



ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระของยอดกระชายที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย

นางสาวรัตนพร พระชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระของยอดกระชายที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย

นางสาวรัตนพร พระชัย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

EFFECT OF ELICITORS ON BIOACTIVE COMPOUNDS
AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *IN VITRO*
BOESENBERGIA ROTUNDA L. SHOOTS

BY

MISS RATTANAPORN PRACHAI



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 2020

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวรัตนพร พระชัย

เรื่อง

ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ของยอดกระชายที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)

เมื่อ วันที่ 25 พฤศจิกายน พ.ศ. 2563

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณพร อธิรัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.เยาวพา จิระเกียรติกุล)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุมาศ ฤทธิไชย)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อาจารย์ ดร.นงลักษณ์ เทียนเสรี)

คณบดี

(รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนนท์ หงส์วรสิทธิ์)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดกระชายที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวรัตนพร พระชัย
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.เยาวพา จิระเกียรติกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุมาศ ฤทธิ์ไชย
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

กระชาย (*Boesenbergia rotunda* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่ประกอบไปด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิด และเหง้ามีสรรพคุณในการรักษาโรคต่างๆ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการเติมสารกระตุ้นเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพฤกษเคมีที่สำคัญจากพืชสมุนไพร การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ รวมถึงผลของชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ได้รับสารกระตุ้นต่อการเจริญเติบโต ปริมาณสารฟีนอลิก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ จากการเพิ่มจำนวนยอดกระชายบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0 4.44 8.87 และ 13.32 μM ร่วมกับ 1-naphthyl-acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0 และ 2.69 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกระชายในสภาพปลอดเชื้อ โดยมีการเกิดยอดใหม่ (100.00 $\pm$ 0.00%) จำนวนยอดใหม่ที่พัฒนา (2.63 $\pm$ 0.38) และความยาวยอด (1.55 $\pm$ 0.11 cm) สูงสุด ยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟีนอลิก (5.15 $\pm$ 0.04 mg/g dry extract) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (35.10 $\pm$ 1.35 mg GAE/g dry extract) สารฟลาโวนอยด์ (121.56 $\pm$ 1.84 mg QE/g dry extract) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 213.76 $\pm$ 8.41

μg/ml) น้อยกว่าเหง้าแก่ เหง้าอ่อน และรากสะสมอาหารของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

จากการศึกษาผลของ MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นต่างกัน และระยะเวลาในการได้รับ MeJA ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อตอบสนองต่อ MeJA ได้ดีกว่า SA ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยปริมาณสารฟีนอลิกโตรบิน (18.34 ± 0.18 mg/g dry extract) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (87.23 ± 3.39 mg GAE/g dry extract) และสารฟลาโวนอยด์ (195.42 ± 1.82 mg QE/g dry extract) สูงสุด เมื่อยอดได้รับ MeJA ความเข้มข้น 200 μM นาน 4 สัปดาห์ หรือสูงกว่า 2.38 1.83 และ 1.57 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 136.51 ± 1.91 μg/ml) ดีที่สุด ดังนั้น การเติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM ลงในอาหาร และเพาะเลี้ยงยอดเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ สามารถกระตุ้นให้ยอดกระชายสร้างและสะสมปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เพิ่มขึ้น และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น

คำสำคัญ: กระชาย, การเพิ่มจำนวนยอด, ฟีนอลิกโตรบิน, สารกระตุ้น, methyl jasmonate

Thesis Title	EFFECT OF ELICITORS ON BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF <i>IN VITRO</i> <i>BOESENBERGIA ROTUNDA</i> L. SHOOTS
Author	Miss Rattanaorn Prachai
Degree	Master of Science (Agricultural Technology)
Department/Faculty/University	Agricultural Technology Faculty of Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Associate Professor Yaowapha Jirakiattikul, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Panumart Rithichai, Dr.Agr.Sci.
Academic Year	2020

ABSTRACT

Boesenbergia rotunda L. is a medicinal plant which contains many types of secondary metabolites. Its rhizomes are used for treatment of various diseases. *In vitro* culture with elicitation technique is widely used for enhancing secondary metabolite production of medicinal plants. The objectives of this study were to investigate the suitable medium for shoot multiplication, and effects of elicitor types, elicitor concentrations, and elicitation period on growth, pinostrobin content, total phenolic content, flavonoid content and DPPH radical scavenging activity of *in vitro* *B. rotunda* shoots. For shoot proliferation, *in vitro* shoots were cultured for four weeks on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0, 4.44, 8.87 and 13.32 μM 6-benzyladenine (BA), and 0 and 2.69 μM 1-naphthyl-acetic acid (NAA). The results indicated that the highest shoot formation (100.00 ± 0.00), number of regenerated shoots (2.63 ± 0.38), and shoot length (1.55 ± 0.11 cm) were obtained from MS medium supplemented with 8.87 μM BA and 2.69 μM NAA. The Four-week-old *in vitro* shoots showed lower pinostrobin (5.15 ± 0.04 mg/g dry extract), total phenolic compounds (35.10 ± 1.35 mg GAE/g dry extract), flavonoid (121.56 ± 1.84 mg QE/g dry extract) contents,

and weaker antioxidant activity (EC_{50} of 213.76 ± 8.4 $\mu\text{g/ml}$) than *in vivo* storage root, shoot base, and rhizome.

The effect of MeJA and SA at different concentrations, and MeJA elicitation period on bioactive compounds and antioxidant activity of *in vitro* shoots were also investigated. The result showed that MeJA was more effective than SA. The highest contents of pinostrobin (18.34 ± 0.18 mg/g dry extract), total phenolic compounds (87.23 ± 3.39 mg GAE/g dry extract) and flavonoids (195.42 ± 1.82 mg QE/g dry extract) were observed from 200 μM MeJA elicited shoots at four weeks. These were 2.38, 1.83, and 1.57 times higher than that of the control, respectively. The greatest antioxidant activity with EC_{50} of 136.51 ± 1.91 $\mu\text{g/ml}$ was also obtained from 200 μM MeJA elicited shoots at four weeks. Therefore, elicitation with 200 μM MeJA for four weeks resulted in an increase in pinostrobin, total phenolic, and flavonoid contents, as well as antioxidant activity of *in vitro* *B. rotunda* shoots.

Keywords: *Boesenbergia rotunda*, elicitation, methyl jasmonate, pinostrobin, shoot multiplication

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร.เยาวพา จิระเกียรติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุมาศ ฤทธิไชย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นในการดำเนินการทดลอง รวมถึงตรวจสอบ และแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรุณพร อธิรัตน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.นงลักษณ์ เทียนเสรี ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัยให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นฤมล วชิรปัทมา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรชัย หาระโคตร ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิโนสโตรบินด้วยเครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) และคุณกัลยารัตน์ ภูสุตแสง ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนสอนการใช้เครื่อง UHPLC ทำให้งานวิจัยดำเนินการได้อย่างราบรื่น และได้ผลการทดลองที่ถูกต้อง และมีประสิทธิภาพ

ขอขอบคุณคุณพิสมัย โพธิ์ศรี ที่กรุณาติดต่อและประสานงานกับเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รวมถึงตรวจสอบความสมบูรณ์ของเล่มวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบุคลากรของสาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ รวมทั้งเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำทดลอง จนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 ตามบันทึกข้อตกลงเลขที่ 25/2561

ท้ายสุด ขอขอบคุณครอบครัว พี่ น้อง และเพื่อนที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัย รวมถึงวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

นางสาวรัตนาพร พระชัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(11)
สารบัญภาพ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กระชาย	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
2.1.2 สรรพคุณของกระชาย	4
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (plant tissue culture)	5
2.2.1 การฟอกกำจัดเชื้อขึ้นส่วนพืช	6
2.2.2 การชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอด	9
2.3 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites หรือ bioactive compounds)	10
2.3.1 สารฟิโนสโตรบิน	13
2.3.2 สารประกอบฟีนอลิก	14

2.3.3 สารฟลาโวนอยด์	16
2.3.4 อนุมูลอิสระ (free radical) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	17
2.4 การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ	19
2.4.1 การเติมสารกระตุ้น	20
2.4.1.1 Methyl jasmonate (MeJA)	21
2.4.1.2 Salicylic acid (SA)	23
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	25
3.1 พืชทดลอง	25
3.2 อาหารเพาะเลี้ยงและสภาพการเพาะเลี้ยง	25
3.3 การฟอกกำจัดเชื้อ	25
3.4 การเตรียมสารละลาย MeJA และ SA	26
3.5 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนยอด	26
3.6 ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	27
3.6.1 ปริมาณสารฟีนอลโตรีบิน	28
3.6.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	30
3.6.3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์	31
3.6.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity	32
3.7 ผลของสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	33
3.7.1 ผลของ MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	33
3.7.2 ผลของ MeJA ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 200 μ M ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	33
3.8 ผลของระยะเวลาในการได้รับ MeJA ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	34
3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	34

3.10 สถานที่ทำการทดลอง	34
3.11 ระยะเวลาในการทดลอง	35
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	37
4.1 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการ เพิ่มจำนวนยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	37
4.2 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	40
4.2.1 % น้ำหนักแห้ง	40
4.2.2 % yield	40
4.2.3 ปริมาณสารฟีนอลิก	41
4.2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	41
4.2.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์	42
4.2.6ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	42
4.3 ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายใน สภาพปลอดเชื้อ	46
4.3.1 ผลของ MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารออก ฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	46
4.3.1.1 การเจริญเติบโตของยอด	46
4.3.1.2 % yield	47
4.3.1.3 ปริมาณสารฟีนอลิก	48
4.3.1.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	49
4.3.1.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์	49
4.3.1.6ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	50
4.3.1.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	50
4.3.2 ผลของ MeJA ที่ความเข้มข้น 0 - 200 μ M ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	52
4.3.2.1 การเจริญเติบโตของยอด	52
4.3.2.2 % yield	53

4.3.2.3 ปริมาณสารพิโนสโตรบิน	53
4.3.2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	54
4.3.2.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์	55
4.3.2.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	55
4.4 ผลของระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ	61
4.4.1 การเจริญเติบโตของยอด	61
4.4.2 % yield	61
4.4.3 ปริมาณสารพิโนสโตรบิน	62
4.4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	62
4.4.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์	64
4.4.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	64
4.4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	65
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	70
5.1 สรุปผลการวิจัย	70
5.2 ข้อเสนอแนะ	70
รายการอ้างอิง	72
ภาคผนวก	84
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารสูตร MS สารควบคุมการเจริญเติบโต สารกระตุ้น MeJA และ SA	85
ภาคผนวก ข การเกิดยอด จำนวนยอดที่พัฒนา และความยาวยอดของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ	89

ภาคผนวก ค	น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดก่อนและหลัง เพาะเลี้ยง ค่า growth index (GI) และ %yield ปริมาณสารฟีนอลโตรีบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระ DPPH EC ₅₀ ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ	90
ประวัติผู้เขียน		98



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิด และความเข้มข้นของสารฟอกกำจัดเชื้อ และระยะเวลาในการฟอกกำจัดเชื้อของพืชวงศ์ Zingiberaceae	8
2.2 อาหารเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอด และเพิ่มจำนวนยอดของพืชวงศ์ Zingiberaceae	11
2.3 ชนิด และความเข้มข้นของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารทุติยภูมิของพืชชนิดต่างๆ	22
3.1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนยอดกระชายในการทดลองที่ 3.5	27
4.1 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC ₅₀) ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μ M เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์	52
4.2 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC ₅₀) ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์	67
ตารางผนวกที่	
ก การเตรียม stock อาหารสูตร MS	86
ข การเกิดยอด (%) จำนวนยอดที่พัฒนา และความยาวยอด (cm) ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 8.87 และ 13.32 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์	89
ค.1 % yield ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหน้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ	90

- ค.2 ปริมาณสารพินอสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และ 91
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอด
เชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ
- ค.3 น้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง ค่า growth index (GI) น้ำหนักแห้ง และ 92
% yield ของยอดกระชายที่พัฒนามานาอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น
8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 400
 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 200 μ M เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม
(ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- ค.4 ปริมาณสารพินอสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และ 93
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกระชายที่พัฒนามานาอาหารสูตร
MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ
MeJA ความเข้มข้น 200 400 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 200 μ M
เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- ค.5 น้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง ค่า growth index (GI) น้ำหนักแห้ง และ 94
% yield ของยอดกระชายที่พัฒนามานาอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น
8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100
150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- ค.6 ปริมาณสารพินอสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และ 95
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกระชายที่พัฒนามานาอาหารสูตร
MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA
ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- ค.7 น้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง ค่า growth index (GI) น้ำหนักแห้ง และ 96
% yield ของยอดกระชายที่พัฒนามานาอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น
8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น
200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์
- ค.8 ปริมาณสารพินอสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และ 97
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกระชายที่พัฒนามานาอาหารสูตร
MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่
ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กระจาย: (A) ลำต้นเทียมเหนือดิน ใบ, (B) ดอก และ (C) ลำต้นใต้ดินหรือเหง้า และ รากสะสมอาหาร	5
2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารพิโนสโตรบิน	14
2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก	16
2.4 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์	17
2.5 โครงสร้างทางเคมีของ methyl jasmonate	23
2.6 โครงสร้างทางเคมีของ salicylic acid	24
3.1 ยอดกระจายที่พัฒนาจากเหง้า	26
3.2 (A) ยอดกระจายที่พัฒนามานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์, (B) รากสะสมอาหาร, (C) เหง้าอ่อน และ (D) เหง้าแก่ของกระจายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (scale bar = 0.5 cm)	28
3.3 Chromatogram สารพิโนสโตรบินของ (A) พิโนสโตรบินมาตรฐาน , (B) ยอดกระจายที่พัฒนามานอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้น, (C) ยอดกระจายที่พัฒนามานอาหารที่เติม 200 μM MeJA, (D) รากสะสมอาหาร, (E) เหง้าอ่อน และ (F) เหง้าแก่ของกระจายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ	29
3.4 กราฟมาตรฐานของ pinostrobin	30
3.5 กราฟมาตรฐานของ gallic acid	31
3.6 กราฟมาตรฐานของ quercetin	32
3.7 แผนการศึกษา	36
4.1 ยอดกระจายที่พัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 8.87 และ 13.32 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 0.5 cm)	38
4.2 (A) การเกิดยอด (%) (B) จำนวนยอดที่พัฒนา และ (C) ความยาวยอด (cm) ของยอดกระจายที่พัฒนามานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 8.87 และ 13.32 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์	39

4.3	% น้ำหนักแห้งของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ	40
4.4	% yield ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้า อ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ	41
4.5	(A) ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (B) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) สารฟลาโวนอยด์ และ (D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ราก สะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ	43
4.6	ยอดกระชายที่พัฒนามานานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μ M เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติม สารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 0.5 cm)	47
4.7	(A) ค่า GI และ (B) น้ำหนักแห้ง ของยอดกระชายที่พัฒนามานานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μ M เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์	48
4.8	% yield ของยอดกระชายที่พัฒนามานานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μ M เปรียบเทียบกับสิ่งทดลอง ควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์	49
4.9	(A) ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (B) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) สารฟลาโวนอยด์ และ (D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนามานานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ MeJA ความ เข้มข้น 200 และ 400 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μ M เปรียบเทียบกับ สิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์	51
4.10	ยอดกระชายที่พัฒนามานานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 0.5 cm)	53
4.11	(A) ค่า GI และ (B) น้ำหนักแห้ง ของยอดกระชายที่พัฒนามานานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์	54

- 4.12 % yield ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 55
- 4.13 (A) ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (B) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) สารฟลาโวนอยด์ และ (D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 57
- 4.14 ยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ (scale bar = 0.5 cm) 62
- 4.15 (A) ค่า GI และ (B) น้ำหนักแห้ง ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ 63
- 4.16 % yield ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ 64
- 4.17 (A) ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (B) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) สารฟลาโวนอยด์ และ (D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ 66

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

กระชาย (*Boesenbergia rotunda* L.) เป็นพืชอายุหลายปีที่มีกลิ่นหอมเฉพาะตัวอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดียและเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีความสำคัญและนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคในทางการแพทย์ เนื่องจากมีสรรพคุณลดอาการอักเสบ แก้ท้องอืดเฟ้อ แก้โรคกระเพาะ ช่วยบำรุงกำลัง ด้านเชื้อรา ด้านอนุมูลอิสระ ด้านมะเร็ง และต้านโรค HIV-1 เป็นต้น (สุภักดิ์กริมย์, 2550; อ.อรรถสิทธิ์, 2551; Yusuf et al., 2011) สารทุติยภูมิที่พบในกระชายมีหลายชนิด โดยสารที่พบมากที่สุดคือ สารพิโนสโตรบิน (pinostrobin) ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มอื่น ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) อัลคาลอยด์ (alkaloid) น้ำมันหอมระเหย (essential oil) และซาลิโคน (chalcones) (Jitvaropas et al., 2012; Yusuf et al., 2013) สามารถพบสารทุติยภูมิได้ทุกส่วนของกระชาย โดยสารพิโนสโตรบินจะพบมากในส่วนเหง้าอ่อน (ไม่ระบุอายุ) ของต้นกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อแล้วนำออกปลูก (21,049.4 µg/g) รวมถึงเหง้าอ่อนของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (20,966.7 µg/g) (Tan et al., 2015) นอกจากนี้ Yusuf et al. (2013) พบว่า เหง้ากระชายมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และสารพิโนสโตรบิน เท่ากับ 12,975.52 และ 8,220.72 µg/g DW ตามลำดับ จากการที่กระชายมีสารทุติยภูมิที่สำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพิโนสโตรบิน ซึ่งสามารถนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคได้ จึงทำให้เป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมเภสัชกรรม

อย่างไรก็ตามการผลิตสารทุติยภูมิจากต้นกระชายที่ปลูกในสภาพธรรมชาตินั้นใช้เวลาค่อนข้างนาน 8-10 เดือน อีกทั้งพบปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อโรคที่อยู่ในดิน รวมถึงสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลง ทำให้ปริมาณสารทุติยภูมิที่ผลิตได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ และไม่เพียงพอต่อความต้องการของอุตสาหกรรมเภสัชกรรม (วรภรณ์, 2551; Azhar et al., 2018) ในปัจจุบันได้มีการนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ซึ่งเทคนิคนี้จะสามารถผลิตยอดกระชายได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และยอดสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ โดยสารทุติยภูมิที่ผลิตด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ ผลิตสารได้อย่างต่อเนื่อง มีคุณภาพสม่ำเสมอ และใช้ระยะเวลาสั้นกว่าการปลูกพืชในสภาพธรรมชาติ (วรภรณ์, 2551) มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระชายมาแล้ว เช่น Yusuf et al. (2011) เพาะเลี้ยงยอดกระชายบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 2.0 mg/l และ naphthalene acetic acid (NAA) ความ

เข้มข้น 0.5 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้สูงสุด 4.9 ± 0.1 ยอด Yusuf et al. (2013) ได้ศึกษาปริมาณสารฟิโนสโตรบินของแคลลัสกระชายที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ NAA biotin และ indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 1 mg/l พบว่า แคลลัสมีปริมาณสารฟิโนสโตรบินเท่ากับ 96.30 ± 0.00 $\mu\text{g/g}$ DW ซึ่งน้อยกว่าปริมาณสารดังกล่าวของเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ($8,220.72 \pm 45.66$ $\mu\text{g/g}$ DW) ส่วนรากกระชายที่พัฒนาบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 mg/l นาน 8 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟิโนสโตรบิน เท่ากับ 3.43 $\mu\text{g/g}$ นอกจากนี้ Yusuf et al. (2018) และ Ng et al. (2016) พบว่า แคลลัสมีปริมาณสารฟิโนสโตรบิน และสารทุติยภูมิอื่นๆ น้อยกว่ายอดกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

จากรายงานข้างต้น รากและแคลลัสของกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารทุติยภูมิน้อยกว่าเหง้าและส่วนต่างๆ ของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ การเติมสารกระตุ้น (elicitor) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ โดย salicylic acid (SA) และ methyl jasmonate (MeJA) เป็นสารกระตุ้นที่นิยมใช้เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ หลายกลุ่มของพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ (Zhoa et al., 2005) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่สำคัญของพืชวงศ์ Zingiberaceae การใช้สารกระตุ้น 2 ชนิดดังกล่าว ได้มีรายงานในพืชวงศ์นี้แล้ว เช่น Ali et al. (2018) เพาะเลี้ยง callus ของชิง (*Zingiber officinale* Rosc.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ SA ความเข้มข้น 50 mg/l เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ 34% และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น 30% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม หรือการเพาะเลี้ยงรากของกระเทียม (*Zingiber zerumbet* L.) ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้น 800 μM นาน 15 วัน พบว่า มีปริมาณสาร zerumbone ที่เป็นสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหย 42,777 $\mu\text{g/g}$ DW สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม (Jalil, 2018) ถึงแม้ว่าจะมีรายงานสูตรอาหารเพาะเลี้ยงยอดกระชายแล้ว แต่พืชที่ปลูกต่างพื้นที่อาจตอบสนองต่ออาหารแตกต่างกัน ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มจำนวนยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ นอกจากนี้ ยังได้การศึกษาปริมาณสารฟิโนสโตรบิน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อกับส่วนต่างๆ ของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ รวมถึงผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งผลการทดลองจากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญจากกระชายให้เพียงพอต่อความต้องการทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมเภสัชกรรมได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ
2. เพื่อศึกษาปริมาณสารพิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับรากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่กระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ
3. เพื่อศึกษาผลของชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นต่อปริมาณสารพิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดกระชาย โดยนำยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดที่พัฒนา และความยาวยอด จากนั้นนำยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณสารพิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เปรียบเทียบกับรากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่กระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และศึกษาผลของ MeJA และ SA ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารต่างกันต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระชาย

กระชาย (*Boesenbergia rotunda* L.) มีชื่อพ้องคือ *Boesenbergia pandurata* หรือ *Kaempferia pandurata* และมีชื่อสามัญว่า Fingerroot เป็นพืชอายุหลายปีที่มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ลำต้นเป็นเหง้าสะสมอาหารอยู่ใต้ดิน (rhizome) มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศอินเดีย และเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศอบอุ่น หรือร้อนชื้น ชอบดินที่ร่วนซุย หรือร่วนปนทราย นิยมปลูกตามบ้านเรือนและเป็นผักสวนครัว กระชายแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ กระชาย กระชายดำ และกระชายแดง โดยกระชายจะนิยมใช้ในการประกอบอาหาร เป็นเครื่องเทศ นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการศึกษาสารสำคัญในกระชาย พบว่า มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยา จึงนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรค ส่วนกระชายดำจะนิยมใช้เป็นส่วนผสมของตัวยา เนื่องจากมีคุณสมบัติในการบำรุงกำลัง รักษาโรคต่างๆ และกระชายแดงเป็นพืชที่ค่อนข้างหายาก จึงไม่เป็นที่นิยม (โชติอนันต์ และคณะ., 2551; อ.อรรถสิทธิ์, 2551; Yusuf et al., 2011)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระชายเป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็กสูงประมาณ 15–40 cm ลำต้นเทียมที่อยู่เหนือดินมีสีเขียวอ่อน ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ ลักษณะใบเป็นรูปรียาว ปลายใบเรียวแหลม โคนใบมน ขอบใบเรียบ แผ่นใบมีสีเขียว (ภาพที่ 2.1 A) ออกดอกเป็นช่อแทรกอยู่ระหว่างกาบใบ กลีบดอกสีขาว ปลายแยกเป็น 3 กลีบ (ภาพที่ 2.1 B) เกสรและก้านดอกมีสีขาว มีลำต้นหรือเหง้าสะสมอาหารใต้ดินสีน้ำตาลแกมเทาจนถึงสีน้ำตาลแกมส้ม มีลักษณะอวบน้ำรูปทรงกระบอกหรือรูปไข่ มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีรากสะสมอาหาร ปลายเรียวแหลม เนื้อในสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 2.1 C) (โชติอนันต์ และคณะ, 2551; Chong et al., 2012)

2.1.2 สรรพคุณของกระชาย

กระชายเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณมาก ปลูกง่าย สามารถเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย รวมถึงเป็นแหล่งของสารทุติยภูมิที่สำคัญหลายชนิด เช่น ฟิโนสโตรบิน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีปริมาณมากที่สุดในพืชชนิดนี้ โดยจะพบสารฟิโนสโตรบิน และสารทุติยภูมิอื่นๆ ในทุกส่วนของกระชาย แต่จะพบมากที่สุดที่ส่วนเหง้าอ่อน (Tan et al., 2015) กระชายมีความสำคัญและนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย เช่น ใช้ประกอบอาหาร เครื่องเทศ เครื่องสำอาง โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคต่างๆ ได้ เช่น เป็นยาบำรุงหัวใจ บำรุงกำลัง แก้บิด ท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยขับปัสสาวะ รักษาโรคผิวหนังและกลากเกลื้อน ต้านเชื้อราและต้านมะเร็ง เป็นต้น (สุภกักริมย์, 2550; อ.อรรถสิทธิ์, 2551; Tan et al., 2015) จึงทำให้เป็นที่ต้องการมากในภาคอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ แต่ข้อจำกัดในการผลิตสารทุติยภูมิของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติคือ ใช้ระยะเวลาในการสร้างและสะสมสารทุติยภูมินาน การขยายพันธุ์ด้วยการแบ่งเหง้าเพิ่มจำนวนต้นได้น้อย และใช้ระยะเวลานาน มักไม่ติดผลและเมล็ด อีกทั้งพบการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ในดิน ปัจจุบันจึงได้นำเทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์พืชให้มีระยะเวลาน้อยกว่าการปลูกพืชในสภาพธรรมชาติ นอกจากนี้ยังใช้เป็นแหล่งในการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญเพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการในภาคอุตสาหกรรม (วราภรณ์, 2551; Yusuf et al., 2011)



ภาพที่ 2.1 กระชาย: (A) ลำต้นเทียมเหนือดิน ใบ, (B) ดอก และ (C) ลำต้นใต้ดินหรือเหง้า และ รากสะสมอาหาร

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (plant tissue culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็น เนื้อเยื่อ อวัยวะ เซลล์ และโปรโทพลาสต์ (protoplast) มาเพาะเลี้ยง ซึ่งเซลล์พืชเหล่านี้สามารถเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ที่ประกอบด้วยวิตามิน เกลือแร่ น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้น เป็นต้น (คำบุญ, 2542) ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้

สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้ 3 รูปแบบ คือ พัฒนาเป็นอวัยวะ (organogenesis) แคลลัส (callus) หรือเอ็มบริโอ (embryogenesis) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิด และชิ้นส่วนพืช รวมถึงปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง (อรดี, 2542; ศิวพงษ์, 2546) ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาใช้ขยายพันธุ์พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ พืชที่มีการขยายพันธุ์ได้ยากและใช้ระยะเวลานาน รวมถึงพืชสมุนไพรเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ ซึ่งจะช่วยให้ขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น ต้นพืชที่ได้มีความแข็งแรงและปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้อย่างต่อเนื่อง และมีคุณภาพสม่ำเสมอ โดยปริมาณสารคงที่ไม่แปรผันตามสภาพภูมิประเทศ และสภาพภูมิอากาศ (วรารณ, 2551) วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก คือ การฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนพืช การชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอด การชักนำให้เกิดราก และการนำต้นที่ชักนำได้ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (รังสฤษดิ์, 2545) ซึ่งความสำเร็จของการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น การฟอกกำจัดเชื้อ อาหารเพาะเลี้ยง หรือสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นต้น (อารีย์, 2541) ในการศึกษาครั้งนี้เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยอดของกระชายในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้มีจำนวนมากเพียงพอต่อการใช้เป็นแหล่งผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่งมีรายละเอียดของการฟอกกำจัดเชื้อเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ การชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอดโดยเฉพาะพืชวงศ์ Zingiberaceae รวมถึงกระชาย ดังต่อไปนี้

2.2.1 การฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนพืช

ชิ้นส่วนพืช (explants) ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้ประสบความสำเร็จได้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ขนาด อายุ ระยะการพัฒนาระยะของเนื้อเยื่อ ชนิด สายพันธุ์ และสภาพธรรมชาติ ที่มาของชิ้นส่วนพืช รวมถึงระบบและวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รังสฤษดิ์, 2545; ศิวพงษ์, 2546) โดยชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นควรเลือกจากต้นแม่ที่สมบูรณ์ แข็งแรง ปราศจากโรค นิยมใช้ชิ้นส่วนที่มีอายุน้อย และเป็นเนื้อเยื่อเจริญ ได้แก่ เนื้อเยื่อปลายยอด และปลายราก เนื่องจากเนื้อเยื่อเหล่านี้อยู่ในระยะกำลังพัฒนา เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดี (สมปอง, 2539; บุญยืน, 2547) นอกจากนี้ขนาดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ควรมีขนาด 0.1 mm ถึง 5 cm โดยชิ้นส่วนพืชขนาดเล็กจะมีโอกาสปนเปื้อนน้อย แต่อาจเกิดความเสียหาย และตายได้ง่าย ในระหว่างการฟอกกำจัดเชื้อ ส่วนชิ้นส่วนพืชขนาดใหญ่จะเจริญได้ดีกว่าและมีโอกาสรอดมากกว่า แต่ก็มีโอกาสปนเปื้อนมากกว่าเช่นกัน (ศิวพงษ์, 2546) ชิ้นส่วนพืชที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่ ใบ ลำต้น ดอก อับละอองเรณู เมล็ด เนื้อเยื่อปลายยอด และราก (บุญยืน, 2547) ดังนั้นการเลือกชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง ควรเลือกเนื้อเยื่อที่มีชีวิต มีขนาดและอายุที่เหมาะสม เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแล้ว

