 8.14±0.45 และ 8.36±0.36 mg ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งยอดของสิ่งทดลองควบคุม (43.59±0.65 mg และ 7.19±0.21 mg ตามลำดับ) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตรพื้นฐานที่มี JA ความเข้มข้นสูงขึ้น (150 μM) พบว่า น้ำหนักสดและแห้งยอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า JA ที่ความเข้มข้นเหมาะสมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แต่หากความเข้มข้นของ JA สูงเกินไปจะส่งผลในทางลบต่อการเจริญเติบโตของพืช ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Yu et al. (2002) ที่รายงานว่า ในการเพาะเลี้ยงรากพิเศษของ *P. ginseng* ด้วยอาหารที่มี JA ความเข้มข้น 0-10 mg/l พบว่า น้ำหนักสดและแห้งของรากลดลงเมื่อความเข้มข้นของ JA เพิ่มขึ้น โดยน้ำหนักสดและแห้งมีค่าน้อยที่สุด (4.67±0.09 และ 0.41±0.01 g ตามลำดับ) เมื่อเติม JA ความเข้มข้น 10 mg/l ในขณะที่รากของสิ่งทดลองควบคุมมีน้ำหนักสดและแห้งเท่ากับ 16.15±0.03 และ 1.47±0.07 g ตามลำดับ

ส่วนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) มีน้ำหนักสด (28.87±1.01 – 30.50±0.41 mg) และแห้ง (4.45±0.11 – 5.23±0.13 mg) น้อยกว่าสิ่งทดลองควบคุม และยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.4 4.5 และตารางที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่า YE มีผลกระทบในทางลบต่อการเจริญเติบโตของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เช่นเดียวกันกับ JA ที่ความเข้มข้นสูง ทั้งนี้อาจเนื่องจาก JA และ YE มีผลต่อการดูดน้ำ และการสะสมน้ำในเซลล์ของพืช รวมถึงมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม ดังที่ Chong et al. (2005) และ Yu et al. (2002) ได้กล่าวไว้ว่า การที่น้ำหนักยอดหรือเซลล์ลดลง อาจเนื่องมาจากสารกระตุ้นบางชนิดมีผลทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของสารทุติยภูมิเกิดการเปลี่ยนแปลงกะทันหัน จึงทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบปฐมภูมิลดลง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Salvia miltiorrhiza* ในอาหารที่เติม YE ความเข้มข้น 0.25-10%

Ref. code: 25595709032527ELH

(v/v) เป็นเวลา 16 วัน พบว่า YE ทุกความเข้มข้นทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (Chen and Chen, 2000)



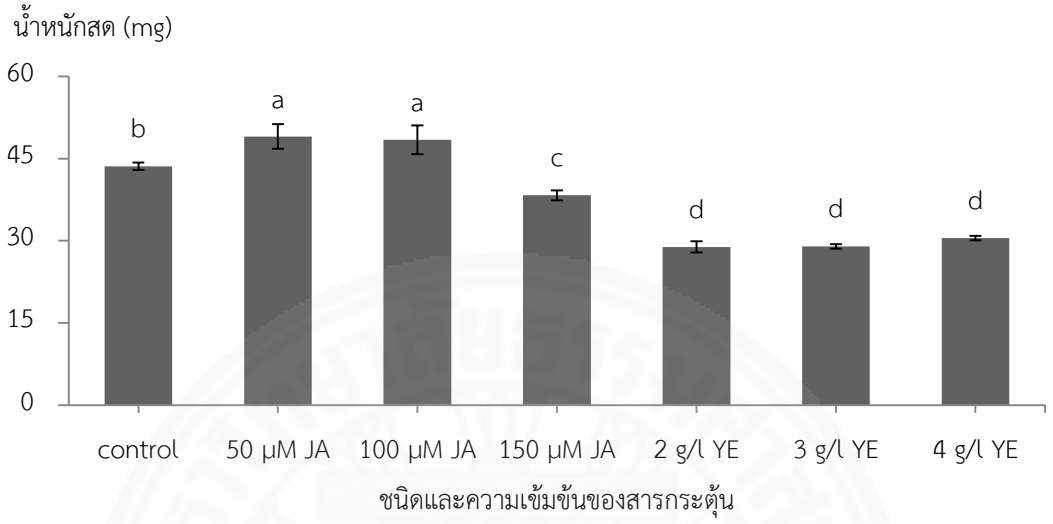
ภาพที่ 4.3 ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.2.2 % น้ำหนักแห้ง

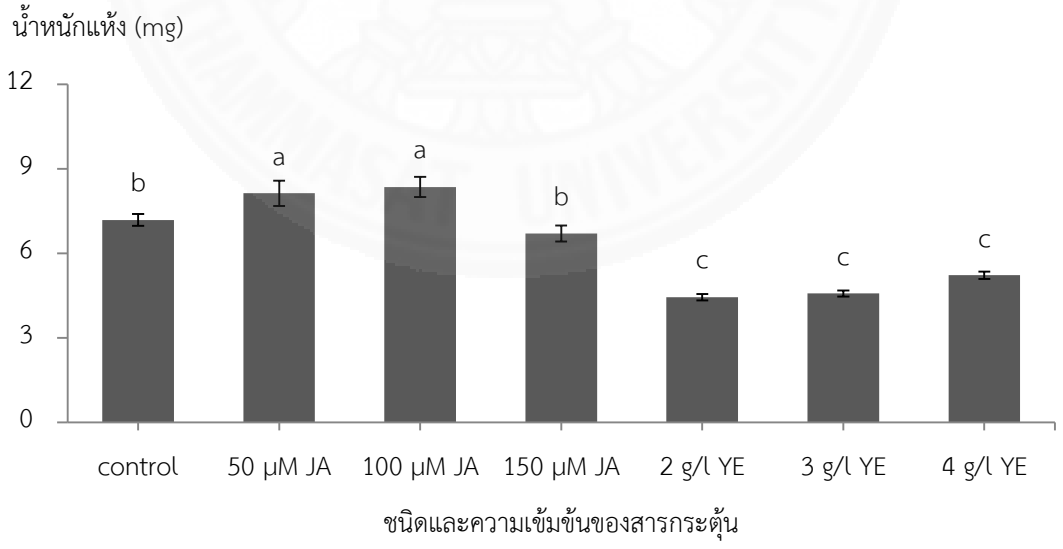
จากการนำค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมาหาค่า % น้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติมสารกระตุ้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า % น้ำหนักแห้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 150 µM มี % น้ำหนักแห้งสูงที่สุด เท่ากับ 17.52±0.36% ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม YE ความเข้มข้น 2 และ 3 g/l ที่มี % น้ำหนักแห้งน้อยที่สุด เท่ากับ 15.44±0.26 และ

Ref. code: 25595709032527ELH

15.79±0.17% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6 และตารางที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม YE ความเข้มข้น 2 และ 3 g/l มีการเจริญเติบโตน้อยกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่น

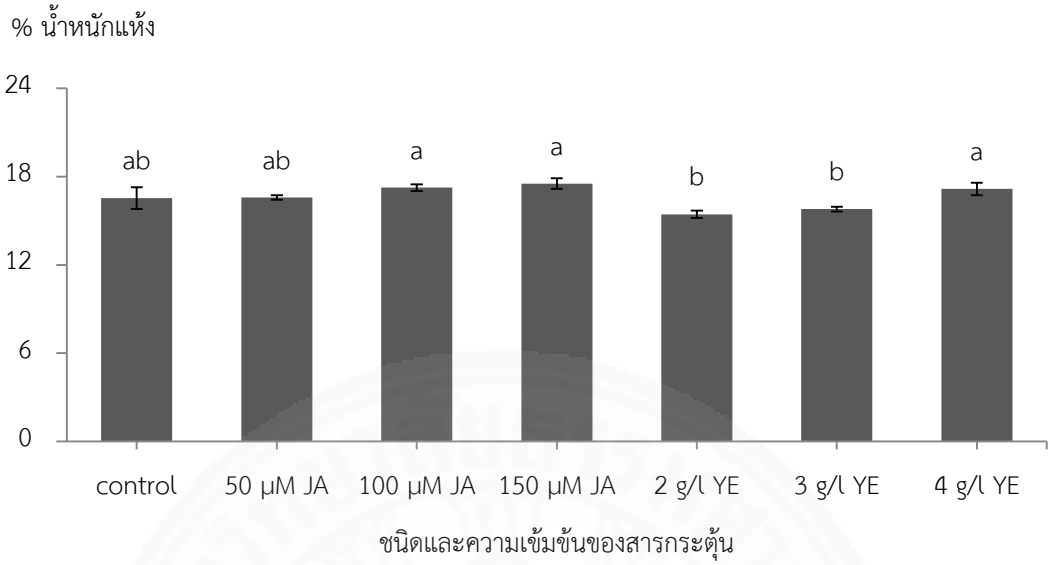


ภาพที่ 4.4 น้ำหนักสดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 100 150 µM และ YE ความเข้มข้น 2 3 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4.5 น้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 100 150 µM และ YE ความเข้มข้น 2 3 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Ref. code: 25595709032527ELH



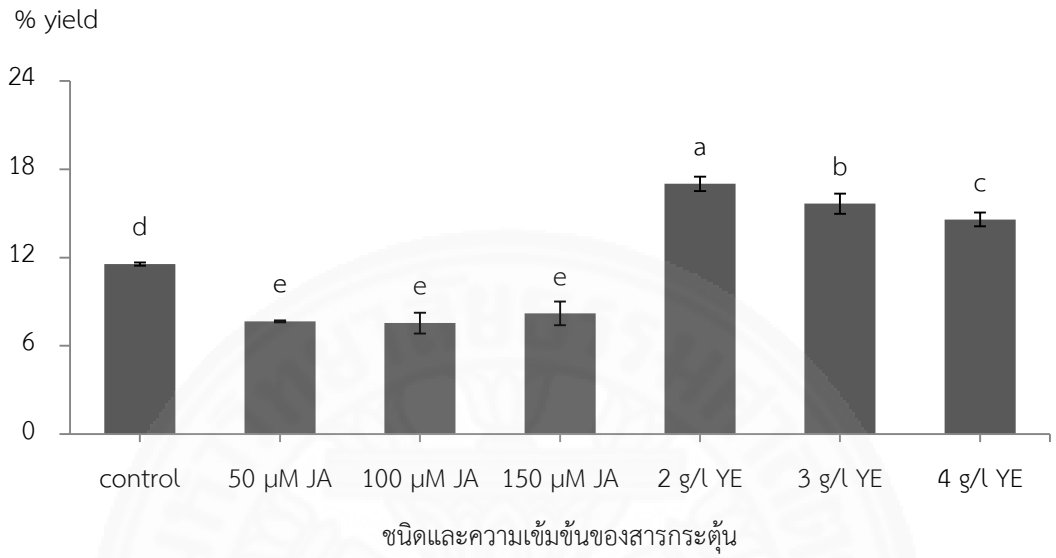
ภาพที่ 4.6 % น้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 100 150 µM และ YE ความเข้มข้น 2 3 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.2.3 % yield

จากการนำยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA และ YE ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ มาทำการสกัดสาร พบว่า ยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่มี YE ทุกความเข้มข้นมี % yield สูงกว่ายอดที่พัฒนาบนสูตรอาหารพื้นฐานที่มี JA ทุกความเข้มข้น และสิ่งทดลองควบคุม (ภาพที่ 4.7 และตารางที่ 4.3) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่มี YE ความเข้มข้น 2 g/l มี % yield สูงสุด เท่ากับ 17.01±0.49% ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับ % yield ของสิ่งทดลองอื่น ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่มี JA ความเข้มข้น 50-150 µM มี % yield ต่ำที่สุดเท่ากับ 7.55±0.71 – 8.21±0.81% ในขณะที่สิ่งทดลองควบคุมมี % yield เท่ากับ 11.56±0.11% จากรายงานการทดลองของ Jaiarree (2010) พบว่า เมื่อนำเหง้าหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) 1 kg มาสกัดมี % yield เท่ากับ 11.13% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันกับ % yield ของสิ่งทดลองควบคุมในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม ในเหง้าหัวแม่ และเหง้าหัวลูกที่รายงานโดยปิยาภัทร์ (2556) พบว่า มี % yield เท่ากับ 6.32±0.36% และ 2.21±0.48 – 2.91±0.60% ตามลำดับ ส่วนยอดอายุ 2 เดือนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีน้ำหนักแห้งยอดก่อนสกัด 2 g มี % yield เท่ากับ

