รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารกระตุ้นที่มีต่อปริมาณสาร 4-methoxycinnamyl p-courmarate ในสารสกัดจากแคลลัสเร่วหอมที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

Effect of Plant Growth Regulators and Elicitors on 4-methoxycinnamyl p-courmarate Content of Extracts from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Callus Cultured *in vitro*

นางสาวศิรศาธิญากร บรรหาร

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ 13.2/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารกระตุ้นที่มีต่อปริมาณสาร 4-methoxycinnamyl p-courmarate ในสารสกัดจากแคลลัสเร่วหอม ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

Effect of Plant Growth Regulators and Elicitors on 4-methoxycinnamyl p-courmarate Content of Extracts from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Callus Cultured *in vitro*

นางสาวศิรศาธิญากร บรรหาร

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 13.2/2562

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ผู้ร่วมวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข หัวหน้าโครงการชุดวิจัยที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างเหง้าของเร่วหอมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในครั้งนี้ รวมทั้งบุคลากร เจ้าหน้าที่ และนิสิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยเฉพาะ นายศราวุธ วงษ์แก้ว ที่ช่วยเหลือในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเร่วหอม นางสาวจรรยาพร จ่าพันธ์และนางสาวรัมภ์รดา ตันติราพันธ์ และที่ช่วยเหลือในขั้นตอนการเก็บข้อมูลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้มีพระคุณที่ไม่ได้เอ่ยนามที่มีส่วนร่วมให้งานวิจัยชิ้นนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวศิรศาธิญากร บรรหาร

บทคัดย่อ

เร่วหอม เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยา จัดเป็นพืชที่สามารถนำมาศึกษาและพัฒนาศักยภาพในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้ ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรและเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืชเพิ่มมากขึ้นเพื่อผลิตสารทุติยภูมิจากพืชสมุนไพร งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินคือ 2, 4-D และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินคือ BA และ TDZ รวมถึงสารกระตุ้นในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในส่วนยอดอ่อนของเร่วหอม โดยนำชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่มีตาข้างของเร่วหอมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหน่อของเร่วหอมบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่ออ่อนมีการเจริญเป็นยอดที่สมบูรณ์แข็งแรงดี และมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณโคนหน่อด้านล่าง และจากการศึกษาหาชนิดของสารกระตุ้นที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยนำชิ้นส่วนหน่ออ่อนของเร่วหอม ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารกระตุ้นชนิดต่างๆ คือ เมทิลจัสโมเนต (MeJA) 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ กรดซาลิไซลิก (SA) 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคโตซาน (Chitosan) 20, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในทุกสูตรอาหารที่นำมาเพาะเลี้ยง หน่ออ่อนเจริญดี แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ และเมื่อนำยอดอ่อนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า ยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม MeJA 200 μM มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในยอดอ่อนมากที่สุดเท่ากับ 3.058±0.048 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคตอกรัมสารสกัด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ

Abstract

Etlingera pavieana (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm was a medicinal plant with medicinal properties and could be studied and developed potential in the field of medicine, food industry and cosmetic industry. More and more studies on medicinal plant tissue culture and plant biotechnology were conducted to produce secondary metabolites from medicinal plants. The objective of this research was to study the effects of growth regulators in the auxin group i.e 2, 4-D and the cytokinin group i.e. BA and TDZ as well as the elicitors at various concentration on shoot induction and total phenolic contents in young shoots of *E. pavieana*. The experiment launched by culturing 1 cm young rhizome on solid MS media supplemented with 2, 4-D 0.1, 0.5 and 1.0 mg/l, BA 0.5, 1.0 mg/l and TDZ. 0.5, 1 and 1.5 mg/l. From the experiment it was found that young rhizome that cultured on MS media supplemented with 0.5 mg/l TDZ grew well and developed into healthy new shoots and formed callus at the base of the rhizome. From the study of the suitable elicitors on shoot multiplication and total phenolic compound content, the young shoot was cultured on MS media added 0.5 mg/l TDZ together with the elicitors i.e. Methyl jasmonate (MeJA) 100 and 200 μM, Salicylic acid (SA) 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mg/l and Chitosan 20, 60 and 80 mg/l for 8 weeks. From this results, it was found that all experiment young shoots grew well. Unfortunately, young shoot was unable to multiplicate new shoot more. From the quantification of the total phenolic compounds, it revealed that the young shoots cultured on the MS media containing MeJA 200 μM had the highest flavonoids content at 3.058 ± 0.048 mg equivalent of gallic acid per gram and there was a statistically significant difference from other experiments.

สารบัญเรื่อง

เนื้อหา **หน้า**

กิตติกรรมประกาศ.....ค
บทคัดย่อ.....ง
Abstract.....จ
สารบัญเรื่อง.....ฉ
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญภาพ.....ซ
บทนำ.....1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....3
ขอบเขตของการวิจัย.....3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5
วิธีการดำเนินการวิจัย.....21
ผลการศึกษา.....26
วิจารณ์ผลการศึกษา.....21
สรุปผลการศึกษา.....26
บรรณานุกรม.....28
ภาคผนวก.....32

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4-1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในยอดอ่อนของเร่วหอมที่เพาะเลี้ยงในสภาพหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นชนิดต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 28

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4-1 ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 26

4-2 ลักษณะยอดและแคลลัสที่เกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นใน ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 27

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เร่วหอม *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep) R.M.Sm เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกับ ขิง ข่า เร่วหอมเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าขนาดใหญ่และแข็ง ทอดเลื้อยไปตามผิวดินหรือใต้ดินแตกลำห่าง ลำต้นเหนือดินสูง 2.5 - 4.5 เมตร มีใบเรียงสลับระนาบเดียว แผ่นใบรูปขอบขนานกว้างประมาณ 12 เซนติเมตร ยาว 70 - 80 เซนติเมตร ปลายแหลม โคนตัดมน ขอบเรียบหรือเป็นคลื่น เส้นใบขนานเฉียงไปทางขอบใบ เรียงถี่ ก้านใบยาว 1.7- 2 เซนติเมตร ช่อดอกแบบช่อเชิงลดคล้ายช่อกระจุก เกิดจากลำต้นใต้ดิน ดอกสีแดงหรือส้มอมแดง ใบประดับสีแดงปลายแหลม กลีบเลี้ยงโคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอดยาวปลายแยกเป็นสามแฉก ผลเมื่อสุกมีสีแดงเปลือกผลมีขนคล้ายผลเงาะขนาดเล็ก ภายในมีเมล็ดสีน้ำตาล (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน), 2556) ในประเทศไทยพบกระจายพันธุ์ของเร่วหอมจำนวนมากในภาคตะวันออกของประเทศไทยได้แก่ จ.ระยอง จ.จันทบุรี และ จ.ตราด (Poulsen & Phonsena, 2017)

เร่วหอมมีสรรพคุณทางยาช่วยแก้ไข้ ช่วยแก้อาการหืดไอ ไอมีเสมหะ ใช้ปรุงเป็นยาขับลม ยาขับปัสสาวะ การใช้ประโยชน์ของเร่วหอม ผลเร่วหอมสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องเทศได้ รากมีกลิ่นหอมสามารถใช้เป็นเครื่องเทศในการปรุงน้ำก๋วยเตี๋ยว น้ำต้มเนื้อ แกงป่า แกงเลียง ผัดเผ็ด เหง้าแก่ใช้ต้มน้ำซุปก๋วยเตี๋ยวหมูหรือใช้ทำแกงเลียง เหง้าอ่อนและแขนงอ่อนของเร่วหอม ใช้รับประทานสดร่วมกับน้ำพริกได้ รากและเหง้าใช้ทำเป็นยาหอมเย็นได้ เพราะเหง้ามีกลิ่นหอมและมีน้ำมันหอยระเหยเป็นองค์ประกอบ เร่วหอมแห้งชนิดแท่งสามารถนำมาใช้เป็นแท่งสำหรับคนในเครื่องดื่มร้อนๆ เช่น กาแฟหรือชาได้ เพื่อให้มีกลิ่นหอมเช่นเดียวกับเปลือกอบเชย เร่วหอมจึงจัดว่าเป็นพืชที่มีความน่าสนใจเพื่อที่นำไปศึกษาและพัฒนาศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ทั้งในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2017)

จากการศึกษาการสารทุติยภูมิในเร่วหอม พบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela (Mankhong, Srisook, & Srisook, 2017; E. Srisook, Palachot, Mankhong, & Srisook, 2017)) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อจากกลุ่มของเชื้อวิบริโอซึ่งเป็นสาเหตุของอาการท้องร่วง (Brackman, 2008) ฤทธิ์ในการต้านไวรัส RSV ที่ก่อโรคติดเชื้อทางเดินหายใจ (Wang, Chang, Chiang, & Lin, 2009) ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของหลอดเลือดแดง (antiatherogenic) (K. Srisook & Srisook, 2019) ฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ตับ (hepatoprotective) (Lee, Kim, Kim, & Kim, 2002), ต้านความจำเสื่อม (anti-amnesic) (Kim, 2002) ใช้เป็นสารส่งเสริมความจำ (cognitive-enhancing activity) (Kim, 2003) ฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท (Kim, 2002; Park, Li, Eom,

Lee, & Lee, 2010) และฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Adisakwattana, Roengsamran, Hsu, & Yibchok-anun, 2005)

การขยายพันธุ์ของเร่วหอม วิธีที่นิยมที่สุดคือการแยกเหง้า หรือแยกหัว เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวก ได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะที่เหมือนเดิม (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน), 2556) นอกจากนี้ยังสามารถใช้หน่อมาทำการปลูกได้โดยสามารถใช้ต้นพันธุ์ได้หลายแบบ เช่น ต้นแก่ทั้งต้นมีเหง้ามีหน่อ ต้นแก่ทั้งต้นมีเหง้าไม่มีหน่อ ต้นแก่ตัดต้นมีเหง้ามีหน่อ หรือใช้หน่ออ่อนที่มีเหง้า (ธำรง ใจบุศย์ และ จันทร์ ใจบุศย์, 2554) โดยปกติเร่วหอมสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งที่ปลูกภายใต้ร่มเงาประมาณร้อยละ 50-60 ในช่วงเร่วหอมอายุ 1 ปี จะมีการแตกหน่อใหม่อยู่ในช่วง 4-5 หน่อต่อกอ (ณัฐวัฒน์ คลังทรัพย์, มปป.) แต่เนื่องจากความต้องการในการสารทุติภูมิที่มีประโยชน์ทางยาจากพืชเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่สารทุติยภูมิที่พืชสร้างมีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณที่ผลิตน้อยกว่าความต้องการ ทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการและทำให้มีราคาสูงขึ้น ตลอดจนการสกัดสารจากพืชให้ได้ปริมาณที่เพียงพอกับความต้องการจำเป็นต้องใช้พืชจำนวนมหาศาล ในขณะที่การเพาะปลูกพืชตามธรรมชาติต้องอาศัยพื้นที่ ระยะเวลา การบำรุงรักษา และการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม ส่งผลให้ผลผลิตจากพืชมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการ ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรและเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืชเพิ่มมากขึ้นเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดดังกล่าว ด้วยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าการเพาะปลูกและขยายพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีข้อดีเหนือกว่าการเพาะปลูกตามธรรมชาติหลายด้าน เช่น สามารถผลิตสารได้โดยไม่มีปัจจัยรบรวมจากภูมิประเทศ สภาพอากาศ และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ตลอดจนสามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดเวลา ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่มีความแตกต่างระหว่างรุ่นการผลิต นอกจากนี้เนื้อเยื่อพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอาจจะผลิตสารใหม่ที่ไม่พบจากต้นพืชในธรรมชาติได้ (วราภรณ์ ภูตะลุน, 2557)

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นในด้านประโยชน์ สรรพคุณและการออกฤทธิ์ทางยาของเร่วหอม ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเร่วหอมในครั้งนี้ โดยการชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดยอดและราก จากการเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนของเร่วหอม และการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในส่วนแคลลัสของเร่วหอม โดยการใช้สารกระตุ้น รวมทั้งการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิที่ได้ในแคลลัส ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเร่วหอมและการเพิ่มปริมาณของเร่วหอม รวมทั้งพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพรได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของเร่วหอมบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ Benzyladenine (BA) และ Thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันภายใต้สภาพการเพาะเลี้ยงในสภาพหลอดทดลอง

2. เพื่อศึกษาหาสารกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสเร่วหอมและปริมาณสารทุติยภูมิ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติมสารเมทิลจัสโมเนต (Methyl jasmonate, MeJA), กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid, SA) และไคโตซาน (Chitosan) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันภายใต้สภาพการเพาะเลี้ยงในสภาพหลอดทดลอง

3. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากการสกัดแคลลัสเร่วหอมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารกระตุ้นต่างชนิดกันที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D, BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสเร่วหอมได้ต่างกัน

2. สารกระตุ้นเมทิลจัสโมเนต (MeJA), กรดซาลิไซลิก (SA) และไคโตซาน ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันมีผลต่อการเพิ่มปริมาณและสารทุติยภูมิของแคลลัสเร่วหอมได้ต่างกัน

3. สารสกัดจากแคลลัสเร่วหอม มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D, BA และ TDZ ในการชักนำให้เกิดแคลลัสของเร่วหอม

2. ทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารกระตุ้นเมทิลจัสโมเนต (MeJA), กรดซาลิไซลิก (SA) และไคโตซาน ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณและสารทุติยภูมิของแคลลัสเร่วหอม

3. ได้สารสกัดจากแคลลัสของเร่วหอมที่มีสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

4. สามารถใช้เทคนิคในการเพาะเลี้ยงเร่วหอมนี้ไปประยุกต์ใช้ในเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีประโยชน์ต่อไป

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการชักนำแคลลัสของเร่วหอมโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA

ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

2. ศึกษาสารกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสเร่วหอมและปริมาณสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติมสารเมทิลจัสโมเนต (MeJA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ กรดซาลิไซลิก (SA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคโตซาน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 20, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. วิเคราะห์ผลของสารกระตุ้นทั้งสามชนิดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส โดยบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง สี และน้ำหนักสดของแคลลัส

4. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดแคลลัสเร่วหอมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารกระตุ้นต่างชนิดกัน

1.6 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ระยะเวลาในการศึกษาตั้งแต่เดือนธันวาคม 2562 – กุมภาพันธ์ 2564

1.7 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช BS-3115 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ของเร่วหอม

พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เป็นกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีจำนวนสมาชิกทั่วโลก ในปัจจุบันมีจำนวนมากกว่า 1,300 ชนิด จำแนกเป็น 55 สกุล โดยมีการกระจายพันธุ์อยู่ในระบบนิเวศทุกแบบของเขตร้อนในทวีปเอเชียโดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการกระจายพันธุ์ของพืชวงศ์ขิงที่มีจำนวนและปริมาณมากกว่าพื้นที่อื่น ๆ ของโลก สำหรับประเทศไทยการศึกษาพืชวงศ์ขิงมีเริ่มการศึกษาและรวบรวมโดยศาตราจารย์ Kai Larsen ซึ่งเป็นนักอนุกรมวิธานคนแรกที่ได้จัดทำรายชื่อสกุลพืชและชนิดพืชในวงศ์ขิงของประเทศไทยทั้งหมดในครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2539 โดยแสดงจำนวน 21 สกุล ประมาณ 200 ชนิด และจากนั้นก็มีทั้งนักวิจัยและลูกศิษย์ให้มีการศึกษาเพิ่มเติมจนมีความก้าวหน้าไปมาก ในปัจจุบันประเทศไทยประเมินได้ทั้งหมด 300 ชนิด จำแนกได้ระหว่าง 25–30 สกุล (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน), 2556)

พืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ เร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep) R.M.Sm จัดเป็นพืชวงศ์ขิง ที่อยู่ในสกุล *Etlingera* ซึ่งในประเทศไทยพบสมาชิกพืชสกุลนี้ 15 สายพันธุ์ ได้แก่

E. araneosa (Baker) R.M. Sm.,

E. coccinea (Blume) S. Sakai & Nagam.,

E. corneri Mood & Ibrahim,

E. elatior (Jack) R.M. Sm.,

E. hemisphaerica (Blume) R.M. Sm.,

E. linguiformis (Roxb.) R.M. Sm.,

E. littoralis (J. Koenig) Giseke,

E. maingayi (Baker) R.M. Sm.,

E. metriocheilos (Griff.) R.M. Sm.,

E. pauciflora (Ridl.) R.M. Sm.,

E. pavieana (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm.,

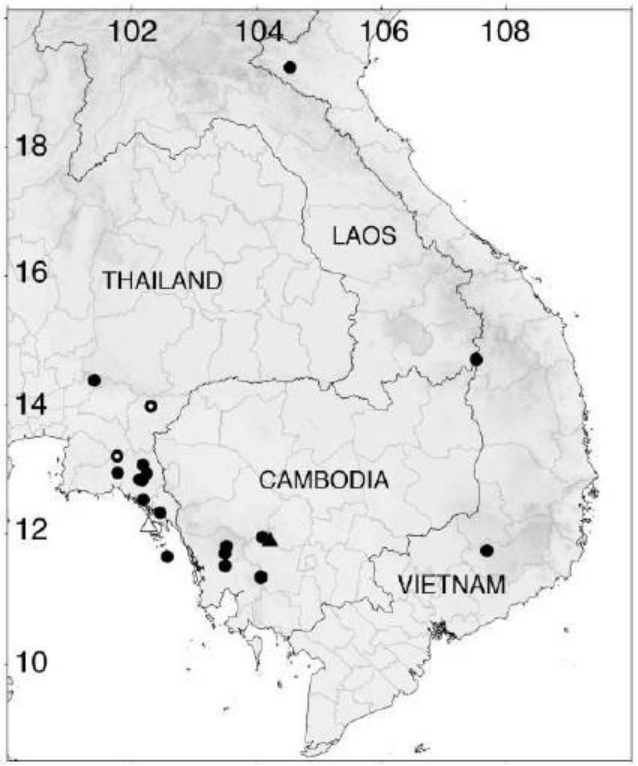
E. subterranean (Holttum) R.M. Sm.,

E. triogyalis (Baker) R.M. Sm., *E. Venusta* (Ridl.) R.M. Sm.

และ *E. yunnanensis* (T.L. Wu & S.J. Chen) R.M. Sm. (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน, 2556)

การกระจายพันธุ์และนิเวศวิทยาของเร่วหอม โดยจากเดิมเร่วหอมเริ่มมีการศึกษาและพบในประเทศกัมพูชาเป็นที่แรก และเมื่อมีการศึกษาเพิ่มเติมก็พบว่ามีการกระจายพันธุ์ทั้งในประเทศลาว

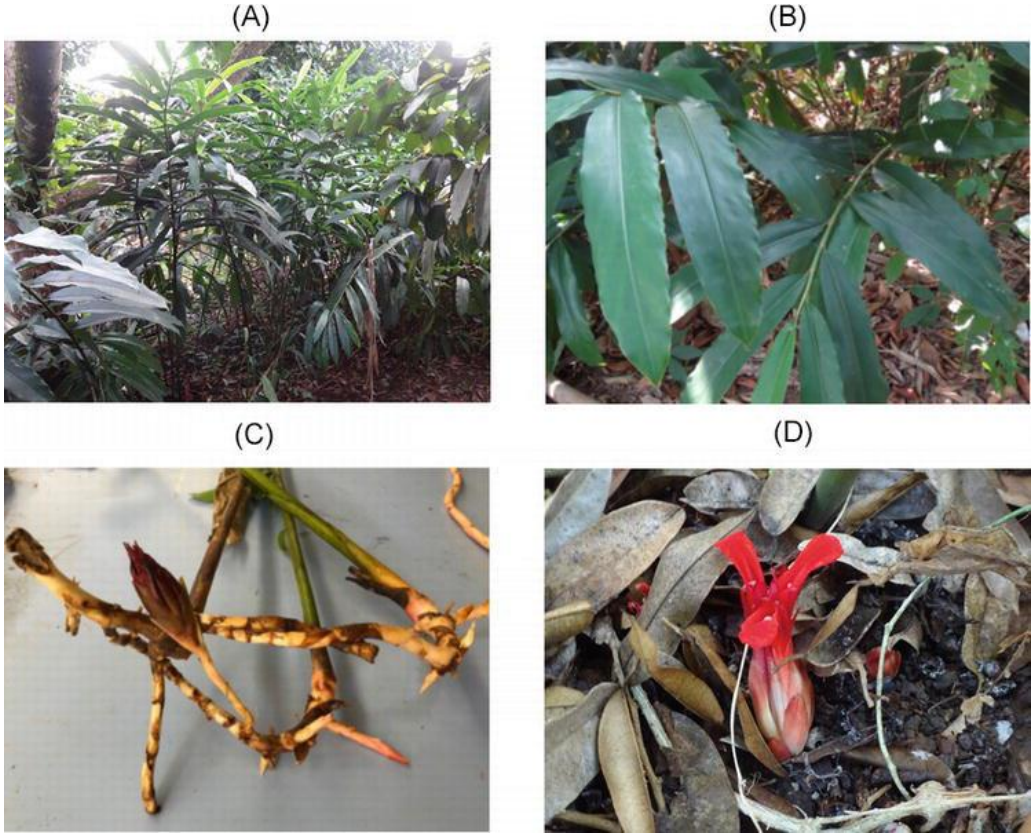
เวียดนาม และไทย (ภาพที่ 2-1) โดยเฉพาะในประเทศไทยพบกระจายพันธุ์ของเร่วหอมจำนวนมากใน ภาคตะวันออก บริเวณเขาชะเมาในจังหวัดระยอง เขาสอยดาวในจังหวัดจันทบุรี และเกาะช้างใน จังหวัดตราด (Poulsen & Phonsena, 2017)



ภาพที่ 2-1 การกระจายพันธุ์ของเร่วหอม

ลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ของเร่วหอม : เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าขนาดใหญ่และแข็ง ทอดเลื้อยไปตามผิวดินหรือใต้ดินแตกลำห่าง ลำต้นเหนือดินสูง 2.5 - 4.5 เมตร มีใบ 10 - 18 ใบ เรียงสลับระนาบเดียว แผ่นใบรูปขอบขนานกว้างประมาณ 12 เซนติเมตร ยาว 70 - 80 เซนติเมตร ปลายแหลม โคนตัดมน ขอบเรียบหรือเป็นคลื่น เส้นใบขนานเฉียงไปทางขอบใบ เรียงถี่เกลี้ยงทั้งสองด้าน ก้านใบยาว 1.7 – 2 เซนติเมตร ช่อดอกแบบช่อเชิงลดคล้ายช่อกระจุก เกิดจากลำต้นใต้ดิน รูปกรวยหรือรูปไข่ กว้าง 4-6 เซนติเมตร ยาวประมาณ 7 เซนติเมตร ก้านช่อยาว 2 - 5 เซนติเมตร ดอกสีแดงหรือส้มอมแดง ใบประดับสีแดง รูปขอบขนาน กว้าง 1 - 1.8 เซนติเมตร ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ปลายแหลม ใบประดับย่อยยาวประมาณ 3.4 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงโคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ยาวประมาณ 3.5 เซนติเมตร ปลายแยกเป็นแฉกลึกด้านเดียว ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอดยาว 4 - 4.7 เซนติเมตร ปลายแยกเป็นสามแฉก รูปใบหอกถึงรูปแถบ ยาว 2-2.6 เซนติเมตร ปลายมน กลีบปากสีแดง รูปลิ้นหรือรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า กว้างประมาณ 1.6 เซนติเมตร ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ปลายยื่นยาวและเว้าตื้นกลีบคู่ข้างลดรูป เกสร

เพศผู้ยาวประมาณ 1.4 เซนติเมตร รังไข่ยาว 3-5 มิลลิเมตร (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน), 2556)

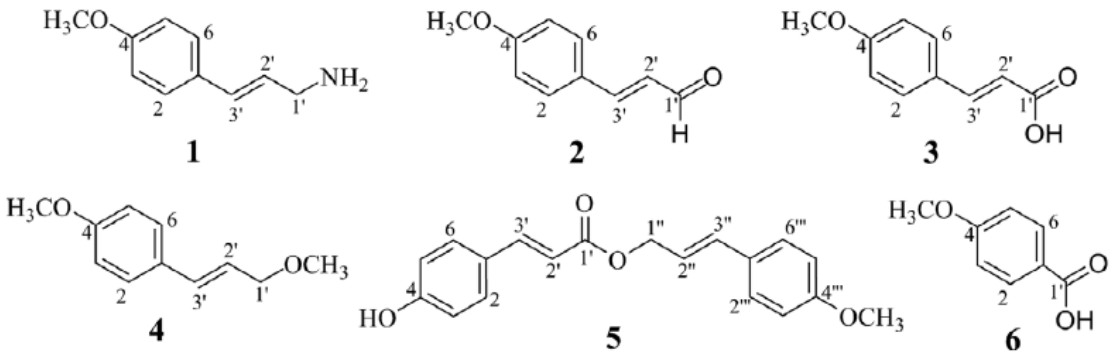


ภาพที่ 2-2 ลักษณะทางพกฤษศาสตร์ของเร่วหอม A; ลำต้นของเร่วหอม, B; ใบของเร่วหอม, C; ลำต้นใต้ดินหรือเหง้าเร่วหอม และ D; ดอกของเร่วหอม (Srisook & Srisook, 2019)

สรรพคุณทางยาของเร่วหอม ในส่วนของผลมีสรรพคุณ ช่วยแก้ไข้ ช่วยแก้อาการหืดไอ ไอมีเสมหะ ใช้ปรุงเป็นยาขับลม ช่วยแก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียดแน่นท้อง ช่วยรักษาริดสีดวงทวาร ใบเร่วหอมใช้เป็นยาขับปัสสาวะ เหง้าและรากเร่วหอมใช้เป็นยาเส้น การใช้ประโยชน์ของเร่วหอม โดยผลของเร่วหอมสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องเทศได้ รากมีกลิ่นหอม สามารถใช้เป็นเครื่องเทศในการปรุงน้ำก๋วยเตี๋ยว น้ำต้มเนื้อ แกงป่า แกงเลียง ผัดเผ็ด ฯลฯ เหง้าแก่ใช้ต้มน้ำซุปก๋วยเตี๋ยวหมูหรือใช้ทำแกงเลียง ทำน้ำพริกแกงผัดเผ็ดหมูป่า เหง้าอ่อนและแขนงอ่อนของเร่วหอม ใช้รับประทานสดร่วมกับน้ำพริกได้ รากและเหง้าใช้ทำเป็นยาหอมเย็นได้ เพราะเหง้ามีกลิ่นหอมและมีน้ำมันหอยระเหยเป็นองค์ประกอบ เร่วหอมแห้งชนิดแท่งสามารถนำมาใช้เป็นแท่งสำหรับคนในเครื่องดื่มร้อนๆ เช่น กาแฟหรือชาได้ เพื่อให้มีกลิ่นหอมเช่นเดียวกับเปลือกอบเชย (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2017)

