ผลของสารควบคุมการเติบโตของพืชและไคโทซานต่อการเพิ่มจำนวนยอดและปริมาณสตีวิโอไซด์ในหญ้าหวาน *Stevia rebaudiana* Bertoni ในหลอดทดลอง

นางสาวราตรี สันติวงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
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.

EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS AND CHITOSAN ON SHOOT MULTIPLICATION AND STEVIOSIDE CONTENT IN STEVIA *Stevia rebaudiana* Bertoni *IN VITRO*

Miss Ratree Santiwong

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 2011

Copyright of Chulalongkron University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารควบคุมการเติบโตของพืชและไคโทซานต่อการเพิ่มจำนวนยอดและปริมาณสตีวิโอไซด์ในหญ้าหวาน *Stevia rebaudiana* Bertoni ในหลอดทดลอง
โดย	นางสาวราตรี สันติวงค์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัชรา ลิมปนะเวช

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัชรา ลิมปนะเวช)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรดี สหวัชรินทร์)

ราตรี สันติวงค์ : ผลของสารควบคุมการเติบโตของพืชและไคโทซานต่อการเพิ่มจำนวนยอดและปริมาณสตีวิโอไซด์ในหญ้าหวาน *Stevia rebaudiana* Bertoni ในหลอดทดลอง (EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS AND CHITOSAN ON SHOOT MULTIPLICATION AND STEVIOSIDE CONTENT IN STEVIA *Stevia rebaudiana* Bertoni *IN VITRO*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ. ดร. ยุพิน จินตภากร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ. พัชรา ลิมปนะเวช, 101 หน้า.

ส่วนแรกงานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำการเพิ่มจำนวนยอดและการเจริญเติบโตในการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้อเดี่ยวของหญ้าหวาน ในอาหารที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซิน ไซโทไคนิน และไคโทซานโดยเปรียบเทียบกับการใช้สารควบคุมการเติบโต IAA (1 และ 2 mg/L) ร่วมกับ BA หรือ kinetin (0.25, 0.5, 0.75 และ 1 mg/L) กับการใช้ BA (0.5, 1, 1.5 และ 2 mg/L) หรือ kinetin (6, 12 และ18 mg/L) เพียงอย่างเดียวในอาหารสูตร MS พบว่าการเพิ่มจำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารควบคุมการเติบโต อย่างไรก็ตามหญ้าหวานที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L สามารถเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดเป็น 2.8 และ 2.7 เท่าของชุดการทดลองควบคุมตามลำดับ สำหรับการใช้ไคโทซานพบว่าอาหารที่เติมไคโทซานชนิด P80 และ P90 ที่ความเข้มข้น 10 และ 5 mg/L ตามลำดับ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.00 ± 0.00 ยอดต่อข้อ ซึ่งมีแนวโน้มมากที่สุดเมื่อเทียบกับทุกชุดการทดลอง และยังพบว่าการใช้ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L สามารถเพิ่มความยาวยอดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 7.0 ± 0.89 มิลลิเมตรในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซาน เพิ่มขึ้นเป็น 11.13 ± 1.76 มิลลิเมตร ซึ่งทำให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดเพิ่มขึ้นเป็น 2.3 และ 2.2 เท่าของชุดการทดลองควบคุมตามลำดับ นอกจากนี้ในชุดการทดลองเดียวกันนี้ยังมีแนวโน้มสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากกว่าชุดการทดลองควบคุม ในส่วนที่สองของงานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงปริมาณสารสตีวิโอไซด์ในหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่ามีปริมาณสารในชุดการทดลองที่ใช้สารควบคุมการเติบโตค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ไคโทซานชนิด P90 40 mg/L, O80 20 mg/L และ O90 10 mg/L มีผลทำให้ปริมาณสารสตีวิโอไซด์เพิ่มมากขึ้นเป็น 1.3 เท่าของชุดการทดลองควบคุม ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5272506723 : MAJOR BOTANY

KEYWORDS : *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI / IN VITRO SINGLE NODE CULTURE / CHITOSAN

RATREE SANTIWONG : EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS AND CHITOSAN ON SHOOT MULTIPLICATION AND STEVIOSIDE CONTENT IN STEVIA *Stevia rebaudiana* Bertoni *IN VITRO*. ADVISOR : YUPYN CHINTAPAKORN, Ph.D, CO-ADVISOR : ASST. PROF. PATCHRA LIMPANAVECH, 101 pp.

The aim of the first part in this study was to investigate the suitable culture conditions for shoot multiplication and growth of single node culture of *Stevia rebaudiana in vitro* by supplementing auxin, cytokinin and chitosan in the culture media. The uses of IAA (1 and 2 mg/L) in combination with either BA or kinetin (0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/L) were compared with BA (0.5, 1, 1.5 and 2 mg/L) or kinetin (6, 12 and 18 mg/L) alone in MS medium. As the result, no significant difference was found in shoot multiplication among the treatments using plant growth regulators and the control. However, the use of BA at the concentration of 2 mg/L could increase the fresh and dry weight of shoot to 2.8 and 2.7 times of the control, respectively. Application of chitosan P80 and P90 at the concentration of 10 and 5 mg/L was found to increase average number of shoots per node to 2.00 ± 0.00, which tended to be higher than the other treatments. In addition, it was found that O80 chitosan at the concentration of 5 mg/L could stimulate shoot growth by increasing the shoot length from 7.0 ± 0.89 mm of the control to 11.13 ± 1.76 mm which caused the increase of average fresh and dry weight of shoot to 2.3 and 2.2 fold of the control, respectively. Apart from that, the same treatment also tended to induce more number of roots than the control did. In the second part of the study, the stevioside content in cultured tissue was analyzed. Low stevioside content was found in the treatments supplemented with plant growth regulators while stevioside content in the treatments using 40 mg/L P90, 20 mg/L O80 and 10 mg/L O90 chitosan were significantly increased to 1.3 times of the control.

Department : Botany ..... Student's Signature……...

Field of study : Botany ..... Advisor's Signature…….…..

Academic year : 2011 ..... Co-advisor's Signature.…….

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัชรา ลิมปนะเวช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือตลอดการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. อรดี สหวัชรินทร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร ที่ให้ความอนุเคราะห์สารไคโทซานชนิดต่างๆ และอุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ ที่เอื้อเฟื้อต้นหญ้าหวานที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.กฤษณา ไกรสินธ์ และ ดร.ลักษณา เจริญใจ จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ HPLC

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2554 ภายใต้แผนงานวิจัยอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพและศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ National University of Singapore ที่สนับสนุนการเผยแพร่งานวิจัยในงานประชุมวิชาการ The 12th Biological Graduate Congress 2011 ณ ประเทศสิงคโปร์

ขอขอบคุณ ภาควิชาพฤกษาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยและสนับสนุนการเผยแพร่งานวิจัยในการประชุมพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทยครั้งที่ 6 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รวมทั้งขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์สำหรับความช่วยเหลือด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา และสมาชิกในครอบครัว สำหรับกำลังใจ รวมถึงการสนับสนุนทุกสิ่งเสมอมาอย่างหาที่สุดมิได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ฎ
บทที่
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 5
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 22
บทที่ 4 ผลการทดลอง 31
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง 68
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 77
รายการอ้างอิง 79
ภาคผนวก 86
ภาคผนวก ก 87
ภาคผนวก ข 88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 101

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 จำนวนยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 36

2 ความยาวยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 37

3 น้ำหนักสดยอดและแคลลัสของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 38

4 น้ำหนักแห้งยอดและแคลลัสของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 39

5 จำนวนรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 40

6 น้ำหนักสดรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 41

7 น้ำหนักแห้งรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 42

8 จำนวนยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 43

9 ความยาวยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 43

ตารางที่ หน้า

10 น้ำหนักสดยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 44
11 น้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 44
12 จำนวนรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 45
13 น้ำหนักสดรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 45
14 น้ำหนักแห้งรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 46
15 จำนวนยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 47
16 ความยาวยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 48
17 น้ำหนักสดยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 49
18 น้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 50

ตารางที่ หน้า

19 จำนวนรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 51
20 น้ำหนักสดรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 52
21 น้ำหนักแห้งรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 53
22 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายสตีวิโอไซด์ 10 µl 79
23 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ 10 µl 80
24 ค่า intraday precision และ interday precision ของสารละลายสตีวิโอไซด์ 10 µl ที่ 3 ความเข้มข้น 81
25 ค่า intraday precision และ interday precision ของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ 10 µl ที่ 3 ความเข้มข้น 81
26 ค่า LOD และ LOQ ของสตีวิโอไซด์ 82
27 ค่า LOD และ LOQ ของรีบาวดิโอไซด์ เอ 82
28 ปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมสารควบคุมการเติบโตออกซินและไซโทไคนินที่ให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุดเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต 84
29 สตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบของหญ้าหวานที่มีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยมีการเติมไคโทซานที่มีชนิดและความเข้มข้นแตกต่างกัน 86
30 สตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ เอ ที่สกัดได้ใบหญ้าหวานในเรือนต้นไม้ 87

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 รูปหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในเรือนต้นไม้ 6

2 โครงสร้างหลักของสารประกอบไดเทอร์ปีนในหญ้าหวานและสารประกอบไดเทอร์ปีนไกลโคไซด์ 7

3 โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโทซาน 13

4 ผลของสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวานเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 54

5 ผลของสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวานเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 55

6 การเจริญเติบโตของหญ้าหวานที่ได้รับไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไคโทซานบนอาหารสูตร MS หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 56

7 retention time ของสารละลายมาตรฐานสตีวิโอไซด์ 10 µl ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml 57

8 retention time ของสารละลายมาตรฐานรีบาวดิโอไซด์ เอ 10 µl ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml 58

9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารละลายสตีวิโอไซด์และพื้นที่ใต้ peak 59

10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ และพื้นที่ใต้ peak 60

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาหารเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีความสำคัญในการดำรงชีวิต พฤติกรรมความชอบในการบริโภครสชาติอาหารของแต่ละบุคคลอาจแตกต่างกันออกไป ส่วนใหญ่แล้วอาหารที่มีรสหวานมักได้รับความนิยมเนื่องจากรับประทานง่าย และรสหวานยังช่วยปรุงแต่งร่วมกับรสเค็มและเปรี้ยวทำให้อาหารมีรสชาติมากยิ่งขึ้น สารให้ความหวานในอาหารที่ใช้เป็นหลักได้แก่ น้ำตาลทราย ซึ่งเมื่อบริโภคเข้าไปในปริมาณมากอาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ เช่น ทำให้เกิดโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและโรคอ้วน เป็นต้น ดังนั้น จึงมีผู้หันมานิยมบริโภคสารทดแทนความหวานที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น ซัคคารีน แอสปาแตม ไซคลาเมต เป็นต้น ซึ่งสารทดแทนความหวานที่ได้จากการสังเคราะห์เหล่านี้หากได้รับในปริมาณมากอาจเป็นสารที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้เช่นกัน นอกจากสารทดแทนความหวานที่ได้จากการสังเคราะห์แล้ว ยังมีสารทดแทนความหวานที่ได้จากพืชธรรมชาติที่ให้ความหวานสูง และสามารถใช้บริโภคได้อย่างปลอดภัยไม่มีพิษแก่ร่างกายคือ สตีวิโอไซด์ (stevioside) (อัมพวัน อภิสริยะกุล, 2533)

สตีวิโอไซด์เป็นสารประเภทไกลโคไซด์ (glycoside) ที่พบในหญ้าหวานและอยู่ในใบเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปในใบหญ้าหวานจะพบสารสตีวิโอไซด์ตั้งแต่ 4-20% ของน้ำหนักใบแห้งและเป็นสารที่ให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลทรายถึง 300 เท่า (Geuns, 2003) นอกจากนี้สารสตีวิโอไซด์ยังไม่ให้พลังงานแก่ร่างกาย จึงทำให้มีการนำหญ้าหวานและสารสกัดจากหญ้าหวานมาใช้เป็นสารให้ความหวานทดแทนน้ำตาลทราย ด้วยจุดประสงค์เพื่อลดปริมาณแคลอรี่ในอาหารหรือเครื่องดื่มสำหรับผู้ที่ต้องการลดความอ้วนและผู้ป่วยโรคเบาหวานซึ่งไม่สามารถบริโภคน้ำตาลในปริมาณมาก ๆ ได้ นอกจากนี้ สารให้ความหวานจากหญ้าหวานยังเป็นสารที่มีพิษเฉียบพลันต่ำและมีความปลอดภัยสูง (กองการแพทย์ทางเลือก, 2552) จึงมีผู้สนใจนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภทที่ต้องมีส่วนผสมของสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องดื่ม

ด้วยเหตุนี้หญ้าหวานจึงจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง โดยในต่างประเทศความต้องการในการบริโภคผลิตภัณฑ์จากหญ้าหวานมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ อย่างไม่มีขีดจำกัด ในขณะที่มีเพียงบางประเทศเท่านั้นที่สามารถปลูกหญ้าหวานได้ สำหรับในประเทศไทยได้มีการนำหญ้าหวานมาปลูกและใช้ผลิตภัณฑ์จากหญ้าหวานเป็นระยะเวลามากกว่า

30 ปี โดยปลูกกันทางตอนเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พะเยา และลำพูน ซึ่งสามารถปลูกได้ผลดีตลอด 30 ปีที่ผ่านมา (อดุลย์ ศรีเทพ, 2533)

ในสภาวะธรรมชาติ การขยายพันธุ์หญ้าหวานด้วยเมล็ดมักประสบปัญหาเปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำและมีการกลายพันธุ์ได้ง่ายเนื่องจากเป็นพืชที่มีการผสมข้ามสูง (Tamura *et al*., 1984) ส่วนการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการปักชำพบว่าเป็นวิธีการที่ไม่สะดวกสำหรับการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณมาก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์หญ้าหวาน โดยทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศมีการศึกษาการใช้สารควบคุมการเติบโตออกซินและไซโทไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของหญ้าหวานในหลอดทดลอง จากการทดลองของ พัชรินทร์ ศรีทองคำ (2538) ได้ทำการเพาะเลี้ยงส่วนยอดอ่อนของหญ้าหวานในอาหารสูตร MS ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 12 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยถึง 60.2 ยอดต่อยอดเริ่มต้น ในระยะเวลา 3 เดือน ในการทดลองของ พิมลพรรณ เฉลิมวุฒิกุล (2547) พบว่าการเลี้ยงตาข้างของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.52 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในขณะที่ Hwang (2006) ได้ทำการทดลองเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานโดยใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับ IAA และ kinetin ความเข้มข้น 2 และ 0.5 mg/L ตามลำดับ พบว่าสามารถชักนำยอดได้ถึง 23.4 ± 2.1 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อในระยะเวลา 6 สัปดาห์ นอกจากนี้ Sivaram และ Mukundan (2003) ได้ทำการเลี้ยงส่วนยอดและข้อของหญ้าหวาน โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม IAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 5.71 และ 8.87 μM ตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ถึง 11.2 ± 0.8 ยอดต่อยอดเริ่มต้น และ 10 ± 0.8 ยอดต่อข้อ นอกจากนี้ จากการทดลองเบื้องต้น ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2553 พบว่า หญ้าหวานซึ่งได้จาก อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมลฑล จังหวัดนครปฐม ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเติบโตที่แตกต่างไปจากรายงานที่ผ่านมา อาจเป็นไปได้ว่าต้นพันธุ์หญ้าหวานมีที่มาจากต่างแหล่งกัน อาจมีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ทำให้มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเติบโตไม่เหมือนกัน ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์หญ้าหวานที่ใช้ในการทดลองนี้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

สารชีวภาพที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการตอบสนองของพืชได้ คือ ไคโทซาน (chitosan) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า poly-β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose มีสูตร

โครงสร้างทางเคมี คือ $(C_6H_{11}O_4N)_n$ เป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติลของไคตินด้วยด่างเข้มข้น ไคโทซานเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่พบได้ในเปลือกนอกของสัตว์พวก กุ้ง ปู แมลง และผนังเซลล์ของเชื้อรา (ศุภจิตรา ชัชวาลย์, 2548) ในปัจจุบันมีการนำไคโทซานมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตพืชกันอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าไคโทซานมีผลต่อการตอบสนองของพืชในหลายแง่มุมขึ้นกับชนิดของพืชและการนำไปใช้ กล่าวคือ มีรายงานว่าไคโทซานเป็นโมเลกุลที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคของพืช ทำให้พืชสามารถต้านทานโรคดีขึ้น ด้วยการกระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืช (Agrawal *et al*., 2002) นอกจากนั้นไคโทซานสามารถชักนำยีน *DXS* ใน Norway spruce (*Picea abies*) ให้แสดงออกสูงขึ้นทำให้มีการสร้าง terpenoid resin เพิ่มมากขึ้น (Phillips *et al*., 2007) และยังพบว่าการให้ไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่ำคือ 0.2 – 10.0 mg/L แก่ hairy root ที่ชักนำด้วย *Agrobacterium rhizogenes* ของ *Lippia dulcis* ที่สามารถสร้างสาร Hurnandulcin ซึ่งเป็นสารให้ความหวานในกลุ่ม sesquiterpene ได้ จะทำให้มีการสร้างสารชนิดนี้เพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า (Sauerwein *et al*., 1991) สำหรับการนำไคโทซานมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในหลอดทดลอง Pornpianpakdee และคณะ (2010) พบว่าไคโทซานที่มีขนาดโมเลกุล % degree of deacetylation และความเข้มข้นบางแบบยังมีผลไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวน protocorm-like bodies เพิ่มจำนวนยอด และกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นอ่อน *Dendrobium* ‘เอียสกุล’ ในหลอดทดลองได้

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีอีกเป้าหมายหนึ่งคือ การทดลองหาชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่เหมาะสมกับหญ้าหวานที่เลี้ยงในหลอดทดลองที่จะสามารถชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวานในหลอดทดลองและกระตุ้นการสร้างสาร สตีวิโอไซด์ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะสามารถช่วยแก้ปัญหาที่เกิดในการเพาะปลูกหญ้าหวานในธรรมชาติ ทั้งยังอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารให้ความหวานสตีวิโอไซด์ ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่อาจใช้ในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวานในหลอดทดลอง
2. ศึกษาผลของขนาดพอลิเมอร์ % degree of deacetylation และความเข้มข้นของไคโทซานที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวานในหลอดทดลอง
3. ศึกษาผลของขนาดพอลิเมอร์ % degree of deacetylation และความเข้มข้นของไคโทซานที่มีต่อการกระตุ้นการสร้างสารสตีวิโอไซด์ในหญ้าหวานในหลอดทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดในหลอดทดลองสำหรับสายพันธุ์หญ้าหวานที่ใช้ในการทดลองนี้
2. ทราบขนาดพอลิเมอร์ % degree of deacetylation และความเข้มข้นของไคโทซานต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวานและสารสตีวิโอไซด์ในหญ้าหวานในหลอดทดลอง
3. เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม หรือใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับงานวิจัยอื่นๆ ต่อไป
4. ข้อมูลที่ได้อาจนำไปสู่การส่งเสริมการใช้ไคโทซานที่สามารถผลิตและพัฒนาขึ้นได้เองภายในประเทศไทย เพื่อลดการใช้สารเคมีนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง

ขอบเขตของงานวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของออกซินและชนิดกับความเข้มข้นของไซโทไคนินในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวานและปริมาณสตีวิโอไซด์ที่พบ

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานต่อการเพิ่มจำนวนยอดและปริมาณสตีวิโอไซด์ในหญ้าหวานในหลอดทดลอง

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญของหญ้าหวาน

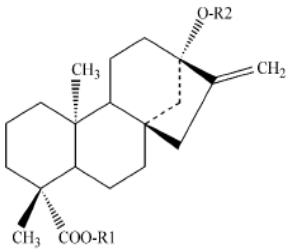
หญ้าหวาน เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Stevia rebaudiana* Bertoni (ภาพที่ 1) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Asteraceae (Geuns, 2003) มีอายุประมาณ 3 ปี (อดุลย์ ศรีเทพ, 2533) หญ้าหวานเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้แถบประเทศบราซิลและปารากวัย โดยชาวพื้นเมืองปารากวัยและบราซิลได้นำใบของหญ้าหวานมาใช้ผสมเพื่อเพิ่มรสหวานในอาหารและเครื่องดื่มมานานกว่า 400 ปีแล้ว (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ, 2540) ต่อมาในราวปี 1970 นักธุรกิจชาวญี่ปุ่นได้นำไปเผยแพร่โดยปลูกที่ญี่ปุ่น และกระจายไปที่เกาหลี จีน ไต้หวัน ไทย และประเทศอื่นๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ไมตรี สุทธจิตต์, 2533) ในปัจจุบันได้มีการใช้ประโยชน์จากหญ้าหวานกันเป็นอย่างมาก โดยใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดที่ต้องมีส่วนผสมของสารให้ความหวาน เช่น อุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม ด้วยเหตุนี้หญ้าหวานจึงจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง โดยความต้องการในการบริโภคผลิตภัณฑ์จากหญ้าหวานในต่างประเทศมีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ อย่างไม่มีขีดจำกัด โดยมีรายงานว่าในปี 1987 ประเทศญี่ปุ่นได้ใช้ใบหญ้าหวานแห้งทั้งหมดประมาณ 750 เมตริคตัน ซึ่งปริมาณดังกล่าวไม่ได้รวมปริมาณการบริโภคใบหญ้าหวานแห้งในประเทศอื่นๆ เช่น บราซิลและประเทศอื่นๆ ในทวีปอเมริกาใต้ ประเทศเกาหลีใต้ ประเทศจีน ประเทศในแถบแปซิฟิครวมทั้งบางประเทศในยุโรป ออสเตรเลียและอเมริกาเหนือ ซึ่งคาดว่าถ้าหากรวมปริมาณความต้องการหญ้าหวานและผลิตภัณฑ์ที่ประเทศต่างๆ ทั่วโลกต้องการจะมีปริมาณหลายพันตันต่อปี และคาดว่ามีความต้องการเพิ่มขึ้นในทุกประเทศ ในขณะที่มีเพียงบางประเทศเท่านั้นที่สามารถปลูกหญ้าหวานได้ (เครือวัลย์ สมณะ, 2545)

สำหรับในประเทศไทยได้มีการนำหญ้าหวานมาปลูกครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2518 (อดุลย์ ศรีเทพ, 2533) ที่นิคมเทพา จังหวัดสงขลา แต่เนื่องจากดินฟ้าอากาศไม่เหมาะสมเพราะมีฝนตกชุกตลอดปี จึงทำให้ความหวานลดน้อยลงซึ่งทำให้การปลูกไม่ค่อยจะได้ผลเท่าที่ควร ต่อมาในปี พ.ศ. 2521 จึงได้มีการนำไปปลูกที่อำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงรายซึ่งปรากฏว่าได้ผลดีจึงได้มีการขยายพื้นที่เพาะปลูกออกไปในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พะเยา และลำพูน ซึ่งปลูกได้ผลดีตลอดมา (ธีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และคณะ, 2538)

