

การชักนำแคลสัสและผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลสัสฟักข้าว *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CALLUS INDUCTION AND EFFECT OF ELICITORS ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GAC
Momordica cochinchinensis (Lour.) Spreng. CALLUS CULTURED IN LIQUID MEDIA



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Botany
Department of Botany
FACULTY OF SCIENCE
Chulalongkorn University
Academic Year 2019
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การชักนำแคลสและผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลสพืชหัว <i>Momordica cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว
โดย	น.ส.สุพรรณษา พลายเปี่ยม
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร.ยุพิน จินตภากร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ใจดี)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ภก.สมภพ ประธานธูรกิจ)

สุพรรณษา พลายเปี่ยม : การชักนำแคลลัสและผลของเอลิซิเตอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าว *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว. (CALLUS INDUCTION AND EFFECT OF ELICITORS ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GAC *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. CALLUS CULTURED IN LIQUID MEDIA) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ดร.ยุพิน จินตภากร

ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) หรือแก๊ก (gac) เป็นพืชไม้เลื้อยที่อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae โดยฟักข้าวนี้มีสารโปรตีนและสารทุติยภูมิสะสมอยู่ในทุกส่วนของต้นประกอบไปด้วยแคโรทีนอยด์ กรดไขมัน วิตามินอี โพลีฟีนอล และ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งทำให้การใช้ประโยชน์ของฟักข้าวถูกบันทึกลงในการแพทย์แผนโบราณของหลายประเทศ ในปัจจุบันมีการใช้เอลิซิเตอร์หลากหลาย เช่น ไคโทซาน และ เมทิลแจสโมเนต (MeJA) เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืช ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการชักนำแคลลัสฟักข้าวและศึกษาผลของไคโทซาน น้ำหนักโมเลกุลสูง (HMC) ไคโทซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (LMC) ความเข้มข้น 10 และ 20 mg/l MeJA ความเข้มข้น 100 และ 150 μ M ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวที่เลี้ยงในอาหารเหลว สำหรับการทดลองชักนำการเกิดแคลลัส ได้นำส่วนยอดและส่วนข้อของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบไปด้วย 2,4-D และ BA พบว่าในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย 0.8 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA 0.8 mg/l 2,4-D + 0.4 mg/l BA และ 0.8 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l BA สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในส่วนของการศึกษาผลของเอลิซิเตอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าว HMC, LMC หรือ MeJA ถูกเติมลงในอาหารวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว และเก็บตัวอย่างแคลลัสในวันที่ 20 และ 22 ของการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ผลการทดลองพบว่าเอลิซิเตอร์ไม่มีผลเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวที่เวลาดังกล่าว ยกเว้นในชุดการทดลองที่เติม 150 μ M MeJA พบว่าในวันที่ 22 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสมีปริมาณของแคโรทีนอยด์มากกว่าชุดควบคุมและชุดทดลองอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ

สาขาวิชา พุทธศาสตร์
ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6072117323 : MAJOR BOTANY

KEYWORD:

Supansa Praipeam : CALLUS INDUCTION AND EFFECT OF ELICITORS ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GAC *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. CALLUS CULTURED IN LIQUID MEDIA. Advisor: YUPYN CHINTAPAKORN, Ph.D.

Momordica cochinchinensis (Lour.) Spreng, a climbing plant commonly known as gac, belongs to family Cucurbitaceae. All parts of gac accumulates both primary and secondary metabolites, which are carotenoid, fatty acid, vitamin E, polyphenol and flavonoid. The plant usage has been recorded in traditional medicine of many countries. Nowadays elicitors, such as chitosan and methyl jasmonate (MeJA), are used to enhance secondary metabolite production in plants. This study aimed to induce callus and investigate the effect of high molecular weight chitosan (HMC), low molecular weight chitosan (LMC) (10 and 20 mg/l) and MeJA (100 and 150 μ M) on antioxidant activity of gac callus in liquid medium. The shoot and node cultures were induced to generate callus on MS solid media supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzyladenine (BA). The best formula for callus induction were MS media supplemented with 0.8 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA, 0.8 mg/l 2,4-D + 0.4 mg/l BA and 0.8 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l BA. HMC, LMC or MeJA could added in liquid medium to elicit the callus cultures on day-18. Then antioxidant activities of the callus were determined on day-20 and day-22. The results showed that chitosan and MeJA did not increase antioxidant activities of the gac callus at those timings. However, carotenoid content on day-22 of the callus treated with 150 μ M MeJA was significantly higher than those in the controls and all other treatments.