2.2 สารทุติยภูมิของเร่วหอม

สารทุติยภูมิที่คัดแยกได้จากเร่วหอมและมีการศึกษาโครงสร้างของสารประกอบพบว่าเป็นสารประกอบ phenylpropens จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-amine, (*E*)-4-methoxycinamaldehyde (MCD), (*E*)-4-methoxycinamic acid และ (*E*)-1-methoxy-4-(3-methoxyprop-1-enyl)benzene นอกจากนี้ยังพบสารประกอบอื่น ๆ อีก 2 ชนิด ได้แก่ (*E*)-((*E*)-3-(4-methoxyphenyl)allyl)3-(4-hydroxyphenyl)acrylate หรือ 4-methoxycinnamyl *p*-coumarate (MCC) และ 4-methoxybenzoic acid (S. Tachai & Nuntawong, 2016)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างสารทุติยภูมิจากเหง้าของเร่วหอม ประกอบด้วย

1. (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-amine
2. (*E*)-4-methoxycinamaldehyde (MCD)
3. (*E*)-4-methoxycinamic acid
4. (*E*)-1-methoxy-4-(3-methoxyprop-1-enyl) benzene
5. (*E*)-((*E*)-3-(4-methoxyphenyl)allyl)3-(4-hydroxyphenyl)acrylate หรือ 4-methoxycinnamyl *p*-coumarate (MCC)
6. 4-methoxybenzoic acid

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารประกอบพบว่า สารประกอบ (*E*)-4-methoxycinamaldehyde (MCD) มีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อจากกลุ่มของเชื้อวิบริโอซึ่งเป็นสาเหตุของอาการท้องร่วง (Brackman, 2008) และมีฤทธิ์ในการต้านไวรัส RSV ที่ก่อโรคติดเชื้อทางเดินหายใจ (Wang, Chang, Chiang, & Lin, 2009) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านการแข็งตัวของหลอดเลือดแดง (antiatherogenic) (Srisook & Srisook, 2019) สารประกอบ (*E*)-4-methoxycinamic acid มีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ตับ (hepatoprotective) (Lee, Kim, Kim, & Kim, 2002) ต้านความจำเสื่อม

(anti-amnesic) (Kim et al., 2002) ใช้เป็นสารส่งเสริมความจำ (cognitive-enhancing activity) (Kim, 2003) ฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท (Kim, 2002; Park, Li, Eom, Lee, & Lee, 2010) และฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Adisakwattana, Roengsamran, Hsu, & Yibchok-anun, 2005) สารประกอบ (*E*)-((*E*)-3-(4 methoxy phenyl) allyl)3-(4-hydroxyphenyl) acrylate หรือ 4-methoxycinnamyl *p*-coumarate (MCC) สามารถต้านเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุของวัณโรค ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งโดยแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (human oral cavity cancer: KB), มะเร็งเต้านม (human breast cancer: MCF7) และมะเร็งปอด (human small-cell lung cancer: NCI-H187) (S. Tachai & Nuntawong, 2016) นอกจากนั้นก็ยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ฤทธิ์ในการต้านหลอดเลือดแดงแข็งตัว ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Srisook & Srisook, 2019)

2.3 สถานการอนุรักษ์เร่วหอม

ถึงแม้มีการพบเร่วหอมใน 4 ประเทศ และในอีกหลายๆ พื้นที่ แต่เร่วหอมจัดเป็นสปีชีส์ที่อยู่ในประเภทความเสี่ยงเกือบใกล้สูญพันธุ์ (Near Threaten: NT) แต่ไม่ได้จัดอยู่ในประเภทที่มีความเสี่ยงขั้นวิกฤตต่อการสูญพันธุ์เมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ แต่เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดินอย่างต่อเนื่อง ตลอดจนความต้องการเหง้าเร่วหอม อาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงให้เร่วหอมเลื่อนสถานภาพเป็นสปีชีส์ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูงได้ โดยเฉพาะในประเทศไทย (Poulsen & Phonsena, 2017)

2.4 การขยายพันธุ์เร่วหอม

การแยกเหง้า หรือแยกหัว เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวก ได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะที่เหมือนเดิม โดยการขุดหัวพันธุ์ขึ้นมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งหักหรือแบ่งกลุ่มเหง้าออกจากกันได้โดยง่าย จากนั้นนำมาแช่สารเคมีป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อรา แช่เสร็จแล้วนำไปผึ่งลมให้แห้งและนำไปปลูกต่อไป การผ่าเหง้า เป็นวิธีที่เหมาะในกรณีที่มีหัวพันธุ์ไม่เพียงพอหรือต้องการประหยัดหัวพันธุ์ ซึ่งวิธีนี้ต้องทำด้วยความระมัดระวัง ควรทำก่อนปลูกในระยะเวลาที่ไม่นานมาก วิธีการคือการผ่าเหง้าตามยาวเป็น 2 ชิ้นเท่าๆ กัน ชิ้นส่วนที่ผ่าได้ควรมีตาที่สมบรูณ์อย่างน้อย 1 ตาและมีรากสะสมอาหารติดมาด้วย เพื่อป้องกันเชื้อราเข้าทำลายอาจจะป้ายปูนแดงหรือแช่สารกำจัดเชื้อราด้วย (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2556)

การใช้หน่อเร่วหอมมาปลูกสามารถใช้ต้นพันธุ์เริ่มต้นได้หลายแบบ เช่น ต้นแก่ทั้งต้นมีเหง้ามีหน่อ ต้นแก่ทั้งต้นมีเหง้าไม่มีหน่อ ต้นแก่ตัดต้นมีเหง้ามีหน่อ หรือใช้หน่ออ่อนที่มีเหง้า โดยทั่วไปสามารถใช้การแยกหน่อได้เหมือนกับพืชวงศ์ขิง คือ เวลาตัดไหลออกจากหน่อควรตัดให้ห่างประมาณ 5 นิ้ว ให้มีรากติดอยู่บ้างเล็กน้อย แล้วนำหน่อที่ได้ไปแช่น้ำแต่ไม่ควรเกิน 2 วัน เพราะอาจทำให้หน่อ

เน่าได้ (ธำรง ใจบุศย์ และ จันทร์ ใจบุศย์, 2554) เร่วหอมสามารถเจริญเติบโตได้ดีและควรมีร่มเงาประมาณร้อยละ 50-60 ระยะห่างของการปลูกที่เหมาะสมควรปลูกให้ห่างกันประมาณ 1 เมตร หรือมีจำนวนต้นอยู่ในช่วง 1,200-1,300 กอต่อไร่ การขยายพันธุ์เร่วหอมเพื่อนำไปปลูกจะเลือกต้นกล้าที่มีอายุ 1 ปีขึ้นไป โดยทำการแยกต้นกล้าที่มีไหลติดอยู่ด้วยมาปลูกเพราะจะมีการแตกหน่อได้ดี ในช่วงเร่วหอมอายุ 1 ปี จะมีการแตกหน่อใหม่อยู่ในช่วง 4-5 หน่อต่อกอ (ณัฐวัฒน์ คลังทรัพย์, มปป.)

2.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ และควบคุมสภาวะแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชนั้นมีการเจริญและเพิ่มปริมาณ ตลอดจนพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบรูณ์ได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะสามารถเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อและให้ต้นพืชได้ในระยะเวลารวดเร็ว พืชที่ได้จะมีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ เป็นต้นใหม่ที่ปลอดโรค และมีความสม่ำเสมอของการเจริญเติบโต เหมาะที่จะใช้สำหรับงานอุตสาหกรรม รวมถึงการผลิตสารทุติยภูมิ สามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เก็บรักษาพันธุ์พืชที่หายาก (รมณีย์ เจริญทรัพย์ และ ศาลักษณ์ พรรณศิริ, 2549)

2.5.1 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีที่มีบทบาทมากทั้งในด้านของวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกษตรกรรม การแพทย์เภสัช และอุตสาหกรรม ดังนี้

1. การขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาสั้น ซึ่งทำได้โดยอาศัยสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดสามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชเป็นทวีคูณ

2. การผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค การผลิตพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ต้นพืชที่ปราศจากเชื้อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อราและแบคทีเรีย เพราะหากมีเชื้อเหล่านี้แล้วจะแสดงอาการปนเปื้อนในอาหารที่ใช้เลี้ยงทันที เนื่องจากแบคทีเรียและเชื้อรามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหารที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถนำไปกำจัดได้เลย

3. การปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทานหรือสายพันธุ์ที่ต้านทานได้จากการจัดการเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง หรือการชักนำการกลายพันธุ์ โดยการใช้สารเคมีหรือรังสี นอกจากนั้น ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการตัดต่อดีเอนเอและการถ่ายทอดยีนยังเปิดโอกาสให้มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่ต้องการในพืชบางชนิด

4. การผลิตยาและสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยา หรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรม แต่ในบางกรณีเนื้อเยื่อพืชที่นำมาสกัดสารดังกล่าวมีปริมาณที่น้อยมาก จึงต้องนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยเพิ่มจำนวนและชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น

5. การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆ ได้ดีกว่าในสภาพเพาะปลูกปกติ

6. การเก็บรักษาพันธุ์พืช ซึ่งพืชพรรณหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์พืชที่หายากและมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์หลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือกำลังจะสูญพันธุ์ในไม่ช้า นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้คิดค้นวิธีเก็บรักษาพืชพรรณต่าง ๆ ไว้ในสภาพหลอดทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารบางชนิดที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพและมีชีวิตได้ยาวนาน

2.5.2 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ประสบความสำเร็จ โดยการที่เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์และเนื้อเยื่อในระยะต่างๆ ในปัจจุบันสูตรอาหารที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายคือ สูตร MS หรือ Murashige & Skoog ที่คิดค้นจากนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Toshio Murashige และ Folke Skoog ในปี 1962 และมีการประยุกต์ใช้ในงานด้านการเพาะเลี้ยงพืชหลากหลายชนิด อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปนั้นจะประกอบไปด้วย เกลืออนินทรีย์ คาร์โบไฮเดรต วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช สารที่ทำให้อาหารแข็งตัว นอกจากนั้นก็ยังมีการใส่สารจำพวกสารยับยั้งการเจริญของจุลชีพหรือสารสกัดจากธรรมชาติ (บุษราภรณ์ งามปัญญา, 2548) อาหารในปัจจุบันเมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วพบว่ามีองค์ประกอบของ

1.เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) เป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดตามความต้องการของพืช (ศาลักษณ์ พรรณศิริ, 2549)

1.1 ธาตุอาหารหลัก (Macroelements) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณที่มาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P), โปแตสเซียม (K), แคลเซียม (Brackman), แมกนีเซียม (Mg), ซัลเฟอร์ (S) ธาตุอาหารหลักนี้บางตัวเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างหรือทำหน้าที่ช่วยในการสังเคราะห์โปรตีน เช่น ไนโตรเจนและซัลเฟอร์ ทำหน้าที่สังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ เช่น ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ แคลเซียมก็มีส่วนช่วยในการเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ แมกนีเซียมเป็น co-factor ของเอนไซม์ซึ่งเป็นองค์ประกอบคลอโรฟิลล์ และยังช่วยให้ผนังเซลล์แข็งแรง

1.2 ธาตุอาหารรอง (Microelements) เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับพืช แต่ต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ แมงกานีส (Mn), สังกะสี (Zn), โบรอน, ทองแดง (Cu), เหล็ก (Fe), โคบอลท์ (Brackman), โมลิบดินัม, คลอไรด์ (Cl), ไอโอดีน (I) นอกจากนั้นพืชบางชนิดอาจจะต้องการอลูมิเนียม (Al), นิคเกิล (Sirichan Tachai, Wangkarn, & Nuntawong), ซิลิกอน หรือ ฟลูออไรด์ (F) เพิ่มขึ้นอีกด้วย ธาตุอาหารรองเหล่านี้ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็น co-factor ของเอนไซม์ในเซลล์ เช่น

โบรอน ทองแดง แมงกานีส โมลิบดินัม และสังกะสี นิยมให้ในรูปสารประกอบเกลือเช่นเดียวกับธาตุอาหารหลัก

2.สารประกอบอินทรีย์ (Organic compounds) คือสารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน แบ่งเป็นหลายพวกได้แก่

2.1 น้ำตาล (Sugar) จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช โดยเป็นแหล่งพลังงาน โดยทั่วไปน้ำตาลที่นิยมใช้ได้แก่น้ำตาลซูโคสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2-4 แต่ในบางกรณีอาจใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซอร์บิทอล ในพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยวนิยมใช้กลูโคสแทนซูโคส หรือกล้วยไม้บางชนิดนิยมใช้น้ำตาลฟรุกโตส