ภาพที่ 1 รูปหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในเรือนต้นไม้

สารสำคัญในหญ้าหวาน

สารให้ความหวานที่พบในหญ้าหวานจัดเป็นสารประกอบพวกไดเทอร์ปีนไกลโคไซด์ซึ่งมีหลายชนิด ได้แก่ stevioside, steviolbioside, rebaudioside A, B, C, D, E, F และ dulcoside A (ภาพที่ 2) โดยสารสตีวิโอไซด์ (stevioside) เป็นสารให้ความหวานหลักที่มีปริมาณมากที่สุดในใบหญ้าหวาน โดยในใบของหญ้าหวานจะพบสารสตีวิโอไซด์ ตั้งแต่ 4-20% ของน้ำหนักใบแห้งของหญ้าหวาน (Geuns, 2003) รองลงมาคือ rebaudioside ซึ่งให้ความหวานมากกว่าสตีวิโอไซด์แต่มีประมาณ 1% ของน้ำหนักใบแห้งของหญ้าหวาน (พัชรินทร์ ศรีทองคำ, 2538)



	Compound name	R1	R2
1	steviol	H	H
2	steviolbioside	H	β-Glc- β-glc(2⟶1)
3	stevioside	β-Glc	β-Glc- β-glc(2⟶1)
4	rebaudioside A	β-Glc	β-Glc- β-glc(2⟶1) | β-Glc (3⟶1)
5	rebaudioside B	H	β-Glc- β-glc(2⟶1) | β-Glc (3⟶1)
6	rebaudioside C (dulcoside B)	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2⟶1) | β-Glc (3⟶1)
7	rebaudioside D	β-Glc- β-glc(2⟶1)	β-Glc- β-glc(2⟶1) | β-Glc (3⟶1)
8	rebaudioside E	β-Glc- β-glc(2⟶1)	β-Glc- β-glc(2⟶1)
9	rebaudioside F	β-Glc	β-Glc- β-Xyl(2⟶1) | β-Glc (3⟶1)
10	rebaudioside A	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2⟶1)

ภาพที่ 2 โครงสร้างหลักของสารประกอบไดเทอร์ปีนในหญ้าหวาน (ภาพบน) และสารประกอบไดเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (Geuns, 2003)

โครงสร้างของสารสตีวิโอไซด์ (ภาพที่ 2) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วน aglycone steviol และส่วนที่เป็นน้ำตาล 3 โมเลกุล มีสูตรทางเคมีคือ $C_{38}H_{60}O_{18}$ มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เบา ไม่มีกลิ่น มีรสหวาน แต่รสหวานของสตีวิโอไซด์นั้นจะมีรสขื่นและขมเล็กน้อย (ธีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และคณะ, 2538) สตีวิโอไซด์สามารถดูดความชื้นได้ดีและมีจุดหลอมเหลวสูงถึง 198°C และสามารถละลายได้ในไดออกเซน แอลกอฮอล์ สารละลายกรด และน้ำร้อน (พัชรินทร์ ศรีทองคำ, 2538) นอกจากนี้สตีวิโอไซด์ยังเป็นสารที่ทนต่อความร้อน ทนต่อกรดและด่าง (เทียนศักดิ์ เมฆโอภาพรรณ, 2531) และไม่ให้พลังงานเนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของสารสตีวิโอไซด์ประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลที่ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ในตำแหน่งเบต้า ซึ่งมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโมเลกุลของน้ำตาลที่ต่อด้วยพันธะไกลโคซิดิกในตำแหน่งเบต้าได้ จึงทำให้ร่างกายไม่สามารถนำไปใช้เป็นพลังงานได้

ชีวสังเคราะห์ของสารสตีวิโอไซด์จะผ่านทาง 2-C-methyl-D-erythritol-4 phosphate (MEP) pathway (Totte *et al*., 2000) ซึ่งพบว่าการสังเคราะห์สารสตีวิโอไซด์มาจากกระบวนการสังเคราะห์ที่คล้ายคลึงกับสารควบคุมการเติบโต gibberellins (GA) และ abscisic acid (ABA) โดยมีการสังเคราะห์จาก Acetyl CoA โดยผ่านทาง mevalonic acid pathway (นันทนา อังกินันทน์, 2549)

ประโยชน์ของสารสตีวิโอไซด์จากหญ้าหวาน

ในหญ้าหวานมีสารสตีวิโอไซด์ซึ่งเป็นสารให้ความหวานที่ให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลทรายถึง 300 เท่า จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ผสมในอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิด เพื่อทดแทนน้ำตาลโดยจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อถูกความร้อนในขณะนำไปใช้ในการประกอบอาหารและไม่ทำให้สารชูรสอื่นๆ มีรสเปลี่ยนแปลงไป แต่จะสามารถกลมกลืนกันได้ดี อีกทั้งสารสตีวิโอไซด์ยังถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรียได้ช้ากว่าน้ำตาลทรายจึงไม่ค่อยจะทำให้เกิดปฏิกิริยาการหมักจนทำให้อาหารบูดเน่าได้ง่าย นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารสตีวิโอไซด์สามารถที่จะทนต่อความร้อน สภาพกรดและด่างได้เป็นอย่างดี (ธีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และคณะ, 2538) จึงเหมาะสมในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม โดยเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารมากมายหลายชนิดเช่น ซอส เต้าเจี้ยว อาหารทะเลแห้ง ผักดอง อาหารหวานแช่แข็ง ไอศครีม แยม ลูกกวาด หมากฝรั่ง หรือในเครื่องดื่ม เช่น น้ำอัดลม และน้ำผลไม้ เป็นต้น และยังมีการนำไปใช้ในการผลิตยาสีฟัน และน้ำยาบ้วนปาก เนื่องจากสารสตีวิโอไซด์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุได้ (ราณี บุรีรักษ์, 2529) นอกจากนี้สตีวิโอไซด์ยังเป็นสารที่ร่างกาย

ไม่สามารถนำไปใช้เป็นพลังงานได้ ดังนั้นในทางการแพทย์จึงนิยมนำไปใช้กับผู้ที่ต้องการลดความอ้วน หรือผู้ป่วยโรคเบาหวาน และโรคไขมันในเลือดสูง เป็นต้น (ไมตรี สุทธจิตต์, 2533)

ความปลอดภัยของการบริโภคสารสตีวิโอไซด์ในหญ้าหวาน

หญ้าหวานถูกนำมาบริโภคโดยใช้ในการปรุงรสและประกอบอาหารพื้นเมืองของประเทศแถบอเมริกาใต้ เช่น ปารากวัยและบราซิลมานานกว่า 400 ปี โดยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการเกิดพิษเฉียบพลันแต่อย่างใด โดยจากการวิจัยและศึกษาเกี่ยวกับความปลอดภัยในการนำสารสตีวิโอไซด์มาบริโภคได้มีการทดลองกันอย่างละเอียดจากหลายสถาบัน ซึ่งผลการวิจัยทั้งหลายที่ได้ไม่ปรากฏว่ามีรายงานฉบับใดที่กล่าวว่าสารสตีวิโอไซด์ให้โทษแก่ร่างกายทั้งทางตรงและทางอ้อม (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ, 2540)

นอกจากนี้จากการศึกษาด้านพิษวิทยาเฉียบพลันพบว่าสตีวิโอไซด์ ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อกระต่าย หนูตะเภาและลูกไก่ แต่การฉีดสารสกัดสตีวิโอไซด์ 20% และ 40% เข้าช่องท้อง จะทำให้หนูถีบจักรตายครึ่งหนึ่ง (ค่า LD_{50}) ด้วยขนาดเท่ากับ 17 และ 42 g/kg BW ตามลำดับ การตรวจศพหนูที่ตายหลังจากที่ได้รับสตีวิโอไซด์ 2 g/kg BW ติดต่อนาน 2 สัปดาห์ ไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในแต่อย่างใด ส่วนการทดลองความเป็นพิษระยะยาวในหนูทดลองพบว่าการให้สารละลายที่มีสตีวิโอไซด์ 7% ผสมในอาหารให้หนูเพศผู้และเพศเมียนาน 3 เดือน พบว่าไม่มีความเป็นพิษเนื่องจากสารสตีวิโอไซด์แต่อย่างใด อีกทั้งยังมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์พบว่าสตีวิโอไซด์ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ (ไมตรี สุทธจิตต์, 2533)

การขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในสภาวะธรรมชาติการขยายพันธุ์หญ้าหวานมักจะขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ดและการปักชำแต่การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดมักประสบปัญหาการกลายพันธุ์ เนื่องจากหญ้าหวานเป็นพืชที่มีการผสมข้ามสูง จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายโดยต้นที่ได้จากการปลูกด้วยเมล็ดจะเกิดการกลายลักษณะต่างๆ เช่น รูปร่าง สีของใบ และปริมาณของสารให้ความหวาน (Tamura *et al*., 1984) อีกทั้งการปลูกด้วยเมล็ดยังให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำด้วย สำหรับการขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยวิธีตัดชำก็สามารถทำได้และทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีพันธุกรรมคงเดิมแต่วิธีการขยายพันธุ์โดยวิธีการตัดชำไม่สะดวกสำหรับการขยายพันธุ์ในระดับอุตสาหกรรมการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณมากๆ ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้ถูกนำมาใช้

ประโยชน์ในการขยายพันธุ์หญ้าหวาน โดยมีผู้ศึกษาใช้สูตรอาหารต่างๆ ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเติบโตหลายชนิดในการเลี้ยงส่วนต่างๆ ของหญ้าหวาน กล่าวคือ

พัชรินทร์ ศรีทองคำ (2538) ได้ทดลองเลี้ยงส่วนใบอ่อนและยอดอ่อนของหญ้าหวาน แล้วพบว่าการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/L โดยให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2°C สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และการใช้อาหารสูตร MS ที่ใส่วิตามินตามสูตร Nitsch and Nitsch (1969) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 mg/L และ BA ความเข้มข้น 2 mg/L สามารถชักนำให้แคลลัสจากใบอ่อนพัฒนาไปเป็นต้นได้ สำหรับการเกิดรากพบว่าการใช้อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดรากได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดจากส่วนของยอดอ่อนด้วย โดยพบว่าการใช้อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 12 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยถึง 60.2 ยอดต่อชิ้นยอดเริ่มต้นภายในระยะเวลา 3 เดือน โดยเมล็ดพันธุ์หญ้าหวานที่นำไปปลูกและใช้ในการทดลองของพัชรินทร์ ศรีทองคำ (2538) ในครั้งนี้ได้มาจากบริษัทศิลป์อุดมเกษตรกรรม จังหวัดเชียงราย

ส่วนพิมลพรรณ เฉลิมวุฒิกุล (2547) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้างของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/L ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถชักนำตาข้างให้เกิดยอดได้ 100% โดยได้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดถึง 2.59 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อตาข้าง และให้ความยาวเฉลี่ยยอดสูงสุด 1.93 เซนติเมตร และยังพบว่าการย้ายยอดอ่อนไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/L สามารถชักนำยอดอ่อนให้เกิดรากได้สูงถึง 56% โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยถึง 2.60 รากต่อยอด

นอกจากนั้น มัทนียา วังประภา (2548) ได้ทดลองเลี้ยงปลายยอดของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/L เพาะเลี้ยงใน growth chamber ที่อุณหภูมิ 25 ± 1°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ยถึง 4.5 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความยาวเฉลี่ยของยอดถึง 3.06 เซนติเมตร สำหรับการเกิดรากพบว่ายอดที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด โดยมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 11 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA อย่างละ 2 mg/L ทั้งในสภาพที่มีแสงและสภาพมืดจะให้ปริมาณแคลลัสสูงที่สุด

สำหรับงานวิจัยของ Sivaram และ Mukundan (2003) พบว่าการเพาะเลี้ยงส่วนยอดและข้อของหญ้าหวานในอาหารสูตร MS ร่วมกับ IAA และ BA ที่ความเข้มข้น 5.71 และ 8.87 μMตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ถึง 11.2 ± 0.8 ยอดต่อชิ้นยอดเริ่มต้น และ 10 ± 0.8 ยอดต่อข้อ สำหรับการเกิดรากพบว่าการใช้อาหารสูตร 1/2MS ที่เติม IBA 4.90 μM สามารถชักนำให้เกิดรากได้ถึง 12-13 ราก หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน โดยรากที่ได้มีลักษณะหนาและยาว

ส่วนงานวิจัยของ Hwang (2006) พบว่าการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานในอาหารสูตร MS ร่วมกับ IAA และ kinetin ความเข้มข้น 2 และ 0.5 mg/Lตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ถึง 23.4 ± 2.1 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ และเมื่อทดลองใช้สารควบคุมการเติบโตสูตรดังกล่าวร่วมกับการใช้อาหารสูตรพื้นฐาน 4 สูตร ได้แก่ สูตร MS, SH, WMP และ B5 พบว่าอาหารพื้นฐานสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเติบโตสูตรดังกล่าว สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุด คือ 23.4 ± 2.1 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ

ไคติน-ไคโทซาน

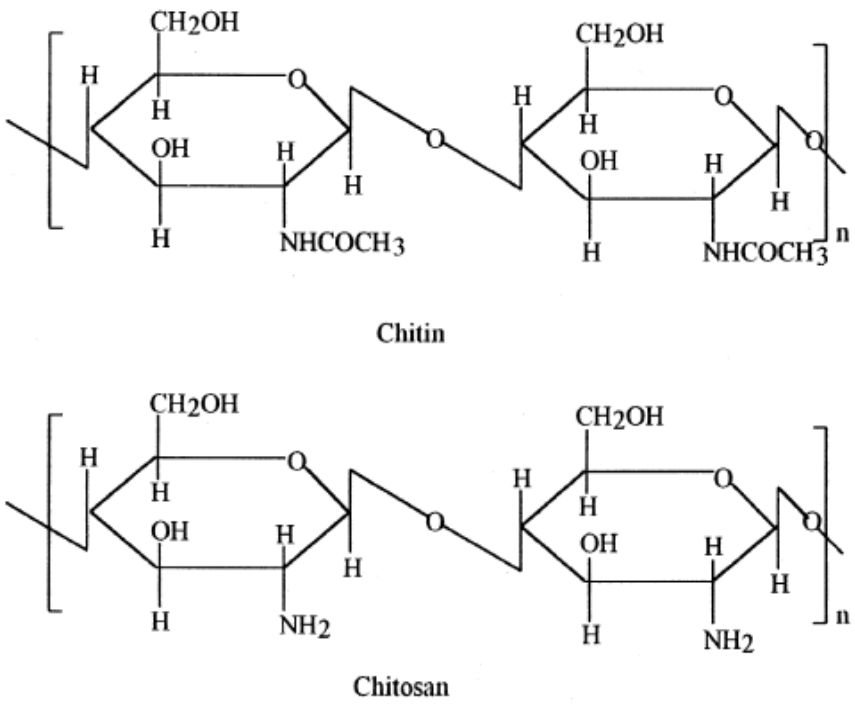
ไคตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้รับการกล่าวถึงเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวผรั่งเศสที่มีชื่อว่า Braconnot ซึ่งได้ทำการทดลองต้มเห็ด *Agaricus volvaceus Bull* และเห็ดชนิดต่างๆ ด้วยด่างเพื่อทำการสกัดไคติน ต่อมาในปี ค.ศ. 1859 ได้มีการรายงานถึงไคโทซาน (chitosan) เป็นครั้งแรกโดย Rouget นำไคตินไปต้มในสารละลาย potassium hydroxide ที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้ไคตินดังกล่าวสามารถละลายในกรดอินทรีย์ได้ จึงเรียกไคตินนี้ว่า modified chitin ซึ่งได้มีการศึกษาอีกครั้งหนึ่งในปี ค.ศ. 1894 โดย Hoppe Seyler และมีการกำหนดชื่อใหม่แก่สารชนิดนี้ว่าไคโทซาน (Muzzarelli, 1976)

ไคตินมีชื่อทางเคมีว่า poly-β-(1,4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (Horton *et al*, 1993) มีสูตรทางเคมีคือ $(C_8H_{13}O_5N)_n$ (ภาพที่ 3) ในธรรมชาติไคตินเป็นสารชีวภาพที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ไคตินในธรรมชาตินั้นเกิดจากการที่สิ่งมีชีวิตนำโมเลกุลของน้ำตาลชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธุ์ของน้ำตาลกลูโคสที่เรียกว่า N-acetyl-D-glucosamine มาสังเคราะห์ต่อกันเป็นสายยาวขนาดต่างๆ ส่วนใหญ่ไคตินจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างที่ให้ความแข็งแรงกับเซลล์หรือร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยจะพบได้ในผนังเซลล์ของจุลชีพจำพวกเห็ด รา และยีสต์ นอกจากนี้ยังพบได้ในปริมาณสูงในเปลือกแข็งภายนอกของสัตว์ที่มีลักษณะเป็นข้อปล้อง (Arthropod) ทั้งหมด อันได้แก่ แมลง กุ้ง กั้ง ปู เป็นต้น นอกจากนี้สัตว์จำพวกหอย และหมึกก็มีสารไคตินอยู่เช่นกัน โดยพบได้มากที่แกนในของหมึก ส่วนในเปลือกหอยก็สามารถพบได้บ้างแต่ก็มีอยู่ในปริมาณน้อย (รัฐ พิชญางกูร, 2548)

ไคโทซานมีชื่อทางเคมีว่า poly-β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose (Horton และคณะ, 1993) มีสูตรทางเคมีคือ $(C_6H_{11}O_4N)_n$ (ภาพที่ 3) ไคโทซานเป็นสารประกอบอนุพันธ์ธรรมชาติที่ได้จากการนำหมู่อะซิติลออกจากสารประเภทไคติน (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2548) สำหรับไคโทซานมักพบได้น้อยในธรรมชาติ โดยสามารถพบได้ในผนังเซลล์ของเห็ดราและยีสต์บางชนิดเท่านั้น ดังนั้นไคโทซานส่วนใหญ่ที่มีใช้กันอยู่ได้มาจากการผลิตและแปรรูปมาจากสารไคติน (รัฐ พิชญางกูร, 2548)

โดยทั่วไปในแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติมักพบโมเลกุลของไคตินและไคโทซานปะปนอยู่ในสายพอลิเมอร์เดียวกันเสมอ ซึ่งการปรับเปลี่ยนระหว่างไคตินไปเป็นไคโทซานเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า deacetylation (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2548) โดยสมบัติของการเป็นไคโทซานสามารถวัดได้จากค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติล โดยคิดเป็นหน่วยร้อยละของการนำหมู่อะซิติลออกจากไคติน (Degree of deacetylation, DD) ซึ่งจะอยู่ระหว่างร้อยละ 70-95 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีในการแปรรูปไคตินให้เป็นไคโทซาน (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และ สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2542)

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตผลิตภัณฑ์แปรรูปกุ้งกุลาดำรายใหญ่ ซึ่งในอุตสาหกรรมการแปรรูปกุ้งจะมีส่วนหัวกุ้งและเปลือกกุ้งเป็นของเหลือทิ้ง โดยประมาณกันว่าในปีหนึ่งๆจะมีเศษที่เหลือทิ้งถึง 150,000 ตัน ในปัจจุบัน ประเทศไทยสามารถแปรรูปเปลือกกุ้งให้ได้ผลผลิตเป็นไคตินและไคโทซานได้ (ทัศนัย วาหะ, 2545) ซึ่งจัดว่าเป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติในประเทศให้เกิดประโยชน์และคุ้มค่ามากที่สุด อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มคุณค่าของผลิตภัณฑ์และลดการนำเข้าสารจำพวกไคตินและไคโทซานจากต่างประเทศอีกด้วย (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2542)



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโทซาน (ดัดแปลงจาก Majeti และ Kumar, 2000)

กระบวนการผลิตไคติน-ไคโทซาน

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. กระบวนการการกำจัดโปรตีน (Deproteination)

ในการผลิตไคติน-ไคโทซานจากเปลือกกุ้ง กระดองปู จำเป็นต้องมีการกำจัดโปรตีนออกเสียก่อน ส่วนใหญ่ใช้โซดาไฟ (NaOH) เป็นตัวทำปฏิกิริยา ซึ่งนอกจากโปรตีนแล้วไขมันและรงควัตถุบางชนิดจะถูกกำจัดออกไปด้วย

2. กระบวนการกำจัดเกลือแร่ (Demineralization)

นำวัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีนมาทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ซึ่งจะเป็นการกำจัดสารพวกหินปูน ($CaCO_3$) ออกไป รงควัตถุและโปรตีนบางตัวที่เหลืออยู่ก็ถูกกำจัดออกไปด้วย ซึ่งขั้นตอนนี้จะทำให้ได้ไคตินบริสุทธิ์

3. กระบวนการกำจัดหมู่อะซิติล (Deacetylation)

ทำการต้มไคตินที่ได้จากการกำจัดเกลือแร่ที่อุณหภูมิสูงโดยใช้ด่าง เช่น NaOH ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 40% (w/v) ขึ้นไปจะทำให้ได้ไคโทซานที่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก (CH_3COOH) กรดโพรพิโอนิก (CH_3CH_2COOH) กรดแลกติก ($CH_3CH_2CH(OH)COOH$) และกรดบิวทีริก ($CH_3CH_2CH_2COOH$) เป็นต้น (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และ สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2542)

การประยุกต์ใช้ไคติน-ไคโทซานในด้านการเกษตร

ไคติน-ไคโทซานได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเกษตรมานานแล้ว และได้มีการผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากสารไคตินและไคโทซานมาใช้ในทางการเกษตรมากมาย โดยการนำมาใช้นั้นมีรูปแบบที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่น นำไปใช้เพื่อช่วยยืดอายุผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช รวมถึงการนำไปใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชเพื่อเพิ่มผลผลิต เป็นต้น

1. ไคติน-ไคโทซานมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช

ไคโทซานมีคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชทั้งที่ปลูกในสภาพธรรมชาติและที่เลี้ยงในหลอดทดลอง

จากการศึกษาทดลองในการปลูกไม้ดอกไม้ประดับมีการรายงานว่า ไคโทซานมีผลต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพดอกของ Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. 'Kairyou Wakamurasaki') โดยพบว่าการใช้ไคโทซานที่ความเข้มข้น 1% (w/v) ผสมลงในดินที่ใช้ปลูกมีผลทำให้ความยาวของยอด ลำต้น ขนาดของใบ และน้ำหนักแห้งของต้นและรากสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 8 และ 11 ของการเพาะปลูก นอกจากนี้ยังพบว่าการผสมไคโทซานในดินที่ใช้ปลูกยังมีผลทำให้มีการออกดอกที่เร็วขึ้น มีจำนวนดอก น้ำหนักของดอก และคุณภาพของดอกสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การแช่เมล็ด Lisianthus ในไคโทซานก่อนที่จะปลูกนั้นกลับให้ผลไม่แตกต่างจากชุดการทดลองควบคุม (Ohta *et al*, 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของไคโทซานต่อการเจริญเติบโตของเยอบีร่า (*Gerbera jamesonii* Bolus) พบว่าการให้ไคโทซานแก่เยอบีร่าในระยะ vegetative growth จนพืชมีอายุครบ 3 ปี จะมีผลทำให้เยอบีร่ามีการเพิ่มขึ้นของจำนวนใบ ขนาดของใบ ความยาวของก้านดอก และจำนวนช่อดอกเมื่อ

เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wanichpongpan, Suriyachan and Chandkrachang, 2000)