สามารถประสบความสำเร็จได้มากที่สุด (บุญยืน, 2547) โดยขึ้นส่วนพืชที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชวงศ์ Zingiberaceae คือ ส่วนยอดที่พัฒนาจากเหง้า (ตารางที่ 2.1)

การทำให้ขึ้นส่วนพืชปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นขั้นตอนที่สำคัญเพื่อลดหรือขจัดสิ่งสกปรก และเชื้อจุลินทรีย์ออกจากผิวของขึ้นส่วนพืช ซึ่งพืชที่เจริญในสภาพธรรมชาติ มักมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น เชื้อรา หรือแบคทีเรีย เป็นต้น ดังนั้นก่อนที่จะนำขึ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารควรทำให้ขึ้นส่วนเหล่านี้ปลอดเชื้อ โดยเริ่มจากการนำขึ้นส่วนพืชที่คัดเลือกแล้วมาทำความสะอาดเบื้องต้น เช่น เอาดินออก ตัดส่วนที่เสียหายหรือไม่ต้องการออก (ศิวพงศ์, 2546) จากนั้นนำขึ้นส่วนมาฟอกกำจัดเชื้อที่ผิวด้วยการล้างด้วยน้ำสบู่หรือน้ำยาล้างจานให้สะอาดหลายๆ ครั้ง แล้วปล่อยให้แห้งปราศจากน้ำเป็นเวลา 10 ถึง 30 นาที ในกรณีที่ขึ้นส่วนพืชมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มากสามารถใช้เทคนิคอื่นๆ ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพก่อนการฟอกกำจัดเชื้อ เช่น การปล่อยน้ำประปาไหลผ่านขึ้นส่วนพืช การแช่เนื้อเยื่อในสารละลายของน้ำยากำจัดเชื้อรา (fungicide) หรือใช้คลื่นความถี่สูง (sonicate) ผ่านเนื้อเยื่อทั้งที่อยู่ในน้ำ หรือในสารละลายน้ำยากำจัดเชื้อรา (บุญยืน, 2547) เมื่อล้างทำความสะอาดขึ้นส่วนพืชแล้ว นำไปฟอกกำจัดเชื้อด้วยสารฟอกกำจัดเชื้อ (sterilizing agents) ซึ่งสารฟอกกำจัดเชื้อที่ใช้มีหลายชนิด เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), silver nitrate ($Ag(NO_3)_2$), calcium hypochlorite ($CaOCl_2$) และ sodium hypochlorite ($NaOCl$) เป็นต้น ซึ่งสารแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน รวมถึงความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ก็แตกต่างกันไปตามชนิดของสาร (รังสฤษฎ์, 2545) ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสม ไม่ส่งผลต่อเนื้อเยื่อพืช และสามารถจัดออกได้ง่าย เนื่องจากหากล้างออกไม่หมดจะทำให้เป็นพิษและทำลายเนื้อเยื่อพืชได้ (วรารณ, 2551) สารฟอกกำจัดเชื้อที่นิยมใช้ คือ $NaOCl$ มีชื่อทางการค้าที่รู้จักโดยทั่วไปคือ คลอโร็กซ์ (clorox) และใช้ร่วมกับสารจับใบ (surfactant) เช่น Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) ความเข้มข้น 0.05% หรือประมาณ 1 ถึง 2 หยด เพื่อลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับเนื้อเยื่อพืช ช่วยให้สารฟอกกำจัดเชื้อทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยประสิทธิภาพของสารฟอกกำจัดเชื้อเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อเวลา และปริมาณสารที่ใช้ (time-dose response) ซึ่งประสิทธิภาพจะมากขึ้นถ้าใช้ในความเข้มข้น และระยะเวลาของสารมากขึ้น แต่ถ้าใช้มากเกินไปอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อความมีชีวิตของเซลล์ หรือเนื้อเยื่อของพืชได้ (รังสฤษฎ์, 2545) ดังนั้นขั้นตอนในการฟอกกำจัดเชื้อขึ้นส่วนพืชแต่ละชนิดจึงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของขึ้นส่วนพืช ชนิดและความเข้มข้นของสารฟอกกำจัดเชื้อ และระยะเวลาในการฟอกกำจัดเชื้อ (สมพร, 2549) ซึ่งวิธีการฟอกกำจัดเชื้อขึ้นส่วนของกระชาย และพืชวงศ์ Zingiberaceae ชนิดต่างๆ ได้มีรายงานแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยสารฟอกกำจัดเชื้อที่นิยมใช้กับพืชวงศ์นี้คือ $NaOCl$ ความเข้มข้น 5 ถึง 50% นาน 5 ถึง 20 นาที และมีขั้นตอนการฟอกด้วย $NaOCl$ 1 ถึง 3 ครั้ง

ตารางที่ 2.1 ชนิด และความเข้มข้นของสารฟอกกำจัดเชื้อ และระยะเวลาในการฟอกกำจัดเชื้อของพืชวงศ์ Zingiberaceae

ชนิดของพืช	ชิ้นส่วนพืช	สารฟอก กำจัดเชื้อ	ความเข้มข้น (v/v)	เวลา (นาที)	เอกสารอ้างอิง
ขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i>)	ยอด	NaOCl	20%, 10%	20, 10	ปริญา (2558)
กระชายดำ (<i>Kaempferia parviflora</i>)	ยอด	NaOCl	15%, 10%, 5%	15, 10, 5	มนทิณี และคณะ (2559)
กระชาย (<i>Boesenbergia rotunda</i>)	ยอด	NaOCl	20%	15	Yusuf et al. (2011)
กระเทียม (<i>Zingiber zerumbet</i>)	ยอด	NaOCl	20%	15	Faridah et al. (2011)
ขิง (<i>Zingiber officinale</i>)	ยอด	NaOCl	50%	15	Abbas et al. (2011)
ขิง (<i>Zingiber officinale</i>)	ยอด	NaOCl	50%	15	David et al. (2016)
ดาหลาขาว (<i>Etlingera elatior</i>)	ยอด	NaOCl	30%	15	Yunus et al. (2012)

แล้วแต่ละชนิดพืช ในการพอกกำจัดเชื้อของกระชายตามรายงานของ Yusuf et al. (2011) พบว่า พอกชิ้นส่วนยอดที่พัฒนาจากเหง้าด้วย NaOCl ความเข้มข้น 20% นาน 15 นาที

2.2.2 การชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอด

การชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอดเป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และจะประสบความสำเร็จได้นั้นจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสูตรอาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงมีมากกว่า 50 สูตร เช่น สูตร Murashige and Skoog's (MS), Gamborg's (B5) และ Schenk and Hiderbrand's (SH) เป็นต้น (บุญยืน, 2547) แต่ละสูตรจะมีองค์ประกอบสารอาหารที่แตกต่างกันไป (วรภรณ์, 2551) สูตรอาหารที่นิยมใช้คือ สูตร MS โดยทั่วไปสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลัก (macronutrients) ธาตุอาหารรอง (micronutrients) วิตามิน กรดอะมิโน สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon sources) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) สารที่ช่วยให้อาหารแข็งตัว (solidifying agents) และสารอาหารเสริมอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ เป็นต้น เมื่ออาหารเพาะเลี้ยงมีสารเหล่านี้ในความเข้มข้นที่เหมาะสมและครบถ้วน ชิ้นส่วนพืชก็จะสามารถเจริญเติบโตได้ โดยพืชชนิดต่างๆ จะมีความต้องการทั้งชนิด และปริมาณขององค์ประกอบเหล่านี้แตกต่างกัน (คำบุญ, 2542; บุญยืน, 2547) ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีความสำคัญอย่างมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถกล่าวได้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาจไม่ประสบความสำเร็จ ถ้าไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมี 2 กลุ่ม คือ ไซโทไคนิน (cytokinin) และออกซิน (auxin) สารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวเมื่อเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์ เกิดการยืดยาว รวมถึงเกิดการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะได้อย่างสมบูรณ์ (ศิวพงศ์, 2546) โดยชิ้นส่วนพืชส่วนมากจะพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นอวัยวะที่สมบูรณ์ได้เมื่อได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง หรือทั้ง 2 กลุ่มร่วมกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชิ้นส่วนพืช ตลอดจนชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (รังสฤษฎ์, 2545) โดยสารในกลุ่มไซโทไคนินนี้จะมีผลโดยตรงต่อการเกิดยอด มีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ ขยายขนาดของเซลล์ กระตุ้นการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและตาข้าง และควบคุมการเกิดรูปร่างของเซลล์ รวมถึงกระตุ้นให้แคลลัสเจริญเติบโตไปเป็นต้น (พีรเดช, 2559) นอกจากนี้ไซโทไคนินยังสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเกิดยอด การเพิ่มจำนวนยอด และเกิดการพัฒนารูปร่างของตาพิเศษ (adventitious bud) โดยไซโทไคนินที่มีความเข้มข้นสูงจะช่วยลดอิทธิพลของตายอดข่มตาข้าง (apical dominance) แต่จะยับยั้งการเกิดราก (คำบุญ, 2542)

สารในกลุ่มไซโทไคนินที่นิยมใช้ในรูปแบบธรรมชาติ ได้แก่ zeatin และ IPA (dihydrozeatin isopentenyl adenine) เป็นต้น และสารสังเคราะห์ ได้แก่ kinetin (6-furfuryl-

aminopurine) 2iP (N6-2-isopentyl adenine) TDZ (thidiazuron) และ BA (6-benzyladenine) เป็นต้น (วรารณ, 2553) สารในกลุ่มออกซินมีบทบาทในการเร่งการเจริญเติบโตของพืช ชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ควบคุมการขยายขนาดและการยึดตัวของเซลล์ ช่วยให้เซลล์ในส่วนต่างๆ ของพืชยืดยาวขึ้นด้วยการกระตุ้นให้สร้างผนังเซลล์มากขึ้น รวมถึงส่งเสริมการเกิดราก (นพดล, 2537; ศิวพงศ์, 2546) สารในกลุ่มออกซินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ IAA 2,4-D NAA PAA (phenylacetic acid) และ IBA (indole-3-butyric acid) โดยทั่วไปการชักนำและเพิ่มจำนวนยอดมักใช้ไซโทไคนินอย่างเดียว แต่อาจใช้ร่วมกับออกซิน อย่างไรก็ตามสัดส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินมีผลต่อการสร้างอวัยวะของพืช โดยเมื่อสัดส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินสูง ขึ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงจะมีการแบ่งเซลล์ และพัฒนาไปเป็นลำต้น ตา ยอด และใบ แต่หากสัดส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินต่ำ ขึ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงจะมีการแบ่งเซลล์ และพัฒนาไปเป็นรากได้ดีกว่า (นพดล, 2537) ความเข้มข้นของไซโทไคนินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในช่วง 0.5 ถึง 30 mg/l (รังสฤษดิ์, 2545) โดย BA เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีฤทธิ์มาก และราคาไม่แพง (นพดล, 2537; บุญยืน, 2547) ส่วนใหญ่ใช้คู่กับ NAA เพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) แต่ถ้าใช้ BA อย่างเดียวมักชักนำให้เกิดยอด (วรารณ, 2553) มีรายงานการชักนำให้เกิดยอดของกระชาย และพืชวงศ์ Zingiberaceae ชนิดต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2.2 ไซโทไคนินที่นิยมเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดยอดของพืชวงศ์นี้คือ BA ความเข้มข้น 0.5 ถึง 4 mg/l ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.3 ถึง 1 mg/l หรือ IAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l โดยมีจำนวนยอดใหม่ที่พัฒนา 2.6 ถึง 6.14 ยอด ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกระชายคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l และ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l โดยมียอดที่พัฒนา 4.9 ยอด (Yusuf et al., 2011)

2.3 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites หรือ bioactive compounds)

สารทุติยภูมิ เป็นสารประกอบทางเคมีที่เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ภายในพืชโดยสร้างจากสารปฐมภูมิบางชนิด ซึ่งสารทุติยภูมิเป็นสารที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืชโดยจะทำหน้าที่ป้องกันตัวเองจากสิ่งที่มีารบกวน เช่น จุลชีพ แมลง และ สัตว์ต่างๆ ทำให้สามารถปรับตัวเพื่อดำรงชีวิต และเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมได้ พืชบางชนิดมีกลไกป้องกันตัวเองเมื่อถูกรบกวนจากสิ่งมีชีวิตอื่นด้วยการ

ตารางที่ 2.2 อาหารเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอด และเพิ่มจำนวนยอดของพืชวงศ์ Zingiberaceae

ชนิดพืช	ชิ้นส่วนพืช ที่นำมาเพาะเลี้ยง	อาหารเพาะเลี้ยง	จำนวนยอด ที่พัฒนา	เอกสารอ้างอิง
กระชาย (<i>Boesenbergia rotunda</i>)	ยอด	MS+2 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA	4.9	Yusuf et al. (2011)
กระชายดำ (<i>Kaempferia parviflora</i>)	ยอด	MS+4 mg/l BA+0.3 mg/l NAA	5	มนทิณี และคณะ (2559)
ปุด (<i>Etlingera coccinea</i>)	ยอด	MS+3 mg/l BAP+0.5 mg/l IAA	5.6	Faridah et al. (2011)
ขิง (<i>Zingiber officinale</i>)	ยอด	MS+4.5 mg/l BAP	8	Abbas et al. (2011)
ขิง (<i>Zingiber officinale</i>)	ยอด	MS+3 mg/l BAP+1 mg/l NAA	6.14	David et al. (2016)
ขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i>)	ยอด	MS+2 mg/l BA	2.6	Jala (2012)
ขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i>)	ยอด	MS+3 mg/l BAP	3.81	วิสสุตา และปิยะมาศ (2558)

ผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณที่มากขึ้น (ศุภวรรณ, 2549) ปัจจุบันมีการค้นพบสารทุติยภูมิในพืชมากกว่า 100,000 ชนิด พืชแต่ละชนิดจะมีสารทุติยภูมิที่แตกต่างกันไป โดยสารทุติยภูมิที่พบมากในพืชส่วนใหญ่ ได้แก่ ฟีนอลิก (phenolic) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แอลคาลอยด์ (alkaloid) เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) สเตียรอยด์ (steroid) เป็นต้น (Collin, 2001; Shmeda –Hirschmann et al., 2005) การสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืชพบว่า มีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโตของพืช โดยในระยะที่พืชยังอายุน้อย (juvenile phase) จะมีการสังเคราะห์ และสะสมสารทุติยภูมิบางกลุ่มในปริมาณมาก ในขณะที่พืชเข้าสู่ช่วงระยะเจริญเติบโตเต็มที่ (mature phase) อาจมีการสร้าง และสะสมสารทุติยภูมิบางชนิดในปริมาณมาก (Banthorpe, 1994)

สารทุติยภูมิที่พบในพืชมักมีสรรพคุณทางเภสัชกรรม สามารถนำมาใช้ผลิตเป็นยารักษาโรค อาหารเสริม ตลอดจนใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ (วรภรณ์, 2551) แต่เมื่อพืชอยู่ในสภาพธรรมชาติจะใช้ระยะเวลาในการสร้าง และสะสมสารเหล่านี้ค่อนข้างนาน อีกทั้งสารที่ได้มักมีปริมาณน้อย และไม่สม่ำเสมอ ทำให้การผลิตสารทุติยภูมิที่ได้จากพืชไม่เพียงพอต่อความต้องการ ปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิจากพืช เนื่องจากเซลล์พืชหรือชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีข้อมูลทางพันธุกรรมและสามารถควบคุมหน้าที่ต่างๆ รวมถึงขบวนการชีวสังเคราะห์สารทุติยภูมิด้วย ดังนั้นเซลล์พืชแต่ละเซลล์จึงสามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้ และสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้เหมือนกับต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ เทคนิคนี้สามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการผลิตสารของพืช ทำให้ปริมาณสารไม่ผันแปรตามสภาพแวดล้อมและสภาพภูมิประเทศ สามารถเก็บเกี่ยวสารทุติยภูมิได้ตลอดเวลา และสารที่ได้จะมีความสม่ำเสมอไม่แตกต่างกันระหว่างรุ่นการผลิต (ศุภวรรณ, 2549; วรภรณ์, 2551; Banthorpe, 1994)

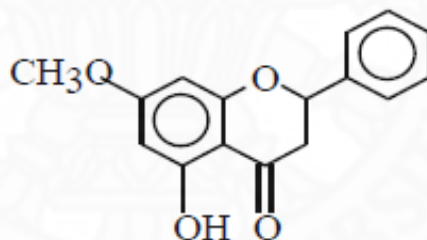
สารทุติยภูมิที่พบในกระชายมีหลายชนิด โดยสารที่พบมากเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น alpinetin, panduratin A, pinocembrin, cardamonin, boesenbergin และ chalcones เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพินอสโตรบิน (pinostrobin) ซึ่งเป็นสารที่พบมากที่สุดใ้ในกระชาย นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มอื่น ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก อัลคาลอยด์ และน้ำมันหอมระเหย เช่น γ -terpinene geraniol, camphor, camphene, methyl cinnamate หรือ terpineol เป็นต้น สารแต่ละชนิดที่พบจะมีปริมาณที่แตกต่างกันตามแต่ละส่วนของพืช (Jitvaropas et al., 2012; Yusuf et al., 2013; Chahyadi et al., 2014) โดยสารพินอสโตรบิน และสารทุติยภูมิเหล่านี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ด้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ โรคเมะเร็ง โรคความจำเสื่อม และโรค HIV-1 เป็นต้น (Patel et al., 2016; Yusuf et al., 2018)

2.3.1 สารฟิโนสโตรบิน

ฟิโนสโตรบิน หรือ 5-ไฮดรอกซี-7-เมทอกซี ฟลาวาโนน (5-hydroxy-7-methoxy flavanone) เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติพบในพืชหลายชนิด เช่น กระชาย ถั่วแระ (*Cajanus Cajan*) ซัลเวีย (*Salvia texana*) และต้นสนเกียะ (*Pinus strobus*) เป็นต้น มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่เสถียรคล้ายกับ naringin (ภาพที่ 2.2) และอาจมีกระบวนการ bioactivity คล้ายกับ naringin โดยสารฟิโนสโตรบิน มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidative) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านจุลินทรีย์ (anti-microbia) ต้านไวรัส (anti-virus) ต้านกิจกรรมของ aromatase (anti-aromatase activities) ต้านกิจกรรมที่ทำให้เกิดเชื้อ HIV (anti-HIV activity) ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ในลำไส้ ลดการเกิด estrogen-induced cell proliferation ยับยั้งการเจริญเติบโตและกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณในการรักษาโรคความจำเสื่อม โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร และโรคมะเร็ง เป็นต้น (Patel et al., 2016; Gu et al., 2017; Yusuf et al., 2018) โดยกระชายเป็นแหล่งสร้างสารฟิโนสโตรบินที่สำคัญสามารถพบได้ทุกส่วนของพืช ซึ่งส่วนของเหง้าอ่อนจะพบสารชนิดนี้สูงที่สุด รองลงมาคือส่วนของรากสะสมอาหาร และ เหง้าแก่ (Tan et al., 2015) จากการที่สารฟิโนสโตรบินมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่สำคัญในการรักษาโรคต่างๆ จึงควรมีการศึกษาถึงปริมาณสารและการเพิ่มปริมาณสารเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเภสัชกรรม และใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคในทางการแพทย์ การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟิโนสโตรบิน นิยมวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสถานะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (Yusuf et al., 2013; Tan et al., 2015; Yusuf et al., 2018)

ปริมาณสารฟิโนสโตรบินของกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ และเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติได้มีรายงานแล้ว เช่น Yusuf et al. (2013) เพาะเลี้ยงยอดกระชายบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ NAA biotin และ IAA ความเข้มข้น 1 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสกระชายในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA และ biotin ความเข้มข้น 1 mg/l 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/l L-glutamine และ myo-inositol ความเข้มข้น 0.1 mg/l เปรียบเทียบกับเหง้ากระชายที่พัฒนาในสภาพธรรมชาติ พบว่า แคลลัส และเซลล์แขวนลอยที่พัฒนามีสารฟิโนสโตรบิน เท่ากับ 96.30 ± 0.00 และ 3.15 ± 0.34 $\mu\text{g/g}$ DW ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณสาร เท่ากับ $8,220.72 \pm 45.66$ $\mu\text{g/g}$ DW นอกจากนี้ Yusuf et al. (2018) พบว่ารากกระชายที่พัฒนามบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 mg/l นาน 8 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟิโนสโตรบินเท่ากับ 3.43 $\mu\text{g/g}$ ในขณะที่รากกระชายที่พัฒนามบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 5% มีปริมาณสารฟิโนสโตรบินเท่ากับ 3.61 $\mu\text{g/g}$ ส่วน Ng et al. (2016) พบว่า ยอดกระชาย

ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟิโนสโตรบินและสารทุติยภูมิอื่นๆ สูงกว่าแคลัสรวมถึงเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟิโนสโตรบินและสารทุติยภูมิอื่นๆ สูงกว่ายอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และ Tan et al. (2015) ได้ศึกษาปริมาณสารฟิโนสโตรบินในส่วนต่างๆ ได้แก่ เหง้าอ่อน (shoot base) รากสะสมอาหาร (rootlet) เหง้า (rhizome) ลำต้นเทียมที่มีสีแดง (maroon stem) ก้าน (stalk) และ ใบ (leaf) ของต้นกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อแล้วออกปลูก เปรียบเทียบกับต้นกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ พบว่า ต้นกระชายแต่ละส่วนมีปริมาณสารฟิโนสโตรบินแตกต่างกัน โดยต้นกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อแล้วออกปลูก มีปริมาณสารฟิโนสโตรบินในเหง้าอ่อนสูงที่สุด (21,049.4 $\mu\text{g/g}$) รองลงมา คือ รากสะสมอาหาร และเหง้า (16,845.4 และ 17,098.5 $\mu\text{g/g}$ ตามลำดับ) ส่วนที่พบน้อยที่สุดคือ ลำต้นเทียมที่มีสีแดง (404.7 $\mu\text{g/g}$) ก้าน (61.0 $\mu\text{g/g}$) และ ใบ (33.8 $\mu\text{g/g}$) เช่นเดียวกับต้นกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณสารดังกล่าวในเหง้าอ่อนมากที่สุด 20,966.7 ($\mu\text{g/g}$) รองลงมา คือ รากสะสมอาหาร และเหง้า (10,502.6 และ 11,366.3 $\mu\text{g/g}$ ตามลำดับ) ส่วนที่พบน้อยที่สุดคือ ลำต้นเทียมที่มีสีแดง (2,020.1 $\mu\text{g/g}$) ก้าน (491.0 $\mu\text{g/g}$) และ ใบ (456.7 $\mu\text{g/g}$) โดยงานทดลองนี้ไม่ระบุอายุพืชทั้งต้นกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อแล้วออกปลูก และต้นกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารฟิโนสโตรบิน

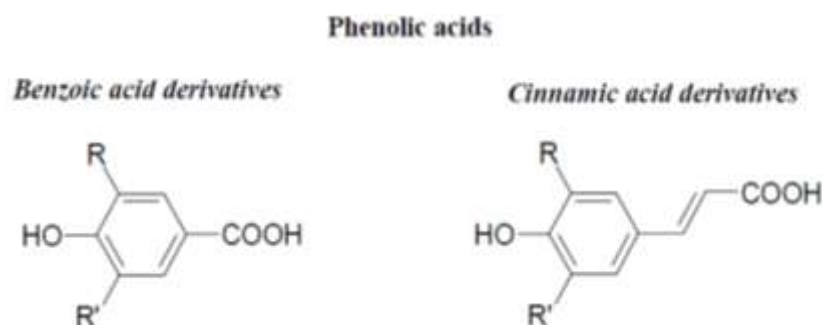
ที่มา: Parwata et al. (2015)

2.3.2 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์เป็นกรด พบได้ในพืชหลายชนิด และพบในธรรมชาติมากกว่า 8,000 ชนิด ซึ่งพืชจะสร้างขึ้นผ่านกระบวนการ pentose phosphate, shikimate และ phenylpropanoid pathways เพื่อใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมีพื้นฐานเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) อย่างน้อย 1 หมู่ (ภาพที่ 2.3) (Pereira et al., 2009; Ozcan et al., 2014) มักพบอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ พืชสามารถสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกได้หลายชนิด

เช่น โพลีฟีนอล (polyphenols) กรดฟีนอลิก (phenolic acids) กรดแกลลิก (gallic acid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ฟลาโวน (flavones) แอนโทไซยานิน (anthocyanins) คูมาริน (coumarins) ลิกนิน (lignin) และ แทนนิน (tannin) เป็นต้น มีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ ต้านกิจกรรมของจุลชีพต่างๆ ต้านการก่อมะเร็ง ป้องกันโรคข้ออักเสบ ลดความดันโลหิต และช่วยในการสลายลิ่มเลือด นอกจากนี้ยังช่วยดักจับอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชันและการเกิดอนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ รวมถึงช่วยกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ (Rice-Evans et al., 1997; Williamson et al., 2000; Lin et al., 2016) การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสามารถทำได้หลายวิธี โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของ molybdenum ion โดยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent เกิดเป็นทังสเตน (tungsten) และโมลิบดีนัมบลู (molybdenum blue) เติมน้ำ Na_2CO_3 เพื่อหยุดปฏิกิริยาไม่ให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับ ทำให้ตัวอย่างที่มีสารประกอบฟีนอลิกเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm (Tsai et al., 2005)

การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของกระชายในสภาพปลอดเชื้อยังไม่มีรายงาน อย่างไรก็ตามมีการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของกระชาย และพืชในวงศ์ Zingiberaceae ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ โดยพบว่าชนิดและส่วนต่างๆ ของพืชมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสะสมแตกต่างกัน เช่น ใบกระชาย ข่า ขมิ้นชัน และ ขิง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 260 ± 8 366 ± 15 230 ± 19 และ 291 ± 18 mg GAE/100 g ตามลำดับ ส่วนเหง้ากระชาย ข่า ขมิ้นชัน และ ขิง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 197 ± 50 150 ± 22 534 ± 205 และ 157 ± 18 mg GAE/100 g ตามลำดับ (Chan et al., 2007) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของพืชวงศ์ Zingiberaceae เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อแล้ว เช่น Cousins et al. (2007) พบว่า เหง้าขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำ (low-nitrogen) มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ($46.888 \mu\text{g GAE/g DW}$) สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมหรืออาหารสูตร MS ($41.008 \mu\text{g GAE/g DW}$) และ Ali et al. (2018) พบว่า แคลลัสซึ่งที่พัฒนามบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/l มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 33.6 ± 0.07 mg gallic acid/g ซึ่งน้อยกว่าเหง้าขิงที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (60.34 ± 0.43 mg gallic acid/g)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก

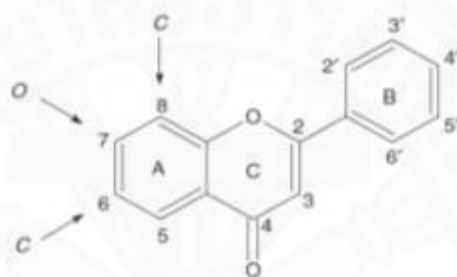
ที่มา: Pereira et al. (2009)

2.3.3 สารฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกประเภทโพลีฟีนอล พบได้ในผัก ผลไม้ ธัญพืช และพบได้ในทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือ เมล็ด (Panche et al., 2016) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (phenylbenzopyrones) ประกอบด้วยวงแหวนคาร์บอน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน 2 วง และวงแหวนไพแรน (heterocyclic pyran ring) 1 วง (ภาพที่ 2.4) มีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างคาร์บอน 15 อะตอม (C6-C3-C6) โมเลกุลมีขนาดเล็ก ละลายน้ำได้ สามารถจำแนกฟลาโวนอยด์ตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างทางเคมีได้หลายกลุ่ม เช่น ฟลาโวน (flavones) ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ฟลาโวนอล (flavonols) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) เป็นต้น ซึ่งสารฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเป็นสารให้สีที่สำคัญในพืช ช่วยกรองรังสีอัลตราไวโอเล็ตและตรึงไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีความสำคัญทางเภสัชกรรม คือ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ต้านโรคเบาหวาน ต้านจุลชีพ และช่วยปรับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Pietta, 2000) การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี colorimetric method เป็นวิธีหนึ่งที่นิยม อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่าง aluminium chloride กับหมู่คีโตน (keto group) โดย NaNO_2 จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลที่วงฟีนอล และเกิดเป็นหมู่คีโต แล้ว aluminum ion จะจับกับหมู่คีโตที่วงฟีนอลของฟลาโวนอยด์ที่ตำแหน่ง 3' และ 4' เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อน เติมน้ำ AlCl_3 จะเกิดสารละลายสีเหลือง และสุดท้ายเติมน้ำ NaOH สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบส ซึ่งสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm (Hassan et al., 2013; Pękal and Pyrzynska, 2014)

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ และเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติได้มีรายงานแล้ว เช่น Yusuf et al. (2013) พบว่า แคลลัสที่พัฒนาจาก

ยอดกระชายบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ NAA biotin และ IAA ความเข้มข้น 1 mg/l นาน 4 สัปดาห์ และเซลล์แขวนลอยจากแคลล์กระชายในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA และ biotin ความเข้มข้น 1 mg/l 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/l L-glutamine และ myo-inositol ความเข้มข้น 0.1 mg/l มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 120.61 ± 0.01 และ 4.91 ± 0.57 mg quercetin/g ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ $12,975.52 \pm 71.78$ mg quercetin/g นอกจากนี้ Jing et al. (2010) รายงานว่าเหง้ากระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 2.19 ± 0.02 mg CE/g DW



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์
ที่มา: Corradini et al. (2011)

2.3.4 อนุมูลอิสระ (free radical) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

อนุมูลอิสระ คืออะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียร มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่บนสุดของโมเลกุล โดยทั่วไปอนุมูลอิสระเกิดขึ้นตลอดเวลาในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ ออกซิเจนในการเผาผลาญ เพื่อสังเคราะห์พลังงานภายในเซลล์ผ่านกระบวนการหายใจระดับเซลล์ หรืออนุมูลอิสระอาจเกิดจากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม การเกิดความเครียด การได้รับมลพิษจากสิ่งแวดล้อม รวมถึงการทานอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบสูง แอลกอฮอล์ และกาแฟ (อนงนาฏ, 2560; Sarms et al., 2010) อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) ซึ่งมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับโมเลกุลข้างเคียงอื่นๆ หลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอ (DNA; deoxyribonucleic acid) โดยจะเข้าไปดัดและจับกับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไป เพื่อให้ตัวเองมีความเสถียรมากขึ้น ซึ่งโมเลกุลที่สูญเสียอิเล็กตรอนไปนั้นจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว และจะเกิดปฏิกิริยานี้ต่อไปเรื่อยๆ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้มีผลไปทำลายโครงสร้างของไขมัน โปรตีน บริเวณ

เยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) และทำลายโครงสร้างโครงสร้างของสารพันธุกรรม ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) หรือเซลล์มีการเกิดและเพิ่มจำนวนที่ผิดปกติ อีกทั้งทำให้เกิดภาวะ oxidative stress (อนงนาฏ, 2017; Robert et al., 2010; Mut-Salud et al., 2016) นำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคความจำเสื่อม โรคข้ออักเสบ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ โรคความแก่ชรา โรคภูมิแพ้ โรคทางระบบประสาท และโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น (บุหรัน, 2556; Rahman et al., 2012)

อย่างไรก็ตามในร่างกายจะมีกลไกที่สามารถยับยั้งและทำลายอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดจากอนุมูลอิสระ โดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่ช่วยป้องกันหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยขจัดและลดปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้ไปทำลายสารประกอบหรือเซลล์อื่นๆ สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกได้ 2 ชนิด คือ ชนิดที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เช่น catalase CAT) superoxide dismutase (SOD) glutathione reductase (GR) และเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) เป็นต้น และชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic antioxidants) เช่น วิตามิน C วิตามิน E วิตามิน A เบต้าแคโรทีน (β -carotene) โพลีฟีนอล (polyphenols) ไลโคปีน (lycopene) และกลูตาไทโอน (glutathione) เป็นต้น (Rio, 2015; Jebur et al., 2016) สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกในการทำงานหลายรูปแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ยับยั้งการทำงานของ lipoxygenase จับกับโลหะหนักที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อสร้างอนุมูลอิสระ (metalchelation) ยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) และหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain breaking) เป็นต้น (อนงนาฏ, 2560)

ในปัจจุบันมีหลายวิธีการที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging assay) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation decolorization assay) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power; FRAP assay) (บุหรัน, 2556) โดยในการศึกษานี้เลือกใช้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ทราบผลได้เร็ว สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารอนุมูลอิสระที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง อีกทั้งทำการวิเคราะห์ได้ทั้งในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาฤทธิ์ทางยาของพืชสมุนไพร โดยอาศัยสารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลอิสระ DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) ที่เป็นสารสังเคราะห์ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียร และมีสีม่วง เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำ

ให้ DPPH• ได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจน และเปลี่ยนเป็น DPPH-H หากสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทำให้ DPPH• ที่มีสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ดังสมการ



เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm จะสามารถนำมาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ (โอภา และคณะ, 2549; บุหรีน, 2556; Yamasaki et al., 1994) มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระชาย และพืชในวงศ์ Zingiberaceae ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติแล้ว ดังรายงานของ Jing et al. (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดของเหง้ากระชายโดยวิธี ABTS DPPH และ FRAP พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 4.24 ± 0.01 4.29 ± 0.55 1.77 ± 0.09 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และ Ali et al. (2018) พบว่า แคลลัสของขิงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $1,265.49 \pm 59.9$ $\mu\text{g/ml}$ ส่วน ABTS มีน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ในขณะที่เหง้าในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เท่ากับ 8.29 ± 1.73 และ 250.33 ± 13.6 $\mu\text{g/ml}$

2.4 การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ

ในสภาพธรรมชาติพืชจะใช้ระยะเวลาในการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิ สารที่ได้มักมีคุณภาพและปริมาณไม่คงที่เนื่องจากความแปรปรวนของสภาพแวดล้อม และสภาพภูมิประเทศ อีกทั้งมีปริมาณสารสกัดน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่เพาะปลูกและจำนวนพืชที่ถูกเก็บเกี่ยวไป ปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาผลิตสารทุติยภูมิ และมีการศึกษามาแล้วในพืชหลายชนิด เนื่องจากสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้อย่างต่อเนื่องในระยะเวลาอันสั้น มีคุณภาพสม่ำเสมอเมื่อเปรียบเทียบกับพืชในสภาพธรรมชาติ รวมทั้งปริมาณสารจะไม่แปรผันตามสภาพภูมิอากาศ และสภาพภูมิประเทศ ซึ่งการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มสารทุติยภูมิสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเลี้ยงยอด ราก และแคลลัสด้วย การควบคุมอาหารและสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการสร้างสาร เป็นต้น (ศุภวรรณ, 2549; วราภรณ์, 2551) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคโนโลยีอื่นๆ มาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น การเติมสารตั้งต้น (precursor feeding) การเติมสารกระตุ้น (elicitation) การตรึงเซลล์ (immobilization) การซึมผ่าน (permeabilization) การดัดแปลงพันธุกรรม (genetic modification) และการควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิในวิถีชีวสังเคราะห์ของพืช (biosynthesis pathway) (วราภรณ์, 2551; Zhao et al., 2005) งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของยอดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

ร่วมกับการเติมสารกระตุ้น ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ และมีการศึกษาแล้วในพืชสมุนไพรหลายชนิด (Patel and Krishnamurthy, 2013) โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.4.1 การเติมสารกระตุ้น

พืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติจะเกิดกลไกการตอบสนอง และสร้างสารทุติยภูมิขึ้น เพื่อป้องกันตัวเองจากจุลชีพ แมลง และสัตว์ต่างๆ ที่มารบกวน หรือเมื่อได้รับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อปรับตัวให้สามารถดำรงชีวิต และเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติได้ ซึ่งการเติมสารกระตุ้นเป็นการทำให้เซลล์พืชเกิดกลไกการป้องกันตัวเองของพืชคล้ายการถูกรบกวนโดยจุลชีพ หรือการที่เซลล์พืชเกิดความเครียด พืชจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางกายภาพและชีวเคมี รวมไปถึงการสังเคราะห์และสะสมสารทุติยภูมิ (วรารณ, 2551; Baenas et al., 2014) การใช้สารกระตุ้นร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในเชิงการค้าเพื่อผลิตสารทุติยภูมิจากพืช เนื่องจากช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย ลดระยะเวลาในการผลิต (Jiao et al., 2018) โดยสารกระตุ้นที่นิยมใช้เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แบ่งตามแหล่งที่มาของสารกระตุ้นได้ 2 กลุ่ม คือ 1) สารกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitors) คือ สารกระตุ้นที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ salicylic acid (SA) methyl jasmonate (MeJA) jasmonic acid (JA) gibberellin (GA3) และ yeast extract เป็นต้น และ 2) สารกระตุ้นอชีวภาพ (abiotic elicitors) คือ สารกระตุ้นที่ได้จากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ สารเคมี หรือสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิ แสง UV inorganic salts และ metal ions เป็นต้น ซึ่งสารกระตุ้นแต่ละชนิดจะมีกระบวนการส่งสัญญาณหรือกลไกการตอบสนองที่แตกต่างกัน ดังนั้นสามารถใช้สารกระตุ้นเพียงชนิดเดียว หรืออาจใช้ร่วมกันหลายชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (วรารณ, 2551; Rao and Ravishankar, 2002) นอกจากนี้ความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นที่ต่างกันก็มีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิของพืช กล่าวคือ เมื่อใช้สารกระตุ้นความเข้มข้นต่ำ หรือระยะเวลาที่ได้รับสารกระตุ้นสั้นเกินไปอาจไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ หรือการแสดงออกของยีนที่ควบคุมกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิ แต่หากใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปนั้นจะเป็นพิษต่อเซลล์ของพืช ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง ภายในเซลล์พืชจะสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่อาจส่งผลทำให้เซลล์พืชตายได้ (Izumi et al., 2009 อ้างโดย Chodisetti et al., 2015) นอกจากนี้ระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นที่นานเกินไปจะส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชมีปริมาณสารทุติยภูมิลดลง เนื่องจากเซลล์พืชเกิดความเครียดจากสารกระตุ้นเป็นเวลานานจนเกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ทำให้สารทุติยภูมิที่พืชสร้างถูกขับออกจากเซลล์มาสะสมอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง (Theboral et al., 2014; Piątczak et al., 2016) โดยพืชแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาได้รับสารกระตุ้นแตกต่างกัน (วรารณ, 2551; Patel

and Krishnamurthy, 2013) ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้สารกระตุ้นชีวภาพ 2 ชนิด คือ SA และ MeJA ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสารกระตุ้นที่นิยมใช้เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของพืชสมุนไพรหลายชนิด (Singh and Dwivedi, 2018) โดยได้รวบรวมข้อมูลของพืชบางชนิดไว้ในตารางที่ 2.3

2.4.1.1 Methyl jasmonate (MeJA)

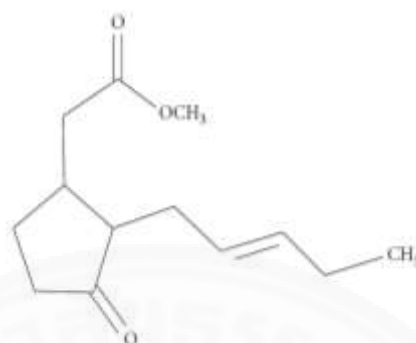
MeJA จัดอยู่ในกลุ่มของ jasmonate สังเคราะห์มาจากกรดลิโนเลนิก (linolenic acid) เป็นสารอินทรีย์ประเภทน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) พบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด และยังพบได้ในพืชชั้นต่ำ เช่น มอส และ เฟิร์น โดยส่วนใหญ่สกัดแยกได้จากต้น *Jasminum grandiflorum* มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.5 MeJA สร้างจากกระบวนการ octadecanoic pathway ที่ออกซิไดซ์ JA โดยเอนไซม์ JA carboxyl methyltransferase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สารชนิดนี้มีคุณสมบัติควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น การงอกของเมล็ด การเจริญของราก การสุกของผล การหลุดร่วงของใบ (abscission) ยับยั้งการเจริญเติบโต และกระตุ้นการชราภาพ (senescence) (Seo et al., 2001; Cheong and Choi, 2003) สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟีนอล โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine-ammonia lyase (PAL) วิธียังกล่าวนำไปสู่การสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล (phenol) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในพืช (Gonzalez-Aguilar et al., 2004) นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานให้กับพืช โดยเป็นตัวส่งสัญญาณในการกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวของพืชเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอกทั้งที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต เช่น การทำลายของโรคแมลง และจุลินทรีย์ต่างๆ รวมถึงความเครียดที่ได้รับจากสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น ความแห้งแล้ง อุณหภูมิที่ต่ำ และระดับความเข้มข้นของเกลือที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น จึงมีการนำสารชนิดนี้มาใช้ในพืชหลายชนิดเพื่อตัวกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิ เช่น ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และอัลคาลอยด์ (Cheong and Choi, 2003; Zhao et al., 2005)

มีการศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิโดยการเติม MeJA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชวงศ์ Zingiberaceae แล้ว เช่น Jalil (2018) พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 800 μM ลงในอาหารเหลวสูตร MS เป็นเวลา 15 วัน ส่งผลให้รากกระเทียมที่มีปริมาณสาร zerumbone ที่เป็นสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 42,777 $\mu\text{g/g}$ DW ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงเหง้าขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติม MeJA ความเข้มข้น 10 μM เพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ พบว่า การสร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างจากสิ่งทดลองควบคุมที่ไม่เติมสาร (Cousins et al., 2007) อย่างไรก็ตามยังไม่มี

ตารางที่ 2.3 ชนิด และความเข้มข้นของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารทุติยภูมิของพืชชนิดต่างๆ

ชนิดพืช	ชิ้นส่วนพืช	ชนิด และความเข้มข้น ของสารกระตุ้นที่ใช้	สารทุติยภูมิที่ศึกษา	ชนิด และความเข้มข้น ของสารกระตุ้นที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
<i>Zingiber zerumbet</i>	ราก	0 - 800 μ M MeJA	สาร zerumbone	800 μ M MeJA	Jalil (2018)
<i>Salvia virgate</i>	ยอด	0 – 44.48 ppm MeJA	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์	11.2 ppm MeJA	Dowom et al. (2017)
<i>Zingiber officinale</i>	แคลลัส	0-100 mg/l SA	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	50 mg/l SA	Ali et al. (2018)
<i>Rumex vesicarius</i>	แคลลัส	0 - 250 μ M SA	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์	50 μ M SA	Gadzovska et al. (2013)
<i>Eleutherococcus koreanum</i>	ราก	0 - 400 μ mol/L MeJA และ SA	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์	50 และ 100 μ mol/L MeJA	Lee et al. (2015)
<i>Scrophularia kakudensis</i>	เซลล์ แขวนลอย	0 - 200 μ M MeJA และ SA	สารฟลาโวนอยด์ และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	200 μ M MeJA	Manivannan et al. (2016)
<i>Thevetia peruviana</i>	เซลล์ แขวนลอย	0 - 5 μ M MeJA และ 0 – 600 μ M SA	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	3 μ M MeJA	Mendoza et al. (2018)

รายงานการศึกษาการใช้ MeJA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ



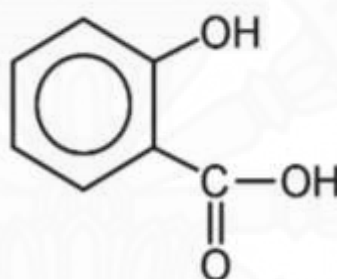
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ methyl jasmonate
ที่มา: Cesari et al. (2014)

2.4.1.2 Salicylic acid (SA)

SA เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่พืชสามารถสร้างเองได้ในสภาพธรรมชาติ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_6H_4(OH)COOH$ (ภาพที่ 2.6) จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic phytohormone) ได้มีการนำ SA มาใช้เพื่อเป็นฮอร์โมนในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การพัฒนาของพืช การสังเคราะห์แสง การคายน้ำ ชักน้ำให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของใบ และโครงสร้างของคลอโรพลาสต์ เนื่องจาก SA มีหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นการทำงานของกรดอะมิโนและโปรตีน ควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ สามารถส่งสัญญาณการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนให้ต่อต้านการรบกวนของเชื้อโรค (จรัสแท้, 2553; Bailly, 2004) เมื่อส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชถูกเชื้อโรครบกวน หรือเข้าทำลาย พืชก็จะเกิดการต้านทานในส่วนอื่นๆ ด้วย โดยอาศัยวิธีการป้องกันตัวเองของพืชแบบ systemic acquired resistance (SAR) โดยสัญญาณสามารถเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณที่ใกล้เคียง SA จะถูกเปลี่ยนเป็น volatile ester และ methyl salicylate (Taiz and Zeiger, 2002) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งปฏิกิริยาถูกใช้ในการแย่งจับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันได้ (จรัสแท้, 2553; Bailly, 2004)

มีรายงานการใช้ SA เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของพืชวงศ์ Zingiberaceae และพืชประเภทเหง้าด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว เช่น Ali et al. (2018) ที่เพาะเลี้ยง callus ของชิงบอนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับการเติม SA

ความเข้มข้น 50 mg/l เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ 34% และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น 30% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม หรือ Raomai et al. (2015) ที่ศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิของ *Paris polyphylla* Sm. โดยเพาะเลี้ยง mini-rhizome ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l และ SA ความเข้มข้น 0-200 mg/l นาน 0-60 วัน พบว่า mini-rhizome ที่ได้รับ SA ความเข้มข้น 50 mg/l นาน 30 วัน สามารถกระตุ้นให้สร้างสาร polyphyllin I polyphyllin II polyphyllin VII และ total saponin เท่ากับ 7.92 ± 0.35 6.20 ± 0.56 31.79 ± 1.74 และ 45.91 ± 2.58 mg/g DW ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมที่มีปริมาณสารดังกล่าว เท่ากับ 5.79 ± 0.43 3.06 ± 0.16 26.84 ± 0.33 และ 35.68 ± 0.91 mg/g DW ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดกระชาย ร่วมกับการเติม SA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ salicylic acid
ที่มา: Madan and Levitt (2014)

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 พืชทดลอง

นำเหง้ากระชายที่ซื้อจากตลาดไทมาวางในตะกร้าภายในห้องปฏิบัติการรดน้ำ 1 ครั้ง/วัน เพื่อทำให้งอก นำส่วนยอดที่งอกไปฟอกกำจัดเชื้อ และนำเหง้าที่งอกบางส่วนไปปลูกในโรงเรือนทดลองของสาขาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี เพื่อใช้ทดลองต่อไป

3.2 อาหารเพาะเลี้ยงและสภาพการเพาะเลี้ยง

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติมน้ำตาลทราย 30 g/l ผงวุ้น 8 g/l และสารควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งชนิดและความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับ การทดลอง ปรับค่า pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6 ถึง 5.8 ด้วย 1 N NaOH ก่อนนำไปนึ่งกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

สภาพการเพาะเลี้ยงวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 °C ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 3000 lux ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ และเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาตามที่กำหนดในการทดลอง

3.3 การฟอกกำจัดเชื้อ

ตัดชิ้นส่วนยอดกระชายที่พัฒนาจากเหง้าขนาด 2.0 ถึง 4.0 cm (ภาพที่ 3.1) ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและน้ำประปา 2 ถึง 3 ครั้ง แล้วพ่นชิ้นส่วนยอดด้วยแอลกอฮอล์ 70% ทิ้งไว้ 1 ถึง 2 นาที จากนั้นฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนยอดด้วยสารละลายคลอรีน (clorox®, sodium hypochlorite 6%) ความเข้มข้น 20% (v/v) และ 10% (v/v) ที่เติม Tween 20 ประมาณ 1 ถึง 2 หยด แต่ละความเข้มข้นฟอกนาน 10 นาที เมื่อครบกำหนดระยะเวลาฟอกกำจัดเชื้อ ล้างชิ้นส่วนยอดด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งกำจัดเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อส่วนที่ถูกทำลายออก และเพาะชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ตามวิธีของ

Yusuf et al. (2011) เมื่อตาข้างพัฒนาไปเป็นยอด ทำการย้ายเลี้ยง (subculture) ยอดทุกๆ 4 สัปดาห์บนอาหารสูตรเดิม จนกระทั่งมีจำนวนยอดมากเพียงพอต่อการทดลองที่ 3.5



ภาพที่ 3.1 ยอดกระชายที่พัฒนาจากเหง้า

3.4 การเตรียมสารละลาย MeJA และ SA

เตรียมสารละลาย MeJA ความเข้มข้น เท่ากับ 4.4583 mM โดยปิเปตสารละลาย MeJA ปริมาตร 97 μ L ละลายด้วย absolute ethanol และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย เท่ากับ 100 ml ส่วนการเตรียมสารละลาย SA ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.1 M โดยชั่ง SA 1.3812 g ละลายด้วย absolute ethanol จนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร เท่ากับ 100 ml

3.5 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนยอด

เพาะเลี้ยงยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ขนาด 1 cm บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 8.87 และ 13.32 μ M (1 2 และ 3 mg/l) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 และ 2.69 μ M (0.5 mg/l) โดยมีอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสิ่งที่ทดลองควบคุม (ตารางที่ 3.1) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) รวมมีสิ่งทดลองทั้งหมด 7 สูตรอาหาร แต่ละสูตรมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 10 ขวด (1 ขวดมี 1 ยอด) เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเกิดยอด (%) จำนวนยอด และความยาวยอด (cm)

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนยอดกระชาย

สูตรอาหารที่	BA (μM)	NAA (μM)
1	-	-
2	4.44	0
3	4.44	2.69
4	8.87	0
5	8.87	2.69
6	13.32	0
7	13.32	2.69

3.6 ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

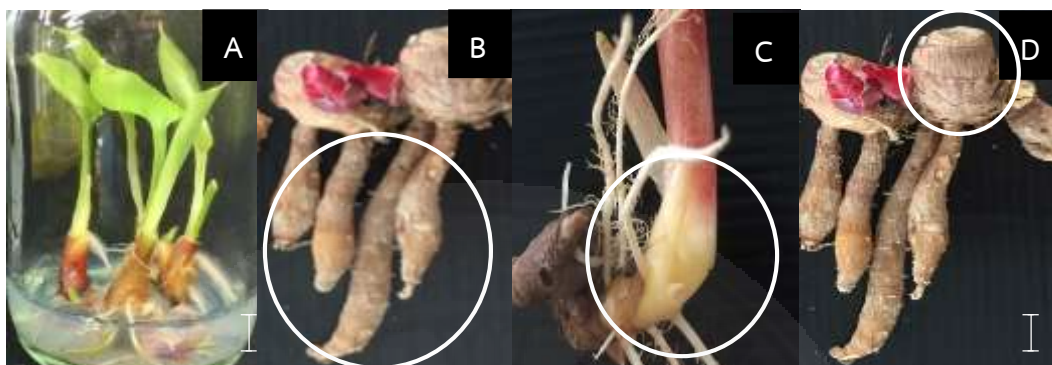
นำยอดกระชายที่พัฒนามาบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจาก 3.5 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอล ไตรโอบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity เปรียบเทียบกับเหง้าอ่อน รากสะสมอาหาร และเหง้าแก่ โดยเหง้าอ่อนที่ปลูกในสภาพธรรมชาติเก็บ 6 เดือนหลังปลูก รากสะสมอาหาร และเหง้าแก่ในสภาพธรรมชาติเก็บ 8 เดือนหลังปลูก (ภาพที่ 3.2) วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ โดยวิธีการวิเคราะห์หมีดังนี้

นำตัวอย่างพืชที่ใช้ทดสอบมาชั่งน้ำหนักสด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างที่มีน้ำหนักแห้งอย่างน้อย 2 g มาสกัดตามวิธีของ Jaiarree (2010) ด้วย ethanol ความเข้มข้น 95% ใช้ตัวอย่างแห้ง และ ethanol อัตรา 1:3 โดยปริมาตร ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งสกัดนาน 3 วัน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาด 11 μm นำสารสกัดที่ได้มาระเหยใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จนกว่าสารสกัดตัวอย่างจะมีน้ำหนักคงที่ คำนวณหา % น้ำหนักแห้ง และ % yield จากสมการ

$$\% \text{ น้ำหนักแห้ง} = (\text{น้ำหนักแห้ง} / \text{น้ำหนักสด}) \times 100$$

$$\% \text{ yield} = (\text{น้ำหนักสารสกัด} / \text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้หนัก}) \times 100$$

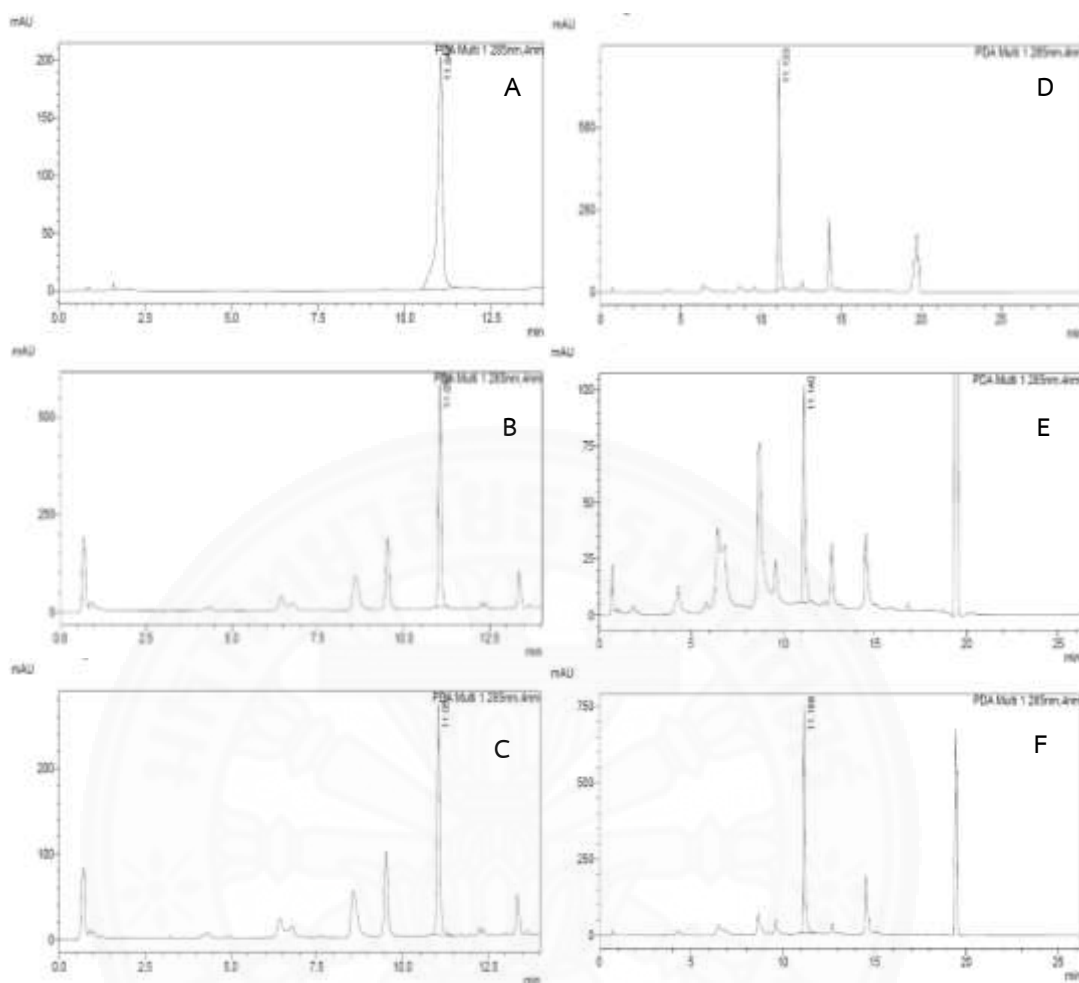
นำสารสกัดของสิ่งทดลองข้างต้นที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารฟิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้



ภาพที่ 3.2 (A) ยอดกระชายที่พัฒนามาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น $8.87 \mu\text{M}$ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น $2.69 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์, (B) รากสะสมอาหาร, (C) เหง้าอ่อน และ (D) เหง้าแก่ของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (scale bar = 0.5 cm)

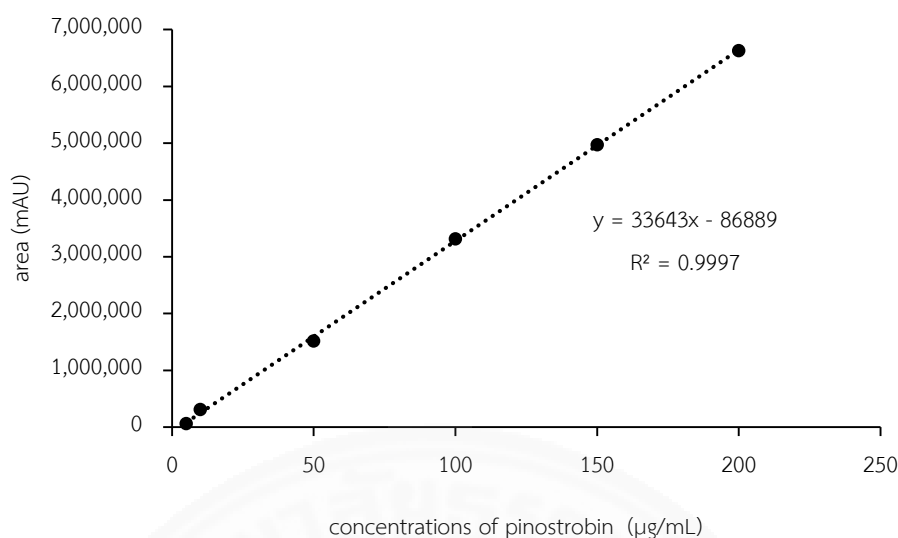
3.6.1 ปริมาณสารฟิโนสโตรบิน

วิเคราะห์ปริมาณสารฟิโนสโตรบิน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Yusuf et al. (2013) นำสารสกัดมาละลายด้วย absolute ethanol ในอัตราส่วนของสารสกัด : absolute ethanol คือ 1 mg : 1 ml และนำไป sonicate นาน 10 นาที ส่วนสารละลายมาตรฐานฟิโนสโตรบิน เตรียมโดยชั่งสารฟิโนสโตรบิน 1 mg ละลายด้วย ethyl acetate 1 ml จากนั้นปิเปตสารละลายฟิโนสโตรบินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 150 100 50 10 และ $5 \mu\text{g/ml}$ นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานฟิโนสโตรบินทุกความเข้มข้นกรองผ่าน filter membrane ขนาด $0.22 \mu\text{m}$ ใส่ลงในขวด vial จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารฟิโนสโตรบินโดยใช้คอลัมน์ชนิด Nova-Pak C18 ความยาว $150 \times 3.9 \text{ mm I.D.}$, $4 \mu\text{m}$ พร้อมกับ guard column ด้วยเครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น Nexera LC-30 A ที่ความยาวคลื่น 285 nm (ภาพที่ 3.3) ระบบที่ใช้คือ gradient elution mode โดยมี mobile phase คือ 0.1% phosphoric acid (A) และ acetonitrile (B) อัตราส่วน 0.5 min, 80% A, 20% B; 4.5 min, 65% A, 35% B; 5.0 min, 40% A, 60% B; 4.0 min, 100% B อัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 1.5 ml/min ปริมาตรสารที่ฉีดเข้าระบบเท่ากับ $20 \mu\text{l}$ แต่ละตัวอย่างฉีดนาน 14 นาที คำนวณหาปริมาณสารฟิโนสโตรบิน