Ref. code: 25595709032527ELH

3.75±0.57% (อรอุมา, 2556) แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นยอดในสภาพปลอดเชื้อด้วย YE ส่งผลให้มี % yield เพิ่มขึ้น



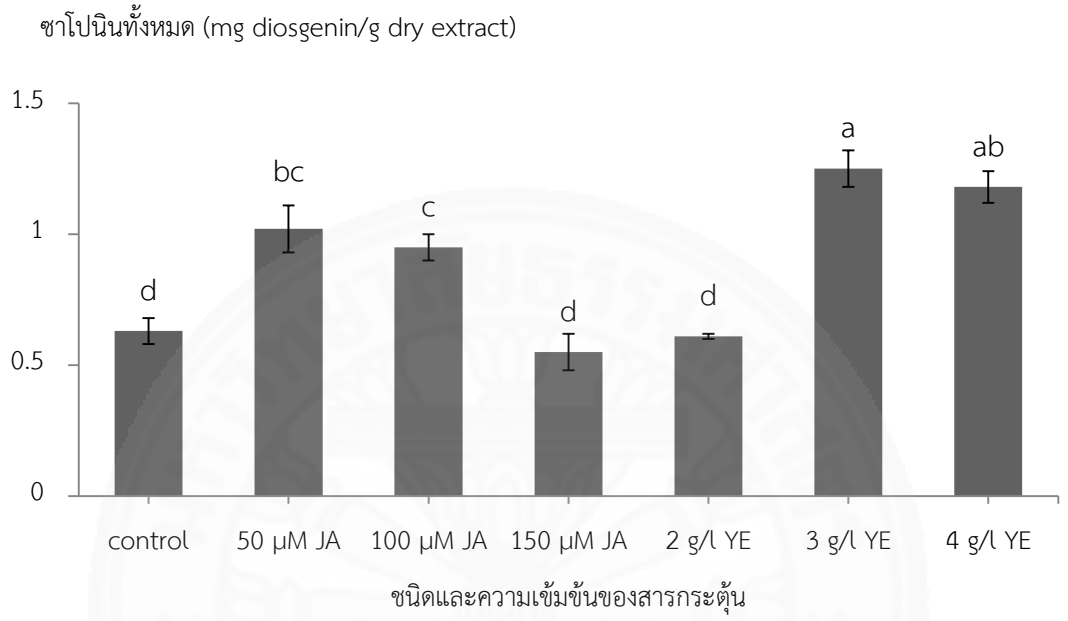
ภาพที่ 4.7 % yield ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 100 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2 3 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.2.4 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด

การเติม JA และ YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลให้ยอดมีการสร้าง และสามารถสารซาโปนินในปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดสูงสุดเมื่อยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE ความเข้มข้น 3 และ 4 g/l มีค่าเท่ากับ 1.25±0.07 และ 1.18±0.06 mg diosgenin/g dry extract ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าปริมาณซาโปนินทั้งหมดของสิ่งทดลองควบคุมเท่ากับ 1.99 และ 1.87 เท่า (ภาพที่ 4.8 และตารางที่ 4.3) หากอาหารเพาะเลี้ยงมี YE ความเข้มข้นลดลง คือ 2 g/l พบว่า ยอดมีการสร้างและสะสมสารซาโปนินทั้งหมดลดลงเท่ากับ 0.61±0.01 mg diosgenin/g dry extract ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณซาโปนินทั้งหมดที่ได้จากยอดของสิ่งทดลองควบคุม (0.63±0.05 mg diosgenin/g dry extract) ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100 μM มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด เท่ากับ 1.02±0.09 และ 0.95±0.05 mg diosgenin/g dry extract ตามลำดับ โดยมีค่าสูงกว่าปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดของสิ่งทดลอง

Ref. code: 25595709032527ELH

ควบคุม 1.61 และ 1.51 เท่า การเติม JA ที่ความเข้มข้นสูง (150 μM) ไม่มีผลต่อการสร้างและสะสมสารซาโปนินทั้งหมด โดยยอดมีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด 0.55±0.07 mg diosgenin/g dry extract ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวของสิ่งทดลองควบคุม



ภาพที่ 4.8 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 100 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2 3 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า YE มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) สร้าง และสะสมสารซาโปนินทั้งหมดได้ดีกว่า JA โดย YE ที่ความเข้มข้น 3 และ 4 g/l มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองนี้สนับสนุน วราภรณ์ (2551) ที่กล่าวไว้ว่า สารกระตุ้นแต่ละชนิดจะมีผลทำให้การสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น การตอบสนองของพืชจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของสารกระตุ้น โดยประสิทธิภาพของสารกระตุ้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่ใช้ มีรายงานในพืชสมุนไพรหลายชนิดที่พบว่า YE มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้มีการสร้าง และสะสมสารทุติยภูมิได้ เช่น การเติม YE ความเข้มข้น 0.5-3.0 g/l ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย *P. ginseng* C.A. Meyer เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 0 5 10 และ 15 วัน และเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 25 วันหลังจากเติม YE เปรียบเทียบกับเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงนาน 0 วัน ในอาหารที่ไม่มี YE เป็นเวลา 25 วัน (สิ่งทดลองควบคุม) พบว่า การเติม YE

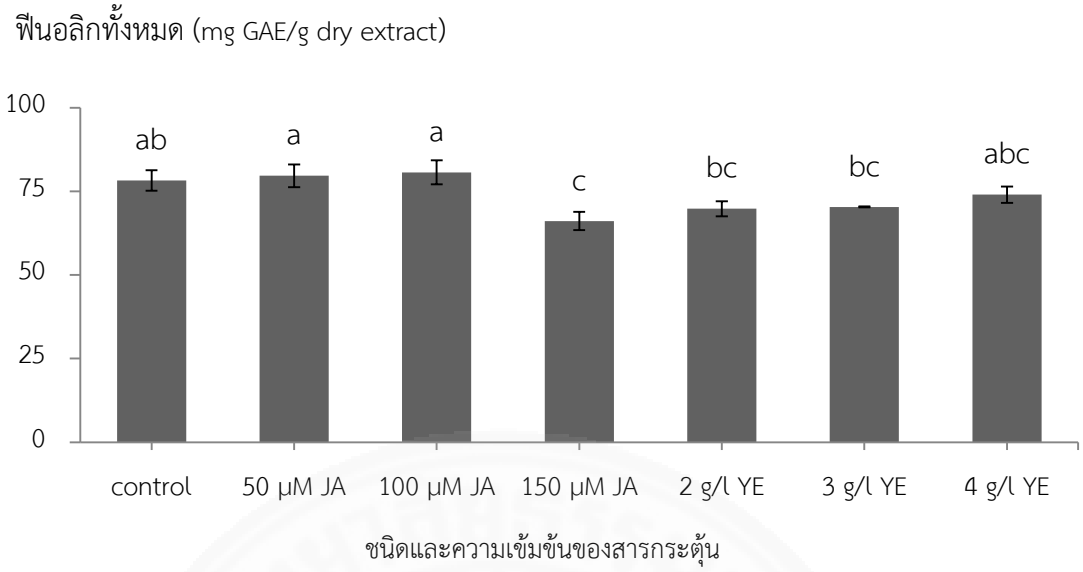
Ref. code: 25595709032527ELH

ความเข้มข้น 3 g/l เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 0 วัน มีปริมาณสารซาโปนินเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 1.61% หรือ 20 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (Lu et al., 2001) หรือใน Kamonwannasit et al. (2008) ศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดของ *B. monnieri* L. และกระตุ้นด้วย YE ความเข้มข้น 2 mg/ml พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสาร pseudojujubogenin glycosides เท่ากับ 40.05±2.37 mg/g DW ซึ่งสูงถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน นอกจากนี้ Hasanloo et al. (2009) พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์รากขนของ *S. marianum* L. ในอาหารที่เติม YE ความเข้มข้น 2.5 mg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า สามารถเพิ่มการสะสมสาร silymarin ได้สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 0.476 mg/g DW การที่ YE สามารถกระตุ้นให้พืชสมุนไพรสร้าง และสะสมสารทุติยภูมิได้นั้น เนื่องจาก YE จะกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานเพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากโรคพืช ความต้านทานของพืชถูกเหนี่ยวนำให้สร้างสารบางชนิด โดยโมเลกุลของพืชที่ทำหน้าที่เป็นตัวตอบสนองการกระตุ้น (pattern recognition receptor; PRR) สามารถตรวจจับโมเลกุลจากเชื้อสาเหตุโรคพืช (pathogen-associated molecular pattern; PAMP) เช่น โปรตีนแฟลกเจลลิน (flagellin) องค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (lipopolysaccharide) หรือองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา (chitin) (Thomma et al., 2011) จึงทำให้เกิดการตอบสนองในแบบต่างๆ ทั้งการป้องกันพืชและการกำจัดเชื้อสาเหตุ โดยพืชจะสังเคราะห์สารบางชนิดให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น และเพียงพอที่จะกำจัดเชื้อสาเหตุได้ (Lucas, 1998) เช่น การสังเคราะห์สารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) ที่เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก เทอร์ปีนอยด์ และอาลิพาติกส์ ที่มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (Buchanan et al., 2000)

4.2.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการทดลองพบว่า ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100 μM โดยมีค่าเท่ากับ 79.64±3.42 และ 80.66±3.59 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ (ภาพที่ 4.9 และตารางที่ 4.3) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมสารกระตุ้น (78.21±3.06 mg GAE/g dry extract) และเติม YE ความเข้มข้น 4 g/l (74.01±2.43 mg GAE/g dry extract) แต่ยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 150 μM หรือ YE ความเข้มข้น 2 และ 3 g/l พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าค่าดังกล่าวของสิ่งทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติม JA ความเข้มข้นสูง (150 μM) และ YE ความเข้มข้นต่ำ (2 และ 3 g/l) ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงหรือน้อยกว่าสิ่งทดลองควบคุม

Ref. code: 25595709032527ELH



ภาพที่ 4.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

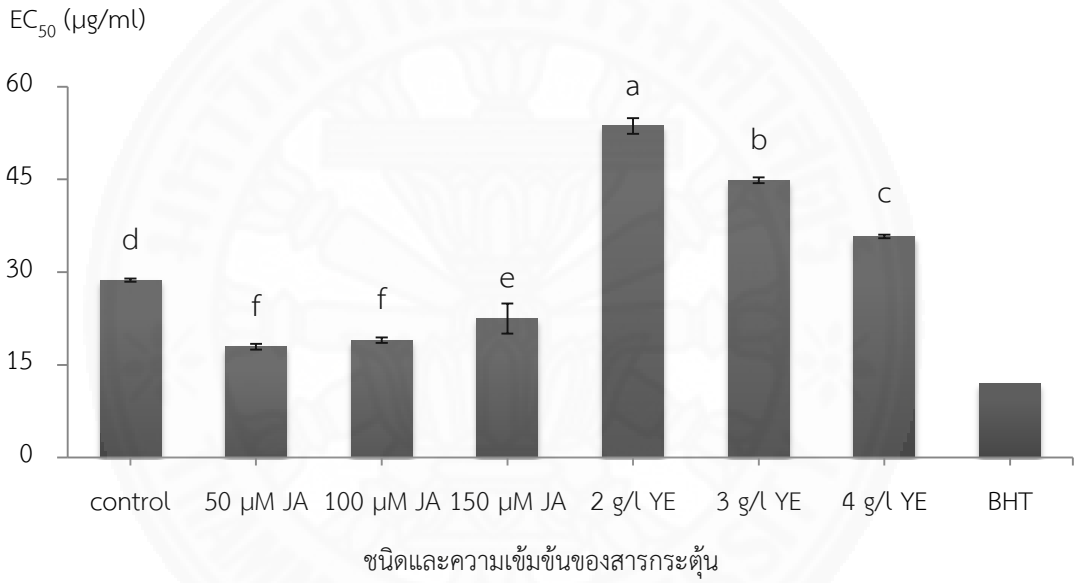
4.2.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50})

การเติม JA และ YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) แตกต่างกัน โดยพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อยอดพัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100 μM มีค่า EC_{50} เท่ากับ 17.94±0.46 และ 18.98±0.44 μg/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10 และตารางที่ 4.3) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่า EC_{50} ของยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) และเติม JA ความเข้มข้น 150 μM และ YE ทุกความเข้มข้น โดยผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดเมื่อได้รับสารกระตุ้น

