

การขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง และการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของผักตบชวา

Solanum spirale Roxb. ที่เพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย

นางสาวทิพวรรณ คงทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

IN VITRO PROPAGATION AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF
PAK DEED *Solanum spirale* Roxb. CELL SUSPENSION CULTURE

Miss Tippawan Khongthong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Botany

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง และการตรวจสอบ

ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของผักตบ

Solanum spirale Roxb. ที่เพาะเลี้ยงแบบเซลล์

แขวนลอย

โดย

นางสาวทิพวรรณ คงทอง

สาขาวิชา

พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. ยุพิน จินตภากร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. อัญชลี ใจดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. ยุพิน จินตภากร)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกวรรณ เสรีภาพ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมภพ ประธานธูรกิจ)

ทิพวรรณ คงทอง : การขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง และการตรวจสอบความสามารถในการ
ต้านออกซิเดชันของผักตบชว *Solanum spirale* Roxb. ที่เพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย.
(IN VITRO PROPAGATION AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY
OF PAK DEED *Solanum spirale* Roxb. CELL SUSPENSION CULTURE) อ. ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก : ดร. ยุพิน จินตภากร, 85 หน้า.

ส่วนแรกของงานวิจัยนี้ได้ทดลองนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้เพื่อชักนำการ
เกิดยอดและแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง และชิ้นส่วนใบของผักตบชว ในอาหารสูตร MS ร่วมกับสาร
ควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน คือ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
หรือ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) และไซโตไคนิน คือ benzyladenine (BA) หรือ kinetin
พบว่าชิ้นส่วนปล้องที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด
ยอดดีที่สุด คือ 2.83 ± 0.28 ยอดต่อชิ้นส่วนปล้อง ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการ
เจริญเติบโต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเกิดแคลลัสพบได้ทั้งจากชิ้นส่วนปล้อง และชิ้นส่วน
ใบ โดยสามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้มากที่สุดจากชิ้นส่วนปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่
เติม 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้จากอาหารสูตรดังกล่าวมีน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง
เป็น 143.38 ± 11.39 และ 18.53 ± 0.82 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ดังนั้น สำหรับผักตบชวชิ้นส่วนปล้องจึงเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและ
แคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบ ในส่วนที่สองของงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบความสามารถในการ
ต้านออกซิเดชันของเซลล์แขวนลอยของผักตบชวพบว่า เซลล์แขวนลอยมีฤทธิ์ในการขจัดอนุมูล
DPPH ได้สูง อีกทั้งในเซลล์แขวนลอยของผักตบชวยังมีปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์สูงกว่าพืชใน
ธรรมชาติ

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา..... 2555.....

5272323123 : MAJOR BOTANY

KEYWORD : *SOLANUM SPIRALE* ROXB. / PLANT GROWTH REGULATORS / TISSUE CULTURE

TIPPAWAN KHONGTHONG : *IN VITRO* PROPAGATION AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF PAK DEED *Solanum spirale* Roxb. CELL SUSPENSION CULTURE. ADVISOR : YUPYN CHINTAPAKORN, Ph.D, 85 pp.

The aim of the first part in this study was to use tissue culture technique for shoot and callus induction. The internode and leaf explants of pak deed were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of auxins (2,4-D or NAA) and cytokinins (BA or kinetin). The results showed that the most effective plant growth regulator was 0.5 mg/L BA for shoot induction in internode explants, (2.83 ± 0.28 shoots per explant) which was significantly different from the control treatment. Apart from that, callus could be induced from both internode and leaf explants, however, the greatest yield (143.38 ± 11.39 mg FW and 18.53 ± 0.82 mg DW) was obtained from internode explants cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D. Thus, internode explant of Pak deed is the better part for shoot and callus induction than the leaf explant. In the second part of the study, antioxidant activity of cell suspension of Pak deed was determined. The results showed that the cell suspension had high DPPH radical scavenging activity. Moreover, the phenolic and flavonoid contents in cell suspension of Pak deed were higher than the plants *in situ*.

Department : .. Botany .. Student's Signature

Field of Study : .. Botany .. Advisor's Signature

Academic Year : .. 2012

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือ ตลอดการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. อัญชลี ใจดี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ และ รองศาสตราจารย์ ดร.สมภพ ประธานคณาจารย์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ พ่ออินบั้น ทาคำสม หมอพื้นบ้านที่กรุณาให้ความรู้เรื่องสมุนไพรพื้นบ้าน ในระหว่างการเก็บตัวอย่างของผักตบเพื่อใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดีที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการวิเคราะห์ผลทางสถิติให้มีความถูกต้องมากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องอ่านผลปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

ขอขอบคุณเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2554 ภายใต้แผนงานวิจัยอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพและศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CEB_M_77_2011) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนวิจัยในงานวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาสนับสนุนวัสดุและห้องปฏิบัติการวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่าน พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา และญาติพี่น้อง ที่เข้าใจเป็นกำลังใจและช่วยเหลือสนับสนุนทำให้งานวิทยานิพนธ์นี้ประสบความสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 การตรวจเอกสาร.....	4
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของผักตบชวา.....	4
2.2 การใช้ประโยชน์ของผักตบชวา.....	5
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์ และเซลล์พืช.....	6
2.4 อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ.....	25
2.5 อนุมูลอิสระที่ใช้ในการศึกษา.....	32
3 อุปกรณ์และวิธีการศึกษา.....	33
3.1 อุปกรณ์การศึกษา.....	33
3.2 สารเคมี.....	34
3.3 วิธีการศึกษา.....	35
4 ผลการศึกษา.....	42
4.1 ผลของไฮโดรโคตินต่อการชักนำให้เกิดยอดของผักตบชวา.....	42
4.2 ผลของออกซินและไฮโดรโคตินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบชวา.....	42

บทที่	หน้า
4.3 ผลของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักตบเพื่อศึกษาการเติบโต ของเซลล์แขวนลอยและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน.....	48
4.3.1 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยของผักตบ.....	48
4.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH.....	50
4.3.3 ปริมาณฟีนอลิก.....	52
4.3.4 ปริมาณฟลาโวนอยด์.....	54
5 อภิปรายผลการศึกษา.....	56
6 สรุปผลการศึกษา.....	60
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	70
ภาคผนวก ก.....	71
ภาคผนวก ข.....	72
ภาคผนวก ค.....	84
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	85

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	พืชสมุนไพรบางชนิดที่ผลิตสารทุติยภูมิและการประยุกต์ใช้..... 7
2	งานวิจัยที่ชักนำการเกิดยอดในหลอดทดลองเพื่อการขยายพันธุ์พืชสกุล <i>Solanum</i> และสกุลอื่นๆ..... 9
3	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอยของพืชสกุล <i>Solanum</i> และสกุลอื่นๆ..... 14
4	อนุมูลอิสระ..... 25
5	กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ..... 26
6	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา antioxidant activity ของพืชในสกุล <i>Solanum</i> และสกุลอื่นๆ..... 28
7	ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบและปล้องของผักตบชวาในอาหารกึ่งแข็ง MS..... 36
8	ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและปล้องของผักตบชวาในอาหารกึ่งแข็ง MS..... 38
9	ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดของผักตบชวาจากชิ้นส่วนปล้อง..... 44
10	ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบชวาจากชิ้นส่วนปล้อง..... 45
11	ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบชวาจากชิ้นส่วนใบ..... 46
12	ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดของเซลล์แขวนลอย ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ..... 72
13	ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดของเซลล์แขวนลอย ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ..... 76

ตารางที่		หน้า
14	ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดและแห้งของใบและ ลำต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	80
15	ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดและแห้งของใบ จากในธรรมชาติ.....	81
16	ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดและแห้งของ ผักกาดขาว.....	81
17	ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทั้งสดและแห้ง ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ.....	82
18	ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากตัวอย่างสด.....	82
19	ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทั้งสดและแห้ง ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ.....	83
20	ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตัวอย่างทั้งสดและแห้ง.....	83

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	ผักตืด หรือ ต้อยตั้ง..... 4
2	ยาลดไข้ตามภูมิปัญญาชาวบ้านประกอบด้วยใบ และรากผักตืดสด หญ้าปากควาย ต้นตะไคร้ ใบหญ้าแพรก และอ้อยดำนำมาแช่น้ำใช้ลดไข้ในเด็กเล็ก..... 5
3	ปฏิกิริยาการขจัดอนุมูล DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)..... 32
4	การชักนำให้เกิดยอคของผักตืดจากชิ้นส่วนปล้อง..... 47
5	การชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตืดจากชิ้นส่วนปล้อง..... 47
6	การชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตืดจากชิ้นส่วนใบ..... 47
7	การเติบโตของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ..... 48
8	เซลล์แขวนลอยของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโต โตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ..... 49
9	ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดเซลล์แขวนลอยของ ผักตืดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ..... 51
10	ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างแห้งเซลล์แขวนลอยของ ผักตืดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ..... 51

ภาพที่	หน้า	
11	ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากตัวอย่างสดเซลล์แขวนลอยของผักตดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ.....	53
12	ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากตัวอย่างแห้งเซลล์แขวนลอยของผักตดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ.....	53
13	ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตัวอย่างสดเซลล์แขวนลอยของผักตดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ.....	55
14	ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตัวอย่างแห้งเซลล์แขวนลอยของผักตดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ.....	55

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลชั้นนอกสุดซึ่งเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก และมีอิเล็กตรอนเดี่ยวเหลืออยู่บนอะตอมหรือโมเลกุล อิเล็กตรอนเดี่ยวนี้ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรต่ำ และว่องไวต่อการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (โอบา วัชรคุปต์ และคณะ, 2549) อนุมูลอิสระเหล่านี้ได้แก่ superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^{\bullet}), singlet molecular oxygen (1O_2) รวมทั้ง hydroperoxyl radical (HO_2^{\bullet}), nitric oxide radical (\dot{NO}) และ peroxynitrite ($ONOO^-$)

อนุมูลอิสระเกิดได้ทั้งจากกระบวนการออกซิเดชันภายในร่างกาย จากอาหาร หรือจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นสาเหตุประการหนึ่งของปัญหาสุขภาพ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง โรคมะเร็ง โรคความจำเสื่อม โรคเบาหวาน และโรคไขข้ออักเสบ (Chanwitheesuk *et al.*, 2005)

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชันภายในร่างกาย ซึ่งสารเหล่านี้จะเข้าจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปทำลายชั้นไขมัน โปรตีน และสารพันธุกรรมหรือสร้างความเสียหายแก่เซลล์ แต่ถ้าร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจากภายนอกด้วย เช่น จากกระบวนการประกอบอาหาร และจากมลพิษทางสิ่งแวดล้อมจะทำให้ สารต้านออกซิเดชันที่ร่างกายสร้างขึ้นเองไม่เพียงพอในการกำจัดอนุมูลอิสระ ในปัจจุบันได้มีการค้นพบสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เอนไซม์ (enzyme) และโคเอนไซม์ (co-enzyme) บางชนิด เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะพบได้ในผักและผลไม้หลายชนิด (นวลศรี รักจริยธรรม และ อัญชญา เจนวิถีสุข, 2545)

จากงานวิจัยของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ทำการศึกษาวิจัย พบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผักพื้นบ้านซึ่งเป็นส่วนประกอบในอาหารของภาคต่างๆ (Tangkanakul *et al.*, 2006) เช่น ภาคอีสานมีผักสะเม็ก หรือประทัดดอย ผักติ้ว กระโดนน้ำ ส่วนในภาคใต้มีผักยอดมันปู หรือมันอียาง หรือ นกนอนทะเล สะตอ และในภาคเหนือมีผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน คือ ดอกสะแล ผักฮ้วน ผักเชียงดา ขนุนอ่อน นอกจากนี้ยังมีผักพื้นบ้านของภาคกลางที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เช่น ใบชะมวง ใบยอ ผักกระเฉด ซึ่งผักพื้นบ้านเหล่านี้

สามารถรับประทานได้ทั้งแบบสดและแบบนำมาปรุงสุก ล้วนยังคงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอยู่ และจากงานวิจัยทางคลินิกและระบาดวิทยาได้ยืนยันว่า การบริโภค ผัก ผลไม้ ธัญพืชที่ไม่ผ่านการขัดสีและพืชสมุนไพรหลายชนิดจากธรรมชาติเป็นแหล่งสำคัญของ สารต้านออกซิเดชันซึ่งช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังที่กล่าวถึงข้างต้น (ศรีวัฒนา ทรงจิต สมบูรณ์และคณะ, 2548) ดังนั้น การรับประทานอาหารที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน เช่น ผักพื้นบ้านของไทยอย่างสม่าเสมอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพร่างกายให้แข็งแรงได้

ผักตืด (*Solanum spirale* Roxb.) จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae เป็นไม้พุ่ม มีแหล่งการ กระจายพันธุ์ตั้งแต่บริเวณตอนใต้ของประเทศจีน อินเดีย พม่า ไทย ลาว เวียดนาม อินโดนีเซีย ถึง ตอนเหนือของรัฐควีนแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย โดยพบอยู่ในป่าฝนเขตร้อนที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 500-1900 เมตร (Knapp, 2002) สำหรับในประเทศไทยพบได้ในบริเวณ ภาคเหนือโดยนำมาเป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหาร และใช้เป็นยาลดไข้ตามภูมิปัญญาท้องถิ่น (วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก, 2547) และจากข้อมูลการตรวจสอบ ความสามารถในการต้านออกซิเดชันเบื้องต้น พบว่า ผักตืดเป็นผักพื้นบ้านชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระสูง แต่การใช้ประโยชน์ และการเพาะปลูกขยายพันธุ์ผักตดียัง มีน้อยมากในท้องถิ่น

นอกจากนี้ การเลี้ยงเซลล์พืชและเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการที่มีบทบาทสำคัญต่อการศึกษาระบบการทำงานของพืช การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืช และกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งจากรายงานวิจัยมีการศึกษาความสามารถของเซลล์พืชในการสังเคราะห์สาร และสะสมสารภายในเซลล์พืช โดยการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมภายในเซลล์พืช เพื่อนำมาประยุกต์เข้ากับการผลิตสารทุติยภูมิสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ที่สามารถเลือกเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ให้สารออกฤทธิ์ อีกทั้งควบคุมปริมาณและกำหนดระยะเวลาตามแผนการผลิตได้ตามความต้องการของตลาด และใช้ระยะเวลาการเพาะปลูกสั้นกว่าการปลูกแบบดั้งเดิม

ถึงแม้ว่าผักตืดจะเป็นพืชอาหารท้องถิ่นที่มีประโยชน์สามารถต้านออกซิเดชันได้ดี แต่การขยายพันธุ์ด้วยวิธีธรรมชาติยังมีข้อจำกัด โดยจะเพาะปลูกจากเมล็ดได้ในฤดูฝนเท่านั้น นอกจากนี้ ช่วงเวลาที่ผลผักตืดสุกพร้อมที่จะให้เมล็ดสำหรับการเพาะปลูกได้จะเป็นในช่วงฤดูหนาว ดังนั้น จึงสนใจนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาศึกษาเพื่อทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดในหลอดทดลอง และการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตืดเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง

เซลล์แขวนลอย รวมทั้งศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของผักตดที่เพาะเลี้ยงในลักษณะของเซลล์แขวนลอย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด และแคลลัส
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเซลล์แขวนลอยของผักตด

ขอบเขตของการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดยอด และแคลลัส จากชิ้นส่วนปล้อง และใบของผักตด

การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักตดเพื่อศึกษาการเติบโต และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้สูตรอาหารสำหรับการขยายพันธุ์ผักตดในหลอดทดลอง และทราบความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากเซลล์แขวนลอยของผักตด

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ผักตืด (Pak Deed)

ผักตืด หรือ ต้อยตั้ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum spirale* Roxb. จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae เป็นไม้พุ่ม และมีแหล่งการกระจายพันธุ์พบอยู่ในป่าฝนเขตร้อนที่ระดับความสูงประมาณ 500-1900 เมตรจากระดับน้ำทะเล ตั้งแต่ตอนใต้ของประเทศจีน อินเดีย พม่า ไทย ลาว เวียดนาม อินโดนีเซีย ถึงตอนเหนือของรัฐควีนแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย (Knapp, 2002)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของผักตืด

ไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นทรงสี่เหลี่ยมแข็งมีข้อห่างๆ ตั้งตรง สูงประมาณ 1-3 เมตร ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปวงรีหรือรูปวงรีแกมรูปไข่กลับ ใบกว้าง 5-8 เซนติเมตร ยาว 9-15 เซนติเมตร ดอกช่อ ออกเหนือซอกใบ ก้านดอกยาว ดอกย่อยเรียงสลับกับกลีบดอกสีขาว (ภาพที่ 1) ผลรูปทรงกลม ผิวเรียบสีเขียวออกเป็นช่อคล้ายมะเขือพวง เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม ออกดอกในเดือน พฤษภาคม-กรกฎาคม ผลสุกในเดือนธันวาคม-มกราคม



ภาพที่ 1 ผักตืด หรือ ต้อยตั้ง

การจัดจำแนกตามอนุกรมวิธานของผักตบชวา

Kingdom: Plantae

Order: Solanales

Family: Solanaceae

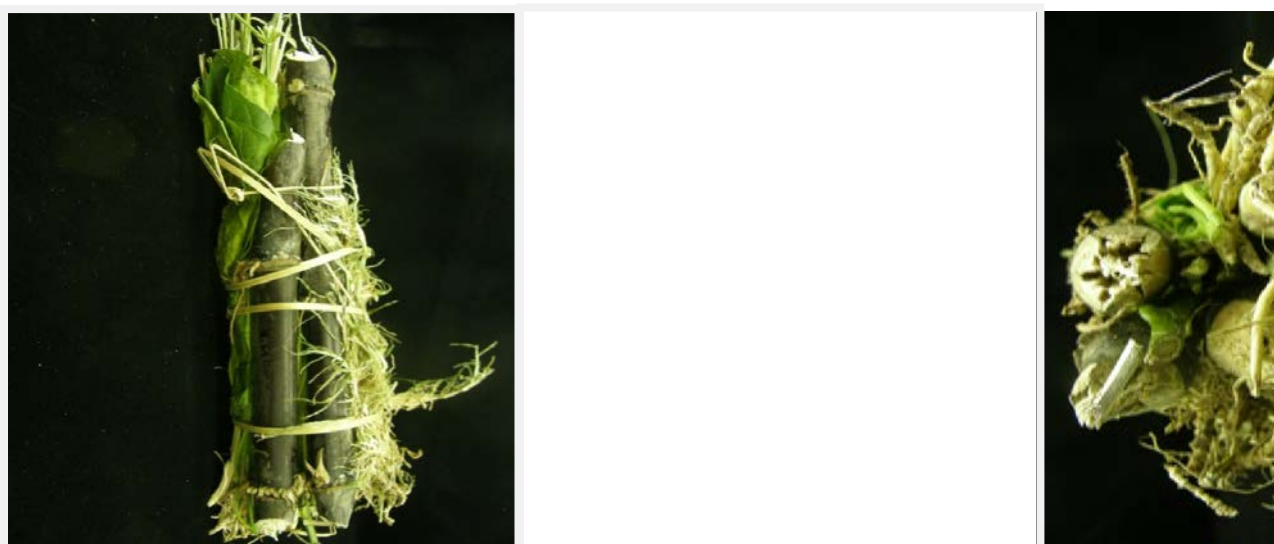
Genus: *Solanum*

Species: *S. spirale*

การใช้ประโยชน์ของผักตบชวา

สำหรับในประเทศไทยพบได้ในบริเวณภาคเหนือ โดยชาวบ้านนำไปอ่อน ยอดอ่อนของผักตบชวาเป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหาร เช่น แกงเห็ดโคน แกงขนุน และเป็นส่วนประกอบในตำรายาลดไข้ตามภูมิปัญญาชาวบ้าน (ภาพที่ 2) มีฤทธิ์เป็นยาเย็น โดยใช้ใบ และรากผักตบชวาสด ร่วมกับหญ้าปากควาย ต้นตะไคร้ ใบหญ้าแพรก และอ้อยดำ นำมาแช่น้ำดื่มใช้ลดไข้ในเด็กเล็ก (วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก, 2547) และในประเทศอินเดียใช้รากเป็นยาขับปัสสาวะ และรักษาอาการ narcotic ส่วนในประเทศลาวนำลำต้นมาแช่น้ำให้เปลือกเปื่อยยุ่ยใช้เป็นยาลดไข้ (Knapp, 2002)