Field of Study: Botany

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร ที่มีส่วนทำให้เกิดหัวข้อวิทยานิพนธ์นี้ขึ้น รวมถึงได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งตลอดการทำวิจัย รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้อง และครบถ้วนจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ใจดี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ รองศาสตราจารย์ ดร.ภก.สมภพ ประธานธรรักษ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์จากภายนอก ที่สละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการในการสอบ รวมทั้งให้คำติชมและชี้แนะแนวทางในส่วนที่ต้องปรับปรุงเพิ่มเติม ผู้วิจัยขออ้อมรับและจะนำไปปรับปรุงแก้ไขเพื่อให้งานวิจัยสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่สนับสนุนทุนการศึกษา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่และครอบครัวสำหรับการสนับสนุนและกำลังใจที่ดีตลอดมา และขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือและกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

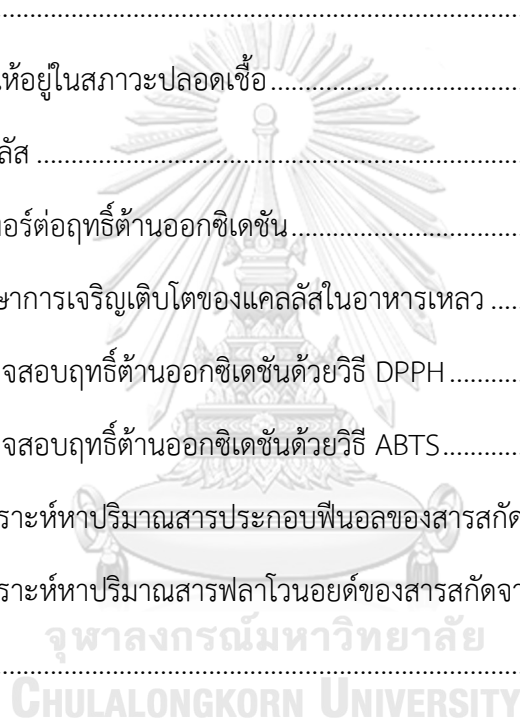
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สุพรรณษา พลายเปี่ยม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ง	ง
กิตติกรรมประกาศ..... จ	จ
สารบัญ..... ฉ	ฉ
สารบัญตาราง..... ฅ	ฅ
สารบัญรูป..... ญ	ญ
บทที่ 1..... 1	1
บทนำ..... 1	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 3	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3	3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย..... 3	3
บทที่ 2..... 4	4
ทบทวนเอกสาร..... 4	4
2.1 ฟักข้าว..... 4	4
2.2 การเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ..... 6	6
2.3 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ..... 13	13
บทที่ 3..... 16	16
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ..... 16	16
3.1 วัสดุอุปกรณ์..... 16	16
3.2 สารเคมี..... 17	17

3.3 วิธีการทดลอง.....	18
3.3.1 การเตรียมพืชให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ (axenic culture).....	18
3.3.2 การชักนำแคลลัส (callus induction)	18
3.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสพักข้าวที่เลี้ยงในอาหารเหลวเมื่อ เติมเอลิสิเทอร์.....	19
บทที่ 4.....	23
ผลการทดลอง.....	23
4.1 การเตรียมพืชให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ.....	23
4.2 การชักนำแคลลัส	24
4.3 ผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน.....	29
4.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว	29
4.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH	31
4.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS.....	32
4.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากแคลลัส	34
4.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัส	35
บทที่ 5.....	38
อภิปรายผลการทดลอง.....	38
5.1 การเตรียมพืชให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ.....	38
5.2 การชักนำแคลลัส	38
5.3 ผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน.....	40
5.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว	40
5.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH	40
5.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS.....	41
5.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากแคลลัส	41



5.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัส.....	42
5.3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณของแคโรทีนอยด์.....	42
บทที่ 6.....	44
สรุปผลการทดลอง.....	44
บรรณานุกรม.....	45
ภาคผนวก.....	58
ประวัติผู้เขียน.....	66