ภาพที่ 3.3 Chromatogram สารพินอสโตรบินของ (A) พินอสโตรบินมาตรฐาน , (B) ยอดกระชายที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้น, (C) ยอดกระชายที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 200 μ M MeJA, (D) รากสะสมอาหาร, (E) เหง้าอ่อน และ (F) เหง้าแก่ของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

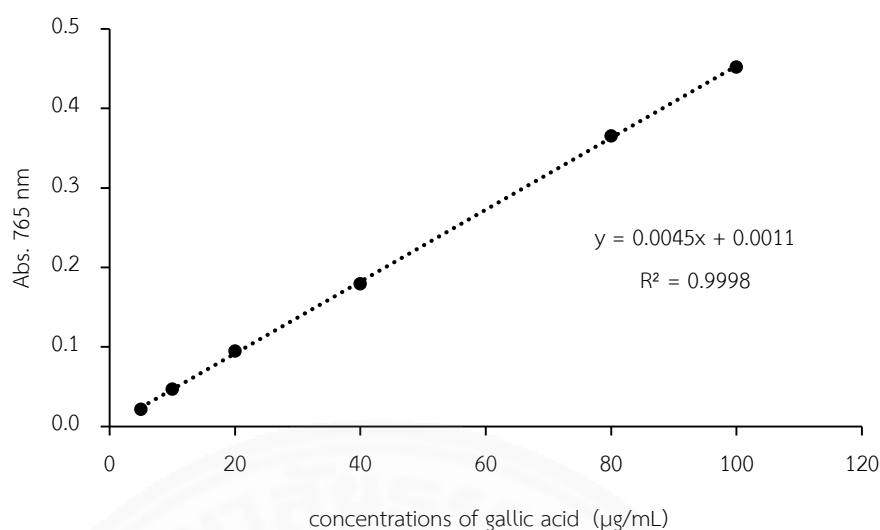
ด้วยโปรแกรม lab solution โดยนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area) ของสารละลายมาตรฐานพินอสโตรบิน ความเข้มข้นต่างๆ มากำหนดจุดในกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) และค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานพินอสโตรบิน (แกน y) เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ของสารตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานสารพินอสโตรบิน (คำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างแทนที่ค่า y ในสมการจากภาพที่ 3.4) โดยมีหน่วยเป็น mg/g dry extract



ภาพที่ 3.4 กราฟมาตรฐานของ pinostrobin

3.6.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

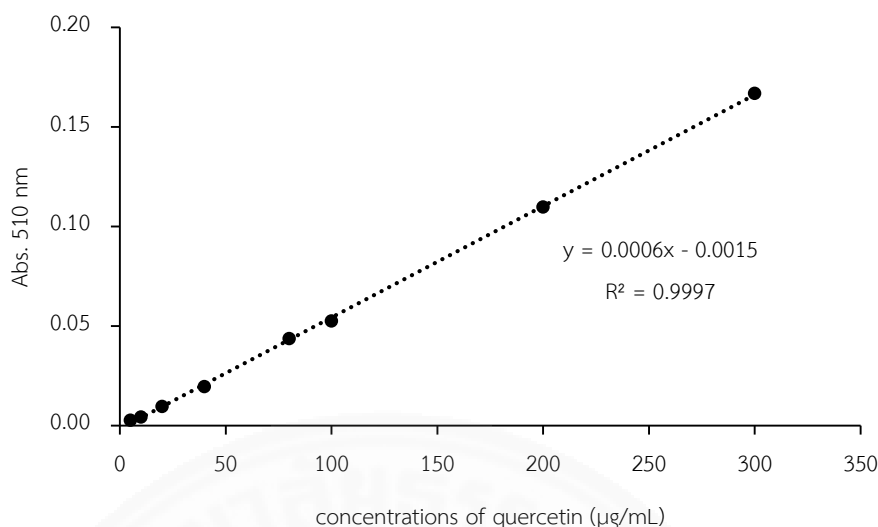
วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Folin and Ciocalteu (1927) โดยละลายสารสกัด 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ปริมาตร 1 ml แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 µl ลงใน 96 well-microplate จากนั้นเจือจาง 2 M Folin - Ciocalteu's reagent 10 เท่า และเติมลง microplate ทุกหลุม ปริมาตร 100 µl ตามด้วยเติมสารละลาย 7.5% w/v Na₂CO₃ ปริมาตร 80 µl ทำซ้ำ 4 หลุม microplate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 nm โดย blank ของสารละลายตัวอย่าง คือ absolute ethanol คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง โดยนำค่า OD ของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ มากำหนดจุดในกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) และค่า OD ของ gallic acid (แกน y) เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ของสารตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (คำนวณค่า OD ของสารตัวอย่าง แทนที่ค่า y ในสมการจากภาพที่ 3.5) โดยมีหน่วยเป็น mg ของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อสารสกัดขึ้น ethanol 1 g (mg GAE/g dry extract)



ภาพที่ 3.5 กราฟมาตรฐานของ gallic acid

3.6.3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Zhu et al. (2010) โดยนำสารสกัดกระชาย 1 mg ละลายใน absolute ethanol ความเข้มข้น 99.9% ปริมาตร 1 ml แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายปริมาตร 500 μ l ลงในหลอดทดลอง เติม 5% w/v NaNO_2 ปริมาตร 75 μ l และเติม 10 % w/v AlCl_3 ปริมาตร 150 μ l ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติม 1M NaOH ปริมาตร 500 μ l และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 275 μ l ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาปิเปตสารละลายปริมาตร 200 μ l ลงใน 96 well-microplate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้ absolute ethanol ปริมาตร 500 μ l และน้ำกลั่น ปริมาตร 500 μ l ร่วมกับ 5% NaNO_2 ปริมาตร 75 μ l 10% AlCl_3 ปริมาตร 150 μ l 1 M NaOH ปริมาตร 500 μ l และน้ำกลั่น ปริมาตร 275 μ l เป็น blank ethanol และ blank น้ำกลั่นของสารละลายตัวอย่าง ตามลำดับ คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารละลายตัวอย่าง โดยนำค่า OD ของ quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มากำหนดจุดในกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) และค่า OD ของ quercetin (แกน y) เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ของสารตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ quercetin (คำนวณค่า OD ของสารตัวอย่าง แทนที่ค่า y ในสมการจากภาพที่ 3.6) โดยมีหน่วยเป็น mg ของ quercetin equivalents (QE) ต่อสารสกัดชั้น ethanol 1 g (mg QE/g DW)



ภาพที่ 3.6 กราฟมาตรฐานของ quercetin

3.6.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยดัดแปลงจากวิธีของ Yamasaki et al. (1994) โดยนำสารสกัดกระชาย 1 mg ละลายใน absolute ethanol ความเข้มข้น 99.9% ปริมาตร 1 ml แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 100 50 และ 25 µg/ml ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µl ลงใน 96 well-microplate และเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ปริมาตร 100 µl ทำซ้ำ 3 หลุม microplate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 520 nm โดย blank ของสารละลายตัวอย่าง คือ สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µl ที่เติม absolute ethanol ปริมาตร 100 µl และสิ่งทดลองควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาตร 100 µl ร่วมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µl และใช้ BHT เป็นสารแอนติออกซิแดนท์มาตรฐาน (positive สิ่งทดลองควบคุม) คำนวณหา % การยับยั้งอนุมูล DPPH จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{\text{OD สิ่งทดลองควบคุม} - \text{OD sample}}{\text{OD สิ่งทดลองควบคุม}} \right] \times 100$$

เมื่อ OD สิ่งทดลองควบคุม = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

OD สิ่งทดลองควบคุม = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

คำนวณค่า EC_{50} (ค่าความสามารถของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ที่ 50%)

จากผลการลอการิทึมเปรียบเทียบค่าความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน (%) โดยนำค่า % inhibition ที่มีความเข้มข้นต่างๆ มากำหนดจุดในกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัด (แกน X) และ % inhibition (แกน Y)

3.7 ผลของสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

3.7.1 ผลของ MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM นาน 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μM และ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μM โดยมีอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารกระตุ้นเป็นสิ่งที่ทดลองควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 สิ่งทดลอง ให้แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ บันทึกน้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง นำน้ำหนักสดที่ได้มาคำนวณค่า Growth index (GI) ตามรายงานของ Abeda et al. (2014) จากสมการ

$$GI = \frac{\text{น้ำหนักสดหลังการเพาะเลี้ยง}}{\text{น้ำหนักสดก่อนการเพาะเลี้ยง}}$$

จากนั้นนำยอดไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแห้งหลังเพาะเลี้ยง ทำการสกัดสาร คำนวณ % yield และวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เช่นเดียวกับ 3.6

3.7.2 ผลของ MeJA ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 200 μM ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดกระชายที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μM โดยมีอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมสารกระตุ้นเป็นสิ่งที่ทดลองควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ บันทึกน้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง คำนวณค่า GI

เช่นเดียวกับ 3.7.1 และบันทึกน้ำหนักแห้งหลังเพาะเลี้ยง ทำการสกัดสาร คำนวณ % yield วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เช่นเดียวกับ 3.6

3.8 ผลของระยะเวลาในการได้รับ MeJA ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μ M (จาก 3.7.2) เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ โดยมีอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารกระตุ้นเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาเท่ากันเป็นสิ่งที่ทดลองควบคุม วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ บันทึกน้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง คำนวณค่า GI เช่นเดียวกับ 3.7.1 และบันทึกน้ำหนักแห้งหลังเพาะเลี้ยง ทำการสกัดสาร คำนวณ % yield และวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เช่นเดียวกับ 3.6

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลอง เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD (honestly significant difference) test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอล สารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยวิธี Pearson's Correlation Coefficients

3.10 สถานที่ทำการทดลอง

- ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
- ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
- ห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

3.11 ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มดำเนินการทดลองตั้งแต่ สิงหาคม 2562 ถึง กันยายน 2563 เป็นระยะเวลา 1 ปี 1 เดือน





ภาพที่ 3.7 แผนการศึกษา

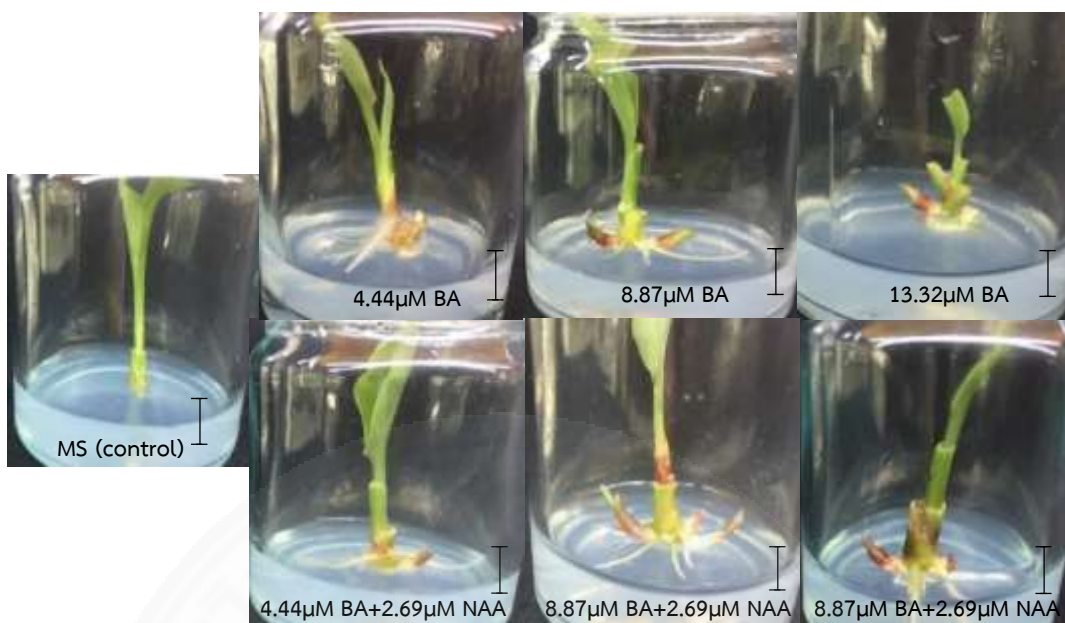
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

จากการทดลอง พบว่า ยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ จำนวนยอดที่พัฒนา และความยาวยอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 และ 13.32 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM มีการเกิดยอดใหม่ เท่ากับ 93.33 ± 5.77 ถึง 100 ± 0.00 % ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม (33.33 ± 5.77 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.2 A และตารางผนวกที่ ข) นอกจากนี้จำนวนยอดใหม่ที่พัฒนาสูงสุด เท่ากับ 2.63 ± 0.38 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนยอดที่พัฒนามาจากอาหารสูตรอื่นๆ ที่มีจำนวนยอดเท่ากับ 1.00 ± 0.00 ถึง 1.97 ± 0.06 ยอด โดยยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีจำนวนยอดใหม่น้อยที่สุดเท่ากับ 1.00 ± 0.00 ยอด (ภาพที่ 4.1 B) สำหรับความยาวยอด พบว่า ยอดที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM มีความยาวมากที่สุด เท่ากับ 1.55 ± 0.11 cm ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความยาวของยอดที่พัฒนามาจากอาหารอื่นๆ (0.71 ± 0.07 ถึง 1.12 ± 0.34 cm) (ภาพที่ 4.2 C)

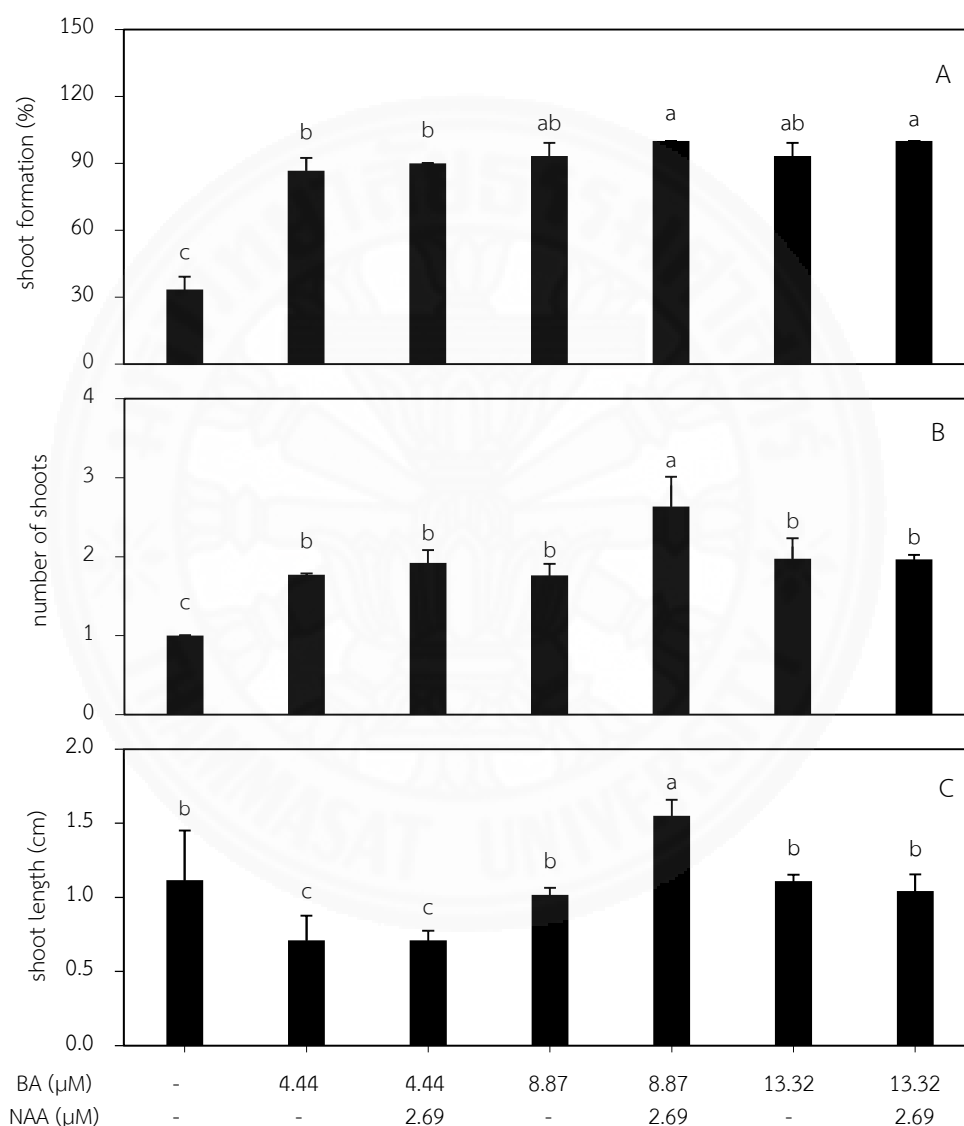
จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM หรือกล่าวได้ว่าการเพิ่มจำนวนยอดของกระชายจำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งในกลุ่มไซโทไคนิน (BA) และออกซิน (NAA) ลงในอาหารเพาะเลี้ยง โดย BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินมีผลโดยตรงต่อการชักนำให้เกิดยอด มีบทบาทกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและตาข้าง รวมถึงเกิดการพัฒนารูปร่างของตาพิเศษ (adventitious bud) (คำณูณ, 2542) ส่วน NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินมีบทบาทในการควบคุมการแบ่งเซลล์ การยึดตัวและการขยายขนาดของเซลล์ อีกทั้งช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช (ศิริพงษ์, 2546) ซึ่งรังสฤษฎ์ (2545) ได้กล่าวว่าการชักนำและเพิ่มจำนวนยอดของพืชแต่ละชนิดอาจใช้



ภาพที่ 4.1 ยอดกระชายที่พัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 8.87 และ 13.32 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 0.5 cm)

ไซโทไคนินเพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับออกซิน โดยให้สัดส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินสูงจะทำให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีการแบ่งเซลล์ และพัฒนาไปเป็นลำต้น ตา ยอด และใบ ส่งผลให้มีจำนวนยอดและความยาวยอดเพิ่มขึ้นได้ แต่หากสัดส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินต่ำ ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงจะมีการแบ่งเซลล์ และพัฒนาไปเป็นรากได้ดีกว่า จากผลการทดลองยังพบอีกว่า การใช้ BA ความเข้มข้นต่ำ (4.44 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA) หรือความเข้มข้นสูง (13.32 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA) มีจำนวนยอดกระชายที่พัฒนาน้อย และมีความยาวยอดสั้น ทั้งนี้เนื่องจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่ำอาจไม่เพียงพอต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ แต่หากใช้ความเข้มข้นมากเกินไปอาจยับยั้งการเพิ่มจำนวนยอด และการเจริญเติบโตของพืชที่เพาะเลี้ยงได้ โดยพืชแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (รังสฤษฎี, 2545) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของการเพาะเลี้ยงยอดกระชาย และพืชในวงศ์ Zingiberaceae ชนิดอื่นๆ ที่พบว่า การใช้ BA ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอดได้ดี รวมถึงทำให้ยอดมีความยาวเพิ่มขึ้น ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อ BA และ NAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เช่น การเพาะเลี้ยงยอดขิงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 mg/l พบว่า มีการพัฒนาของยอดใหม่ 6.14 ± 0.91 ยอด และมีความยาวยอดสูงสุด

1.69±0.17 cm (David et al., 2016) นอกจากนี้ มนต์ิณี และคณะ (2559) พบว่า ยอดกระชายดำที่พัฒนามานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.3 mg/l มีจำนวนยอดใหม่ที่พัฒนาเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5 ยอด และ Yusuf et al. (2011) พบว่า ยอดกระชายดำที่พัฒนามานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l มีจำนวนยอดใหม่พัฒนาสูงสุด เท่ากับ 4.90±0.10 ยอด

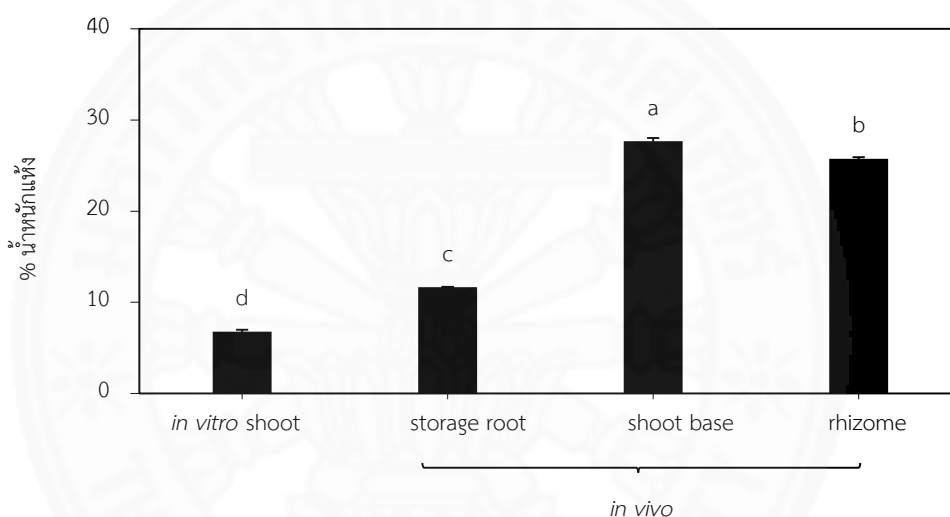


ภาพที่ 4.2 (A) การเกิดยอด (%) (B) จำนวนยอดที่พัฒนา และ (C) ความยาวยอด (cm) ของยอดกระชายที่พัฒนามานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 8.87 และ 13.32 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.2 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

4.2.1 % น้ำหนักแห้ง

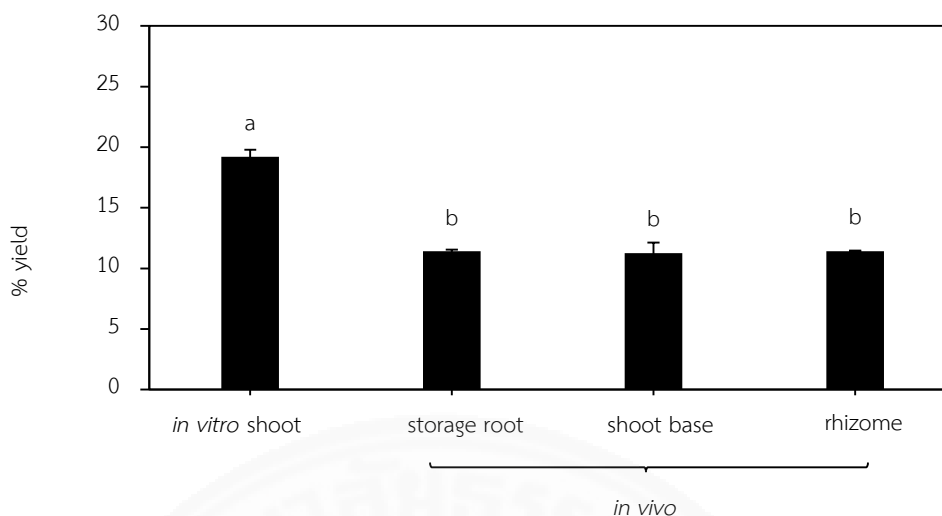
ยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมี % น้ำหนักแห้ง เท่ากับ $6.79 \pm 0.21\%$ ซึ่งน้อยกว่า % น้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเหง้าอ่อนที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมี % น้ำหนักแห้งสูงสุด เท่ากับ $27.67 \pm 0.36\%$ รองลงมาคือ เหง้าแก่ และรากสะสมอาหาร ที่มี % น้ำหนักแห้ง เท่ากับ 25.75 ± 0.16 และ $11.66 \pm 0.04\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3 และตารางผนวกที่ ค.1)



ภาพที่ 4.3 % น้ำหนักแห้งของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

4.2.2 % yield

จากการนำสกัดสารของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ มาคำนวณหา % yield พบว่า รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมี % yield (11.27 ± 0.86 ถึง $11.44 \pm 0.04\%$) น้อยกว่ายอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ($19.20 \pm 0.60\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.4 และตารางผนวกที่ ค.1)



ภาพที่ 4.4 % yield ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และ เหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

4.2.3 ปริมาณสารฟีนอลิก

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพ ปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น $8.87 \mu\text{M}$ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น $2.69 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับรากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพ ธรรมชาติ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.5 A และตารางผนวกที่ ค.2) โดยยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารฟีนอลิก ($5.15 \pm 0.04 \text{ mg/g dry extract}$) น้อยกว่าชิ้นส่วนกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเหง้า แก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติดีปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ $151.65 \pm 0.07 \text{ mg/g dry extract}$ รองลงมาคือ รากสะสมอาหาร และเหง้าอ่อน (139.59 ± 0.25 และ $23.70 \pm 0.22 \text{ mg/g dry extract}$ ตามลำดับ)

4.2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการทดลอง พบว่า ยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชิ้นส่วนพืชที่ เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (ภาพที่ 4.5 B และตารางผนวกที่ ค.2) โดยเหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่ เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติดีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (168.98 ± 6.20 และ $172.21 \pm 8.56 \text{ mg GAE/g dry extract}$ ตามลำดับ) สูงกว่ารากสะสมอาหารที่เจริญเติบโตในสภาพ ธรรมชาติดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($135.35 \pm 4.52 \text{ mg GAE/g dry extract}$) ในขณะที่ยอดกระชายที่

พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยสุด (35.10 ± 1.35 mg GAE/g dry extract)

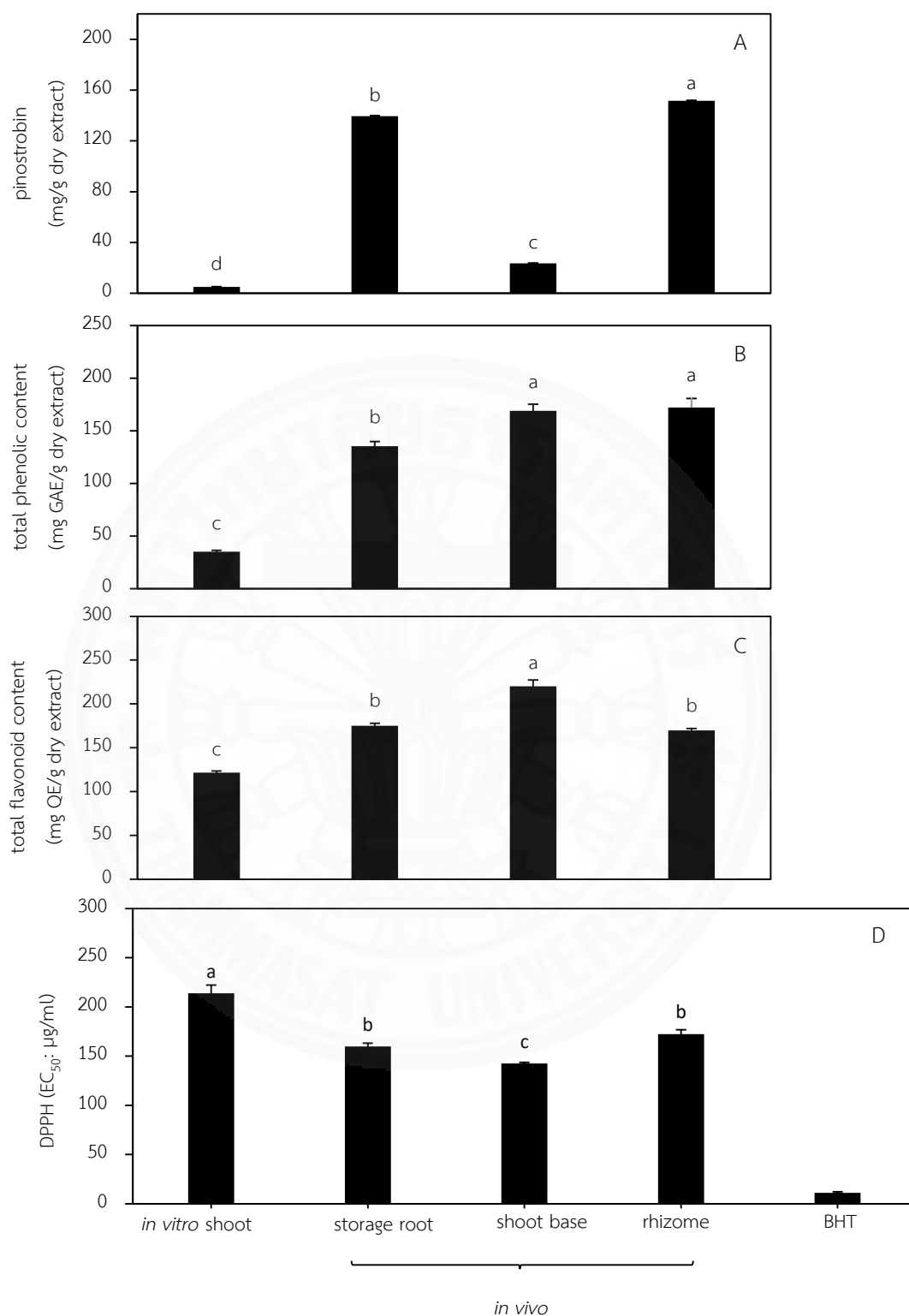
4.2.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

ยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.5 C และตารางผนวกที่ ค.2) โดยยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (121.56 ± 1.84 mg QE/g dry extract) น้อยที่สุด ในขณะที่เหง้าอ่อนกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด เท่ากับ 220.03 ± 7.32 mg QE/g dry extract ส่วนรากสะสมอาหาร และเหง้าแก่ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 174.98 ± 3.01 และ 169.65 ± 2.43 mg QE/g dry extract ตามลำดับ

4.2.6ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ พบว่า ยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 213.76 ± 8.41 μ g/ml ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเหง้าอ่อนกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด (EC_{50} เท่ากับ 142.57 ± 1.15 μ g/ml) รองลงมาคือ รากสะสมอาหาร (EC_{50} เท่ากับ 159.71 ± 3.42 μ g/ml) และเหง้าแก่ (EC_{50} เท่ากับ 172.35 ± 4.33 μ g/ml) (ภาพที่ 4.5 D และตารางผนวกที่ ค.2)

จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่ายอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อสามารถสร้างและสะสมสารฟีนอลิโตรีบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เหมือนกับชิ้นส่วนอื่นๆ ได้แก่ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะทางพันธุกรรม และสามารถเกิดกระบวนการต่างๆ รวมถึงกระบวนการชีวสังเคราะห์ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นต้นพืชที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อจึงสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เหมือนกับต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (วราภรณ์, 2551; Banthorpe, 1994) แต่ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ การที่เหง้าแก่ เหง้าอ่อนและรากสะสมอาหารมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณที่สูง เนื่องจากกระชายเป็นพืชสมุนไพรที่มีลำต้นใต้ดิน สะสมอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเหง้า โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจจะสังเคราะห์จากใบหรือลำต้นเหนือดิน แล้วนำไปสะสมในเหง้าที่ใช้ระยะเวลาตั้งแต่ปลูก



ภาพที่ 4.5 (A) ปริมาณสารพินอสโตรบิน (B) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และ (D)ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

จนเก็บเกี่ยวนาน 7 ถึง 8 เดือน ดังที่ได้มีรายงานในพืชสกุล *Dioscorea* ที่พบว่าสาร diosgenin จะสังเคราะห์ในส่วนของลำต้นเหนือดินแล้วนำไปสะสมในส่วนของลำต้นใต้ดิน (Rojas et al., 1999) ส่วนยอดกระชายเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ถึงแม้จะมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อย แต่ก็แสดงให้เห็นว่า ยอด เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ในสภาพปลอดเชื้อสามารถสังเคราะห์สารเหล่านี้ได้ และจากการที่ยังไม่มีการพัฒนาของเหง้าขนาดเล็กจึงสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ไว้ที่ยอด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดหรือเนื้อเยื่อที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ เปรียบเทียบกับปริมาณสารดังกล่าวของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น Yusuf et al. (2013) ที่พบว่า แคลลัส และเซลล์แขวนลอยมีปริมาณสารฟิโนสโตรบิน เท่ากับ 96.30 ± 0.00 และ 3.15 ± 0.34 $\mu\text{g/g}$ DW ตามลำดับ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 120.61 ± 0.01 และ 4.91 ± 0.57 mg QE/g ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณสารฟิโนสโตรบิน เท่ากับ $8,220.72 \pm 45.66$ $\mu\text{g/g}$ DW และ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ $12,975.52 \pm 71.78$ mg QE/g Ali et al. (2018) พบว่า แคลลัสซึ่งที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 33.6 ± 0.07 mg gallic acid/g และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ค่า EC_{50} เท่ากับ $1,265.49 \pm 59.9$ $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งน้อยกว่าเหง้าซึ่งที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (60.34 ± 0.43 mg gallic acid/g และ ค่า EC_{50} 8.29 ± 1.73 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) นอกจากนี้ Esmaeili et al. (2016) พบว่า แคลลัส และต้นของ *Asparagus officinalis* ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (17.55 และ 15.36 $\text{mg GAE/g dry extracts}$) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (10.15 และ 7.20 $\mu\text{g RE/g dry extracts}$) และมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (20 ถึง 40%) น้อยกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 21.15 $\text{mg GAE/g dry extracts}$ และ 11.35 $\mu\text{g RE/g dry extracts}$ ตามลำดับ รวมถึงมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าเท่ากับ 68% และ Jirakiattikul et al. (2016) พบว่า ยอดของหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica*) ที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (92.29 $\text{mg GAE/g dry extract}$) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ค่า EC_{50} เท่ากับ 51.46 $\mu\text{g/ml}$) น้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเหง้าหัวข้าวเย็นอายุมากกว่า 1 ปีที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ (321.48 $\text{mg GAE/g dry extract}$ และ ค่า EC_{50} เท่ากับ 9.10 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามมีพืชอีกหลายชนิดที่พบว่าเนื้อเยื่อ เซลล์ หรืออวัยวะที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าชิ้นส่วนพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ เช่น ยอดของ *Cucumis anguria* ที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (382.72 $\mu\text{g/g}$) สารฟลาโวนอยด์ ($2,277.23$ $\mu\text{g/g}$) และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (77.50%) มากกว่าสารสกัดจากเมล็ดของต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 353.59 $\mu\text{g/g}$ 2153.36 $\mu\text{g/g}$ และ 62.00% ตามลำดับ

(Thiruvengadam and Chung, 2015) เช่นเดียวกับ Baskaran et al. (2014) ที่พบว่า ยอดของ *Coleonema pulchellum* ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (12.52 ± 0.30 mg GAE/g DW) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (4.13 ± 0.11 mg CE/g DW) และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ($45.8 \pm 2.16\%$) สูงกว่าใบของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (6.76 ± 0.56 mg GAE/g DW 2.07 ± 0.05 mg CE/g DW และ $29.8 \pm 3.21\%$ ตามลำดับ) และเหง้าของ *Acorus calamus* ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (71.60 ± 0.02 mg GAE/g) และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (42.34 ± 0.06 mg QE/g) สูงกว่าเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 62.15 ± 0.03 mg GAE/g และ 27.41 ± 0.04 mg QE/g ตามลำดับ (Deepalakshmi et al., 2016)

จากการทดลองนี้ยังพบว่า เหง้าแก่ของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟิโนสโตรบินสูงกว่ารากสะสมอาหาร และเหง้าอ่อน ซึ่งไม่สอดคล้องกับ Tan et al. (2015) ที่รายงานถึงปริมาณสารฟิโนสโตรบินของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ โดยพบว่า เหง้าอ่อนมีปริมาณสารฟิโนสโตรบินสูงสุด รองลงมา คือ รากสะสมอาหาร และ เหง้าแก่ จากรายงานของ Tan et al. (2015) นี้ไม่ได้ระบุอายุของกระชายที่นำมาศึกษา ซึ่ง Banthorpe (1994) ได้กล่าวไว้ว่า อายุ และระยะการเจริญเติบโตของพืชมีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของพืช โดยพืชยังอายุน้อย (juvenile phase) จะมีการสังเคราะห์ และสะสมสารทุติยภูมิบางกลุ่มในปริมาณมาก เมื่อพืชเข้าสู่ช่วงระยะเจริญเติบโตเต็มที่ (mature phase) อาจมีการสร้าง และสะสมสารทุติยภูมิบางชนิดในปริมาณมาก รวมถึงปริมาณสารที่ผลิตได้อาจไม่เท่ากันในแต่ละอายุ และระยะการเจริญเติบโต นอกจากนี้ ต้นพืชที่เจริญเติบโตในสภาพพื้นที่ และภูมิอากาศที่แตกต่างกันอาจมีการสร้าง และสะสมสารทุติยภูมิหรือชนิดของสารทุติยภูมิไม่เหมือนกัน สารทุติยภูมิที่ผลิตจึงได้อาจมีปริมาณไม่เท่ากัน จากผลการทดลองนี้ถึงแม้ว่าสารฟิโนสโตรบินจะเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยเหง้าอ่อนมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด แต่กลับมีปริมาณสารฟิโนสโตรบินน้อย ทั้งนี้เนื่องจากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ของกระชายมีหลายชนิด ดังที่ Tan et al. (2015) ได้รายงานไว้ว่า สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในกระชาย ได้แก่ alpinetin, pinocembrin, pinostrobin, 4-Hydroxypanduratin A, panduratin A, pinocembrin chalcone, cardamonin และ pinostrobin chalcone โดยปริมาณสารฟลาโวนอยด์เหล่านี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละส่วนของกระชาย ได้แก่ เหง้าอ่อน รากสะสมอาหาร เหง้าแก่ ลำต้นเทียมที่มีสีแดง ก้าน และใบ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในช่วงเหง้าอ่อน กระชายจะมีการสร้างและสะสมสารฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ ไว้ในปริมาณมากแต่มีฟิโนสโตรบินในปริมาณที่ไม่สูงมากนัก และเมื่อเหง้าอ่อนมีการเจริญเติบโตเป็นเหง้าแก่ก็จะมีสร้างและสะสมสารฟิโนสโตรบินในปริมาณที่สูงขึ้นโดยที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดลดลงเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ และส่วนต่างๆ ในสภาพ

ธรรมชาติมีฤทธิ์ไม่ดีมากนัก โดยมีค่า EC_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอนติออกซิเดนซ์มาตรฐาน (BHT) ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 11.16 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Thirapanithan et al. (2015) ที่พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเหง้ากระชายที่สกัดด้วย ethanol ความเข้มข้น 95% มีค่า EC_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/ml}$ เช่นเดียวกับ Jitvaropas et al. (2012) และ Taechowisan et al. (2017) ที่พบว่า เหง้ากระชายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 76.3 mg/ml และ 259.27 mg/ml ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับรากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติสามารถสรุปได้ว่า ส่วนต่างๆ ของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์สูงกว่า รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่ายอดกระชายที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 4.5 A ถึง D) ถึงแม้ว่ายอดของกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อจะมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อย แต่การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสภาพปลอดเชื้อมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้อย่างต่อเนื่อง สารมีคุณภาพสม่ำเสมอ และใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้นกว่าการปลูกพืชในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากสามารถควบคุมคุณภาพของพืชให้คงที่ ไม่ให้เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม และสภาพภูมิประเทศ (วรารณ, 2551) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการทดลองต่อไปถึงผลของสารกระตุ้น MeJA และ SA ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารต่างกันต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

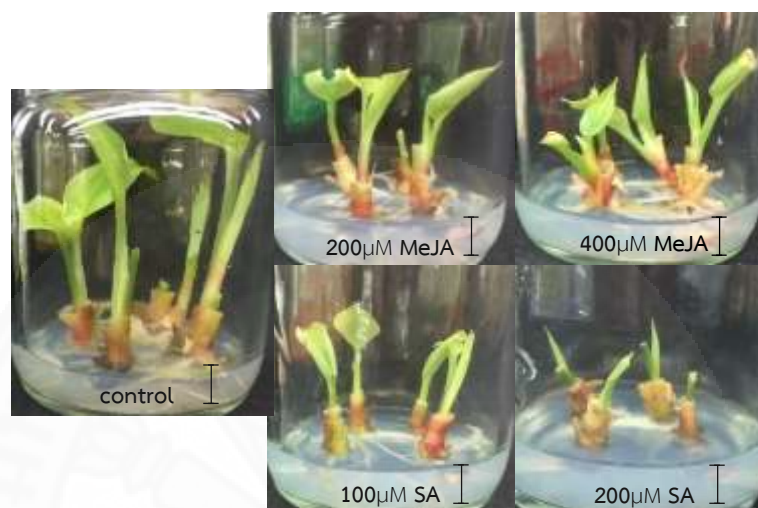
4.3 ผลของสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

4.3.1 ผลของ MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

4.3.1.1 การเจริญเติบโตของยอด

จากการเพาะเลี้ยงยอดกระชายบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μM หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μM เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุมที่ไม่เติม MeJA และ SA เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า growth index (GI) และน้ำหนักแห้งยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (ภาพที่ 4.6 - 4.7 และตารางผนวกที่ ค.3) โดยยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นมีค่า GI สูงสุด เท่ากับ 3.24 ± 0.18 ในขณะที่การเติม SA ความเข้มข้น 200 μM

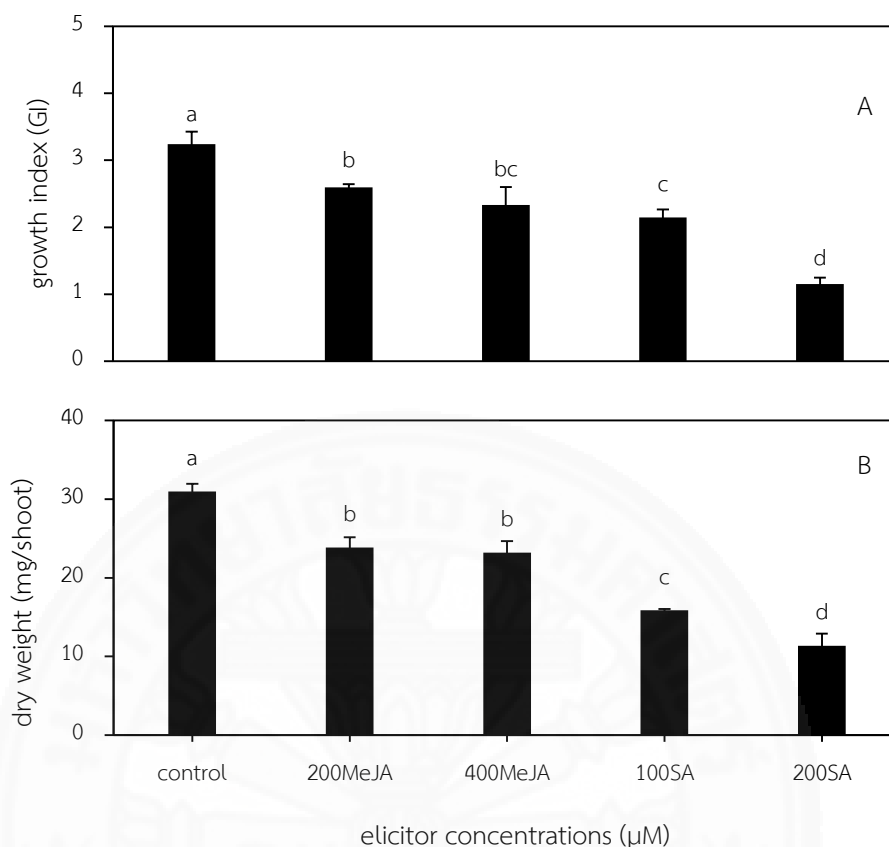
ส่งผลให้ยอดมีค่า GI น้อยที่สุดเท่ากับ 1.15 ± 0.10 ส่วนน้ำหนักแห้ง พบว่า เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับค่า GI โดยยอดที่พัฒนามนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นมีน้ำหนักแห้งสูงสุด เท่ากับ 30.98 ± 0.98 mg/shoot และยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 μ M มีน้ำหนักแห้งน้อยสุด 11.34 ± 1.58 mg/shoot



ภาพที่ 4.6 ยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μ M เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 0.5 cm)

4.3.1.2 % yield

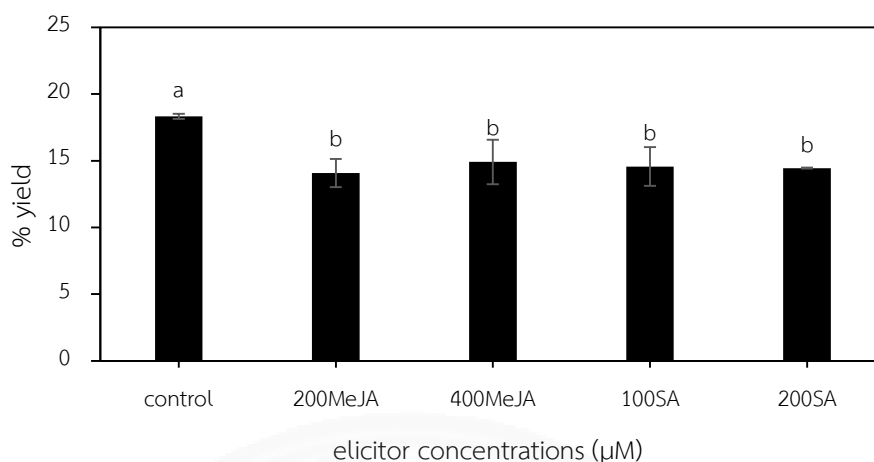
จากการนำยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารที่ได้รับ MeJA และ SA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาสกัดสารและวิเคราะห์หา % yield พบว่า ยอดที่พัฒนามนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้น มี % yield เท่ากับ $18.33 \pm 0.19\%$ ซึ่งสูงสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับ % yield ของยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA และ SA ทุกความเข้มข้น (14.08 ± 1.05 ถึง $14.91 \pm 1.68\%$) (ภาพที่ 4.8 และตารางผนวกที่ ค.3)



ภาพที่ 4.7 (A) ค่า GI และ (B) น้ำหนักแห้ง ของยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μM หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μM เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.3.1.3 ปริมาณสารฟิโนสโตรบิน

จากการทดลอง พบว่า ปริมาณสารฟิโนสโตรบิน มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (ภาพที่ 4.9 A และตารางผนวกที่ ค.4) โดยยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM มีปริมาณสารฟิโนสโตรบินสูงสุด เท่ากับ 17.97 ± 0.01 mg/g dry extract หรือคิดเป็น 2.44 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (7.35 ± 0.04 mg/g dry extract) ยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 400 μM และ SA ความเข้มข้น 100 μM ที่ปริมาณสารฟิโนสโตรบิน เท่ากับ 17.01 ± 0.16 และ 12.11 ± 0.01 mg/g dry extract หรือสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 2.31 และ 1.65 เท่า ตามลำดับ ส่วนยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 μM มีปริมาณสารฟิโนสโตรบินเท่ากับ 6.09 ± 0.04 mg/g dry extract ซึ่งน้อยกว่าสิ่งทดลองควบคุม



ภาพที่ 4.8 % yield ของยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μM หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μM เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.3.1.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดกระชายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม MeJA และ SA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.9 B และตารางผนวกที่ ค.4) โดยยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 86.01 ± 1.33 mg GAE/g dry extract หรือคิดเป็น 1.81 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (47.50 ± 1.32 mg GAE/g dry extract) ยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 400 μM และ SA ความเข้มข้น 100 μM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 58.96 ± 0.85 และ 57.93 ± 3.97 mg GAE/g dry extract หรือสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.24 และ 1.22 เท่า ตามลำดับ ส่วนยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 μM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 43.78 ± 1.24 mg GAE/g dry extract ซึ่งมีค่าน้อยที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม

4.3.1.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของยอดที่พัฒนามนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม MeJA และ SA ความเข้มข้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.9 C และตารางผนวกที่ ค.4) โดยยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 166.60 ± 2.57 mg QE/g dry extract หรือคิดเป็น 1.25 เท่าของสิ่งทดลอง

ควบคุม (133.18 ± 3.05 mg QE/g dry extract) ยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 μ M และ SA ความเข้มข้น 100 μ M มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 133.36 ± 1.90 และ 132.50 ± 4.83 mg QE/g dry extract ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม ส่วนปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 μ M มีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 57.71 ± 4.28 mg QE/g dry extract

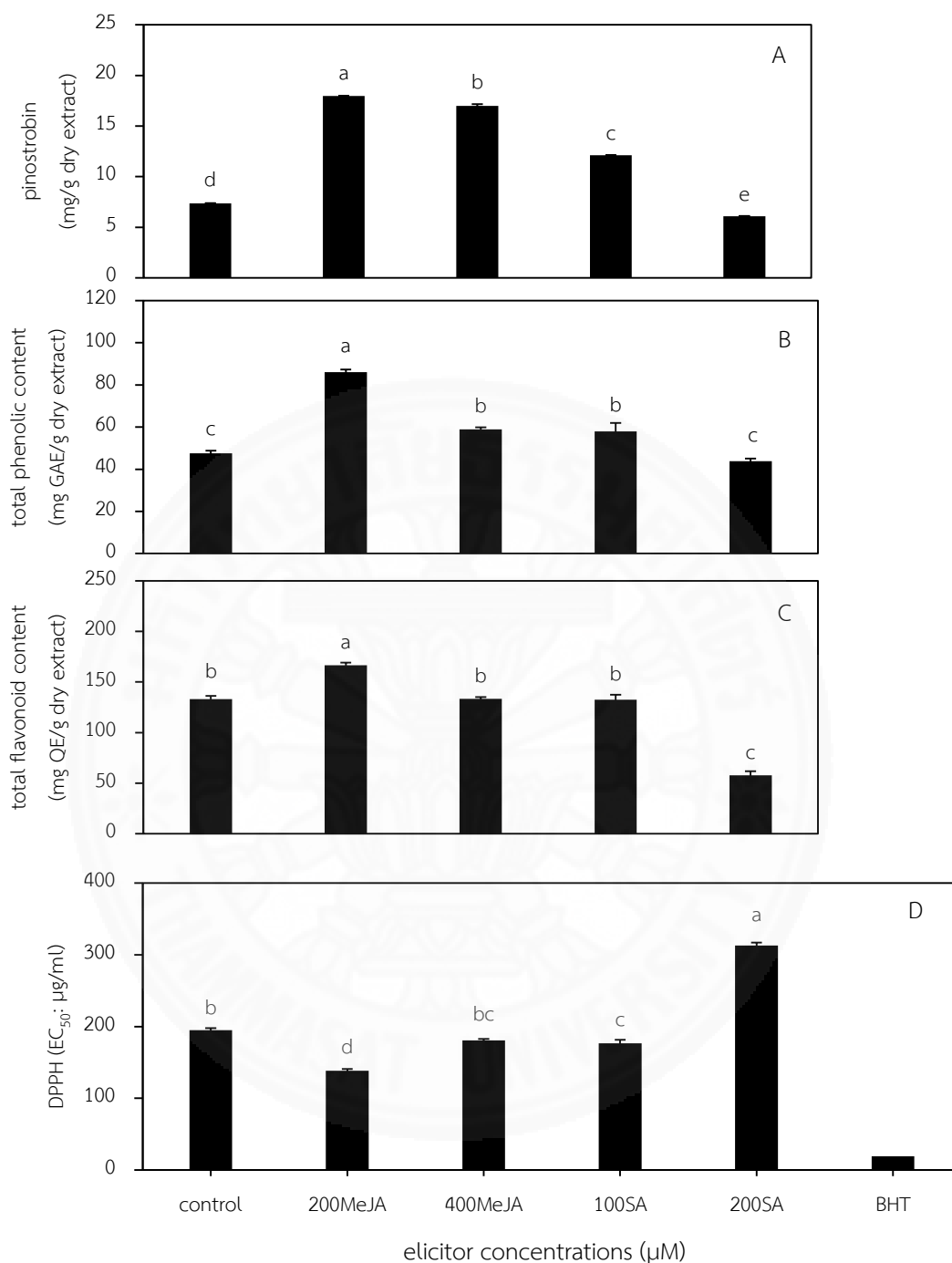
4.3.1.6ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การเติม MeJA และ SA ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลให้ยอดกระชายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.9 D และตารางผนวกที่ ค.4) โดยยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μ M มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 138.27 ± 3.37 μ g/ml ยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 400 μ M และ SA ความเข้มข้น 100 μ M มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 180.80 ± 5.50 และ 176.56 ± 3.99 μ g/ml ตามลำดับ ส่วนยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 μ M มีค่า EC_{50} เท่ากับ 312.89 ± 11.92 μ g/ml ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าสิ่งทดลองควบคุม (EC_{50} เท่ากับ 194.97 ± 2.27 μ g/ml)

4.3.1.7ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม MeJA และ SA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารฟิโนสโตรบินมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (r เท่ากับ 0.845) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.746) แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.774) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดกระชายมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.763) และสารทั้งสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.749 และ -0.986 ตามลำดับ) (ตารางที่ 4.1)

จากผลการทดลองที่ 4.3.1 แสดงให้เห็นว่ายอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อตอบสนองต่อ MeJA ได้ดีกว่า SA ในการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการใช้ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุกชนิด



ภาพที่ 4.9 (A) ปริมาณสารพินอสโตรบิน (B) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และ (D)ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 µM NAA ความเข้มข้น 2.69 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 µM หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 µM เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูงสุด รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดด้วย แต่เนื่องจาก MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดในการทดลองนี้ อาจเป็นไปได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้อาจให้ผลที่ดีกว่า จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของ MeJA ความเข้มข้นต่ำลง (0 ถึง 200 μM) ต่อการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

ตารางที่ 4.1 ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ระหว่างปริมาณสารพิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกระชายที่พัฒนามานานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 และ 400 μM หรือ SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μM เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

	pinostrobin content	total phenolic content	total flavonoid content	DPPH
pinostrobin content	-	0.845**	0.746*	-0.774**
total phenolic content	-	-	0.763**	-0.749**
total flavonoid content			-	-0.986**
DPPH				-

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

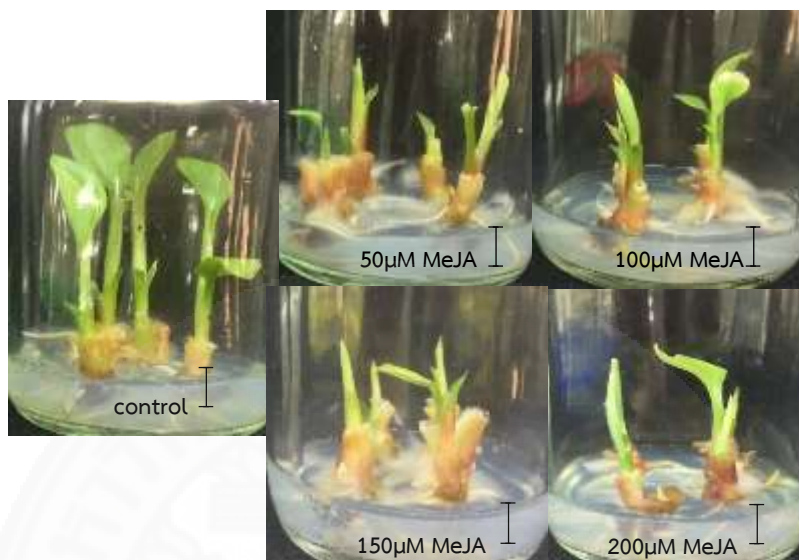
** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

4.3.2 ผลของ MeJA ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 200 μM ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

4.3.2.1 การเจริญเติบโตของยอด

จากการทดลอง พบว่า ยอดกระชายที่พัฒนามานานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (ภาพที่ 4.10 - 4.11 และตารางผนวกที่ ค.5) ยอดที่พัฒนามานานอาหารที่ไม่เติม MeJA หรือสิ่งทดลองควบคุม มีค่า GI 3.04 ± 0.12 และ น้ำหนักแห้ง 42.12 ± 0.12 mg/shoot ซึ่งสูงสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับยอดที่พัฒนามานานอาหารที่เติม MeJA ทุกความเข้มข้น (50 ถึง

200 μ M) ที่มีค่า GI อยู่ในช่วง 2.11 ± 0.27 ถึง 2.50 ± 0.11 และน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 20.45 ± 0.92 ถึง 31.10 ± 2.72 mg/shoot



ภาพที่ 4.10 ยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 0.5 cm)