นอกจากนี้ในการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านของ Borkataki และคณะ (2008) ในรัฐอัสสัมของประเทศอินเดีย พบว่าผักตบชวาเป็นพืชที่ปลูกไว้ริมรั้ว (Live fencing หรือ Biofencing)



ภาพที่ 2 ยาลดไข้ตามภูมิปัญญาชาวบ้าน ประกอบด้วยใบ และรากผักตบชวาสด หญ้าปากควาย ต้นตะไคร้ ใบหญ้าแพรก และอ้อยดำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเซลล์พืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคขั้นต้นพื้นฐานในการเพิ่มผลผลิตจากพืช นอกเหนือจากการปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากความสามารถของเซลล์พืชที่มีคุณสมบัติ totipotent จึงสามารถเจริญในอาหารแข็งและอาหารเหลว อีกทั้งเซลล์พืชเป็นแหล่งสำคัญของ เมตาบอลิซึมของเซลล์ (cellular metabolism) เช่น การแบ่งเซลล์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เป็นต้น ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการถ่ายทอดพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกหลาน

พืชสมุนไพรจัดว่าเป็นแหล่งผลิตสารเคมีจากธรรมชาติที่สำคัญในด้านเภสัชกรรม อาหาร เกษตรกรรม ตลอดจนเครื่องสำอางค์ ส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ได้แก่ สารจำพวก อัลคาลอยด์ (alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ฟีนอลิก (phenolic) สเตอรอยด์ (steroid) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoid) น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) เป็นต้น (ตารางที่ 1) สารทุติยภูมิที่ได้จากพืชนั้นส่วนมากมีราคาแพง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่ออกฤทธิ์ต่อกระบวนการชีววิทยาของสิ่งมีชีวิต (biologically active compounds) เช่น ยารักษาโรค สารแต่งกลิ่นอาหาร เป็นต้น ในธรรมชาติพืชจะผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณน้อยมาก ตลอดจนขั้นตอนในการสกัด การแยกสาร และการทำให้สารบริสุทธิ์มักจะต้องยุ่งยากและใช้เวลานาน ดังนั้นการเพิ่มผลผลิตของสารทุติยภูมิเหล่านี้จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจเพื่อแผนการผลิตทางอุตสาหกรรม เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเทียบกับการผลิตจากต้นพืชในธรรมชาติ ดังนี้

1. สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากในพื้นที่จำกัดในระยะเวลาอันสั้น
2. ได้ต้นพืชที่ยังคงลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เดิม
3. ได้ต้นพืชปลอดภัยจากยาฆ่าแมลงศัตรูพืช และโรคพืช
4. ไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมได้แก่ ภูมิอากาศ ศัตรูพืช โรคพืช และฤดูกาล เป็นต้น
5. สามารถควบคุมการผลิตทั้งในด้านปริมาณและเวลาที่ต้องการ ซึ่งนำไปถึงความสามารถควบคุมด้านการตลาดได้ดียิ่งขึ้น

6. สามารถสร้างผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณแน่นอน ซึ่งสามารถคัดเลือกเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์เกาะกลุ่มทำให้ได้โคลนของเซลล์พืชเพาะเลี้ยงที่สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์เป้าหมายได้มากกว่าในพืชจากธรรมชาติ อีกทั้งสามารถชักนำให้เซลล์พืชเพาะเลี้ยงผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการโดยจำเพาะ ประหยัดเวลา และสะดวกต่อกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 1 พืชสมุนไพรบางชนิดที่ผลิตสารทุติยภูมิและการประยุกต์ใช้ (Endress, 1994)

Metabolite	Application	Species
	Drugs	
Ajmalicine	Circulation	<i>Catharanthus roseus</i>
Atropine	Anti-cholinergic	<i>Atropa belladonna</i>
Hyoscyamine		<i>Hyoscyamus</i> spp.
Hyoscine		<i>Datura</i> spp.
Theophylline		<i>Camellia sinensis</i>
Diosgenin	Contraceptive	<i>Dioscorea</i> spp.
Quinine	Anti-malarial	<i>Cinchona</i> spp.
Eugenol	Local anesthetic	<i>Syzygium aromaticum</i>
Morphine	Analgesics	<i>Papaver somniferum</i>
Codeine		
Thebaine		
Digoxin	Cardiatonic	<i>Digitalis</i> spp.
Eucalyptol	Anthelmintic	<i>Artemisia pauciflora</i>
Sabinol		<i>Juniperus Sabina</i>
	Flavours	
Capsaicin	Chilli	<i>Capsicum frutescens</i>
Crocin, picocrocin	Saffron	<i>Crocus sativus</i>
Humulene	Beer	<i>Humulus lupulus</i>
Glycyrrhizin	Licorice	<i>Gycyrrhiza</i>
Vanilin	Vanilla	<i>Vanilla</i> spp.
Quinine	Bittering agent	<i>Cinchona</i> spp.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Metabolite	Application	Species
	Pigments	
Anthocyanins	Red/blue	Grapes (<i>Vitis</i> sp.) Purple maize <i>Beta vulgaris</i>
Antraquinones	Red	<i>Morinda citrifolia</i>
Saffron	Yellow	<i>Crocus sativa</i>
Shikonin	Red	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Xanthophylls	Yellow	<i>Curcuma longa</i>
	Agrochemicals	
Cederene	Repellent	<i>Juniperus virginiana</i>
Nicotine	Insecticides	<i>Nicotiana tabacum</i>
Piperine	Contact insecticides	<i>Piper nigrum</i>
Various pyrethroids		<i>Chrysanthemum</i> spp.

ผักตบชวาเป็นผักพื้นบ้านอีกชนิดหนึ่งชนิดที่มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระสูง แต่จากการค้นคว้าเอกสารที่เกี่ยวข้องของผักตบชวาการใช้ประโยชน์ และการเพาะปลูกขยายพันธุ์ผักตบชวามีน้อยมาก ซึ่งจากรายงานวิจัย ดังตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดที่อ้างถึงการชักนำให้เกิดยอดเพื่อการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองจากพืชสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆ เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นในการดัดแปลงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ผักตบชวาในหลอดทดลอง

ตารางที่ 2 งานวิจัยที่ชักนำการเกิดยอดในหลอดทดลองเพื่อการขยายพันธุ์พืชสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆ

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา/การขยายพันธุ์พืช	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
มะแว้งนก	ปล้อง	shoot direct regeneration	B5 ที่เติม BA 0.5 mg/L	Hassanein and Soltan, 2000
<i>S. surattense</i> Bum.	ปล้อง	shoot direct regeneration	MS ที่เติม BA 0.5 mg/L	Rahman <i>et al.</i> , 2011
<i>S. villosum</i> Mill.	ปล้อง	shoot organogenesis	MS ที่เติม BA 2 mg/L ร่วมกับ NAA 1 mg/L	Hussein and Aqlan, 2011
มะแว้งนก	ใบ	shoot formation	MS ที่เติม kinetin 1.5 mg/L	Bhat <i>et al.</i> , 2010
มะเขือเทศ	ใบ	shoot multiplication	MS ที่เติม BA 2.5 mg/L ร่วมกับ NAA 1.5 mg/L	Khan <i>et al.</i> , 2010
<i>S. villosum</i> Mill.	ใบ	shoot organogenesis	MS ที่เติม BA 2 mg/L ร่วมกับ NAA 1 mg/L	Hussein and Aqlan, 2011

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา/การขยายพันธุ์พืช	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
มะเขือยาว	ใบ	plantlets regeneration	MS ที่เติม BA 0.05 mg/L ร่วมกับ NAA 1 mg/L	Hossain <i>et al.</i> , 2007
<i>Nicotiana tabacum</i> L. สายพันธุ์ SPTG-172	แคลลัส	shoot regeneration	MS ที่เติม BA 2 mg/L ร่วมกับ NAA 0.2 mg/L	Ali <i>et al.</i> , 2007
<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal.	ใบ	shoot organogenesis	MS ที่เติม BA 1 mg/L ร่วมกับ IAA 1 mg/L	Kulkarni <i>et al.</i> , 1996
มะแว้งนก	ข้อ	shoot multiplication	MS ที่เติม BA 1 mg/L	Verma <i>et al.</i> , 2010
มะแว้งนก	ข้อ	shoot multiplication	MS ที่เติม 2,4-D 2.5 mg/L ร่วมกับ NAA 2 mg/L	Khan <i>et al.</i> , 2010
มันฝรั่ง	ข้อ	shoot multiplication	MS ที่เติม BA 2. mg/L	Khan <i>et al.</i> , 2010

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา/การขยายพันธุ์พืช	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
<i>S. sessiliflorum</i> สายพันธุ์ Santa luzia	ข้อ	shoot organogenesis	MS ที่เติม kinetin 0.64 mg/L ร่วมกับ IAA 0.01 mg/L	Boufleuher <i>et al.</i> , 2008
<i>S. sessiliflorum</i> สายพันธุ์ Santa luzia	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	shoot formation	MS ที่เติม kinetin 10 หรือ 20 mg/L ร่วมกับ IAA 0.02 mg/L	Schuelter <i>et al.</i> , 2009
<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal.	ตาข้าง	shoot regeneration	MS ที่เติม BA 1 mg/L ร่วมกับ kinetin 1 mg/L	Sabir <i>et al.</i> , 2007
<i>S. capsicoides</i> All.	ปลายยอด	shoot regeneration	MS ที่เติม BA 2 mg/L	Anish <i>et al.</i> , 2010

การเจริญและการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง

การนำชิ้นส่วนของพืชมาวางเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ในสภาวะปลอดเชื้อ โดยกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์จะถูกกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จากเนื้อเยื่อธรรมดา (organized tissue) เช่น ลำต้น ใบ และราก พัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อที่จะเกิดเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือรากได้โดยตรง หรือไม่ประกอบเป็นอวัยวะ (unorganized tissue) คือ แคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ (undifferentiated mass) เมื่อแคลลัสได้รับอาหาร และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็สามารถเกิดเป็นยอด รากได้ (สมพร ประเสริฐสูงสกุล, 2549)

แคลลัส เป็นกลุ่มเซลล์ที่ประกอบด้วยเซลล์พาเร็นไคมา มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะ หรือ เนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ภายในเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ของแวคิวโอล (vacuole) สูง แคลลัสที่เซลล์เกาะตัวกันแน่น เรียกว่า compact callus ถ้าเซลล์เกาะกันอย่างหลวม อ่อนนุ่ม ชุ่มน้ำ เรียกว่า friable callus (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536) แคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ (pigment) มีเป็นส่วนน้อยที่พบว่ามีสีเขียว สีเหลือง และสีม่วง ซึ่งปริมาณและชนิดของรงควัตถุขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยของแสง อีกทั้งการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ หรือ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536)

เนื้อเยื่อบางชนิดไม่จำเป็นต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชก็สามารถเกิดแคลลัสได้ เนื้อเยื่อดังกล่าว คือ vascular cambium เพราะเซลล์มีการแบ่งตัวในอัตราที่สูง ดังนั้นแคลลัสมักจะเกิดขึ้นมาจากเนื้อเยื่อที่มีส่วนของแคมเบียมรวมอยู่ด้วย เช่น ส่วนของเอมบริโอ ใบเลี้ยง ราก ใบอ่อน ดอกอ่อน เป็นต้น (สมพร ประเสริฐสูงสกุล, 2549)

เซลล์แขวนลอย เป็นเซลล์เดี่ยว หรือกลุ่มของเซลล์ (aggregate cell) ผสมกันในอาหารเหลวที่เขย่าตลอดเวลาซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีนิวเคลียสและไซโทพลาซึมชัดเจน และยังพบอีกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมักสูญเสียความสามารถในการเกิดต้นพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช พืชบางชนิดแม้เลี้ยงในสภาวะเซลล์แขวนลอยก็ยังสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ (Chawla, 2003)

การเจริญของเซลล์แขวนลอยมีลักษณะดังนี้ (Chawla, 2003)

ระยะที่ 1 lag phase เป็นระยะแรกหลังจากเซลล์ได้รับอาหารใหม่ ยังไม่มีการแบ่งเซลล์ ไม่มีการเติบโต มีแต่การเปลี่ยนแปลงทางเคมีเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์

ระยะที่ 2 exponential phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร่งสูงจึงทำให้ได้จำนวนเซลล์มากขึ้นตามไปด้วย

ระยะที่ 3 linear phase เป็นระยะที่เซลล์มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น รวมทั้งเซลล์จะสร้างสารประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์จึงทำให้เซลล์มีน้ำหนักสด และแห้งมากที่สุด

ระยะที่ 4 progressive deceleration phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์และขนาดของเซลล์ลดลง

ระยะที่ 5 stationary phase เป็นระยะที่ไม่มีการเพิ่มจำนวน หรือ ขนาดของเซลล์คงที่แล้ว หยุดการเติบโต

การวัดการเติบโตของเซลล์ วิธีที่ง่ายที่สุด และสะดวกสบายจะใช้วิธีการชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เมื่อสร้างกราฟการเติบโตซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของเซลล์และช่วงเวลาที่เหมาะสม สามารถพบรูปแบบการเติบโตเป็นแบบซิกมอยด์ (sigmoid curve)

สำหรับการศึกษาการเลี้ยงเซลล์พืชและเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆมีรายงานวิจัยดังในตารางที่ 3 ซึ่งเป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิ

ตารางที่ 3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเพาะเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอยของพืชสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆ

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
มันฝรั่ง (<i>S. tuberosum</i> L.)	eye buds	แคลลัส	สารสกัดของแคลลัสมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของเต้านม เม็ดเลือดขาว กล่องเสียง ตับ ปากมดลูก, ลำไส้ใหญ่ และสมอง ให้ค่า IC ₅₀ สูง ดังนี้ คือ 2.7, 3.7, 6.0, 6.7, 10.0, 13.6, และ 22.3 µl/ml ตามลำดับ และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง 76.4% อีกทั้งยังผลิตสาร glycoalkaloid สูงกว่าสารสกัดจากแคลลัส และจากหัวมันฝรั่งในธรรมชาติ	MS ที่เติม IAA 2 mg/L ร่วมกับ BA 0.5 mg/L	Al-Ashaal, 2010
<i>S. chrysotrichum</i> Schldl.	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	เซลล์แขวนลอย	ผลิตสาร antifungal spirostanol saponin (SC-1)	MS ที่เติม 2,4-D 2 mg/L ร่วมกับ kinetin 2 mg/L	Villarreal <i>et al.</i> , 1997
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	แคลลัส	แคลลัสสามารถสะสมสาร gossypol ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.1 mg/L	MS ที่เติม 2,4-D 0.1 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.1 mg/L	Baksha <i>et al.</i> , 2006

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
<i>S. khasianum</i> C. B. Clark.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	ผลิตสาร hydroxycinnamoylamides and α -hydroxyacetovanillone	MS ที่เติมน้ำตาล ซูโครส 1.5% และ 2,4-D 1 mg/L ร่วม กับ kinetin 1 mg/L	Muhlenbeck <i>et al.</i> , 1996
<i>S. hainanense</i> Hance.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	น้ำหนักเซลล์รวม (cell biomass) มากที่สุด 18.47 g ในสัปดาห์ที่ 4 และได้ปริมาณสาร solasodine (121.01 mg/g) สูงกว่ารากจากต้น ในธรรมชาติที่มีอายุ 1 ปี ถึง 6 เท่า	MS ที่เติม 2,4-D 1 mg/L ร่วมกับ BA 0.1 mg/L และน้ำตาล ซูโครส 3%	Loc and Thanh, 2011
<i>S. lyratum</i> Thunb.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	ออกซินมีผลทำให้ปริมาณสาร solanidine และ solasodine สูง และเซลล์มีการเจริญเติบโตได้เร็ว กว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรชุดควบคุม	MS ที่เติม IBA 5 mg/L และ IBA 1 mg/L	Kuo <i>et al.</i> , 2012

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook.f.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	กลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 mm เซลล์จะเติบโตอย่างรวดเร็ว ส่วนการสะสมสาร ก้อนเซลล์ที่มีขนาด 0.5-2 mm ให้ปริมาณสาร triptolide มากที่สุด ในขณะที่ก้อนเซลล์ขนาดเล็ก 0.1-0.5 mm มีการสะสมของคลอโรพลาสต์ได้น้ำหนักมวลรวมต่ำ (cell biomass) และเซลล์เติบโตช้า	PRL-4 medium ที่เติม 2,4-D 2 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.1 mg/L และเติม casein 250 mg/L และน้ำตาลซูโครส 20 g/L	Miao <i>et al.</i> , 2012
<i>Rhodiola sachalinensis</i> A. Bor.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	เซลล์แขวนลอยของกลุ่มก้อน compact callus เพื่อการผลิตสาร salidroside กลุ่มก้อนแคลลัสประกอบด้วย เซลล์รูปทรงกลม ผิวเรียบ มีขนาด 2-7 mm ช่วงการเติบโตของ exponential phase มีระยะเวลาสั้น และมีช่วงของ linear ยาวนานที่สุดในวัฏจักรของการเลี้ยงเซลล์	MS ที่เติม NAA 0.3 mg/L ร่วมกับ BA 3 mg/L และเติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v)	Xu <i>et al.</i> , 1998

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
มะเขือยาว	ใบ	เซลล์แขวนลอย	ชักนำให้เกิด somatic embryogenic	MS ที่เติม NAA 1 mg/L ร่วมกับ BA 0.05 mg/L	Hossain <i>et al.</i> , 2007
<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal.	ใบ	เซลล์แขวนลอย	สภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 10 g/L และ pH 5.8 จะได้เซลล์แขวนลอยมีการเติบโต และมีปริมาณสาร withanolide A สูงสุดในสัปดาห์ที่ 4	MS ที่เติม 2,4-D 2 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.5 mg/L และน้ำตาล ซูโครส 3% (w/v)	Nagella and Murthy, 2010
<i>Nicotiana tabacum</i> L. สายพันธุ์ SPTG-172	ใบ	แคลลัส	การใช้สัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สำเร็จ	MS ที่เติม NAA 3 mg/L ร่วมกับ BA 0.2 mg/L	Ali <i>et al.</i> , 2007