สุวลี และคณะ (2546) ศึกษาผลของไคโทซานในการปลูกพืชผักสวนครัวแบบผสมผสาน ได้แก่ คะน้า (*Brassica alboglabra* Bailey) และพริก (*Capsicum* sp.) โดยการฉีดพ่นไคโทซานที่ความเข้มข้น 0, 3.75, 7.5, 11.25 และ 15 ppm ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่ามีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดต่อต้นของคะน้าและพริกสูงขึ้น และสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้รับไคโทซาน โดยอัตราการใช้ไคโทซานที่ความเข้มข้น 3.75 ppm มีแนวโน้มทำให้น้ำหนักสดของคะน้าและความสูงของพริกที่วัดได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป สูงกว่าการให้ไคโทซานที่ความเข้มข้นอื่นๆ

Mason และ Davis (1997) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ของต้น Slash pine (*Pinus elliottii* var. *elliottii* Engelm.) พบว่าเมื่อให้ไคโทซานแก่เซลล์ของพืชชนิดนี้ที่ความเข้มข้น 60 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อนำไปสกัด mRNA ตรวจสอบด้วยวิธี differential display และ sequence analysis พบว่าไคโทซานสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ mRNA ภายในเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น mRNA ของยีนที่ความเกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตนเองของพืช

Barka และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงตายอดขององุ่น (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay clone 7535) ในหลอดทดลอง พบว่าเมื่อเติมไคโทซานที่อยู่ในรูปของสารละลายชื่อ chitogel ที่ความเข้มข้น 1.75% (v/v) จะสามารถชักนำยอดองุ่นที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองให้มีความยาวมากกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อให้ไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 1.75% (v/v) กลับส่งผลให้ยอดองุ่นเจริญเติบโตได้น้อยกว่าชุดการทดลองควบคุม นอกจากนี้การให้ไคโทซานที่ความเข้มข้นดังกล่าวยังมีผลส่งเสริมให้รากองุ่นเจริญเติบโตได้ดีขึ้นและมีการแตกแขนงมากขึ้น และจากการวัดความยาวของลำต้น การนับจำนวนข้อ การวัดน้ำหนักแห้งของยอดและราก รวมถึงมวลชีวภาพทั้งหมด พบว่าองุ่นที่ได้รับไคโทซานจะมีค่าการเติบโตต่างๆ ข้างต้นทั้งหมดสูงกว่าองุ่นที่เพาะเลี้ยงในชุดการทดลองควบคุม สำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสงพบว่าไคโทเจลสามารถเพิ่มอัตราการด้วยสังเคราะห์แสงได้มากขึ้นโดยทำให้ต้นองุ่นสามารถผลิตก๊าซออกซิเจน (O_2 production) และตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixation) ได้มากกว่าต้นองุ่นที่เพาะเลี้ยงในชุดการทดลองควบคุม

สำหรับในกล้วยไม้ก็ได้มีการศึกษาผลของไคโทซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลหวาย ‘เอียสกุล’ ที่ปลูกเพื่อตัดดอก โดยการทดลองให้ไคโทซานชนิดพอลิเมอร์ (P) และโอลิโกเมอร์ (O) ซึ่งแต่ละชนิดมี degree of deacetylation (%DD) เท่ากับ 70, 80 และ 90 พบว่า ภายในระยะเวลา 68 สัปดาห์

การใช้ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 ppm สามารถชักนำให้กล้วยไม้ออกดอกได้เร็วและสามารถเพิ่มจำนวนช่อดอกได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้รับไคโทซาน นอกจากนี้ไคโทซานยังมีผลต่อขนาดของคลอโรพลาสต์ในใบของกล้วยไม้ โดยพบว่าคลอโรพลาสต์ในใบอ่อนจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อได้รับไคโทซานชนิด O80 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ppm ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับในใบแก่พบว่ามีเฉพาะไคโทซานชนิด O80 ที่ความเข้มข้น 50 ppm เท่านั้นที่มีผลต่อการเพิ่มขนาดของคลอโรพลาสต์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าไคโทซานชนิด O80 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *ycf2* ในคลอโรพลาสต์ของใบอ่อนกล้วยไม้ได้ ซึ่ง *ycf2* เป็นยีนที่จำเป็นต่อการอยู่รอดของพืชบางชนิด นอกจากนี้ไคโทซานชนิด O80 ยังสามารถที่จะเพิ่มจำนวน vascular bundles ที่ประกอบด้วย silica body ทั้งในใบแก่และใบอ่อนได้อีกด้วย (Limpanavech *et al*., 2008)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของไคโทซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลหวาย ‘เอียสกุล’ ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยการใช้ไคโทซานชนิดพอลิเมอร์ (P) และโอลิโกเมอร์ (O) ซึ่งแต่ละชนิดมี degree of deacetylation (%DD) เท่ากับ 70, 80 และ 90 ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40 และ 80 ppm โดยเติมลงในอาหารสูตร Vacin and Went (1949) หรือ VW ดัดแปลง พบว่า การเติมไคโทซานชนิดพอลิเมอร์ 70% (P70) ความเข้มข้น 10 ppm และ P90 ความเข้มข้น 20 ppm สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน protocorm-like bodies (plb) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการเกิด somaclonal variation และไคโทซานทุกชนิดที่มีความเข้มข้นสูงถึง 80 ppm กลับมีผลไปยับยั้งการสร้าง plb ส่วนการใช้ไคโทซานในระยะการพัฒนา plb ให้เป็นต้นอ่อนได้ ศึกษาโดยเลี้ยง plb บนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง พบว่าการเติมไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 20 ppm สามารถกระตุ้นการสร้าง plb และการเจริญเติบโตของ plb เป็นต้นอ่อนได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ใช้ไคโทซาน หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ในขณะที่การใช้ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 10 ppm หรือ P80 ความเข้มข้น 10 ppm มีประสิทธิภาพและเหมาะสมที่สุดในการพัฒนาต้นอ่อนของกล้วยไม้ให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ และสำหรับการใช้ P70 ความเข้มข้น 10 ppm หรือ P70 ความเข้มข้น 20 ppm ในการแช่ต้นกล้าของพืชเมื่อย้ายออกจากขวดและฉีดพ่นทุกสัปดาห์ในช่วงระยะเวลาการปลูกพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิต และเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้าในช่วงเดือนแรกได้ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้ไคโทซานที่มีขนาดโมเลกุล %DD และความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละระยะสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย ‘เอียสกุล’ ใน

หลอดทดลองได้ และเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ที่ย้ายปลูกในสภาพโรงเรือนแล้ว แต่ถ้าใช้ในปริมาณมากเกินไปอาจกลับให้ผลยับยั้งการเจริญได้ (Pornpienpakdeeet *at al*, 2010)

2. ไคโทซานมีผลต่อการสร้างสารในพืช

ในธรรมชาติพืชจะมีระบบป้องกันตัวเองจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น จากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยพืชอาจมีการสร้างเอนไซม์และสารเคมีบางชนิดออกมาต่อต้านสิ่งเร้านั้น เช่น การสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสารในกลุ่ม phenolic compounds ได้แก่ lignin และ phytoalexins (Smith, 1996) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยไคโทซานเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชหรือที่เรียกว่า elicitor ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืชได้ นอกจากนี้ไคโทซานยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า systemic acquired resistance (SAR) (Sathiyaba and Balasubramaman, 1998) ซึ่งทำให้พืชมีการสร้างโปรตีนหลายชนิดที่ทำให้พืชมีความสามารถต้านทานโรคได้ดีขึ้นทั่วทั้งต้น ในปัจจุบัน แม้ว่ายังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับกลไกการทำงานที่ชัดเจนของไคโทซานในพืช แต่จากการศึกษาคุณสมบัติของไคโทซานที่ผ่านมา พบว่าไคโทซานสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารบางอย่างในพืชได้ด้วย โดยมีรายงานดังต่อไปนี้

Uddin และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของไคโทซานและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารสีในกลีบดอกของต้น Lisianthus จำนวน 3 พันธุ์ได้แก่ Asuka no Asa, Mickey Rose และ Royal Violet โดยเปรียบเทียบระหว่างตาดอกที่แช่ในน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่เติมไคโทซาน และไม่เติมไคโทซานในหลอดทดลองกับตาดอกที่เจริญบนต้นซึ่งให้ไคโทซานทางใบ จากการทดลองพบว่าการแช่ตาดอกของต้น Lisianthus พันธุ์ Asuka no Asa ในน้ำตาลเพียงอย่างเดียวจะมีตาดอกขนาดใหญ่กว่าตาดอกของชุดการทดลองควบคุม แต่ตาดอกที่แช่ในสารละลายไคโทซานร่วมกับสารละลายน้ำตาลกลับให้ผลไม่แตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมที่แช่น้ำเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ดีตาดอกของต้น Lisianthus พันธุ์ Asuka no Asa ที่แช่ในน้ำตาลทุกชนิด ยกเว้นในน้ำตาลกาแลกโตสร่วมกับสารละลายไคโทซาน จะสามารถชักนำให้มีการสร้าง anthocyanin ในกลีบดอกได้มากกว่าชุดการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการทดลองในต้น Lisianthus พันธุ์ Mickey Rose พบว่าตาดอกที่แช่ในน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เพียงอย่างเดียว หรือมีการแช่ในน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับไคโทซาน พบว่าขนาดของตาดอกไม่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมที่แช่น้ำ และจากการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าการแช่ตาดอกในไคโทซานเพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อการสร้าง anthocyanin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งตรง

ข้ามกับการทดลองที่ให้ไคโทซานทางใบในแปลงทดลอง นอกจากนี้ในต้น Lisianthus พันธุ์ Royal Violet ยังพบว่าเมื่อแช่ตาดอกในสารละลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับไคโทซานและการให้ไคโทซานเพียงอย่างเดียวที่ปลูกในแปลงทดลองพบว่ามีปริมาณ anthocyanin ในกลีบดอกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ซึ่งจากการทดลองทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่า ชนิดพันธุ์ของพืช ชนิดของน้ำตาลและวิธีการใช้ไคโทซานมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีในกลีบดอก

Brodilius และคณะ (1989) ได้ศึกษาผลของไคโทซานต่อความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิในยาสูบ (*Nicotiana tabaccum* L.) และ *Eschscholtzia californica* Cham. โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในอาหารสูตร MS พบว่าการให้ไคโทซานที่ความเข้มข้นที่อัตรา 1-3 mg/g ของน้ำหนักสดของเซลล์ ทำให้มีการสร้าง phenylalanine ammonia lyase (PAL) เพิ่มขึ้น แต่เมื่อมีการให้ไคโทซานที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 mg/g ของน้ำหนักสดของเซลล์กลับพบว่ามีการสร้างสารทุติยภูมิในกลุ่มอัลคาลอย์ บางชนิดได้แก่ chelerythrine และ macarpine ได้น้อยลง

Conrath และคณะ (1989) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ Parsley (*Petroselinum crispum* (Mill*)* A .W. Hill) พบว่า ระยะเวลาที่ให้ไคโทซานมีผลต่อการสร้างสาร callose และสาร coumarin ภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน จากการทดลองเมื่อเติมไคโทซานชนิด 22% N-acetylation ที่มี Degree of polymerization (DP) เท่ากับ 3,420 และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 753,000 kDa ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้นของไคโทซาน 150 µg/ml พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะมีการสะสมปริมาณของ callose สูงขึ้น หลังจากนั้นการสะสมก็จะลดลง ในขณะที่การสะสมของ coumarin จะเพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นการสะสมก็จะลดลงเช่นกัน และจากการทดลองนี้ก็ยังพบอีกว่าการใช้ไคโทซานชนิด 0% N-acetylation และชนิด 22% N-acetylation ที่มีความเข้มข้น 70 µg/ml จะพบการสะสมของสาร callose และ coumarin ในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อค่า DP ของไคโทซานทั้งสองแบบสูงขึ้นด้วย โดยเมื่อให้ไคโทซาน 22% N-acetylation ที่มี DP เท่ากับ 3,420 เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมง แล้ววัดการสะสมของ callose พบว่าการสะสมของ callose จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไคโทซานเพิ่มขึ้น แต่เมื่อให้ไคโทซาน 0% N-acetylation ที่มี DP เท่ากับ 2,500 ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 150 µg/ml จะทำให้มีสะสมของ callose เพิ่มมากขึ้น แต่ถ้าหากเพิ่มความเข้มข้นของไคโทซานให้มากกว่านี้จะพบว่ามีการสะสมของ callose ลดลง นอกจากนี้ยังแยกเซลล์ที่ทำการเพาะมาแล้ว 7 วัน ไปเลี้ยงใน growth medium ที่เติมไคโทซานชนิด 22% N-acetylation ที่มี DP เท่ากับ 3,420 ความเข้มข้น 25 µg/ml หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีการสะสมของ coumarin ภายในเซลล์มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโทซานให้มากขึ้นจะทำให้ปริมาณสาร coumarin ลดลง และการให้

ไคโทซานที่ความเข้มข้นไม่เกิน 100 µg/ml ร่วมกับ reduced glutathione (GSH) ที่ความเข้มข้น 1 nM พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการสร้างสาร coumarin ได้ภายใน 25 ชั่วโมง และยังสามารถชักนำให้เกิดการสร้าง callose ได้มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติม GSH ภายใน 4.5 ชั่วโมงหลังจากได้รับไคโทซาน และเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของไคโทซานจะพบว่ามีการสะสมของ callose เพิ่มขึ้นด้วย

Sauerwein และคณะ (1991) ได้ศึกษาใน *Lippia dulcis* พบว่า เมื่อมีการชักนำให้เกิด hairy root ด้วย *Agrobacterium rhizogrnes* A4 แล้ว เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 2% สามารถทำให้เกิดการสร้างสาร hurnandulcin ซึ่งเป็นสารให้ความหวานในกลุ่ม sesquiterpene ได้ และเมื่อมีการให้ไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ คือ 0.2-10 mg/L จะทำให้มีการสร้างสาร hurnandulcin ซึ่งเป็นสารให้ความหวานเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า

Komaraiah และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชโดยการตรึงเซลล์ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago rosea*) ซึ่งพืชชนิดนี้สามารถผลิตสาร plumbagin (5-hydroxyl, 2-methyl, 1-4 naphthoquinone) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่ม naphthoquinone จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ของเจตมูลเพลิงแดงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 10 mM ร่วมกับไคโทซานที่ได้จากเปลือกปูที่ความเข้มข้น 200 mg/L พบว่าสามารถผลิตสาร plumbagin เพิ่มขึ้น 8 เท่า ซึ่งมากกว่าการสร้างสาร plumbagin ในเซลล์ที่ไม่ได้รับไคโทซาน อีกทั้งสารดังกล่าวยังสามารถปลดปล่อยออกมาจากภายในเซลล์สู่อาหารเพาะเลี้ยงได้ถึง 73.34%

นอกจากนี้ไคโทซานยังสามารถกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิในกลุ่ม anthraquinone ในพืชได้ โดย Vasconsuelo และคณะ (2004) ทดลองเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Rubia tinctorum* ในอาหารเหลวสูตร B5 ที่เติมไคโทซานความเข้มข้น 200 mg/L หลังจากการเลี้ยงไปแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทำให้เซลล์พืชดังกล่าวผลิตสาร anthraquinone ได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับไคโทซานถึง 2 เท่า แต่หลังจากการเลี้ยงไปจนครบเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณของสารดังกล่าวก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยไคโทซานที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถกระตุ้นการทำงานของ phospholipase C (PLC) ซึ่งเป็นสารที่ไปกระตุ้นการสร้าง secondary massengers เช่น Ca^{2+} ที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของ protein kinase C ได้ เมื่อเติมสาร neomycin ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ PLC พบว่าหลังจากเซลล์แขวนลอยได้รับ neomycin เป็นเวลา 30 นาที จะมีผลทำให้ปริมาณของสาร anthraquinone ลดลง แต่เมื่อมีการเติมไคโทซานที่ความเข้มข้น 200 mg/L ลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวจะสามารถช่วยชะลอการลดลงของปริมาณสาร anthraquinone ให้ช้าลงได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะทดลองดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง mitogen activated protein kinase (MAPK)

ซึ่งทำให้มีการสร้างสาร anthraquinone ที่มากกว่าปกติ แต่หากมีการเติมสารที่ยับยั้งการทำงานของ MAPK เป็นเวลา 10 -15 นาที ก่อนจะมีการเติมไคโทซานพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง การสร้างสารในเซลล์ที่ได้รับไคโทซานจะไม่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมมากนัก

Chong และคณะ (2005) ได้ศึกษาใน *Morinda elliptica* ซึ่งเป็นพืชที่มีการสร้างสารทุติยภูมิในกลุ่ม anthraquinone โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร G medium ร่วมกับไคโทซานที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.25 g/L หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีไคโทซานความเข้มข้น 0.01 g/L จะมีน้ำหนักแห้งสูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโทซานให้สูงถึง 0.25 g/L จะทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์ลดลง แต่มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสาร anthraquinone ในปริมาณที่สูงขึ้น

วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสตีวิโอไซด์

เนื่องจากสตีวิโอไซด์เป็นสารที่ได้รับความนิยมใช้ในการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สตีวิโอไซด์ในหญ้าหวาน โดยวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดวิธีหนึ่งคือ การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งได้มีการนำไปใช้ในการตรวจสอบสารสตีวิโอไซด์ในใบแห้งของหญ้าหวานดังมีรายงานดังนี้

Makapugay และคณะ (1984) ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารไกลโคไซด์ชนิดต่างๆ ในหญ้าหวาน โดยใช้การสกัดผ่าน Soxhlet และใช้ HPLC ในการแยกสารไกลโคไซด์ชนิดต่างๆ ในใบของหญ้าหวาน โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดครั้งนี้คือ คลอโรฟอร์มและเมทานอล ซึ่งจะทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปสกัดต่อด้วยเมทานอลเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อทำการสกัดเสร็จแล้วจึงนำไประเหยให้แห้ง แล้วนำไปละลายในเมทานอลเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป โดย mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ อะซีโตไนไตรล์และน้ำ (80:20) โดยผ่านคอลัมน์ชนิด NH_2 และใช้ UV detection ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ต่อมา Kolb และคณะ (2001) ได้ทำการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการวิเคราะห์ของ Makapugay และคณะ ในปี 1984 และวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยวิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้มีข้อดีคือใช้เวลาในการสกัดน้อยลงและยังช่วยลดความเสี่ยงของการใช้สารเคมีซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม โดยตัวทำละลายในสกัดครั้งนี้คือ เอทานอล 70% ที่อุณหภูมิ 70 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที โดย mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ อะซีโตไนไตรล์และน้ำ (80:20) โดยผ่านคอลัมน์ชนิด NH_2 และ

ใช้ UV detection ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร เช่นเดียวกัน ซึ่งสามารถช่วยลดระยะเวลาในการสกัด อีกทั้งวิธีการวิเคราะห์ที่ได้ทำการปรับปรุงขึ้นมานี้มีความถูกต้องและแม่นยำสูงอีกด้วย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์การศึกษา

1.1 พืชทดลอง

ต้นหญ้าหวาน *Stevia rebaudiana* Bertoni ได้รับความอนุเคราะห์จากอุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมลฑล จังหวัดนครปฐม

1.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.2.1 บีกเกอร์ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.2.2 ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

1.2.3 กระบอกตวงขนาด 25, 50 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.2.4 ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝาพลาสติกทนความร้อน

1.2.5 แท่งแก้วสำหรับคนสาร

1.2.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (balance)

1.2.7 เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)

1.2.8 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)

1.2.9 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

1.2.10 ตู้เย็น (refrigerator)

1.2.11 เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)

1.2.12 เตาอบความร้อน (hot air oven)

1.2.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.2.14 ปากคีบ

1.2.15 มีดผ่าตัด พร้อมใบมีดเบอร์ 11

1.2.16 จานแก้ว (petri dish)

1.2.17 ช้อนตักสาร

1.2.18 อะลูมิเนียมฟอยล์

1.2.19 Micropipette ขนาดปริมาตร 20, 200 และ 1,000 µl (Gilson, France)

1.2.20 Pipette tip ขนาดปริมาตร 200 และ 1,000 µl

1.2.21 กระดาษชั่งสารเคมี

1.2.22 ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.23 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 ^{o}C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน

1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ

1.3.1 HPLC instrument: HP 1100 HPLC (Agilent 1100) System

1.3.2 HPLC column: TSKgel® NH_2-100 3µm (4.6 mm.ID x 15 cm) (TOSOH CORPORATION)

1.3.3 Rotary shaker

1.3.4 Paper filter, quantitative, routine ashless, Whatman: Grade 42

1.3.5 Nylon syringe filter size 0.22µm

1.3.6 Syringe

1.3.7 Eppendorf

1.3.8 หลอดแก้วขนาด 5 ml ฝาเกลียว

1.3.9 Ultrasonic bath

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.4.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) (ภาคผนวก ก)

1.4.2 สารควบคุมการเติบโต Indole-3-acetic acid (IAA)

1.4.3 สารควบคุมการเติบโต Benzyladenine (BA)

1.4.4 สารควบคุมการเติบโต 6-furfurylaminopurine (Kinetin)

1.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาผลของขนาดพอลิเมอร์ %DD และความเข้มข้นของไคโทซาน:

ไคโทซานชนิด P80 หมายถึง chitosan polymer ที่มี degree of deacetylation 80-90% (MW = 530,000 Da)

ไคโทซานชนิด P90 หมายถึง chitosan polymer ที่มี degree of deacetylation

90% ขึ้นไป (MW = 450,000 Da)

ไคโทซานชนิด O80 หมายถึง chitosan oligomer ที่ได้จากการใช้ chitinase ตัด P80 ซึ่งมี degree of deacetylation ประมาณ 80-90% (MW = 45,000 Da)

ไคโทซานชนิด O90 หมายถึง chitosan oligomer ที่ได้จากการใช้ chitinase ตัด P90 ซึ่งมี degree of deacetylation ประมาณ 90% ขึ้นไป (MW = 110,000 Da)

ไคโทซานทั้ง 4 ชนิดได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัฐ พิชญางกูร ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และสารรีบาวดิโอไซด์ เอ

2.1 Standard stevioside, Sigma Chemical Co., USA

2.2 Standard rebaudioside A, Sigma Chemical Co., USA

2.3 Acetronitrile, HPLC grade

2.4 Ethyl alcohol 70 %

2.5 Acetic acid

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมพืชทดลองในสภาพปลอดเชื้อ

ตัดลำต้นหญ้าหวานมาเป็นท่อนๆ ขนาดความยาวประมาณท่อนละ 5 เซนติเมตร นำลำต้นของหญ้าหวานมาริดใบออก แล้วล้างด้วยน้ำไหลเพื่อทำความสะอาดเบื้องต้น ตัดปลายยอดและลำต้นของหญ้าหวานให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำยาซันไลต์ประมาณ 1 นาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด นำส่วนปลายยอดและลำต้นของหญ้าหวานมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ผสม Tween 20 จำนวน 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างเนื้อเยื่อพืช 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ แล้วนำปลายยอดและข้อที่มีตาข้างมาตัดให้มีขนาดยาว 1 เซนติเมตรเท่าๆ กันเพื่อนำเนื้อเยื่อปลายยอดและข้อที่มีตาข้างไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) หรือ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเติบโตในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 ^{o}C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ต้นหญ้าหวานที่เจริญในสภาวะปลอดเชื้อสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 ศึกษาความเข้มข้นของออกซินและชนิดกับความเข้มข้นของไซโทไคนินในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวาน