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างการทดลองเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิโดยใช้โคโทซาน.....	11
ตารางที่ 2 ตัวอย่างการทดลองเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิโดยใช้ MeJA.....	13
ตารางที่ 3 ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการชักนำการเกิด แคลลัสจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นผักข่าปลอดเชื้อในอาหารแข็งสูตร MS.....	19
ตารางที่ 4 ผลการฟอกฆ่าเชื้อของเมล็ดผักข่า.....	23
ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสผักข่าที่ชักนำจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นผักข่า....	58
ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของแคลลัสผักข่าที่ชักนำจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นผักข่า บนอาหารแข็ง 12 สูตร (กรัม)	59
ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดที่ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว (กรัม).....	60
ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งที่ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว (กรัม).....	60
ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ($\mu\text{g TEAC/g FW}$).....	61
ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ($\mu\text{g TEAC/g FW}$)	62
ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{g GAE/g FW}$).....	63
ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ($\mu\text{g RUE/g FW}$).....	64
ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ($\mu\text{g/ml}$).....	65

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงส่วนต่างๆของต้นฟักข้าว.....	5
รูปที่ 2 ชนิดของ elicitor	8
รูปที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของโคโตซาน.....	10
รูปที่ 4 โครงสร้างโมเลกุลของ MeJA	12
รูปที่ 5 ปฏิกริยาของ DPPH	14
รูปที่ 6 การเกิดปฏิกิริยาของ ABTS.....	15
รูปที่ 7 ผลพอกฆ่าเชื้อเมล็ดฟักข้าว.....	23
รูปที่ 8 แสดงน้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	25
รูปที่ 9 แสดงน้ำหนักแห้งของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	26
รูปที่ 10 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอดของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	27
รูปที่ 11 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนข้อของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	28
รูปที่ 12 น้ำหนักสดของแคลลัสฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว	29
รูปที่ 13 น้ำหนักแห้งของแคลลัสฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว.....	30
รูปที่ 14 แสดงน้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอดของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย 0.8 mg/l 2,4-D และ 0.8 mg/l BA ในแต่ละชุดการทดลอง ของวันที่ 20 และวันที่ 22 หลังการเพาะเลี้ยง.....	30

รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox31

รูปที่ 16 ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างแคลลัสพืชข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งทดสอบโดยวิธี DPPH.....32

รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox33

รูปที่ 18 ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างแคลลัสพืชข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งทดสอบโดยวิธี ABTS.....33

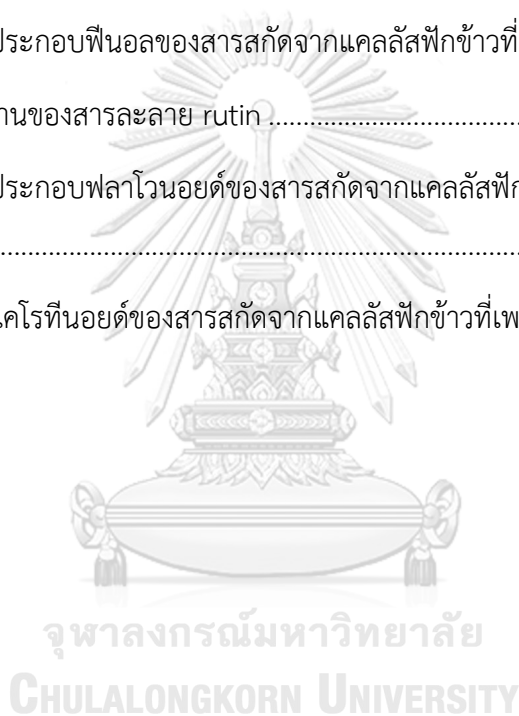
รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid.....34

รูปที่ 20 ปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากแคลลัสพืชข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว.....35

รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลาย rutin36

รูปที่ 22 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัสพืชข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว36

รูปที่ 23 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัสพืชข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว.....37