จากผลการทดลองในส่วนของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH นี้จะเห็นได้ว่า JA ความเข้มข้น 50 และ 100 μM สามารถกระตุ้นให้ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) สร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดให้เพิ่มขึ้นได้เล็กน้อย และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Rungruang et al. (2015) ที่กระตุ้นเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองด้วย MeJA ซึ่งเป็นสารกระตุ้นในกลุ่มเดียวกันกับ JA ที่ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μM พบว่า ทุกความเข้มข้นของ MeJA ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย แต่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มสูงขึ้น โดยการเติม MeJA ความเข้มข้น 50 μM ส่งผลให้เซลล์แขวนลอยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น

Ref. code: 25595709032527ELH

สูงสุด เท่ากับ 81.16 mg GAE/ 100 g DW และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด เท่ากับ 86.11 µg TE/ 100 g DW อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Jirakiattikul et al. (2016) ได้ทำการเพาะเลี้ยงยอดของหัวข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ซึ่งเป็นพืชใน genus และ section เดียวกันกับหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม JA ความเข้มข้น 100 250 500 µM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดที่ได้รับ JA ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม แสดงให้เห็นว่า การตอบสนองของสารกระตุ้นในการสร้างสารทุติยภูมิของพืชแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันไป



ภาพที่ 4.10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 100 150 µM และ YE ความเข้มข้น 2 3 4 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

นอกจากนี้ จากผลการทดลองที่พบว่า การเติม YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ลดน้อยลงกว่าสิ่งทดลองควบคุม ในขณะที่ YE ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดในพืชชนิดนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากกลไกในการกระตุ้นของ YE ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จึงส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Lim et al. (2013) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Orthosiphon stamineus* โดยใช้สารกระตุ้นทั้งหมด 5 ชนิด

Ref. code: 25595709032527ELH

คือ NaCl sucrose caseinhydrolysate YE และ chitosan พบว่า NaCl caseinhydrolysate และ YE ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ นอกจากนี้ Gabr et al. (2016) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบของ *S. marianum* L. บนอาหารที่มี chitosan ความเข้มข้น 200-800 mg/l SA ความเข้มข้น 10-40 mg/l และ MeJA ความเข้มข้น 20-80 mg/l เป็นเวลา 14 วัน พบว่า MeJA ความเข้มข้น 20 mg/l ส่งผลให้แคลลัสมีปริมาณ total silymarin (13.59±0.88 µg/g DW) สูงกว่าสารกระตุ้นชนิดอื่น และสิ่งทดลองควบคุม (3.70±0.33 – 12.77±0.47 µg/g DW) อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของแคลลัสที่ได้รับสารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิดทุกความเข้มข้นมีค่าต่ำกว่าสิ่งทดลองควบคุม ซึ่งจะเห็นได้ว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารทุติยภูมิที่ต้องการอาจไม่สัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงกล่าวได้ว่า YE สามารถกระตุ้นสารทุติยภูมิในกลุ่มไตร-เทอร์ปีนอยด์ซาโปนิน ส่วน JA สามารถกระตุ้นการสร้างสารในกลุ่มฟีนอลิก (ตารางที่ 4.3) แต่เนื่องจากสารซาโปนินทั้งหมดเป็นสารทุติยภูมิที่สำคัญของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) จึงควรใช้ YE ความเข้มข้น 3 g/l ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อหรือยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของพืชในการสร้างสารทุติยภูมินั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นแล้ว ยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นด้วย (วราภรณ์, 2551) จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงระยะเวลาในการได้รับ YE หรือระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิต่อไปในการทดลองที่ 3

Ref. code: 25595709032527ELH

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % yield ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารกระตุ้น	ความเข้มข้น	น้ำหนักสด/ยอด (mg)	น้ำหนักแห้ง/ยอด (mg)	% น้ำหนักแห้ง	% yield	ซาโปนิน (mg diosgenin /g dry extract)	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g dry extract)	EC_{50} (µg/ml)
-	-	43.59±0.68[1/b]	7.19±0.21[b]	16.53±0.74[ab]	11.56±0.11[d]	0.63±0.05[d]	78.21±3.06[ab]	28.73±3.06[d]
JA	50 µM	49.01±2.25[a]	8.14±0.45[a]	16.59±0.15[ab]	7.67±0.07[e]	1.01±0.09[bc]	79.64±3.42[a]	17.94±3.42[f]
	100 µM	48.43±1.62[a]	8.36±0.36[a]	17.25±0.23[a]	7.55±0.71[e]	0.95±0.05[c]	80.66±3.59[a]	18.98±3.59[f]
	150 µM	38.29±0.90[c]	6.71±0.28[b]	17.52±0.36[a]	8.21±0.81[e]	0.55±0.07[d]	66.14±2.72[c]	22.49±2.72[e]
YE	2 g/l	28.87±1.01[d]	4.45±0.11[d]	15.44±0.26[b]	17.01±0.49[a]	0.61±0.01[d]	69.82±2.25[bc]	53.66±2.25[a]
	3 g/l	28.96±0.39[d]	4.58±0.11[d]	15.79±0.17[b]	15.66±0.68[b]	1.25±0.07[a]	70.32±0.14[bc]	44.88±0.14[b]
	4 g/l	30.50±0.41[d]	5.23±0.13[d]	17.16±0.43[a]	14.59±0.46[c]	1.18±0.06[ab]	74.01±2.43[abc]	35.76±2.43[c]
F-test		**	**	*	**	**	*	**

[1/] ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

Ref. code: 25595709032527ELH

4.3 การทดลองที่ 3 ผลของ YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิ

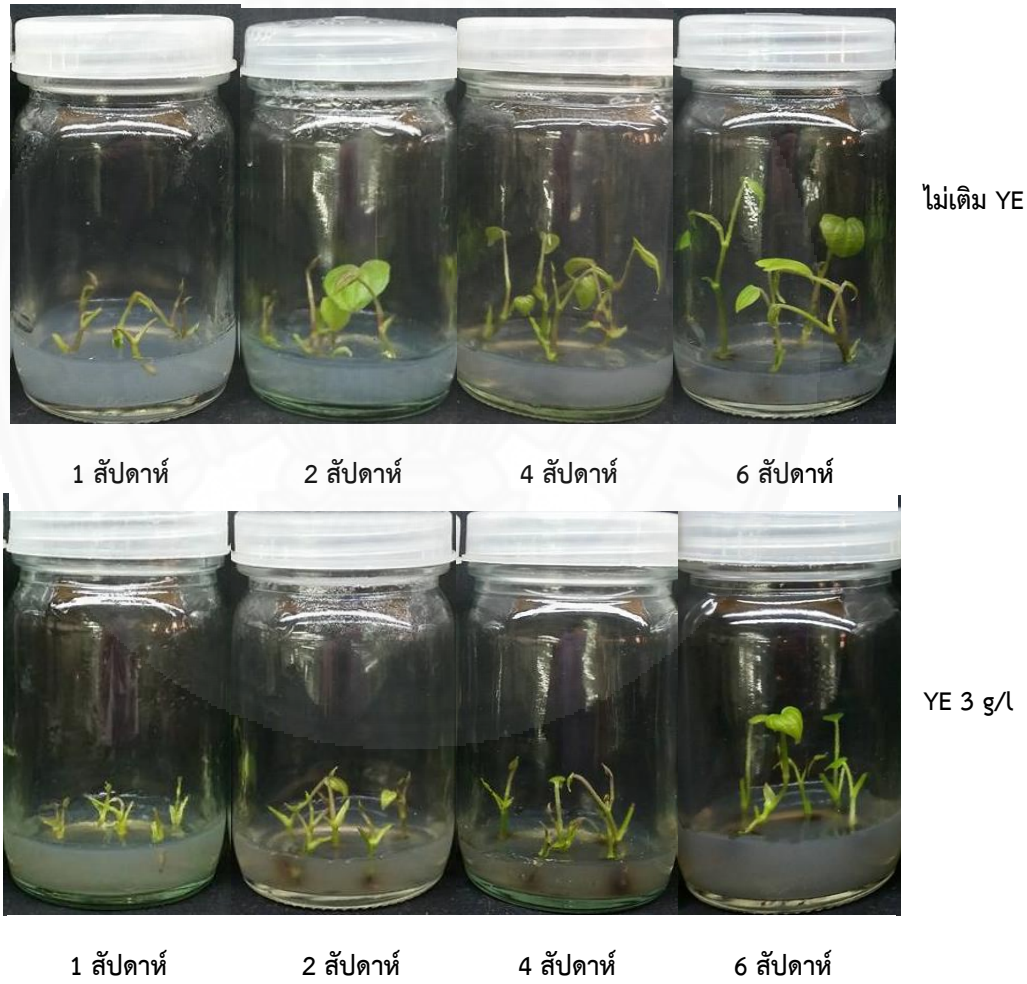
4.3.1 น้ำหนักสดและแห้งยอด

ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติมหรือไม่เติม YE ความเข้นข้น 3 g/l เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์ พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อน้ำหนักสดและแห้งยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) (ภาพที่ 4.11 4.12 4.13 และตารางผนวกที่ ง.1) โดยยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่ได้รับ YE เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ มีน้ำหนักสด (46.65±2.67 mg) และแห้ง (8.63±0.41 mg) สูงสุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของสิ่งทดลองอื่น ส่วนยอดที่ไม่ได้รับ YE ที่เพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ และได้รับ YE นาน 1-2 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งยอดน้อยที่สุด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การที่พืชเจริญเติบโตบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม และระยะเวลานานขึ้นพืชจะมีการเจริญเติบโต และการพัฒนาที่ดี โดยพืชจะมีการขยายขนาด การยืดตัวของเซลล์ การเพิ่มปริมาณไซโทพลาสซึม ทำให้มีขนาด และน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเพาะเลี้ยง (ลิลลี่, 2546) สอดคล้องกับทิพย์สุคนธ์ และคณะ (2557) ที่ได้รายงานผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ต่อการเจริญเติบโตของยอดข้าวเย็นใต้ (*D. membra-nacea* Prain & Burkill) ที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM เป็นเวลา 4 6 8 10 12 14 และ 16 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่พัฒนามีน้ำหนักสดและแห้งยอดเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยยอดที่เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งยอดน้อยที่สุด และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 6-16 สัปดาห์ โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 12-16 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งยอดสูงสุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของใบบัวบก (*Centella asiatica* L.) นาน 22 วัน พบว่า ในช่วง 4 วันแรกของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักสดและแห้งของแคลลัสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่หลังจากวันที่ 6 น้ำหนักสดและแห้งของแคลลัสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 22 ของการเพาะเลี้ยง (Tan et al., 2010) ส่วน Wu et al. (2005) เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *P. ginseng* เป็นเวลา 25 วัน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ 5-7 วัน เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ หลังจากนั้นเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงอายุ 12 วัน โดยมีน้ำหนักแห้งสูงสุดแล้วค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง

จากภาพที่ 4.11 และ 4.12 จะเห็นได้ว่า น้ำหนักสดและแห้งของยอดที่ได้รับและไม่ได้รับ YE เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2-6 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม YE นาน 2-6 สัปดาห์ มีน้ำหนักสด (22.11±2.48 – 30.69±1.25 mg) และแห้ง (3.36±0.46 – 5.57±0.35 mg) น้อยกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่