2.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของออกซินและชนิดกับความเข้มข้นของไซโทไคนินในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวาน

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยนำต้นหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงไว้ในสภาวะปลอดเชื้อจากข้อ 2.1 มาตัดใบทิ้ง และ ตัดลำต้นให้มีความยาว 1 เซนติเมตร เท่ากันๆ โดยให้มี 1 ข้อต่อชิ้นส่ว explant และข้ออยู่ห่างจากปลายทั้งสองด้านใกล้เคียงกัน นำไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเติบโต Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 mg/L ร่วมกับ Indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ตามลำดับ เทียบกับ kinetin ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 mg/L ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ตามลำดับ และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต รวมทั้งสิ้น 17 ชุดการทดลอง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ10 ขวด (รวม 510 ขวด) เลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละ 3 ชิ้น นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2°C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกผลการทดลองตามข้อ 2.2.3

2.2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของไซโทไคนินในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวาน

วางแผนการทดลองแบบ RCBD โดยใช้ต้นหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงไว้ในสภาวะปลอดเชื้อจากข้อ 2.1 นำมาตัดชิ้นส่วนพืชตามวิธีในข้อ 2.2.1 นำไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเติบโต BA เพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 mg/L เทียบกับ kinetin เพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น 6, 12 และ 18 mg/L และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตรวมทั้งสิ้น 8 ชุดการทดลอง ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (รวม 320 ขวด)เลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละ 3 ชิ้น นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรส

เซนส์ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกผลการทดลองตามข้อ 2.2.3

2.2.3 บันทึกผลการทดลอง

2.2.3.1 บันทึกจำนวนยอด จำนวนราก และวัดความยาวยอด และการเกิดแคลลัส

2.2.3.2 ชั่งน้ำหนักสดของยอดรวมทั้งแคลลัสที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วน explant และน้ำหนักสดของรากต่อชิ้นส่วน explant

2.2.3.3 นำตัวอย่างในข้อ 2.2.3.2 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของยอด และน้ำหนักแห้งของราก

2.3 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหญ้าหวานในหลอดทดลอง

2.3.1 วางแผนการทดลองแบบ RCBD โดยใช้ต้นหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงไว้ในสภาวะปลอดเชื้อจากข้อ 2.1 นำมาตัดชิ้นส่วนพืชตามวิธีในข้อ 2.2.1 นำไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมไคโทซานชนิด P80 P90 O80 และ O90 ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 5, 10, 20 และ 40 mg/L และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซาน รวมทั้งสิ้น 17 ชุดการทดลอง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด (รวม 255 ขวด) เลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละ 3 ชิ้น นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ความเข้มแสง 2,250 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

2.3.2 บันทึกผลการทดลอง

2.3.2.1 บันทึกจำนวนยอด จำนวนราก และวัดความยาวยอด

2.3.2.2 ชั่งน้ำหนักสดของยอดรวมทั้งแคลลัสที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วน explant และน้ำหนักสดของรากต่อชิ้นส่วน explant

2.3.2.3 นำตัวอย่างในข้อ 2.3.2.2 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของยอด และน้ำหนักแห้งของราก

2.4 ศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโตและไคโทซานต่อปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ในหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

2.4.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ด้วยระบบ HPLC

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ด้วยระบบ HPLC ภายใต้สภาวะดังต่อไปนี้ (Kolb *et al*, 2001)

HPLC column	:	TSKgel® NH_2-100 3µm (4.6 mm.ID x 15 cm)
Mobile phase	:	Acetonitrile : Water (80:20)
Flow rate	:	2 ml/min
Detection	:	UV 210 nm
Injection volume	:	10 µl
Running time	:	17 min

2.4.1.1 การตรวจสอบ linearity ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ โดยฉีด 10 µl ของสารละลายมาตรฐานสตีวิโอไซด์ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.0312 mg/ml หรือสารละลายมาตรฐานรีบาวดิโอไซด์ เอ ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.04 mg/ml ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง และนำข้อมูลที่ได้มาสร้างเป็น calibration curve ระหว่างปริมาณสารและพื้นที่ใต้ peak

2.4.1.2 การตรวจสอบ precision ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ

2.4.1.2.1 การตรวจสอบ intraday precision หรือ within day precision เป็นการทดลองซ้ำในช่วงวันเดียวกัน และใช้เครื่องมือและสภาพแวดล้อมเดียวกัน โดยการฉีดสารละลายสตีวิโอไซด์หรือรีบาวดิโอไซด์ เอ ปริมาตร 10 µl โดยมีความเข้มข้นของสตีวิโอไซด์ 3 ระดับ คือ 2, 0.25 และ 0.0312 mg/ml ส่วนความเข้มข้นของรีบาวดิโอไซด์ เอ 3 ระดับ คือ 2, 0.5

และ 0.125 mg/ml ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นจะทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 6 ครั้ง

2.4.1.2.2 การศึกษา interday precision หรือ day to day precision

ทำการทดลองซ้ำต่อเนื่องกัน 2 วัน โดยมีการเตรียม mobile phase ใหม่ ทำการฉีดสารละลายสตีวิโอไซด์หรือรีบาวดิโอไซด์ เอ ปริมาตร 10 µl โดยมีความเข้มข้นของสตีวิโอไซด์ 3 ระดับ คือ 2, 0.25 และ 0.0312 mg/ml และมีความเข้มข้นของรีบาวดิโอไซด์ เอ 3 ระดับ คือ 2, 0.5 และ 0.125 mg/ml ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นจะทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 6 ครั้ง

2.4.1.2.3 คำนวณหาค่า precision ในรูปของ % relative standard deviation (RSD) ดังสมการ

$$\% \text{ RSD} = \frac{S}{\bar{X}}$$

S = standard deviation

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของผลที่ได้จากแต่ละความเข้มข้น

เปรียบเทียบค่า %RSD ที่คำนวณได้กับค่า %RSD ที่ยอมรับได้ตามกำหนดของ AOAC (ภาคผนวก ข)

2.4.1.3 การตรวจสอบค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

2.4.1.3.1 Limit of Detection (LOD)

LOD คือปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้ ซึ่งศึกษาโดยใช้สารละลายสตีวิโอไซด์ที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 0.0625 mg/ml หรือสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ ที่ความเข้มข้น 0.125 mg/ml จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วนำสารละลายสตีวิโอไซด์หรือรีบาวดิโอไซด์ เอ ที่ได้ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 10 µl มาฉีดเพื่อดูความสูงของ signal ที่ได้ต่อความสูงของ noise ที่

เกิดขึ้น โดย signal ของสารละลายจะต้องมีความสูงเป็น 3 เท่า ของความสูงของ Noise (S/N = 3:1) ซึ่งถือเป็นค่า LOD

2.4.1.3.2 Limit of Quantitation (LOQ)

LOD คือปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณได้ ซึ่งศึกษาโดยใช้สารละลายสตีวิโอไซด์ที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 0.0625 mg/ml หรือสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ ที่ความเข้มข้น 0.125 mg/ml จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วนำสารละลายสตีวิโอไซด์หรือรีบาวดิโอไซด์ เอ ที่ได้ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 10 µl มาฉีดเพื่อดูความสูงของ signal ที่ได้ต่อความสูงของ noise ที่เกิดขึ้น โดย signal ของสารละลายจะต้องมีความสูงเป็น 10 เท่าของความสูงของ Noise (S/N = 10:1) ซึ่งถือเป็นค่า LOD

2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบแห้งของหญ้าหวานที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเติบโตที่ให้ผลดีที่สุด

นำส่วนใบแห้งของชุดการทดลองในข้อ 2.2.1 และ 2.2.2 ที่ให้ผลดีที่สุดคือมีจำนวนยอดหรือน้ำหนักสดยอดมากที่สุดกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ใช้สารควบคุมการเติบโตมาทำการสกัด โดยใช้ตัวอย่างใบหญ้าหวานแห้งบดละเอียด 0.01 กรัม สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำไป sonicate ด้วย ultrasonic bath ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็น เวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปกรองผ่าน Nylon syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสตีวิโอไซด์และสารรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบหญ้าหวานด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีของ Kolb และคณะ (2001)

2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และสารรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบแห้งของหญ้าหวานที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับไคโทซาน นำส่วนใบหญ้าหวานแห้งของชุดการทดลองในข้อ 2.3.2.3 มาทำการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และสารรีบาวดิโอไซด์ เอ ในหญ้าหวานที่ปลูกเลี้ยงในธรรมชาติจากอุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ ใช้ใบอ่อนบริเวณยอดของหญ้าหวาน โดยคัดเลือกเฉพาะใบที่นับจากยอดลงมาไม่เกินข้อที่ 3 ของต้นหญ้าหวาน นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลที่ได้ในแต่ละชุดการทดลอง มาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistic 17.0 (บริษัท SPSS Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลของการใช้ออกซินร่วมกับไซโทไคนินและการใช้ไซโทไคนินเพียงอย่างเดียวต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

1.1 ผลของความเข้มข้นของ IAA ร่วมกับ BA หรือ kinetin อย่างใดอย่างหนึ่งที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกันไซโทไคนิน ได้แก่ Indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 mg/L เทียบกับ IAA ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 mg/L และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต รวมทั้งสิ้น 17 ชุดการทดลอง เมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ พบว่าส่วนข้อของหญ้าหวานบริเวณรอยตัดด้านล่างที่สัมผัสกับอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเติบโตทุกชุดการทดลองจะเกิดเป็นก้อนแคลลัสขนาดใหญ่ โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นนี้มีลักษณะเกาะตัวกันแน่น ส่วนที่ตาข้างมียอดเกิดขึ้น เมื่อนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นพบว่า ชุดการทดลองที่มีแนวโน้มว่าสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดมากกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต ได้แก่ ชุดการทดลองที่เติม IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.75 mg/L (ภาพที่ 4) รองลงมาคือชุดการทดลองที่เติม IAA ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และ ชุดการทดลองที่เติม IAA ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.75 mg/L โดยมีจำนวนยอด 2.00 ± 0.00, 1.96 ± 0.02 และ 1.94 ± 0.03 ยอดต่อข้อ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ส่วนการใช้ IAA ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ทุก ๆ ความเข้มข้นพบว่าให้จำนวนยอดต่อข้อต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุม โดยเฉพาะการใช้ IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ทุกความเข้มข้น มีผลทำให้จำนวนยอดต่อข้อต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนความยาวยอดของหญ้าหวานพบว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตจะมีความยาวยอดมากที่สุด คือ 32.96 ± 4.55 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับชุดการทดลองที่มีความยาวยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดได้แก่ ชุดการทดลองที่เติม IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L (ตารางที่ 2)

ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของยอดและแคลลัส พบว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตจะมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยน้อยที่สุด และชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L (ภาพที่ 4) เป็นชุดการทดลองที่มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของยอดและแคลลัสของหญ้าหวานมากที่สุด คือ 234.62 ± 28.46 และ 30.34 ± 3.18 ตามลำดับ รองลงมาคือชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.75 mg/L ซึ่งมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของยอดและแคลลัสของหญ้าหวานเท่ากับ 203.03 ± 17.61 และ 28.48 ± 2.03 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3-4)

สำหรับการเจริญเติบโตของรากหญ้าหวานพบว่าเกิดรากเฉพาะในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตและชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 0.75 mg/L เท่านั้น โดยชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตจะมีจำนวนรากของหญ้าหวานมากที่สุด คือ 1.62 ± 0.18 รากต่อข้อ และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต IAA ร่วมกับ BA ทุกความเข้มข้นยับยั้งการเกิดรากของหญ้าหวาน (ตารางที่ 5)

ส่วนค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากหญ้าหวานพบว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากหญ้าหวานมากที่สุด คือ 27.65 ± 4.46 และ 4.02 ± 0.50 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 6-7)

1.2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของไซโทไคนิน ได้แก่ BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 mg/L เปรียบเทียบกับ kinetin ความเข้มข้น 6, 12 และ18 mg/L และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต รวมทั้งสิ้น 8 ชุดการทดลอง เมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ พบว่าส่วนข้อของหญ้าหวานที่สัมผัสกับอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเติบโตทุกชุดการทดลองจะเกิดเป็นก้อนแคลลัสขนาดเล็กบริเวณรอยตัดด้านล่างส่วนด้านบนจะมียอดเกิดขึ้น โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นนี้จะมีลักษณะเกาะตัวกันแน่น และเมื่อนับจำนวนยอดที่ได้พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในชุดการทดลองทั้งหมด โดยทุกชุดการทดลองที่สามารถชักนำหญ้าหวานให้เกิดยอดได้เท่ากันคือ 2.00 ± 0.00 ยอดต่อข้อ (ตารางที่ 8)

เมื่อวัดความยาวยอดพบว่า ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตมีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 24.00 ± 1.63 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับชุดการทดลองที่มีความยาวยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดได้แก่ ชุดการทดลองที่เติม kinetin ความเข้มข้น 12 mg/L (ตารางที่ 9)

ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของยอดและแคลลัสหญ้าหวานพบว่า ชุดการทดลองที่เติม BA ทุก ๆ ความเข้มข้นจะมีแนวโน้มของค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดและแคลลัสหญ้าหวานมากกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต โดยชุดการทดลองที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L (ภาพที่ 5) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดและแคลลัสหญ้าหวานมากที่สุดและมากกว่าชุดการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีน้ำหนักสด 222.88 ± 21.29 และน้ำหนักแห้ง 23.86 ± 1.99 มิลลิกรัม รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L คือมีน้ำหนักสด 156.99 ± 13.64 และน้ำหนักแห้ง 16.20 ± 1.20 มิลลิกรัม โดยสังเกตพบว่าชุดการทดลองที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/Lจะมีใบที่มีขนาดใหญ่กว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อีกด้วย สำหรับชุดการทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดและแคลลัสหญ้าหวานต่ำที่สุดคือ ชุดการทดลองเติม kinetin ความเข้มข้น 12 mg/L (ตารางที่ 10-11)

สำหรับการเจริญเติบโตของรากหญ้าหวานพบว่าหญ้าหวานจะเกิดรากเฉพาะในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตเท่านั้น (ตารางที่ 12-14)

2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน โดยหลังจากการนำข้อหญ้าหวานไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมไคโทซานชนิดพอลิเมอร์ (P) และโอลิโกเมอร์ (O) ซึ่งแต่ละชนิดมี %DD เท่ากับ 80 และ 90 และแต่ละชนิด มีระดับความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 mg/L เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซาน รวมทั้งสิ้น 17 ชุดการทดลอง เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากการเก็บผลการทดลองโดยนับจำนวนยอด วัดความยาวยอด ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอด นับจำนวนราก ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งราก พบว่าการใช้ไคโทซานแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตของตาข้างของหญ้าหวานที่เลี้ยงในหลอดทดลองแตกต่างกัน หากพิจารณาจำนวนยอดต่อข้อที่เกิดขึ้นพบว่าชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานมีผลต่อค่าเฉลี่ยจำนวนยอดต่อข้อแตกต่างกันทางสถิติ โดยชุดการทดลองที่ใช้ไคโทซานชนิด P80 ความเข้มข้น 10 mg/L และไคโทซานชนิด P90 ความเข้มข้น 5 mg/L มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด

ต่อข้อ เท่ากับ 2.00 ± 0.00 ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่ใช้ P80 ความเข้มข้น 5 mg/L ซึ่งมีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดต่อข้อน้อยที่สุดคือ 1.73 ± 0.09 แต่เมื่อเทียบกับชุดควบคุมพบว่าการใช้ไคโทซานในชุดการทดลองต่างๆ ในครั้งนี้ให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ดังนั้นจึงมีเพียงแนวโน้มที่สูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซาน (ตารางที่ 15)

สำหรับความยาวยอดพบว่าชุดการทดลองที่ใช้ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L (ภาพที่ 6) มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดต่อข้อมากที่สุดคือ 11.13 ± 1.76 มิลลิเมตร และมากกว่าความยาวยอดของทุกชุดการทดลองรวมทั้งชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าชุดการทดลองที่ใช้ไคโทซานชนิด P90 และ O90 ทุก ๆ ความเข้มข้นมีแนวโน้มให้ค่าเฉลี่ยความยาวยอดของหญ้าหวานน้อยกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซาน สำหรับชุดการทดลองที่มีค่าเฉลี่ยความยอดน้อยสุดคือ 4.25 ± 0.57 มิลลิเมตร ได้แก่ชุดการทดลองที่ใช้ไคโทซานชนิด P90 ความเข้มข้น 5 mg/L (ตารางที่ 16)

ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของยอดหญ้าหวานพบว่าชุดการทดลองที่ใช้ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L (ภาพที่ 6) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดหญ้าหวานมากที่สุด คือ 38.09 ± 8.27 และ 4.71 ± 0.97 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดหญ้าหวานในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับชุดการทดลองที่มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของยอดหญ้าหวานน้อยที่สุดคือ 13.90 ± 1.29 มิลลิกรัม ได้แก่ชุดการทดลองที่ใช้ไคโทซานชนิด P80 ความเข้มข้น 20 mg/L ส่วนค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของหญ้าหวานที่น้อยที่สุดนั้นได้จากชุดการทดลองที่เติมไคโทซานชนิด P80 ความเข้มข้น 5 mg/L ชนิด P90 ความเข้มข้น 40 mg/L และ P80 ความเข้มข้น 20 mg/L ซึ่งมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.69 ± 0.14, 1.69 ± 0.16 และ 1.69 ± 0.17 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 17-18)

ด้านการเจริญของรากหญ้าหวาน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจำนวนราก โดยชุดการทดลองที่มีแนวโน้มของค่าเฉลี่ยจำนวนรากมากกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซานได้แก่ ชุดการทดลองที่เติมไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L และเป็นชุดการทดลองที่มีแนวโน้มค่าเฉลี่ยจำนวนรากมากที่สุด คือ 0.63 ± 0.17 รากต่อต้น และยังพบว่าชุดการทดลองที่เติมไคโทซานชนิด P80 และ P90 ทุกๆ ความเข้มข้น ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนรากที่น้อยกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซาน นอกจากนี้ชุดการทดลองที่ใช้ไคโทซานชนิด P80 ความเข้มข้น 10 mg/L และชนิด O80 ความเข้มข้น 20 mg/L ยังมีผลไปยับยั้งการเกิดรากในหญ้าหวานด้วย (ตารางที่ 19)

สำหรับน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากหญ้าหวานพบว่าชุดการทดลองที่เติมไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L จะมีผลทำให้หญ้าหวานมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งรากมากที่สุด คือ 6.71 ± 3.00 และ 0.92 ± 0.38 มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆ ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไคโทซาน (ตารางที่ 20-21)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	จำนวนยอดของหญ้าหวานต่อข้อ*
ชุดควบคุม	1.92 ± 0.04^{ab}
IAA 1 mg/L + KIN 0.25 mg/L	1.76 ± 0.05^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 0.5 mg/L	1.85 ± 0.05^{ab}
IAA 1 mg/L + KIN 0.75 mg/L	1.84 ± 0.05^{ab}
IAA 1 mg/L + KIN 1 mg/L	1.78 ± 0.05^{ab}
IAA 2 mg/L + KIN 0.25 mg/L	1.37 ± 0.12^{c}
IAA 2 mg/L + KIN 0.5 mg/L	1.44 ± 0.12^{c}
IAA 2 mg/L + KIN 0.75 mg/L	1.47 ± 0.10^{c}
IAA 2 mg/L + KIN 1 mg/L	1.40 ± 0.08^{c}
IAA 1 mg/L + BA 0.25 mg/L	1.91 ± 0.04^{ab}
IAA 1 mg/L + BA 0.5 mg/L	1.96 ± 0.02^{ab}
IAA 1 mg/L + BA 0.75 mg/L	1.94 ± 0.03^{ab}
IAA 1 mg/L + BA 1 mg/L	1.86 ± 0.06^{ab}
IAA 2 mg/L + BA 0.25 mg/L	1.84 ± 0.04^{ab}
IAA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L	1.78 ± 0.07^{ab}
IAA 2 mg/L + BA 0.75 mg/L	2.00 ± 0.00^{a}
IAA 2 mg/L + BA 1 mg/L	1.82 ± 0.06^{ab}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความยาวยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	**ความยาวยอดของหญ้าหวาน (มิลลิเมตร)***
ชุดควบคุม	32.96 ± 4.55^{a}
IAA 1 mg/L + KIN 0.25 mg/L	11.89 ± 1.05^{bcd}
IAA 1 mg/L + KIN 0.5 mg/L	13.60 ± 1.81^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 0.75 mg/L	12.75 ± 1.30^{bc}
IAA 1 mg/L + KIN 1 mg/L	11.19 ± 1.33^{bcd}
IAA 2 mg/L + KIN 0.25 mg/L	9.88 ± 1.13^{bcde}
IAA 2 mg/L + KIN 0.5 mg/L	7.67 ± 0.86^{cde}
IAA 2 mg/L + KIN 0.75 mg/L	8.41 ± 1.08^{bcde}
IAA 2 mg/L + KIN 1 mg/L	8.85 ± 0.95^{bcde}
IAA 1 mg/L + BA 0.25 mg/L	8.67 ± 0.76^{bcde}
IAA 1 mg/L + BA 0.5 mg/L	9.19 ± 1.19^{bcde}
IAA 1 mg/L + BA 0.75 mg/L	7.47 ± 0.83^{cde}
IAA 1 mg/L + BA 1 mg/L	6.40 ± 0.84^{d}
IAA 2 mg/L + BA 0.25 mg/L	9.29 ± 1.06^{bcde}
IAA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L	8.74 ± 0.71^{bcde}
IAA 2 mg/L + BA 0.75 mg/L	6.99 ± 0.80^{d}
IAA 2 mg/L + BA 1 mg/L	5.17 ± 0.59^{e}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดยอดและแคลลัสของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	**น้ำหนักสดของยอดและแคลลัสหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)***
ชุดควบคุม	£117.00 ± 16.22[e]
IAA 1 mg/L + KIN 0.25 mg/L	197.03 ± 15.82[abc]
IAA 1 mg/L + KIN 0.5 mg/L	164.65 ± 17.54[bcde]
IAA 1 mg/L + KIN 0.75 mg/L	203.03 ± 17.61[ab]
IAA 1 mg/L + KIN 1 mg/L	195.44 ± 16.40[abc]
IAA 2 mg/L + KIN 0.25 mg/L	154.14 ± 17.11[bcde]
IAA 2 mg/L + KIN 0.5 mg/L	143.85± 13.76[cde]
IAA 2 mg/L + KIN 0.75 mg/L	135.42 ± 9.79[de]
IAA 2 mg/L + KIN 1 mg/L	137.42 ± 12.02[de]
IAA 1 mg/L + BA 0.25 mg/L	174.76 ± 13.33[bcd]
IAA 1 mg/L + BA 0.5 mg/L	154.88 ± 11.57[bcde]
IAA 1 mg/L + BA 0.75 mg/L	166.05 ± 14.11[bcde]
IAA 1 mg/L + BA 1 mg/L	145.20 ± 15.32[cde]
IAA 2 mg/L + BA 0.25 mg/L	189.09 ± 27.03[abcd]
IAA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L	234.62 ± 28.46[a]
IAA 2 mg/L + BA 0.75 mg/L	179.74 ± 19.10[bcd]
IAA 2 mg/L + BA 1 mg/L	148.05 ± 15.72[bcde]