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) เป็นพืชไม้เลื้อยในวงศ์ Cucurbitaceae สามารถพบได้ในทวีปเอเชีย เช่น เวียดนาม อินเดีย บังคลาเทศ จีน พม่า มาเลเซีย ลาว และไทย เป็นต้น สำหรับการปลูกฟักข้าวในประเทศไทยประกอบด้วยสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์เวียดนาม ซึ่งสามารถปลูกได้ในหลายภูมิภาคของประเทศ ฟักข้าวจัดอยู่ในกลุ่มพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณหลากหลาย ตามตำรายาแผนไทยกล่าวว่า ใบสดของฟักข้าวช่วยถอนพิษอักเสบต่างๆ ส่วนรากช่วยถอนพิษ ดับร้อน ถอนไข้ และเมล็ดช่วยบำรุงปอด รักษาวัณโรคได้ (Chuyen *et al.*, 2015; วรรณภาณุจันท์ ภมรประวัติ, 2556) ปัจจุบันมีรายงานว่าฟักข้าวประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ วิตามินอี กรดไขมันชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และสารทุติยภูมิ เช่น สารประกอบฟีนอลและสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Kha *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเนื้อเยื่อหุ้มเมล็ด (aril) ที่มีสีแดงของฟักข้าวมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วยสารเบตาแคโรทีนปริมาณมากกว่าแครอทถึง 10 เท่าและอุดมไปด้วยสารไลโคปีนและกรดไขมันไม่อิ่มตัว จึงมีการสกัดเอาสารเหล่านี้มาทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Muller-Maatsch *et al.*, 2017) จากสรรพคุณของฟักข้าวทำให้ท้องตลาดเกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากฟักข้าวมากมาย เช่น สบู่ แชมพู ครีมทาหน้า น้ำดื่มฟักข้าว เป็นต้น ซึ่งการใช้สารสกัดจากพืชแทนการใช้สารเคมีย่อมปลอดภัยต่อผู้ใช้และไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม แต่การใช้สารสกัดจากพืชก็มีข้อจำกัดคือสารเหล่านี้มีปริมาณน้อยในพืชธรรมชาติ หรือใช้เวลานานในการปลูก เช่น *Panax ginseng* ใช้ระยะเวลาการปลูกนานถึง 6 ปี จึงจะสามารถสกัดสารจากรากมาใช้ประโยชน์ได้ (Soldati and Tanaka, 1984) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการทดลองเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิขึ้นและเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็เป็นทางเลือกที่สำคัญในการชักนำการสร้างสารทุติยภูมิในพืช (Veraplakorn, 2016) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิในพืชเป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถใช้ผลิตสารดังกล่าวในระดับอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีข้อได้เปรียบกว่าการปลูกพืชลงในแปลงปลูก คือ สามารถควบคุมสภาวะให้เหมาะสมระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ จึงไม่มีข้อจำกัดในเรื่องสภาวะอากาศที่ไม่เหมาะสม การเกิดโรค และการโจมตีของแมลงศัตรูพืช อีกทั้งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังสามารถวิจัยและพัฒนาให้มีการควบคุมการเจริญของเซลล์พืชหรือการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น (Srirat *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแคลลัสของพืชหลายชนิดสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ในระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Fagonia indica*, *Bletilla striata* Rchb. f. และ *Habenaria edgeworthii* Hook. f.