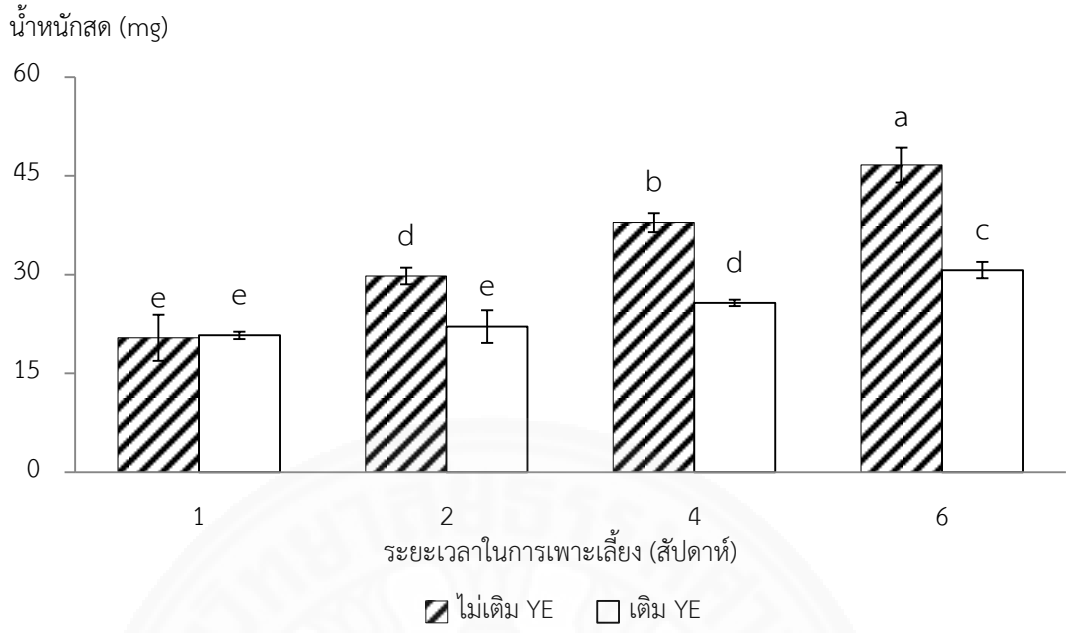
Ref. code: 25595709032527ELH

เติม YE (29.80±1.25 – 46.65±2.67 mg และ 4.83±0.14 – 8.63±0.41 mg ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า YE มีผลต่อการเจริญเติบโตของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองที่ 2 โดยพบว่า น้ำหนักสดและแห้งของยอดที่ได้รับ YE มีค่าน้อยกว่าค่าดังกล่าวของยอดที่ได้รับ JA หรือไม่ได้รับสาร (สิ่งทดลองควบคุม) และสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *S. miltiorrhiza* เป็นเวลา 16 วัน โดยพบว่า YE ทุกความเข้มข้น ทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยลดลง (มีค่าอยู่ระหว่าง 6.8-7.8 g/l) เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (11.3 g/l) (Chen and Chen, 2000) หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์รากขนของ *P. ginseng* C. A. Meyer ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า JA มีผลทำให้น้ำหนักสดและแห้งของรากลดลงตามความเข้มข้นของ JA แต่

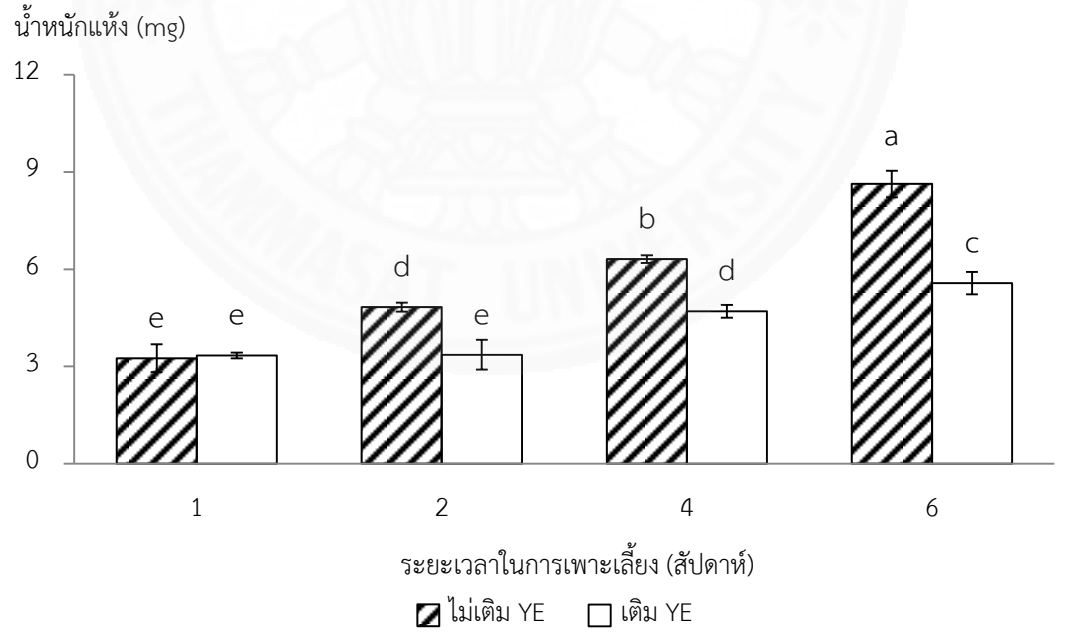


ภาพที่ 4.11 ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติมหรือไม่เติม YE ความเข้นข้น 3 g/l เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์

Ref. code: 25595709032527ELH



ภาพที่ 4.12 น้ำหนักสดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์



ภาพที่ 4.13 น้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์

Ref. code: 25595709032527ELH

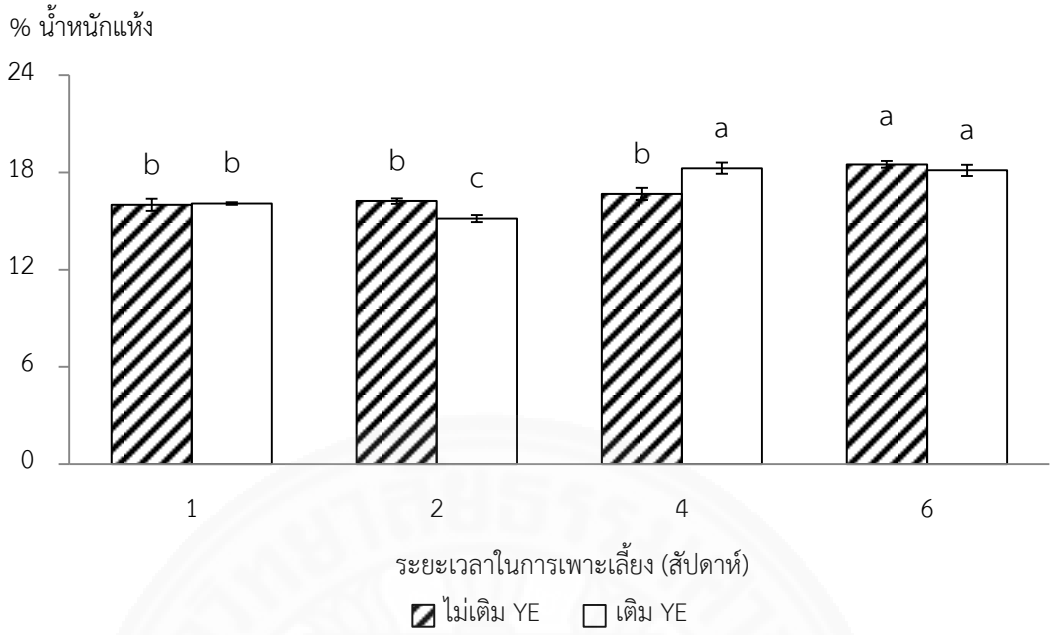
ปริมาณสาร ginsenoside เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ JA (Yu et al., 2002) ซึ่ง Chong et al. (2005) และ Yu et al. (2002) กล่าวว่า การที่น้ำหนักยอดหรือเซลล์ลดลง อาจเนื่องมาจากสารกระตุ้นบางชนิดมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม ทำให้สารประกอบปฐมภูมิลดลง นอกจากนี้ยังเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหันของกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารทุติยภูมิ จึงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

และจากการทดลองนี้พบว่า YE มีผลกระทบในทางลบต่อการเจริญเติบโตของยอดมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 2-6 สัปดาห์ ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่า ผลของ YE ต่อการเจริญเติบโตของพืชจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการได้รับสารด้วย ซึ่งผลของระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ หรืออวัยวะที่เพาะเลี้ยงได้มีรายงานแล้วเช่นกันในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *C. officinalis* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้น 5 ชนิด คือ Chitosan JA YE Pectin และเชื้อรา *T. viride* เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง พบว่า การเติม JA chitosan หรือ YE ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตที่ 72 ชั่วโมงแรก แต่ที่ 96 ชั่วโมงที่ได้รับสารกระตุ้น เซลล์เกือบทั้งหมดมีการเจริญเติบโตลดลง โดยการได้รับสาร JA (50 μM) และ chitosan (150 mg/l) นาน 96 ชั่วโมง พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงมากถึง 18 และ 22% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม ส่วนการเติมเชื้อรา *T. viride* พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มลดลง หลังจากได้รับสารนาน 24 ชั่วโมง และการเจริญเติบโตลดลงมากถึง 42% หลังจากได้รับสารนาน 96 ชั่วโมง (Wiktorowska et at., 2010) อย่างไรก็ตาม มีพืชบางชนิดที่รายงานว่า การเติมสารกระตุ้นลงในอาหารเพาะเลี้ยงไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช ดังเช่น การเพาะเลี้ยงรากของ *P. abrotanoides* Karel บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ $AgNO_3$ sorbitol YE และ MeJA พบว่า ทุกสิ่งทดลอง และสิ่งทดลองควบคุมมีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย MeJA ความเข้มข้น 50 μM มีน้ำหนักแห้งต่ำที่สุด เท่ากับ 0.564±0.284 g (Zaker et al., 2015)

4.3.2 % น้ำหนักแห้ง

จากการทดลอง พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อ % น้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 4.14 และตารางผนวกที่ ง.1) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่เติม YE นาน 6 สัปดาห์ มี % น้ำหนักแห้งสูงสุด (18.50±0.20%) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE นาน 4 และ 6 สัปดาห์ (18.26±0.34 และ 18.13±0.35% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม ยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE นาน 2 สัปดาห์ มี % น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด (15.15±0.22%)

Ref. code: 25595709032527ELH



ภาพที่ 4.14 % น้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์

4.3.3 % yield

จากการนำยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติมหรือไม่เติม YE ความเข้นข้น 3 g/l ในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์ มาทำการสกัดสาร และคำนวณ % yield พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อ % yield ของสารสกัด (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงก็ไม่มีผลต่อ % yield โดยยอดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 1-6 สัปดาห์ ให้ % yield เท่ากับ 15.08±1.69 – 16.26±0.79% อย่างไรก็ตาม การเติม YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลให้ยอดมี % yield (16.10±0.57%) สูงกว่า และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม YE (15.08±1.16%)

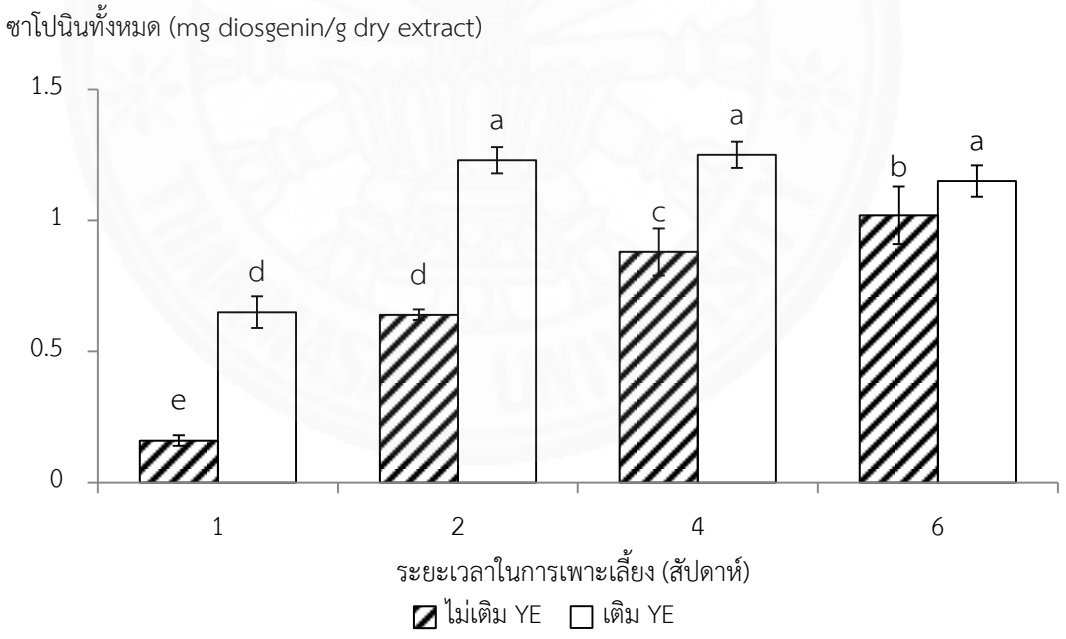
4.3.4 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด

จากการทดลอง พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด (ภาพที่ 4.15 และตารางผนวกที่ ง.2) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่เติม YE มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง แต่ปริมาณสารดังกล่าวน้อยกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

Ref. code: 25595709032527ELH

ตารางที่ 4.4 % yield ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1-6 สัปดาห์

สิ่งทดลอง		% yield
สารกระตุ้น (E)	ไม่เติม YE	15.08±1.16[b]
	เติม YE	16.10±0.57[a]
ระยะเวลาเพาะเลี้ยง	1	15.20±0.23
(T: สัปดาห์)	2	15.83±0.56
	4	15.08±1.69
	6	16.26±0.79
สารกระตุ้น (E)		**
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (T)		ns
E X T		ns
C.V. (%)		5.09



ภาพที่ 4.15 ปริมาณซาโปนินทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์

Ref. code: 25595709032527ELH

ทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเท่ากัน ซึ่งยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE ความเข้มข้น 3 g/l นาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 1.25±0.05 mg diosgenin/g dry extract แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวเมื่อยอดพัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE นาน 2 และ 6 สัปดาห์ (1.23±0.05 และ 1.15±0.06 mg diosgenin/g dry extract ตามลำดับ) โดยปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดที่ได้จากยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE นาน 2 4 และ 6 สัปดาห์นี้ มีค่าสูงกว่า 1.93 1.42 และ 1.13 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ YE เป็นระยะเวลานานเท่ากัน (0.64±0.02 0.88±0.09 และ 1.02±0.11 mg diosgenin/g dry extract ตามลำดับ) ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม YE เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ ก็สามารถสร้างสารซาโปนินทั้งหมดได้เพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 0.65±0.06 mg diosgenin/g dry extract ซึ่งสูงกว่า 1.41 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ YE นาน 1 สัปดาห์ (0.46±0.02 mg diosgenin/g dry extract)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า YE สามารถกระตุ้นการสร้างสารซาโปนินทั้งหมดในยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) และระยะเวลาที่ได้รับสารกระตุ้นมีผลต่อการสร้าง และสะสมสารซาโปนินทั้งหมดด้วย โดย Ramachandra Rao and Ravishankar (2002) กล่าวว่า การที่พืชถูกรุกรานโดยเชื้อโรค มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคในเซลล์พืชขึ้นด้วยการตอบสนองต่างๆ รวมไปถึงการสะสมของสารทุติยภูมิ ดังนั้น การเติม YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยง จึงมีผลทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์พืชในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสาร ทุติยภูมิได้เพิ่มขึ้น ดังที่ได้กล่าวแล้วในการทดลองที่ 2 นอกจากนี้ วราภรณ์ (2551) ยังได้กล่าวไว้ว่า สารกระตุ้นสามารถกระตุ้นเซลล์พืชได้ตลอดเวลาที่เพาะเลี้ยง และมีการสัมผัสสารจนกว่าจะมีการเก็บเกี่ยว ดังนั้นการหาระยะเวลาที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ และจำเป็นต้องศึกษาถึงรายละเอียดในการเพาะเลี้ยงพืชแต่ละชนิด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับพืชสมุนไพรหลายชนิดที่เติม YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยง และสามารถส่งเสริมให้สร้าง และสะสมสารทุติยภูมิในกลุ่มไกลโคไซด์และซาโปนินได้ เช่น *B. monnieri* L. (Kamonwannasit et al., 2008) *S. marianum* L. (Hasanloo et al., 2009) *P. abrotanoides* Karel (Zaker et al., 2015) *C. officinalis* L. (Wiktorowska et al., 2010) และ *P. ginseng* C.A. Meyer (Lu et al., 2001) อย่างไรก็ตามความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังเช่นยอดของ *B. monnieri* L. สามารถเพิ่มปริมาณสาร pseudojujubogenin glycosides เท่ากับ 40.05±2.37 mg/g DW ซึ่งสูงถึง 6 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม YE ความเข้มข้น 2 mg/ml เป็นเวลา 7 วัน (Kamonwannasit et al., 2008) หรือในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอายุ 0 5 10 และ 15 วัน ของ *P. ginseng* ในอาหารที่มี YE ความเข้มข้น 0.5-3.0 g/l เป็นเวลา 25 วัน พบว่า การเติม YE ความเข้มข้น 3 g/l ให้กับเซลล์แขวนลอยที่อายุ 0 วัน สามารถเพิ่มปริมาณสารซาโปนินได้สูงสุด เท่ากับ 1.61% หรือ 20 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (Lu et al., 2001)

Ref. code: 25595709032527ELH

4.3.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการเติมหรือไม่เติม YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เป็นเวลา 1-6 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ตารางที่ 4.5) นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเติมหรือไม่เติม YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยง โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม และไม่เติม YE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 70.86±5.33 และ 70.74±10.53 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ ส่วนระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยพบว่า ยอดที่พัฒนาบนอาหารเป็นเวลา 4 และ 6 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 77.84±5.93 และ 75.82±6.38 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับปริมาณสารดังกล่าวเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ (61.36±2.74 และ 68.18±4.25 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ)

ตาราง 4.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1-6 สัปดาห์

สิ่งทดลอง		สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g dry extract)
สารกระตุ้น (E)	ไม่เติม YE	70.74±10.53
	เติม YE	70.86±5.33
ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (T: สัปดาห์)	1	61.36±2.74[c]
	2	68.18±4.25[b]
	4	77.84±5.93[a]
	6	75.82±6.38[a]
สารกระตุ้น (E)		ns
ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (T)		**
E X T		ns
C.V. (%)		7.37

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า YE ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองที่ 2 ทั้งนี้อาจเนื่องจากกลไกในการกระตุ้นของ YE อาจไม่ส่งผลต่อการสร้าง และสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของพืชชนิดนี้ และสอดคล้องกับการศึกษาในยอดข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ที่พบว่า

Ref. code: 25595709032527ELH

สารกระตุ้นไม่สามารถส่งเสริมการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ โดยเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 100 250 และ 500 μM และ SA ความเข้มข้น 50 100 และ 200 μM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ในช่วง47.44±9.25 – 53.54±3.85 mg/GAE/g dry extract (ทิพย์สุคนธ์, 2557) หรือจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *S. marianum* L. บนอาหารที่เติม chitosan SA และ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน พบว่า แคลลัสที่ได้รับสารกระตุ้นทุกชนิดทุกความเข้มข้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยกว่าสิ่งทดลองควบคุม (Gabr et al., 2016) อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของสารกระตุ้นต่อการสร้างสารประกอบฟีนอลิกก็จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังงานวิจัยของ Yan et al. (2006) ที่พบว่า YE สามารถส่งเสริมให้พืชสร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นได้ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์รากขนของ *S. miltiorrhiza* ในอาหารที่มี YE และ Ag^+ เป็นเวลา 0-96 ชั่วโมง พบว่า YE ที่ความเข้มข้น 200 mg/l สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 20% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง หรือในการใช้สารกระตุ้นชนิดอื่นๆ เช่น sucrose ความเข้มข้น 45 g/l และ chitosan ความเข้มข้น 150 mg/l ส่งเสริมให้เซลล์ของ *Orthosiphon stamineus* มีการสร้างสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น และมากกว่าสิ่งทดลองควบคุม (Lim et al., 2013) นอกจากนี้ จากการทดลอง พบว่า การเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงขึ้น สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงยอดข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) บนอาหารแข็ง และเหลวที่เติม JA ความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเหลวนาน 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 62.02±5.12 และ 56.23±0.72 mg GAE/g dry extract ซึ่งแตกต่างอย่างนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเหลว นาน 2-4 สัปดาห์ (ทิพย์สุคนธ์, 2557)

4.3.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50})

จากการทดลองพบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม YE และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) (ภาพที่ 4.16 และตารางผนวกที่ ง.2) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 31.58±2.42 μg/ml ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่า EC_{50} ของสิ่งทดลองอื่น ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 68.45±5.76 และ 72.82±3.44 μg/ml ตามลำดับ แต่การเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติม YE เป็นระยะเวลานานขึ้นหรือนาน 6 สัปดาห์ พบว่า มีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่ายอดที่ไม่ได้รับ YE เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเท่ากัน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า YE ไม่มีผลต่อ

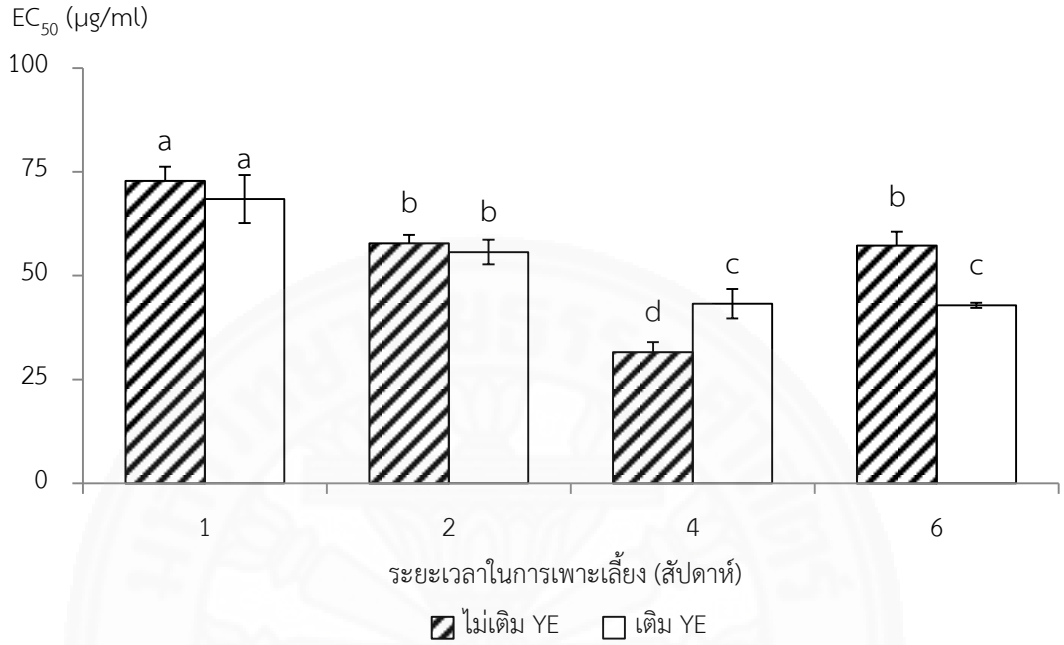
Ref. code: 25595709032527ELH

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 1-4 สัปดาห์ แต่หากเพาะเลี้ยงนานขึ้นเป็น 6 สัปดาห์ YE ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงรากแขวนลอยของ *P. ginseng* ที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM และ SA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 0-9 วัน พบว่า รากแขวนลอยที่ได้รับ SA ความเข้มข้น 200 μM นาน 9 วัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด เท่ากับ 58.27% (Ali et al., 2007) อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของพืชต่อระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นอาจแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด โดย Rodrigues-Brandão et al. (2014) ได้ศึกษาเพาะเลี้ยงข้อของ *Alternanthera tenella* ในอาหารเหลวที่เติม SA ความเข้มข้น 400 μM เป็นเวลา 0-36 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใบมาวิเคราะห์หาปริมาณสารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้นไม่มีผลต่อ %inhibition ของ DPPH โดย %inhibition ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระยะเวลา 12-48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดที่ได้รับ YE นาน 6 สัปดาห์ ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่ายอดที่ไม่ได้รับ YE นาน 4 สัปดาห์