£ เป็นน้ำหนักสดของยอดหญ้าหวานโดยไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งยอดและแคลลัสของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	**น้ำหนักแห้งของยอดหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)***
ชุดควบคุม	14.22 ± 1.92^{e}
IAA 1 mg/L + KIN 0.25 mg/L	27.03 ± 1.69^{abc}
IAA 1 mg/L + KIN 0.5 mg/L	27.60 ± 2.12^{abc}
IAA 1 mg/L + KIN 0.75 mg/L	28.48 ± 2.03^{ab}
IAA 1 mg/L + KIN 1 mg/L	27.60 ± 2.80^{abc}
IAA 2 mg/L + KIN 0.25 mg/L	22.08 ± 1.89^{bcd}
IAA 2 mg/L + KIN 0.5 mg/L	20.93 ± 1.83^{cd}
IAA 2 mg/L + KIN 0.75 mg/L	18.95 ± 1.29^{de}
IAA 2 mg/L + KIN 1 mg/L	21.21 ± 1.50^{cd}
IAA 1 mg/L + BA 0.25 mg/L	25.16 ± 1.77^{abcde}
IAA 1 mg/L + BA 0.5 mg/L	23.17 ± 1.70^{bcd}
IAA 1 mg/L + BA 0.75 mg/L	24.02 ± 1.69^{abcd}
IAA 1 mg/L + BA 1 mg/L	21.42 ± 1.73^{bcd}
IAA 2 mg/L + BA 0.25 mg/L	25.55 ± 3.19^{abcd}
IAA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L	30.34 ± 3.18^{a}
IAA 2 mg/L + BA 0.75 mg/L	23.82 ± 2.38^{abcd}
IAA 2 mg/L + BA 1 mg/L	22.19 ± 2.08^{bcd}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยจำนวนรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	จำนวนรากของหญ้าหวานต่อต้น*
ชุดควบคุม	1.62 ± 0.18^{a}
IAA 1 mg/L + KIN 0.25 mg/L	0.33 ± 0.10^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 0.5 mg/L	0.52 ± 0.15^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 0.75 mg/L	0.05 ± 0.04^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 0.25 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 0.75 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 0.25 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 0.75 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 0.25 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 0.75 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	**น้ำหนักสดรากของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)***
ชุดควบคุม	27.65 ± 4.46^{a}
IAA 1 mg/L + KIN 0.25 mg/L	1.58 ± 0.69^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 0.5 mg/L	3.60 ± 1.02^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 0.75 mg/L	0.16 ± 0.11^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 0.25 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 0.75 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 0.25 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 0.75 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 0.25 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 0.75 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	**น้ำหนักแห้งรากของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)***
ชุดควบคุม	4.02 ± 0.50^{a}
IAA 1 mg/L + KIN 0.25 mg/L	0.19 ± 0.08^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 0.5 mg/L	0.34 ± 0.09^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 0.75 mg/L	0.05 ± 0.02^{b}
IAA 1 mg/L + KIN 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 0.25 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 0.75 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + KIN 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 0.25 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 0.75 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 1 mg/L + BA 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 0.25 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 0.75 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
IAA 2 mg/L + BA 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	จำนวนยอดของหญ้าหวานต่อข้อ[ns]
ชุดควบคุม	2.00 ± 0.00
BA 0.5 mg/L	2.00 ± 0.00
BA 1 mg/L	2.00 ± 0.00
BA 1.5 mg/L	2.00 ± 0.00
BA 2 mg/L	2.00 ± 0.00
KIN 6 mg/L	2.00 ± 0.00
KIN 12 mg/L	2.00 ± 0.00
KIN 18 mg/L	2.00 ± 0.00

[ns] ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเมื่อ เปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยความยาวยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	ความยาวของยอดหญ้าหวานต่อต้น (มิลลิเมตร)[*]
ชุดควบคุม	24.00 ± 1.63[a]
BA 0.5 mg/L	13.95 ± 0.61[b]
BA 1 mg/L	9.61 ± 0.39[c]
BA 1.5 mg/L	8.12 ± 0.43[cd]
BA 2 mg/L	13.50 ± 0.58[b]
KIN 6 mg/L	8.26 ± 0.41[cd]
KIN 12 mg/L	6.44 ± 0.31[d]
KIN 18 mg/L	7.88 ± 0.30[cd]

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดยอดและแคลลัสของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	น้ำหนักสดยอดของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)*
ชุดควบคุม	79.10 ± 7.93^{cde}
BA 0.5 mg/L	156.99 ± 13.64^{b}
BA 1 mg/L	109.43 ± 12.58^{c}
BA 1.5 mg/L	105.62 ± 11.94^{c}
BA 2 mg/L	222.88 ± 21.29^{a}
KIN 6 mg/L	89.61 ± 9.05^{cd}
KIN 12 mg/L	49.90 ± 3.90^{e}
KIN 18 mg/L	65.59 ± 4.97^{de}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งยอดและแคลลัสของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	น้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)*
ชุดควบคุม	9.00 ± 0.84^{cde}
BA 0.5 mg/L	16.20 ± 1.20^{b}
BA 1 mg/L	11.33 ± 1.05^{c}
BA 1.5 mg/L	11.44 ± 1.14^{c}
BA 2 mg/L	23.86 ± 1.99^{a}
KIN 6 mg/L	10.11 ± 0.82^{cd}
KIN 12 mg/L	6.15 ± 0.42^{e}
KIN 18 mg/L	6.98 ± 0.46^{de}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยจำนวนรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	จำนวนรากของหญ้าหวานต่อต้น*
ชุดควบคุม	2.32 ± 0.19^{a}
BA 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
BA 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
BA 1.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
BA 2 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
KIN 6 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
KIN 12 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
KIN 18 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดรากและแคลลัสของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	น้ำหนักสดรากของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)*
ชุดควบคุม	12.74 ± 1.80^{a}
BA 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
BA 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
BA 1.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
BA 2 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
KIN 6 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
KIN 12 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
KIN 18 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งรากและแคลลัสของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	น้ำหนักแห้งรากของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)*
ชุดควบคุม	1.79 ± 0.23^{a}
BA 0.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
BA 1 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
BA 1.5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
BA 2 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
KIN 6 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
KIN 12 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
KIN 18 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	จำนวนยอดของหญ้าหวานต่อต้น*
ชุดควบคุม	1.81 ± 0.06^{abc}
P80 5 mg/L	1.74 ± 0.09^{c}
P80 10 mg/L	2.00 ± 0.00^{a}
P80 20 mg/L	1.83 ± 0.05^{abc}
P80 40 mg/L	1.92 ± 0.05^{abc}
P90 5 mg/L	2.00 ± 0.00^{a}
P90 10 mg/L	1.82 ± 0.07^{abc}
P90 20 mg/L	1.84 ± 0.06^{abc}
P90 40 mg/L	1.86 ± 0.06^{abc}
O80 5 mg/L	1.85 ± 0.05^{abc}
O80 10 mg/L	1.76 ± 0.06^{bc}
O80 20 mg/L	1.93 ± 0.04^{ab}
O80 40 mg/L	1.89 ± 0.04^{abc}
O90 5 mg/L	1.90 ± 0.05^{abc}
O90 10 mg/L	1.80 ± 0.06^{bc}
O90 20 mg/L	1.93 ± 0.04^{ab}
O90 40 mg/L	1.82 ± 0.07^{abc}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยความยาวยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	**ความยาวยอดของหญ้าหวาน (มิลลิเมตร)***
ชุดควบคุม	7.00 ± 0.89^{bc}
P80 5 mg/L	5.27 ± 0.61^{bc}
P80 10 mg/L	5.59 ± 0.91^{bc}
P80 20 mg/L	6.33 ± 1.21^{bc}
P80 40 mg/L	7.94 ± 1.10^{b}
P90 5 mg/L	4.25 ± 0.57^{c}
P90 10 mg/L	6.61 ± 1.06^{bc}
P90 20 mg/L	5.66 ± 0.89^{bc}
P90 40 mg/L	6.67 ± 1.48^{bc}
O80 5 mg/L	11.13 ± 1.76^{a}
O80 10 mg/L	4.49 ± 0.50^{cb}
O80 20 mg/L	4.51 ± 0.52^{c}
O80 40 mg/L	5.37 ± 0.72^{bc}
O90 5 mg/L	6.27 ± 0.52^{bc}
O90 10 mg/L	5.92 ± 0.68^{bc}
O90 20 mg/L	6.33 ± 1.12^{bc}
O90 40 mg/L	6.86 ± 0.99^{bc}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	น้ำหนักสดยอดของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)*
ชุดควบคุม	16.87 ± 2.20[b]
P80 5 mg/L	15.46 ± 1.17[b]
P80 10 mg/L	17.68 ± 2.78[b]
P80 20 mg/L	13.90 ± 1.29[b]
P80 40 mg/L	22.89 ± 3.74[b]
P90 5 mg/L	16.75 ± 2.84[b]
P90 10 mg/L	20.06 ± 3.91[b]
P90 20 mg/L	20.50 ± 3.14[b]
P90 40 mg/L	14.88 ± 1.62[b]
O80 5 mg/L	38.09 ± 8.27[a]
O80 10 mg/L	14.81 ± 1.90[b]
O80 20 mg/L	14.19 ± 1.61[b]
O80 40 mg/L	19.23 ± 3.30[b]
O90 5 mg/L	22.52 ±2.19 [b]
O90 10 mg/L	22.84 ± 4.54 [b]
O90 20 mg/L	15.99 ± 1.95 [b]
O90 40 mg/L	15.87 ± 2.44 [b]

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	**น้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)***
ชุดควบคุม	2.13 ± 0.31^{b}
P80 5 mg/L	1.69 ± 0.14^{b}
P80 10 mg/L	2.20 ± 0.37^{b}
P80 20 mg/L	1.69 ± 0.17^{b}
P80 40 mg/L	2.82 ± 0.48^{b}
P90 5 mg/L	2.38 ± 0.41^{b}
P90 10 mg/L	2.46 ± 0.49^{b}
P90 20 mg/L	2.47 ± 0.35^{b}
P90 40 mg/L	1.69 ± 0.16^{b}
O80 5 mg/L	4.71 ± 0.97^{a}
O80 10 mg/L	1.90 ± 0.22^{b}
O80 20 mg/L	1.99 ± 0.26^{b}
O80 40 mg/L	2.76 ± 0.45^{b}
O90 5 mg/L	3.02 ± 0.25^{b}
O90 10 mg/L	2.62 ± 0.54^{b}
O90 20 mg/L	2.04 ± 0.26^{b}
O90 40 mg/L	2.00 ± 0.23^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ยจำนวนรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	จำนวนรากของหญ้าหวานต่อต้น*
ชุดควบคุม	0.47 ± 0.14^{abc}
P80 5 mg/L	0.08 ± 0.08^{cd}
P80 10 mg/L	0.00 ± 0.00^{d}
P80 20 mg/L	0.36 ± 0.17^{abcd}
P80 40 mg/L	0.43 ± 0.12^{abc}
P90 5 mg/L	0.29 ± 0.12^{abcd}
P90 10 mg/L	0.33 ± 0.14^{abcd}
P90 20 mg/L	0.07 ± 0.04^{cd}
P90 40 mg/L	0.36 ± 0.15^{abcd}
O80 5 mg/L	0.63 ± 0.17^{a}
O80 10 mg/L	0.30 ± 0.13^{abcd}
O80 20 mg/L	0.00 ± 0.00^{d}
O80 40 mg/L	0.14 ± 0.06^{bcd}
O90 5 mg/L	0.38 ± 0.13^{abcd}
O90 10 mg/L	0.20 ± 0.08^{bcd}
O90 20 mg/L	0.51 ± 0.16^{ab}
O90 40 mg/L	0.21 ± 0.13^{bcd}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

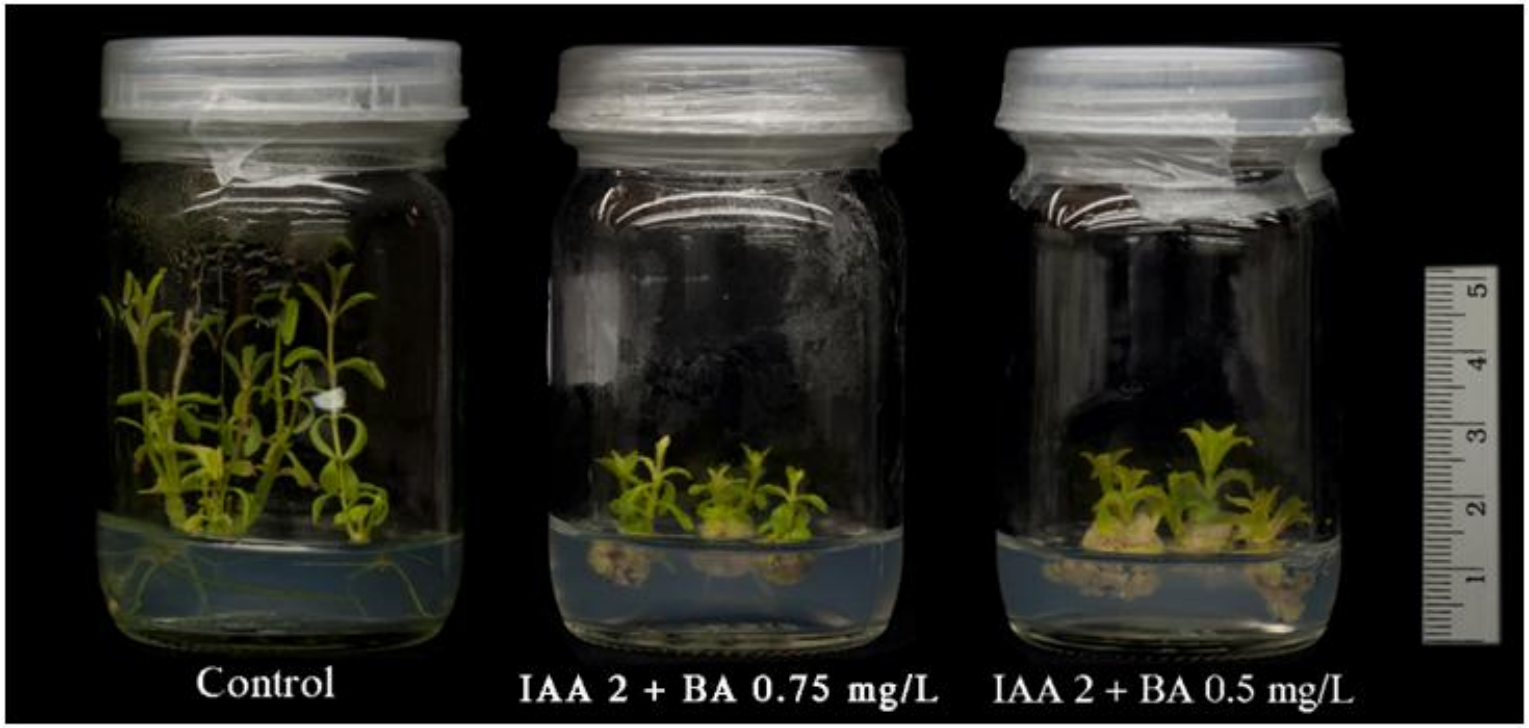
ชุดการทดลอง	น้ำหนักสดรากของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)*
ชุดควบคุม	0.34 ± 0.17^{b}
P80 5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
P80 10 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
P80 20 mg/L	0.77 ± 0.34^{b}
P80 40 mg/L	1.48 ± 0.52^{b}
P90 5 mg/L	0.26 ± 0.16^{b}
P90 10 mg/L	0.32 ± 0.17^{b}
P90 20 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
P90 40 mg/L	0.39 ± 0.24^{b}
O80 5 mg/L	6.71 ± 3.00^{a}
O80 10 mg/L	0.28 ± 0.13^{b}
O80 20 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
O80 40 mg/L	0.18 ± 0.09^{b}
O90 5 mg/L	0.67 ± 0.28^{b}
O90 10 mg/L	0.12 ± 0.06^{b}
O90 20 mg/L	1.18 ± 0.40^{b}
O90 40 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

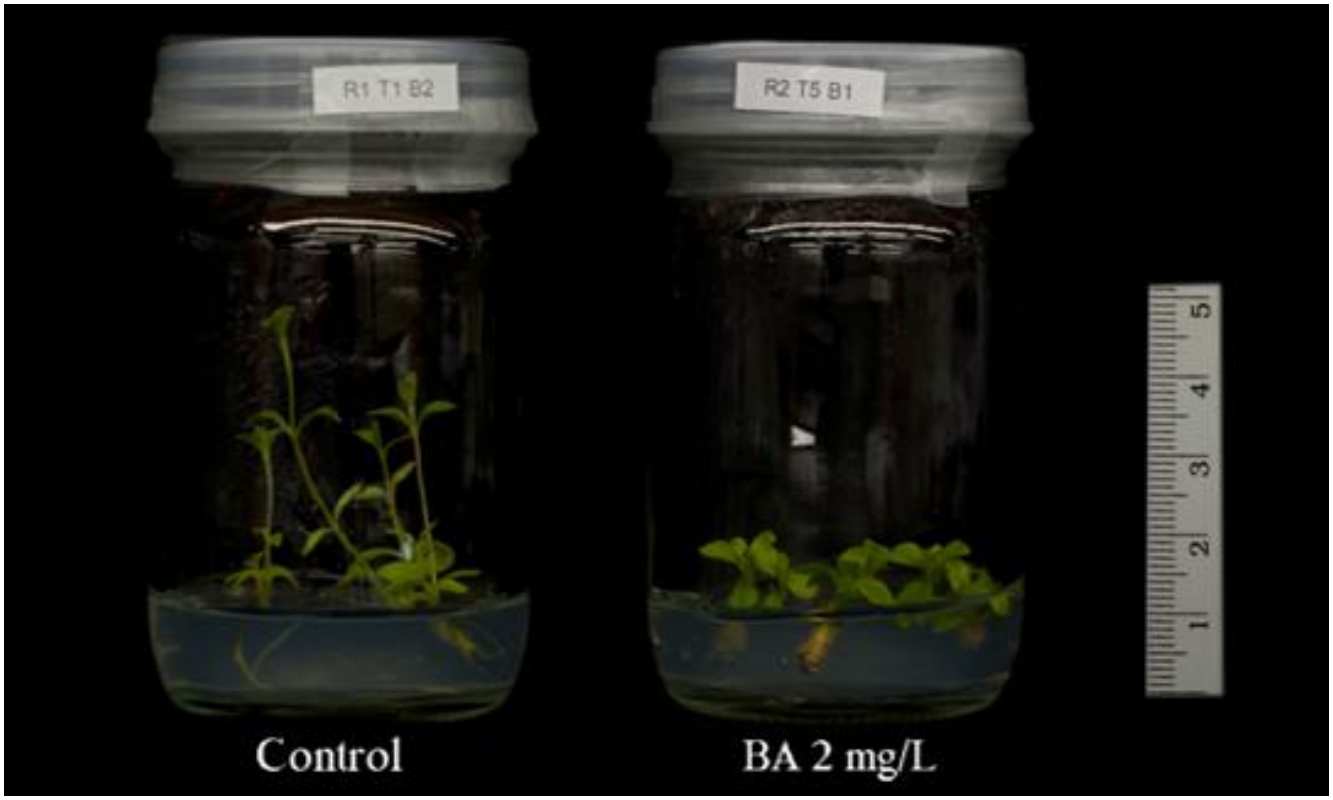
ตารางที่ 21 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งรากของหญ้าหวานหลังจากการเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่แตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	น้ำหนักแห้งรากของหญ้าหวาน (มิลลิกรัม)*
ชุดควบคุม	0.33 ± 0.15^{b}
P80 5 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
P80 10 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
P80 20 mg/L	0.11 ± 0.05^{b}
P80 40 mg/L	0.29 ± 0.11^{b}
P90 5 mg/L	0.05 ± 0.05^{b}
P90 10 mg/L	0.02 ± 0.02^{b}
P90 20 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
P90 40 mg/L	0.02 ± 0.02^{b}
O80 5 mg/L	0.92 ± 0.38^{a}
O80 10 mg/L	0.02 ± 0.02^{b}
O80 20 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
O80 40 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
O90 5 mg/L	0.18 ± 0.09^{b}
O90 10 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}
O90 20 mg/L	0.18 ± 0.07^{b}
O90 40 mg/L	0.00 ± 0.00^{b}

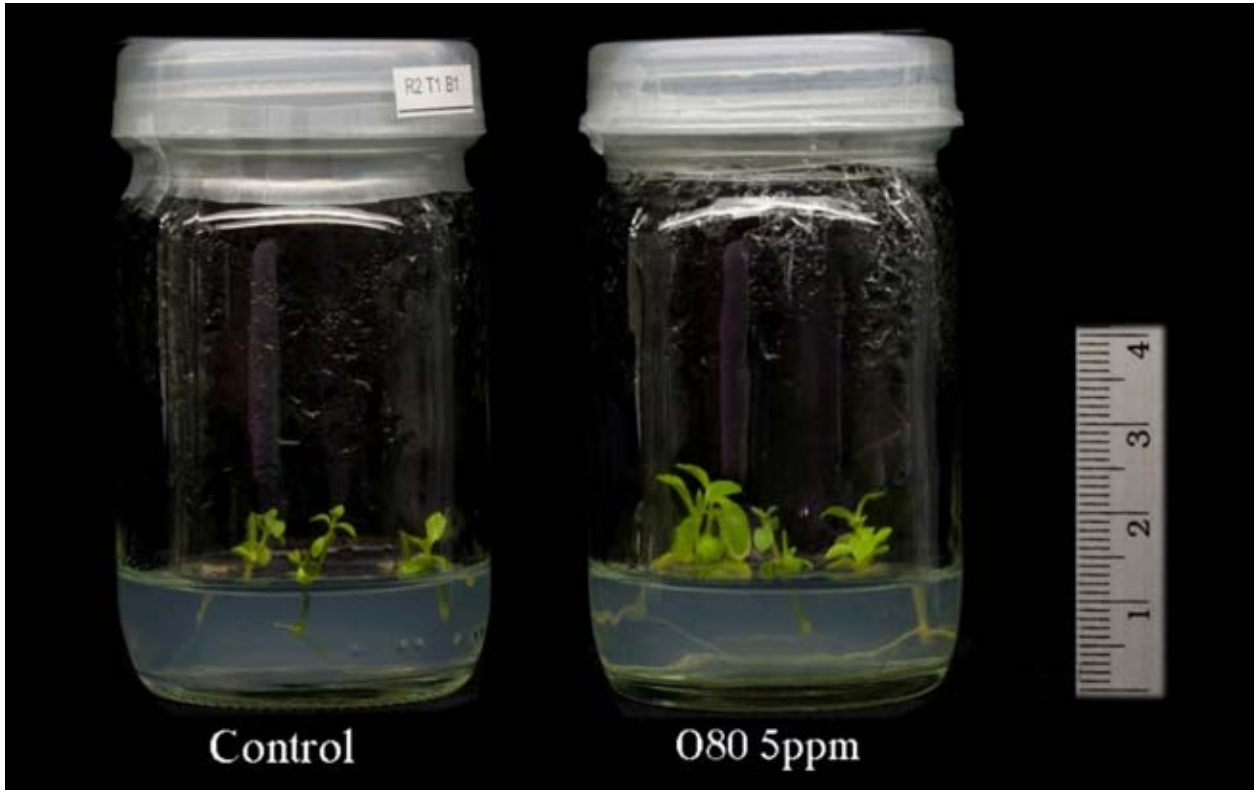
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 4 ผลของสารควบคุมการเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวานเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยชุดการทดลองที่เติม IAA 2 mg/L ร่วมกับ BA 0.75 mg/L เป็นชุดการทดลองที่มีจำนวนยอดมากที่สุด และชุดการทดลองที่เติม IAA 2 mg/L ร่วมกับ BA 0.5 mg/L เป็นชุดการทดลองที่มีน้ำหนักสดยอดและแคลลัสสูงที่สุด