ex. Collett สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ได้ (Giri *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2020)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิโดยอาศัยกระบวนการ elicitation อย่างแพร่หลาย ซึ่ง elicitation หมายถึงการใช้โมเลกุลหรือสภาวะที่มีคุณสมบัติชักนำเซลล์พืชให้สร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น โดยโมเลกุลหรือสภาวะดังกล่าวเรียกว่า เอลิซิเทอร์ (elicitor) (Thakur *et al.*, 2019) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น ไบโอติกเอลิซิเทอร์ (biotic elicitors) และ อะไบโอติกเอลิซิเทอร์ (abiotic elicitors) ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาเอลิซิเทอร์ 2 ชนิด คือ ไคโทซานและเมทิลจัสโมเนต สำหรับไคโทซานเป็น biopolymer ที่สังเคราะห์มาจากไคติน โดยพบที่ผนังเซลล์ของพวกเห็ดราและยังเป็นองค์ประกอบหลักของเปลือกแข็งที่ห่อหุ้มตัวสัตว์ที่มีข้อปล้อง ได้แก่ แมลงต่าง ๆ ปู และกุ้ง (Malerba and Cerana, 2016) สำหรับไคโทซานนั้นมีบทบาททางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งยังสามารถชักนำกลไกการป้องกันตัวเองของพืชเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Katiyar *et al.*, 2015) และนอกจากนี้ยังมีบทบาทชักนำการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase ซึ่งเป็น key enzyme ใน pathway ของการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล (Tahsili *et al.*, 2014) ซึ่ง Rahman และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 ได้รายงานว่าการฉีดพ่นต้นสตอร์เบอร์รี่ด้วยไคโทซานสามารถเพิ่มทั้งการเจริญเติบโต และผลผลิตของพืช รวมทั้งยังสามารถเพิ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Rahman *et al.*, 2018) นอกจากนี้ Fooladi และคณะ ในปี ค.ศ. 2019 รายงานว่าไคโทซานสามารถเพิ่มปริมาณสาร Rosmarinic acid ของ *Melissa officinalis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อได้ (Fooladi *et al.*, 2019) สำหรับเอลิซิเทอร์อีกหนึ่งตัวที่จะกล่าวถึงคือเมทิลจัสโมเนตซึ่งเป็นสารที่สังเคราะห์มาจาก linolenic acid ที่บริเวณเซลล์เมมเบรน โดยทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณที่สำคัญในการตอบสนองต่อปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางชีวภาพ ซึ่งส่งผลต่อสรีระวิทยาต่างๆของพืช เช่น การเกิดดอก การสุกของผล การเจริญของราก การหลุดร่วงของใบ รวมถึงเกี่ยวข้องกับกลไกป้องกันตัวเองเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดหรือเมื่อมีสิ่งมีชีวิตก่อโรค (pathogen) เข้ามาจู่โจม และรายงานของ Milan, Mandoulakani และ Kheradmand ในปี ค.ศ. 2017 พบว่าเมทิลจัสโมเนตมีบทบาทชักนำการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารประกอบฟีนอลอีกด้วย (Milan *et al.*, 2017) ดังเช่นตัวอย่างงานวิจัยของ Anusha, Joseph และ Elyas ในปี ค.ศ. 2016 สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลได้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Celastrus paniculatus* Willd ในอาหารเหลวโดยใช้เมทิลจัสโมเนตเป็นเอลิซิเทอร์ (Anusha *et al.*, 2016)

จากคุณประโยชน์ของฟักข้าวที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ฟักข้าวได้รับความสนใจและเป็นที่ต้องการในการอุปโภคบริโภคในปัจจุบัน ประกอบกับการศึกษาทดลองของฟักข้าวมีค่อนข้างน้อย หากมีข้อมูลการใช้เอลิสิเทอร์เพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าว ก็จะสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการชักนำแคลลัสฟักข้าวและผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวที่เลี้ยงในอาหารเหลว

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาการชักนำแคลลัสฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.)
2. เพื่อศึกษาผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าว (*M. cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) ที่เลี้ยงในอาหารเหลว

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัสฟักข้าวและสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยใช้เอลิสิเทอร์ ซึ่งนำไปสู่การใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัสฟักข้าว
2. หาชนิดและความเข้มข้นของเอลิสิเทอร์ที่สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 ฟักข้าว

ฟักข้าวเป็นพืชไม้เลื้อยในวงศ์ Cucurbitaceae ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. มีชื่อเรียกท้องถิ่นหลากหลาย เช่น ฝักข้าว (ภาคเหนือ), มะข้าว (แพร่), ขี้พั่วไฟ (ภาคใต้), ขี้กาเครือ (ปัตตานี), Gac ในภาษาเวียดนาม หรือ Bitter Gourd ในภาษาอังกฤษ โดยทั่วไปสามารถพบต้นฟักข้าวแพร่กระจายในหลายพื้นที่ของเอเชีย ประกอบด้วย เวียดนาม อินเดีย บังคลาเทศ จีน พม่า มาเลเซีย ลาว และไทย สำหรับการปลูกฟักข้าวในประเทศไทย ประกอบด้วยสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์เวียดนาม สามารถปลูกได้ในหลายภูมิภาคของประเทศ เช่น ระยอง นครปฐม เชียงใหม่ และ กาญจนบุรี เป็นต้น (วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์, 2557)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Wimalasiri et al., 2015)

ใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ (alternate) แผ่นใบเป็นรูปฝ่ามือ (palmately) มี 3-5 แฉก กว้าง 10-15 เซนติเมตร ก้านใบยาว 2.8-5.5 เซนติเมตร แสดงดังรูปที่ 1 (C)