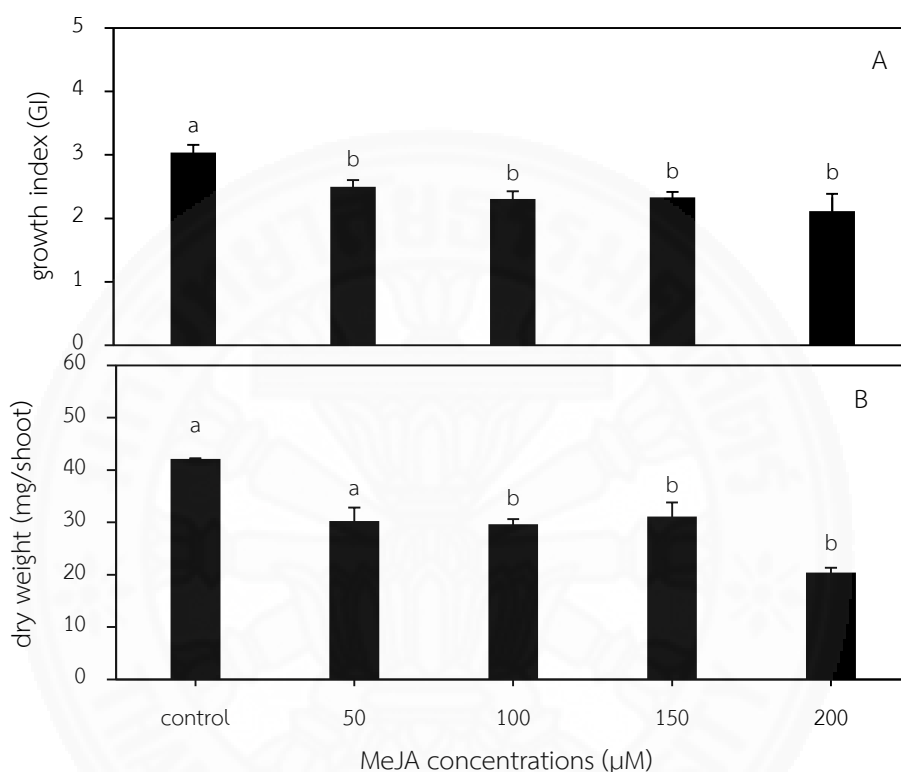
4.3.2.2 % yield

จากการนำสกัดสารของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม และไม่ได้เติม MeJA ความเข้มข้นต่างๆ มาคำนวณหา % yield พบว่า ยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่ไม่เติม MeJA มี % yield สูงสุด $25.42 \pm 0.44\%$ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 50 ถึง 200 μ M ที่มี % yield อยู่ในช่วง 20.36 ± 2.62 ถึง $21.05 \pm 0.10\%$ (ภาพที่ 4.12 และตารางผนวกที่ ค.5)

4.3.2.3 ปริมาณสารฟีนอลิโตรบิน

ปริมาณสารฟีนอลิโตรบินของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0 ถึง 200 μ M มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.13 A และตารางผนวกที่ ค.6) โดยยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μ M มีปริมาณสารฟีนอลิโตรบินสูงสุดเท่ากับ 15.95 ± 0.07 mg/g dry extract หรือ 2.22 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม ส่วนยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 และ 150 μ M มีปริมาณสารฟีนอลิโตรบิน 7.89 ± 0.01 และ 9.91 ± 0.03 mg/g dry extract ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.10 และ

1.38 เท่า โดยยอดที่พัฒนามนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้น หรือสิ่งทดลองควบคุม มีปริมาณสารฟีนอลิกน้อยที่สุด 7.17 ± 0.35 mg/g dry extract และไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 50 μ M (7.39 ± 0.02 mg/g dry extract)

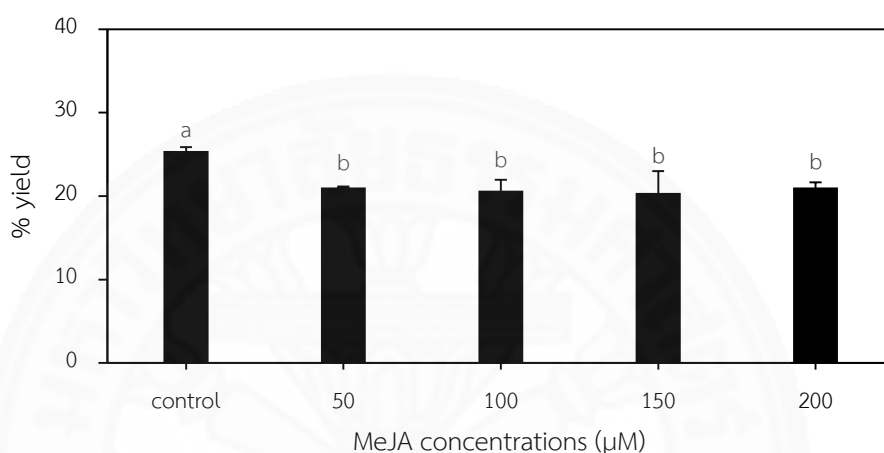


ภาพที่ 4.11 (A) ค่า GI และ (B) น้ำหนักแห้ง ของยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.3.2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0 ถึง 200 μ M มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.13 B และตารางผนวกที่ ค.6) โดยยอดที่พัฒนามนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยที่สุด เท่ากับ 44.41 ± 4.07 mg GAE/g dry extract ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 50 μ M (43.78 ± 1.24 mg GAE/g dry extract) ในขณะที่การเติม MeJA ความเข้มข้น 200 μ M ลงในอาหาร

เพาะเลี้ยงส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 71.50 ± 1.32 mg GAE/g dry extract หรือคิดเป็น 1.61 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม นอกจากนี้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 63.97 ± 1.50 และ 63.42 ± 0.54 mg GAE/g dry extract ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.44 และ 1.42 เท่าตามลำดับ



ภาพที่ 4.12 % yield ของยอดกระชายที่พัฒนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.3.2.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

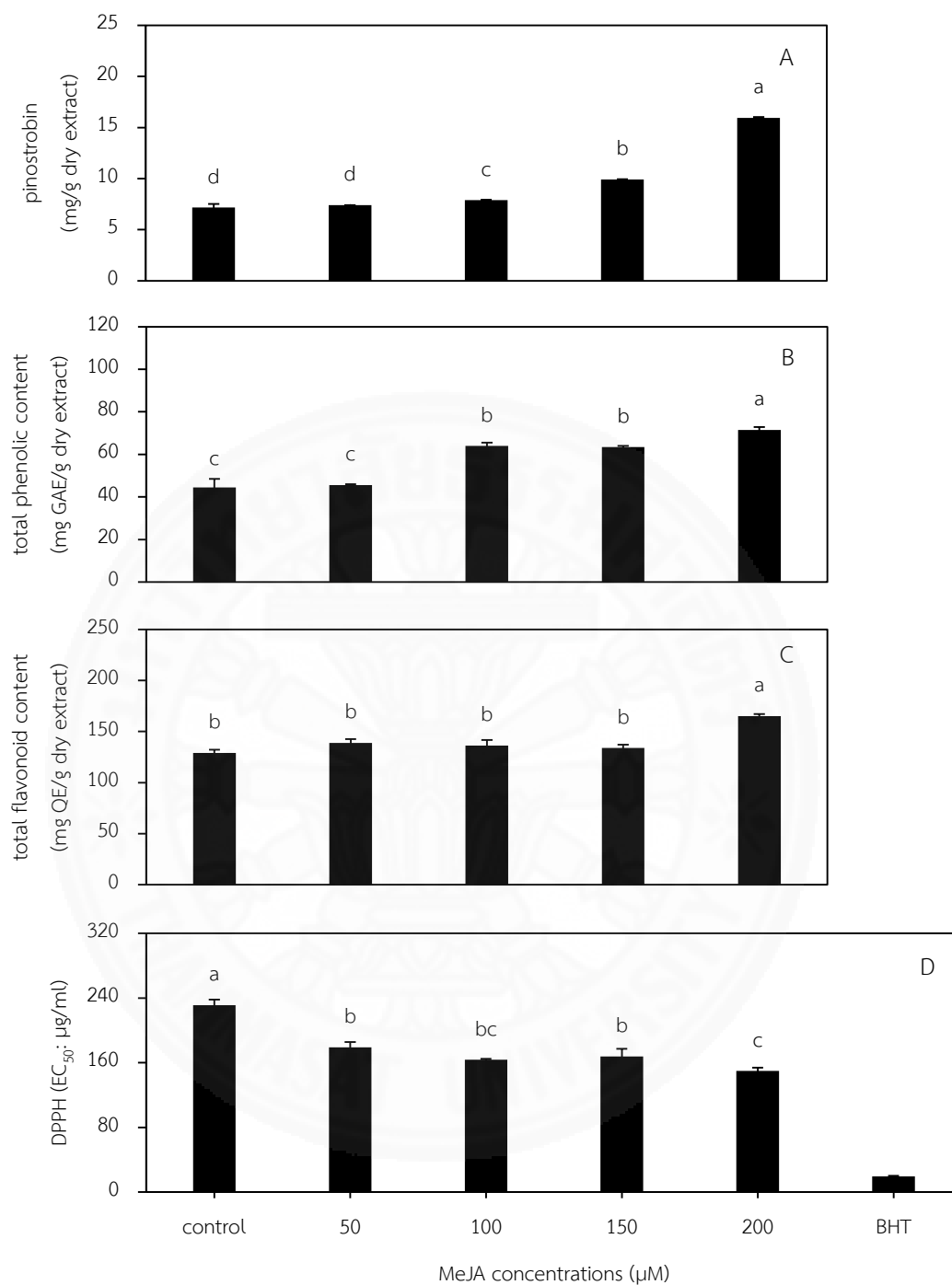
ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของยอดกระชายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี MeJA ความเข้มข้น 0 ถึง 200 μM (ภาพที่ 4.13 C และตารางผนวกที่ ค.6) โดยยอดที่พัฒนามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด 165.17 ± 1.94 mg QE/g dry extract หรือสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 2.78 เท่า ส่วนยอดที่พัฒนามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 129.08 ± 3.15 mg QE/g dry extract ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่พัฒนามี MeJA ความเข้มข้น 50 100 และ 150 μM ที่มีค่าเท่ากับ 133.89 ± 3.34 ถึง 138.92 ± 3.59 mg QE/g dry extract

4.3.2.6ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM และ MeJA ความเข้มข้น 0 ถึง 200 μM พบว่า ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด

MeJA ความเข้มข้น 200 μM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 149.67 ± 4.30 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0 50 และ 150 μM ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 231.11 ± 6.77 167.71 ± 9.40 และ 178.90 ± 6.67 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.13 D และตารางผนวกที่ ค.6)

จากผลการทดลองใน 4.3.1 และ 4.3.2 แสดงให้เห็นว่า การเติม MeJA และ SA ทุกความเข้มข้นลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของยอดกระชาย ทั้งนี้เนื่องจาก MeJA และ SA ทำให้เซลล์ของพืชเกิดกลไกการป้องกันตัวเองคล้ายการถูกรบกวนจากเชื้อจุลินทรีย์ และทำให้พืชอยู่ในสภาวะเครียด พืชจะดูดและสะสมน้ำรวมถึงธาตุอาหารลดลง จึงส่งผลต่อการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic pathways) ของสารประกอบปฐมภูมิทำให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง และเกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาบอลิซึมในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Yu et al., 2002; Zhao et al., 2005; Baenas et al., 2014) สอดคล้องกับรายงานของ Liu et al. (2018) ที่พบว่า เซลล์ของ *Gardenia jasminoides* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 25 ถึง 100 μM และ MeJA ความเข้มข้น 50 ถึง 400 μM เป็นเวลา 3 วัน มีน้ำหนักแห้ง (12 ถึง 13 g/DW) น้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารกระตุ้น (15 ถึง 16 g/L DW) นอกจากนี้ Coste et al. (2011) พบว่า ยอดของ *Hypericum maculatum* ที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 200 μM และ JA ความเข้มข้น 100 250 และ 500 μM เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ มีชีวมวล (5 ถึง 15.5 g/shoot DW) น้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม (17.5 g/shoot DW) และ Mahmood et al. (2012) ที่เพาะเลี้ยงยอดของ *Musa acuminata* ร่วมกับการใช้ MeJA ความเข้มข้น 0 ถึง 160 μM พบว่า MeJA ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 80 μM ส่งผลทำให้ยอดมีน้ำหนักสด (3 ถึง 4 g) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม มีพืชบางชนิดที่พบว่า สารกระตุ้นเหล่านี้ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ดังเช่น รากของ *Tripterygium wilfordii* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม SA และ MeJA ความเข้มข้น 50 μM เป็นเวลา 3 6 และ 9 วัน มีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม (0.5 ถึง 1.5 g/flask) (Zhu et al., 2014) นอกจากนี้ Ali et al. (2006) พบว่า รากของ *Panax ginseng* ที่พัฒนามาจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม MeJA และ SA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 และ 7 วัน มีน้ำหนักสด ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม (4 ถึง 5 g) เช่นเดียวกับ การเติม MeJA และ SA ความเข้มข้น 0.05 ถึง 0.2 mM ในอาหารเพาะเลี้ยงยอดของ *Talinum paniculatum* เป็นเวลา 5 และ 10 วัน พบว่า ยอดมีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม (35 ถึง 45 mg) (Faizal and Sari, 2019) ดังนั้น การตอบสนองของพืชต่อสารกระตุ้นในการเจริญเติบโต จึงแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช รวมถึงชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้น (วรารักษ์, 2551)



ภาพที่ 4.13 (A) ปริมาณสารพินอสโตรบิน (B) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และ (D)ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนามาอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ในการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า ยอดกระชายตอบสนองต่อ MeJA ได้ดีกว่า SA โดย Zhao et al. (2005) กล่าวว่าชนิดของสารกระตุ้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่ง MeJA มีคุณสมบัติในการควบคุมการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟีนอล โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกของกระบวนการ phenylpropanoid pathway วิธีดังกล่าวนำไปสู่การสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ และ เทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น (Gonzalez-Aguilar et al., 2004; Wang et al., 2015) จึงทำให้ MeJA สามารถกระตุ้นการสร้างสารฟิโนสโตรบิน ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้ดี รวมถึงสามารถกระตุ้นการสร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ด้วย นอกจากนี้ MeJA ยังเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานให้กับพืช โดยเป็นตัวส่งสัญญาณในการกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวของพืชให้สร้างสารทุติยภูมิขึ้น เพื่อตอบสนองต่อสิ่งรุกรานนอกทั้งที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต (Cheong and Choi, 2003; Gonzalez-Aguilar et al., 2004; Zhao et al., 2005) ส่วน SA สามารถกระตุ้นให้ยอดกระชายมีปริมาณสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นได้ โดย SA จะส่งสัญญาณการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างสารให้ต่อต้านการรบกวนของเชื้อโรคหรือทำให้พืชเกิดความเครียด ส่งผลให้มีปริมาณสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น (จรัสแท้, 2553; Bailly, 2004) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของ MeJA และ SA ต่อการเพิ่มปริมาณสารฟิโนสโตรบินซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ แต่มีรายงานผลของสารกระตุ้น 2 ชนิดดังกล่าวต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชชนิดอื่นๆ และพบว่า MeJA ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า SA ดังรายงานของ Manivannan et al. (2016) ที่พบว่า เซลล์ของ *Scrophularia kakudensis* ที่พัฒนาในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0 ถึง 200 μM นาน 2 สัปดาห์ ตอบสนองต่อการสร้างสารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่า SA (0 ถึง 200 μM) และสิ่งทดลองควบคุม โดย MeJA ความเข้มข้น 200 μM กระตุ้นให้เซลล์มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด (8 ถึง 10 μg quercetin/mg FW) และมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด เท่ากับ 23.6% หรือ Lee et al. (2015) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงรากพิเศษ ของ *Eleutherococcus koreanum* บนอาหารที่เติม MeJA และ SA ความเข้มข้น 0 ถึง 400 $\mu\text{mol/L}$ นาน 1 สัปดาห์ พบว่า รากพิเศษที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ทุกความเข้มข้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าการใช้ SA และสิ่งทดลองควบคุม โดย MeJA ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{mol/L}$ สามารถกระตุ้นให้รากพิเศษสร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (22.22 และ 22.48 mg/g DW) และสารฟลาโวนอยด์ (9.95 และ 10.00 mg/g DW) ได้สูงสุด และ Mendoza et al. (2018) พบว่า เซลล์แขวนลอยของ *Thevetia peruviana* ตอบสนองต่อ MeJA ได้ดีกว่า SA โดย MeJA ที่ความเข้มข้น 3 μM สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ทั้งหมด 1.49 เท่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 2.55 เท่า และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น 1.66 เท่าของ
 สิ่งทดลองควบคุม

ความเข้มข้นของสารกระตุ้นก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อการสร้าง
 และสะสมสารทุติยภูมิของพืช (วรารักษ์, 2551) จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า MeJA ความ
 เข้มข้น 200 μM สามารถกระตุ้นการสร้างและสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงเพิ่มฤทธิ์ต้าน
 อนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อได้ดีที่สุด การเติม MeJA ความเข้มข้น
 400 μM หรือ SA ความเข้มข้น 200 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงจากผลการทดลองใน 4.3.1 ส่งผล
 ให้ยอดกระชายมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ลดลง และมี
 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยลง ความเข้มข้นของ MeJA และ SA ที่สูงเกินไปนั้นอาจเป็นพิษต่อ
 เซลล์ของพืช ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง นอกจากนี้ ภายในเซลล์พืชอาจสะสมไฮโดรเจนเปอร์
 ออกไซด์ (H_2O_2) จากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ส่งผลทำให้เซลล์พืชตายได้ (chong et al., 2005) ซึ่งผล
 การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของพืชชนิดอื่นๆ ที่พบว่า การใช้ MeJA และ SA ความเข้มข้นสูงมี
 ผลทำให้ปริมาณสารทุติยภูมิลดลง เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Habenaria edgeworthii* บน
 อาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้น 10 ถึง 1,000 μM เป็นเวลานาน 28 วัน พบว่า แคลลัส
 ที่พัฒนามบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 10 μM มีสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด (14.70 mg/g
 DW) สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม (10.17 mg/g DW) แต่เมื่อใช้ MeJA ความเข้มข้นสูงขึ้น (100 ถึง
 1,000 μM) ส่งผลทำให้ปริมาณสารดังกล่าวลดลง (2.99 ± 0.08 ถึง 11.86 ± 0.41 mg/g DW) (Giri et
 al., 2012) นอกจากนี้ Dowom et al. (2017) เพาะเลี้ยงยอด *Salvia virgata* ในอาหารเหลวที่เติม
 MeJA ความเข้มข้น 11.2 ppm เป็นเวลา 3 วัน พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
 (93.66 ± 0.81 mg GAE/g DW) และสารฟลาโวนอยด์ (7.47 ± 0.09 mg QUE/g DW) สูงสุด แต่เมื่อใช้
 MeJA ความเข้มข้นสูงขึ้น 22.4 และ 44.8 ppm สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (87.65 ± 0.57 และ
 73.40 ± 0.49 mg GAE/g DW ตามลำดับ) และสารฟลาโวนอยด์ (7.25 ± 0.06 และ 6.70 ± 0.15 mg
 QUE/g DW ตามลำดับ) มีปริมาณลดลง เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Linum ussitatissimum*
 L ในอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 0 25 50 100 และ 200 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า การใช้
 SA ความเข้มข้น 50 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (37.8 mg/g DW) และสารฟลาโวนอยด์
 (5.23 mg/g DW) สูงสุด แต่เมื่อใช้ SA ความเข้มข้นสูงขึ้น 100 และ 200 μM ส่งผลให้ปริมาณสารทั้ง
 2 ชนิดดังกล่าวลดลง (Nadeem et al., 2019) รวมถึงการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Rumex vesicarius*
 L. บนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 0 ถึง 250 μM เป็นเวลา 14 วัน พบว่า แคลลัสที่พัฒนามบน
 อาหารที่มี SA ความเข้มข้น 50 μM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (1 ถึง 2 mg/g dry
 material) และสารฟลาโวนอยด์ (0.6 ถึง 1 mol/g dry material) สูงสุด แต่เมื่อเติม SA ที่ความ

เข้มข้นสูงขึ้น 100 และ 250 μM มีผลทำให้ปริมาณสารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวลดลง (Gadzovska et al., 2013)

จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าเมื่อใช้ MeJA ความเข้มข้นต่ำ 50 ถึง 150 μM จากผลการทดลองใน 4.3.2 ส่งผลให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีค่าน้อย และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นที่ความเข้มข้นเหมาะสม ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่ำ อาจไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ หรือการแสดงออกของยีนที่ควบคุมกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิ สอดคล้องกับ Danaee et al. (2015) ศึกษาผลของ MeJA ความเข้มข้น 0 ถึง 10 μM ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Phyllanthus pulcher* พบว่าเซลล์ที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้นต่ำ 0.1 1 และ 5 μM มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์น้อยกว่าการใช้ MeJA ความเข้มข้นสูงสุด (10 μM) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *S. kakudensis* บนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0 ถึง 200 μM นาน 2 สัปดาห์ พบว่า เซลล์ที่พัฒนาในอาหารที่มี MeJA ความเข้มข้นต่ำกว่า 200 μM ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ (Manivannan et al., 2016) ดังนั้นชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อกระบวนการกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของพืช ซึ่งจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แสดงให้เห็นว่า เมื่อยอดกระชายมีปริมาณสารฟิโนสโตรบินเพิ่มสูงขึ้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย ทั้งนี้เนื่องจากสารฟิโนสโตรบินเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เมื่อมีปริมาณสารฟิโนสโตรบินสูง ปริมาณสารฟลาโวนอยด์จึงสูงขึ้นด้วย และฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มย่อยของสารประกอบฟีนอลิก โดยเมื่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ในยอดกระชายมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารทั้ง 2 กลุ่มนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Pietta, 2000) สอดคล้องกับรายงานของ Yi et al. (2019) ที่พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มขึ้นใน hairy root ของ *Lactuca indica* L. ส่งผลให้ hairy root มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน และ Danaee et al. (2015) พบว่า เซลล์ของ *P. pulcher* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น เนื่องจากการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์เพิ่มมากขึ้น

จากผลการทดลองทั้ง 2 การทดลองนี้ (4.3.1 และ 4.3.2) สามารถสรุปได้ว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลให้ยอดกระชายสร้างและสะสมสารฟิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ได้สูงสุด รวมถึงมีฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของพืชต่อสารกระตุ้นในการสังเคราะห์สารทุติยภูมินั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นแล้ว ระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญเช่นเดียวกัน (วรารณ, 2551) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาถึงผลของระยะเวลาในการได้รับ MeJA ต่อการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อในการทดลองต่อไป

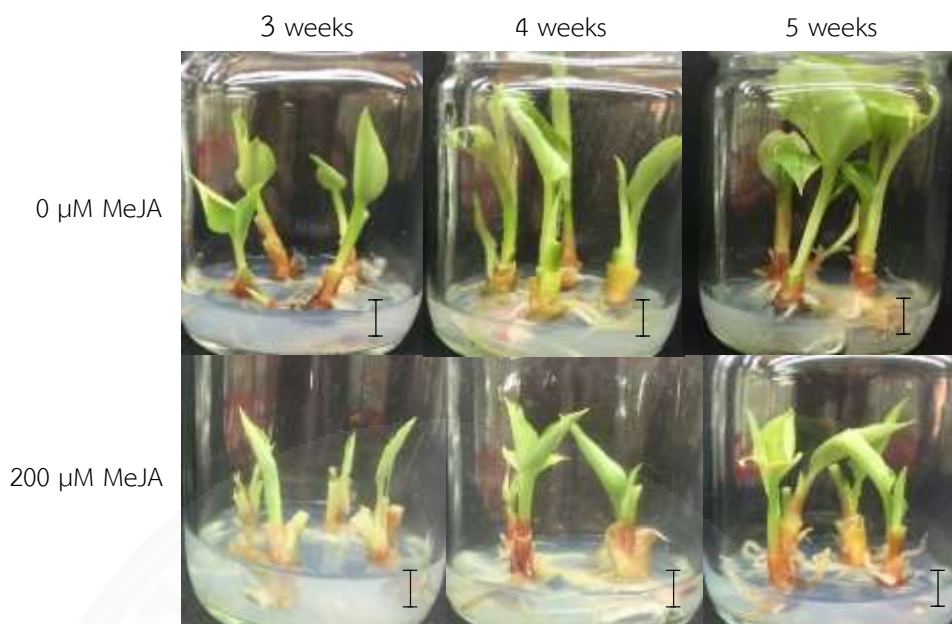
4.4 ผลของระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

4.4.1 การเจริญเติบโตของยอด

จากการเพาะเลี้ยงยอดกระชายบนอาหารที่เติมและไม่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ พบว่า ยอดมีค่า GI และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (ภาพที่ 4.14 - 4.15 และตารางผนวกที่ ค.7) ยอดที่ได้รับ MeJA ทุกระยะเวลามีค่า GI และน้ำหนักแห้งน้อยกว่าค่าดังกล่าวของยอดที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเท่ากัน โดยยอดที่พัฒนามบนอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นเวลา 5 สัปดาห์ มีค่า GI สูงสุด 3.70 ± 0.19 และน้ำหนักแห้งสูงสุด 64.74 ± 3.02 mg/shoot ในขณะที่ยอดที่พัฒนามบนอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นระยะเวลานาน 3 และ 4 สัปดาห์ ที่มีค่า GI เท่ากับ 2.22 ± 0.10 และ 3.33 ± 0.11 และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 41.62 ± 0.72 และ 55.65 ± 0.42 mg/shoot ส่วนยอดที่พัฒนามบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μ M นาน 3-5 สัปดาห์ มีค่า GI อยู่ในช่วง 1.68 ± 0.06 ถึง 2.95 ± 0.06 และน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 36.31 ± 1.86 ถึง 54.97 ± 1.37 mg/shoot

4.4.2 % yield

จากการทดลอง พบว่า ยอดกระชายที่พัฒนามบนอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นเวลา 3-5 สัปดาห์ มี % yield เท่ากับ 27.31 ± 0.22 ถึง $27.36 \pm 0.19\%$ ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนามบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μ M ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 3-5 สัปดาห์ (22.06 ± 0.70 ถึง $22.29 \pm 0.80\%$) (ภาพที่ 4.16 และตารางผนวกที่ ค.7)



ภาพที่ 4.14 ยอดกระชายที่พัฒนามบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ (scale bar = 0.5 cm)

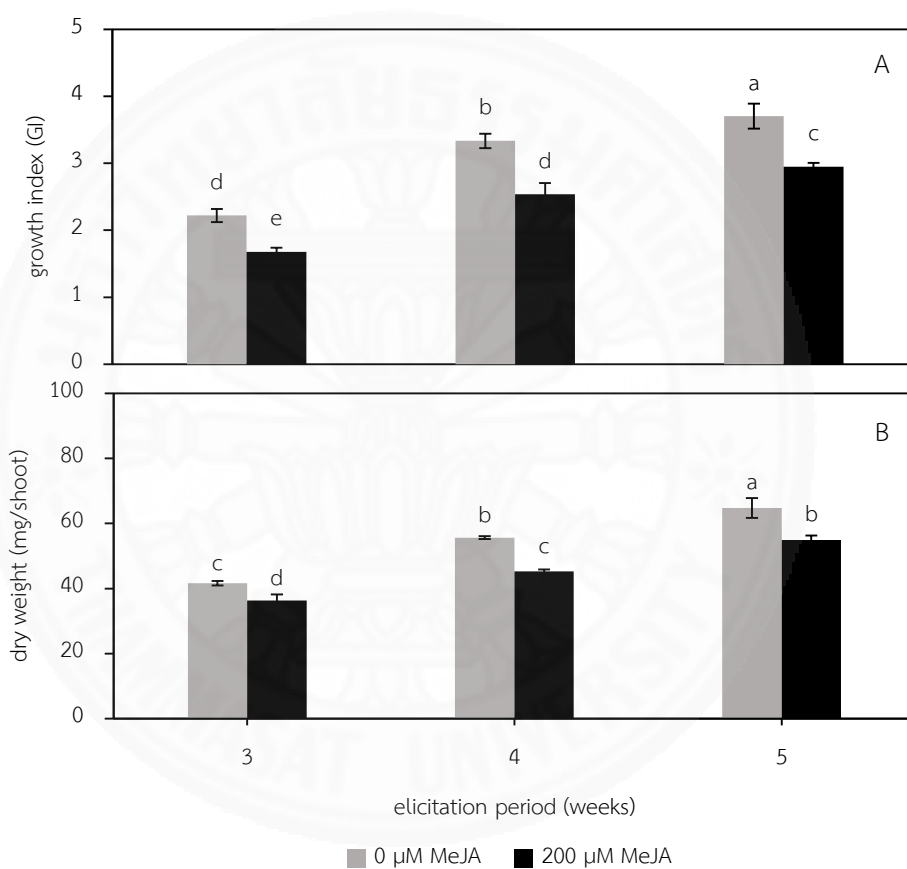
4.4.3 ปริมาณสารฟีนอลิก

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกของยอดกระชายที่พัฒนามบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมและไม่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (ภาพที่ 4.17 A และตารางผนวกที่ ค.8) โดยยอดที่พัฒนามบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลานาน 4 และ 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงเท่ากับ 18.34 ± 0.18 และ 18.46 ± 3.30 mg/g dry extract ตามลำดับ หรือสูงกว่า 2.38 และ 2.12 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 4 และ 5 สัปดาห์ ส่วนการเติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ สามารถกระตุ้นให้ยอดสร้างสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้นได้โดยมีค่าเท่ากับ 11.63 ± 0.07 mg/g dry extract ซึ่งสูงกว่า 1.70 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 3 สัปดาห์