ภาพที่ 5 ผลของสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวานเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยชุดการทดลองที่เติม BA 2 mg/L เป็นชุดการทดลองที่มีน้ำหนักสดยอดและแคลลัสสูงที่สุด

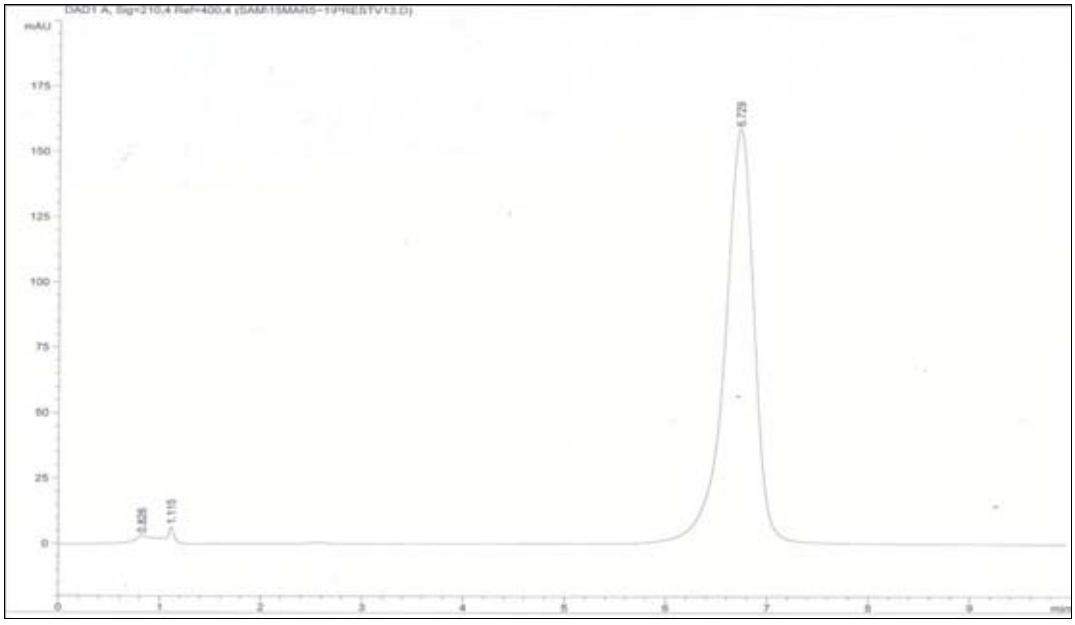


ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของหญ้าหวานที่ได้รับไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไคโทซานบนอาหารสูตร MS หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

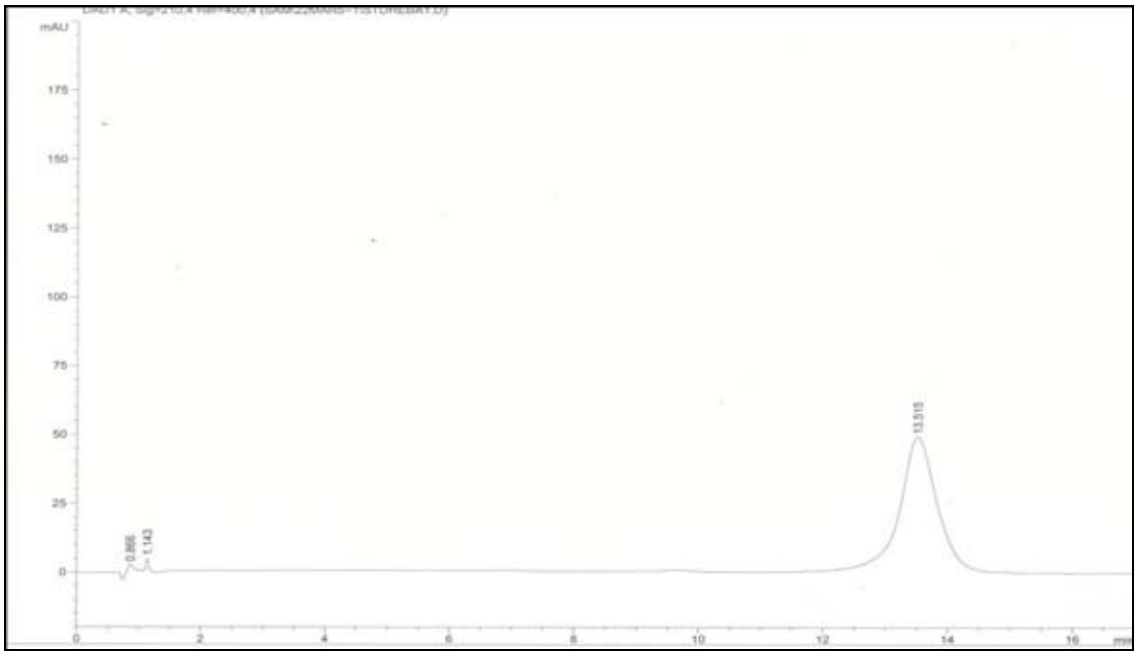
3. ผลของสารควบคุมการเติบโตและไคโทซานต่อปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ ในหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

3.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ ด้วยระบบ HPLC

จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าสารมาตรฐานสตีวิโอไซด์จะมีค่า retention time เท่ากับ 6.729 นาที (ภาพที่ 7) ส่วนสารมาตรฐานรีบาวดิโอไซด์ เอ มีค่า retention time เท่ากับ 13.52 นาที (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 retention time ของสารละลายมาตรฐานสตีวิโอไซด์ 10 µl ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml



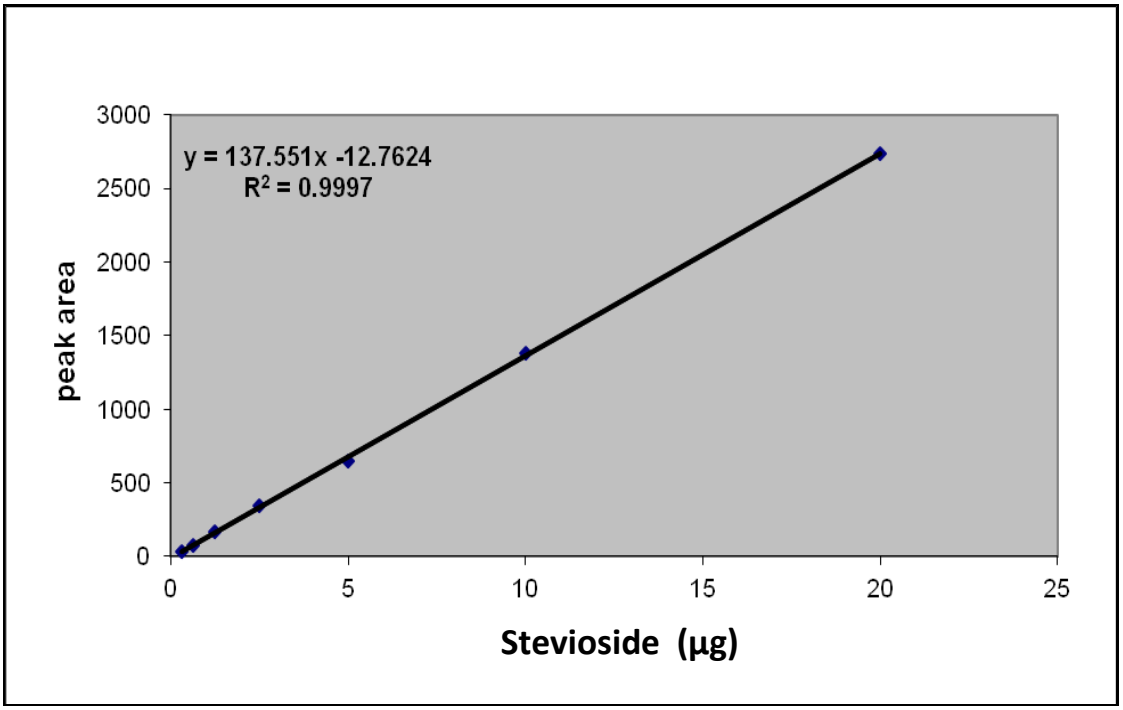
ภาพที่ 8 retention time ของสารละลายมาตรฐานรีบาวดิโอไซด์ เอ 10 µl ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml

3.1.1 การตรวจสอบ linearity ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้ peak ความเข้มข้นของสารละลายสตีวิโอไซด์จำนวน 7 ความเข้มข้น (2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.0312 mg/ml) พบว่าเป็นความสัมพันธ์เชิงบวกที่มีค่า correlation coeffiencent (R^2) เท่ากับ 0.9997 (ตารางที่ 22) (ภาพที่ 9) ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้ peak และความเข้มข้นของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ จำนวน 6 ความเข้มข้น (2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.040 mg/ml) พบว่าเป็นความสัมพันธ์เชิงบวกที่มีค่า correlation coeffiencent (R^2) เท่ากับ 0.9993 (ตารางที่ 23) (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 22 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายสตีวิโอไซด์ 10 µl

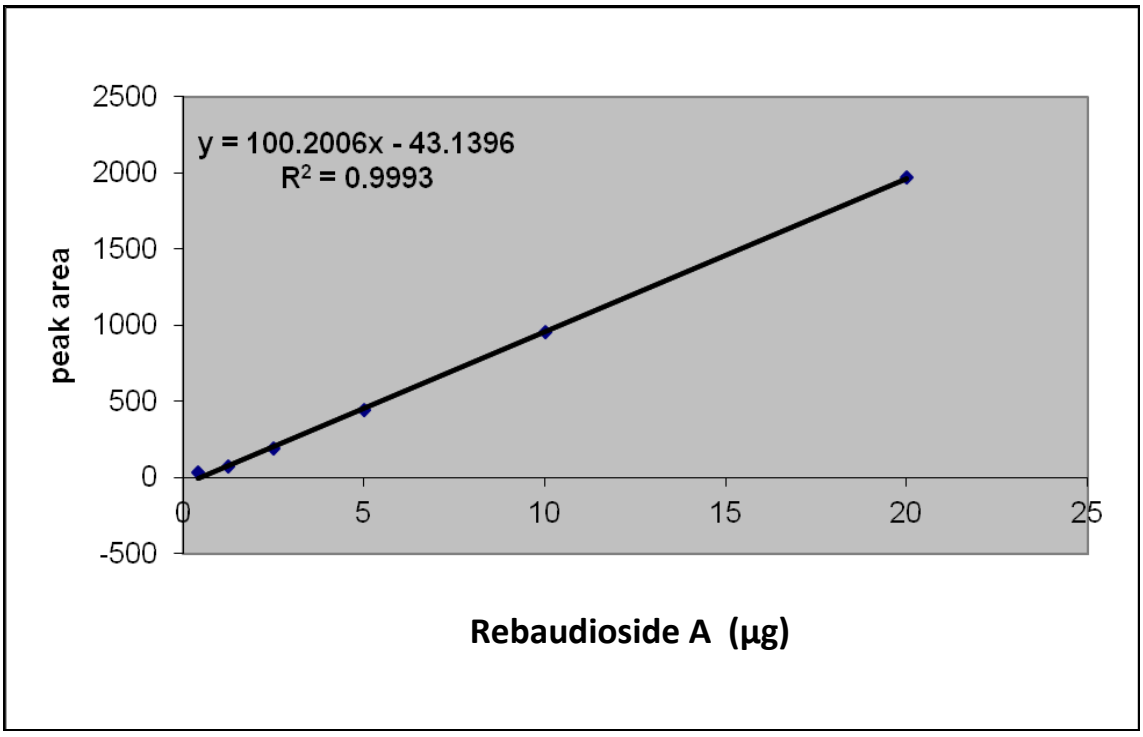
ความเข้มข้น (mg/ml)	ปริมาณสตีวิโอไซด์ที่วิเคราะห์ (µg)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak
2	20	2735.45
1	10	1379.81
0.5	5	644.41
0.25	2.5	344.36
0.125	1.25	164.49
0.0625	0.625	71.27
0.0312	0.3125	29.94



ภาพที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารละลายสตีวิโอไซด์และพื้นที่ใต้ peak

ตารางที่ 23 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ 10 µl

ความเข้มข้น (mg/ml)	ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ ที่วิเคราะห์ (µg)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak
2	20	1968.97
1	10	954.17
0.5	5	441.64
0.25	2.5	192.60
0.125	1.25	72.75
0.040	0.625	33.89



ภาพที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ และพื้นที่ใต้ peak

3.1.2 การตรวจสอบ precision ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ

จากการตรวจสอบ intraday precision และ interday precision ของสารละลายสตีวิโอไซด์พบว่า มีค่า % relative standard deviation (RSD) อยู่ในช่วง 0.33-1.29 และ 0.07-1.09 ตามลำดับ (ตารางที่ 24) สำหรับสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ จะมีค่า % RSD อยู่ในช่วง 0.13-4.64 และ 0.32-2.35 ตามลำดับ (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 24 ค่า intraday precision และ interday precision ของสารละลายสตีวิโอไซด์ 10 µl ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (mg/ml)	วันที่ 1			วันที่ 2		
	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak	SD	%RSD	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak	SD	%RSD
2	3166.60	10.53	0.33	3133.04	2.21	0.07
0.25	328.47	4.10	1.25	316.97	0.93	0.29
0.0312	28.78	0.37	1.29	26.49	0.29	1.09

ตารางที่ 25 ค่า intraday precision และ interday precision ของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ 10 µl ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (mg/ml)	วันที่ 1			วันที่ 2		
	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak	SD	%RSD	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak	SD	%RSD
2	1970.25	2.47	0.13	2053.35	6.56	0.32
0.5	437.89	4.92	1.12	442.15	2.42	0.55
0.125	73.71	3.42	4.64	73.63	1.73	2.35

3.1.3 การตรวจสอบค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) สำหรับสตีวิโอไซด์ได้พบ signal ของสารละลายที่มีความสูงเป็น 3 เท่า และ 10 เท่าของ noise จากการเจือจางสารละลายสตีวิโอไซด์ความเข้มข้น 0.0625 mg/ml ปริมาตร 2.5 หรือ 5 µl ด้วยน้ำกลั่น 7.5 หรือ 5 µl ซึ่งคิดเป็นค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.0156 และ 0.0312 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 26)

ตารางที่ 26 ค่า LOD และ LOQ ของสตีวิโอไซด์

LOD			**LOQ**		
ความเข้มข้น (mg/ml)	**ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak**	**ปริมาณสตีวิ-โอไซด์ (µg)**	**ความเข้มข้น (mg/ml)**	**ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak**	**ปริมาณสตีวิ-โอไซด์ (µg)**
0.0156	10.8933	1.72	0.0312	35.1842	3.20

สำหรับรีบาวดิโอไซด์ เอ ได้พบ signal ของสารละลายที่มีความสูงเป็น 3 เท่า และ 10 เท่า ของ noise จากการเจือจางสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ ความเข้มข้น 0.125 mg/ml ปริมาตร 1.6 หรือ 5 µl ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 8.4 หรือ 5 µl ซึ่งคิดเป็นค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.020 และ 0.0625 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 27)

ตารางที่ 27 ค่า LOD และ LOQ ของรีบาวดิโอไซด์ เอ

LOD			**LOQ**		
ความเข้มข้น (mg/ml)	**ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak**	**ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ (µg)**	**ความเข้มข้น (mg/ml)**	**ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak**	**ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ (µg)**
0.020	10.37	6.30	0.0625	52.38	10.54

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบแห้งของหญ้าหวานที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเติบโตที่ให้ผลดีที่สุด

ใบหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมสารควบคุมการเติบโต IAA 1 mg/L ร่วมกับ BA 0.5 mg/L ซึ่งให้จำนวนยอดมากที่สุด เมื่อนำใบมาสกัดเพื่อตรวจสอบสารสตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ พบว่าในใบหญ้าหวานแห้ง 1 กรัม มีปริมาณสารสตีวิโอไซด์ อยู่ 7.48 ± 0.08 µg แต่ไม่พบสารรีบาวดิโอไซด์ เอ และสำหรับใบหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมสารควบคุมการเติบโต IAA 2 mg/L ร่วมกับ BA 0.5 mg/L ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดยอดและน้ำหนักแห้งยอดมากที่สุด พบว่า จะมีปริมาณสารสตีวิโอไซด์ 5.45 ± 0.33 µg ต่อใบหญ้าหวานแห้ง 1 กรัม แต่ไม่พบสารรีบาวดิโอไซด์ เอ เช่นเดียวกัน สำหรับใบหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมสารควบคุมการเติบโต BA 2 mg/L เพียงอย่างเดียว ซึ่งพบว่าสามารถให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด น้ำหนักสดยอดและน้ำหนักแห้งยอดได้มากที่สุด มีสารสตีวิโอไซด์ 3.72 ± 0.34 µg ต่อใบหญ้าหวานแห้ง 1 กรัม แต่ไม่พบสารรีบาวดิโอไซด์ เอ เช่นเดียวกัน ซึ่งต่างกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตที่จะสามารถตรวจพบทั้งสารสตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ โดยพบสารสตีวิโอไซด์ 9.35 ± 0.17 µg/g DW และสารรีบาวดิโอไซด์ เอ 8.01 ± 3.52 µg/g DW ตามลำดับ (ตารางที่ 28)

ตารางที่ 28 ปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมสารควบคุมการเติบโตออกซินและไซโทไคนินที่ให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุดเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต

ชุดการทดลอง	สาร สตีวิโอไซด์ (µg/g DW)*	คิดเป็น %ของ น้ำหนักใบแห้ง	สาร รีบาวดิโอไซด์ เอ (µg/g DW)*	คิดเป็น %ของ น้ำหนักใบแห้ง
ชุดควบคุม	9.35±0.17[a]	0.0009	8.01±3.52[a]	0.0008
IAA 1 mg/L + BA 0.5 mg/L	7.48±0.08[b]	0.0007	0.00±0.00[b]	0
IAA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L	5.45±0.33[c]	0.0005	0.00±0.00[b]	0
BA 2 mg/L	3.72±0.34[d]	0.0004	0.00±0.00[b]	0

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ย เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และสารรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบแห้งของ หญ้าหวานที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับไคโทซาน

ใบหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมไคโทซานชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าใบหญ้าหวานที่เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 20 mg/L P90 ความเข้มข้น 40 mg/L และ O90 ความเข้มข้น 10 mg/L และ 5 mg/L จะมีปริมาณสารสตีวิโอไซด์ มากที่สุดตามลำดับ และมากกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้นยังพบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมไคโทซานชนิด O90 ทุกๆ ความเข้มข้นมีปริมาณสารสตีวิโอไซด์ มากกว่าและมีแนวโน้มมากกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมไคโทซาน สำหรับชุดการทดลองที่มีแนวโน้มของปริมาณสารสตีวิโอไซด์ น้อยกว่าชุดการทดลองควบคุมได้แก่ชุดการทดลองที่เติมไคโทซานชนิด P80 ความเข้มข้น 20 mg/L ชนิด P90 ความเข้มข้น 10 mg/L และชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L โดยชุดการ

ทดลองที่เติมไคโทซานชนิด P80 ความเข้มข้น 20 mg/L นั้นมีปริมาณสารสตีวิโอไซด์น้อยที่สุด (ตารางที่ 29)

ส่วนการตรวจสอบหาสารรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบหญ้าหวาน พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมไคโทซานทุกๆ ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมไคโทซาน อย่างไรก็ดีชุดการทดลองที่มีการเติมไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 20 mg/L และ O90 ความเข้มข้น 20 mg/L มีแนวโน้มในการให้ปริมาณสารรีบาวดิโอไซด์ เอ มากที่สุด (ตารางที่ 29)

ตารางที่ 29 สตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบของหญ้าหวานที่มีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยมีการเติมไคโทซานที่มีชนิดและความเข้มข้นแตกต่างกัน

ชุดการทดลอง	สตีวิโอไซด์ (µg/g DW)*	คิดเป็น %ของน้ำหนักใบแห้ง	รีบาวดิโอไซด์ เอ (µg/g DW)*	คิดเป็น %ของน้ำหนักใบแห้ง
ชุดควบคุม	10.73 ± 0.23^{cd}	0.0011	10.26 ± 0.07^{abcde}	0.0010
P80 5 mg/L	11.44 ± 0.83^{bc}	0.0011	10.16 ± 0.86^{abcde}	0.0010
P80 10 mg/L	10.87 ± 0.50^{cd}	0.0011	9.25 ± 0.12^{cde}	0.0009
P80 20 mg/L	9.35 ± 0.43^{d}	0.0009	10.46 ± 0.27^{abcd}	0.0010
P80 40 mg/L	11.90 ± 0.60^{bc}	0.0012	9.05 ± 0.17^{de}	0.0009
P90 5 mg/L	10.74 ± 0.37^{cd}	0.0011	9.35 ± 0.72^{cde}	0.0009
P90 10 mg/L	10.51 ± 0.02^{cd}	0.0011	9.23 ± 0.49^{cde}	0.0009
P90 20 mg/L	11.44 ± 0.13^{bc}	0.0011	9.44 ± 0.12^{bcde}	0.0009
P90 40 mg/L	13.74 ± 0.67^{a}	0.0014	10.47 ± 0.47^{abcd}	0.0010
O80 5 mg/L	10.40 ± 0.67^{cd}	0.0010	10.12 ± 0.30^{abcd}	0.0010
O80 10 mg/L	11.83 ± 0.22^{bc}	0.0012	9.86 ± 0.40^{abcde}	0.0010
O80 20 mg/L	13.80 ± 0.29^{a}	0.0014	11.01 ± 0.09^{a}	0.0011
O80 40 mg/L	10.80 ± 0.20^{cd}	0.0011	9.01 ± 0.80^{de}	0.0009
O90 5 mg/L	12.54 ± 0.96^{ab}	0.0013	10.81 ± 0.34^{ab}	0.0011
O90 10 mg/L	13.56 ± 0.50^{a}	0.0014	10.57 ± 0.50^{abc}	0.0011
O90 20 mg/L	11.70 ± 0.22^{bc}	0.0012	11.13 ± 0.25^{a}	0.0011
O90 40 mg/L	11.65 ± 0.15^{bc}	0.0012	8.94 ± 0.10^{e}	0.0009

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

3.4 การวิเคราะห์สตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในเรือนต้นไม้