ดอก ดอกเดี่ยว ไม่สมบูรณ์เพศโดยมีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่คนละต้น (dioeciously plant) ดอกมีสีขาวเหลือง มีกลีบดอก 5 กลีบ เกิดสีด้าบริเวณโคนกลีบดอกด้านในเป็นจำนวน 3 กลีบ แสดงดังรูปที่ 1 (D)

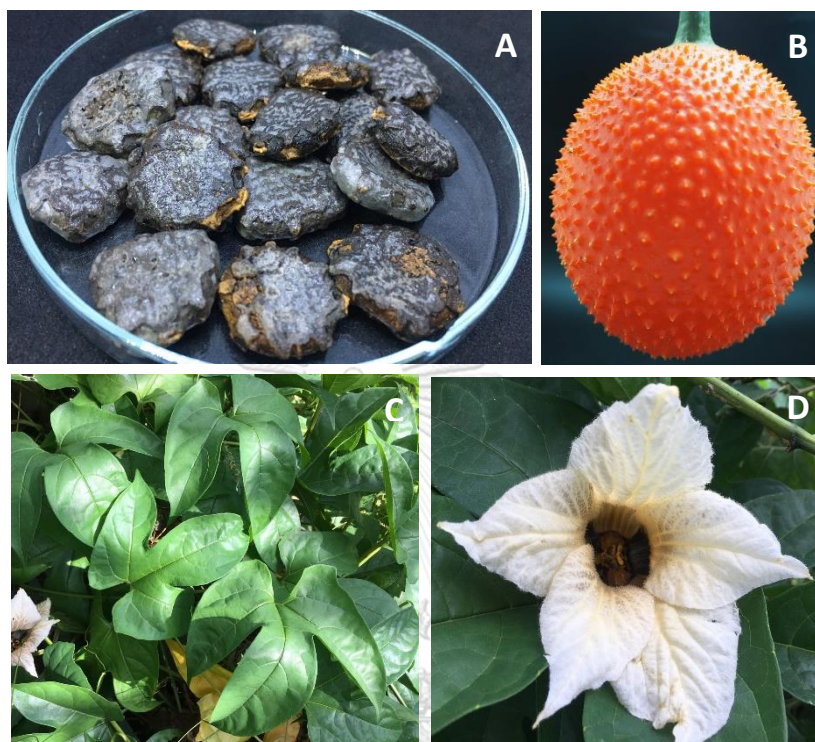
ผล เป็นผลเดี่ยวประเภท pepo มีรูปร่างกลมหรือ รี มีเส้นผ่านศูนย์กลางยาวประมาณ 12-17 เซนติเมตร ผลอ่อนสีเขียวอมเหลือง เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือแดง ผิวเป็นหนามสั้นทั่วผล แสดงดังรูปที่ 1 (B)

เมล็ด แบน รูปกลมหรือรี มีเปลือกหุ้มที่แข็งและหนาสีน้ำตาลดำ ขอบเมล็ดมีรอยหยักโดยรอบ เมล็ดแต่ละเมล็ดถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อสีแดง (red aril) และใน 1 ผลมีเมล็ดมีจำนวนมาก แสดงดังรูปที่ 1 (A)

2.1.2 การขยายพันธุ์ต้นฟักข้าว

ฟักข้าวสามารถขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการเพาะเมล็ด ซึ่งใช้เวลานานในการงอกและเกิดผลผลิตช้า นอกจากนั้นต้นที่งอกมีโอกาสเกิดได้ทั้งต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ในส่วนของการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศประกอบด้วย การตอน การปักชำ ซึ่งสามารถทำง่ายและให้ผลผลิตได้เร็วกว่าการปลูกจากเมล็ด (พัชริน ส่งศรี, 2555) นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่

ถูกนำมาใช้เพิ่มจำนวนต้นฟักข้าว (Deerobram *et al.*, 2014) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้ปริมาณมากในช่วงเวลาที่รวดเร็ว



รูปที่ 1 แสดงส่วนต่างๆของต้นฟักข้าว
(A) เมล็ด (B) ผล (C) ใบ (D) ดอก

2.1.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในฟักข้าว (Kha *et al.*, 2013)