2.2 วิตามิน (Vitamins) พืชส่วนมากที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสามารถสร้างวิตามินได้เองแต่มีปริมาณที่น้อยไม่เพียงพอจึงต้องมีการเติมวิตามินในอาหารเพื่อให้พืชเจริญเติบโตได้ เนื่องจากวิตามินมีหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ ในกระบวนการต่างๆ วิตามินที่พืชต้องการ ได้แก่ ไทอามีน (Thiamine, B1) นอกจากนี้ยังมีวิตามินอื่นๆ ที่นำมาใช้กัน ได้แก่ nicotinic acid (B5) และ pyridoxine (B6) ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของต้นพืช (บุษราภรณ์ งามปัญญา, 2548)

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) ปกติพืชจะสามารถสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนขึ้นมาเองได้ และฮอร์โมนเพียงเล็กน้อยนี้ก็สามารถกระตุ้นและพัฒนาให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ ปัจจุบันก็มีการสังเคราะห์ฮอร์โมนซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญมากๆ สำหรับใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการเร่งการเจริญและเร่งให้พืชมีการพัฒนาของต้นพืช สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ออกซิน (Auxin) สารกลุ่มนี้มีทั้งชนิดที่พืชสร้างขึ้นเองและสารสังเคราะห์ มีหน้าที่ควบคุมการขยายตัว กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ทำให้บริเวณเนื้อเยื่อเจริญมีการเจริญขึ้นโดยเฉพาะบริเวณราก นอกจากนั้นยังมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของตาข้าง กระตุ้นการเจริญของผล การออกดอกและการติดผลของพืชบางชนิด สารในกลุ่มออกซินที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ NAA (1-naphthylacetic acid), IBA (4-(indol-3-yl) butyric acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 4-CPA (4-chlorophenoxyacetic acid) และ IPA (indolepropionic acid) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าการใช้ 2, 4-D จะนิยมใช้เพื่อการชักนำแคลลัส ในขณะที่ IAA, IBA และ NAA นั้นใช้ในการชักนำให้เกิดราก นอกจากนั้นยังใช้ 3, 6-dicholoro-2-methoxy benzoic acid (dicamba) และ 4-amino-3, 5, 6-trichloropicolinic acid (picloram) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มออกซินโดยที่ dicamba จะใช้ได้ผลดีกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว picloram ใช้กับพืชตระกูลถั่ว

กลุ่มที่ 2 ไซโตไคนิน (Cytokinins) เป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทต่อการชักนำให้เกิดยอด และการพัฒนาไปเป็นต้นของพืชทุกชนิด โดยไปส่งเสริมให้มีการแบ่งและเร่งการขยายตัวของเซลล์ พร้อมกับส่งเสริมการสร้างและการเจริญของตา โดยที่ไซโตไคนินสามารถดึงสารและกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เข้าใกล้ตัวและสามารถสร้าง RNA และ DNA ได้ ปัจจุบันไซโตไคนินที่นิยมนำมาใช้ใน

ห้องปฏิบัติการได้แก่ Benzyladenine (BA), Benzylaminopurine (BAP), Kinetin, hydropyranyl benzyl adenine (PBA) และ Thidiazuron

กลุ่มที่ 3 จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) มีผลต่อการเจริญในส่วนต่าง ๆ ของพืชได้แก่ การขยายตัวของเซลล์และการยืดยาวของลำต้น เร่งการออกดอกของพืช มีผลต่อการแสดงออกของเพศ ช่วยในการติดผล ช่วยในการงอกของเมล็ดและการพักตัวของตา การใช้จิบเบอเรลลินในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีส่วนใหญ่ใช้เพื่อชักนำให้เกิดการยืดของหน่อ

กลุ่มที่ 4 กรดแอบไซซิก (Abscisic acid; ABA) ผลคือการยับยั้งการงอกของเมล็ดและการพักของตา ผลต่อการร่วงของใบ ผล กิ่ง การใช้ ABA ความเข้มข้นต่ำในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นสามารถใช้ควบคุมรูปแบบการเจริญและพัฒนาการของเซลล์พืชได้

กลุ่มที่ 5 เอทิลีน (ethylene) เป็นฮอร์โมนที่อยู่ในรูปของแก๊ส เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบรูณ์ของสารที่มีคาร์บอนมาก มีผลทำให้ใบร่วง ใบบิดเบี้ยวและบิดงอ สีกลีบดอกจางลง ลำต้นบวม ปล้องสั้น รากไม่เจริญ

2.4 กรดอะมิโน (Amino acid) การเติมกรดอะมิโนลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อช่วยในการส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นต้นพืช ส่งเสริมกระบวนการ morphogenesis และไปทดแทนหรือเพิ่มปริมาณของไนโตรเจน กรดอะมิโนที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็น L-form ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ L-tyrosine สำหรับการชักนำให้เกิดต้น L-arginine ใช้สำหรับการชักนำราก L-serine ใช้เลี้ยง microspore เป็นต้น (บุษราภรณ์ งามปัญญา, 2548)

2.5 สารกระตุ้น (Elicitors) เนื่องจากพืชบางชนิดมีการผลิตสารทุติยภูมิที่มีประโยชน์ต่อทางการแพทย์และการเกษตร การนำเอาสารกระตุ้นเข้ามาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ โดยสารกระตุ้นที่ใช้อาจเป็นสารประกอบที่ได้จากทั้งสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต (วราภรณ์ ภูตะลุน, 2557) สารกระตุ้นทางชีวภาพ สารกระตุ้นชีวภาพเป็นสารกระตุ้นที่ได้จากสิ่งมีชีวิต สารกระตุ้นในกลุ่มนี้ได้มาจากผนังเซลล์ของจุลชีพ ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และสารสกัดยีสต์ นอกจากนี้ ยังมีกลุ่มสารเคมีที่พบได้ในพืช ได้แก่ Methyl jasmonate และ salicylic acid หรือได้จากเปลือกของสัตว์ ได้แก่ ไคโตซาน (Chitosan)

- สาร Methy jasmonate และ Jasmonic acid เป็นสารกระตุ้นที่มีการนำมาใช้ในอย่างแพร่หลายในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาร Methy jasmonate และ jasmonic acid เป็นน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นมะลิก้านแดง (Jasminum grandiflorum) ต่อมามีการศึกษาพบว่า สารชนิดนี้มีการกระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์พืช โดย methy jasmonate และ jasmonic acid เป็นตัวควบคุมที่สำคัญในระดับเซลล์และเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของพืชหลายอย่าง เช่น การเจริญของเมล็ด การเจริญของราก การสุกของผล และการแก่ของพืช อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิในพืชอีกด้วย ดังนั้นการใช้สาร methy jasmonate และ jasmonic acid เป็นสารกระตุ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงสามารถส่งผลให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นได้ (Cheong & Choi, 2003)

- สาร Salicylic acid เป็นสารกระตุ้นอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยทั่วไป salicylic acid จะพบได้ในเซลล์พืช มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช salicylic acid จะเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signal transduction) การตอบสนองของพืชในระดับเซลล์ เพื่อป้องกันตัวเองจากการถูกบุกรุกโดยจุลชีพ (defense mechanism) เมื่อระดับของ salicylic acid ในเซลล์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จะมีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ทำให้เกิดการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าวสารทุติยภูมิและเกิดการสร้างสารเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเติม salicylic acid จากภายนอกลงไป จึงส่งผลให้เกิดการตอบสนองของเซลล์พืชคล้ายกับกลไกในการป้องกันตัวเองจากถูกบุกรุกโดยจุลชีพ (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005)

- สาร Chitosan จัดเป็นสารกระตุ้นในกลุ่มที่ได้จากสิ่งมีชีวิต สกัดได้จากเปลือกของสัตว์จำพวกหอย กุ้ง ปู การทำงานของ Chitosan เกิดจากเซลล์พืชมีตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะกับสารกระตุ้นชนิดนี้ ดังนั้นเมื่อให้ chitosan แก่เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง chitosan จะเข้าไปจับยังบริเวณที่ออกฤทธิ์ (active site) ของตัวรับในเซลล์พืช ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณในเซลล์พืช จากนั้นจะมีการขยายสัญญาณในที่สุดทำให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญของพืชชนิดนั้นๆ ออกมามากขึ้น (Zhao, 2005)

2.5.3 การคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชและประเภทของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่วนหนึ่งขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ทั้งนี้รวมถึงชนิด พันธุ์ สภาพที่มา ขนาด ตลอดจนวัตถุประสงค์และระบบของการเพาะเลี้ยง โดยทฤษฎี totipotency ที่กล่าวว่า เกือบทุกชิ้นส่วนของต้นพืชสามารถนำมาเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสหรือกลุ่มเซลล์ เพื่อเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และเกิดกระบวนการ organogenesis หรือ embryogenesis จนกระทั่งเกิดเป็นต้นใหม่ได้ ชิ้นส่วนเหล่านี้อาจจะมาจากอวัยวะต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ และดอก หรือจากเซลล์เฉพาะเช่น เอ็นโดสเปิร์ม ไข่ อับเกสร ละอองเกสรผู้

2.5.3.1 ชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง ในความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบ่งได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่

1. อวัยวะพืช ได้แก่ ปลายยอดและปลายราก เป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ เท่านั้นที่จะเป็นเนื้อเยื่อ
2. เนื้อเยื่อ ได้แก่ แคมเบียม โปรแคมเบียม เนื้อเยื่อพาเรงไคม่าและอื่น ๆ
3. กึ่งอวัยวะพืชกึ่งเนื้อเยื่อ ได้แก่ ส่วนของใบที่มีส่วนของท่อลำเลียงน้ำและอาหารที่มีเนื้อเยื่อพาเรงไคม่าร่วมอยู่ด้วย
4. เซลล์และโปรโตพลาสต์ ได้แก่ ละอองเรณู ไข่ และ เซลล์พาเรงไคม่า ที่แยกออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ โปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาเป็นโปรโตพลาสต์เดี่ยว ๆ

2.5.3.2 การเลือกชนิดของเนื้อเยื่อพืชมาทำการเพาะเลี้ยง ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงซึ่งอาจแบ่งได้ดังนั้นคือ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายสายพันธุ์ (Clonal propagation)

1.1 เลือกเนื้อที่ปกติ ตรงตามพันธุ์โดยไม่มีความแปรปรวนใด ๆ เกิดขึ้น เช่น พยายามหลีกเลี่ยงเนื้อเยื่อที่มีเนื้อเยื่อ 2 ชนิดมาอยู่ใกล้กันที่เรียกว่า ไคเมอรา (chimera) ไม่ใช้ตาที่ผ่าเหล่า (bud spot) เป็นต้น

1.2 เลือกเนื้อเยื่อโซมาติก (somatic tissue) และหลีกเลี่ยงเนื้อเยื่อสืบพันธุ์ให้มากที่สุด โดยหลักทั่วไป เซลล์พืชจะมีการแบ่งตัวได้ ก็ต่อเมื่อกลายเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic cells) ดังนั้นการเลือกเนื้อเยื่อบริเวณเนื้อเยื่อเจริญมาเพาะเลี้ยงจะมีโอกาสสำเร็จได้มากเพราะเซลล์สามารถแบ่งตัวและเจริญต่อได้ทันที

2. การเลือกเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ (tissue selection for crop improvement)

2.1 การสร้างพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว ทำได้โดยการนำเอาละอองเรณูที่อยู่ในระยะการแบ่งตัวครั้งแรกและไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.2 การสร้างพืชให้มีจำนวนโครโมโซมสามชุด (triploid) ทำได้โดยนำเอาเอนโดสเปิร์มมาเพาะเลี้ยง

2.3 การสร้างพืชให้มีความแปรปรวนเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ ทำได้โดยการเลือกเนื้อเยื่อที่มีเนื้อเยื่อ 2 ชนิดมาอยู่ใกล้กัน หรือบริเวณไคเมอรามาเพาะเลี้ยง

2.5.3.3 ประเภทของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื่องจากพืชประกอบด้วยอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งแต่ละอวัยวะก็ประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิด ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายในหลอดทดลองจึงแบ่งออกได้หลายชนิด ได้แก่

1. การเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ต้นพืชทั้งต้น คือการนำเอาเมล็ดไปเพาะในหลอดทดลองจนเป็นต้นกล้าและพืชที่สมบรูณ์ต่อไป

2. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ คือการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอไม่ว่าแก่หรืออ่อนหลังจากเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออกไปแล้ว

3. การเพาะเลี้ยงอวัยวะ คือการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะพืชที่แยกออกมา เช่น ปลายยอด ปลายราก ดอก ผล อับเรณู

4. การเพาะเลี้ยงแคลลัส คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืช

5. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่ได้มาจากแคลลัสในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา

6. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

2.6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

2.6.1 สารทุติยภูมิจากพืช

สารทุติยภูมิซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถถูกสร้างขึ้นโดยพืชได้เองตามธรรมชาติโดยอาศัยเวลานานนับเป็นปี ซึ่งส่วนใหญ่พืชที่สร้างสารทุติยภูมิจัดเป็นพืชสมุนไพรซึ่งจัดเป็นแหล่งผลิตสารเคมีจากธรรมชาติที่สำคัญในด้านเภสัชกรรม อาหาร การเกษตรกรรม ตลอดจนเครื่องสำอาง สารทุติยภูมิส่วนใหญ่ ได้แก่ สารจำพวกอัลคาลอยด์ (alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ฟีนอลิก (phenolic) สเตอรอยด์ (steroid) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoid) น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) เป็นต้น สารดังกล่าวมีสูตรโครงสร้างที่ซับซ้อนซึ่งจะส่งผลให้ขั้นตอนในการสังเคราะห์สารมีความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง ทำให้ไม่คุ้มค่าต่อการผลิต ดังนั้น แหล่งของสารทุติยภูมิจากพืชจึงยังคงมีความจำเป็นในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรค การสกัดสารจากพืชให้ได้ปริมาณที่เพียงพอกับความต้องการจำเป็นต้องใช้พืชจำนวนมหาศาลในขณะที่การเพาะปลูกพืชตามธรรมชาติต้องอาศัยพื้นที่ ระยะเวลา การบำรุงรักษา และการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม ส่งผลให้ผลผลิตจากพืชมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรและเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืชเพิ่มมากขึ้นเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดดังกล่าว ด้วยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าการเพาะปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีข้อดีเหนือกว่าการเพาะปลูกตามธรรมชาติหลายด้าน เช่น สามารถผลิตสารได้โดยไม่มีปัจจัยรบรวมจากภูมิประเทศ สภาพอากาศ และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ตลอดจนสามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดเวลา ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่มีความแตกต่างระหว่างรุ่นการผลิต นอกจากนี้ เนื้อเยื่อพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอาจจะผลิตสารใหม่ที่ไม่พบจากต้นพืชในธรรมชาติได้ (วราภรณ์ ภูตะลุน, 2557)

2.6.2 การผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถูกนำใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพร ตลอดจนการพัฒนาวิธีการเพิ่มศักยภาพในการสร้างสารจากเซลล์พืช และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในระดับอุตสาหกรรมด้วยการเพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยง เพื่อทดแทนการเพาะปลูกพืชจากธรรมชาติ ลักษณะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรที่มีการศึกษาวิจัย ได้แก่ การเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย และการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพรเริ่มจากชักนำให้ชิ้นส่วนพืชในธรรมชาติหรือต้นพืชที่ได้จากการเพาะเมล็ดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในรูปแบบเซลล์แขวนลอย หรือชักนำแคลลัสให้เกิดการพัฒนาเป็นอวัยวะพืชโดยการเปลี่ยนแปลงสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการสร้างสารทุติยภูมินั้น ต้องมีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารทุติยภูมิของเซลล์พืชร่วม

ด้วยโดยอาจจะควบคุมสารอาหาร ตลอดจนชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง หรือควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชที่เป็นปัจจัยจากภายนอก ได้แก่ ความเครียด แสง อุณหภูมิ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีการอื่นร่วมด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารทุติยภูมิ เช่น การเติมสารกระตุ้น (elicitation) การตรึงเซลล์ (immobilization) การซึมผ่าน (permeabilization) การเติมสารตั้งต้น (precursor feeding) หรือการดัดแปลงพันธุกรรม (genetic modification) (วราภรณ์ ภูตะลุน, 2557)

2.6.3 แคลลัสและการสร้างสารทุติยภูมิ

การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชในรูปแบบของแคลลัส (callus culture) นับได้ว่า เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตสารทุติยภูมิทดแทนการสร้างสารดังกล่าวจากการเพาะปลูกพืชตามธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์พืชมียีนครบถ้วนสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับต้นพืชที่ปลูกในธรรมชาติ

2.6.3.1 แคลลัส

แคลลัส หมายถึงเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) แต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอนภายในเซลล์มีแวคิลโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุแต่อาจจะมีสีเขียว เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นเรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวม ๆ เรียกว่า friable callus

ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่าง ๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วความสำเร็จสูงในพืชใบเลี้ยงคู่ได้จากส่วนของคัพภะ ใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ปลายยอด ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง และราก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากส่วนของคัภพะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอกจะให้ผลดีที่สุด เนื้อเยื่อพิเศษอื่น ๆ ของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นกันคือ แคมเบียม (cambium) คอร์เทค (cortex) ไส้หรือแกนลำต้น (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem vessels) ไซเลมพาเรนไคมา (xylem parenchyma) และเอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541)

2.6.3.2 การเปลี่ยนสภาพของแคลลัส (callus differentiation)

การเปลี่ยนสภาพของพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ คือ สารเร่งการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน นอกจากนี้อาจจะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ส่วนประกอบของธาตุอาหาร สภาพแวดล้อม เป็นต้น เมื่อต้องการให้เนื้อเยื่อหรือแคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นพืช จะต้องนำไปเพาะเลี้ยง

บนอาหารสูตรที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดยอด ราก หรือเอ็มบริออยด์ การชักนำให้เนื้อเยื่อหรือแคลลัสเปลี่ยนสภาพเป็นต้นพืชมี 2 กระบวนการดังนี้

1. การเจริญเป็นอวัยวะ (organogenesis) หมายถึงการเปลี่ยนแปลงสภาพของเนื้อเยื่อหรือแคลลัสเป็นอวัยวะ เช่น ยอดและราก ซึ่งอาจจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นรากหรือยอดอย่างใดอย่างหนึ่ง หรืออาจจะพัฒนาไปเป็นทั้งสองอย่างพร้อมกัน ถ้าเกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นยอดเพียงอย่างเดียว สามารถนำยอดไปชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารชักนำให้เกิดรากจึงจะได้ต้นพืชที่สมบรูณ์ การเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นอวัยวะนั้นขึ้นอยู่กับสารเร่งการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคนินเป็นส่วนใหญ่ โดยไซโตไคนินมีคุณสมบัติชักนำให้เกิดยอดและออกซินกระตุ้นการชักนำของราก

2. การเจริญเป็นเอ็มบริโอ (embryogenesis) หมายถึงการเจริญของเนื้อเยื่อหรือแคลลัสเป็นเอ็มบริโอโดยตรง เรียกเอ็มบริโอที่เกิดจากเซลล์ไม่เกี่ยวกับเพศว่าเอ็มบริออยด์ เซลล์จากเนื้อเยื่อหรือแคลลัสจะเจริญเป็นเอ็มบริโอในระยะแรก เรียกว่า โพรเอ็มบริโอ (proembryo) ขั้นตอนการเจริญดังกล่าวเหมือนกับการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์สืบพันธุ์โดยเริ่มจากเซลล์กำเนิดมีการเปลี่ยนสภาพจนมีรูปร่างค่อนข้างกลมเรียกโครงสร้างระยะนี้ว่า ระยะรูปกลม (globular shaped) ต่อมาจะเจริญเป็นรูปร่างคล้ายหัวใจ (heart shaped) และสุดท้ายจะมีรูปร่างคล้ายทอร์ปิโด (torpedo shaped) และจะเจริญไปเป็นเอ็มบริออยด์ต่อไป (อุดม นวพานิช, 2549)

2.6.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส (ภพเก้า พุทธรักษ์, 2556)

1.ขนาดและรูปร่างของชิ้นส่วนพืช (size and shape) ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงทั่วไปต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่เล็กจนเกินไป ซึ่งถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กมากจะไม่สามารถนำมาชักนำการเกิดแคลลัสได้

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์โดยทั่ว ๆ ไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำจะพัฒนาไปเป็นยอด และหากสัดส่วนนี้สมดุลจะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ นั้นพบว่า ออกซินจะอยู่ในช่วง 0.01 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนตินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

3. ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากจะต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่ว ๆ ไป ของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามิน แอสปาติน อาร์จินิน พิวรีน และไพริมิดิน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วยเช่นกัน

4. แหล่งคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส และแซคคาโรส ความเข้มข้นร้อยละ 2-4

5. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors) โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มแสงต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจระดับเซลล์ด้วย

6. สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาบอลิซึมปลดปล่อยออกมาจากเซลล์และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

2.6.3.4 การวัดการเจริญเติบโตของแคลลัส

การเติบโตของแคลลัสนิยมวิเคราะห์ออกมาในรูปของน้ำหนักสด (fresh weight) และน้ำหนักแห้ง การหาน้ำหนักสดทำได้ง่ายกว่าและไม่ทำลายเนื้อเยื่อ แต่น้ำหนักสดก็รวมเอาน้ำหนักของน้ำเข้าไว้ด้วย จึงไม่ใช่น้ำหนักของแคลลัสอย่างแท้จริง การวัดการเติบโตของแคลลัสนอกจากการหาน้ำหนักสดแล้วยังมีอีกหลายวิธี เช่น การหาน้ำหนักแห้ง การหาจำนวนเซลล์ การหาค่าไมโททิกอินเดกซ์ (mitotic index) ของแคลลัส และการหาอัตราการหายใจ การหาน้ำหนักแห้งทำได้โดยนำแคลลัสไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วนำมาชั่ง (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์, 2546)

2.7 อนุมูลอิสระและการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ในสิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกระบวนการการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ ซึ่งจะมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลของออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระมีความสามารถในการจับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นเพื่อทำให้ตัวเองเกิดความสมดุลสูง (Halliwell, 1999) นอกจากนี้ออกซิเจนที่ไม่สมดุลสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารประกอบหรือสารชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น โปรตีน ไขมัน เอนไซม์ ดีเอ็นเอ คาร์โบไอเดรต คอลลาเจน ผนังเซลล์ตลอดจนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคชรา(aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิต โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคผิวหนังอักเสบ โรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Ames, Shigenaga, Hagen, 1993) โดยเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นร่างกายจะมีกลไกควบคุมหรือป้องกันสารอนุมูลอิสระ เรียกว่า ระบบแอนติออกซิแดนซ์ (antioxidant defense system) ซึ่งจะมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จะทำหน้าที่ต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอนไม่ให้ไปมีผลทำลายเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็นสองกลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ร่างกายสามารถสร้างเองได้และกลุ่มที่ต้องรับจากภายนอก ซึ่งถ้าหากร่างกายมีการสะสมอนุมูลอิสระมากเกินไปจะส่งผลทำให้เกิดภาวะออกซิเดทิฟสเตรต (oxidative stress) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์

ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่และอาจจะรุนแรงจนสามารถทำให้เกิดโรคภัยต่างๆ (Margaill, Plotkine, Lerouet, 2005) การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้หลายวิธี เช่น โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography) การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารฟีนอลชนิดต่างๆ โดยการทำให้เกิดสี (colorimetric assay) การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radicalcation decolorization assay) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) และการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenyl-picryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นต้น (Phansawan, 2013) ซึ่งวิธี DPPH assay เป็นที่นิยมนำมาศึกษา เนื่องจากมีข้อดีคือ เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ให้ความถูกต้องและมีความสามารถในการทำซ้ำสูง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

<u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เร่วหอม (*Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep) R.M.Sm)
2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
    2.1 เครื่องชั่งสารแบบละเอียด ทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น RP 3100 S
    2.2 เครื่องชั่งสารแบบหยาบ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ SWISS QUALITY รุ่น Precisa 4000 C
    2.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ TOMY รุ่น SS-325
    2.4 เตาอบไมโครเวฟ ยี่ห้อ NATIONAL รุ่น DIMENSION 4
    2.5 เครื่องกวนสาร (Magnetic Stirrer รุ่น IKAMAX RCT)
    2.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) ยี่ห้อ Martini รุ่น MI151
    2.7 แท่งแก้วคนสาร
    2.8 กระบอกตวงแก้ว ขนาด 10, 20 และ 100 มิลลิลิตร
    2.9 บีกเกอร์ขนาด 10, 20, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
    2.10 ปิเปตแก้วขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
    2.11 ช้อนตักสาร
    2.12 ลูกยางสามทาง
    2.13 ขวดแก้ว ขนาด 8 ออนซ์ พร้อมฝาปิด
    2.14 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
3. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว
    3.1 ขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ พร้อมฝาปิด
    3.2 ตะแกรงสแตนเลส เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร
    3.3 ปากคีบขนาดสั้นและยาว (Forceps)
    3.4 จานแก้วเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร
    3.5 กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
    3.6 มีดผ่าตัดเบอร์ 4 และใบมีดผ่าตัดเบอร์ 21
    3.7 คลอรอกซ์ (Clorox)
4. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อ
    4.1 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ Laminar flow รุ่น UNIFLOW UVUB 1200 BIOHAZARD
    4.2 จานแก้วเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร
    4.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.4 มีดผ่าตัดเบอร์ 4 และใบมีดผ่าตัดเบอร์ 21

4.5 กระดาษกราฟ

4.6 สำลี

4.7 ขวดสำหรับใส่แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

5. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

5.1 อาหารสูตร Murashige and Skoog (Murashige Skoog, 1962) (ภาคผนวก ก)

5.2 น้ำตาลทราย

5.3 ผงวุ้น (Agar) บริษัท MERCK

5.4 น้ำกลั่น

6. สารเคมีที่ใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

6.1 KOH 1 N

6.2 HCl 1 N

7. สารควบคุมการเจริญเติบโต

7.1 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

7.2 Benzyladenine (BA)

7.3 Thidiazuron (TDZ)

7.4 Methyl jasmonate (MeJA)

7.5 Salicylic acid (SA)

7.6 Chitosan

8. สารสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

8.1 Folin-Ciocalteu

8.2 Methanol 80 เปอร์เซ็นต์

8.3 Sodium Carbonate 10 เปอร์เซ็นต์

8.4 Gallic acid

8.5 Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์

8.6 Aluminium chloride 10 เปอร์เซ็นต์

8.7 Potassium acetate 1 M

8.9 Quercetin

8.10 2,2-diphenyl-1-picrylhdrazyl (DPPH)