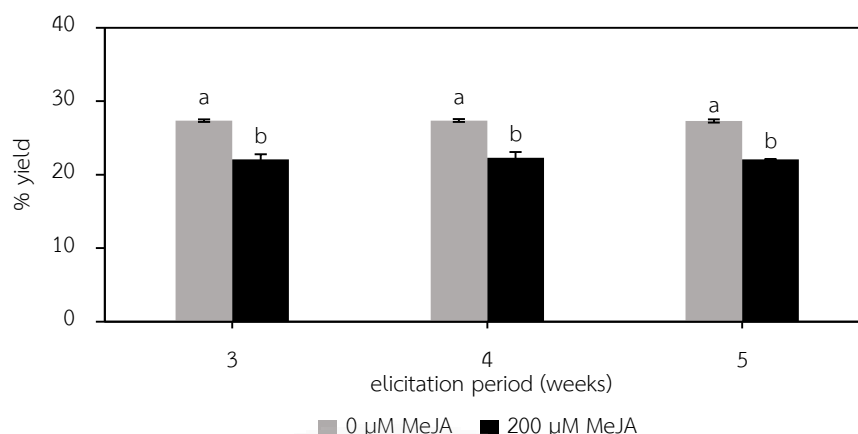
4.4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดกระชายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมและไม่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.17 B และตารางผนวกที่ ค.8) โดยยอดที่พัฒนามบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ

87.23±3.39 mg GAE/g dry extract ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกัน 1.83 เท่า แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ (84.44±2.44 mg GAE/g dry extract) ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.82 เท่า ส่วนยอดที่พัฒนามนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 46.94±0.86 mg GAE/g dry extract หรือสูงกว่า 1.23 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 3 สัปดาห์



ภาพที่ 4.15 (A) ค่า GI และ (B) น้ำหนักแห้ง ของยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์



ภาพที่ 4.16 % yield ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

4.4.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

ยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมและไม่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.17 C และตารางผนวกที่ ค.8) โดยการเติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4 และ 5 สัปดาห์ ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 195.42 ± 1.82 และ 194.44 ± 4.83 mg QE/g dry extract หรือสูงกว่า 1.57 และ 1.54 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 4 และ 5 สัปดาห์ ตามลำดับ ส่วนยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ มีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 125.97 ± 4.88 mg QE/g dry extract หรือสูงกว่า 1.23 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 3 สัปดาห์

4.4.6ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

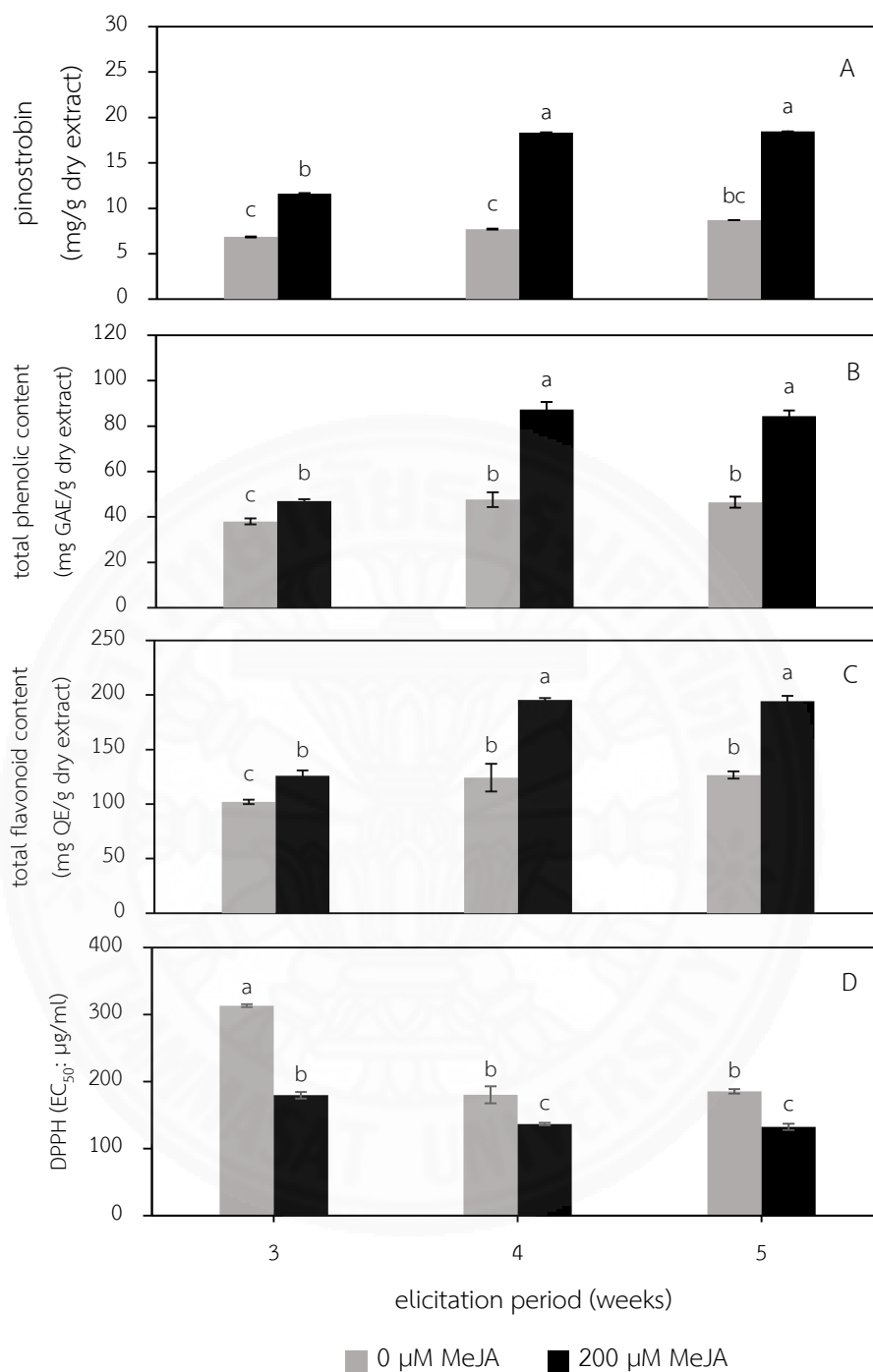
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมและไม่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (ภาพที่ 4.17 D และตารางผนวกที่ ค.8) โดยยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลานาน 4 และ 5 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ค่า EC_{50} เท่ากับ 136.51 ± 1.91 และ 132.22 ± 1.84 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่ายอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 4 และ 5 สัปดาห์ (ค่า EC_{50} เท่ากับ 180.08 ± 3.52 และ 185.28 ± 3.83 $\mu\text{g/ml}$) ส่วนการเติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ สามารถ

กระตุ้นให้ยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ค่า EC_{50} เท่ากับ $179.48 \pm 2.15 \mu\text{g/ml}$) ดีกว่ายอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 3 สัปดาห์ (ค่า EC_{50} เท่ากับ $313.22 \pm 8.05 \mu\text{g/ml}$)

4.4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมและไม่เติม MeJA ความเข้มข้น $200 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารฟีนอลิกมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (r เท่ากับ 0.944) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.944) แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.722) นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดกระชายมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.985) และสารทั้งสองกลุ่มมีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.743 และ -0.782 ตามลำดับ) (ตารางที่ 4.2)

ผลของระยะเวลาในการได้รับ MeJA ต่อการเจริญเติบโตของยอด พบว่า เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการทดลองใน 4.3.1 (ผลของ MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ) และ 4.3.2 (ผลของ MeJA ที่ความเข้มข้น $0 - 200 \mu\text{M}$ ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ) โดยยอดที่ได้รับ MeJA ที่ทุกระยะเวลาที่มีการเจริญเติบโตลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก MeJA ไปลดการสร้างสารประกอบปฐมภูมิผลิตลงและทำให้เซลล์พืชอยู่ในสภาวะเครียด จึงทำให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง (Yu et al., 2002; Baenas et al., 2014) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่พบว่าพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี MeJA เป็นระยะเวลาต่างๆ มีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม ดังรายงานการเพาะเลี้ยงยอดของ *Ophiorrhiza mungos* L. บนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ เป็นเวลานาน 24 ถึง 96 ชั่วโมง พบว่า ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ MeJA เป็นเวลานาน 24 ถึง 96 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้ง (0.29 ± 0.01 ถึง $0.33 \pm 0.01 \text{ mg}$) น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (0.34 ± 0.13 ถึง $0.39 \pm 0.04 \text{ mg}$) (Krishnan et al., 2018) หรือ Veerashree et al. (2012) พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 100 ถึง $200 \mu\text{M}$ ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Gymnema sylvestre* เป็นเวลา 5 ถึง 20 วัน เซลล์มีน้ำหนักแห้ง (0.01 ถึง 0.1 mg/g DW) น้อยกว่าและแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเท่ากัน (0.2 ถึง 0.25 mg/g DW) นอกจากนี้ เซลล์แขวนลอยของ *Psoralea corylifolia* ที่เจริญเติบโต



ภาพที่ 4.17 (A) ปริมาณสารพินอสโตรบิน (B) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และ (D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

ในอาหารที่มี MeJA ความเข้มข้น 100 และ 200 μM เป็นเวลา 6 ถึง 24 วัน มีน้ำหนักแห้งน้อย (1 ถึง 3 g) กว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับ MeJA ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเท่ากัน (4 ถึง 6 g) (Gajula et al., 2018) และการเพาะเลี้ยงยอดของ *E. affine* ร่วมกับการเติม MeJA ความเข้มข้น 800 μM เป็นเวลา 3 ถึง 7 วัน พบว่า ยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA มีน้ำหนักแห้งน้อยกว่าและแตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม และมีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสารกระตุ้น (Skrzypczak-Pietraszek et al., 2014)

ตารางที่ 4.2 ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 μM NAA ความเข้มข้น 2.69 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 และ 5 สัปดาห์

	pinostrobin content	total phenolic content	total flavonoid content	DPPH
pinostrobin content	-	0.944**	0.944**	-0.722**
total phenolic content	-	-	0.985**	-0.743**
total flavonoid content			-	-0.782**
DPPH				-

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

จากการศึกษาผลของระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อการสร้างทุติยภูมิ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ยอดที่พัฒนามาจากอาหารที่เติม MeJA นาน 4 และ 5 สัปดาห์ สามารถสังเคราะห์สารฟีนอลิก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดี ส่วนยอดกระชายที่ได้รับ MeJA เป็นระยะเวลานาน 3 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ได้รับ MeJA น้อย (3 สัปดาห์) มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นไม่เพียงพอสำหรับการแสดงออกหรือการทำงานของยีน และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นที่เหมาะสมนั้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของพืช เช่น การเติม MeJA ความเข้มข้น 50-200 μM ลงในอาหารที่เซลล์แขวนลอยของถั่วเหลือง (*Glycine max*) เป็นเวลานาน 3-15 วัน พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 50 μM เป็น

เวลานาน 6 วัน ส่งผลให้ยอดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด หรือเพิ่มขึ้น 1.79 และ 2.5 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (Rungruang et al., 2015) นอกจากนี้ Gabotti et al. (2019) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Cannabis sativa* ร่วมกับการเติม MeJA ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ นาน 1 และ 4 วัน พบว่าเซลล์ที่ได้รับ MeJA นาน 4 วัน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด หรือสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 82 และ 26% ตามลำดับ และ การเติม MeJA ความเข้มข้น 100 μM ลงในอาหารเพาะเลี้ยง hairy root ของ *L. indica* เป็นเวลา 1 ถึง 71 ชั่วโมง พบว่า hairy root ที่พัฒนานบนอาหารที่ได้รับ MeJA เป็นเวลา 71 ชั่วโมงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์สูงสุด หรือสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 236.6% และ 348.0% ตามลำดับ รวมถึงมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดและดีกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.88 เท่า (Yi et al., 2019)

จากการทดลองนี้พบว่ายอดที่ได้รับ MeJA เป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับยอดที่ได้รับ MeJA นาน 4 สัปดาห์ ดังนั้นจึงควรใช้ระยะในการได้รับ MeJA ที่ 4 สัปดาห์ เนื่องจากใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าแต่ให้ผลไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามยอดที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 200 μM นาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่ารากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ดังที่รายงานใน 4.2 (ตารางผนวกที่ ค.2) ส่วนยอดกระชายที่ได้รับ MeJA นาน 5 สัปดาห์ ยังคงมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงนั้น อาจเป็นเพราะระยะเวลาที่ได้รับสารยังไม่นานมากจนเป็นอันตรายกับเซลล์พืช อย่างไรก็ตามมีรายงานในพืชชนิดอื่นๆ ที่พบว่าเมื่อเนื้อเยื่อของพืชที่เพาะเลี้ยงได้รับ MeJA เป็นระยะเวลานานเกินไปจะส่งผลให้มีปริมาณสารทุติยภูมิลดลง เนื่องจากเซลล์พืชเกิดความเครียดจากการกระตุ้นด้วย MeJA เป็นเวลานานจนเกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ทำให้สารทุติยภูมิที่พืชสร้างถูกขับออกจากเซลล์มาสะสมอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง (Thebora et al., 2014; Piątczak et al., 2016) ดังรายงานของ Ali et al. (2014) ที่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Artemisia absinthium* L. ในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0.5 ถึง 2.0 mg/l เป็นเวลานาน 3 ถึง 39 วัน พบว่า เซลล์ที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 0.5 mg/l นาน 27 วัน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (5.6 mg GAE/g DW) สารฟลาโวนอยด์ (1.84 mg QE/g DW) และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด (72.4 %) แต่ปริมาณสารดังกล่าวลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการได้รับ MeJA เป็น 36 และ 39 วัน นอกจากนี้ Mendoza et al. (2018) เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *T. peruviana* ในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 3 μM เป็นเวลา 24 ถึง 120 ชั่วโมง พบว่า เซลล์แขวนลอยที่ได้รับ MeJA เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด ($4.47 \pm 0.37 \text{ mg GAE/g DW}$) แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ได้รับ MeJA เป็น 120 ชั่วโมง เซลล์มีปริมาณสารดังกล่าวลดลง เช่นเดียวกับ Wang et al. (2015) ที่

พบว่า เซลล์แขวนลอย *H. perforatum* ที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี MeJA ความเข้มข้น 100 $\mu\text{mol/L}$ นาน 5 วัน เซลล์สามารถสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ได้สูงสุด (38.26 mg/g DW) แต่ปริมาณสารดังกล่าว ลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการได้รับ MeJA เป็น 10 วัน จากรายงานข้างต้นนี้จะเห็นได้ว่า การเติม สารกระตุ้นลงในอาหารเพาะเลี้ยง สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้ตลอดเวลาที่ เพาะเลี้ยง แต่ปริมาณสารที่ได้นั้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เหมาะสมในการได้รับสาร กระตุ้น ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นต่อการสังเคราะห์ปริมาณ สารทุติยภูมิ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน (วรารณ, 2551; Rao and Ravishankar, 2002)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายที่พัฒนาบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมและไม่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ พบว่า ยอดกระชายมีปริมาณสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสาร ฟลาโวนอยด์ก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน รวมถึงมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดลอง ใน 4.3.1 และ 4.3.2

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. อาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกระชายในสภาพปลอดเชื้อ คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM
2. ยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารฟิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่ารากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ของกระชายที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
3. การเติม MeJA ความเข้มข้น 200 μM นาน 4 สัปดาห์ เป็นความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้ยอดกระชายสร้างและสะสมสารฟิโนสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์สูง รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดี

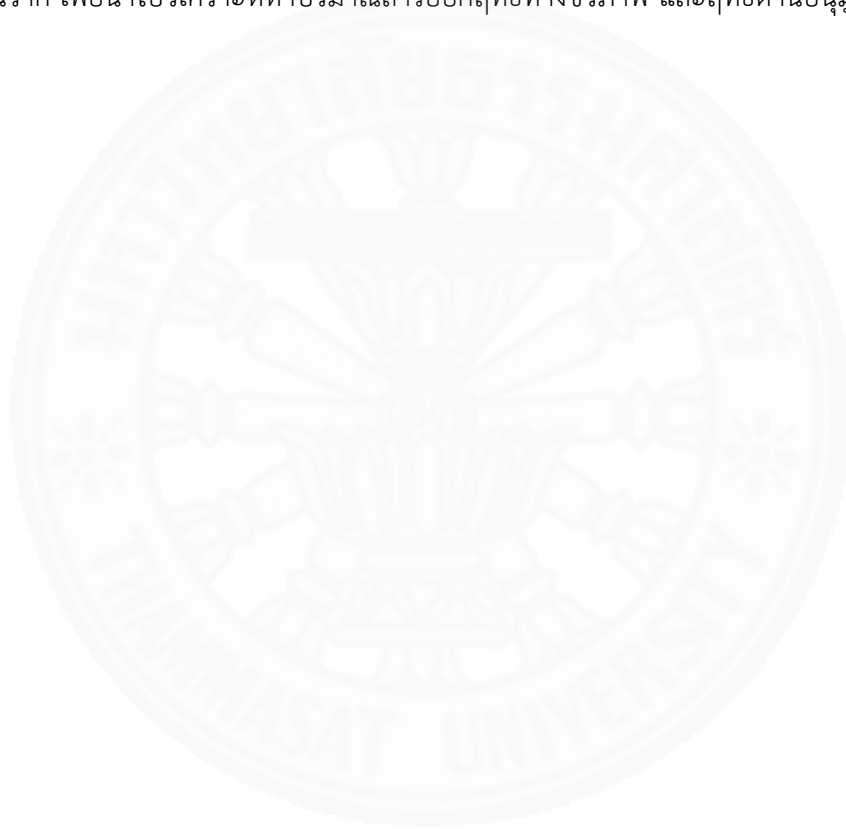
5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการใช้สารตั้งต้น Phe ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับสารกระตุ้น MeJA และ SA หรือศึกษาสารกระตุ้นชนิดอื่น เช่น yeast extract, chitosan และ gibberellic acid หรือใช้สารกระตุ้นเหล่านี้ร่วมกับ MeJA ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ได้รับต่างกัน เพื่อเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่อไป เนื่องจาก Phe เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการโพรพานอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น สารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และแอนโทไซยานิน เป็นต้น และ yeast extract, chitosan และ gibberellic acid สามารถส่งสัญญาณการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างสารให้ต่อต้านการรบกวนของเชื้อโรค หรือทำให้พืชเกิดความเครียด ส่งผลให้มีปริมาณสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น
2. ควรนำสารสกัดที่ได้จากยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านเชื้อราและแบคทีเรีย ต้านไวรัสหรือกิจกรรมที่ทำให้เกิดเชื้อ HIV ต้านการอักเสบ และต้านโรคมะเร็ง เป็นต้น รวมถึงนำยอดหรือสารสกัดกระชายไปใช้เป็นส่วนประกอบของยา เช่น ยารักษาอาการอักเสบ ยาแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้วปวด ยารักษาโรค HIV และโรคบิด เป็นต้น หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์แคปซูลกระชายสำหรับรับประทานเพื่อรักษาโรคต่างๆ ผลิตเป็นอาหารเสริม หรือนำใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

3. ศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และส่วนต่างๆ ของกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ เช่น ใบ ยอด ใบและยอด ต้น และราก เป็นต้น ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

4. ศึกษาสภาพการเพาะเลี้ยง เช่น แสง อุณหภูมิ และอาหารเพาะเลี้ยง เป็นต้น ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ

5. ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินต่อการชักนำ และเพิ่มจำนวนราก เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH



รายการอ้างอิง

- คำณูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.
- จริงแท้ ศิริพานิช. 2553. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวางของพืช. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, นครปฐม. 453 หน้า.
- โชติอนันต์ และคณะ. 2551. สมุนไพรไทยสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. ดวงกมลพับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 368 หน้า.
- นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต, กรุงเทพฯ. 128 หน้า.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2547. เทคโนโลยีเบื้องต้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการพัฒนาพันธุ์พืช. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น. 168 หน้า.
- บุหริน พันธุ์สวรรค์. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 21: 275-286.
- ปริญา สุคนธ์รัตน์. 2558. การขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่ออกนอกหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พีรเดช ทองอำไพ. 2559. ฮอร์โมนและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. ไดนามิคการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ. 196 หน้า.
- มนทิณี กมลธรรม สะไบทอง ภูมิคอนสาร และสุภาวดี ชนะพาล. 2559. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรกระชายดำ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. 3: 74-78.
- รังสฤษดิ์ กาวิตะ. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.
- วรารณ ฤทัย. 2553. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์, นครสวรรค์. 147 หน้า.
- วรารณ ฤตะลุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด, ขอนแก่น. 120 หน้า.
- วิสสุตา ประเสริฐพรศักดิ์ และปิยะมาศ ศรีรัตน์. 2558. การขยายพันธุ์ขมิ้นชันในสภาพปลอดเชื้อโดยระบบการเพาะเลี้ยงที่ใช้อาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 46: 717-720.

- ศิวพงษ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี, อุดรธานี. 187 หน้า.
- ศุภวรรณ บุญระเทพ. 2549. การผลิตสารทุติยภูมิโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์. 20: 185-195.
- สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 135 หน้า.
- สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี, ปัตตานี. 127 หน้า.
- สุภัททิรมย์ 2550. 97 สมุนไพรใกล้ตัวเสริมสุขภาพและความงาม. สำนักพิมพ์เครือเถา, กรุงเทพฯ. 224 หน้า.
- อ.อรรถสิทธิ์. 2551. สมุนไพรในครัว บำรุงร่างกาย บำบัดโรค. สำนักพิมพ์อุทยานความรู้, นนทบุรี. 136 หน้า.
- อนงนาฏ ไพนุพงศ์. 2560. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ. PKRU SciTech Journal. 1: 20-27.
- อรดี สหวัชรินทร์. 2542. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 48 หน้า.
- อารีย์ วรรณวัฒน์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อดิสรณ์, กรุงเทพฯ. 133 หน้า.
- โอภา วัชรคุปต์ ปรีชา บุญจง จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรัตน์ อัดต์สินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พี.เอส.พรินท์, กรุงเทพฯ. 200 หน้า.
- Abbas, M. S., Taha, H. S., Aly, U. I., El-Shabrawi, H. M. and Gaber, E. I. 2011. *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosco). J. Genet. Eng. Biotechnol. 9: 165-172.
- Abed, H. Z., Kouassi, M. K., Yapo, K. D., Koffi, E., Sie, R. S., Kone, M. and Kouakou, H. T. 2014. Production and enhancement of anthocyanin in callus line of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Int. J. Rec. Biotech. 2: 45-56.
- Ali, A. M. A., El-Nour, M. E. M. and Yagi, S. M. 2018. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. J. Genet. Eng. Biotechnol. 16: 677-682.

- Ali, M. B., Yu, K. W., Hah, E. J. and Paek, K. Y. 2006. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep.* 25: 613-620.
- Ali, M., Abbasi, B. H. and Ali, G. S. 2014. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 120: 1099-1106.
- Azhar, S. Z. A., Ghani, K. A. B. D. and Yusuf, N. A. 2018. *In vitro* induction of adventitious root from shoot bud of *Boesenbergia rotunda* (Zingiberaceae): effect of plant growth regulators. *Sci. Int.* 30: 147-151.
- Baenas, N., García-Viguera, C. and Moreno, D. A. 2014. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules* 19: 13541-13563.
- Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14: 93-107.
- Banthorpe, B. V. 1994. Secondary metabolism in plant tissue culture: scope and limitations. *Nat. Prod. Rep.* 11: 303-328.
- Baskaran, P., Moyo, M. and Staden, J. V. 2014. *In vitro* plant regeneration, phenolic compound production and pharmacological activities of *Coleonema pulchellum* S. Afr. J. Bot. 90: 74-79.
- Cesari, I. M., Carvalho, E., Rodrigues, M. F., Mendonça, B. D. S., Amôedo, N. D. and Rumjanek, F. D. 2014. Methyl jasmonate: putative mechanisms of action on cancer cells cycle metabolism and apoptosis. *Int. J. Cell Biol.* 2014: Article ID 572097.
- Chahyadi, A., Hartatia, R., Wirasutisna, K. R. and Elfahmia. 2014. *Boesenbergia pandurata* Roxb, an Indonesian medicinal plant: phytochemistry, biological activity, plant biotechnology. *Procedia Chem.* 13: 13-37.
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y. and Lim T. Y. 2007. Total phenolic content and antioxidant activity of leaves and rhizomes of some ginger species in Peninsular Malaysia. *Gard. Bull.* 1: 47-56.

- Cheong, J. J. and Choi, Y. D. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet.* 19: 409-413.
- Chodisetti, B., Rao, K., Gandhi, S. and Giri, A. 2015. Gymnemic acid enhancement in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* by using the signaling molecules—methyl jasmonate and salicylic acid. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 51: 88–92.
- Chong, T. M., Abdullah, M. A., Fadzillah, N., Lai, O. M. and Lajis, N. H. 2005. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *Enzyme and Microbial Technology.* 36: 469-477.
- Chong, T. E., Kee, L. Y., Fei, C. C., Han, H. C., Ming, W. S., Ping, C. T. L., Teck, F. G., Khalid, N., Rahman, N. A., Karsani, S. A., Othman, S., Othman, R. and Yusof, R. 2012. *Boesenbergia rotunda*: from ethnomedicine to drug discovery. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2012: Article ID 473637.
- Collin, H. A. 2001. Secondary product formation in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.* 34: 119-134.
- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi R. and Lagana A. 2011. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Nat. Prod. Res.* 25: 469–495.
- Coste, A., Vlase, L. and Halmagyi, A. 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106: 279–288.
- Cousins, M., Adelberg, J., Chen, F. and Rieck J. 2007. Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of turmeric (*Curcuma longa* L.) grown *in vitro*. *Indust. Crops Prod.* 25: 129–135.
- Danaee, M., Farzinebrahimi, R., Kadir, M. A., Sinniah, U. R., Mohamad, R. and Taha, R. M. 2015. Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. *Braz. J. Bot.* 38: 265-272.
- David, D., Ji, T. Y. and Azlan, G. J. 2016. *In vitro* propagation of *Zingiber officinale* Rosc. ‘Tambunan’. *Transactions on Science and Technology.* 3: 162 - 167.

- Deepalakshmi, P. D., Odgerel, K., Thirugnanasambantham, P., Yungeree, O., Khorolragchaa, A. and Senthil, K. 2016. Metabolite profiling of *in vitro* cultured and field grown rhizomes of *Acorus calamus* from Mongolia using GC–MS. *Chromatographia*. 79: 1359–1371.
- Dowom, S. A., Abrishamchi, P., Radjabian, T. and Salami, S. A. 2017. Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag⁺ ions, methyl jasmonate and yeast extract. *Ind. Crops Prod.* 103: 81-88.
- Esmaili, A. K., Taha, R. M., Mohajer, S. and Banisalam, B. 2016. *In vitro* regeneration and comparison of phenolic content, antioxidant and antityrosinase activity of *in vivo* and *in vitro* grown *Asparagus officinalis*. *Sains Malays.* 45: 373–381.
- Faizal, A. and Sari, A. V. 2019. Enhancement of saponin accumulation in adventitious root culture of Javanese ginseng (*Talinum paniculatum* Gaertn.) through methyl jasmonate and salicylic acid elicitation. *Afr. J. Biotechnol.* 18: 130-135.
- Faridah, Q. Z., Abdelmageed, A. H. A., Julia, A. A. and Nor Hafizah, R. 2011. Efficient *in vitro* regeneration of *Zingiber zerumbet* Smith (a valuable medicinal plant) plantlets from rhizome bud explants. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 9303-9308.
- Folin, O. and Ciocalteu, V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* 73: 627–650.
- Gabotti, D., Locatelli, F., Cusano, E., Baldoni, E., Genga, A., Pucci, L., Consonni, R. and Mattana, M. 2019. Cell suspensions of *Cannabis sativa* (var. futura): effect of elicitation on metabolite content and antioxidant activity. *Molecules*. DOI :10.3390/molecules24224056.
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagege, D., Courtois, D. and Joseph, C. 2013. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrone and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 113: 25–39.

- Gajula, H., Kumar, A., Vijendra, P. D., Rajashekar, J., Sannabommaji, T. and Basappa G. 2018. A combination of elicitor and precursor enhances psoralen production in *Psoralea corylifolia* Linn. suspension cultures. Ind. Crops Prod. 124: 685–691.
- Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I. D., Nandi, S. K., Rawal, R. S. and Pande, V. 2012. *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. Ind. Crops Prod. 39: 1-6.
- Gonzalez-Aguilar, G. A., Tiznado-Hernandes, M. E., Zavaleta-Gatica, R. and Martinez-Tellez, M. A. 2004. Methyl jasmonate treatment reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. Biochem. Biophys. Res. 313: 704-711.
- Gu, C., Fu, L., Yuan, X. and Liu, Z. 2017. Promoting effect of pinostrobin on the proliferation, differentiation and mineralization of murine pre- osteoblastic MC3T3-E1 cells. Molecules. 22: 1735-1746.
- Hassan, S. M., Aqil, A. A. A. and Attimarad, M. 2013. Determination of crude saponin and total flavonoids content in guar meal. Adv. Med. Plant Res. 1: 24-28.
- Jaiarree, N. 2010. Biological activities of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill extract and its active ingredients. Dissertion in Medical Science. Faculty of Medicine. Thammasat University, Pathumthani.
- Jala, A. 2012. Effect of NAA BA and sucrose on shoot induction and rapid micropropagation by trimming shoot of *Curcuma longa* L. Thammasat Int. J. Sci. Tech. 17: 54-60.
- Jalil, M. 2018. Enhancement and isolation of zerumbone in *Zingiber zerumbet* (L.) Smith cell suspension and adventitious root cultures. Ph.D. Thesis. Malaya University, Kuala Lumpur.
- Jebur, A. B., Mokhamer, M. H. and El- Demerdash, F. M. 2016. A review on oxidative stress and role of antioxidants in diabetes mellitus. Austin Endocrinol. Diabetes Case Rep. 1: 1-6.