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	ใบ	แคลลัส และเซลล์แขวนลอย	เกิด embryogenic callus ไปเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยซึ่งมีช่วงการเติบโตจำกัด เนื่องจากเกิด browning ระหว่างการเพาะเลี้ยง ดังนั้น จึงต้องมีการย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ เพื่อให้ช่วงเวลากการมีชีวิตของเซลล์ยืดยาวขึ้น	B5 ที่เติม 2,4-D 1 mg/L ร่วมกับ kinetin 1 mg/L และเติมซูโครส 2%	Mousa <i>et al.</i> , 2007
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	ใบ	แคลลัส และเซลล์แขวนลอย	แคลลัสที่ได้มีสีเขียว เซลล์เกาะกันแบบหลวม (friable callus) และเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโต (cell growth) เร็วกว่าแคลลัส อีกทั้งให้ปริมาณสาร asiaticoside (494.62 mg/g) สูงกว่าแคลลัส และส่วนของใบจากธรรมชาติ	MS ที่เติม NAA 1 mg/L ร่วมกับ BA 1 mg/L	Nath and Buragohain, 2005

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
<i>Melastoma malabathricum</i> L.	ใบ	แคลลัส และเซลล์แขวนลอย	สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เลี้ยงแคลลัสเกิดแคลลัสหลวม (friable callus) และจากนั้นเลี้ยงเซลล์แขวนลอยใช้เซลล์เริ่มต้นที่อยู่ในช่วง 0.25-0.5 g ให้น้ำหนักสดสูงถึง 6.150 g ซึ่งเซลล์จะเริ่มเติบโตในช่วงวันที่ 9-15 หลังจากเริ่มทำการเลี้ยง	MS ที่เติม NAA 6 mg/L ร่วมกับ BA 1 mg/L (แคลลัส) MS ที่เติม NAA 0.5 mg/L ร่วมกับ BA 0.25 mg/L (เซลล์แขวนลอย)	Keng <i>et al.</i> , 2008
<i>Saussurea medusa</i> Maxim.	ใบ	แคลลัส และเซลล์แขวนลอย	ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอยต้องใช้แสง Blue light, 3% sucrose กับ 1% glucose และการใช้ NAA ความเข้มข้นสูงจะทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโต และมีปริมาณสารเพิ่มมากขึ้น	MS ที่เติม NAA 0.2 mg/L ร่วมกับ BA 2 mg/L	Zhao <i>et al.</i> , 2001

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
<i>Silybum marianum</i> L.	ใบเลี้ยง	แคลลัส	น้ำหนักมวลรวมของแคลลัสที่ให้ milk clotting peptidases สูงสุดในช่วง exponential phase ในวันที่ 14 และเซลล์เจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ในวันที่ 35 ของการเพาะเลี้ยง	B5 ที่เติม 2,4-D 0.5 mg/L ร่วมกับ BA 0.05 mg/L	Cimino <i>et al.</i> , 2006
<i>Gymnema sylvestre</i> R. Br.	ข้อ และ ปล้อง	แคลลัส และ เซลล์แขวนลอย	สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อน และเซลล์เติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 2-3 สัปดาห์ซึ่งได้น้ำหนักมวลรวมของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยเพิ่มขึ้น	MS ที่เติม 2,4-D 0.5 mg/L ร่วมกับ NAA 2.5 mg/L	Gopi and Vatsala, 2006
<i>Cistanche deserticola</i> Y. C. Ma.	เมล็ด	เซลล์แขวนลอย	เซลล์แขวนลอยมีการเติบโตสูงสุดในวันที่ 21 ได้น้ำหนักแห้งมากที่สุด 8.03 g และมีการสะสมสาร Phenylethanoid glycosides (PeGs) มากที่สุด 97 mg นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์แขวนลอยสามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้มากกว่าใบในหลอดทดลอง และแคลลัสถึง 1.1 และ 2.2 เท่า ตามลำดับ	MS ที่เติม NAA 1 mg/L และ 2,4-D 0.25 mg/L ร่วมกับ BA 2 mg/L และเติมน้ำตาลซูโครส 30 g/L	Cheng <i>et al.</i> , 2005

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
<i>Pueraria candollei</i> var. <i>candollei</i> และ var. <i>mirifica</i>	ราก	เซลล์แขวนลอย	เซลล์แขวนลอยมีการเติบโตเพิ่มขึ้นจนถึง stationary phase ในระยะเวลา 15-24 วัน โดยเซลล์แขวนลอยของ var. <i>mirifica</i> จากรากมีน้ำหนักมวลรวมมากกว่าใบ และลำต้น ตามลำดับ นอกจากนี้เซลล์แขวนลอยมีปริมาณ isoflavonoid สูงกว่าหัวใต้ดินจากธรรมชาติ	MS ที่เติม 2,4-D 1 mg/L	Boonsong-cheep <i>et al.</i> , 2010
<i>Psoralea corylifolia</i> L.	ราก	แคลลัส	แคลลัสจากรากให้ปริมาณสาร isoflavone และ เติบโต (growth index) สูงที่สุด รวมทั้งมีค่า EC ₅₀ 104.89 µg/ml และปริมาณฟีนอลิก 39.00 mg GAE/g dry weight สูงกว่าพืชในธรรมชาติ	สูตร MS ที่เติม IAA 1 mg/L ร่วมกับ BA 1 mg/L	Shinde <i>et al.</i> , 2010

ลักษณะและธรรมชาติของเซลล์พืช

1. ขนาดและความไวต่อแรงเฉือน (shear sensitivity)

เซลล์พืชเพาะเลี้ยงมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 10-100 เท่า กล่าวคือ เซลล์พืชเพาะเลี้ยงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 20-40 ไมโครเมตร และมีความยาวของเซลล์อยู่ในช่วง 100-200 ไมโครเมตร อีกทั้งมีรูปร่างหลากหลาย ตั้งแต่ทรงกลมจนถึงทรงกระบอก ขนาดและรูปร่างแปรตามขั้นของการเจริญ โดยในการเจริญขั้นทวีคูณ (log) เซลล์จะมีแวกิวโอเล็ก ๆ จำนวนมาก และไซโตพลาซึมข้น ขณะที่เมื่อเซลล์แก่จะมีแวกิวโอขนาดใหญ่อันเดียว และไซโตพลาซึมเจือจาง การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนระหว่างแวกิวโอกับของเหลวในเซลล์ทำให้เซลล์ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความดันออสโมติก (osmotic potential) และแรงกดดันทางกายภาพ (physical stress) และอาจเป็นไปได้ที่จะปล่อยของเสียที่สะสมในแวกิวโอ เข้าสู่ไซโตพลาซึม อย่างไรก็ตามลักษณะของผนังเซลล์ซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็นหลัก อันมีคุณสมบัติแข็งและความดึงตัวสูง (high tensile strength) ทำให้เซลล์พืชทนต่อแรงเฉือนต่ำ (low shear resistance) (กนกวรรณ รัตนสินบอล, 2536)

2. การจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ (aggregate formation)

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ปกติเซลล์พืชมักจะจับกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ (clump) ซึ่งอาจมีขนาดตั้งแต่กลุ่มละ 2-300 เซลล์ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช การเปลี่ยนย้ายอาหาร (subculture) สภาพแวดล้อม และองค์ประกอบของอาหาร การจับกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ขนาดใหญ่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่อยู่บริเวณรอบนอกกับเซลล์บริเวณตรงกลางของกลุ่มทั้งในด้านสภาพแวดล้อม การนำสารอาหารเข้าเซลล์ (nutrient uptake) และการหลั่งสารทุติยภูมิ อีกทั้งขนาดใหญ่และมีน้ำหนักกว่าเซลล์เดี่ยวทำให้การแขวนลอยไม่คงตัว ตกตะกอนเร็ว และเมื่อเซลล์เจริญมากขึ้นทำให้เกิดความหนืดสูง (high viscosity) ดังนั้น แรงเฉือนที่เกิดขึ้นต้องไม่รุนแรงจนเซลล์แตก และควรให้การเกิดการขนถ่ายมวล (mass transfer) ได้ดีโดยเฉพาะออกซิเจน

อย่างไรก็ดี การจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ก็อาจมีประโยชน์ในแง่สรีรวิทยาและชีวเคมีของการร่วมกันสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของเซลล์พืช การเกิดความแตกต่างของสภาพแวดล้อมและการแพร่ของสารอาหารอาจทำให้เซลล์บริเวณตรงกลางเกิดการพัฒนา (differentiation) ไปเป็นเซลล์

ป้อน (feeder) ไปกระตุ้นเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ล้อมรอบตัวเอง การแก้ปัญหาการจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ทำได้โดยการแยกเอาเซลล์เดี่ยวจากเซลล์มีไซฟิลลินในแผ่นใบ ทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ เช่น การบดหรือปั่นใบพืช เป็นต้น และวิธีการใช้เอนไซม์เพคตินเนส เป็นต้น

3. ความต้องการออกซิเจน

เซลล์พืชเป็นเซลล์ที่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต แต่เนื่องด้วยอัตราการหายใจของเซลล์ต่ำ จึงต้องการออกซิเจนน้อย (maximum oxygen uptake rate อยู่ในช่วง 1-9 mmol/h) การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแบบเขย่าช่วยให้กลุ่มเซลล์ที่มีเซลล์ต่างชนิดกันผสมกันอยู่ (heterogeneous) กระจายตัวออกจากกันเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ ทำให้ได้รับธาตุอาหาร และออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น (Tapia *et al.*, 2003)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์พืชและเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

1. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

กระบวนการเจริญเติบโตของพืชเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นผลที่เกิดจากสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนิน ซึ่งพืชจะควบคุมระดับของออกซินและไซโตไคนินภายในต้นพืช (hormone autotrophy) ทั้งที่อยู่ในรูป free active และ conjugation (Endress, 1994) เพื่อให้เกิดความสมดุลของระดับฮอร์โมนภายในต้นพืชและฮอร์โมนพืชสังเคราะห์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Robert and Dennis, 2005) ซึ่งถ้าหากสัดส่วนของฮอร์โมนที่อยู่ในต้นพืชสมดุลกับปริมาณของสารสังเคราะห์ที่เติมในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้ขึ้นส่วนของพืชที่ต้องการเลี้ยงเจริญเป็นยอดหรือรากหรือแคลลัสก็ได้

ออกซิน

โดยปกติการเจริญเติบโตและความมีชีวิตของพืชเพาะเลี้ยงเกิดจากการเติมออกซินสังเคราะห์ ได้แก่ 2,4-D และ NAA ซึ่งจะช่วยชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์ RNA ในการตอบสนองของพืชต่อออกซินแต่ละชนิดมีระดับความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกัน เช่น 2,4-D มีความแรงกว่า IAA ถึง 20 เท่า ดังนั้น 2,4-D จึงได้ชื่อว่า dedifferentiating hormone (Endress, 1994)

ไซโตไคนิน

ไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนที่ใช้ร่วมกับออกซินเพื่อส่งเสริมให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัส เซลล์แขวนลอย และอวัยวะ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาแบบทางตรง (George, *et al.*, 2008) เช่น kinetin ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยง ส่วน BA และ Zeatin ช่วยเหนี่ยวนำและเพาะเลี้ยง (maintain) แคลลัสและเซลล์แขวนลอยได้ดี (Endress, 1994)

2. องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง

องค์ประกอบของอาหารได้แก่ แหล่งคาร์บอน และธาตุอาหารต่างๆ มีผลต่อการสังเคราะห์ สารทุติยภูมิ โดยสูตรอาหารที่ให้การเจริญสูงสุดอาจแตกต่างไปจากสูตรอาหารที่ให้การสังเคราะห์ สารทุติยภูมิสูงสุด การที่จะพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิต (production medium) มักมุ่งเน้นไปที่ แหล่งและปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสเฟต (Endress, 1994)

3. ปัจจัยทางกายภาพที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ และเนื้อเยื่อพืช

ปัจจัยทางแสง ประกอบด้วย ช่วงความยาวแสง (day length) ชนิดแสง (light quality) และความเข้มแสง (light intensity) ดังนั้นจึงนิยมเลือกใช้ปัจจัยของช่วงความยาวแสงให้เหมือน สภาพที่พืชนั้นขึ้นอยู่ในธรรมชาติ ความเข้มแสงที่เหมาะสมและนิยมใช้ คือ 1,000-4,000 ลักซ์ ส่วน ชนิดของแสงสีต่างๆจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชที่เลี้ยงต่างกัน เช่น การเกิดยอดหรือรากจากแคลลัสยาสูบ พบว่าแสงสีน้ำเงินและม่วงส่งเสริมการเกิดยอด ในขณะที่แสงสีแดงส่งเสริมการเกิดราก (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2544)

อุณหภูมิและความชื้นภายในห้องเพาะเลี้ยงมีการติดตั้งเครื่องปรับอากาศซึ่งอุณหภูมิที่พอเหมาะอยู่ที่ 24-26 °C ส่วนความชื้นควรมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 70 เพื่อหลีกเลี่ยง การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2544)

นอกจากนี้การให้ออกซิเจนในการเติบโตของเซลล์ และเนื้อเยื่อนิยมวางบนเครื่องเขย่า เพื่อ เพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100-120 รอบต่อนาที (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2544)

อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง (ตารางที่ 4) อิเล็กตรอนเดี่ยวนี้จะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น จึงทำให้อนุมูลอิสระมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($\cdot OH$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี (HO_2^{\cdot}) ซึ่งเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก ขณะที่อนุมูลอิสระที่มีความไวสูงรองลงมา ได้แก่ อนุมูลไนตริกออกไซด์ ($\cdot NO$) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซี โมเลกุลดังกล่าวจะเป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ในร่างกาย ซึ่งการเผาผลาญอาหารประเภทเนื้อสัตว์ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายจะมีของเสียที่เรียกว่าอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก

ตารางที่ 4 อนุมูลอิสระ (โอบา วัชรคุปต์, 2549)

อนุมูลอิสระ	
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide, Superoxide anion	$O_2^{\cdot-}$
Hydroxyl	$\cdot OH$
Hydroperoxyl	HO_2^{\cdot}
Peroxyl	RO_2^{\cdot}
Alkoxy	RO^{\cdot}
Carbonate	$CO_3^{\cdot-}$
Carbon dioxide	$CO_2^{\cdot-}$
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide	$\cdot NO$
Nitrogen dioxide	$NO_2^{\cdot} \cdot NO_2^{\cdot-}$

ตารางที่ 4 (ต่อ)

อนุมูลอิสระ	
Reactive chlorine species (RCS)	
Atomic chlorine	Cl
Others	
Thieryl radical	RS•

การเกิดอนุมูลอิสระ

การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ (นวลศรี รักอริยะธรรม และอัฏฐนา เจนวิถีสุข, 2545)

สารตั้งต้น \longrightarrow R•	โมเลกุลของสารตั้งต้นถูกกระตุ้นด้วยความร้อน แสง หรือได้รับอิเล็กตรอนจากสารรีดิวซิง หรือถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (R•)
$R\bullet + O_2 \longrightarrow ROO\bullet$	อนุมูลอิสระ (R•) ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ อนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล (ROO•)
$ROO\bullet + RH \longrightarrow ROOH + R\bullet_{(ใหม่)}$	อนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลทำปฏิกิริยากับไขมัน (RH) ได้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และอนุมูลอิสระตัวใหม่ (R• _(ใหม่))
$ROO\bullet + ROO\bullet \longrightarrow$ โมเลกุลที่คงตัว	เมื่อใดก็ตามที่อนุมูลอิสระ 2 ตัวมาเจอกันก็จะรวมกันเป็นโมเลกุลที่คงตัว

ผลของอนุมูลอิสระก่อให้เกิดความเสียหายและอันตรายต่อร่างกาย อันนำไปสู่ภาวะพยาธิสภาพของโรคบางโรค หรือเซลล์ทำงานผิดปกติ ซึ่งร่างกายที่มีปริมาณอนุมูลอิสระสะสมอยู่ในระดับสูงทำให้เกิดโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติ โรค

ข้ออักเสบ โรคแก่ก่อนวัย โรคต่อกระดูก โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer) โรคพาร์กินสัน (Parkinson) เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ สารต้านออกซิเดชัน เป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระจากร่างกาย แต่ถ้าในสภาวะที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงมาก (oxidative stress) ระบบสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น ยับยั้งหรือต่อต้านอนุมูลอิสระไม่ทันจะส่งผลกระทบต่อเซลล์ และทำลายเซลล์ในอวัยวะส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ จึงก่อให้เกิดโรดดังที่กล่าวมาข้างต้น

โดยปกติสารต้านอนุมูลอิสระจะมีอยู่ 2 ลักษณะ คือ สารที่พบในร่างกาย และสารที่พบในธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. สารที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase: SOD, catalase: CAT, glutathione peroxidase: GPX, glutathione reductase: GR และ glutathione S-transferase: GST
2. สารที่ไม่เป็นเอนไซม์ เช่น glutathione, lipoic acid, ceruloplasmin, albumin transferring, haptoglobin, hemopexin, uric acid, bilirubin และ cysteine

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติและไม่ได้จัดว่าเป็นเอนไซม์ ได้มาจากการบริโภคผักผลไม้ เช่น วิตามินอี (tocopherols) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) วิตามินซี (ascorbic acid) สารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิกได้แก่ สเตียรอยด์ (steroids) ยูบิควิโนน (ubiquinone) ไทออล (thiols) อินโนซีน (inosine) ทิวรีน (taurine) ไพรูเวต (pyruvate) กรดแกลลิก (gallic acid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น จากรายงานการวิจัยสารสกัดจากพืชสมุนไพร และผักพื้นบ้าน ทั้งพืชเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และพืชในธรรมชาติ (ตารางที่ 6) โดยการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น cytotoxicity antioxidant และ antiparasitic เป็นต้น ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ต่อไป

ตารางที่ 6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา antioxidant activity ของพืชในสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆ

ชื่อพืช	งานวิจัย	ผลการวิจัย	อ้างอิง
<i>S. surattense</i> Bum.	ตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบ ลำต้น ผล และราก	- รากที่สกัดด้วยตัวทำละลาย acetone มีฤทธิ์ในการขจัดอนุมูลอิสระสูง เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS ^{•+} , •OH radical scavenging และ phosphomolybdenum reduction รวมทั้งมีปริมาณฟีนอลิก และ tannin สูงด้วยเช่นกัน - ส่วนสารสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol จากรากและลำต้นมีความสามารถในการ reducing ferric และ metal chelation ได้ดีที่สุด นอกจากนี้พบว่าสารสกัดของรากที่ได้จากตัวทำละลาย acetone และ methanol มีผลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา peroxidation และ antihemolytic activity ซึ่งช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกลูโซของอนุมูลอิสระ	Joseph <i>et al.</i> , 2011
<i>S. nigrum</i> L. และ <i>S. torvum</i> L.	ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านในประเทศอินเดียจากสารสกัดใบและผล	ส่วนผลของ <i>S. torvum</i> ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย chloroform มีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าส่วนผลของ <i>S. nigrum</i> ในขณะที่ส่วนผลของ <i>S. nigrum</i> ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ และ reducing oxidants ที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS ^{•+} สูงที่สุด	Loganayaki <i>et al.</i> , 2010

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อพืช	งานวิจัย	ผลการวิจัย	อ้างอิง
<i>Ocimum sanctum</i> L.	เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนใบ ลำต้น และดอกในธรรมชาติ กับแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ลำต้น และดอก	แคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.1 mg/L ให้เปอร์เซ็นต์ของการชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด 99.1±1.4% และแคลลัสมีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระได้สูงกว่าพืชในธรรมชาติ โดยแคลลัสจากชิ้นส่วนใบมีปริมาณฟีนอลิก 40 mg/ml ของสารสกัด และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้สูงด้วยเช่นกัน	Hakkim <i>et al.</i> , 2007
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	ตรวจสอบปริมาณฟีนอลิก และ antioxidant activity ของสารสกัดจากแคลลัส	ชิ้นส่วนลำต้นที่เลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่เติม NAA 1 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้ำหนักสดมากที่สุด 18.6 g และสารสกัดที่อุณหภูมิ 50 °C จะทำให้ได้ปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด 34.4 mg/g dry weight และมีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระได้สูงกว่าชุดการทดลองอื่น	Celiktas <i>et al.</i> , 2007