- แคโรทีนอยด์ เป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพ เช่น ไลโคปีน มีคุณสมบัติต้านโรคหัวใจและโรคมะเร็ง เบต้าแคโรทีน สามารถเปลี่ยนรูปเป็นวิตามินเอซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายได้
- วิตามินอี หรือ α -tocopherol สามารถต้านทานโรคหัวใจ และยับยั้งการเกิดโรค Alzheimer
- กรดไขมัน พบทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งช่วยดูดซึมสารที่ละลายได้ในไขมัน
- สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2.1.4 การนำส่วนต่าง ๆ ของต้นผักข่ามาใช้ประโยชน์

ต้นผักข่าสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เกือบทุกส่วน ในส่วนใบสามารถนำมาปรุงเป็นยาช่วยถอนพิษ หรือนำมาตำแล้วพอกบรรเทาอาการปวดหลัง ส่วนเมล็ดนำมาต้มกินบำรุงปอด รักษาท่อน้ำดีอุดตันและวัณโรค ส่วนรากนำมาต้มดื่มหรือนำรากที่ตากแห้งไปบดเป็นผงปั้นเป็นก้อนแล้วนำมารับประทาน ช่วยขับเสมหะ ดับพิษไข้หรือนำรากไปแช่น้ำสระผมรักษาผมร่วงและรักษาเหา (วิเศษฐ์ ลีลามานิตย์, 2557) ในปี 2007 Chuethong และคณะ รายงานว่า เมล็ดของผักข่าประกอบด้วย cochinin A และ cochinin B ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในเมล็ดผักข่า มีคุณสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Chuethong *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าผลของผักข่ารวมถึงเนื้อเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดง (red aril) มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วยสารเบตาแคโรทีนที่มีปริมาณมากกว่าแคโรทีน 10 เท่า โดยมีการสกัดเอาสารเหล่านี้มาทำเครื่องสำอางต่าง ๆ (วิเศษฐ์ ลีลามานิตย์, 2557) ซึ่ง Wihong และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 รายงานว่าผักข่าสายพันธุ์ไทยมีปริมาณไลโคปีน 70 -116 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสด ในขณะที่เบต้าแคโรทีนมีประมาณ 26 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสด (Wihong *et al.*, 2014) และยังมีรายงานว่าสาร triterpenoid saponin ที่สกัดจากเมล็ดของผักข่าสามารถยับยั้งการสร้างเนื้อเยื่อไขมัน โดยไปลดการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไขมันได้ (Yu *et al.*, 2020) และสาร trypsin inhibitor มีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดเม็ดสีที่ทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ (Le *et al.*, 2018) และจากคุณสมบัติของผักข่าที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ผักข่าได้รับความสนใจและมีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นมากมาย เช่น สบู่ ครีมทาผิว เครื่องดื่มผักข่า ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น เนื่องจากมีความต้องการผักข่าในท้องตลาดเพิ่มขึ้น จึงมีการศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดของต้นผักข่าในท้องทดลอง (Deerobram *et al.*, 2014) อีกทั้งยังพบว่าที่ 25-35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการงอกของเมล็ดผักข่า (Tran *et al.*, 2019) และมีการศึกษาการปรับปรุงพันธุกรรมผักข่าโดยการผสมข้ามสายพันธุ์ให้สามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

2.2 การเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

2.2.1 อนุมูลอิสระ (Free radicals)

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุลทำให้มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ โดยทำหน้าที่ดึงอิเล็กตรอนจากสารที่อยู่ใกล้เคียงทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น เรียกปฏิกิริยาที่เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนนี้ว่า oxidation reaction ซึ่งส่งผลให้โมเลกุลใกล้เคียงที่เสียอิเล็กตรอนไปนั้นไม่เสถียรและอาจเกิดเป็นสารที่อันตราย โดยสามารถไปทำลายส่วนประกอบที่สำคัญในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต ซึ่งส่งผลให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้โครงสร้างเปลี่ยนไปและทำหน้าที่ผิดปกติ (Lobo *et*

al., 2010; Phansawan, 2013) สารอนุมูลอิสระนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในร่างกายของเราจากกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ เช่น กระบวนการหายใจระดับเซลล์ เป็นต้น และ สารอนุมูลอิสระที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ประกอบไปด้วย คาร์บอน สารเคมี และ อาหาร เป็นต้น (Young and Woodside, 2001) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตจึงต้องมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อสร้างสมดุลภายในเซลล์ ซึ่งสารอนุมูลอิสระนั้นแบ่งออกเป็น สารประกอบออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) เช่น hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) hydrogen peroxide (H_2O_2) และ oxygen singlet ($^1\text{O}_2$) เป็นต้น สารประกอบไนโตรเจน (reactive nitrogen species, RNS) เช่น nitric oxide radical ($\cdot\text{NO}$) และ nitric dioxide radical ($\cdot\text{NO}_2$) เป็นต้น (Lobo *et al.*, 2010; Phansawan, 2013)