8.11 Ascorbic acid

วิธีการวิจัย

1. การฟอกฆ่าเชื้อจากตัวอย่างพืช (สุลักษณ์ แจ่มจำรัส และคณะ, 2553)

1.1 นำเหง้าเร่วหอมจาก อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ยาวประมาณ 5-6 นิ้ว มาล้างให้สะอาด ลอกกาบใบชั้นนอกออกประมาณ 2-3 ชั้น

1.2 จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม tween 20 จำนวน 2-3 หยด แช่เป็นเวลา 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ

1.3 จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ผ่านการแช่สารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

2. การชักนำให้เกิดแคลลัส ยอดและรากบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid, Benzyladenine และ Thidiazuron ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

2.1 วางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยมีปัจจัยศึกษา คือ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ Benzyladenine (BA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งการทดลองออกเป็น 8 ชุด ในแต่ละชุดการทดลองมี 12 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน ต่อ 1 ขวด โดยมีทั้งหมด 8 ชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 สูตรอาหาร MS (ชุดควบคุม)
ชุดการทดลองที่ 2 สูตรอาหาร MS + 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 3 สูตรอาหาร MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 3 สูตรอาหาร MS + 2, 4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 4 สูตรอาหาร MS + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 5 สูตรอาหาร MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 6 สูตรอาหาร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 7 สูตรอาหาร MS + TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 8 สูตรอาหาร MS + TDZ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 นำหน่อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของเร่วหอม มาเพาะเลี้ยงบนสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ตามชุด

การทดลองข้อ 2.1.1 โดยนำมาเพาะเลี้ยงในหองที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข
มแสงประมาณ 1600 µmol m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 1-2 เดือน

2.2.2 เมื่อครบเวลา 1-2 เดือนแล้วนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้น หากมีแคลลัสเกิดขึ้น วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส สีของแคลลัส และน้ำหนักสดของแคลลัส

3. การศึกษาสารกระตุ้นที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดและปริมาณสารทุติยภูมิ

3.1 การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยมีปัจจัยศึกษาคือสารกระตุ้น ได้แก่ เมทิลจัสโมเนต (Methyl jasmonate, MeJA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid, SA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคโตซาน (Chitosan) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 20, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งการทดลองออกเป็น 10 ชุด การทดลอง ๆ ละ 12 ซ้ำ ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน ต่อ 1 ขวด โดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 สูตรอาหาร MS (ชุดควบคุม)
ชุดการทดลองที่ 2 สูตรอาหาร MS + MeJA 100 ไมโครโมลาร์
ชุดการทดลองที่ 3 สูตรอาหาร MS + MeJA 200 ไมโครโมลาร์
ชุดการทดลองที่ 3 สูตรอาหาร MS + SA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 4 สูตรอาหาร MS + SA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 5 สูตรอาหาร MS + SA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 6 สูตรอาหาร MS + SA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 7 สูตรอาหาร MS + SA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 8 สูตรอาหาร MS + Chitosan 20 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 9 สูตรอาหาร MS + Chitosan 60 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดการทดลองที่ 10 สูตรอาหาร MS + Chitosan 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 นำแคลลัสและยอดที่ได้ ย้ายลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้ในข้อ 2 ร่วมกับการใช้สารกระตุ้น กรดเมทิลจัสโมเนต ไคโตซาน และกรดซาลิไซลิก เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ ในหองที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเขมแสงประมาณ 1600 µmol m^{-2} s^{-1}

3.2.2 บันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด ที่เกิดขึ้น หากมีแคลลัสเกิดขึ้น วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส สีของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และน้ำหนักสดของแคลลัส

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงมาจาก Slinkard Singleton, 1977) มีขั้นตอนดังนี้

4.1 เตรียมสารละลายเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 ลิตร สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลายกรดแกลลิก ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และสารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1, 0.05, 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.2 สกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบระเหิด (freeze dryer) มาบดเป็นผงละเอียด 0.05 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว ปิเปตสารละลายเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำตัวอย่างที่ได้มากรองบนกระดาษกรอง

4.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง (ทำ 3 ซ้ำ) ปิเปตสารสกัดจากแคลลัสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดและปิเปตโฟลินซิโอแคลทู รีเอเจนต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เทกซ์ จากนั้นจับเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (10 เปอร์เซ็นต์ Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดตัวอย่างแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เทกซ์ วางหลอดทดลองตัวอย่างในตะแกรงวางหลอด ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

4.4 เมื่อครบเวลา 30 นาที นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ใช้สารละลายเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นสารควบคุมแทนตัวอย่างสารสกัด

4.5 ใช้สารละลายกรดแกลลิกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน คือ 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานใช้ในการคำนวณปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดในรูปของ GAE (Gallic acid equivalent)

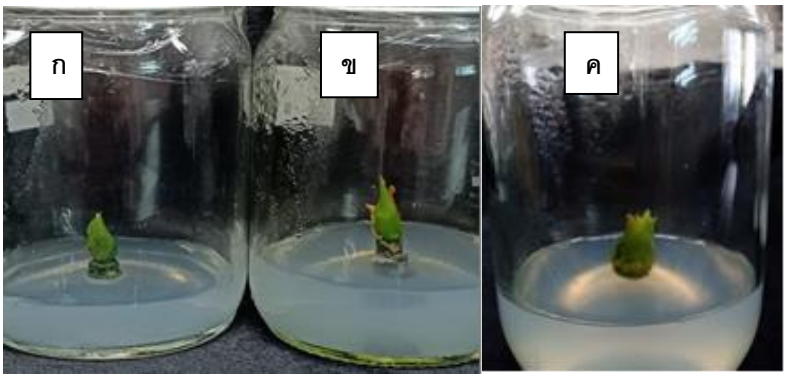
5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of Variance; ANOVA) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดการทดลองแต่ละชุด ด้วยวิธี Tukey’ s studentized range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Minitab version 17 ที่ระดับนัยสำคัญ p-value 0.05

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดของเร่วหอมในสภาพหลอดทดลอง

จากการชักนำให้เกิดยอด โดยการนำชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่มีตาข้างของเร่วหอมติดอยู่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ Benzyladenine (BA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนหน่ออ่อนของเร่วหอม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างยอดเกิดขึ้นแต่ยอดที่ได้มีลักษณะยืดยาว แต่จะเห็นได้ว่ายอดที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะอวบอ้วนสมบูรณ์ดี ส่วนยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดที่เกิดขึ้น มีลักษณะยืดยาวกว่า (ภาพที่ 4-1) ส่วนสูตรอาหารอื่นๆ ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ซึ่งจากลักษณะของยอดที่เพาะ เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดที่ได้มีความสมบูรณ์แข็งแรงดีและมีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยต่อของโคนหน่อติดกับผิววุ้นของอาหาร (ภาพที่ 4-1 ค) จึงมีการนำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรนี้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกต่อไป



ภาพที่ 4-1 ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

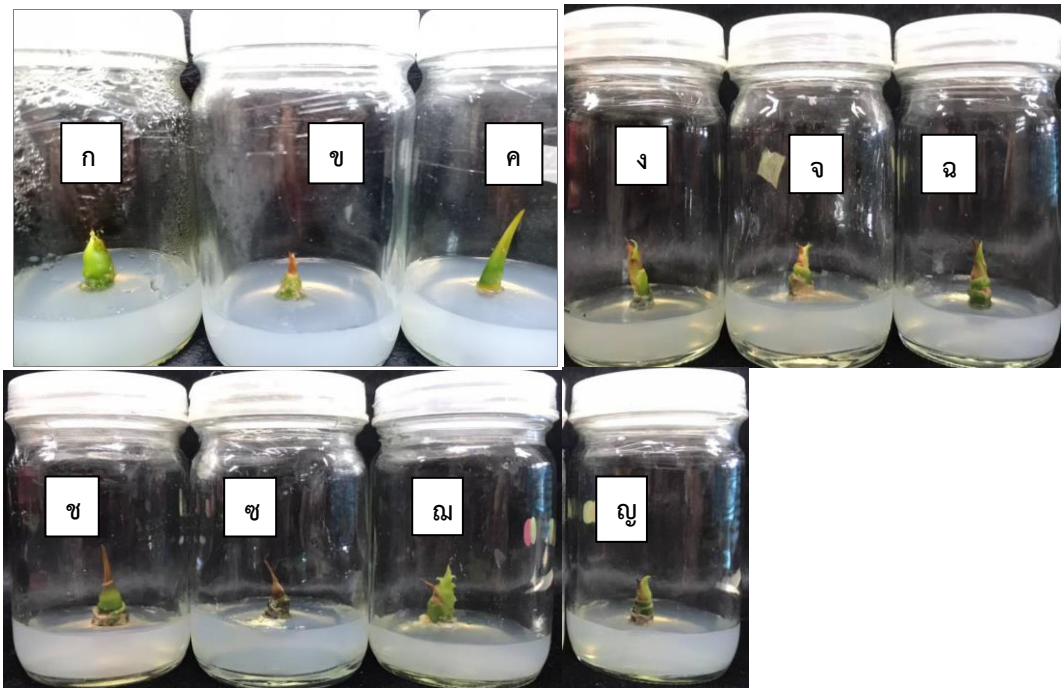
ก) สูตร MS + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) สูตร MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 ผลของสารกระตุ้นที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอดของเร่วหอมในสภาพหลอดทดลอง

จากการนำชิ้นส่วนหน่ออ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารกระตุ้น ได้แก่ เมทิลจัสโมเนต (Methyl jasmonate, MeJA) ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid, SA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคโตซาน (Chitosan) ที่ระดับความเข้มข้น 20, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในทุกสูตรอาหารที่นำมาเพาะเลี้ยง หน่ออ่อนที่เพาะเลี้ยงสามารถเจริญเติบโตได้ดี แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ แต่จะเห็นได้ว่าในบางชุดการทดลอง (ชุดควบคุม : อาหารสูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยต่อของโคนหน่อติดกับผิววุ้นของอาหาร แต่เมื่อนำแคลลัสส่วนนี้ไปชักนำให้สร้างแคลลัส ปรากฏว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและเพิ่มปริมาณได้ แต่ในภาพรวมจะเห็นได้ว่า อาหารทุกสูตรที่เติมสารกระตุ้น หน่ออ่อนเจริญดี มีความสมบูรณ์แข็งแรง ซึ่งจะนำยอดที่ได้นี้ไปวิเคราะห์หาสารสกัดต่อไป



ภาพที่ 4-2 ลักษณะยอดและแคลลัสที่เกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ก) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เมทิลจัสโมเนต 100 μM

ค) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เมทิลจัสโมเนต 200 μM

ง) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + กรดซาลิไซลิก 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + กรดซาลิไซลิก 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + กรดซาลิไซลิก 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร
ช) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + ไคโตซาน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร
ซ) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + ไคโตซาน 40 มิลลิกรัมต่อลิตร
ฌ) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + ไคโตซาน 60 มิลลิกรัมต่อลิตร
ญ) สูตร MS + TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + ไคโตซาน 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3 ผลของสารกระตุ้นที่มีต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดทั้งหมดในยอดอ่อนของเร่วหอมในสภาพหลอดทดลอง

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่ายอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม เมทิลจัสโมเนต 200 μM มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในยอดอ่อนมากที่สุดเท่ากับ 3.058±0.048 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในยอดอ่อนของเร่วหอมที่เพาะเลี้ยงในสภาพหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นชนิดต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชุดทดลอง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
Control	0.235±0.044^{def}
SA 0.2	1.142±0.080^{c}
SA 0.4	0.500±0.005^{d}
SA 0.6	0.455±0.030^{de}
SA 0.8	0.215±0.043^{def}
SA 1.0	0.080±0.023^{f}
MJ 100	2.078±0.091^{b}
MJ 200	3.058±0.048^{a}
Chitosan 0	0.168±0.055^{ef}
Chitosan 20	1.802±0.204^{b}
Chitosan 60	1.210±0.252^{c}
Chitosan 80	0.225±0.055^{def}

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

อภิปรายผลการวิจัย

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดของเร่วหอมในสภาพหลอดทดลอง

จากการชักนำให้เกิดยอด โดยการนำชิ้นส่วนหน่ออ่อนและตาข้างของเร่วหอมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตรมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ Benzyladenine (BA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนหน่ออ่อนของเร่วหอม มีการสร้างยอดเกิดขึ้น บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างยอดเกิดขึ้น แต่จะเห็นได้ว่า ยอดที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะอวบอ้วนสมบูรณ์ดี ส่วนยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดที่เกิดขึ้น มีลักษณะยืดยาว (ภาพที่ 4-1) ส่วนสูตรอาหารอื่นๆ ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ซึ่งจากลักษณะของยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำ ทำให้ยอดที่ได้มีความสมบูรณ์แข็งแรงดี ซึ่งจะเห็นได้ว่า TDZ หรือ Thidiazuron เป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยออกฤทธิ์คล้าย cytokinin และมีผลต่อการเจริญและพัฒนาการต่างๆของพืชในความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับ cytokinin ตัวอื่นๆ TDZ สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เกิดเป็นตาดอก แคลลัส และโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) ขึ้นกับความเข้มข้นชิ้นส่วนพืช และชนิดของพืช การใช้ TDZ ที่มีประสิทธิภาพควรใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ถ้าสูงเกินไปจะทำให้ความแข็งแรงของยอด ร้อยละการเกิดราก และพัฒนาการที่เป็นปกติของ somatic embryo ลดลง ซึ่งการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในพืชมักเป็นอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน โดยเฉพาะ BA และ Kn แต่ TDZ ก็เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้เช่นกัน (วราภรณ์ อำพันกาญจน์, 2009)

สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น จะเห็นได้ว่า ในชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยต่อของโคนหน่อติดกับผิววุ้นของอาหาร แต่เมื่อนำไปชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้นี้ ไปเพาะเลี้ยงต่อ ปรากฏว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสหรือเพิ่มปริมาณแคลลัสมากกว่านี้ได้ อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนของแคลลัสเริ่มต้นที่มีปริมาณน้อยเกินไป อีกทั้งเมื่อเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่งเกิดการปนเปื้อน จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ ซึ่งหากแคลลัสที่ได้มีปริมาณมากพอ คาดว่าจะสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มากได้ต่อไป แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสเป็นกลุ่มของเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเป็นกลุ่มก้อนโดยไม่มีการกำหนดพัฒนา เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม แคลลัสนั้นอาจมีการพัฒนาไปเป็นยอดหรือเป็น somatic embryo ได้ ขึ้นกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้และชนิดของพืช การชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดเป็นแคลลัสนั้น เป็นผลจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน

โดยเฉพาะ NAA และ 2,4-D ส่วน TDZ แม้จะไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน แต่ก็สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน ดังที่พบได้ในการทดลองครั้งนี้ โดยทั่วไปหากใช้ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่ำ จะได้แคลลัสที่แน่น (compact callus) และมีสีเขียว ซึ่ง TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างกว้างขวาง สามารถชักนำให้เกิดยอด แคลลัสโซมาติกเอมบริโอ หรือแม้กระทั่งการชักนำให้ออกดอกในสภาพหลอดทดลอง โดยจะเห็นได้ว่า การใช้ TDZ เพียงอย่างเดียวที่ระดับความเข้มข้นต่ำคือ 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดพัฒนาเป็นยอดอ่อนได้ดี เช่น การเพาะเลี้ยงต้นชะเอมเทศ, ชิงเฮา (Artemisia annua), พรมมิ (Bacopa monnieri), คนทีเมา (Vitex negundo) และอิชินาเซีย (Echinacea purpurea) (Wongwicha et.al., 2008 ; Lualon et. al., 2008 ; Kamonwannasit et.al., 2008 ; Nisha Rani and Nair, 2006 ; Jones et. al., 2007) ซึ่งจะเห็นได้ว่าในพืชส่วนใหญ่ TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ทั้งในด้านปริมาณสารที่ใช้และผลลัพธ์ที่ได้ แต่ข้อเสียที่สำคัญของ TDZ คือ มีราคาแพงกว่า cytokinin ที่นิยมใช้กันทั่วไปโดยเฉพาะ BA ที่มีราคาถูกกว่า อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในแต่ละชนิดยังต้องมีการศึกษาวิจัยกันต่อไป เพราะพืชต่างชนิดกัน ต่างสกุลกัน อาจมีการตอบสนองต่อ TDZ ที่แตกต่างกันออกไป

ผลของสารกระตุ้นที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเร่วหอมในสภาพหลอดทดลอง

จากการนำชิ้นส่วนหน่ออ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารกระตุ้น ได้แก่ เมทิลจัสโมเนต (Methyl jasmonate, MeJA) ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid, SA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคโตซาน (Chitosan) ที่ระดับความเข้มข้น 20, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในทุกสูตรอาหารที่นำมาเพาะเลี้ยง หน่ออ่อนที่เพาะเลี้ยงสามารถเจริญเติบโตได้ดี หน่ออ่อนเจริญกลายเป็นยอด มีความสมบูรณ์แข็งแรง ซึ่งไม่ว่าจะเป็นการเติมเมทิลจัสโมเนต กรดซาลิไซลิคและไคโตซาน ยอดที่ได้เจริญสมบูรณ์ดี ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการสร้างสารทุติยภูมิให้มากขึ้นนั้น ต้องมีการควบคุมสารอาหาร ตลอดจนชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง หรือควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชให้เหมาะสม รวมถึงการใช้วิธีการอื่นร่วมด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสารทุติยภูมิ เช่น การเติมสารกระตุ้นหรือสารเหนี่ยวนำ (elicitors) จะช่วยให้พืชที่เพาะเลี้ยงมีการสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นในพืช (วราภรณ์ ภูตะลุน, 2557) ซึ่งสารเหนี่ยวนำที่เติมลงไปจะไปมีผลชักนำหรือกระตุ้นให้เซลล์พืชสร้างสารทุติยภูมิ การใส่สารเหนี่ยวนำให้พืชหรือเซลล์เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่มีผลไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์และสะสมสารที่ออกฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรียเช่น สารในกลุ่มไฟโตอเลกซิน (phytoalexins) ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทในการต่อต้านเชื้อโรค

ต่างๆ ที่บุกรกพืช สารเหล่านี้จะไม่มีการสังเคราะห์หรือสังเคราะห์ในปริมาณต่ำในเซลล์พืชหรือเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมสารเหนี่ยวนำ (ดวงพร เปรมจิต, 2552) จากการศึกษาของ Srisook และ Srisook (2011) พบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ โดยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 ในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมนี้มีกลไกแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ได้โดยลดการกระตุ้น NF-**k**B ซึ่งเป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ต่อมามีการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate, p-anisic acid, p-hydroxy benzaldehyde, 4-methoxycinnamyl alcohol, p-coumaric acid, trans-4-methoxycinnamaldehyde, สาร (E)-methyl isoeugenol, trans-anethole และ p-anisaldehyde และพบว่าสาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate ซึ่งเป็นสารที่มีการพบเป็นครั้งแรกในเหง้าเร่วหอม มีฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และสารนี้ยังลดปริมาณ mRNA และโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555; Srisook et al., 2017; Mankhong et al., 2017) นอกจากนี้ในส่วนสกัดจากเร่วหอมและสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ยังแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ โดยการลดการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม adhesion molecule คือ intercellular adhesion molecular-1 (ICAM-1) และ vascular cell adhesion molecular-1 (VCAM-1) ทั้งยังลดการผลิตใน reactive oxygen species ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ และมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela (Srisook et al., 2017; Mankhong et al., 2017, Lawsipo et. al., 2017)

ในการทดลองครั้งนี้ได้นำสารกระตุ้น 3 ชนิดมาใช้คือ Methy jasmonate, Salicylic acid และ Chitosan โดยจะเห็นว่า Methy jasmonate หรือ Jasmonic acid เป็นสารกระตุ้นที่มีการนำมาใช้ในอย่างแพร่หลายในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาร Methy jasmonate และ jasmonic acid เป็นน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นมะลิก้านแดง (Jasminum grandiflorum) ต่อมามีการศึกษาพบว่า สารชนิดนี้มีการกระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์พืช โดย methy jasmonate และ jasmonic acid เป็นตัวควบคุมที่สำคัญในระดับเซลล์และเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของพืชหลายอย่าง เช่น การเจริญของเมล็ด การเจริญของราก การสุกของผล และการแก่ของพืช อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิในพืชอีกด้วย ดังนั้นการใช้สาร methy jasmonate และ jasmonic acid เป็นสารกระตุ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงสามารถส่งผลให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นได้ (Cheong and Choi, 2003) ส่วน Salicylic acid เป็นสารกระตุ้นอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยทั่วไป salicylic acid จะพบได้ในเซลล์พืช มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช salicylic acid จะเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signal

transduction) การตอบสนองของพืชในระดับเซลล์ เพื่อป้องกันตัวเองจากการถูกบุกรุกโดยจุลชีพ (defense mechanism) เมื่อระดับของ salicylic acid ในเซลล์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จะมีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ทำให้เกิดการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าวสารทุติยภูมิและเกิดการสร้างสารเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเติม salicylic acid จากภายนอกลงไป จึงส่งผลให้เกิดการตอบสนองของเซลล์พืชคล้ายกับกลไกในการป้องกันตัวเองจากถูกบุกรุกโดยจุลชีพ (Zhao et. al., 2005) อีกชนิดหนึ่งคือ Chitosan จัดเป็นสารกระตุ้นในกลุ่มที่ได้จากสิ่งมีชีวิต สกัดได้จากเปลือกของสัตว์จำพวกหอย กุ้ง ปู การทำงานของ Chitosan เกิดจากเซลล์พืชมีตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะกับสารกระตุ้นชนิดนี้ ดังนั้นเมื่อให้ chitosan แก่เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง chitosan จะเข้าไปจับยังบริเวณที่ออกฤทธิ์ (active site) ของตัวรับในเซลล์พืช ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณในเซลล์พืช จากนั้นจะมีการขยายสัญญาณในที่สุดทำให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญของพืชชนิดนั้นๆ ออกมามากขึ้น (Zhao et. al., 2005) จากการทดลองในครั้งนี้ จะเห็นได้ว่า จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า ยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม เมทิลจัสโมเนต 200 µM มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในยอดอ่อนมากที่สุดเท่ากับ 3.058±0.048 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคตอกรัมสารสกัด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wee et.al. (2015) ที่ได้ศึกษาผลของสารกระตุ้นที่มีต่อการผลิตทุติยภูมิและคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการเพาะเลี้ยงผักหวานบ้าน (Sauropus androgynous) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง จากการทดลองพบว่าปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งปริมาณของสารจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารกระตุ้นและระยะเวลาที่ได้สัมผัสกับสารกระตุ้น โดยแคลลัสของผักหวานบ้านที่เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสงร่วมกับการเติม methyl malmonate (MJ) ความเข้มข้น 200 µM หลังการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุดคือ 2.10 เท่า (192.91 µg / g FW) และ 1.53 เท่า (370.44 µg / g FW) มากกว่าการปลูกในแปลง และการเติม MJ (50, 100 µM) หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ กระตุ้นให้เกิดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (DPPH, FRAP) ที่ 1.31 เท่า (70.95%) และ 1.19 เท่า (708.82 µg / g FW) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า Salicylic acid (SA) มีผลไปชักนำให้ต้นอ่อนของผักหวานบ้านมีประสิทธิภาพในการผลิต naringin , TBHQ และ kaempferol เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1.จากการชักนำให้เกิดยอด โดยการนำชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่มีตาข้างของเร่วหอมติดอยู่ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนหน่ออ่อนของเร่วหอมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดเกิดขึ้นและยอดที่ได เมีลักษณะยืดยาว แต่จะเห็นได้ว่ายอดที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะอวบอ้วนสมบูรณ์ดี ซึ่งจะเห็นได้ว่า อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนของเร่วหอม ในการชักนำให้ได้ยอดที่มีการเจริญดี

2. จากการนำชิ้นส่วนหน่ออ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารกระตุ้น ได้แก่ MeJA ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ SA ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Chitosan ความเข้มข้น 20, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในทุกสูตรอาหารที่นำมาเพาะเลี้ยง หน่ออ่อนที่เพาะเลี้ยงสามารถเจริญเติบโตได้ดี แต่ไม่สามารถชักนำให้มีการเพิ่มปริมาณยอดจากเดิมได้

3. จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่ายอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม เมทิลจัสโมเนต 200 µM มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในยอดอ่อนมากที่สุดเท่ากับ 3.058±0.048 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคตอกรัมสารสกัด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส ควรมีการเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโตในหลายๆ กลุ่ม โดยการเติมเดี่ยวและการเติมร่วม เพื่อเปรียบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในเร่วหอม

2. ควรมีการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากเร่วหอม ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากสถานการณ์โรคระบาดของไวรัสโคโรนา (COVID-19) ในช่วงแรกระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนเมษายน พ.ศ.2563 ทำให้ไม่สามารถสั่งซื้อสารเคมีต่างๆ ในการฟอกฆ่าเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบเหล่านี้ได้ รวมถึงการปิดสำนักงานและหน่วยงานราชการในหลายแห่งของมหาวิทยาลัยบูรพา ทำให้ไม่สมารถเข้ามาปฏิบัติงานหรือทำการวิจัยได้ ต่อมามีการระบาดระลอกใหม่ของไวรัสโคโรนาระหว่างเดือนธันวาคม 2563 ถึงมกราคม 2564 ทำให้การวิเคราะห์สารสกัดล่าช้าออกไปอีก เนื่องจากคำสั่งปิด