ตารางที่ 6 (ต่อ)

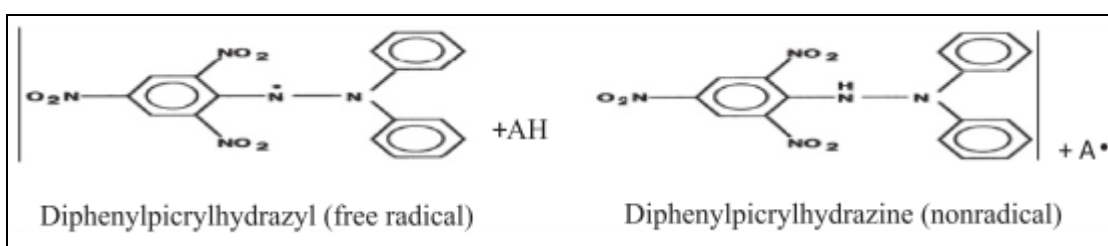
ชื่อพืช	งานวิจัย	ผลการวิจัย	อ้างอิง
<i>Salvia officinalis</i> L.	ตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกของ แคลลัส และเซลล์แขวนลอยจาก ชิ้นส่วนปล้อง	แคลลัส และเซลล์แขวนลอยเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.05 mg/L ร่วมกับ Zeatin 1.5 mg/L ในขณะที่ ปริมาณฟีนอลิกที่สะสมอยู่ในแคลลัสจากอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.05 mg/L ร่วมกับ BA 1.5 mg/L มีปริมาณฟีนอลิกสูง กว่าเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.05 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.5 mg/L	Santos-Gomes <i>et al.</i> , 2003
<i>Salvia officinalis</i> L.	ตรวจสอบ antioxidant activity ของ สารสกัดจากการเพาะเลี้ยงในหลอด ทดลอง และในธรรมชาติ	สารสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol ของ hairy root และรากที่ ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีความสามารถในการ reducing Mo และขจัดอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด ตามลำดับ ใน ขณะที่สารสกัดด้วยตัวทำละลาย acetone ของยอดเพาะเลี้ยง ในหลอดทดลองสามารถต่อต้านปฏิกิริยาการเกิด linoleic acid ได้ดีเท่ากับสารสกัดจากยอด และรากในธรรมชาติ นอกจากนี้ ยังพบว่า hairy root มีปริมาณสาร rosmarinic acid มากที่สุด การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จะเกิด ปฏิกิริยาได้ดี เมื่อสารสกัดที่นำมาทดสอบเป็นพวกมีขี้	Grzegorzcyk <i>et al.</i> , 2007

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อพืช	งานวิจัย	ผลการวิจัย	อ้างอิง
ถั่วเหลือง (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	ศึกษาฤทธิ์ในการขจัดอนุมูลอิสระในเปลือกหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลของถั่วเหลืองที่ผลิตสาร procyanidins	ถั่วเหลืองที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ สีน้ำตาล และสีแดง-น้ำตาลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง ตามลำดับซึ่งให้ผลที่สัมพันธ์กับปริมาณสาร procyanidins ที่พบมากที่สุด ในสายพันธุ์ที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ	Takahata <i>et al.</i> , 2001

อนุมูลอิสระที่ใช้ในการศึกษา

1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH radical) เป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนอยู่ที่ตำแหน่งของไนโตรเจน และมีความเสถียรจากโครงสร้างเรโซแนนซ์ DPPH• มีลักษณะเป็นของแข็งสีม่วง (free radical) เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีเป็นไม่มีสี (non radical) (ภาพที่ 3) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 nm และคำนวณหาค่า EC_{50} (ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของอนุมูล DPPH ลดลงครึ่งหนึ่ง, 50%) ดังนั้น DPPH• รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้สะดวก รวดเร็วและง่ายต่อการทดสอบเบื้องต้น (โสภา วัชรคุปต์, 2549)



ภาพที่ 3 ปฏิกริยาการขจัดอนุมูล DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. อุปกรณ์การศึกษา

- 1.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
 - 1.1.1 ปีกเกอร์ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 ml
 - 1.1.2 ปิเปตขนาด 5 และ 10 ml
 - 1.1.3 กระจกตวงขนาด 25, 50 และ 1,000 ml
 - 1.1.4 ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml
 - 1.1.5 ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ลิตร พร้อมฝาพลาสติกทนความร้อน
 - 1.1.6 แท่งแก้วสำหรับคนสาร
 - 1.1.7 ข้อนตักสาร
 - 1.1.8 ปากคีบ
 - 1.1.9 มีดผ่าตัด พร้อมใบมีดเบอร์ 11
 - 1.1.10 จานแก้ว (petri dish)
 - 1.1.11 อะลูมิเนียมฟอยล์
 - 1.1.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 1.1.13 เตาอบความร้อน (hot air oven)
 - 1.1.14 เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
 - 1.1.15 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)
 - 1.1.16 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
 - 1.1.17 ตู้เย็น (refrigerator)
 - 1.1.18 เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)
 - 1.1.19 กระดาษชั่งสารเคมี
 - 1.1.20 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (balance)
 - 1.1.21 pipette tip ขนาดปริมาตร 200 และ 1,000 μ l

- 1.1.22 micropipette ขนาดปริมาตร 20, 200 และ 1,000 μ l (Gilson, France)
- 1.1.23 ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 1.1.24 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน
- 1.1.25 เครื่องเขย่าแบบวง (orbital platform shaker) ที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที

1.2 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ antioxidant activity

- 1.2.1 96 well plate
- 1.2.2 micro-titer plate reader (BIOTEK[®])
- 1.2.3 กระดาษกรอง Whatman No 1.
- 1.2.4 nylon syringe filter 0.22 μ m
- 1.2.5 syringe ขนาด 5 ml
- 1.2.6 Eppendorf tube ขนาด 2 ml
- 1.2.7 หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 5 ml
- 1.2.8 หลอดทดลอง
- 1.2.9 homogenizer (WiseTis[®])
- 1.2.10 กรวยแก้ว
- 1.2.11 แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์
- 1.2.12 พาราฟิล์ม

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ DPPH scavenging activity

- 2.1.1 absolute ethanol
- 2.1.2 95% ethanol
- 2.1.3 DPPH[·] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
- 2.1.4 methanol

2.1.5 ascorbic acid

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compounds

2.2.1 Folin-Ciocalteu's reagent

2.2.2 gallic acid

2.2.3 2% sodium carbonate (Na_2CO_3)

2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ flavonoid

2.3.1 2% aluminum chloride (AlCl_3)

2.3.2 rutin

3. วิธีการศึกษา

- 3.1 เก็บตัวอย่างผักตัดจากตำบลคูใต้ อำเภอเมือง จังหวัดน่าน โดยเก็บส่วนใบ ดอก และผลมาทำตัวอย่างแห้งเพื่อตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ และเก็บผลแก่เพื่อนำเมล็ดมาใช้ในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง
- 3.2 เพาะเมล็ดผักตัดในหลอดทดลอง
 - 3.2.1 นำเมล็ดผักตัดที่สมบูรณ์ และแก่เต็มที่ ล้างน้ำสะอาด แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย NaOCl 3% เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (ทำในตู้ปลอดเชื้อ)
 - 3.2.2 นำเมล็ดมาวางเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) (ภาคผนวก ก) ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
 - 3.2.3 เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน จนกระทั่งเมล็ดงอกเป็นต้นอ่อนและเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นอ่อนลงเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการทดลอง
- 3.3 ศึกษาผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดของผักตัด
 - 3.3.1 ใช้ตัวอย่างพืชที่เลี้ยงไว้ในข้อ 3.2.3 มาตัดให้ได้ชิ้นส่วนใบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และปล้องขนาด 0.3-0.4 เซนติเมตร เลี้ยง

แยกกันในอาหารกึ่งแข็ง MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนิน ได้แก่ benzyladenine (BA) หรือ kinetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังในตารางที่ 7 ซึ่งมี 11 ชุดการทดลองในแต่ละชั้นส่วน โดยในแต่ละชุดการทดลองมีจำนวนซ้ำละ 10 ชุด (replication) และเลี้ยงเนื้อเยื่อชุดละ 2 ชั้น

- 3.3.2 วางชุดการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์
- 3.3.3 เก็บผลการทดลองโดยบันทึกจำนวนชั้นส่วนใบ หรือ ปล้องที่เกิดยอด จำนวนยอดที่เกิดใหม่ต่อชั้นส่วน น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอด
- 3.3.4 ทำการทดลองจากข้อ 3.3.1-3.3.4 ซ้ำอีกหนึ่งรอบ

ตารางที่ 7 ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ชักนำให้เกิดยอด จากชั้นส่วนใบและปล้องของผักตบชวาในอาหารกึ่งแข็ง MS

ชุดการทดลองที่	ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช	ความเข้มข้น (mg/L)
1	-	0
2	benzyladenine (BA)	0.25
3		0.5
4		1
5		2
6		3
7	kinetin	0.25
8		0.5
9		1
10		1.5
11		2

- 3.4 ศึกษาผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบชว
- 3.4.1 ใช้ตัวอย่างที่เลี้ยงไว้ในข้อ 3.2.3 มาตัดให้ได้ชิ้นส่วนใบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และปล้องขนาด 0.3-0.4 เซนติเมตร เลี้ยงแยกกันในอาหารกึ่งแข็ง MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), BA และ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังในตารางที่ 8 ซึ่งมี 15 ชุด การทดลองในแต่ละชิ้นส่วน โดยในแต่ละชุดการทดลองมีจำนวนซ้ำละ 10 ขวด (replication) และเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละ 2 ชิ้น
- 3.4.2 วางชุดการทดลองแบบ RCBD ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์
- 3.4.3 เก็บผลการทดลองโดยบันทึกจำนวนชิ้นส่วนใบ หรือ ปล้องที่เกิดแคลลัส น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส และบันทึกลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น
- 3.4.4 ทำการทดลองจากข้อ 3.4.1-3.4.2 ซ้ำอีกหนึ่งรอบ

ตารางที่ 8 ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส จากชิ้นส่วนใบและปล้องของผักตบชวาในอาหารกึ่งแข็ง MS

ชุดการทดลองที่	ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช		
	ความเข้มข้น (mg/L)		
	2,4-D	NAA	BA
1	-	-	-
2	0.1	-	0
3			0.25
4			0.5
5			1
6			0
7	1	-	0.25
8			0.5
9			1
10			0
11	2	-	0.25
12			0.5
13			1
14			0.25
15	0.1	1	0.5

- 3.5 เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักตบเพื่อศึกษาการเติบโต และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน
- 3.5.1 ชักน้ำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 mg/L ตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.4 จากนั้นย้ายแคลลัสวางลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.25 mg/L ร่วมกับ BA 0.05 mg/L เพื่อเพิ่มจำนวนแคลลัสสำหรับการทดลอง
- 3.5.2 นำแคลลัสในข้อ 3.5.1 มาเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.25 mg/L ร่วมกับ BA 0.05 mg/L โดยใช้แคลลัส 300 มิลลิกรัมต่ออาหารเหลว 12 มิลลิลิตร ใน flasks ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยวางชุดการทดลองแบบ RCBD ทำการทดลองจำนวน 2 รอบ รอบละ 50 flasks
- 3.5.3 วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 rpm ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน
- 3.5.4 เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอย ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 จำนวน 3 flasks ในแต่ละช่วงเวลา เพื่อศึกษาการเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยบันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง
- 3.5.5 เตรียมสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยในแต่ละช่วงเวลาเช่นเดียวกับ 3.5.4 จำนวน 3 flasks ในแต่ละช่วงเวลา เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างสดจากส่วนใบ และปล้องของผักตบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และใบจากธรรมชาติทั้งตัวอย่างสด และแห้ง โดยนำตัวอย่างสดที่ทราบน้ำหนักมาสกัดด้วย เอทานอล ในสัดส่วน 1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างแห้งที่ทราบน้ำหนักมาสกัดด้วยเอทานอล ในสัดส่วน 1 กรัมต่อ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียด ด้วยเครื่อง homogenizer รอจนกระทั่งตัวอย่างสดตกตะกอน หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้วย micropipette มากรองผ่าน nylon syringe filter 0.22 μ m เก็บสารสกัดตัวอย่างสดและแห้งใน Eppendorf tube ขนาด 2 ml ที่อุณหภูมิ -20 °C จนทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

- 3.5.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity assay (Hatano *et al.*, 1988)
- 3.5.6.1 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM ใน methanol เก็บไว้ในที่มืดโดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ห่อหุ้มและแช่ในตู้เย็น
- 3.5.6.2 เตรียมสารสกัดสดและแห้งจากข้อ 3.5.5 โดยสารสกัดสดให้มีความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/ml และสารสกัดแห้งให้มีความเข้มข้น 2.06, 4.13, 8.25, 16.50, 33.00 mg/ml ด้วย absolute ethanol
- 3.5.6.3 ปิเปตสารสกัดสดและแห้งที่ได้จากข้อ 3.5.6.2 ลงใน 96 well plates ในปริมาตร 100 μ l/well
- 3.5.6.4 เติมสารละลาย DPPH ลงใน 96 well plates ที่มีสารสกัดสดและแห้ง ความเข้มข้นต่างๆ ในปริมาตร 100 μ l/well
- 3.5.6.5 เก็บ 96 well plates ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที
- 3.5.6.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 517 nm ด้วยเครื่อง micro-plate reader
- 3.5.6.7 คำนวณค่า Scavenging activity (%) เพื่อนำไปสร้างกราฟ
- $$\text{Scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$
- 3.5.7 การวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compounds (Slinkard and Singleton, 1977)
- 3.5.7.1 เตรียมสารสกัดสดและแห้งจากข้อ 3.5.5 ให้มีความเข้มข้น 200 mg/ml และ 33 mg/ml ตามลำดับ
- 3.5.7.2 ปิเปตสารสกัดสดและแห้งที่ได้ลงในหลอดทดลอง 100 μ l
- 3.5.7.3 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 ml ลงไป
- 3.5.7.4 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (dilute 3 เท่า) ปริมาตร 100 μ l
- 3.5.7.5 เติมสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 300 μ l

- 3.5.7.6 เก็บหลอดทดลองไว้ในที่มืดโดยการห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 3.5.7.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 670 nm ด้วยเครื่อง micro-plate reader
- 3.5.7.8 บันทึกค่าที่ได้เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณ phenolic compounds ในสารสกัดสดและแห้งโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้ กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid
- 3.5.8 การวิเคราะห์ปริมาณ flavonoid content (Djeridane *et al.*, 2006)
- 3.5.8.1 เตรียมสารสกัดสดและแห้งจากข้อ 3.5.5 ให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml และ 16.50 mg/ml ตามลำดับ
- 3.5.8.2 ปิเปตสารสกัดสดและแห้งลงใน 96 well plate ในปริมาณ 100 μ l
- 3.5.8.3 เติม 2% $AlCl_3$ ลงใน 96 well plate ปริมาตร 100 μ l
- 3.5.8.4 เก็บ 96 well plates ในที่มืดโดยการห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 15 นาที
- 3.5.8.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 433 nm ด้วยเครื่อง micro-plate reader
- 3.5.8.6 บันทึกค่าที่ได้เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณ flavonoid ในสารสกัดสดและแห้งโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย rutin
- 3.6 วิเคราะห์ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง
วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในโปรแกรม SPSS Statistic 17.0 (บริษัท SPSS Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา)

บทที่ 4 ผลการศึกษา

4.1 ศึกษาผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดของผักตบ

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้อง และชิ้นส่วนใบของผักตบ พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงตรงบริเวณรอยตัดทั้งสองข้างของชิ้นส่วนปล้องที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L โดยเกิดยอดขนาดเล็กจำนวนมากติดกันเป็นกลุ่มก้อน ส่วนชุดการทดลองอื่นเกิดยอดใหม่ได้เล็กน้อย เมื่อครบ 6 สัปดาห์ ชิ้นส่วนปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด คือ 2.83 ± 0.28 ยอดต่อชิ้นส่วนปล้อง ซึ่งต่างกับชุดควบคุม และชุดการทดลองอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 4)

ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอด พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.25 mg/L ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดได้ดีที่สุด คือ 51.56 ± 13.29 และ 13.41 ± 3.77 mg ตามลำดับ รองลงมา คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอด คือ 36.29 ± 8.76 และ 10.79 ± 2.63 mg ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ทั้งสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11)

ส่วนเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปล้องที่เกิดยอด พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ถึง 100 % แต่อย่างไรก็ตามในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.25 และ 1 mg/L หรือ kinetin ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mg/L รวมทั้งชุดควบคุมล้วนมีแนวโน้มว่าสามารถเกิดยอดได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11)

ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบนั้นไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ kinetin รวมทั้งชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

4.2 ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบ

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้อง และชิ้นส่วนใบ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เร็วกว่าชุดการทดลองอื่น เมื่อครบเวลา 6 สัปดาห์ ชิ้นส่วนปล้องที่เลี้ยงในอาหารสูตร

นี้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีน้ำหนักรวดและน้ำหนักแห้งได้มากที่สุด คือ 143.38 ± 11.39 และ 18.53 ± 0.82 mg ตามลำดับ (ตารางที่ 10) รองลงมา คือ อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L ให้น้ำหนักรวดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสเฉลี่ย 118.27 ± 18.01 และ 16.93 ± 1.86 mg ตามลำดับ ซึ่งให้ผลแตกต่างกับชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่เกิดแคลลัส

นอกเหนือจากนี้พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็นเซลล์ที่เกาะกันแน่น (compact callus) สีเขียวอ่อน สีเขียว สีเหลืองอ่อน สีนํ้าตาลอ่อน และไม่มีสีอยู่ในก้อนเดียวกัน (ภาพที่ 5) โดยมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปล้องที่เกิดแคลลัส เท่ากับ 93.06 ± 3.94 ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.25 mg/L ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปล้องที่เกิดแคลลัสมากที่สุด คือ 94.12 ± 3.41 อนึ่ง ยังพบว่าชิ้นส่วนปล้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดังต่อไปนี้ ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.25 mg/L หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.25 mg/L ล้วนสามารถให้เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปล้องที่เกิดแคลลัสได้ดีเช่นกัน (ตารางที่ 10)

ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.25 mg/L ให้แคลลัสที่มีน้ำหนักรวดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด คือ 44.07 ± 3.00 และ 8.92 ± 0.56 mg ตามลำดับ (ตารางที่ 11) รองลงมา คือ อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ให้น้ำหนักรวดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสเฉลี่ย 41.37 ± 2.48 และ 8.23 ± 0.43 mg ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในชุดควบคุมไม่เกิดแคลลัส ส่วนชิ้นส่วนใบที่เกิดแคลลัสได้ 100% นั้นพบได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mg/L หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mg/L นอกจากนี้สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L สามารถให้ผลเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่เกิดแคลลัสไม่ต่างกับสูตรอาหารกลุ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นเซลล์ที่เกาะกันแน่น (compact callus) สีน้ำตาลอ่อน สีเหลืองอ่อน และสีเขียวอ่อนพบได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.25 mg/L (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 9 ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดของผักตบชวาจากชิ้นส่วนปล้อง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอดต่อชิ้นส่วนปล้อง)*	น้ำหนักสดของยอดเฉลี่ย (มิลลิกรัม)*	น้ำหนักแห้งของยอดเฉลี่ย (มิลลิกรัม)*	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปล้องที่เกิดยอด*
ชุดควบคุม	2.00±0.15 ^b	5.12±0.57 ^c	1.59±0.22 ^c	91.18±4.77 ^a
BA 0.25 mg/L	1.45±0.23 ^b	51.56±13.29 ^a	13.41±3.77 ^a	85.71±6.27 ^{ab}
BA 0.5 mg/L	2.83±0.28 ^a	36.29±8.76 ^{ab}	10.79±2.63 ^{ab}	100.00±0.00 ^a
BA 1 mg/L	2.00±0.23 ^b	28.99±7.68 ^b	6.16±1.10 ^{bc}	92.31±5.21 ^a
BA 2 mg/L	2.11±0.31 ^b	10.55±2.60 ^c	4.00±1.41 ^c	63.64±7.04 ^c
BA 3 mg/L	1.80±0.24 ^b	7.21±2.13 ^c	2.33±0.66 ^c	70.00±8.17 ^c
kinetin 0.25 mg/L	1.69±0.13 ^b	8.58±1.25 ^c	2.42±0.50 ^c	91.18±4.77 ^a
kinetin 0.5 mg/L	1.63±0.14 ^b	8.46±2.15 ^c	3.08±0.76 ^c	90.00±4.59 ^a
kinetin 1 mg/L	1.76±0.15 ^b	8.63±2.03 ^c	2.62±0.55 ^c	70.59±6.15 ^c
kinetin 1.5 mg/L	2.18±0.19 ^b	9.39±3.09 ^c	1.75±0.34 ^c	73.08±7.20 ^{bc}
kinetin 2 mg/L	1.85±0.26 ^b	6.16±1.51 ^c	1.98±0.47 ^c	67.86±6.65 ^c

* ตัวเลขภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่กำกับตัวเลขในช่องแสดงความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMPT ($P \leq 0.05$) โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 10 ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบชวาจากชิ้นส่วนปล้อง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

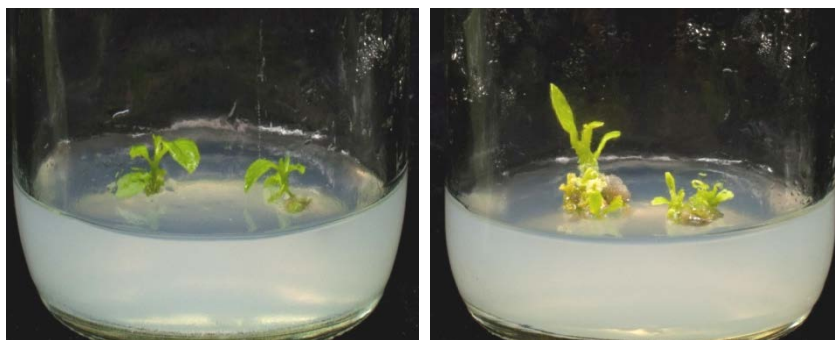
ชุดการทดลอง	น้ำหนักสดแคลลัส (มิลลิกรัม)*	น้ำหนักแห้งแคลลัส (มิลลิกรัม)*	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปล้อง ที่เกิดแคลลัส*	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น
ชุดควบคุม	ND**	ND**	ND**	ไม่เกิดแคลลัส
2,4-D 0.1 mg/L	143.38±11.39 ^a	18.53±0.82 ^a	93.06±3.94 ^a	สีเขียวอ่อน สีเขียว สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน ไม่มีสี
2,4-D 0.1 mg/L+BA 0.25 mg/L	92.33±11.99 ^b	14.28±1.27 ^b	94.12±3.41 ^a	สีเขียวอ่อน สีเขียว สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน
2,4-D 0.1 mg/L+BA 0.5 mg/L	118.27±18.01 ^{ab}	16.93±1.86 ^{ab}	80.88±6.26 ^{ab}	สีเขียวอ่อน สีเขียว สีเหลืองอ่อน
2,4-D 0.1 mg/L+BA 1 mg/L	57.22±10.27 ^c	9.45±1.46 ^c	52.63±6.31 ^{de}	สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน สีเขียวอ่อน สีเขียว
2,4-D 1 mg/L	33.92±3.18 ^{cde}	5.51±0.42 ^{def}	67.50±6.04 ^{bcd}	สีเขียวอ่อน สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน ไม่มีสี
2,4-D 1 mg/L+BA 0.25 mg/L	49.04±4.14 ^{cd}	9.44±0.77 ^c	84.21±5.48 ^{ab}	สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน
2,4-D 1 mg/L+BA 0.5 mg/L	33.99±4.96 ^{cde}	7.13±0.93 ^{cde}	65.91±5.08 ^{bcd}	สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน สีเขียวอ่อน
2,4-D 1 mg/L+BA 1 mg/L	23.20±3.38 ^{de}	4.70±0.57 ^{def}	44.23±5.03 ^e	สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน
2,4-D 2 mg/L	25.04±2.87 ^{de}	3.82±0.37 ^{ef}	85.42±8.40 ^{ab}	สีน้ำตาลอ่อน สีเหลืองอ่อน
2,4-D 2 mg/L+BA 0.25 mg/L	32.64±3.38 ^{cde}	6.54±0.42 ^{cdef}	78.57±5.78 ^{abc}	สีน้ำตาลอ่อน สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน ไม่มีสี
2,4-D 2 mg/L+BA 0.5 mg/L	29.50±4.96 ^{cde}	6.06±0.76 ^{cdef}	70.45±7.40 ^{bcd}	สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน
2,4-D 2 mg/L+BA 1 mg/L	14.87±1.56 ^e	3.42±0.42 ^f	71.43±13.83 ^{bcd}	สีน้ำตาลอ่อน สีเหลืองอ่อน
2,4-D 0.1 mg/L+BA 0.25 mg/L+NAA 1 mg/L	53.75±8.26 ^{cd}	9.42±1.25 ^c	59.72±6.11 ^{cde}	สีเขียวอ่อน สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน
2,4-D 0.1 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 1 mg/L	40.66±4.06 ^{cde}	7.34±0.70 ^{cd}	58.42±9.36 ^{cde}	สีเหลืองอ่อน สีเขียวอ่อน สีเขียว สีน้ำตาลอ่อน

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่กำกับตัวเลขในช่องแสดงความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี DMRT ($P \leq 0.05$) โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; ** ND หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส หมายถึง สีของแคลลัสเรียงลำดับตามการเกิดสีของแคลลัสจากมากไปหาน้อย

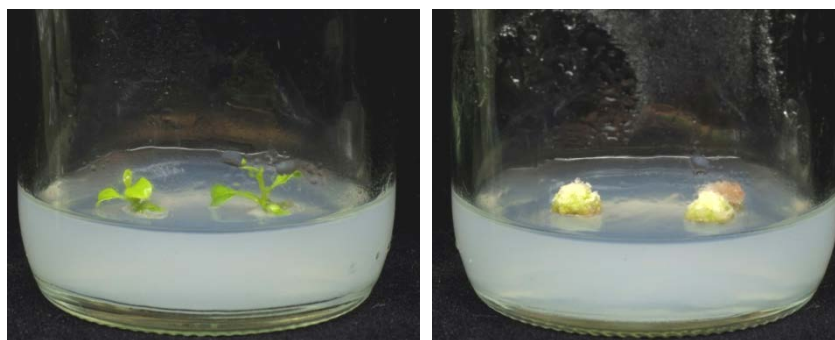
ตารางที่ 11 ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบชวาจากชิ้นส่วนใบ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	น้ำหนักสดแคลลัส (มิลลิกรัม)*	น้ำหนักแห้งแคลลัส (มิลลิกรัม)*	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วน ใบที่เกิดแคลลัส*	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น
ชุดควบคุม	ND**	ND**	ND**	ไม่เกิดแคลลัส
2,4-D 0.1 mg/L	12.16±2.17 ^f	2.82±0.15 ^g	41.67±5.27 ^e	สีน้ำตาลอ่อน
2,4-D 0.1 mg/L+BA 0.25 mg/L	26.98±2.70 ^{cd}	5.83±0.53 ^{bcde}	69.23±7.57 ^d	สีเขียวอ่อน สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน
2,4-D 0.1 mg/L+BA 0.5 mg/L	20.71±1.68 ^{de}	4.50±0.35 ^{ef}	71.88±8.76 ^d	สีน้ำตาลอ่อน สีเหลืองอ่อน สีเขียวอ่อน
2,4-D 0.1 mg/L+BA 1 mg/L	16.89±1.00 ^{ef}	3.46±0.21 ^{fg}	52.78±7.73 ^e	สีเขียวอ่อน สีเหลืองอ่อน
2,4-D 1 mg/L	41.37±2.48 ^a	8.23±0.43 ^a	92.50±3.67 ^{abc}	สีเขียวอ่อน สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน ไม่มีสี
2,4-D 1 mg/L+BA 0.25 mg/L	44.07±3.00 ^a	8.92±0.56 ^a	100.00±0.00 ^a	สีน้ำตาลอ่อน สีเหลืองอ่อน สีเขียวอ่อน
2,4-D 1 mg/L+BA 0.5 mg/L	26.55±1.86 ^{cd}	5.68±0.33 ^{bcde}	100.00±0.00 ^a	สีน้ำตาลอ่อน สีเหลืองอ่อน สีเขียวอ่อน
2,4-D 1 mg/L+BA 1 mg/L	22.40±1.12 ^{de}	5.11±0.27 ^{de}	83.75±4.54 ^{bc}	สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน สีเขียวอ่อน
2,4-D 2 mg/L	34.31±2.52 ^b	6.84±0.49 ^b	100.00±0.00 ^a	สีเขียวอ่อน สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน ไม่มีสี
2,4-D 2 mg/L+BA 0.25 mg/L	33.76±1.61 ^b	6.65±0.27 ^{bc}	100.00±0.00 ^a	สีน้ำตาลอ่อน สีเหลืองอ่อน สีเขียวอ่อน
2,4-D 2 mg/L+BA 0.5 mg/L	28.28±1.66 ^{bcd}	5.92±0.32 ^{bcd}	100.00±0.00 ^a	สีน้ำตาลอ่อน สีเหลืองอ่อน สีเขียวอ่อน
2,4-D 2 mg/L+BA 1 mg/L	25.92±1.88 ^{cd}	5.62±0.37 ^{bcde}	94.74±2.40 ^{ab}	สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน สีเขียวอ่อน
2,4-D 0.1 mg/L+BA 0.25 mg/L+NAA 1 mg/L	24.64±1.54 ^{cd}	5.45±0.32 ^{cde}	85.53±5.17 ^{bc}	สีเขียวอ่อน สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน
2,4-D 0.1 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 1 mg/L	21.15±0.94 ^{cde}	4.48±0.22 ^{ef}	80.56±4.31 ^{cd}	สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน สีเขียวอ่อน

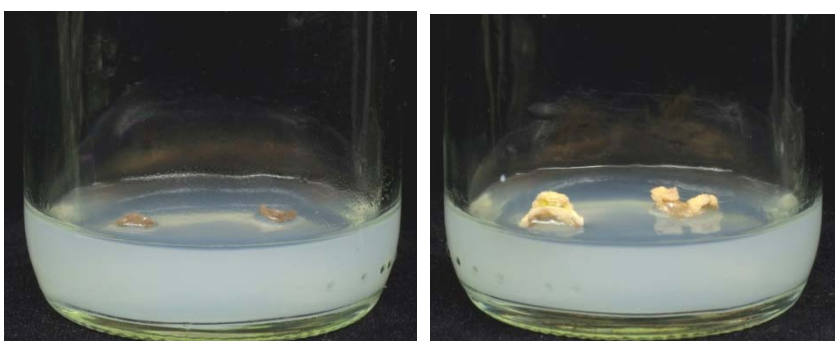
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่กำกับตัวเลขในช่องแสดงความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$) โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; ** ND หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส หมายถึง สีของแคลลัสเรียงลำดับตามการเกิดสีของแคลลัสจากมากไปหาน้อย



ภาพที่ 4 การชักนำให้เกิดยอดของผักตบชวาจากชิ้นส่วนปล้องในอาหารสูตร MS ที่ได้รับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ซ้าย) หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 5 การชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบชวาจากชิ้นส่วนปล้องในอาหารสูตร MS ที่ได้รับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/L (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ซ้าย) หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

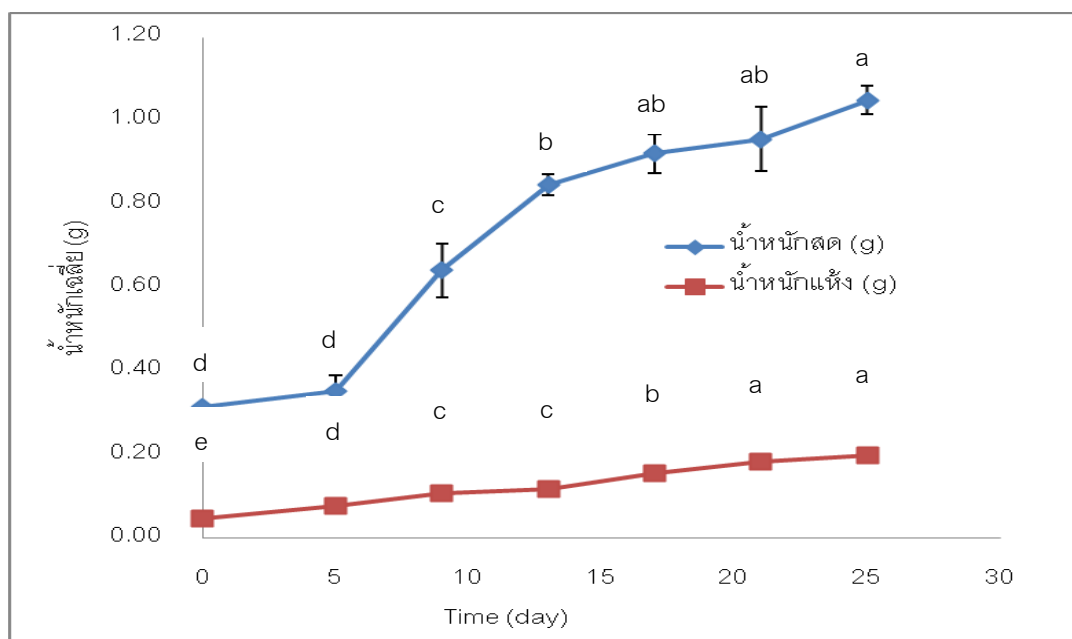


ภาพที่ 6 การชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบชวาจากชิ้นส่วนใบในอาหารสูตร MS ที่ได้รับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.25 mg/L (ขวา) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ซ้าย) หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

4.3 เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักตดเพื่อศึกษาการเติบโต และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

4.3.1 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยของผักตด

เมื่อนำแคลล์จากชิ้นส่วนปล้องมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L และวัดการเติบโตด้วยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (g) ของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 พบว่า กลุ่มเซลล์เริ่มเติบโตมากขึ้น โดยสังเกตจากน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่หลังวันที่ 5 ถึง วันที่ 9 จากนั้นเซลล์เติบโตขึ้นเรื่อยๆ จนมีน้ำหนักสดสูงสุดในวันที่ 17, 21 และ 25 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนน้ำหนักแห้งสูงสุด คือ ในวันที่ 21 และ 25 ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ

ส่วนลักษณะของเซลล์แขวนลอยเป็นกลุ่มก้อนที่เกาะติดกัน และก้อนเซลล์ขนาดเล็กที่แยกออกมาหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลว รวมทั้งเกิดเป็นตะกอนสีน้ำตาลอ่อน ในระยะเริ่มต้นกลุ่มเซลล์แคลลัสส่วนใหญ่มีสีเขียว และหลังจากวันที่ 21 วันจนถึงวันที่ 25 ของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเซลล์ส่วนใหญ่มีสีคล้ำ และเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 8)



วันที่ 0

วันที่ 5

วันที่ 9

วันที่ 13



วันที่ 17

วันที่ 21

วันที่ 25

ภาพที่ 8 เซลล์แขวนลอยของแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ

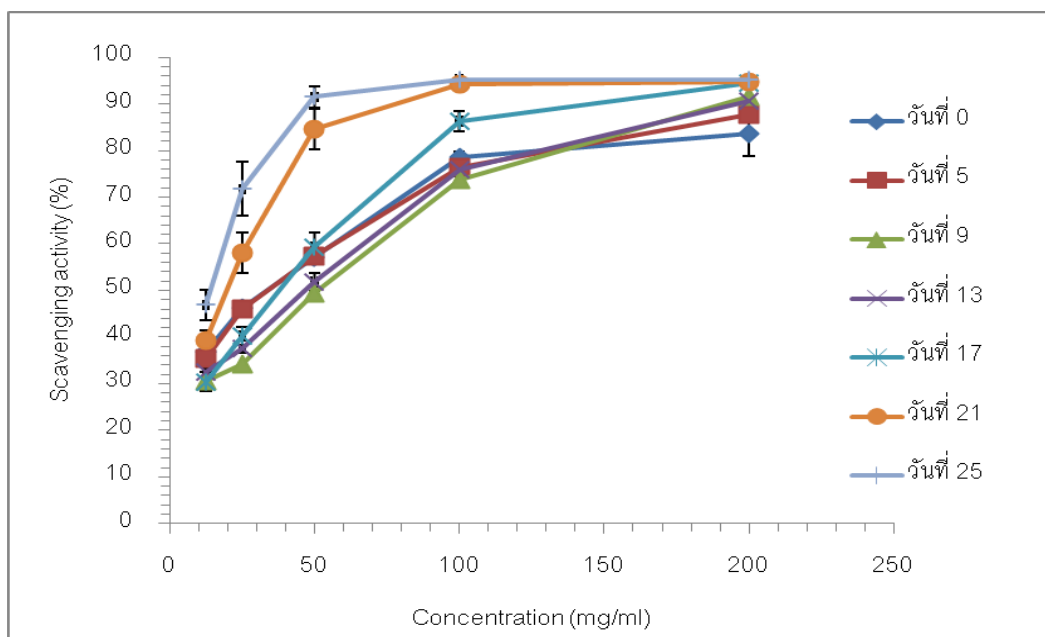
4.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเซลล์แขวนลอย ของผักตืด