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อได้รับ YE ที่ระยะเวลานานต่างกัน พบว่า ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้น และสูงสุดเมื่อได้รับ YE นาน 2 สัปดาห์ ในขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีฤทธิ์ดีขึ้นเมื่อได้รับ YE นาน 6 สัปดาห์ และ YE ไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นด้วย YE นาน 2 สัปดาห์ ส่งผลให้ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นเท่านั้น ซึ่งไม่สัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ทั้งนี้อาจเนื่องจากกลไกในการกระตุ้นของ YE และระยะเวลาในการกระตุ้นไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Hasanloo et al. (2009) ที่เพาะเลี้ยงเซลล์รากขนของ *S. marianum* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติม YE ความเข้มข้น 2.5 mg/50 ml เป็นเวลา 0-120 ชั่วโมง พบว่า เซลล์รากขนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี YE มีค่า IC_{50} ลดน้อยลงกว่าในสิ่งทดลองควบคุมหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 72-120 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณสาร silymarin เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง และลดลงเมื่อได้รับ YE นาน 96-120 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นให้สาร silymarin เพิ่มขึ้นเป็นเวลาที่เซลล์รากขนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ หรือจากการทดลองของ Rodrigues-Brandão et al. (2014) ที่เพาะเลี้ยงข้อของ *A. tenella* ในอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 400 μM เป็นเวลา 0-36 ชั่วโมง พบว่า สาร betacyanin เพิ่มขึ้นหลังได้รับสาร 36-48 ชั่วโมง ในขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12-36 ชั่วโมง ส่วนสารฟลาโวนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 0 และ 12 ชั่วโมง โดยที่ 36 และ 48 ชั่วโมง ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ลดลงมากถึง

Ref. code: 25595709032527ELH

18% แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาที่ได้รับสารเพื่อกระตุ้นการสร้างสารฟลาโวนอยด์ให้เพิ่มขึ้นนั้นไม่สัมพันธ์กับ betacyanin และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH



ภาพที่ 4.16 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1 2 4 และ 6 สัปดาห์

ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สามารถกล่าวได้ว่า การเติม YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอดของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ทำให้ยอดมีการสร้าง และสะสมปริมาณสาร ซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นทุกระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยเพิ่มขึ้น 1.41-1.93 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ YE แต่ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และเนื่องจากสารทุติยภูมิที่สำคัญในหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) คือสารซาโปนินทั้งหมด ดังนั้นจึงควรเติม YE ความเข้มข้น 3 g/l ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอด และเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ โดยมีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด เท่ากับ 1,233.33±47.15 µg diosgenin/g dry extract หรือเพิ่มขึ้น 1.93 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ YE นาน 2 สัปดาห์

Ref. code: 25595709032527ELH

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. การเพิ่มจำนวนยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ ควรใช้อาหารสูตร MS ที่เติม AC ความเข้มข้น 0.01% BA ความเข้มข้น 2 mg/l CW ความเข้มข้น 20% และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l โดยมีจำนวนยอด เท่ากับ 1.85±0.11 ยอด และจำนวนข้อต่อยอด เท่ากับ 2.04±0.13 ข้อ/ยอด

2. การเพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) บนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE ความเข้มข้น 3 g/l เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ส่งผลให้ปริมาณซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 1,254.76±72.06 µg diosgenin/g dry extract หรือ 1.99 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม ส่วน JA ความเข้มข้น 50 และ 100 µM ส่งผลให้ยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสิ่งทดลองควบคุม หรือได้รับ YE โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 17.94±3.42 และ 18.98±3.59 µg/ml ตามลำดับ

3. ยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE ความเข้มข้น 3 g/l เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สามารถสร้าง และสะสมสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นในปริมาณสูงสุด และใช้เวลาน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 1,233.33±47.15 µg diosgenin/g dry extract หรือเท่ากับ 1.93 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ YE เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเท่ากัน (638.10±15.74 µg diosgenin/g dry extract)

Ref. code: 25595709032527ELH

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.จากการที่หัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในการทดลองนี้สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้เพียงเล็กน้อย และยอดมีการเจริญเติบโตได้ช้า จึงควรปรับสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอด โดยอาจเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นๆ เพิ่มลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง รวมถึงลดหรือเพิ่มความเข้มข้นของ CW BA และ IAA

2.ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้สารกระตุ้นชนิดอื่น เช่น MeJA SA chitosan pectin ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิที่ต้องการ หรือเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่มี YE ความเข้มข้น 3 g/l ร่วมกับ JA ความเข้มข้น 50-100 μM เป็นระยะเวลานานต่างกัน เพื่อกระตุ้นให้ยอดมีการสร้างและสะสมสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย

3.ควรนำสารสกัดที่ได้จากยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนี้ไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

4.ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพอื่นๆ ที่สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้อย่างรวดเร็ว เช่น การเพาะเลี้ยงแบบ bioreactor

Ref. code: 25595709032527ELH

รายการอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

ชวนพิศ แดงสวัสดิ์. 2544. สรีรวิทยาของพืช. สำนักพิมพ์พัฒนาศึกษา, กรุงเทพฯ. 380 หน้า.

ทิพย์สุคนธ์ บุญยืน เยาวพา จิระเกียรติกุล ภาณุมาศ ฤทธิไชย ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อิฐรัตน์. 2557. ปริมาณ dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน. วารสารแก่นเกษตร 42. ฉบับพิเศษ 3: 306-310.

ทิพย์สุคนธ์ บุญยืน. 2557. ผลของ Jasmonic Acid และ Salicylic Acid ต่อปริมาณ Dioscorealide B ในการเพาะเลี้ยงยอดของข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre Prain & Burkill). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการเกษตร. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี. 85 หน้า.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

นิทราพร รุจนวิศาล. 2542. กันแก่ กันป่วย ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระตัวเก่ง. สำนักพิมพ์รวมทรรศน์, กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

นิตย์ ศกุนรักษ์. 2541. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพืชไร่. คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. 237 หน้า.

ปรียา ลีฬหกุล. 2556. น้ำมะพร้าว. ธรรมศาสตร์เวชสาร. 13: 270-274.

ปิยาภัทร์ เข็มวิชัย. 2556. การเขตกรรมและการสะสมสารทุติยภูมิของหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการเกษตร. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี. 83 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

Ref. code: 25595709032527ELH

ลิลลี่ กาวีต๊ะ. 2546. การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและพัฒนาการของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 320 หน้า.

วันทนี สว่างอารมณ์. 2542. การเจริญและการเติบโตของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา, กรุงเทพฯ. 366 หน้า.

วันทนา เหรียญมงคล อรุณพร อิฐรัตน์ และพิศิษฐ์ บัวแก้ว. 2550. ตรวจหาฤทธิ์แก้อักเสบ ระงับปวด และลดไข้ของสารสกัดจากเหง้าหัวข้าวเย็นในหนูทดลอง. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี. 29: 49-57.

วราภรณ์ ภูตะลุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ ทางเภสัชวิทยา. บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด, ขอนแก่น. 120 หน้า.

วราภรณ์ ฉุยฉาย. 2553. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสรรค์, นครสรรค์. 147 หน้า.

วิโรจน์ สุ่มใหญ่. 2551. วิตามินและโภชนะบำบัด ศาสตร์มหัศจรรย์ชะลอความชรา. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ. 240 หน้า.

ศุภวรรณ บุญระเทพ. 2549. การผลิตสารทุติยภูมิโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์. 20: 185-196.

ศวรรณี เหลืองสุนทรชัย. 2549. มหัศจรรย์สารต้านอนุมูลอิสระ. สำนักพิมพ์ใกล้หมอ, กรุงเทพฯ. 144 หน้า.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2544. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 237 หน้า.

อรดี สหวัชรินทร์. 2542. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 48 หน้า.

อรอุมา สองศรี. 2556. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) และการสะสมสารทุติยภูมิ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการเกษตร. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี. 94 หน้า.

Ref. code: 25595709032527ELH

อาทิมา แซ่ตั้ง อรุณพร อิฐรัตน์ ชวบูลย์ เดชสุขม ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล นิวัติ แก้วประดับ และ ปราณีรัตนสุวรรณ. 2548. การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสมุนไพรไทยที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 27: 469-478.

เอมอร ตรีภิญโญยศ. 2551. รู้จักอนุมูลอิสระ. บริษัทเอ็ดดูเคชั่น ไมน์ด ไลน์ มัลติมีเดีย จำกัด, กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

โอภา วัชรคุปต์. 2549. อนุมูลอิสระ. หน้า. 1-10. *ใน* : โอภา วัชรคุปต์ (บรรณาธิการ). สารต้านอนุมูลอิสระ : Radical Scavenging Agents. พี. เอส. พริ้น, กรุงเทพฯ.

Ali, M. B., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. 2007. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root suspension cultures. Molecules. 12: 607-621.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 7915-7922.

Attele, A. S., Wu, J. A. and Yuan, C. S. 1999. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. Biochem. Pharmacol. 58: 1685-1693.

Banthorpe, B. V. 1994. Secondary metabolism in plant tissue culture: scope and limitations. Nat. Prod. Rep. 11: 303-328.

Beena, M. R., Martin, K. P., Kirti, P. B. and Hariharan, M. 2003. Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Ceropegia candelabrum*. Plant Cell Tiss. Org. 72: 285–289.

Bhandari, M. R. and Kawabata, J. 2003. Organic acid, phenolic content and antioxidant activity of wild yam (*Dioscorea* spp.) tubers of Nepal. Food Chem. 88: 163-168.

Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition. Elsevier, Amsterdam. 767 p.

Blein, J., Thevenot, P., Marion, D. and Ponchet, M. 2002. From elicitins to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signaling involved in plant defence mechanisms. Trends plant Sci. 7: 293-299.

Ref. code: 25595709032527ELH

Bonnefont, R. D. 2002. Glucose and reactive oxygen species. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 5: 561-568.

Boonyaratanakornkit, L. and Chantarateptawan, V. 1993. Identification and specification of Khaao-Yen-Neua, Khaao-Yen-Tai. Thai J. Pharm. Sci. 17: 79-90.

Buchanan, P. C., Lindstrom, D. J., Mittlefehldt, D. W., Koeberl, C. and Reimold, W. U. 2000. The South African polymict eucrite Macibini. Meteorit. Planet. Sci. 35: 1,321-1,331.

Buitelaar, R. M. and Tramper, J. 1992. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. J. Biotechnol. 23: 111-141.

Caddick, L. R., Wilkin, P., Rudall, P. J., Hedderson, T. A. J. and Chase, M. W. 2002. Yams reclassified: a recircumscription of *Dioscoreaceae* and *Dioscoreales*. Taxon. 51: 103-114.

Chantiratikul, P., Meechai, P. and Nakbanpote, W. 2009. Antioxidant activities and phenolic contents of extracts from *Salvinia molesta* and *Eichornia crassipes*. Res. J. Biol. Sci. 4: 1113-1117.

Cheong, J. J. and Choi, Y. D. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plant. Trends Genet. 19: 409-413.

Chen, H. and Chen, F. 2000. Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension culture. Plant Cell Rep. 19: 710-717.

Chen, Y., Fan, J., Yi, F., Luo, Z. and Fu, Y. 2003. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis*. Plant Cell Tiss. Org. 73: 75-80.

Chong, T. M., Abdullah, M. A., Lai, O. M., Aini, F. M. N. and Lajis, N. H. 2005. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. Process Biochem. 40: 3397-3405.

Cunha, L., McFall, A. and Mackay, D. 2006. Innate immunity in plant: a continuum of layered defenses. Microbes Infect. 8: 1372-1381.

Ref. code: 25595709032527ELH

Folin, O. and Ciocalteu, V. 1927. On tyrosine and tryptophan determination in proteins. J. Biol. Chem. 27: 627-650.

Gabr, A. M. M., Ghareeb, H., Shabrawi, H. M. E., Smetanska, I. and Bekheet, S. A. 2016. Enhancement of silymarin and phenolic compound accumulation in tissue culture of milk thistle using elicitor feeding and hairy root cultures. J. Genet. Eng. Biotechnol. 14: 327-333.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. and Cross, C. E. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?. J. Lab. Clin. Med. 119: 598-620.

Hasanloo, T., Sepehrifar, R., Rahnama, R. and Shams, M. R. 2009. Evaluation of the yeast-extract signaling pathway leading to silymarin biosynthesis in milk thistle hairy root culture. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 1901–1909.

Hiai, S., Oura, H. and Nakajima, T. 1976. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. Plant. Med. 29: 116–122.

Hostettmann, K. and Marston, A. 1995. Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Cambridge University Press. Cambridge, 562 p.

Huber, H. 1988. The families and genera of vascular plants, pp. 216-235. *In*: H. Huber (ed.). Dioscoreaceae. Flowering Plant Monocotyledons. Lilianae (except Orchidaceae). Vol. 3. Springer, Germany.

Huckenlhoven, R. 2007. Transport and secretion in plant-microbe interaction. Curr. Opin. Plant Biol. 10: 573-579.

Itharat, A., Jaiarree, N. and Kumapava, K. 2010. Cytotoxic saponin against lung cancer cell from *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. J. Med. Assoc. Thai. 93: 192-197.