เมื่อตรวจวิเคราะห์ใบหญ้าหวานในเรือนต้นไม้ของ สวนสมุนไพรสิรีรุกขชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมลฑล จังหวัดนครปฐม พบว่าในใบหญ้าหวานแห้งหนัก 1 กรัม มีสารสตีวิโอไซด์ อยู่ 77.67 µg และมีรีบาวดิโอไซด์ เอ อยู่ 55.20 µg **(ตารางที่ 30)**

ตารางที่ 30 สตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ เอ ที่สกัดได้ใบหญ้าหวานในเรือนต้นไม้

ชุดการทดลอง	**สตีวิโอไซด์ (µg/g DW)**	**คิดเป็น %ของน้ำหนักใบแห้ง**	**รีบาวดิโอไซด์ เอ (µg/g DW)**	**คิดเป็น %ของน้ำหนักใบแห้ง**
หญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในเรือนต้นไม้	77.67	0.0078	55.20	0.0055

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. ผลของการใช้ออกซินร่วมกับไซโทไคนินและการใช้ไซโทไคนินเพียงอย่างเดียวต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

1.1 ผลของความเข้มข้นของ IAA ร่วมกับ BA หรือ kinetin อย่างใดอย่างหนึ่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

จากการทดลองในหญ้าหวานซึ่งได้จาก สวนสมุนไพรสิรีรุกขชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมลฑล จังหวัดนครปฐม พบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินร่วมกับไซโทไคนินลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีผลทำให้จำนวนยอดมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น คือการใช้ IAA ร่วมกับ BA ซึ่งจะมีแนวโน้มในการชักนำตาของหญ้าหวานให้เกิดยอดได้ดีกว่าการใช้ IAA ร่วมกับ kinetin ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sivaram และ Mukundan ในปี 2003 ที่ได้ทำการทดลองในหญ้าหวานพบว่าการใช้สารควบคุมการเติบโต IAA ร่วมกับ BA ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงกว่าการใช้สารควบคุมการเติบโต IAA ร่วมกับ kinetin แต่เมื่อเปรียบเทียบถึงความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตที่ใช้พบว่ามีความแตกต่างกันในปริมาณของสารควบคุมการเติบโต BA ซึ่งในการทดลองของ Sivaram และ Mukundan (2003) การใช้สารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/L ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดมากที่สุด แต่ในการทดลองครั้งนี้กลับพบว่าการใช้สารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.75 mg/L ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดมากที่สุด คือ 2.00 ± 0.0 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม การทดลองครั้งนี้ยังแตกต่างจากการทดลองของ Hwang ในปี 2006 ที่พบว่าการใช้สารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด แต่เมื่อทดลองกับหญ้าหวานซึ่งได้จาก อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมลฑล จังหวัดนครปฐม ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าการใช้ IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 mg/L กลับให้จำนวนยอดของหญ้าหวานน้อยกว่าชุดการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การตอบสนองที่

แตกต่างไปนี้อาจเป็นไปได้เนื่องจากต้นพันธุ์หญ้าหวานมาจากต่างแหล่งกัน จึงมีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ทำให้มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเติบโตที่ไม่เหมือนกัน

สำหรับผลของการเจริญเติบโตด้านความยาวยอดพบว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตจะมีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 32.96 ± 4.55 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลการทดลองของ มัทนียา วังประภา (2548) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของหญ้าหวานในหลอดทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตจะมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด อีกทั้งในการทดลองครั้งนี้พบว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตมีจำนวนรากมากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ พัชรินทร์ ศรีทองคำ (2538) ที่รายงานว่ายอดที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตและมีการเกิดรากร่วมด้วยมีผลต่อพัฒนาการทางความสูงให้รวดเร็วด้วย

ส่วนผลของค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดและแคลลัสของหญ้าหวานพบว่า ชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L จะเป็นชุดการทดลองที่มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดและแคลลัสของหญ้าหวานสูงที่สุด โดยเพิ่มขึ้นเป็น 2.0 และ 2.1 เท่า ของชุดการทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตตามลำดับ และพบว่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดและแคลลัสของหญ้าหวานที่มีปริมาณสูงนี้มาจากน้ำหนักของแคลลัสเป็นส่วนใหญ่ โดยชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L พบว่าจะมีแคลลัสที่มีขนาดใหญ่กว่าชุดการทดลองอื่น ๆ จึงทำให้มีปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของยอดและแคลลัสของหญ้าหวานสูง (ภาพที่ 4) เนื่องจากการใช้สารควบคุมการเติบโตมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช โดยจากการศึกษาของ Skoog และ Miller (1957) ได้รายงานว่า การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเนื้อเยื่อ pith ของยาสูบไปเป็นยอด ราก หรือแคลลัสขึ้นอยู่กับสมดุลของปริมาณออกซินและไซโทไคนิน และจากการทดลองนี้มีการเติมสารควบคุมการเติบโตทั้งออกซินคือ IAA และไซโทไคนิน คือ BA หรือ kinetin ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง เมื่อไปเสริมการทำงานของฮอร์โมนภายในที่พืชสามารถสร้างขึ้นเองอยู่แล้ว ปรากฏว่า สัดส่วนของสารควบคุมการเติบโตทั้งสองชนิดที่ใช้อยู่ในช่วงที่กระตุ้นการสร้างแคลลัสเป็นส่วนใหญ่ แต่ส่งเสริมการเกิดและการเจริญของยอดและรากค่อนข้างน้อย

สำหรับการเจริญเติบโตของรากหญ้าหวานพบว่าจะเกิดรากมากที่สุดในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่ายอดหญ้าหวานสามารถสร้างสารควบคุมการเติบโตออกซินเองเพียงพอที่จะกระตุ้นการสร้างรากเองได้ ในทางตรงกันข้ามชุดการทดลองอื่น ๆ ที่เติมสารควบคุมการเติบโตจากภายนอกลงไป อาจมีผลเปลี่ยนแปลงสัดส่วนหรือความสมดุลของฮอร์โมนภายในของพืช ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเกิดราก (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2544) และยังสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าการเติมสารควบคุมการเติบโต IAA ร่วมกับ BA ทุกความเข้มข้น และการเติมสารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ทุกความเข้มข้นจะไม่มีรากเกิดขึ้น แต่สำหรับชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ kinetin เกือบทุกความเข้มข้นสามารถเกิดรากได้ แต่จำนวนรากจะน้อยกว่า โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ kinetin เพิ่มจาก 0.25 mg/L หรือ 0.5 mg/L จำนวนรากของหญ้าหวานจะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ kinetin เพิ่มเป็น 0.75 mg/L และ1 mg/L จำนวนรากของหญ้าหวานจะน้อยลง ทั้งนี้อาจเนื่องจาก kinetin เป็นสารควบคุมการเติบโตในกลุ่มของไซโทไคนิน ซึ่งการใช้สารควบคุมการเติบโตไซโทไคนินความเข้มข้นสูงจะมีผลไปยับยั้งการเกิดรากได้ (Murashige, 1974) จากการทดลองครั้งนี้พบว่าชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.75 mg/L มีจำนวนรากน้อยโดยรากที่ได้จะมีลักษณะสั้น หนา ไม่เจริญเป็นรากปกติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสัดส่วนของสารควบคุมการเติบโตออกซินและไซโทไคนินไม่เหมาะสม ทำให้รากที่งอกมีลักษณะผิดปกติ นอกจากนี้ลักษณะรากที่ผิดปกติยังพบได้เมื่อใช้ออกซินปริมาณสูงเกินไป ดังรายงานของพัชรินทร์ ศรีทองคำ (2538) ที่พบว่าหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงเกิดรากน้อยลงเมื่อปริมาณ NAA ในอาหารเพิ่มจาก 0.01 mg/L เป็น 0.5 และ 1 mg/L โดย NAA ในปริมาณที่สูงจะชักนำให้เกิดรากที่มีลักษณะสั้นและหนา

1.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

จากการทดลองพบว่าการเติมสารควบคุมการเติบโตไซโทไคนิน 2 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันลงในอาหารสูตร MS เพื่อเพิ่มจำนวนยอดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในชุดการทดลองทั้งหมด โดยชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต BA และ kinetin ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำหญ้าหวานให้เกิดยอดได้เช่นเดียวกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต

สำหรับความยาวยอดพบว่าชุดการทดลองที่ให้ความยาวยอดมากสุดได้แก่ ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต เช่นเดียวกันกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ในข้อ 1.1 อีกทั้งยังสอดคล้องกับการทดลองที่มีรายงานก่อนหน้านี้ โดยพัชรินทร์ ศรีทองคำ (2538) และ มัทนียา วังประภา (2548) ที่พบว่าหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตมีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด โดยยอดที่มีการเกิดรากร่วมด้วยจะมีพัฒนาการทางความสูงอย่างรวดเร็ว สำหรับชุดการทดลองควบคุมที่ให้ความยาวยอดสูงสุดนี้มีความยาวยอดเฉลี่ย 24.00 ± 1.63 มิลลิเมตร ซึ่งความยาวยอดที่ได้นี้จะมีความยาวยอดที่น้อยกว่าความยาวยอดของชุดการทดลองควบคุมของผลการทดลองก่อนหน้านี้ อาจเนื่องจากหญ้าหวานที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ถูก subculture และเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลายาวนาน

ส่วนค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดและแคลลัสของหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยง พบว่าชุดการทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดและแคลลัสของหญ้าหวานสูงสุดคือชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 2 mg/L ซึ่งต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทำให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดและแคลลัสของหญ้าหวาน เพิ่มเป็น 2.8 และ 2.7 เท่า ของชุดการทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตตามลำดับ โดยพบว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมานี้มาจากน้ำหนักของยอดและแคลลัส โดยเฉพาะยอดหญ้าหวานจะมีขนาดใบที่ใหญ่กว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ทำให้มีปริมาณค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวานสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ด้วย (ภาพที่ 5) แตกต่างจากการทดลองก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการทดลองใช้สารควบคุมการเติบโต IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L ที่ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวานมากที่สุด โดยน้ำหนักที่มากขึ้นมาจากน้ำหนักของแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ นอกจากนี้ทุกชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโต BA ทุกความเข้มข้นยังมีแนวโน้มของค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดหญ้าหวานมากกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต สอดคล้องกับการทดลองของ Hassanein และ Soltan (2000) ที่พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงยอดของมะแว้งนก (*Solanum nigrum*) บนอาหารสูตร B5 ที่เติมสารควบคุมการเติบโต BA จะสามารถเพิ่มจำนวนน้ำหนักสดของยอดมะแว้งนกมากกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงยอดของมะแว้งนก บนอาหารสูตร B5 ที่เติมสารควบคุมการเติบโต kinetin ความเข้มข้นต่าง ๆ และบนอาหารสูตร B5 ที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต

2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวาน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อเดี่ยวของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่เติมไคโทซานต่างชนิดกันที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของตาข้างที่ข้อของหญ้าหวานแตกต่างกัน โดยการใช้ไคโทซานชนิด P80 ความเข้มข้น 10 mg/L และ P90 ความเข้มข้น 5 mg/L มีแนวโน้มทำให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดของหญ้าหวานเพิ่มขึ้นจาก 1.81 ± 0.06 ยอดต่อข้อในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นเป็น 2.00 ± 0.00 ยอดต่อข้อ ซึ่งแตกต่างจากในกล้วยไม้ที่มีรายงานว่าการใช้ไคโทซานชนิด P70 ความเข้มข้น 10 mg/L สามารถเพิ่มจำนวน protocorm-like body และการใช้ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 20 mg/L สามารถเพิ่มจำนวนทั้งยอด ยอดที่มีราก และ protocorm-like body ของกล้วยไม้ Dendrobium ‘เอียสกุล’ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pornpianpakdee *et al*, 2010) ซึ่งความแตกต่างอาจเนื่องมาจากชนิดของพืชที่ต่างกันมีการตอบสนองต่อชนิดและความเข้มเข้นของไคโทซานที่แตกต่างกัน

สำหรับความยาวยอดเฉลี่ยพบว่าการใช้ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L จะมีค่าเฉลี่ยความยาวยอดมากที่สุดคือ 11.13 ± 1.76 มิลลิเมตร และมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Barka และคณะ (2004) ที่รายงานว่าการใช้ไคโทซานในรูปของไคโทเจล (chitogel) ที่ความเข้มข้น 1.75% (v/v) ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพาะเลี้ยงตายอดขององุ่น (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay clone 7535) พบว่า สามารถชักนำให้ยอดองุ่นที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีความยาวมากที่สุด และต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลของไคโทซานในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีผู้รายงานไว้ไม่เฉพาะในหลอดทดลองเท่านั้นแต่ในพืชที่ปลูกในธรรมชาติเช่นในการศึกษาของ Ohta และคณะ (1999) พบว่าไคโทซานมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้น *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. โดยแช่เมล็ดของพืชชนิดนี้ในไคโทซานที่ความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนปลูก และใช้ไคโทซานผสมในวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1% (w/v) พบว่าการผสมไคโทซานมีผลทำให้ความยาวของลำต้นถึงปลายยอดสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการวัดค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดยอดและน้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวานพบว่า การใช้ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L จะมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดยอดและน้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวานมากที่สุด ซึ่งต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดเพิ่มเป็น 2.3 และ 2.2 เท่า ของชุดการทดลองที่ไม่เติมไคโทซานตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดยอดและน้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวานที่มีปริมาณสูงนี้ มาจากน้ำหนักของใบที่มีขนาดใบที่ใหญ่กว่าชุดการทดลองอื่นๆ ทำให้มีปริมาณค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวาน

สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ด้วย (ภาพที่ 6) สอดคล้องกับการทดลองของสุวลี จันทร์กระจ่าง และคณะ (2546) ที่ได้รายงานว่าในการปลูกพืชผักสวนครัวแบบผสมผสาน เมื่อทำการฉีดพ่นไคโทซานที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่ามีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดต่อต้นสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้รับไคโทซาน และยังสอดคล้องกับการทดลองของ Barka และคณะ (2004) ที่กล่าวไปก่อนหน้านี้ ได้รายงานว่าการใช้ไคโทซานผสมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพาะเลี้ยงตายอดขององุ่นจะทำให้ยอดองุ่นมีน้ำหนักแห้ง สูงกว่าองุ่นในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไคโทซาน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Ohta และคณะ (1999) ที่พบว่าการผสมไคโทซานในวัสดุปลูกมีผลทำให้ขนาดของใบ และน้ำหนักแห้งของต้นสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับการเจริญเติบโตของรากพบว่า การใช้ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L เช่นเดียวกันมีแนวโน้มทำให้หญ้าหวานมีจำนวนรากมากที่สุดคือ 0.63 ± 0.17 รากต่อต้น ซึ่งส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากหญ้าหวานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย โดยจะมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากหญ้าหวานเป็น 19.7 และ 2.8 เท่า ของชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซาน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Barka และคณะ (2004) ที่รายงานว่าการใช้ไคโทซานในรูปของไคโทเจล (chitogel) ที่ความเข้มข้น 1.75% (v/v) ผสมในอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงตายอดขององุ่นจะสามารถส่งเสริมให้รากองุ่นเจริญเติบโตดีขึ้น และเมื่อชั่งน้ำหนักแห้งของรากก็พบว่ามีน้ำหนักแห้งรากมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Ohta และคณะ (1999) ซึ่งพบว่าการผสมไคโทซานในวัสดุปลูกของต้น *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของรากมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ผลการศึกษา method validation ของการวิเคราะห์สตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ

จากการศึกษาพบว่า สตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ มีค่า retention time เท่ากับ 6.7 และ 13.52 นาที ตามลำดับ ด้วยวิธีวิเคราะห์นี้ได้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตราฐานสตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ เท่ากับ 0.9997 และ 0.9993 ตามลำดับ

เมื่อตรวจสอบความใกล้เคียงของค่าที่วัดได้ โดยใช้มาตราฐานของ AOAC (The association of analytical communities guidelines for single-laboratory validation of chemical method for dietary supplements and botanicals) (AOAC Peer Verified Methods Program, 1993) ซึ่งได้กำหนดค่า % RSD ที่ยอมรับได้ สำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 100 mg/L ค่า % RSD ที่ยอมรับได้ต้องไม่

เกิน 5.3 % ซึ่งพบว่าค่า % RSD ที่ได้จากการทำการทดลองมีค่าอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่า 5.3 % ซึ่งเป็นไปตามมาตราฐานที่กำหนดไว้

ด้วยวิธีวิเคราะห์นี้ ปริมาณสตีวิโอไซด์ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ และสามารถวัดปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือเท่ากับ 1.72 และ 3.20 µg/g DW ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารรีบาวดิโอไซด์ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ และสามารถวัดปริมาณได้เท่ากับ 6.3 และ 10.54 µg/g DW ตามลำดับ

4. ผลการวิเคราะห์สารสตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบหญ้าหวาน

4.1 ผลการตรวจสอบสารสตีวิโอไซด์และ รีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบหญ้าหวานที่เลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมสารควบคุมการเติบโต

จากการตรวจสอบสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบของหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมสารควบคุมการเติบโตที่ให้ผลดีที่สุดกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต พบว่า ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตมีสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ มากที่สุด คือ 9.35 ± 0.17 µg/g DW และ 8.01 ± 3.52 µg/g DW ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการทดลองในครั้งนี้สามารถตรวจพบสารสตีวิโอไซด์ในทุกชุดการทดลอง ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Swanson (1992) ที่ไม่พบการสะสมของสารสตีวิโอไซด์ในแคลลัส และยอดหญ้าหวานที่ทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง แต่จะพบสารสตีวิโอไซด์ได้ในยอดที่ชักนำให้เกิดรากแล้วเท่านั้น แต่ในการทดลองครั้งนี้พบสารสตีวิโอไซด์ได้ทั้งในชุดการทดลองที่เกิดรากและไม่เกิดราก โดยชุดการทดลองที่เกิดรากได้แก่ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตเพียงชุดการทดลองเดียว สำหรับชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโตจะไม่มีรากเกิดขึ้น แต่ก็สามารถตรวจพบสารสตีวิโอไซด์ได้

สำหรับสารรีบาวดิโอไซด์ เอ พบว่าชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโตทุกชุดการทดลองตรวจไม่พบสารรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบของหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง แต่ตรวจพบเฉพาะในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณสารรีบาวดิโอไซด์ เอ ในธรรมชาติมีปริมาณน้อยมาก เมื่อนำมาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองปริมาณสารที่สร้างขึ้นก็ยิ่งมีปริมาณน้อยกว่าในธรรมชาติลงไปอีก ทำให้วิธีวิเคราะห์นี้ไม่สามารถใช้ตรวจสอบได้ โดยเฉพาะหากปริมาณสารรีบาวดิโอไซด์น้อยกว่า 6.30 µg หรือ 0.02 mg/ml และจากการทดลองจะเห็นได้ว่า ชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโตทุกชุดการทดลองมีปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และรี

บาวดิโอไซด์ น้อยกว่าชุดการทดลองควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารควบคุมการเติบโตที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะไปช่วยเร่งการเจริญเติบโตให้ต้นหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นสารอาหารต่าง ๆในพืชจึงถูกนำมาใช้ในเพิ่มการเจริญเติบโตเป็นส่วนใหญ่ และทำให้มีการสร้างและสะสมของสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่ลดน้อยลง

4.2. การตรวจสอบหาสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบหญ้าหวานที่เลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมไคโทซาน

จากการตรวจสอบสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบของหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีการเติมไคโทซาน พบว่าชุดการทดลองที่มีสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ มากที่สุด ได้แก่ ชุดการทดลองที่เติมไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 20 mg/L ซึ่งต่างจากชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมไคโทซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีสารสตีวิโอไซด์เท่ากับ 13.80 ± 0.29 μg/g DW ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองควบคุมเป็น 1.3 เท่า นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มที่มีสารรีบาวดิโอไซด์ เอ มากกว่าชุดการทดลองควบคุมอีกด้วย โดยมีสารรีบาวดิโอไซด์ เอ เท่ากับ 11.01 ± 0.09 μg/g DW สอดคล้องกับการทดลอง Chong และคณะ (2005) ที่ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Morinda elliptica* ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร G medium ร่วมกับไคโทซานที่ความเข้มข้น 0.25 g/L จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสาร anthraquinone ในปริมาณที่สูงขึ้น และยังสอดคล้องกับการรายงานของ Komaraiah และคณะ (2003) ที่ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชโดยการตรึงเซลล์ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago rosea*) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ของเจตมูลเพลิงแดงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 10 mM ร่วมกับไคโทซานที่ได้จากเปลือกปูที่ความเข้มข้น 200 mg/L จะสามารถผลิตสาร plumbagin ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่ม naphthoquinone เพิ่มขึ้นถึง 8 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับไคโทซาน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Sauerwein และคณะ (1991) ที่ได้ศึกษา *Lippia dulcis* ซึ่งเป็นพืชที่สามารถผลิตสาร hurnandulcin โดยเป็นสารให้ความหวานในกลุ่ม sesquiterpene และพบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 2% ร่วมกับไคโทซานที่ระดับความเข้มข้นต่ำคือ 0.2-10 mg/L จะทำให้มีการสร้างสาร hurnandulcin เพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า

ดังนั้น หากต้องการให้ยอดหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีปริมาณของสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ต่อน้ำหนักแห้งเพิ่มมากขึ้น ควรเลือกใช้ไคโทซานชนิด O80 ที่ความเข้มข้น

20 mg/L เพราะเป็นชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ต่อน้ำหนักแห้งได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไคโทซานชนิดอื่นๆ และการไม่ได้ใช้ไคโทซาน

4.3 การตรวจสอบปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และ รีบาวดิโอไซด์ ในใบของหญ้าหวานที่ปลูกเลี้ยงในเรือนต้นไม้

เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณสตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ ในใบของหญ้าหวานที่ปลูกเลี้ยงในเรือนต้นไม้ พบว่า มีปริมาณสตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ในปริมาณที่สูงถึง 77.67 และ 55.2 µg/g DW ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต 8.3 และ 6.9 เท่า ตามลำดับ และยังมากกว่าหญ้าหวานซึ่งเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่เติมสารควบคุมการเติบโตหรือไคโทซาน สอดคล้องกับการทดลองของ พัชรินทร์ ศรีทองคำ (2538) ที่พบว่าต้นหญ้าหวานซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปริมาณสตีวิโอไซด์ที่ต่ำกว่าต้นหญ้าหวานที่ปลูกในธรรมชาติ 1.2 เท่า จากการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ว่าระยะเวลาในการเลี้ยงในหลอดทดลองน้อยกว่าในธรรมชาติ และแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มแสงที่น้อยกว่าแสงแดดในธรรมชาติ

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. ผลของการใช้ออกซินร่วมกับไซโทไคนินและการใช้ไซโทไคนินเพียงอย่างเดียวต่อการเจริญเติบโต และสารสตีวิโอไซด์รวมทั้งรีบาวดิโอไซด์ เอ ในหญ้าหวาน