4.3.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH

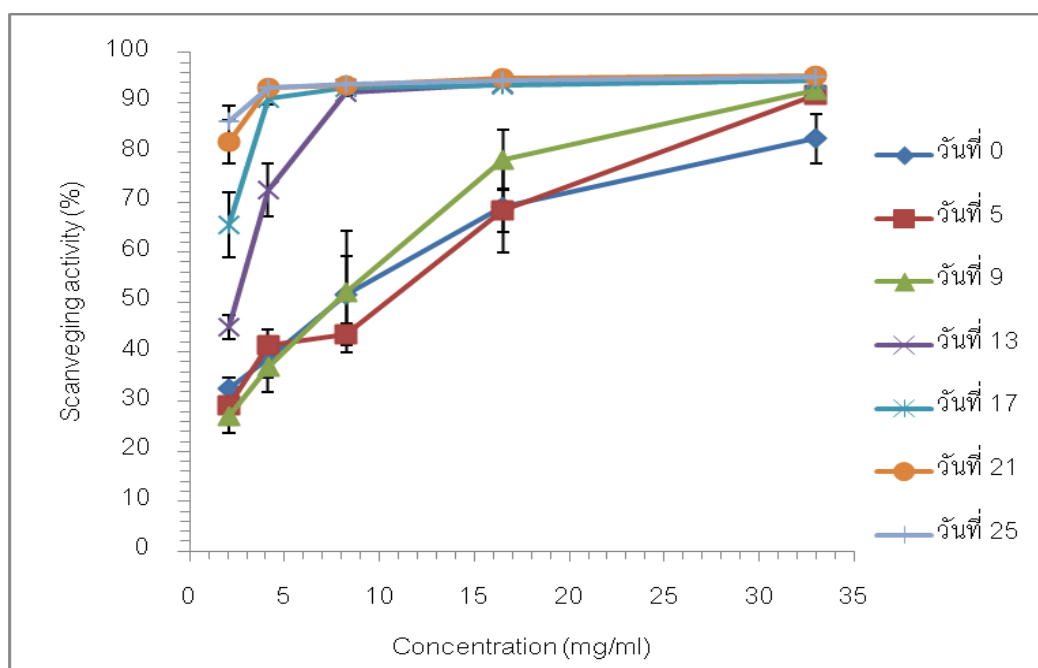
จากการตรวจสอบความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดตัวอย่างสดและแห้งจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L เป็นเวลา 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 พบว่า สารสกัดตัวอย่างสดของเซลล์แขวนลอยในช่วงวันที่ 25 มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุด รองลงมา คือ เซลล์แขวนลอยของวันที่ 21 ซึ่งที่ความเข้มข้น 25 mg/ml ของสารสกัดเซลล์แขวนลอยสามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้มากกว่า 50% และสูงขึ้นเกือบ 100% ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/ml (ภาพที่ 9) ในขณะที่เซลล์แขวนลอยของช่วงวันอื่นที่ความเข้มข้น 50 mg/ml ของสารสกัดเซลล์แขวนลอยสามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้มากกว่า 50% และเพิ่มมากขึ้นเกือบ 100% ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 mg/ml (ภาคผนวก ข ตารางที่ 12)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ระหว่างเซลล์แขวนลอยของผักตืดและตัวอย่างสดใบ และลำต้นของผักตืดจากการเพาะเลี้ยง และใบของผักตืดจากธรรมชาติ รวมทั้งผักเศรษฐกิจ คือ ผักกาดขาว พบว่า ทั้งเซลล์แขวนลอยของผักตืด และผักตืดจากการเพาะเลี้ยง และใบผักตืดจากธรรมชาติ มีความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ได้สูงกว่าผักกาดขาว (ภาคผนวก ข ตารางที่ 14, 15 และ 16)

ส่วนสารสกัดตัวอย่างแห้งของเซลล์แขวนลอยของวันที่ 25, 21 และ 17 มีความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ได้สูงกว่า 50% ที่ความเข้มข้น 2.06 mg/ml ของสารสกัดเซลล์แขวนลอย และสูงเพิ่มขึ้นเกือบ 100% ที่ความเข้มข้น 4.13, 8.25, 16.50 และ 33.00 mg/ml (ภาพที่ 10) ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า เซลล์แขวนลอยของวันที่ 25, 21 และ 17 มีความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH สูงมากเกือบ 100% ส่วนเซลล์แขวนลอยของวันที่ 13 สามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้สูงมากกว่า 70% ที่ความเข้มข้น 4.13 mg/ml ในขณะที่เซลล์แขวนลอยของวันที่ 9, 5 และ 0 สามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้เกือบ 50% ที่ความเข้มข้น 8.25 mg/ml (ภาคผนวก ข ตารางที่ 13)



ภาพที่ 9 ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดเซลล์แขวนลอยของผักตบชวาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ



ภาพที่ 10 ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างแห้งเซลล์แขวนลอยของผักตบชวาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ

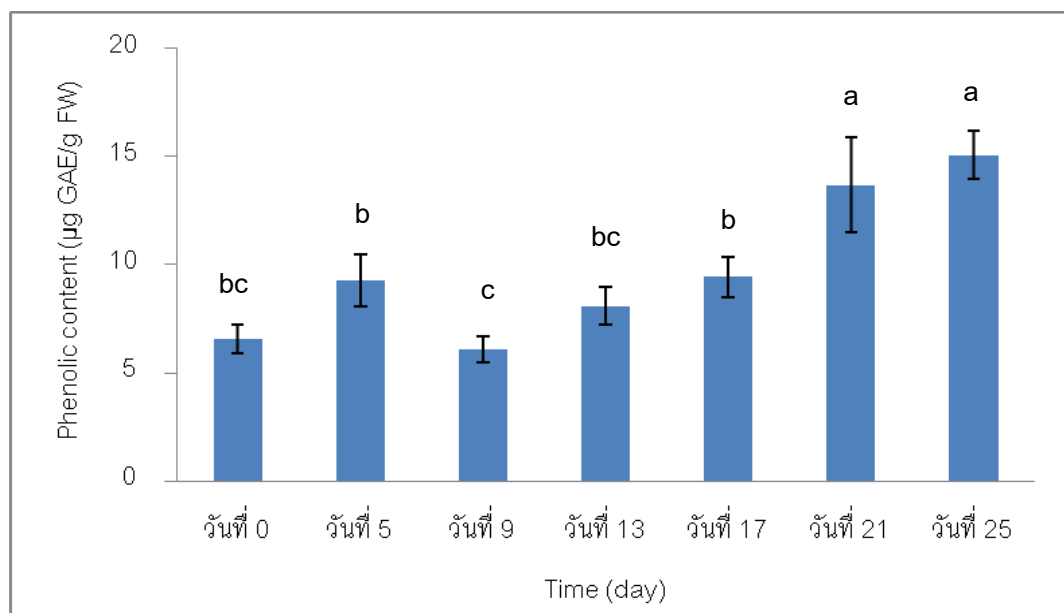
เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของเซลล์แขวนลอยแห้งกับใบ และลำต้นแห้งของผักตบชวาจากการเพาะเลี้ยง และใบแห้งของผักตบชวาธรรมชาติ รวมทั้งผักเศรษฐกิจ คือ ผักกาดขาวแห้ง พบว่า เซลล์แขวนลอยแห้งมีเปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH สูงกว่าผักกาดขาวแห้ง อีกทั้งยังมีความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ได้สูงกว่าใบ และลำต้นแห้งของผักตบชวาจากการเพาะเลี้ยง และใบแห้งของผักตบชวาธรรมชาติ (ภาคผนวก ข ตารางที่ 14, 15 และ 16)

4.3.2.2 ปริมาณฟีนอลิก

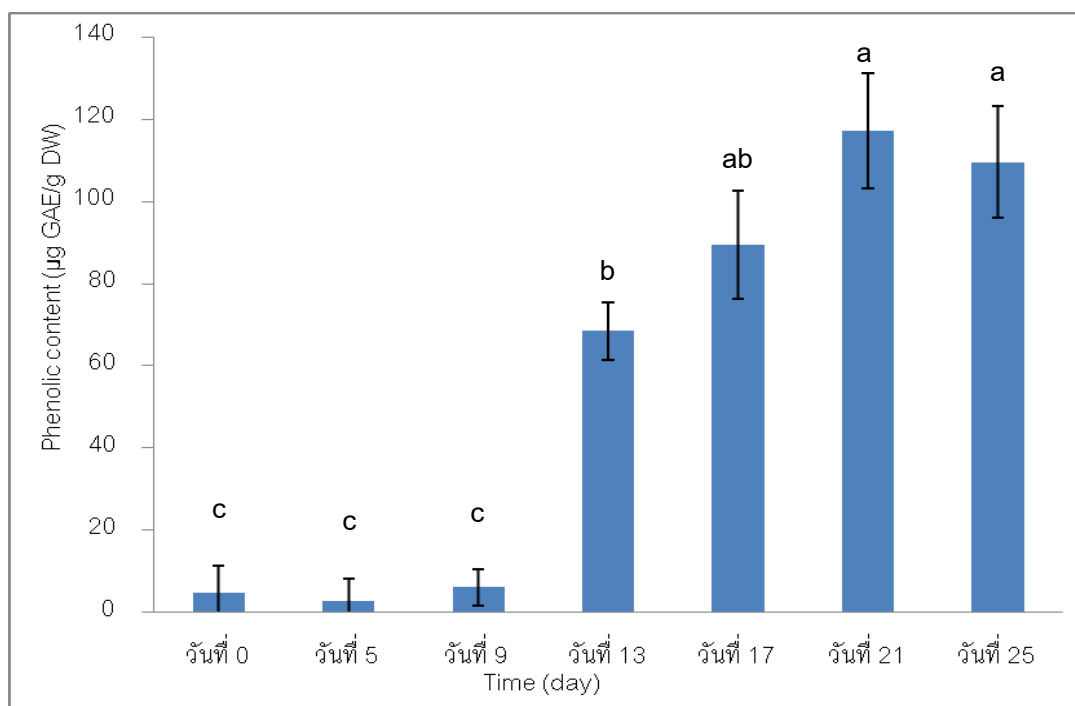
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดตัวอย่างเซลล์แขวนลอยของผักตบชวาแห้งและแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L เป็นเวลา 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 พบว่า สารสกัดตัวอย่างสดของเซลล์แขวนลอยในช่วงวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด คือ 15.08 ± 1.11 μg GAE/g FW รองลงมาคือ ในวันที่ 21 เท่ากับ 13.69 ± 2.21 μg GAE/g FW ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าเซลล์แขวนลอยในช่วงวันอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 11)

ส่วนสารสกัดตัวอย่างแห้งของเซลล์แขวนลอยจะเห็นได้ว่าเริ่มมีการสะสมปริมาณฟีนอลิกตั้งแต่วันที่ 17 ถึง วันที่ 25 โดยเซลล์แขวนลอยในวันที่ 21 มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 117.11 ± 13.98 μg GAE/g DW รองลงมา คือ ในวันที่ 25 เท่ากับ 109.57 ± 13.61 μg GAE/g DW และในช่วงวันที่ 17 ให้ปริมาณฟีนอลิก เท่ากับ 89.53 ± 13.19 μg GAE/g DW ซึ่งมีแนวโน้มว่าจะสามารถสะสมสารฟีนอลิกได้ดีเช่นกัน (ภาพที่ 12)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกในเซลล์แขวนลอยทั้งตัวอย่างสดและแห้งกับสารสกัดตัวอย่างของใบ และลำต้นผักตบชวาจากการเพาะเลี้ยง และใบผักตบชวาธรรมชาติ รวมทั้งผักเศรษฐกิจ คือ ผักกาดขาว พบว่า เซลล์แขวนลอยทั้งตัวอย่างสดและแห้งมีการสะสมปริมาณสารฟีนอลิกได้มากกว่าสารสกัดจากตัวอย่างอื่น (ภาคผนวก ข ตารางที่ 18)



ภาพที่ 11 ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากตัวอย่างสดเซลล์แขวนลอยของผักคัตที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ



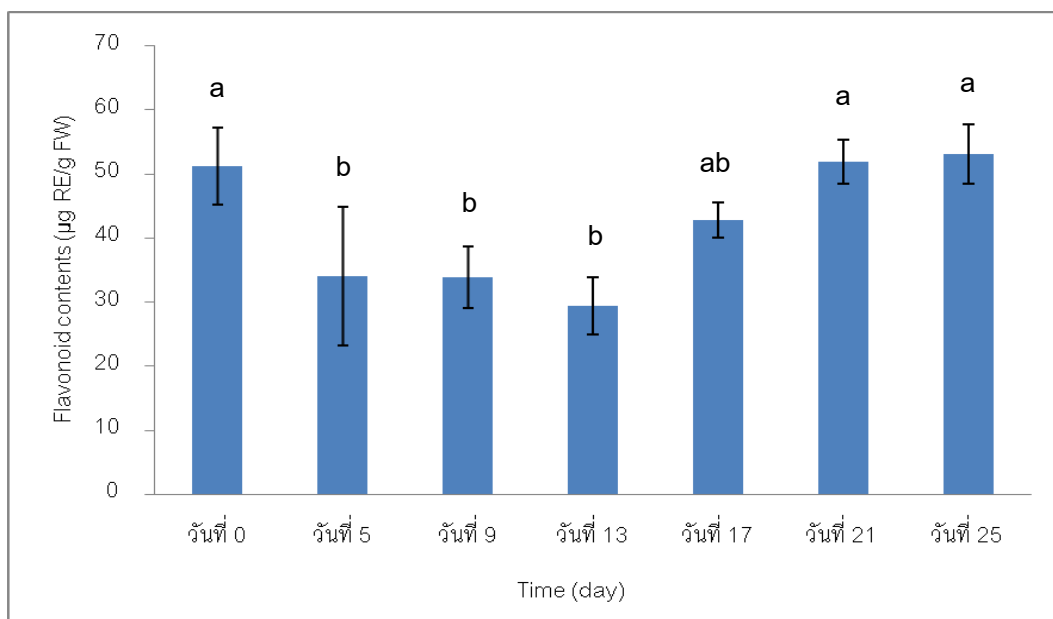
ภาพที่ 12 ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากตัวอย่างแห้งเซลล์แขวนลอยของผักคัตที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ

4.3.2.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์

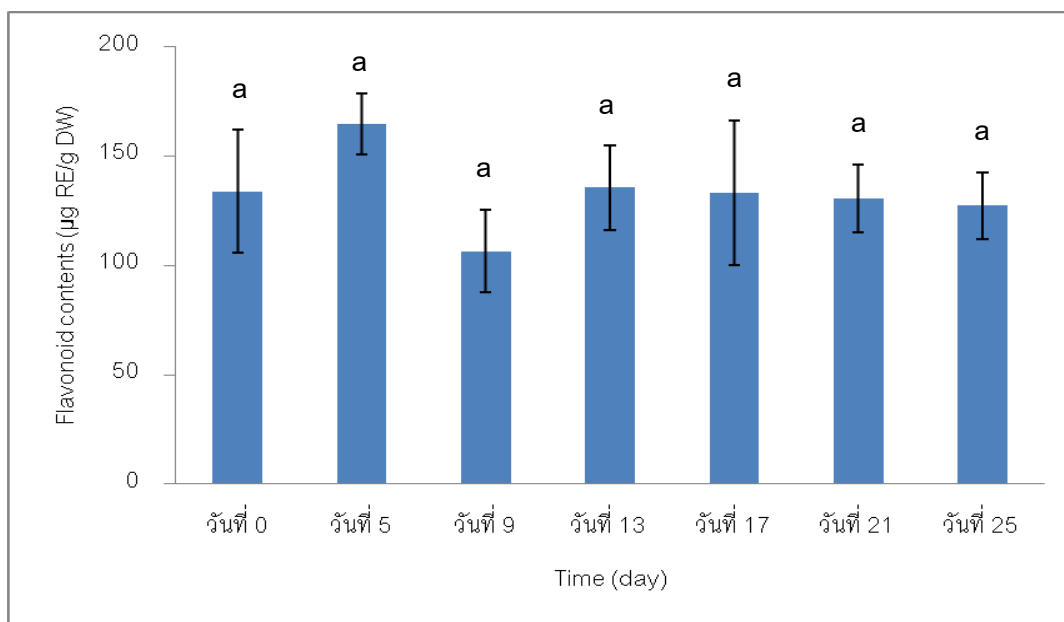
จากภาพที่ 13 จะเห็นได้ว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดตัวอย่างเซลล์แขวนลอย ตัวอย่างสดของผักคัตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L มีการสะสมปริมาณฟลาโวนอยด์สูงตั้งแต่ในช่วงวันที่ 17 จนถึงวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งในช่วงวันที่ 25 มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด เท่ากับ $53.06 \pm 4.65 \mu\text{g RE/g FW}$ รองลงมา คือ วันที่ 21 เท่ากับ $51.94 \pm 3.39 \mu\text{g RE/g FW}$ ในขณะที่ช่วงวันที่ 0 มีปริมาณฟลาโวนอยด์ เท่ากับ $51.26 \pm 5.98 \mu\text{g RE/g FW}$ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงเป็นเวลา 17 วันมีแนวโน้มว่าจะสามารถสะสมฟลาโวนอยด์ได้ดีเช่นกัน

ส่วนสารสกัดตัวอย่างเซลล์แขวนลอยแห้งมีปริมาณฟลาโวนอยด์ในแต่ละช่วงอายุไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเซลล์แขวนลอยแห้งในวันที่ 5 มีแนวโน้มของการสะสมฟลาโวนอยด์มากที่สุด เท่ากับ $164.557 \pm 13.939 \mu\text{g RE/g DW}$ (ภาพที่ 14)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์ของเซลล์แขวนลอยทั้งตัวอย่างสดและแห้ง และสารสกัดตัวอย่างของใบ และลำต้นผักคัตจากการเพาะเลี้ยง และใบผักคัตจากธรรมชาติ รวมทั้งผักเศรษฐกิจ คือ ผักกาดขาว พบว่า เซลล์แขวนลอยจากสารสกัดตัวอย่างสดและแห้งในทุกช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าใบและลำต้นผักคัตจากการเพาะเลี้ยง ใบผักคัตในธรรมชาติ และผักกาดขาว (ภาคผนวก ข ตารางที่ 20)



ภาพที่ 13 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตัวอย่างสดเซลล์แขวนลอยของผักกาดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ



ภาพที่ 14 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตัวอย่างแห้งเซลล์แขวนลอยของผักกาดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.05 mg/L ในช่วงเวลาการเติบโตของวันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25 ตามลำดับ

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

5.1 ศึกษาผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดของผักตบ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ชี้นส่วนปล้องสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่า ชี้นส่วนใบเนื่องจากกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อในชี้นส่วนปล้อง และชี้นส่วนใบมีชนิดของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน โดยชี้นส่วนปล้องมีเนื้อเยื่อชั้น vascular cambium ซึ่งเป็นชั้นเนื้อเยื่อพืชที่มีการแบ่งเซลล์เป็นเนื้อเยื่อเจริญอยู่ตลอดเวลา ส่วนชนิดของเนื้อเยื่อในชี้นส่วนใบนั้น เป็นเนื้อเยื่อถาวร (เทียมใจ คมกฤต, 2549) จึงทำให้ชี้นส่วนปล้องมีความสามารถในการเกิด differentiated เป็นอวัยวะใหม่ได้ง่ายกว่าชี้นส่วนใบ และจากการเพาะเลี้ยงชี้นส่วนใบไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้นั้น อาจเกิดจากชนิดของต้นพืช อายุของต้นพืช และความไม่สัมพันธ์กันระหว่างความเข้มข้นของฮอร์โมนภายใน (endogenous PGR) ของชี้นส่วนใบกับฮอร์โมนสังเคราะห์ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยง (exogenous PGR) (Robert and Dennis, 2005)

การศึกษานี้ให้ผลที่เป็นไปตามรายงานของ Hassanein และ Soltan (2000) และ Rahman และคณะ (2011) ที่พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้ชี้นส่วนปล้องของ *S. nigrum* L. และ *S. surattense* Bum. เกิดยอดใหม่ได้มากกว่าการใช้ kinetin

ส่วนการเพาะเลี้ยงชี้นส่วนใบนั้น พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ซึ่งให้ผลการทดลองที่แตกต่างกับรายงานวิจัยของ Bhat และคณะ (2010) ที่ศึกษาการเกิดยอดใหม่จากชี้นส่วนใบของ *S. nigrum* L. ได้สำเร็จทั้งในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L หรือ kinetin ความเข้มข้น 1.5 mg/L นอกจากนี้ในรายงานวิจัยของ Hussein และ Aqlan (2011) ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากชี้นส่วนใบของ *S. villosum* Mill. พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 mg/L สามารถชักนำการเกิดยอดได้มากที่สุด