- Jiao, J., Gai, Q. Y., Wang, X., Qin, Q. P., Wang, Z. Y., Liu, J. and Fu, Y. J. 2018. Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Ind. Crops Prod.* 124: 28-35.
- Jing, L. J., Mohamed, M., Rahmat, A. and Bakar, M. F. A. 2010. Phytochemicals, antioxidant properties and anticancer investigations of the different parts of several gingers species (*Boesenbergia rotunda*, *Boesenbergia pulchella* var *attenuata* and *Boesenbergia armeniaca*). *J. Med. Plant. Res.* 4: 27-32.
- Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Songsri, O., Ruangnoo, S. and Itharat, A. 2016. *In vitro* propagation and bioactive compound accumulation in regenerated shoots of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. *Acta. Physiol. Plant.* 38: 249.
- Jitvaropas, R., Saenthaweesuka, S., Somparna, N., Thuppiiaa, A., Sireeratawonga, S. and Phoolcharoenb, W. 2012. Antioxidant, antimicrobial and wound healing activities of *Boesenbergia rotunda*. *Nat. Prod. Commun.* 7: 909 – 912.
- Krishnan, J. J., Gangaprasad, A. and Satheeshkumar, K. 2018. Exogenous methyl jasmonate acts as a signal transducer in the enhancement of camptothecin (CPT) production from *in vitro* cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. var. *angustifolia* (Thw.) Hook. f. *Ind. Crops Prod.* 119: 93-101.
- Lee, E. J., Park, S. Y. and Paek, K. Y. 2015. Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 120: 1–10.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H. and Chen, S. 2016. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules.* 21: 1374-1393.
- Liu, Z. B., Chen, J. G., Yin, Z. P., Shangguan, X. C., Peng, D. Y. and Lin, T. L. P. 2018. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation increase content and yield of chlorogenic acid and its derivatives in *Gardenia jasminoides* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss. Org.* 134: 79–93.

- Madan K. R. and Levitt J. 2014. A review of toxicity from topical salicylic acid preparations. *J. Am. Acad. Dermatol.* 70: 788-792.
- Mahmood, M., Bidabadi, S. S., Ghobadi, C. and Dennis J. G. 2012. Effect of methyl jasmonate treatments on alleviation of polyethylene glycol -mediated water stress in banana (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tip cultures. *Plant Growth Regul.* 68: 161–169.
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y. G. and Jeong, B. R. 2016. Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1-13.
- Mendoza, D., Cuaspu, O., Arias, J. P., Ruiz, O. and Arias, M. 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnol. Rep.* 19: e00273.
- Mut-Salud, N., Alvarez, P. J., Garrido, J. M., Carrasco, E., Aranega, A. and Rodriguez-Serrano F. 2016. Antioxidant intake and antitumor therapy: toward nutritional recommendations for optimal results. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016: Article ID 6719534.
- Nadeem, M., Ahmed, W., Zahir, A., Hano, C. and Hano, C. 2019. Salicylic acid-enhanced biosynthesis of pharmacologically important lignans and neolignans in cell suspension culture of *Linum usitatissimum* L. *Eng. Life Sci.* 19: 168–174.
- Ng, T. L. M., Karim, R., Tan, Y. S., The, H. F., Danial, A. D., Ho, L. S., Khalid, N., Appleton, D. R. and Harikrishna, J. A. 2016. Amino acid and secondary metabolite production in embryogenic and non-embryogenic callus of fingerroot ginger (*Boesenbergia rotunda*). *PLoS One.* 11: e0156714.
- Ozcan, T., Akpinar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L. and Delikanli, B. 2014. Phenolics in human health. *Int. J. Chem. Eng.* 5: 393-396.

- Panche, A. N., Diwan, A. D. and Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. J. Nutr. Sci. 5: e47.
- Parwata, A., Sukardiman., Mulja, H. S., Widhiartini, A. and Gunawan. 2015. Induction of apoptosis and antiangiogenesis effects of pinostrobin from *Kaempferia pandurata* Roxb against induction of fibrosarcoma mice results benzopiren. Pure Appl. Chem. 3: 19-29.
- Patel, N. K., Jaiswal, G. and Bhutani, K. K. 2016. A review on biological sources chemistry and pharmacological activities of pinostrobin. Nat. Prod. Res. 30: 2017–2027.
- Patel, R. H. and Krishnamurthy, R. 2013. Elicitors in plant tissue. J. Pharmacogn. Phytochem. 2: 60-65.
- Pełkal, A. and Pyrzynska, K. 2014. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. Food Anal. Methods. 7:1776–1782.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A. and Andrade P. B. 2009. Phenolics: from chemistry to biology. Molecules. 14: 2202-2211.
- Piątczak, E., Kuzma, Ł. and Wysokińska, H. 2016. The influence of methyl jasmonate and salicylic acid on secondary metabolite production in *Rehmannia Glutinosa* Libosch. hairy root culture. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 58: 57-65.
- Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. 63: 1035-1042.
- Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T. and Shekhar, H. U. 2012. Oxidative stress and human health. Adv. Biosci. Biotechnol. 3: 997-1019.
- Rao, S. R. and Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 20: 101-153.
- Raomai, S., Kumaria, S., Kehie, M. and Tandon, P. 2015. Plantlet regeneration of *Paris polyphylla* Sm. via thin cell layer culture and enhancement of steroidal saponins in mini-rhizome cultures using elicitors. Plant Growth Regul. 75: 341–353.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compound. Trends Plant Sci. 2: 152-159.
- Rio, D. L. A. 2015. ROS and RNS in plant physiology: an overview. J. Exp. Bot. 66: 2827-2837.

- Robert, R. A. , Smith, R. A. , Safe, S. and Szabo, C. 2010. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*. 276: 85-94.
- Rojas, R., Alba, J., Magaña-Plaza, I., Cruz, F. and Ramos-Valdivia, A. C. 1999. Stimulated production of diosgenin in *Dioscorea galeottiana* cell suspension cultures by abiotic and biotic factors. *Biotechnol. Lett.* 21: 907–911.
- 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: 81-84.
- Sarms, A. D., Mallick, A. R. and Ghosh, A. K. 2010. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 1: 185-192.
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., Lee, J. S. and Choi, Y. D. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 4788–4793.
- Shmeda – 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.
- Singh, A. and Dwivedi, P. 2018. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 7: 750-757.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Słota, J. and Pietraszek, J. 2014. The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. *Acta Biochim. Pol.* 61: 47-53.
- Taechowisan, T., Chaisaeng, S. and Phutdhawong, W. S. 2017. Antibacterial, antioxidant and anticancer activities of biphenyls from *Streptomyces* sp. BO-07: an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A. *Food Agr. Immunol.* 28: 1330-1346.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. 690 p.

- Tan, B. C., Tan, S. K., Wong, S. M., Ata, N., Rahman, A. N. and Khalid, N. 2015. Distribution of flavonoids and cyclohexenyl chalcone derivatives in conventional propagated and *in vitro*-derived field-grown *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015: Article ID 451870.
- Thebora, J., Sivanandhan, G., Subramanyam, K., Arun, M., Selvaraj, N., Manickavasagam, M. and Ganapathi, A. 2014. Enhanced production of isoflavones by elicitation in hairy root cultures of Soybean. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 117: 477–481.
- Thiruvengadam, M. and Chung, I. M. 2015. Phenolic compound production and biological activities from *in vitro* regenerated plants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). Electron. J. Biotechnol. 18: 295-301.
- Thirapanithan, C., Jaiaree, N., Itharat, A., Makchuchit, S., Thongdeeying, P. and Panthong, S. 2015. Anti-inflammatory and antioxidant activities of the Thai traditional remedy called “Leard-ngam” and its plant ingredients. Thammasat Med. J. 15: 376-383.
- Tsai, S. C., Tsai, L. D. and Li, Y. K. 2005. An isolated *Candida albicans* TL3 capable of degrading phenol at large concentration. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 2358-2367.
- Veerashree, V., Anuradha, C. M., Kumar, V. 2012. Elicitor-enhanced production of gymnemic acid in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 108: 27–33
- Wang, J., Qian, J., Yao, L. and Lu, Y. 2015. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. Bioresour. Bioprocess. 2: 1-9.
- 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.
- 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.

- Yi, T. G., Park, Y., Park, J. E. and Park, N. I. 2019. Enhancement of phenolic compounds and antioxidative activities by the combination of culture medium and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Lactuca indica* L. Nat. Prod. Commun. 14: 1-9.
- 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. Meyer. Biochem. Eng. J. 11: 211–215.
- Yunus, M. F., Aziz, M. A., Kadir, M. A. and Rashid, A. A. 2012. *In vitro* propagation of *Etlingera elatior* (Jack) (torch ginger). Sci. Hortic. 135: 145-150.
- Yusuf, N. A., Annuar, M. M. S. and Khalid, N. 2011. Rapid micropropagation of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturpfl. (a valuable medicinal plant) from shoot bud explants. Afr. J. Biotechnol. 10: 1194-1199.
- Yusuf, N. A., Annuar, M. M. S. and Khalid, N. 2013. Existence of bioactive flavonoids in rhizomes and plant cell cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturpfl. Aust. J. Crop Sci. 7: 730-734.
- Yusuf, N. A., Rahim, N. S. M., Azhar, S. Z. A., Ghani, K. A., Sommano, S. and Khalid. N. 2018. Adventitious root cultures of *Boesenbergia rotunda* as a source of pinostrobin. Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Techno. 8: 337-383.
- Zhoa, J., Davis, L. and Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 23: 283-333.
- Zhu, C., Miao, G., Guo, J., Huo, Y., Zhang, X., Xie, J. and Feng, J. 2014. Establishment of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. hairy root culture and optimization of its culture conditions for the production of triptolide and wilforine. J. Microbiol. Biotechnol. 24: 823–834.
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. and Tang, T. 2010. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by uv-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. Food Anal. Methods. 3: 90–97.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารสูตร MS สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารกระตุ้น MeJA และ SA

วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS

1. ตวงสารละลายจาก stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS (ตารางภาคผนวกที่ 1) ต่อการเตรียมอาหาร 500 ml โดยใช้ปริมาตร ดังนี้

Stock 1, 3 – 6 = 5 ml

Stock 2 = 10 ml

Stock 7 = 2.5 ml

2. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จาก stock solution ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ตามความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองต่อการเตรียมอาหาร 500 ml โดยใช้ปริมาตร ดังนี้

BA ความเข้มข้น 4.44 8.87 และ 13.32 μ M = 5 10 และ 15 ml

NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M = 2.5 ml

3. เติมน้ำตาล 15 g คนให้ละลายเข้ากัน

4. ปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

5. ปรับ pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6 – 5.8 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N

6. ต้มส่วนผสมทั้งหมด ค่อยๆเติมผงวุ้น 4 g ลงในอาหาร และคนเป็นระยะ

7. เมื่ออาหารเดือดตักใส่ขวดเพาะเลี้ยง ขวดละประมาณ 10 ml และปิดฝาให้สนิท

8. นำไปนึ่งกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. ทิ้งให้อาหารเย็นก่อนนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก การเตรียม stock อาหารสูตร MS

stock	สารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณ (ml)	น้ำหนักสารที่ใช้ (g)	ปริมาตรที่ใช้ (ml)
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	
	KI			0.0208	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			0.0063	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			0.0006	
4	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100	250	11	10
5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100	250	9.25	10
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			0.5575	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			0.215	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$			0.006	
6	Na_2ETDA	100	250	0.9313	10
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			0.6963	
7	myo-inositol	200	100	2	5
	glycine			0.04	
	nicotinic acid			0.01	
	pyridoxine-HCl			0.01	
	thiamine-HCl			0.002	

วิธีการเตรียม stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้น 0.1 mg/ml

ชั่ง BA หรือ NAA 0.01 g ละลายด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N 4 ถึง 5 หยด จากนั้น
ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม stock solution MeJA ความเข้มข้น 4.4583 mM

ปิเปต MeJA ปริมาตร 97 μ L ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อย แล้วปรับให้มี
ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการคำนวณ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ

MeJA มีมวลโมเลกุล (molecular weight, MW) เท่ากับ 224.30 g/mole

ซึ่งใน stock MeJA ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ml จะมีเนื้อสาร MeJA เท่ากับ 0.1 g

เปลี่ยนหน่วยเป็น mole จากสูตร $\text{mole} = \text{g}/\text{MW}$

ดังนั้น ใน stock MeJA จะมีเนื้อสาร MeJA อยู่ $0.1 / 224.30 = 0.00044583$ mole

เปลี่ยนหน่วยให้เป็น M โดยเทียบต่อ 1 L

จากใน stock MeJA ปริมาตร 100 ml มีเนื้อสาร MeJA อยู่ 0.00044583 mole

ดังนั้น หากเตรียม stock MeJA ปริมาตร 1000 ml มีเนื้อสาร MeJA อยู่

$0.00044583 \text{ mole} \times 1000 \text{ ml} / 100 \text{ ml} = 0.0044583 \text{ M}$

เมื่อต้องการเตรียม MeJA ความเข้มข้น 50 μ M ปริมาตร 500 ml

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$$0.0044583 \text{ M} \times V_1 = 50 \text{ } \mu\text{M} \times 500 \text{ ml}$$

$$V_1 = 50 \times 10^{-6} \text{ M} \times 500 \text{ ml} / 0.0044583 \text{ M}$$

$$V_1 = 5.61 \text{ ml}$$

ดังนั้น เมื่อต้องการเตรียม MeJA ความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 μ M ปริมาตร
500 ml ต้องตวง stock MeJA ปริมาตร 5.61 11.22 16.84 และ 22.44 ml

วิธีเตรียม stock solution SA ความเข้มข้น 0.1 M

SA 1 M มีเนื้อสารอยู่ 138.12 g ใน 1 L

ถ้าต้องการเตรียม stock SA 0.1 M = $0.1 \times 138.12 \text{ g} / 1 \text{ M}$

ดังนั้นต้องชั่ง SA = 13.812 g

ถ้าต้องการเตรียมปริมาตร 100 ml ต้องชั่ง = $13.812 \text{ g} \times 100 \text{ ml} / 1000 \text{ ml}$
= 1.3812 g

นำ SA 1.3812 g มาละลายด้วย absolute ethanol 1 แล้วปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

เมื่อต้องการเตรียม SA ความเข้มข้น 100 μM ปริมาณ 500 ml

จาก

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$0.1 \text{ M} \times V_1 = 100 \mu\text{M} \times 500 \text{ ml}$$

$$0.1 \times 10^6 \mu\text{M} \times V_1 = 100 \mu\text{M} \times 500 \text{ ml}$$

$$V_1 = 100 \mu\text{M} \times 500 \text{ ml} / 0.1 \times 10^6 \mu\text{M}$$

$$V_1 = 0.5 \text{ ml}$$

ดังนั้น เมื่อต้องการเตรียม SA ความเข้มข้น 100 และ 200 μM ปริมาตร 500 ml ต้องตวง stock SA ปริมาตร 0.5 และ 1 ml

ภาคผนวก ข
การเกิดยอด จำนวนยอดที่พัฒนา และความยาวยอด
ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

ตารางผนวกที่ ข การเกิดยอด (%) จำนวนยอดที่พัฒนา และความยาวยอด (cm) ของยอดกระชายที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 8.87 และ 13.32 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์

BA (μM)	NAA (μM)	การเกิดยอด (%)	จำนวนยอดที่พัฒนา	ความยาวยอด (cm)
-	-	33.33 $\pm$ 5.77 ^{1/c}	1.00 $\pm$ 0.00 ^c	1.12 $\pm$ 0.34 ^b
4.44	-	86.67 $\pm$ 5.77 ^b	1.77 $\pm$ 0.02 ^b	0.71 $\pm$ 0.17 ^c
4.44	2.69	90.00 $\pm$ 0.00 ^b	1.92 $\pm$ 0.16 ^b	0.71 $\pm$ 0.07 ^c
8.87	-	93.33 $\pm$ 5.77 ^{ab}	1.76 $\pm$ 0.15 ^b	1.02 $\pm$ 0.05 ^{bc}
8.87	2.69	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	2.63 $\pm$ 0.38 ^a	1.55 $\pm$ 0.11 ^a
13.32	-	93.33 $\pm$ 5.77 ^{ab}	1.97 $\pm$ 0.26 ^b	1.11 $\pm$ 0.04 ^b
13.32	2.69	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	1.97 $\pm$ 0.06 ^b	1.04 $\pm$ 0.11 ^{bc}
F-test		**	**	**
C.V.		5.12	10.43	15.64

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Tukey's HSD test

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาคผนวก ค

น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง ค่า growth index (GI) และ %yield ปริมาณสารฟีนอลโตรีบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH EC₅₀ ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

ตารางผนวกที่ ค.1 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

สิ่งทดลอง	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง	% น้ำหนักแห้ง	% yield
ยอดในสภาพปลอดเชื้อ (g/shoot)	0.31±0.01	0.02±0.00	6.79±0.21 ^{1/d}	19.20±0.60 ^a
รากสะสมอาหารในสภาพธรรมชาติ (g)	97.16±0.03	11.13±0.04	11.66±0.04 ^c	11.41±0.15 ^b
เหง้าอ่อนในสภาพธรรมชาติ (g)	10.51±0.01	2.91±0.04	27.67±0.36 ^a	11.27±0.86 ^b
เหง้าแก่ในสภาพธรรมชาติ (g)	130.67±0.06	33.65±0.19	25.75±0.16 ^b	11.43±0.04 ^b
F-test			**	**
C.V. (%)			1.26	3.99

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวดิ่งตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Tukey's HSD test

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.01)

ตารางผนวกที่ ค.2 ปริมาณสารพินอสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC₅₀) ของยอดกระชายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ รากสะสมอาหาร เหง้าอ่อน และเหง้าแก่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

สิ่งทดลอง	pinostrobin (mg/g dry extract)	total phenolic content (mg GAE/g dry extract)	total flavonoid content (mg QE/g dry extract)	EC ₅₀ (µg/ml)
ยอดในสภาพปลอดเชื้อ	5.15±0.04 ^{1/d}	35.10±1.35 ^c	121.56±1.84 ^c	213.76±8.41 ^a
รากสะสมอาหารในสภาพธรรมชาติ	139.59±0.25 ^b	135.35±4.52 ^b	174.98±3.01 ^b	159.71±3.42 ^b
เหง้าอ่อนในสภาพธรรมชาติ	23.70±0.22 ^c	168.98±6.20 ^a	220.03±7.32 ^a	142.57±1.15 ^c
เหง้าแก่ในสภาพธรรมชาติ	151.65±0.07 ^a	172.21±8.56 ^a	169.65±2.43 ^b	172.35±4.33 ^b
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	0.21	4.52	2.47	2.94

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวดิ่งตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Tukey's HSD test

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.01)

ตารางผนวกที่ ค.3 น้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง ค่า growth index (GI) น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกระชายที่พัฒนามาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 400 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 200 μ M เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Elicitors (μ M)		น้ำหนักสดก่อนการเพาะเลี้ยง	น้ำหนักสดหลังการเพาะเลี้ยง	growth index	น้ำหนักแห้ง	% yield
MeJA	SA	(mg/shoot)	(mg/shoot)	(GI)	(mg/shoot)	
0	0	150.69 $\pm$ 5.85	487.77 $\pm$ 15.00	3.24 $\pm$ 0.18 ^{1/a}	30.98 $\pm$ 0.98 ^a	18.33 $\pm$ 0.19 ^a
200	-	163.90 $\pm$ 15.11	424.53 $\pm$ 30.80	2.59 $\pm$ 0.05 ^b	23.84 $\pm$ 1.30 ^b	14.08 $\pm$ 1.05 ^b
400	-	188.39 $\pm$ 16.66	439.18 $\pm$ 59.08	2.33 $\pm$ 0.27 ^{bc}	23.22 $\pm$ 1.47 ^b	14.91 $\pm$ 1.68 ^b
-	100	154.61 $\pm$ 16.95	330.25 $\pm$ 18.20	2.14 $\pm$ 0.12 ^c	15.86 $\pm$ 0.18 ^c	14.57 $\pm$ 1.44 ^b
-	200	151.07 $\pm$ 16.37	173.18 $\pm$ 6.88	1.15 $\pm$ 0.10 ^d	11.34 $\pm$ 1.58 ^d	14.45 $\pm$ 0.03 ^b
F-test				**	**	**
C.V. (%)				7.01	5.76	7.10

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Tukey's HSD test

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.01)

ตารางผนวกที่ ค.4 ปริมาณสารพินอสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC₅₀) ของยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 400 μ M หรือ SA ความเข้มข้น 100 200 μ M เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ไม่เติมสารกระตุ้น) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Elicitors (μ M)		pinostrobin	total phenolic content	total flavonoid content	EC ₅₀
MeJA	SA	(mg/g dry extract)	(mg GAE/g dry extract)	(mg QE/g dry extract)	(μ g/ml)
0	0	7.35 $\pm$ 0.04 ^{1/d}	47.50 $\pm$ 1.32 ^c	133.18 $\pm$ 3.05 ^b	194.97 $\pm$ 2.27 ^b
200	-	17.97 $\pm$ 0.01 ^a	86.01 $\pm$ 1.33 ^a	166.60 $\pm$ 2.57 ^a	138.27 $\pm$ 3.37 ^d
400	-	17.01 $\pm$ 0.16 ^b	58.96 $\pm$ 0.85 ^b	133.36 $\pm$ 1.90 ^b	180.80 $\pm$ 5.50 ^{bc}
-	100	12.11 $\pm$ 0.01 ^c	57.93 $\pm$ 3.97 ^b	132.50 $\pm$ 4.83 ^b	176.56 $\pm$ 3.99 ^c
-	200	6.09 $\pm$ 0.04 ^e	43.78 $\pm$ 1.24 ^c	57.71 $\pm$ 4.28 ^c	312.89 $\pm$ 11.92 ^a
F-test		**	**	**	**
C.V. (%)		0.61	3.53	2.80	3.19

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Tukey's HSD test

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.01)

ตารางผนวกที่ ค.5 น้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง ค่า growth index (GI) น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกระชายที่พัฒนามาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์

MeJA (μ M)	น้ำหนักสดก่อนการเพาะเลี้ยง (mg/shoot)	น้ำหนักสดหลังการเพาะเลี้ยง (mg/shoot)	growth index (GI)	น้ำหนักแห้ง (mg/shoot)	% yield
0	156.46 $\pm$ 9.14	474.35 $\pm$ 9.13	3.04 $\pm$ 0.12 ^{1/a}	42.12 $\pm$ 0.12 ^a	25.42 $\pm$ 0.44 ^a
50	193.23 $\pm$ 9.32	481.52 $\pm$ 6.37	2.50 $\pm$ 0.11 ^b	30.24 $\pm$ 2.62 ^b	21.05 $\pm$ 0.10 ^b
100	192.98 $\pm$ 20.25	442.95 $\pm$ 23.18	2.30 $\pm$ 0.12 ^b	29.66 $\pm$ 0.99 ^b	20.63 $\pm$ 1.32 ^b
150	184.03 $\pm$ 8.48	428.83 $\pm$ 7.35	2.33 $\pm$ 0.08 ^b	31.10 $\pm$ 2.72 ^b	20.36 $\pm$ 2.62 ^b
200	176.52 $\pm$ 33.89	367.07 $\pm$ 20.98	2.11 $\pm$ 0.27 ^b	20.45 $\pm$ 0.92 ^c	21.03 $\pm$ 0.62 ^b
F-test			**	**	**
C.V. (%)			6.40	5.85	6.24

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Tukey's HSD test

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.01)

ตารางผนวกที่ ค.6 ปริมาณสารพินอสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC₅₀) ของยอดกระชายที่พัฒนามานอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M และ MeJA ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 μ M เป็นเวลา 4 สัปดาห์

MeJA (μ M)	pinostrobin (mg/g dry extract)	total phenolic content (mg GAE/g dry extract)	total flavonoid content (mg QE/g dry extract)	EC ₅₀ (μ g/ml)
0	7.17 $\pm$ 0.35 ^{1/e}	44.41 $\pm$ 4.07 ^c	129.08 $\pm$ 3.15 ^b	231.11 $\pm$ 6.77 ^a
50	7.39 $\pm$ 0.02 ^d	45.54 $\pm$ 0.43 ^c	138.92 $\pm$ 3.59 ^b	178.90 $\pm$ 6.67 ^b
100	7.89 $\pm$ 0.01 ^c	63.97 $\pm$ 1.50 ^b	136.10 $\pm$ 5.54 ^b	163.52 $\pm$ 1.15 ^{bc}
150	9.91 $\pm$ 0.03 ^b	63.42 $\pm$ 0.54 ^b	133.89 $\pm$ 3.34 ^b	167.71 $\pm$ 9.40 ^b
200	15.95 $\pm$ 0.07 ^a	71.50 $\pm$ 1.32 ^a	165.17 $\pm$ 1.94 ^a	149.67 $\pm$ 4.30 ^c
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	0.36	3.56	2.63	3.53

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวดิ่งตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Tukey's HSD test

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.01)

ตารางผนวกที่ ค.7 น้ำหนักสดก่อนและหลังเพาะเลี้ยง ค่า growth index (GI) น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกระชายที่พัฒนามาจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

MeJA (μ M)	elicitation time (weeks)	น้ำหนักสดก่อนการเพาะเลี้ยง (mg/shoot)	น้ำหนักสดหลังการเพาะเลี้ยง (mg/shoot)	growth index (GI)	น้ำหนักแห้ง (mg/shoot)	% yield
0	3	156.67 $\pm$ 6.20	347.42 $\pm$ 4.19	2.22 $\pm$ 0.10 ^{1/d}	41.62 $\pm$ 0.72 ^c	27.34 $\pm$ 0.18 ^a
	4	146.19 $\pm$ 4.29	487.07 $\pm$ 2.16	3.33 $\pm$ 0.11 ^b	55.65 $\pm$ 0.42 ^b	27.36 $\pm$ 0.19 ^a
	5	160.30 $\pm$ 8.19	592.63 $\pm$ 1.79	3.70 $\pm$ 0.19 ^a	64.74 $\pm$ 3.02 ^a	27.31 $\pm$ 0.22 ^a
200	3	154.57 $\pm$ 3.28	259.26 $\pm$ 6.99	1.68 $\pm$ 0.06 ^e	36.31 $\pm$ 1.86 ^d	22.06 $\pm$ 0.70 ^b
	4	164.90 $\pm$ 8.60	417.59 $\pm$ 4.98	2.54 $\pm$ 0.17 ^d	45.28 $\pm$ 0.58 ^c	22.29 $\pm$ 0.80 ^b
	5	159.23 $\pm$ 3.57	468.95 $\pm$ 1.28	2.95 $\pm$ 0.06 ^c	54.97 $\pm$ 1.37 ^b	22.08 $\pm$ 0.06 ^b
F-test				**	**	**
C.V. (%)				4.54	3.23	1.84

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวดิ่งตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Tukey's HSD test

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.01)

ตารางผนวกที่ ค.8 ปริมาณสารพินอสโตรบิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC₅₀) ของยอดกระชายที่พัฒนามนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M NAA ความเข้มข้น 2.69 μ M ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 200 μ M เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

MeJA (μ M)	elicitation time (weeks)	pinostrobin (mg/g dry extract)	total phenolic content (mg GAE/g dry extract)	total flavonoid content (mg QE/g dry extract)	EC ₅₀ (μ g/ml)
0	3	6.86 $\pm$ 0.05 ^{1/c}	38.01 $\pm$ 1.31 ^c	102.08 $\pm$ 2.08 ^c	313.22 $\pm$ 8.05 ^a
	4	7.72 $\pm$ 0.04 ^c	47.64 $\pm$ 3.29 ^b	124.17 $\pm$ 12.71 ^b	180.08 $\pm$ 3.52 ^b
	5	8.71 $\pm$ 0.01 ^{bc}	46.48 $\pm$ 2.44 ^b	126.67 $\pm$ 3.33 ^b	185.28 $\pm$ 3.83 ^b
200	3	11.63 $\pm$ 0.07 ^b	46.94 $\pm$ 0.86 ^b	125.97 $\pm$ 4.88 ^b	179.48 $\pm$ 2.15 ^b
	4	18.34 $\pm$ 0.18 ^a	87.23 $\pm$ 3.39 ^a	195.42 $\pm$ 1.82 ^a	136.51 $\pm$ 1.91 ^c
	5	18.46 $\pm$ 3.30 ^a	84.44 $\pm$ 2.44 ^a	194.44 $\pm$ 4.83 ^a	132.22 $\pm$ 1.84 ^c
F-test		**	**	**	**
C.V. (%)		11.31	4.23	4.25	2.21

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Tukey's HSD test

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.01)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวรัตนพร พระชัย
วันเดือนปีเกิด	23 พฤษภาคม 2538
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2560: วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ทุนการศึกษา	ปีงบประมาณ 2561: ทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อ ระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตามบันทึกข้อตกลงเลขที่ 25/2561

ผลงานทางวิชาการ

รัตนพร พระชัย เยาวพา จิระเกียรติกุล และ ภาณุมาศ ฤทธิไชย. 2562. ผลของ BA และ NAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอดกระชายในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 50 (พิเศษ): 13-16.

รัตนพร พระชัย เยาวพา จิระเกียรติกุล ภาณุมาศ ฤทธิไชย และ อรุณพร อธิรัตน์. 2563. การเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของยอดหัวข้าวเย็นเหนือในสภาพปลอดเชื้อด้วย Methyl Jasmonate และ Salicylic Acid. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. 7: 196-204.