Itharat, A., Supavita, T., Jusanit, P., Singchagchai, P., Subchareon, P. and Deevisad, G. 1999. Survey of medicinal plants and local folk wisdom in Southern Thailand: case study at Talebun National Park. Research report of Prince of Songkla University. 82: 98-115.

Ivanova, I., Georgieva, V. and Pavlov, A. 2013. Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. J. Plant Physiol. 170: 1122–1129.

Ref. code: 25595709032527ELH

Jaiarree, N. 2010. Biological activities of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill extract and its active ingredients. Dissertation in Medical. Sciences Faculty of Medicine. Thammasat University, Pathumthani.

Jaiarree, N., Itharat, A., Kumapava, K. 2010. Cytotoxic saponin against lung cancer cell from *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. J. Med. Assoc. Thai. 93: 97-192.

Jirakiattikul, Y., Rithichai, P. and Itharat, A. 2013. Effects of medium salt strength and plant growth regulators on shoot multiplication and root induction of *Smilax corbularia*. Pharmacologyonline. 3: 1-7.

Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Boonyuen, T., Ruangnoo, S. and Itharat, A. 2016. Effect of elicitors on bioactive compound accumulation in shoot culture of *Dioscorea membranacea*. 9th Joint Natural Products Conference. 24-27 July 2016. Tivoli hotel, Denmark.

Kamonwannasit, S., Phrompittayarat, W., Ingkaninan, K., Tanaka, H. and Putalun, W. 2008. Improvement of pseudojujubogenin glycosides production from regenerated *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and enhanced yield by elicitors. Z. Naturforsch. 63: 879-883.

Karagozler, A. A., Erdag, B., Emek, Y. C. and Uygun, D. A. 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. Food Chem. 111: 400-407.

Kimura, S., Okada, M., Sugita, Y., Kanazawa, I. and Munekata, E. 1983. Novel neuropeptides, neurokinins α and β, isolated from porcine spinal cord. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 59: 101-104.

Lim, F. L., Yam, M. F., Asmawi, M. Z. and Chan, L. K. 2013. Elicition of *Orthosiphon stamineus* of cell suspension culture for enhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity. Ind. Crop. Prod. 50: 436-442.

Lin, J. T. and Yang, D. J. 2008. Determination of steroidal saponins in different organs of yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). Food Chem. 108: 1068–1074.

Ref. code: 25595709032527ELH

Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Luo, W., Yang, B. and Jiang, Y. 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. J. Food Compos. Anal. 21: 219-228

Lu, M. B., Wong, H. L. and Teng, W. L. 2001. Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. Plant Cell Rep. 20: 674-677.

Lucas, J. B. 1998. Plant Pathology and Plant Pathogens. Blackwell Science, Oxford, 288 p.

Manuhara, Y. S. W., Kristanti, A. N., Utami, E. S. W. and Yachya, A. 2015. Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon-type bubble bioreactor. Asian Pac. J. Trop Biomed. 5: 1027–1032.

Meyer, A. S., Yi, O. S., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L. and Frankel, E. N. 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). J. Agricult. Food Chem. 45: 1638-1643.

Nasib, A., Ali, K. and Khan, S. 2008. An optimized and improved method for the *in vitro* propagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. Pak. J. Bot. 40: 2355-2360.

Pasaribu, T., Astuti, D. A., Wina, E., Sumiati and Setiyono, A. 2014. Saponin content of *Sapindus rarak* pericarp affected by particle size and type of solvent, its biological activity on *Eimeria tenella* oocysts. Int. J. Poult. Sci. 13: 347-352.

Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H. and Macedo, E. 2007. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. Sci. Hortic. 113: 1–7.

Peltonen, S., Mannonem, L. and Karjalainem, R. 1997. Elicitor-induced changes of phenylalanine ammonia-lyase activity in barley cell suspension cultures. Plant Cell Tissue Org. Cult. 50: 185–93.

Ref. code: 25595709032527ELH

Poornima, G. N. and Ravishankar, V. R. 2007. *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). Afr. J. Biotechnol. 6: 2348-2358.

Prando, S. M. A., Chiavazza, P., Contessa, C. and Botta, R. 2014. Effect of coconut water and growth regulator supplement on the *in vitro* propagation of *Corylus avellana l.* Sci. Hortic. 171: 91–94.

Querol, A. and Fleet, G. 2006. Yeasts in Food and Beverages. Springer. Berlin, Germany. 453 p.

Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell culture: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 20: 101-153.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 2: 152-159.

Rodrigues-Brandão, I., Kleinowski, A. M., Einhardt, A. M., Lima, M. C., Amarante, L. D., Peters, J. A. and Braga, E. J. B. 2014. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. Ciência Rural. 44: 1893-1898.

Rungruang, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N. and Matta, F. B. 2015. The accumulation of total phenolic content and antioxidant activity in suspension culture of *Glycine max* by methyl jasmonate. Agricultural Sci. J. 46: 3. 81-84.

Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M. and Ochi, H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. J. Agr. Food Chem. 44: 37-41.

Schmeda-Hirschmann, G., Jordan, M., Gerth, A. and Wilken, D. 2005. Secondary metabolite content in rhizome, callus culture and *in vitro* regenerated plantlets of *Solidago chilensis*. Z. Naturforsch. C. 60: 5-10.

Sembdner, G., and Parthier, B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. Annu. Rev. Plant Phys. 44: 569-589.

Ref. code: 25595709032527ELH

Shin, J. H., Kim, S. K., Kwon, J. B., Lee, B. H. and Shon, J. K. 2004. Factors affecting the production of *in vitro* plants from the nodal pieces of Chinese yam (*Dioscorea opposite* Thunb). J. Plant Biotech. 6: 97-102.

Shukla, S. and Shukla, S. K. 2013. Adjuvant and their influence on *in vitro* propagation of *Dioscorea hispida* – an important tuber crop. 3rd Annual International Conference on Advances in Biotechnology. 18-19 March 2013. Fort Canning Hotel, Singapore.

Singelton, V. R., Orthifer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Meth. Method Enzymol. 299: 152-178.

Siva, G., Sivakumar, S., Premkumar, G., Kumar, T. S. and Jayabalan, N. 2015. Enhanced production of psoralen through elicitors treatment in adventitious root culture of *Psoralea corylifolia* L. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 7: 146-149.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I. and Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut. 579: 200-213.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Secondary metabolites and plant defense. Plant Physiol. 4: 315-344.

Tan, S. H., Musa, R., Ariff, A. and Maziah, M. 2010. Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from Pegaga (*Centella asiatica* L. Urban). Am. J. Biochem. & Biotech. 6: 284-299.

Thomma, B. P., Nurnberger, T., Joosten, M. H. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. Plant Cell. 23: 4–15.

Uphade, B. K., Shelke, S. S. and Thorat, D. G. 2008. Studies on some physico-chemical characteristics of coconut water near sugar and chemical factory, Kopergaon (m. s.). Int. J. Chem. Sci. 6: 2052-2054.

Vasconsuelo, A. A. and Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Sci.. 172: 861-875.

Ref. code: 25595709032527ELH

Venkatachalam, P., Kalaiarasi, K. and Sreeramanan, S. 2015. Influence of plant growth regulators (PGRs) and various additives on *in vitro* plant propagation of *Bambusa arundinacea* (Retz.) Wild: a recalcitrant bamboo species. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 13: 193-200.

Walker, T. S., Bais, H. P. and Vivanco, J. M. 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). Phytochemistry. 60: 289-293.

Wiktorowska, E., Dlugosz, M. and Janiszowska, W. 2010. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. Enzyme Microb. Tech. 46: 14-20.

Wilkin, P. and Thapyai, C. 2009. Dioscoreaceae, pp. 1-140. *In*: Santisuk, T. and Larsen, k. (eds.). Flora of Thailand 10. Prachachon, Bangkok.

Williamson, G., Day, A. J., Plumb, G. W. and Couteau, D. 2000. Human metabolic pathway of dietary flavonoids and cinnamates. Biochem. Soc. Trans. 28: 16-22.

Wu, J. Y., Wong, K., Ho, K. P. and Zhou, L. G. 2005. Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic strees and nutrient feeding. Enzyme Microb. Tech. 36:133-138.

Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T. 1994. Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs. Chem. Pharmaceut. Bull. 42: 1663-1665.

Yan, Q., Shi, M., Ng, J. and Wu, J. Y. 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Sci. 170: 853–858.

Yu, K. W., Gao, W., Hahn, E. J. and Paek, K.Y. 2002. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Mayer. Biochem. Eng. J. 11: 211-215.

Ref. code: 25595709032527ELH

Zaheer, M. and Giri, C. C. 2015. Multiple shoot induction and jasmonic versus salicylic acid driven elicitation for enhanced andrographolide production in *Andrographis paniculata*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 122: 553–563.

Zaker, A., Sykora, C., Gössnitzer, F., Abrishamchi, P., Asili, J., Mousavi, S. H. and Wawrosch, C. 2015. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. Ind. Crop Prod. 67: 97–102.

Zhao, J., Davis, L. and Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 23: 283-333.

Ref. code: 25595709032527ELH

ภาคผนวก

Ref. code: 25595709032527ELH

ภาคผนวก ก
ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

ภาคผนวก ก-1
การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS

1. ตวงสารละลายจาก Stock solution (ตารางผนวกที่ ก.1) ต่างๆ มารวมกัน โดยใช้ปริมาตรในแต่ละ Stock ดังนี้

Stock 1, 3-6	10 ml
Stock 2	20 ml
Stock 7	5 ml
AC	0.01 %
BA	20 ml (stock solution ของ BA มีความเข้มข้น 0.1 mg/ml)

2. เติมน้ำตาลความเข้มข้น 3% และเติม PGR ตามความเข้มข้นที่ต้องการ คนสารละลายให้เข้ากัน

3. ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น

4. ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8 โดยใช้ HCl หรือ NaOH 1 N เป็นตัวปรับ

5. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มให้เดือด ขณะเดือดค่อยๆ เติมผงถ่านความเข้มข้น 0.01% (บางสูตรอาหาร) และเติมวุ้นความเข้มข้น 0.8% ลงไป พร้อมคนเป็นระยะ

6. ตักอาหารเพาะเลี้ยงที่เดือดแล้ว ใส่ในขวดที่มีฝาปิดสนิทประมาณ 10 – 20 ml

7. นำอาหารเพาะเลี้ยงที่อยู่ในขวดไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

8. ปล่อยให้อาหารเพาะเลี้ยงเย็นก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

Ref. code: 25595709032527ELH

ตารางผนวก ก.1 การเตรียม stock อาหารสูตร MS (Murashige & Skoog)

Stock	สารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาตร (ml)	ปริมาณสารที่ใช้ (g)	ปริมาตรที่ใช้ (ml/l)
1	NH_4NO_3	100	250	41.25	10
2	KNO_3	50	250	23.75	20
3	H_3BO_3	100	250	0.155	10
	KH_2PO_4			4.25	
	Kl			0.0208	
	$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$			0.0063	
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$			0.0006	
4	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	100	250	11	10
5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100	250	9.25	10
	$MnSO_4 \cdot H_2O$			0.5575	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$			0.215	
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$			0.0006	
6	Na_2ETDA	100	250	0.9313	10
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$			0.6963	
7	myo-inosotal	200	100	2	5
	glycine			0.04	
	nicotinic acid			0.01	
	Pyridoxine-HCl			0.01	
	thiamine-HCl			0.002	

Ref. code: 25595709032527ELH

ภาคผนวก ก-2
การเตรียม stock solution ของ PGR

เตรียม BA และ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ชั่ง BA และ IAA 0.01 g ละลายด้วย NaOH เล็กน้อย คนจนละลายแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็น 100 ml

เตรียม CW โดยกรองด้วยผ่านขาวบาง เติมปริมาตรที่ต้องการลงในอาหารเพาะเลี้ยง (150 ml สำหรับอาหาร 1 l ที่ความเข้มข้น 15% และ 200 ml สำหรับอาหาร 1 l ที่ความเข้มข้น 20%) ก่อนการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยง

ภาคผนวก ก-3
วิธีคำนวณ และการเตรียมสาร JA

JA ขนาด 250 mg ละลายด้วย ethanol 70% ลงในขวด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 250 ml