5.2 ศึกษาผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบ

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง และชิ้นส่วนใบเกิดจากอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช ซึ่ง 2,4-D จัดเป็น dedifferentiation hormone ทำให้เซลล์พืชสามารถกลับสู่สภาวะที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญอีกครั้ง และไซโตไคนินช่วยส่งเสริมให้เกิดการแบ่งตัว และขยายขนาดของเซลล์เกิดเป็นแคลลัสมากขึ้น (Endress, 1994) ส่วนแคลลัสที่มีสีแตกต่างกันนั้นเกิดจากการสะสมรงควัตถุภายในเซลล์จึงทำให้แคลลัสมีสีเขียว สีเหลือง เป็นต้น อีกทั้งชิ้นส่วนปล้อง และชิ้นส่วนใบประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด จึงทำให้เกิดแคลลัสที่มีสีแตกต่างกันกลายเป็นแคลลัสผสม (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2544) แต่อย่างไรก็ตามยังขึ้นอยู่กับปัจจัยของชนิดของต้นพืช ชนิดและระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ภายในพืช (Robert and Dennis, 2005)

ในขณะที่ Hassanein และ Soltan (2000) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้อง และใบของ *S. nigrum* L. ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/L ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 mg/L และ BA 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 % และได้แคลลัสที่มีน้ำหนักสดถึง 300 mg จากชิ้นส่วนใบ ในขณะที่ Loc และ Thanh (2011) ซึ่งได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของ *S. hainanense* Hance. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 mg/L หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และอาหารสูตรดังกล่าวเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัส

5.3 เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักตบเพื่อศึกษาการเติบโตและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

5.3.1 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยของผักตบ

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในแต่ละช่วงเวลา จะเห็นได้ว่า เซลล์มีการเติบโตเพิ่มมากขึ้นจากวันที่ 0 จนถึงวันที่ 25 ของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย โดย กลุ่มก้อนเซลล์ที่กระจายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงได้รับอาหารและอากาศอย่างทั่วถึง การเติบโตของเซลล์แขวนลอย (ภาพที่ 7) จะเห็นว่า ช่วงระยะเวลาหลังวันที่ 5 จนกระทั่งถึงวันที่ 9 เซลล์มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มมากขึ้นถึง 2 เท่าหลังการเพาะเลี้ยง อาจเนื่องมาจากช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงระยะที่เซลล์เกิดการแบ่ง ตัว เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ตามวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) ด้วยอัตราเร่งซึ่งจะเป็นช่วงระยะ exponential phase จากนั้นเซลล์จะขยายขนาดของเซลล์เพิ่มมากขึ้น (linear phase) ทำให้

น้ำหนักรากและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมากขึ้นตามไปด้วย (Endress, 1994) หลังจากนั้น เซลล์จะเติบโตคงที่ (stationary phase) ในช่วงวันที่ 17, 21 และ 25 วัน และหลังจากช่วงวันที่ 25 เซลล์มีสีคล้ำ และเป็นสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเซลล์ตาย

จากรายงานวิจัยของ Xu และคณะ (1998) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Rhodiola sachalinensis* จากกลุ่มก้อน compact callus มีช่วงการเติบโตของเซลล์ในช่วงของ exponential phase สั้นกว่าช่วงระยะเวลาอื่นๆ ซึ่งมีรูปแบบการเติบโตของเซลล์แขวนลอยของพืชชนิดนี้ใกล้เคียงกับการเติบโตของเซลล์แขวนลอยของผักตบชวา ส่วนจากรายงานวิจัยของ Boonsongcheep และคณะ (2010) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Pueraria candollei* var. *candollei* และ var. *mirifica* พบว่าเซลล์แขวนลอยของทั้งสองสายพันธุ์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นจนถึง stationary phase ในระยะเวลา 15-24 วัน ซึ่งมีช่วงระยะเวลาการเติบโตนานกว่าเซลล์แขวนลอยของผักตบชวา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของชิ้นส่วนพืช ชนิดของพืช และแคลลัส เริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงเซลล์แขวนลอย รวมถึงการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นต้น (Chawla, 2003)

5.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเซลล์แขวนลอยของผักตบชวา

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักตบชวาเพื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน พบว่า เซลล์แขวนลอยในช่วงวันที่ 25 และวันที่ 21 เป็นช่วงเวลาที่เปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุด ตามลำดับ (ภาพที่ 9 และ 10) ซึ่งความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างเซลล์แขวนลอย ทั้งสดและแห้งของผักตบชวา อีกทั้งความสามารถในการต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลาย DPPH เริ่มต้นที่ใช้ทำปฏิกิริยากับสารสกัดตัวอย่างด้วย (Sanchez-moreno, 2002; กมลวรรณ โชติพฤตพิงศ์, 2554) ในขณะที่พบการสะสมฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์มากที่สุดในเซลล์แขวนลอยช่วงวันที่ 25 และวันที่ 21 เช่นเดียวกัน ดังนั้นสารสกัดของเซลล์แขวนลอยสามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น อาจเนื่องมาจากภายในเซลล์แขวนลอยของผักตบชวา มีการสร้างสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยโมเลกุลของสารต้านออกซิเดชันเกิดการให้ไฮโดรเจนอะตอม หรือรับอิเล็กตรอนจึงเป็นผลให้สารละลาย DPPH มีสีจางลง ซึ่งทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ลดลง (Ferreira et al., 2007)

จากการทดลองครั้งนี้ให้ผลที่สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Cheng และคณะ (2005) ศึกษาการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Cistanche deserticola* พบว่า เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 21 ซึ่งมีการสะสมสาร Phenylethanoid glycosides (PeGs) ได้มากที่สุดจึงทำให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันได้สูงกว่าใบในหลอดทดลอง และแคลล์ถึง 1.1 และ 2.2 เท่า ตามลำดับ

นอกจากนี้การที่เซลล์แขวนลอยสดและแห้งของผักตบมีการสะสมของฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์น้อยในช่วงแรกของการเติบโต อาจเนื่องจาก สารชีวสังเคราะห์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ ณ ขณะนั้น เป็นสารปฐมภูมิเป็นส่วนใหญ่ (nucleotide, nucleic acid, amino acid, protein และ carbohydrate) เพื่อการเติบโตของเซลล์เป็นหลัก (Endress, 1994)

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

6.1 ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดของผักตบ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องของผักตบในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 2.83 ± 0.28 ยอดต่อชิ้นส่วนปล้อง

6.2 ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักตบ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบ โดยสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/L สามารถชักนำให้ได้แคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องได้มากที่สุด โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เป็น 143.38 ± 11.39 และ 18.53 ± 0.82 mg ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปล้องที่เกิดแคลลัส 93.06 ± 3.94 ส่วนชิ้นส่วนใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.25 mg/L โดยได้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง คือ 44.07 ± 3.00 และ 8.92 ± 0.56 mg ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่เกิดแคลลัส 100 ± 0.00 โดยทุกสูตรอาหารเหล่านี้ให้ผลที่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6.3 เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักตบเพื่อศึกษาการเติบโต และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

6.3.1 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยของผักตบ

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนปล้องของผักตบมีรูปแบบการเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงหลังวันที่ 5 ถึง วันที่ 9 จากนั้นเซลล์เติบโตขึ้นเรื่อยๆ จนได้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด และคงที่ในวันที่ 21 และวันที่ 25

6.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเซลล์แขวนลอย ของผักตืด

เซลล์แขวนลอยของผักตืดที่เพาะเลี้ยงในช่วงวันที่ 21-25 วัน มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่าผักตืดจากการเพาะเลี้ยง ผักตืดจากในธรรมชาติ และผักกาดขาวซึ่งเป็นผักเศรษฐกิจ และยังมีการสะสมฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ปริมาณสูงในเซลล์แขวนลอยของผักตืดในช่วงวันที่ 21-25 วัน เช่นเดียวกัน

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบของผักตืด ควรจะทดลองเพิ่มเติม โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของไซโตไคนินร่วมกับออกซินในการเลี้ยงชิ้นส่วนใบซึ่งอาจจะช่วยชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้
2. การศึกษาการเติบโตของเซลล์แขวนลอยของผักตืด ควรจะมีการดัดแปลงสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง เพื่อให้ได้แคลลัสที่มีลักษณะเซลล์เกาะกันหลวม ซึ่งจะทำให้กลุ่มเซลล์ได้รับอาหาร และอากาศเพิ่มมากขึ้น
3. การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเซลล์แขวนลอยที่เก็บตัว อย่าง ณ วันที่ 0 ควรจะเก็บตัวอย่างไว้ให้มากกว่าน้ำหนักสดเริ่มต้น (0.3 g) เพื่อให้ง่ายในเตรียมสารสกัดตัวอย่างที่จะนำไปใช้วิเคราะห์ DPPH ปริมาณฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กนกวรรณ รัตนโนบล. 2536. การผลิตสีแอนโธไซยานินจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไผ่เน่า *Vitex glabrata* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- กมลวรรณ โชติพิณพิงค์. 2554. ความสามารถในการขจัดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ของพืชอาหารพื้นบ้านในจังหวัดน่าน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- คำณูญ กาญจนภูมิ. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- เทียมใจ คมกฤส. 2549. กายวิภาคของพฤษ. พิมพ์ครั้งที่ 6. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียน สโตร์.
- วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก. 2547. ตำราการแพทย์พื้นบ้านล้านนา สาขาหมอยา. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ร่วมกับเครือข่ายสุขภาพและหมอเมืองในเขตภาคเหนือตอนใน.
- ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบุญ, ปาจารย์ อับดุลลาฮาซิม และ สุรัตน์ โคมินทร์. 2548. สารต้านอนุมูลอิสระจำเป็นต่อร่างกายอย่างไร. นิตยสารหมอชาวบ้าน. 316: 27-31.
- สมพร ประเสริฐสงสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โพธิ์เพชร.
- โสภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. พี. เอส. พรินท์: กรุงเทพฯ.

ภาษาอังกฤษ

- Al-Ashaal, H. A. 2010. Regeneration *in vitro* glycoalkaloids production and evaluation of bioactivity of callus methanolic extract of *Solanum tuberosum* L. **Fitoterapia**. 81: 600-606.
- Ali, G., Hadi, F., Ali, Z., Tariq, M., and Ali, M. K. 2007. Callus induction and *in vitro* complete plant regeneration of different cultivars of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) on media of different hormonal concentrations. **Biotechnology**. 6: 561-566.
- Anish, N. P., Rajesh, M. G., Elias, J., and Jayan, N. 2010. *In vitro* propagation of *Solanum capsicoides* All. An important therapeutic agent Kantakari. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. 20: 179-184.
- Baksha, R., Mavlanov, G. T., Nasirova, G. B., and Djataev, S. A. 2006. Gossypol accumulation and morphogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) callus culture. **Journal of Biological Sciences**. 6: 1126-1129.
- Bhat, M. A., Mujib, A., Junaid, A., and Mahmooduzzafar. 2010. *In vitro* regeneration of *Solanum nigrum* with enhanced solasodine production. **Biologia Plantarum**. 54: 757-760.
- Boonsongcheep, P., Korsangruang, S., Soonthornchareonnon, N., Chintapakorn, Y., Saralamp, P., and Prathanturarug, S. 2010. Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension culture. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**. 101: 119-126.
- Borkataki, S., Chutia, M., and Borthakur, S. K. 2008. Ethnobotany of biofencing among teagarden and ex-teagarden communities of Nagaon district of Assam. **Indian Journal of Traditional Knowledge**. 7: 666-668.
- Boufleuher, L. M., Schuelter, A. R., Luz, C. L., Da Luz, C. L., Antes, V. A., Stefanello, S., Comerlato, A. P., and Otoni, W. C. 2008. *In vitro* propagation of *Solanum sessiliflorum* as affected by auxin and cytokinin combinations and concentrations. **Asian Journal of Plant Sciences**. 7: 639-646.

- Celiktas, O. Y., Nartop, P., Gurel, A., Bedir, E., and Sukan, F. V. 2007. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* calli. **Journal of Plant Physiology**. 164: 1536-1542.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., and Rakariyatham, N. 2005. Screening of antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**. 92: 491-497.
- Chawla, H. S. 2003. **Plant Biotechnology A Practical Approach**. Science Publishers, Inc. USA. pp 87-91.
- Cheng, X. Y., Wei, T., Guo, B., Ni, W., and Liu, C. Z. 2005. *Cistanche deserticola* cell suspension cultures: Phenylethanoid glycosides biosynthesis and antioxidant activity. **Process Biochemistry**. 40: 3119-3124
- Cimino, C., Cavalli, S. V., Spina, F., Natalucci, C., and Priolo, N. 2006. Callus culture for biomass production of milk thistle as a potential source of milk clotting peptidases. **Electronic Journal of Biotechnology**. 9: 237-240.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**. 97: 654-660.
- Endress, R. 1994. **Plant Cell Biotechnology**. Macmillan India, Berlin Heidelberg, Germany.
- Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., and Barros, L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**. 100: 1511-1516.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. 1963. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. **Experimental Cell Research**. 50: 151-158.
- George, E. F., Hall, M. A., and Klerk, Geert-Jan. D. 2008. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd edition. Volume 1. The background. Published by Springer, Netherlands.

- Gopi, C., and Vatsala, T. M. 2006. *In vitro* studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre* R. Br. **African Journal of Biotechnology**. 5: 1215-1219.
- Grzegorzczuk, I., Matkowski, A., and Wysokinska, H. 2007. Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. **Food chemistry**. 104: 536-541.
- Hakkim, F. L., Shankar, C. G., and Girija, S. 2007. Chemical composition and antioxidant property of Holy Basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems and inflorescence and their *in vitro* callus cultures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55: 9109-9117.
- Hassanein, A. M., and Soltan, D. M. 2000. *Solanum nigrum* is a model system in plant tissue and protoplast cultures. **Biologia Plantarum**. 43: 501-509.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., and Okuda, T. 1988. Two new flavanoids and other constituents in licorice root: Their relative astringency and radical scavenging effects. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 36: 1090-2097
- Hossain, M. J., Raman, M., and Bari, M. A. 2007. Establishment of cell suspension culture and plantlet regeneration of Brinjal (*Solanum melongena* L.). **Journal of Plant Sciences**. 2: 407-415.
- Hussein, E. A. and Aqlan, E. M. 2011. Regeneration of *Solanum villosum* Mill. via direct organogenesis *in vitro* : A novel study. **International Journal of Botany**. 7: 177-182.
- Joseph, J. M., Sowndhararajan, K., Rajendrakumaran, D., and Manian, S. 2011. *In vitro* antioxidant potential of different parts of *Solanum surattense* Burm. f. **Food Science Biotechnology**. 20: 477-483.
- Khan, F., Gilani, K., Younas, A., Munnawar, M., and Yousaf, Z. 2010. The effect of different physical and chemical factors on *in vitro* growth of some member of family Solanaceae. **Journal of Life Sciences**. 1: 30-36.

- Keng, C. L., See, K. S., Hoon, L. P., and Lim, B. P. 2008. Effect of plant growth regulators and subculture frequency on callus culture and the establishment of *Melastoma malabathricum* cell suspension cultures for the production of pigments. **Biotechnology**. 7: 678-785.
- Knapp, S. 2002. Solanum section Geminata (Solanaceae). **Flora of Neotropica**. 84: 1-405.
- Kulkarni, A. A., Thengane, S. R., and Krishnamurthy, K. V. 1996. Direct *in vitro* regeneration of leaf explants of *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Plant Science**. 119: 163-168.
- Kuo, C. L., Chao, C. H., and Lu, M. K. 2012. Effects of auxins on the production of steroidal alkaloids in rapidly proliferating tissue and cell cultures of *Solanum lyratum*. **Phytochemical Analysis**. 23: 400-404.
- Loc, N. H. and Thanh, L. T. H. 2011. Solasodine production from cell culture of *Solanum hainanense* Hance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 16: 581-586.
- Loganayaki, N., Siddhuraju, P., and Manian, S. 2012. Antioxidant activity of two traditional Indian vegetable : *Solanum nigrum* L. and *Solanum torvum* L. **Food Science Biotechnology**. 19: 121-127.
- Maheshwari, P., and Kovalchuk, I. 2011. Efficient shoot regeneration from intermodal explants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoids*. **New Biotechnology**. 28: 778-787.
- Miao, G. P., Zhu, C. S., Feng, J. T., Han, J., Song, X. W., and Zhang, X. 2012. Aggregate cell suspension cultures of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. for triptolide, wilforgine and wilforine production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**.
- Mousa, N. A., Siaguru, P., Wiryowidagdo, S., and Wagih, M. E. 2007. Establishment of regenerative callus and cell suspension system of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) for the production of the sweetener glycyrrhizin *in vitro*. **Sugar Technology**. 9: 72-82.

- Muhlenbeck, U., Kortenbusch, A., and Barz, W. 1996. Formation of Hydroxycinnamoylamides and α -Hydroxyacetovanillone in cell cultures of *Solanum khasianum*. **Phytochemistry**. 42: 1573-1579.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**. 15: 473-497.
- Nagella, P., and Murthy, H. N. 2010. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. **Bioresource Technology**. 101: 6735-6739.
- Nath, S., and Buragohain, A. K. 2005. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Centella asiatica*. **Biologia Plantarum**. 49: 411-413.
- Rahman, M. M., Amin, M. N., Islam, Md. Z. and Sultana, R. S. 2011. Mass propagation of *Solanum surattense* Bum. using direct adventitious shoot organogenesis from internode. **Acta agriculturae Slovenica**. 97: 11-17.
- Robert, N. T. and Dennis, J. G. 2005. **Plant Development and Biotechnology**. CRC Press, New York.
- Sabir, F., Sangwan, N. S., Chaurasiya, N. D., Misra, L. N., Tuli, R., and Sangwan, R. S. 2007. Rapid micropropagation of *Withania somnifera* L. accessions from axillary meristems. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**. 13: 123-133.
- Sanchez-Moreno, C. 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**. 8: 121-137.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., and Fernandes-Ferreira, M. 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspension of sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Plant Physiology**. 160: 1025-1032.
- Schuelter, A. R., Grunvald, A. K., Amaral Junior, A. T., Da Luz, C. L., Luz, C. L., Goncalves, L. M., Stefanello, S., and Scapim, C. A. 2009. *In vitro* regeneration of cocona (*Solanum sessiliflorum*, Solanaceae) cultivars for commercial production. **Genetics and Molecular Research**. 8: 963-975.

- Shinde, A. N., Malpathak, N., and Fulzele, D. P. 2010. Determination of isoflavone content and antioxidant activity in *Psoralea corylifolia* L. callus culture. **Food Chemistry**. 118: 128-132.
- Slinkard, K., and Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**. 28: 49-55.
- Takahata, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Furuta, S., Takahashi, M., and Suda, I. 2001. Highly polymerized procyanidins in Brown soybean seed coat with a high radical scavenging activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 5843-5847.
- Tangkanakul, P., Trakoontivakorn, G., Auttaviboonkul, P., Niyomvit, B., and Wongkrajang, K. 2006. Antioxidant activity of northern and northeastern Thai foods containing indigenous vegetables. **Kasetsart Journal-Natural Science**. 40: 47-58.
- Tapia, G. T., Trujillo, R. H., Espino, J. L. T., Aparicio, A. J., and Monroy, M. R. 2003. Analysis of morphological characteristics of *Solanum chrysotrichum* cell suspension cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 19: 929-932.
- Thiem, B. 2003. *In vitro* propagation of isoflavone-producing *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi. **Plant Science**. 165: 1123-1128.
- Verma, S. K., Rai, M. K., Asthana, P., Jaiswal, V. S., and Jaiswal, U. 2010. *In vitro* plantlets from alginate-encapsulated shoot tip of *Solanum nigrum* L. **Scientia Horticulturae**. 124: 517-521.
- Villarreal, M. L., Arias, C., Velasco, A. F., Ramirez, O. T., and Quintero, R. 1997. Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum* (Schldl.) –A plant producing an antifungal spirostanol saponin. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 50: 39-44.
- Xu, J., Su, Z., and Fang, P. 1998. Suspension culture of compact callus aggregate of *Rhodiola sachalinensis* for improved salidroside production. **Enzyme and Microbial Technology**. 23: 20-27.