สถานที่ศึกษาและให้ปฏิบัติงานที่บ้าน (Work from Home) ทำให้การทดลองต้องหยุดชะงักอีกครั้ง รวมถึงขาดแรงงานผู้ช่วยวิจัยที่ต้องช่วยในการวิเคราะห์สารสกัดและการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง ผู้วิจัยจึงพยายามทำการทดลองให้เต็มกำลังความสามารถที่มี เพื่อให้ได้ผลการทดลองออกมาได้ดีที่สุด ซึ่งหากมีระยะเวลาวิจัยที่มากกว่านี้ เชื่อว่าจะได้นำไปต่อยอดและศึกษาเพิ่มเติมให้มากขึ้น

3. ควรมีการศึกษาขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อและวิธีการเพาะเลี้ยงให้ปลอดการปนเปื้อนในหน่ออ่อนของเร่วหอม เนื่องจากปัญหาอุปสรรคสำคัญของการเพาะเลี้ยงเร่วหอมคือ การปนเปื้อน เนื่องจากเป็นหัวหรือลำต้นสะสมอาหารใต้ดินแบบไรโซม (rhizome) ซึ่งเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จะทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากมีเชื้อจุลินทรีย์ในดินติดมาด้วย หากมีการศึกษาถึงขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ จะช่วยย่นระยะเวลาการวิจัยและสามารถชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดเชื้อ

ผลผลิต

1. ผลงานตีพิมพ์ “ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารกระตุ้นที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากเร่วหอมที่เพาะเลี้ยงในสภาพหลอดทดลอง” (อยู่ระหว่างการดำเนินการ)

2. ผลงานเชิงสาธารณะ

2.1 รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ จัดส่งให้แก่ โครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ตำบลตกพรม อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรีเพื่อเป็นแนวทางในการเพาะขยายพันธุ์เร่วหอมและถ่ายทอดความรู้ให้กับเกษตรกร เยาวชนผู้สนใจ และประชาชนในพื้นที่ต่อไป

2.2 ผลิตบัณฑิต : ระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) 2 คน คือ นางสาวจรรยาพร จ่าพันธ์ และนางสาวรัมภ์รดา ตันติราพันธ์

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย - สัญญาเลขที่ 13.2/2562

โครงการวิจัยประเภท งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารกระตุ้นที่มีต่อปริมาณสาร 4-methoxycinnamyl p-courmarate ในสารสกัดจากแคลลัสเร่วหอมที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง
Effect of Plant Growth Regulators and Elicitors on 4-methoxycinnamyl p-courmarate Content of Extracts from Etlingera pavieana (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Callus Cultured *in vitro*

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ดร. ศิรศาธิญากร บรรหาร

รายงานในช่วงตั้งแต่ วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2561 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2562

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 215,650 บาท เมื่อวันที่ 7 มกราคม พ.ศ. 2562

งวดที่ 2 (40%) 172,520 บาท เมื่อวันที่ 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2562

งวดที่ 3 (10%) 43,130 บาท เมื่อ .....

รวม 431,300 บาท

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ
1. ค่าตอบแทน	50,400	50,400	0
2. ค่าใช้สอย	40,000	40,000	0
3. ค่าวัสดุ	297,770	297,770	0
4. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
5. ค่าธรรมเนียมอุดหนุนมหาวิทยาลัยและส่วนงาน	43,130	43,430	0
รวม	431,300	431,300	0

(.....)

นางสาวศิรศาธิญากร บรรหาร

หัวหน้าโครงการวิจัย

บรรณานุกรม

ดวงพร เปรมจิต. (2552). การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ปฐม โสมวงศ์. (2552). *คุณค่าทางอาหารและทางยาของสมุนไพร.* วันที่สืบค้นข้อมูล 10 ธันวาคม 2553, เข้าถึงได้จาก http://www.osotsala-chula.com/ /information/research/ document/

ผาณตา วาณิชวัฒนเดชา, เอกรัฐ ศรีสุขและมธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. (2560). การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

พงษ์ศักดิ์ พลเสนา. (2550). บันทึกธรรมชาติหลากเผ่าพันธุ์. *หมายเหตุนิเวศวิทยา*, 1(4) : 25-26.

พันธิตรา กมล ปวีร์รฐา วรดิลกพิพัฒน์ คงศักดิ์ พร้อมเทพ และ ปรียานันท์ แสนโภชน์. (2555). ผลของไซโตไคนินต่อการเพิ่มจานวนยอดของ *Zingiber mekongense* Gagnep. ในหลอดทดลอง. *ในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ Phayao research conference*. หน้า 2-5.

เร่วหอม. (2560). วิทยาศาสตร์สำหรับเยาวชน : เร่วหอม. วันที่สืบค้นข้อมูล 3 ตุลาคม 2560. เข้าถึงได้จาก http://www.xn--o3caeunjf6cwh0d2ac3e.com/article-125.

วราภรณ์ ภูตะลุน. (2557). เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร. บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา, ขอนแก่น.

วารสารเคหเกษตร. เร่วหอม: สมุนไพรที่ขยายพันธุ์ ปลูก และแปรรูปไม่ยาก. วันที่สืบค้นข้อมูล 26 กันยายน 2560. เข้าถึงได้จาก http://www.kehakaset.com/ index.php?option=com_content&view=article&id=222:2011-04-11-02-29-41&catid=38.

วัชรพงษ์ ทสะสังคินทร์. (2556). องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเหง้าเร่วหอมและเมล็ดกระวาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศุภวรรณ บุญระเทพ. (2549). การผลิตสารทุติยภูมิโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเทคโนโลยีชีวภาพ. *วารสารวิจัยทางการแพทย์*. 20(2), 185-195.

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2560). เร่วหอม สรรพคุณและประโยชน์ของเร่วหอม 14 ข้อ. วันที่สืบค้นข้อมูล 4 ตุลาคม 2560. เข้าถึงได้จาก http : //medthi.com/เร่วหอม/

สุพัตรา สระธรรม และกอบเกียรติ แสงนิล. (2547) . การเกิดแคลลัสของลำต้นกระเจียงเบอร์ 50 ในสภาพปลอดเชื้อ. *Sonklanakarin J.Sci. Technol*. 27(3) : 487-498.

สุรัตน์วดี จิวะจินดา, มณฑา วงศ์มณีโรจน์และณัฐวัฒน์ คลังทรัพย์. (2553) . การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชในสกุลเร่ว. วันที่สืบค้นข้อมูล 5 ตุลาคม 2560. เข้าถึงได้จาก www.rdi.ku.ac.th/kasetsartreserch52/04-plant/Suratwadee/plant_00.html.

สุลักษณ์ แจ่มจำรัส, ,มณฑา วงศ์มณีโรจน์, รงรอง หอมนวล, ณัฐวัฒน์ คลังทรัพย์และสุรัตน์วดี จิวะจินดา. (2553). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเร่วหอม. ใน *รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน* ครั้งที่ 7 (หน้า 1689-1695). จังหวัดนครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน.

สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน. (2542). สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน. ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 3. หน้า 150-152.

หทัยรัตน์ เลขสุข, พรทิพย์ จรรยา, มลิวรรณ์ เมืองมูล, วิไลลักษณ์ สาระพิน และอนุพันธ์ กงบังเกิด. (2555). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของต้นอ่อนส้มในหลอดทดลอง. *Phayao Research Conference*.

อนุพันธ์ กงบังเกิด และพันธิตรา กมล. (2549). ผลของไซโตไคนินต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกระเจียวขาว. *NU Science Journal*. 2(2) :183-201.

เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2554). การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

Agrawal, V. and Sardar, P.R. (2006). In vitro propagation of Cassia angustifolia through leaflet and cotyledon derived calli. *Biol. Plantarum*, 50 : 118-122.

Cheong, J.J. and Choi, Y.D. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet*. 19(1), 409-413.

Genady, E.A., Ebtesam, A., Q. and Ashraf H.F. (2016). Copper sulphate nanoparticles *in vitro* applications on Verbena bipinnatifida Nutt. Stimulating growth and phenolic content increasments. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Science*, 5(1) : 196-202.

Govindaraju, S. and Indra Aruselvi, P. (2016). Effect of cytokinin combined elicitors (L-phenylalanine, salicylic acid, chitosan) on *in vitro* propagation, secondary metabolites and molecular characterization of medical herb-*Coleus aromaticus* Benth (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricutural Sciences*, 11: 1-9.

Jones, M.P.A., Yi, Z., Murch, S.J. and Saxena, P.K. (2007). Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L. : micropropagation in solid and liquid systems. *Plant Cell Rep*, 26 : 13-19.

Kamonwannasit, S., Phrompittayarat, W., Ingkaninan, K., Tanaka, H. and Putalun, W. (2008). Improvement of pseudojujubogenin glycosides production from regenerated *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. And enhanced yield by elicitors. *Z Naturforsch* C, 68 : 879-883.

Lee, A., Cho, K., Jang, S., Rakwal, R., Iwahashi, H., Agrawal, G.K., Shim, J.and Han, O. (2004). Inverse correlation between jasmonic acid and salicylic acid during early wound response in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 318, 734-738.

Lualon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H., Shoyama, Y., and Putalun, W. (2008). Artemisinin production by shoot regeneration of Artemisia annua L. using thidiazuron. *Z Naturforsch* C, 63 : 96-100.

Mankhong, S., Srisook, E., Srisook, K. (2017). Anti-inflammatory activity of 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes in lipopolysaccharide-induced macrophages. NU. International Journal of Science. 14(*2*), 58-66.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.

Nisha Rani, D. and Nair, G.M. (2006). Effect of plant regulators on high frequency shoot multiplication and callus regeneration of an important Indain medicinal plant, nirgundi (*Vitex negundo* L.). *In Vitro Cell Dev*, 42 : 69-73.

Rahimi, S., Devi, B.S.R., Khorolragchaa, Y.J., Jung, S.K., and Yang, D.C. (2014). Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(6) : 811-817.

Sha Valli Khan, P.S. (2002). Callus induction and plant regeneration on *Phyllanthus emblica* L. *Plant Cell Botechnol Mol.Biol*. 6 : 155-158.

Soniya, E.V., and Sujitha, M. (2006). An efficient in vitro propagation of Aristolochia indica. *Biol*. *Plantarum*, 50 : 272-274.

Srisook, K., Srisook, E. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).

Srisook, E., Palachot, M., Mankhong, S., Srisook, K. (2017). Anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacognosy Magazine*, 13, 50, s230-235.

Wee, S.L., Yap, W.S.P., Alderson, P.G. and Khoo, T.J. (2015). Effects of elicitors on *in vitro* cultures of *Sauropus androgynous* (sweet shoot) for sustainable metabolite production and antioxidant capacity improvement. *Acta Hortic*. 10 : 1076-1085.

Wongwicha, W, Tanaka H, Shoyama Y., Tuvshinytogtokh, I. and Putalun, W. (2008). Production of glycyrrhizin in licorice callus cultures. *Z. Naturforsch*, 63 : 413-417.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารสูตรดัดแปลง MS

1. การเตรียม Stock solution (อารยา บุตดี, 2555)

Stock solution I: Macronutrient, 100X	(กรัม/500 มิลลิลิตร)
$Cacl_2.2H_2O$	22
Stock solution II: Macronutrient, 1,000X	(กรัม/100 มิลลิลิตร)
$MnSO_4.4H_2O$	2.23
$ZnSo_4.7H_2O$	0.86
H_3BO3	0.62
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025
$CuSo_4.4H_2O$	0.0025
$CoCl_2.6H_2O$	0.0025
Stock solution III: Macronutrient, 1,000X	(กรัม/100 มิลลิลิตร)
Kl	0.083
Stock solution IV: Vitamins, 1,000X	(กรัม/100 มิลลิลิตร)
Glycine	0.2
Nicotinic acid	0.05
Pytidoxine-HCl	0.05
Thiamin-HCl	0.01
Myo-inositol	10.00
Stock solution V: Iron/EDTA	(กรัม/100 มิลลิลิตร)
$FeSo_4.4H_2O$	0.557
$Na_2EDTA.2H_2O$	0.745

การเตรียม Stock V ชั่ง $FeSo_4$ และ $Na_2EDTA2H_2O$ แยกกัน แล้วจึงละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนประมาณ 60 องศาเซลเซียส จนละลายดีแล้วจึงเทรวมกัน Stock solution ทุกขวดต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมอาหารสูตร MS (อารยา บุตดี, 2555)

2.1 ชั่งสารเคมีดังรายการต่อไปนี้

Potassium nitrate; KNO_3	1.90 กรัม
Ammonium nitrate; NH_4NO_3	1.65 กรัม
Magnesium sulfate; $MgSO_4 . 2H_2O$	0.37 กรัม
Potassium phosphate; KH_2PO_4	0.17 กรัม

ละลายสารแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 20 มิลลิลิตร

2.2 เติมสารละลายที่ละลายไว้แล้ว ลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน

2.3 เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม

2.4 เติมสารละลายจาก stock solution ตามปริมาตรดังต่อไปนี้

stock solution I	10 มิลลิลิตร
stock solution II	1 มิลลิลิตร
stock solution III	1 มิลลิลิตร
stock solution IV	.1 มิลลิลิตร
stock solution V	5 มิลลิลิตร

2.5 เติมสารควบคุมการเจริญ (ถ้าต้องการใส่)

2.6 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.7 ปรับ pH ให้ได้ 5.7±1 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH

2.8 เติมวุ้น 7 กรัม แล้วนำไปเข้าไมโครเวฟ เพื่อให้วุ้นละลาย

2.9 เทวุ้นใส่ขวดเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ ปิดฝา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 นาที