ในสาร 250 ml มี JA อยู่ 0.25 g

เปลี่ยนหน่วยเป็น mole ในสาร 250 ml มี JA อยู่ $\frac{0.25}{210.27}$ mole

= 0.0011889 mole

เปลี่ยนหน่วยให้เป็น M โดยเทียบต่อ L

ถ้าในสาร 1000 ml จะมี JA $\frac{0.0011889 \times 1000 \text{ ml}}{250 \text{ ml}}$

แสดงว่าในสาร 250 ml มีเนื้อสาร JA อยู่ = 0.0047556 M

เมื่อต้องการเตรียม JA ความเข้มข้น 50 μM ปริมาตร 1000 ml

จาก $M_1V_1 = M_2V_2$

$50\ \mu M \times 1000\ ml = 0.0011889\ M \times V_2$

$50\ \mu M \times 1000\ ml = 0.0011889 \times 10^6\ \mu M \times V_2$

$$V_2 = \frac{50\ \mu M \times 1000\ ml}{0.0011889 \times 10^6\ \mu M}$$

$V_2 = 42.056$ ml

Ref. code: 25595709032527ELH

ดังนั้น เมื่อต้องการเตรียม JA ความเข้มข้น 50 μM ปริมาตร 1000 ml ต้องตวง stock JA ปริมาตร 42.055682 ml

เมื่อต้องการเตรียม JA ความเข้มข้น 100 μM ปริมาตร 1000 ml

จาก $M_1V_1 = M_2V_2$

$100\ \mu M \times 1000\ ml = 0.0011889\ M \times V_2$

$100\ \mu M \times 1000\ ml = 0.0011889 \times 10^6\ \mu M \times V_2$

$$V_2 = \frac{100\ \mu M \times 1000\ ml}{0.0011889 \times 10^6\ \mu M}$$

$V_2 = 84.111\ ml$

ดังนั้น เมื่อต้องการเตรียม JA ความเข้มข้น 100 μM ปริมาตร 1000 ml ต้องตวง stock JA ปริมาตร 84.111363 ml

เมื่อต้องการเตรียม JA ความเข้มข้น 150 μM ปริมาตร 1000 ml

จาก $M_1V_1 = M_2V_2$

$150\ \mu M \times 1000\ ml = 0.0011889\ M \times V_2$

$150\ \mu M \times 1000\ ml = 0.0011889 \times 10^6\ \mu M \times V_2$

$$V_2 = \frac{150\ \mu M \times 1000\ ml}{0.0011889 \times 10^6\ \mu M}$$

$V_2 = 126.167\ ml$

ดังนั้น เมื่อต้องการเตรียม JA ความเข้มข้น 150 μM ปริมาตร 1000 ml ต้องตวง stock JA ปริมาตร 126.16704 ml

Ref. code: 25595709032527ELH

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์ซาโปนิน

ภาคผนวก ข-1
การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน diosgenin หรือสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งสาร และปรับความเข้มข้นให้ได้ 0.5 mg/ml

2. ดูดสารละลายมาตรฐานจากข้อ 1 มา 960 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 µl ด้วย absolute methanol (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 960 µg/ml)

3. ดูดสารละลายมาตรฐานจากข้อ 2 มา 500 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 µl ด้วย absolute methanol (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 480 µg/ml)

4. ดูดสารละลายมาตรฐานจากข้อ 1 มา 500 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 µl ด้วย absolute methanol (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 240 µg/ml)

5. ดูดสารละลายมาตรฐานจากข้อ 1 มา 500 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 µl ด้วย absolute methanol (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 120 µg/ml)

6. ดูดสารละลายมาตรฐานจากข้อ 1 มา 500 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 µl ด้วย absolute methanol (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 60 µg/ml)

7. ดูดสารละลายมาตรฐานจากข้อ 1 มา 500 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 µl ด้วย absolute methanol (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 30 µg/ml)

8. ดูดสารละลายมาตรฐานจากข้อ 1 มา 500 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 µl ด้วย absolute methanol (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 15 µg/ml)

Ref. code: 25595709032527ELH

ภาคผนวก ข-2
การเตรียมสารละลาย

Vanillin reagent โดยชั่ง Vanillin 1.6 g ละลายใน absolute ethanol ปริมาตร 20 ml (ความเข้มข้น 8%) เตรียมใหม่ทุกครั้ง

H_2SO_4 72% เตรียมจากกรด H_2SO_4 เข้มข้น 98% โดยตวง H_2SO_4 ปริมาตร 72 ml เทลงใน absolute ethanol ปริมาตร 26 ml อย่างช้าๆ

ภาคผนวก ข-3
วิธีทดสอบ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ซาโปนิน (ความเข้มข้น 0.5 mg/ml) ปริมาตร 0.25 ml ลงในหลอดทดลองแก้วขนาด 20 ml
2. เติม Vanillin reagent ความเข้มข้น 8% ปริมาตร 0.25 ml
3. เติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 72% ปริมาตร 2.5 ml ลงในหลอดทดลอง
4. นำไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C เป็นเวลา 10 นาที
5. จากนั้นทำให้เย็นโดยหล่อน้ำที่อุณหภูมิห้อง จนอุณหภูมิของสารเท่าอุณหภูมิห้อง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 544 nm ค่าที่ได้นำมาคำนวณ mg diosgenin/g dry extract จากกราฟมาตรฐาน diosgenin (ภาพที่ 3.3)

Ref. code: 25595709032527ELH

ภาคผนวก ข-4
วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดโดยใช้สมการ

$$OD = (OD_s - OD_b) - (OD_c - OD_o)$$

โดย OD_s = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด + H_2SO_4 + Vanillin reagent

OD_b = ค่าการดูดกลืนแสงของ absolute ethanol + H_2SO_4 + Vanillin reagent

OD_c = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด + H_2SO_4 + absolute ethanol

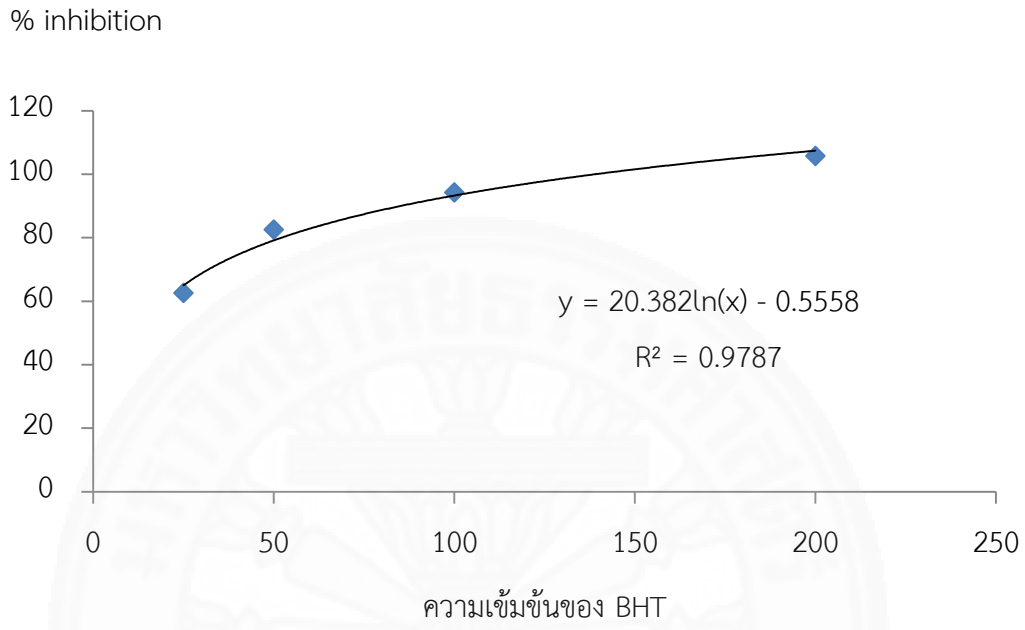
OD_o = ค่าการดูดกลืนแสงของ absolute ethanol + H_2SO_4 + absolute ethanol

ค่า OD ที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณซาโปนินทั้งหมดโดยใช้สมการจากกราฟมาตรฐาน diosgenin (ภาพที่ 3.3) โดยมีหน่วยเป็น mg diosgenin/g dry extract

Ref. code: 25595709032527ELH

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของ BHT



ภาพผนวกที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของ BHT

Ref. code: 25595709032527ELH

ภาคผนวก ง
น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % yield ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ตารางผนวกที่ ง.1 น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1-6 สัปดาห์

สิ่งทดลอง		น้ำหนักสด/ยอด (mg)	น้ำหนักแห้ง/ยอด (mg)	%น้ำหนักแห้ง
สารกระตุ้น (E)	ไม่เติม YE	33.69±10.35[1/a]	5.76±2.08[a]	16.90±1.12
	เติม YE	24.82±4.19[b]	4.24±1.02[b]	16.85±1.45
ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (T: สัปดาห์)	1	20.60±2.25[d]	3.30±0.28[d]	16.04±0.42[c]
	2	25.96±4.56[c]	4.09±0.86[c]	15.69±0.67[c]
	4	31.81±6.74[b]	5.50±0.90[b]	17.46±1.04[b]
	6	38.67±8.94[a]	7.10±1.71[a]	18.31±0.98[a]
ไม่เติม YE	1	20.41±3.51[e]	3.25±0.43[e]	16.00±0.37[b]
	2	29.80±1.25[c]	4.83±0.14[d]	16.23±0.17[b]
	4	37.90±1.43[b]	6.31±0.12[b]	16.67±0.37[b]
	6	46.65±2.67[a]	8.63±0.41[a]	18.50±0.20[a]
เติม YE	1	20.78±0.55[e]	3.34±0.09[e]	16.08±0.08[b]
	2	22.11±2.48[e]	3.36±0.46[e]	15.15±0.22[c]
	4	25.71±0.49[d]	4.70±0.20[d]	18.26±0.34[a]
	6	30.69±1.25[c]	5.57±0.35[c]	18.13±0.35[a]
สารกระตุ้น (E)		**	**	ns
ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (T)		**	**	**
E X T		**	**	**
C.V. (%)		5.98	6.06	2.91

[1/] ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Ref. code: 25595709032527ELH

ตารางผนวกที่ ง.2 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม และไม่เติม YE เป็นเวลา 1-6 สัปดาห์

สิ่งทดลอง		ซาโปนินทั้งหมด (mg diosgenin/g dry extract)	EC_{50} (µg/ml)
สารกระตุ้น (E)	ไม่เติม YE	0.75±0.23[1/b]	54.87±15.67
	เติม YE	1.07±0.26[a]	52.56±11.44
ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (T: สัปดาห์)	1	0.55±0.11[c]	70.64±4.87[a]
	2	0.94±0.33[b]	56.75±2.55[c]
	4	1.06±0.21[a]	40.03±4.38[c]
	6	1.08±0.11[a]	50.07±8.18[b]
ไม่เติม YE	1	0.46±0.02[e]	72.82±3.44[a]
	2	0.64±0.02[d]	57.82±2.00[b]
	4	0.88±0.09[c]	31.83±2.42[d]
	6	1.02±0.11[b]	57.28±3.33[b]
เติม YE	1	0.65±0.06[d]	68.45±5.76[a]
	2	1.23±0.05[a]	55.67±2.96[b]
	4	1.25±0.05[a]	43.24±3.52[c]
	6	1.15±0.06[a]	42.86±0.63[c]
สารกระตุ้น (E)		**	ns
ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (T)		**	**
E X T		**	**
C.V. (%)		7.45	6.52

[1/] ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Ref. code: 25595709032527ELH

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวรัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา
วันเดือนปีเกิด	24 มิถุนายน 2535
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2556: วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ทุนการศึกษา	ปีงบประมาณ 2557-2558 ทุนเรียนดี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีงบประมาณ 2557 งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผลงานทางวิชาการ

รัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา, เยาวพา จิระเกียรติกุล และภาณุมาศ ฤทธิไชย. 2559. ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24: 40-48.

รัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา, เยาวพา จิระเกียรติกุล และ ภาณุมาศ ฤทธิไชย. 2560. ผลของ Jasmonic acid และ Yeast extract ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 25: กำลังตีพิมพ์.

Ratchaneewan Jirapongpattana, Yaowapha Jirakiattikul1, Panumart Rithichai and Arunporn Itharat. 2016. Effects of Coconut Water and IAA on Shoot Multiplication of Hua-Khao-Yen (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) and Bioactive Compound of Regenerated Shoots. 20th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN 2016). December 14-16, 2016 Rama Gardens Hotel Bangkok, Thailand.

Ref. code: 25595709032527ELH