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารกึ่งแข็งทั้งที่เติมสารควบคุมการเติบโตและไม่เติมสารควบคุมการเติบโตสามารถชักนำให้หญ้าหวานเกิดยอดได้มากที่สุดคือ 2 ยอดต่อข้อ โดยเฉพาะชุดการทดลองที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 2 ยอดต่อข้อแล้ว ยังให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งยอดของหญ้าหวานมากที่สุด คือมากเป็น 2.8 และ2.7 เท่าของชุดควบคุม ดังนั้นชุดการทดลองที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวานในหลอดทดลอง คือการใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/L อย่างไรก็ดีการใช้สารควบคุมการเติบโตแม้จะมีผลกระตุ้นการเติบโตแต่กลับพบการสะสมของสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ค่อนข้างต่ำ ส่วนชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตจะมีการเจริญเติบโตด้านความสูงและจำนวนรากมากที่สุด จึงเหมาะสมต่อการนำไปใช้ขยายพันธุ์หญ้าหวานสำหรับการเพาะปลูกต่อไป และยังตรวจพบการสะสมของสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ มากกว่าชุดการทดลองที่ใช้สารควบคุมการเติบโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย

2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานต่อการเจริญเติบโต และสารสตีวิโอไซด์รวมทั้งรีบาวดิโอไซด์ เอ ของหญ้าหวาน

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าชุดการทดลองที่เติมไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 5 mg/L สามารถเพิ่มความยาวยอด ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดยอด ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งยอด จำนวนราก ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดรากและค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งราก มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมไคโทซานและชุดการทดลองที่เติมไคโทซานอื่นๆ ส่วนการเพิ่มจำนวนยอดพบว่าการใช้ไคโทซานชนิด P80 ความเข้มข้น 10 mg/L และ P90 ความเข้มข้น 5 mg/L มีแนวโน้มสามารถชักนำให้หญ้าหวานเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และจากการตรวจสอบสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ในใบของหญ้าหวานที่เลี้ยงในหลอดทดลองพบว่า ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 20 mg/L ยังสามารถเพิ่มสารสตีวิโอไซด์และรีบาวดิโอไซด์ เอ ที่วิเคราะห์ในใบของหญ้าหวานมากที่สุด แต่ปริมาณที่พบเมื่อเทียบกับในการเพาะเลี้ยงในเรือนต้นไม้แล้วพบว่ามีปริมาณค่อนข้างน้อยกว่ามาก

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาทดลองโดยเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งอาจทำให้เห็นความแตกต่างของการเจริญเติบโต ปริมาณของสารสตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ เอ ระหว่างชุดการทดลองต่างๆ ได้มากขึ้น โดยมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ให้กับต้นหญ้าหวานด้วย
2. ด้วยข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวนมาก การทดลองนี้จึงวางแผนแยกชุดการทดลองเปรียบเทียบผลของสารควบคุมการเติบโตเป็นคนละชุดกับการทดลองใช้ไคโทซาน เมื่อได้ผลการทดลองชั้นต้นแล้วว่าชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตในชุดการทดลองใดดี ที่สุดเช่นเดียวกับผลของชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่ดีที่สุด แล้วจึงควรนำชุดการทดลองเหล่านั้นมาทดลองใหม่พร้อมกันเพื่อเปรียบเทียบกันโดยตรงและมีชุดการทดลองควบคุมร่วมกันจะช่วยให้ทราบชัดเจนขึ้นว่าชุดการทดลองใดให้ผลดีที่สุด ในขณะเดียวกันอาจเพิ่มการทดลองเพื่อศึกษาผลร่วมกันของสารควบคุมการเติบโตและไคโทซานว่าจะมีส่วนเสริมกันหรือไม่ โดยการนำชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดมาใช้ร่วมกับชนิดและความเข้มข้นของไคโทซานที่ดีที่สุดทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานเพื่อศึกษาดูว่าจะส่งเสริมการเจริญเติบโตและการผลิตสารสำคัญในหญ้าหวานหรือไม่ อย่างไร
3. ควรมีการศึกษาทดลองใช้ ไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 20 mg/L ในแปลงทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ปริมาณสารสตีวิโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ เอ ว่ามีผลสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองหรือไม่ อย่างไร ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการใช้สารดังกล่าวเพิ่มผลผลิตสารทุติยภูมิทั้ง 2 ชนิดในการปลูกหญ้าหวานในแปลงด้วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กองการแพทย์ทางเลือก. 2552. หญ้าหวานทางเลือกของคนอ้วน แหล่งที่มา :http://www.dtam.moph.go.th/alternative/viewstory.php?id=239 [30 เมษายน 2552]

เครือวัลย์ สมณะ. 2545. ใน สรุปรายงานการประชุมเพื่อพัฒนาสมุนไพรหญ้าหวาน. หน้า 1-53. 2 มกราคม 2545 ณ ห้องประชุม อาคารสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี.

คำนูน กาญจนภูมิ. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทัศนัย วาหะ. 2545. นักวิทยาศาสตร์ระดับ 5 กองการวิจัย กรมวิทยาศาสตร์บริการ. ไคตินและไคโทซาน [บทวิทยุออกอากาศทางสถานีกระจายเสียงแห่งประเทศไทย].

เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอภาศ. 2531. สตีเวียไซด์สารที่มีรสหวานใช้แทนน้ำตาลทราย. วารสารวิทยาศาสตร์สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย. 42: 149-152.

ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์, สุรวัฒน์ จิรยาวัฒน์, วิทยา ธรรมวิทย์, ประดิษฐ์ เชยจิตร, ด้วง พุธศุกร์, วรรณี โรจนโพธิ์, จิตติมา พิมพ์บัว และ ฐิติมา พาณิชยกุล. 2538. การทดสอบความเป็นพิษของสตีวิโอไซด์. โครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากหญ้าหวาน. หน้า 1-13. ภาควิชาสรีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นันทนา อังกินันทน์. 2549. ฮอร์โมนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และ สุวลี จันทร์กระจ่าง. 2542. การพัฒนาแผ่นเยื่อบางไคโทซานเพื่อการกรองแยกชีวสาร. ใน การสัมมนาวิชาการเรื่องความร่วมมือของภาครัฐบาลและเอกชนในการพัฒนาการผลิตและการใช้สารไคติน-ไคโทซานแบบครบวงจร. หน้า 34-36. 2-3 เมษายน 2542 ณ โรงแรมไอเฟิล จังหวัดระนอง.

พิมลพรรณ เฉลิมวุฒิกุล. 2547. การเพาะเลี้ยงตาข้างของหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) ในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พัชรินทร์ ศรีทองคำ. 2538. การขยายพันธุ์หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไมตรี สุทธจิตต์. 2533. การวิจัยหญ้าหวานที่ผ่านมา. การวิจัยหญ้าหวาน. หน้า 10-15. โรงพิมพ์ดาว เชียงใหม่.

ไมตรี สุทธจิตต์, อัมพวัน อภิสริยะกุล และ รวิวรรณ พัวธนาโชคชัย. 2540. การรวบรวม การทบทวน การวิเคราะห์ข้อมูล วิจัยและสังเคราะห์แนวความคิดที่เกี่ยวกับเรื่องความปลอดภัยของหญ้าหวานและผลิตภัณฑ์จากหญ้าหวาน. รายงานการประมวลความรู้เพื่อเสนอต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. หน้า 1-52 มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น.

มัทนียา วังประภา. 2548. การผลิตสารสตีวิโอไซด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานในเครื่องปฏิกรชีวภาพ. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ราณี บุรีรักษ์. 2529. การค้นคว้าแบบอิสระเชิงวิทยาเรื่องของสารสกัดหญ้าหวาน (*stevia rebaudiana* Bertoni) ต่อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รัฐ พิชญางกูร. 2548. เทคนิคการเตรียมไคโทซานอย่างง่ายเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เอกสารประกอบการสัมมนาการใช้ไคโทซานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. หน้า 2. 7 กรกฎาคม 2548 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวลี จันทร์กระจ่าง. 2542. นักวิทยาศาสตร์หญิงไทย ผศ.สุวลี จันทร์กระจ่าง กับ “ไคโทซาน” สารสารพัดประโยชน์. สกุลไทย. หน้า 74, 75, 96 (อัดสำเนา)

สุวลี จันทร์กระจ่าง, เพ็ญใจ สมพงษ์ชัยกุล และสมชาย ต่วนต่าย. 2546. ผลของการใช้ไคโทซานในการปลูก พืชผักสวนครัวแบบผสมผสาน.ใน การประชุมไคติน-ไคโตซานแห่งประเทศไทย. หน้า 158-160. 17-18 กรกฎาคม 2546 ณ อาคารสถาบัน 3 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร.

สุวลี จันทร์กระจ่าง. 2548. ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้ไคโทซานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้วยไม้. เอกสารประกอบการสัมมนาการใช้ไคโทซานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. หน้า 1-6. 7 กรกฎาคม 2548 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภจิตรา ชัชวาลย์. 2548. ผลของไคโทซานที่มีต่อพืช. เอกสารประกอบการสัมมนาการใช้ไคโทซานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. หน้า 1-9. 7 กรกฎาคม 2548 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อดุลย์ ศรีเทพ. 2533. ประสบการณ์ในการปลูกหญ้าหวาน. การวิจัยหญ้าหวาน. หน้า 17-22. โรงพิมพ์ดาวเชียงใหม่

อัมพวัน อภิสริยะกุล. 2533. สตีวีโอไซด์. การวิจัยหญ้าหวาน. หน้า 68-71. โรงพิมพ์ดาวเชียงใหม่

ภาษาอังกฤษ

Agrawal, G. H., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A., and Saji, H. 2002. Chitosan activatesdefense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. Plant Physiology and Biochemistry. 40: 1061-1069.

AOAC Peer Verified methods Program, 1993. Manual on Policies and Procedures, Arlington.

Barka, E.A., Eullaffroy, P., Clement, C., and Vernet, G. 2004. Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. Plant Cell Reports. 22 : 608-614.

Brodelius, P., Funk, C., Haner, A., and Villegas, M. 1989. A procedure for the determination of optimal chitosan concentrations for elicitation of cultured plant cells. Phytochemistry. 28: 2651-2654.

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

Conrath, U., Domard, A., and Kauss, H. 1989. Chitosan-elicited synthesis of callose and coumarin derivertives in parsley cell suspension culture. Plant Cell Reports. 8: 152-155.

Geuns, M. C. 2003. Molecules of Interest : Stevioside. Phytochemistry. 64 : 913-921.

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.

Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D., and Scrimgeour, K.G. 1993. Principles of Biochemistry. USA.

Hwang, S. J. 2006. Rapid *in vitro* propagation and enhanced stevioside accumulation in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Plant Biology. 49: 267-270.

Kolb, N., Herrera, J. L., Ferreyra, D. J., and Uliana, R. F. 2001. Analysis of sweet diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC method. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 4538-4541.

Komaraiah, P., Ramakrishna, S.V., Reddanna, P., and Kavi Kishor, P.B. 2003. Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and *in situ* adsorption. Journal of Biotechnology. 101: 181-187.

Limpanavech, P., Chaiyasuta, S., Vongpromek, R., Pichyangkura, R., Khunwasi, C., Chadchawan, S.,Lotrakul, P., Bunjongrat, R., Chaidee, A., and Bangyeekhun, T. 2008. Chitosan effects on floral production, genes expression and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. Scientia Horticulturae. 166: 65-72.

Majeti, N. V., and Kumar, R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers. 46: 1-27.

Makapugay, H. C., Nanayakkara, N. P. D., Kinghorn, A. D. 1984. Improved high-performance liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. Journal of Chromatography. 283: 390-395.

Mason, M. E., and Davis, J. M. 1997. Defense response in Slash Pine: Chitosan treatment alters the abundance of specific mRNAs. Molecular Plant-Microp Interactions. 10: 135-137.

Molloy, C., Cheah, L. H., and Koolaard, J. P. 2004. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan. Postharvest Biology and Technology. 33: 61-65.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiology. 15: 473-479.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology. 25: 135-166.

Muzzarelli, R.A.A. 1976. Chitin. New York: Pergamon.

Nitsch, J. P., and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science. 163: 85-87.

Ohta, K., Taniguchi, A., Konishi, N., and Hosoki, T. 1999. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. Hostscience. 34: 233-234.

Phillips, M. A., Walter, M. H., Ralph. S. G., Dabrowska, P., Luck, K., Uros, E. M., Boland, W., Strack, D., Rodriguez-Concepcion, M., Bohlmann, J., and Gershenzon, J. 2007. Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*). Plant Molecular Biology. 65: 243-257.

Pornpianpakdee, P., Singhasurasak, R., Chaiyasap, P., Pichyangkura, R., Bunjongrat, R., Chadchawan, S., and Limpanavech, P. 2010. Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchid with chitosan. Scientia Horticulturae. 124: 490-499.

Sathiyabama, M., and Balasubramanian, R. 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. Crop Protection. 17: 307-313.

Sauerwein, M., Yamazak, T., and Shimonura, K. 1991. Hernandulcin in hairy cultures of *Lippia dulcis*. Plant Cell Reports. 9: 579-581.

Sivaram, L., and Mukundan, U. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana.* In vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 39: 520-523.

Skoog, F., and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology. 11: 118-131.

Smith, C.J. 1996. Tansley Review No.86 Accumulation of phytoalexin: defence mechanism and stimulus response system. New Phytologist. 132: 1-45.

Swanson, S. M., Mahady, G. B. and Beecher, C. C. W. 1992. Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot culture *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 28: 151-157.

Tamura, F., Nakamura, S., Fukui, H., and Tabata, M. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip. Plant Cell Reports. 3: 183-185.

Totte, N., Charon, L., Rohmer, M., Compernolle, F., Baboeuf, l., and Geuns, M. C. 2000. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. Tetrahedron Letters. 41: 6407-6410.

Vacin, E., and Went, F. 1969. Some pH changes in nutrient solution. Botanic Gardens Conservation News. 110: 605-613.

Vasconsuelo, A. A., Giuletti, A. M., Picotto, G., Rodriguez-Talou, J., and Boland, R. 2004. Involvement of the PLC/PKC pathway in Chitosan-induced antharquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell culture. Plant Science. 165: 429-436.

Wanichpongpan, P., Suriyachan, K., and Chandrkrachang, S. 2000. Effects of chitosan on the growth of gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*). The 8th International Chitin and Chitosan Conference and 4th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium. 198-201.

Uddin, A. F. M. J., Hashimoto, F., Shimizu, K., and Sakata, Y. 2004. Monosaccharides and chitosan sensing in bud growth and petal pigmentation in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. Scientia Horticulture. 100: 127-138.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร Muraskige and Skoog (1962) ที่ใช้ในการทดลองมีส่วนประกอบดังนี้

สารประกอบ	หน่วย (mg/L)
ธาตุอาหารหลัก	
$CaCl_2.2H_2O$	440
KNO_3	1,900
KH_2PO_4	170
$MgSO_4.7H_2O$	370
NH_4NO_3	1,650
ธาตุอาหารรอง	
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4.7H_2O$	27.9
Na_2EDTA	37.2
กรดอะมิโนและวิตามิน	
Glycine	2
Myo-inosital	100
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Nicotinic acid	0.5
อื่น ๆ	
น้ำตาลซูโครส	30 (g/L)
วุ้น	8 (g/L)
pH	5.6

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข.1 แสดงค่ามาตรฐานของ AOAC (The association of analytical communities guidelines for single-laboratory validation of chemical method for dietary supplements and botanicals) (AOAC Peer Verified Methods Program, 1993)

ความเข้มข้นของสารสำคัญ	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัด (mg/ml)	%RSD ที่ยอมรับได้
100%	1000 mg/ml	1.3
10%	100 mg/ml	2.8
1 %	10 mg/ml	2.7
0.1%	1 mg/ml	3.7
100 ppm	0.1 mg/ml	5.3
10 ppm	0.01 mg/ml	7.3
1 ppm	0.001 mg/ml	11
100 ppb	$1x10^{-4}$ mg/ml (0.0001 mg/ml)	15
10 ppb	$1x10^{-5}$ mg/ml (0.00001 mg/ml)	21
1 ppb	$1x10^{-6}$ mg/ml (0.000001 mg/ml)	30

ตารางภาคผนวกที่ ข.2 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายสตีวิโอไซด์ 10 µl

ความเข้มข้นของสารละลายสตีวิโอไซด์ (mg/ml)	**ปริมาณสตีวิโอไซด์ (µg)**	**ครั้งที่ฉีด**	**พื้นที่ใต้ peak**
2	20	1	2736.60
		2	2732.95
		3	2736.81
		Average	2735.45
		SD	2.17
		%RSD	0.08
1	10	1	1382.12
		2	1380.55
		3	1376.75
		Average	1379.81
		SD	2.76
		%RSD	0.20
0.5	5	1	647.19
		2	644.78
		3	641.25
		Average	644.41
		SD	2.99
		%RSD	0.46
2.5	2.5	1	346.17
		2	345.03
		3	341.87
		Average	344.36
		SD	2.23
		%RSD	0.65

ความเข้มข้นของสารละลายสตีวิโอไซด์ (mg/ml)	ปริมาณสตีวิโอไซด์ (µg)	ครั้งที่ฉีด	พื้นที่ใต้ peak
0.125	1.25	1	167.54
		2	164.19
		3	161.74
		Average	164.49
		SD	2.91
		%RSD	1.77
0.0625	0.625	1	72.14
		2	71.47
		3	70.20
		Average	71.27
		SD	0.99
		%RSD	1.38
0.03125	0.3125	1	29.84
		2	30.22
		3	29.75
		Average	29.94
		SD	0.25
		%RSD	0.833

ตารางภาคผนวกที่ ข.3 แสดงค่า intraday precision ของสารละลายสตีวิโอไซด์ 10 µl ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้นของสารละลายสตีวิโอไซด์ (mg/ml)	**ปริมาณสตีวิโอไซด์ (µg)**	**ครั้งที่ฉีด**	**พื้นที่ใต้ peak**
2	20	1	3150.81
		2	3163.54
		3	3161.34
		4	3181.23
		5	3173.46
		6	3169.22
		Average	3166.60
		SD	10.53
		%RSD	0.33
0.25	2.5	1	330.14
		2	331.15
		3	330.65
		4	329.61
		5	328.99
		6	320.25
		Average	328.47
		SD	4.10
		%RSD	1.25

ความเข้มข้นของสารละลายสตีวิโอไซด์ (mg/ml)	ปริมาณสตีวิโอไซด์ (µg)	ครั้งที่ฉีด	พื้นที่ใต้ peak
0.0312	0.3125	1	28.28
		2	29.28
		3	28.87
		4	28.98
		5	28.41
		6	28.86
		Average	28.78
		SD	0.37
		%RSD	1.29

ตารางภาคผนวกที่ ข.4 แสดงค่า interday precision ของสารละลายสตีวิโอไซด์ 10 µl ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้นของสารละลายสตีวิโอไซด์ (mg/ml)	**ปริมาณสตีวิโอไซด์ (µg)**	**ครั้งที่ฉีด**	**พื้นที่ใต้ peak**
2	20	1	3134.10
		2	3131.85
		3	3134.95
		4	3133.92
		5	3134.35
		6	3129.06
		Average	3133.04
		SD	2.21
		%RSD	0.07
0.25	2.5	1	318.46
		2	316.12
		3	317.63
		4	316.17
		5	317.01
		6	316.44
		Average	316.97
		SD	0.93
		%RSD	0.29

ความเข้มข้นของสารละลายสตีวิโอไซด์ (mg/ml)	ปริมาณสตีวิโอไซด์ (µg)	ครั้งที่ฉีด	พื้นที่ใต้ peak
0.0312	0.3125	1	26.45
		2	26.84
		3	26.59
		4	26.49
		5	26.61
		6	25.97
		Average	26.49
		SD	0.29
		%RSD	1.09

ตารางภาคผนวกที่ ข.5 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ 10 µl

ความเข้มข้นของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ (mg/ml)	**ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ (µg)**	**ครั้งที่ฉีด**	**พื้นที่ใต้ peak**
2	20	1	1968.40
		2	1969.27
		3	1969.23
		Average	1968.97
		SD	0.49
		%RSD	0.02
1	10	1	960.78
		2	948.93
		3	952.79
		Average	954.17
		SD	6.05
		%RSD	0.63
0.5	5	1	440.45
		2	440.44
		3	444.04
		Average	441.64
		SD	2.07
		%RSD	0.47

ความเข้มข้นของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ (mg/ml)	ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ (µg)	ครั้งที่ฉีด	พื้นที่ใต้ peak
0.25	2.5	1	193.41
		2	192.65
		3	191.74
		Average	192.60
		SD	0.84
		%RSD	0.44
0.125	1.25	1	72.73
		2	72.76
		3	72.75
		Average	72.75
		SD	0.02
		%RSD	0.02
0.040	0.40	1	33.21
		2	34.29
		3	34.17
		Average	33.89
		SD	0.59
		%RSD	1.74

ตารางภาคผนวกที่ ข.6 แสดงค่า intraday precision ของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ 10 µl ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้นของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ (mg/ml)	**ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ (µg)**	**ครั้งที่ฉีด**	**พื้นที่ใต้ peak**
2	20	1	1968.40
		2	1969.27
		3	1969.23
		4	1975.19
		5	1970.03
		6	1969.40
		Average	1970.25
		SD	2.47
		%RSD	0.13
0.5	5	1	440.45
		2	440.44
		3	444.04
		4	437.47
		5	430.10
		6	434.86
		Average	437.89
		SD	4.92
		%RSD	1.12

ความเข้มข้นของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ (mg/ml)	**ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ (µg)**	**ครั้งที่ฉีด**	**พื้นที่ใต้ peak**
0.125	1.25	1	79.58
		2	72.73
		3	72.76
		4	69.32
		5	72.75
		6	75.12
		Average	73.71
		SD	3.42
		%RSD	4.64

ตารางภาคผนวกที่ ข.7 แสดงค่า interday precision ของสารละลายสตีวิโอไซด์ 10 µl ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้นของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ (mg/ml)	**ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ (µg)**	**ครั้งที่ฉีด**	**พื้นที่ใต้ peak**
2	20	1	2062.96
		2	2047.25
		3	2054.68
		4	2058.25
		5	2050.95
		6	2045.98
		Average	2053.35
		SD	6.56
		%RSD	0.32
0.5	5	1	441.60
		2	442.65
		3	446.76
		4	440.36
		5	441.15
		6	440.36
		Average	442.15
		SD	2.42
		%RSD	0.55

ความเข้มข้นของสารละลายรีบาวดิโอไซด์ เอ (mg/ml)	ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ (µg)	ครั้งที่ฉีด	พื้นที่ใต้ peak
0.125	1.25	1	74.56
		2	73.72
		3	74.64
		4	73.54
		5	75.04
		6	70.30
		Average	73.63
		SD	1.73
		%RSD	2.35

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวราตรี สันติวงค์ เกิดเมื่อวันที่ 20 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2526 ณ จังหวัดเชียงราย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะเทคโนโลยีชีวิภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต เมื่อปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 ระหว่างการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2554 ภายใต้แผนงานวิจัยอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพและศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อไปเผยแพร่ผลงานทางวิชาการแบบบรรยายในงานประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 6 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ในหัวข้อเรื่อง Effects of chitosan on growth of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) *in vitro* นอกจากนี้ยังได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Department of Biological Science, National University of Singapore เพื่อไปเผยแพร่ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ The 16th Biological Sciences Graduate Congress 2011 ในรูปแบบแบบโปสเตอร์ ณ ประเทศสิงคโปร์ ในหัวข้อเรื่อง Effects of cytokinin, auxin and chitosan on growth of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) *in vitro*.