Zhao, D., Xing, J., Li, M., Lu, D., and Zhou, Q. 2001. Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67: 227-234.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)

Macronutrients	mg/L
NH ₄ NO ₃	1,650
KNO ₃	1,900
CaCl ₂ .H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrients	mg/L
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	6.9
ZnSO ₄ .H ₂ O	6.14
KI	0.83
Na ₂ Moo ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Iron	37.25
Sodium EDTA	27.85
Organic component	mg/L
Glycine	2
Nicotinic acid	0.5
Pyridixin-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30 g/L

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 12 ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดของเซลล์แขวนลอย ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25

วันที่ 0

[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
sample 1R1	38.061	48.878	58.654	80.048	87.901
sample 2R1	36.619	45.673	59.535	81.811	88.942
sample 3R1	37.981	49.279	55.288	78.766	88.942
sample 1R2	35.337	43.990	51.603	76.442	59.936
sample 2R2	39.503	46.554	60.497	79.808	90.144
sample 3R2	33.253	43.750	56.410	75.000	86.058

วันที่ 5

[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
sample 1R1	31.998	41.667	57.479	74.679	85.684
sample 2R1	39.663	51.683	60.417	83.173	91.026
sample 3R1	36.699	47.035	55.929	76.042	89.503
sample 1R2	35.897	46.314	56.891	77.938	87.607
sample 2R2	32.158	45.032	51.923	70.940	84.135
sample 3R2	36.111	43.750	60.737	76.229	87.767

วันที่ 9

[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
sample 1R1	32.292	40.465	50.321	71.635	88.381
sample 2R1	30.929	36.859	50.641	74.279	90.705
sample 3R1	30.529	36.699	52.885	78.365	92.468
sample 1R2	33.013	33.013	49.573	74.840	94.124
sample 2R2	28.846	29.167	48.771	72.276	92.842
sample 3R2	27.564	29.647	44.444	70.726	91.560

วันที่ 13

[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
sample 1R1	29.006	36.538	48.157	73.478	91.346
sample 2R1	37.179	40.705	55.288	74.306	89.103
sample 3R1	27.190	36.966	52.724	80.823	90.118
sample 1R2	31.624	37.233	57.532	80.662	94.712
sample 2R2	42.575	38.835	52.030	73.932	88.355
sample 3R2	26.976	34.455	45.139	72.970	90.331

วันที่ 17

[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
sample 1R1	31.197	40.812	61.058	81.784	94.284
sample 2R1	33.707	46.848	68.376	93.002	95.833
sample 3R1	29.487	37.821	52.938	83.013	95.673
sample 1R2	32.372	40.972	60.524	87.500	95.032
sample 2R2	35.363	42.361	64.744	91.720	94.712
sample 3R2	20.566	32.372	48.611	80.556	91.346

วันที่ 21

[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
sample 1R1	37.714	47.810	75.481	95.139	95.620
sample 2R1	39.156	58.868	91.720	95.246	95.192
sample 3R1	31.517	45.887	68.429	92.147	94.979
sample 1R2	37.019	66.827	93.857	94.231	94.231
sample 2R2	46.528	73.077	94.231	94.712	94.818
sample 3R2	44.124	55.929	84.295	94.124	94.071

วันที่ 25

[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
sample 1R1	46.314	64.156	93.483	95.406	95.620
sample 2R1	51.335	76.175	93.429	95.032	95.246
sample 3R1	55.182	84.936	94.444	95.299	95.459
sample 1R2	46.688	70.940	93.643	95.192	94.765
sample 2R2	32.532	48.451	80.342	95.139	95.513
sample 3R2	49.252	85.844	93.697	95.139	94.498

หมายเหตุ sample 1R1 (ตัวอย่างที่ 1 ของการทดลองรอบที่ 1); sample 2R1 (ตัวอย่างที่ 2 ของการทดลองรอบที่ 1); sample 3R1 (ตัวอย่างที่ 3 ของการทดลองรอบที่ 1); sample 1R2 (ตัวอย่างที่ 1 ของการทดลองรอบที่ 2); sample 2R2 (ตัวอย่างที่ 2 ของการทดลองรอบที่ 2); sample 3R2 (ตัวอย่างที่ 3 ของการทดลองรอบที่ 2)

ตารางที่ 13 ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างแห้งของเซลล์แขวนลอย ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25

วันที่ 0

[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
sample 1R1	38.542	53.526	76.603	93.510	93.349
sample 2R1	31.571	39.503	64.663	91.987	91.667
sample 3R1	38.462	44.979	61.912	80.556	94.071
sample 1R2	27.724	29.407	34.535	46.074	68.029
sample 2R2	25.881	32.131	34.295	49.760	68.830
sample 3R2	33.654	32.158	37.500	52.297	81.090

วันที่ 5

[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
sample 1R1	34.669	45.780	51.709	87.286	94.551
sample 2R1	32.479	50.694	43.429	69.979	94.124
sample 3R1	26.496	47.329	37.073	58.707	90.598
sample 1R2	26.015	33.547	45.566	67.735	93.483
sample 2R2	30.662	38.088	44.872	69.124	93.857
sample 3R2	25.374	32.105	38.088	57.105	83.387

วันที่ 9

[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
sample 1R1	38.248	56.143	91.720	93.643	94.231
sample 2R1	25.053	35.524	54.113	88.515	94.658
sample 3R1	32.532	47.703	76.870	93.323	94.444
sample 1R2	17.147	23.771	7.585	60.470	85.363
sample 2R2	29.647	29.006	42.041	69.605	93.429
sample 3R2	19.391	30.288	40.118	65.652	92.895

วันที่ 13

[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
sample 1R1	38.782	62.714	92.094	92.735	93.376
sample 2R1	49.199	80.983	92.682	92.735	96.635
sample 3R1	51.389	89.744	92.468	92.949	93.697
sample 1R2	42.254	71.261	92.735	94.177	94.177
sample 2R2	49.199	76.870	93.216	94.872	94.391
sample 3R2	38.942	52.991	88.515	94.498	93.857

วันที่ 17

[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
sample 1R1	48.985	90.438	92.147	92.415	93.857
sample 2R1	69.551	92.254	92.735	93.056	94.124
sample 3R1	91.880	93.376	93.109	94.017	94.391
sample 1R2	56.784	91.827	93.376	94.231	94.658
sample 2R2	52.297	84.562	93.590	93.590	95.032
sample 3R2	73.504	92.468	92.895	93.643	94.124

วันที่ 21

[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
sample 1R1	81.838	93.056	93.429	94.818	95.459
sample 2R1	84.989	93.162	93.483	94.391	95.726
sample 3R1	92.682	92.735	93.590	94.338	95.459
sample 1R2	72.703	92.735	92.895	95.192	95.139
sample 2R2	67.308	92.147	93.002	95.139	94.551
sample 3R2	93.269	93.857	94.124	95.192	95.726

วันที่ 25

[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
sample 1R1	92.308	93.002	93.483	94.498	95.459
sample 2R1	93.323	93.376	93.590	94.444	95.085
sample 3R1	91.293	92.735	93.429	94.124	94.551
sample 1R2	72.222	93.216	93.857	94.551	95.406
sample 2R2	83.013	92.788	93.483	94.338	95.085
sample 3R2	85.150	93.002	94.124	94.498	95.299

หมายเหตุ sample 1R1 (ตัวอย่างที่ 1 ของการทดลองรอบที่ 1); sample 2R1 (ตัวอย่างที่ 2 ของการทดลองรอบที่ 1); sample 3R1 (ตัวอย่างที่ 3 ของการทดลองรอบที่ 1); sample 1R2 (ตัวอย่างที่ 1 ของการทดลองรอบที่ 2); sample 2R2 (ตัวอย่างที่ 2 ของการทดลองรอบที่ 2); sample 3R2 (ตัวอย่างที่ 3 ของการทดลองรอบที่ 2)

ตารางที่ 14 ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดและแห้งของใบ และลำต้น ผักตบชวาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สารสกัดตัวอย่าง	[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
ใบสด	sample 1	49.573	73.825	91.239	97.009	98.932
	sample 2	51.496	73.291	90.011	94.231	98.611
	sample 3	44.124	77.137	89.476	96.314	98.130
ลำต้นสด	sample 1	20.566	27.618	38.622	61.699	76.656
	sample 2	18.910	27.190	42.361	63.462	80.662
	sample 3	17.361	24.145	37.500	57.906	73.825
สารสกัดตัวอย่าง	[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
ใบแห้ง	sample 1	11.859	23.718	48.024	82.158	93.803
	sample 2	27.350	33.226	52.190	85.577	95.620
	sample 3	16.827	27.938	54.167	81.197	93.269
ลำต้นแห้ง	sample 1	9.348	11.592	22.062	31.891	54.327
	sample 2	4.861	8.387	20.299	27.190	47.756
	sample 3	10.951	15.865	21.100	50.694	50.962

ตารางที่ 15 ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสด และแห้งของใบผักตบชวา
จากในธรรมชาติ

สารสกัดตัวอย่าง	[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
ใบสด	sample 1	32.105	50.641	83.280	92.628	92.949
	sample 2	38.088	46.635	72.115	89.156	95.353
	sample 3	35.470	54.594	83.120	93.216	95.566
สารสกัดตัวอย่าง	[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
ใบแห้ง	sample 1	15.545	22.009	32.959	70.299	90.438
	sample 2	19.444	26.389	39.370	58.654	90.385
	sample 3	23.291	35.737	48.985	83.013	91.774

ตารางที่ 16 ค่า Scavenging activity (%) ของสารสกัดจากตัวอย่างสดและแห้งของผักกาดขาว

สารสกัดตัวอย่าง	[] (mg/ml)	12.5	25	50	100	200
ผักกาดขาวสด	sample 1	17.788	20.246	22.543	48.024	55.075
	sample 2	14.850	17.842	26.229	49.306	53.953
	sample 3	15.118	19.658	21.955	45.353	53.900
สารสกัดตัวอย่าง	[] (mg/ml)	2.0625	4.125	8.25	16.5	33
ผักกาดขาวแห้ง	sample 1	11.218	12.767	17.147	26.763	41.293
	sample 2	7.959	8.440	13.782	21.528	36.538
	sample 3	13.301	10.203	14.850	22.329	38.942

ตารางที่ 17 ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทั้งสดและแห้งของผักตบชวา ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25

ตัวอย่างสารสกัด	Phenolic content ($\mu\text{g GAE/g cell suspension}$)	
	เซลล์แขวนลอยสด	เซลล์แขวนลอยแห้ง
วันที่ 0	6.563 \pm 0.675 ^{bc}	4.767 \pm 6.462 ^c
วันที่ 5	9.279 \pm 1.207 ^b	2.843 \pm 5.255 ^c
วันที่ 9	6.104 \pm 0.610 ^c	6.103 \pm 4.411 ^c
วันที่ 13	8.079 \pm 0.870 ^{bc}	68.527 \pm 6.973 ^b
วันที่ 17	9.438 \pm 0.922 ^b	89.530 \pm 13.186 ^{ab}
วันที่ 21	13.688 \pm 2.205 ^a	117.108 \pm 13.982 ^a
วันที่ 25	15.081 \pm 1.109 ^a	109.572 \pm 13.608 ^a

ตารางที่ 18 ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากตัวอย่างสด

ตัวอย่างสารสกัด	Phenolic content ($\mu\text{g GAE/g FW}$)
ผักกาดขาวสด	0.584 \pm 0.077 ^a
ใบผักตบชวาสดจากการเพาะเลี้ยง	1.783 \pm 2.353 ^a
ลำต้นผักตบชวาสดจากการเพาะเลี้ยง	2.330 \pm 0.309 ^a
ใบผักตบชวาสดจากธรรมชาติ	2.436 \pm 1.201 ^a

หมายเหตุ: ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากตัวอย่างแห้งของผักกาดขาว ใบ และลำต้นผักตบชวาจากการเพาะเลี้ยง และใบผักตบชวาจากธรรมชาติได้

ตารางที่ 19 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทั้งสดและแห้งของผักตืด ณ วันที่ 0, 5, 9, 13, 17, 21 และ 25

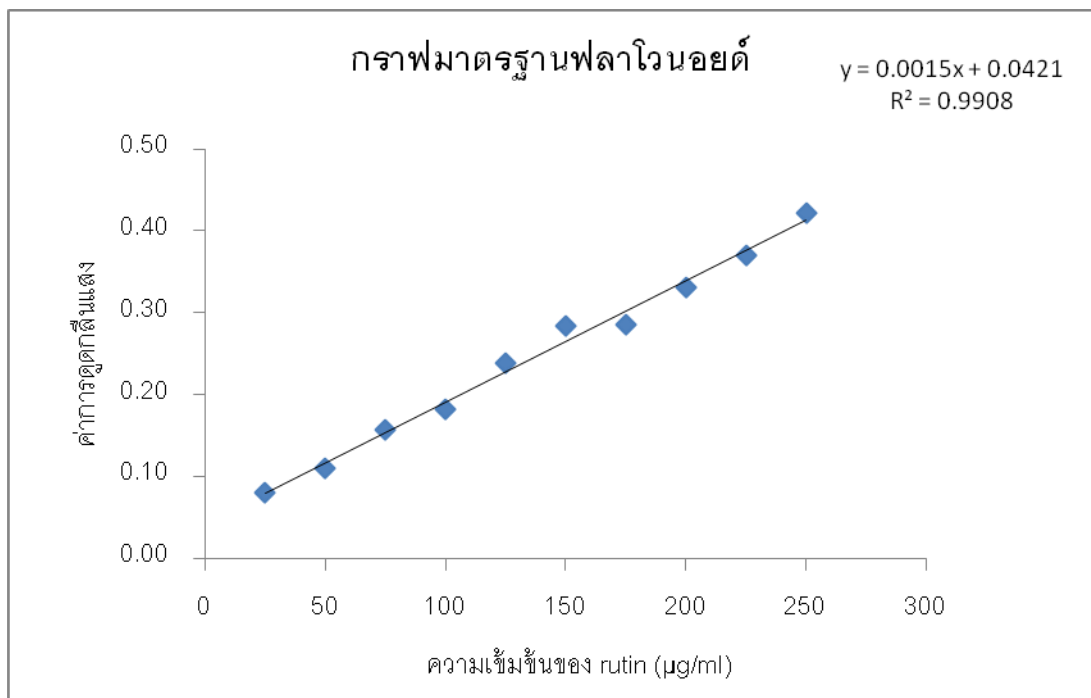
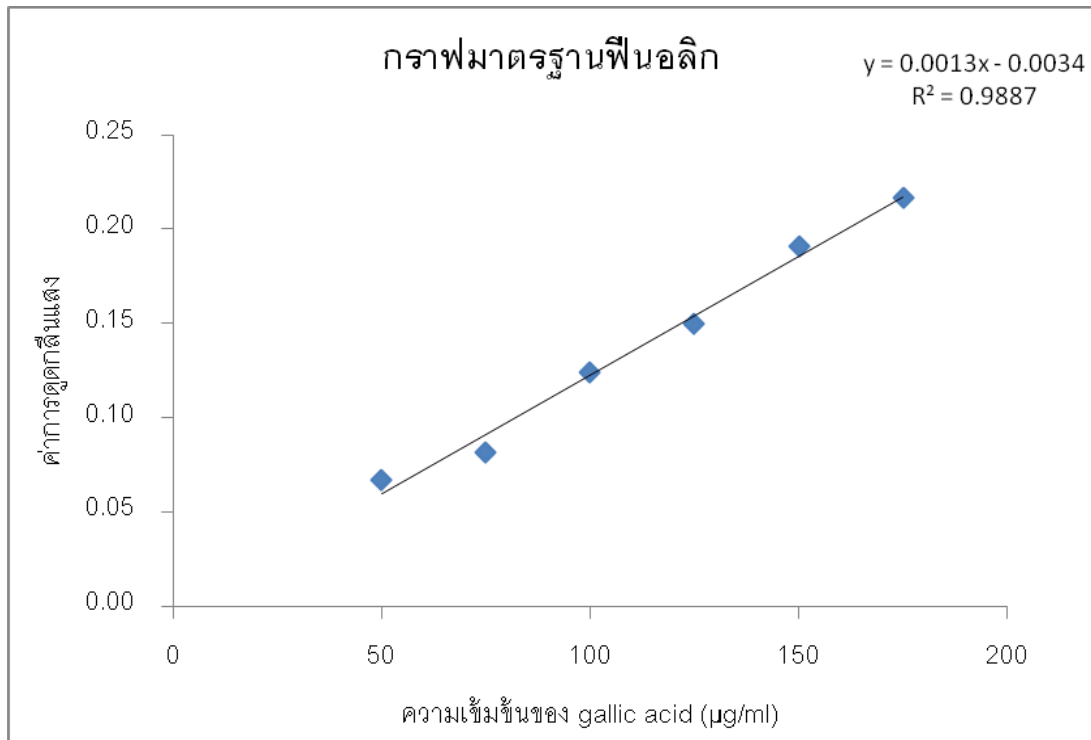
ตัวอย่างสารสกัด	Flavonoid content ($\mu\text{g RE/g cell suspension}$)	
	เซลล์แขวนลอยสด	เซลล์แขวนลอยแห้ง
วันที่ 0	51.261 \pm 5.983 ^a	133.871 \pm 28.257 ^a
วันที่ 5	34.025 \pm 10.825 ^b	164.557 \pm 13.939 ^a
วันที่ 9	33.891 \pm 4.870 ^b	106.564 \pm 18.933 ^a
วันที่ 13	29.433 \pm 4.408 ^b	135.515 \pm 19.400 ^a
วันที่ 17	42.800 \pm 2.728 ^{ab}	133.337 \pm 32.967 ^a
วันที่ 21	51.935 \pm 3.386 ^a	130.433 \pm 15.428 ^a
วันที่ 25	53.058 \pm 4.647 ^a	127.438 \pm 15.282 ^a

ตารางที่ 20 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตัวอย่างสดและแห้ง

ตัวอย่างสารสกัด	Flavonoid content ($\mu\text{g RE/g FW}$)
ผักกาดขาวสด	12.522 \pm 0.827 ^a
ตัวอย่างสารสกัด	Flavonoid content ($\mu\text{g RE/g DW}$)
ผักกาดขาวแห้ง	63.184 \pm 26.851 ^b
ลำต้นผักตืดแห้งจากการเพาะเลี้ยง	73.348 \pm 22.322 ^a

หมายเหตุ: ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตัวอย่างสดของใบและลำต้นผักตืดจากการเพาะเลี้ยง และใบผักตืดจากธรรมชาติ และสารสกัดจากตัวอย่างแห้งของใบผักตืดจากการเพาะเลี้ยง และใบผักตืดจากธรรมชาติ

ภาคผนวก ค



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทิพวรรณ คงทอง เกิดวันที่ 13 เมษายน พ.ศ. 2529 ในจังหวัดพิษณุโลก สำเร็จ การศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2551 เข้าศึกษาต่อชั้นวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552