2.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

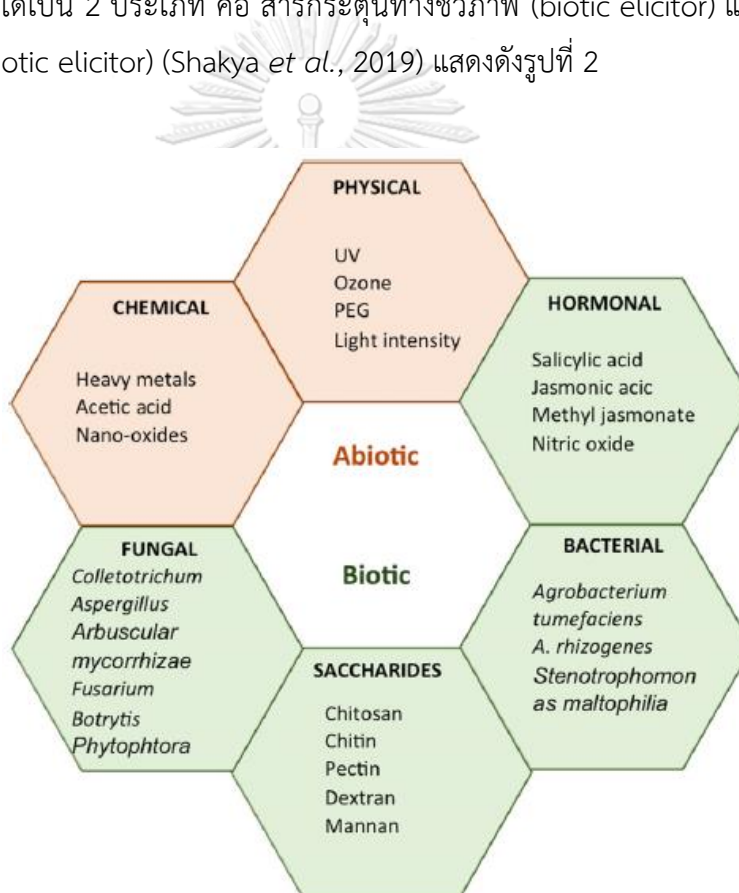
สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิเป็นสารที่สามารถชะลอหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ในเซลล์เพื่อลดปริมาณสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา (Halliwell *et al.*, 1995) โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระมีหลายแบบด้วยกัน เช่น การดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ หรือการเข้าจับ (chelate) กับไอออนของโลหะที่เป็นตัวที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน (Sies, 1991) สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่สร้างขึ้นในสิ่งมีชีวิต (endogenous antioxidant) คือพวกเอนไซม์ เช่น Superoxide dismutase Catalase และ Glutathione peroxidase เป็นต้น ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นอาจไม่เพียงพอต่อการป้องกันอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงต้องการสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก (exogenous antioxidant) ส่วนใหญ่ได้จากการรับประทานผักและผลไม้ เช่น วิตามินอี วิตามินซี วิตามินเอ เบต้าแคโรทีน แคโรทีนอยด์ และ สารประกอบฟีนอล เป็นต้น (Phansawan, 2013)

2.2.3 Elicitation

พืชมีการผลิตสารทุติยภูมิที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช แต่มีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันและการปรับตัวของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สำหรับสารดังกล่าวประกอบด้วย สารประกอบฟีนอล เทอร์ปีน และ อัลคาลอยด์ ซึ่งหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม เคมีภัณฑ์ ทำสี สารแต่งกลิ่น หรือเป็นยาฆ่าแมลงชีวภาพ (Gupta *et al.*, 2010) สำหรับปริมาณของสารหรือชนิดของสารขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และอาจมีการเพิ่มผลผลิตของสารในระหว่างที่พืชกำลังเจริญเติบโตหรือในสภาวะที่มีความจำเพาะ คือ สภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อม และ นอกจากนั้นยังขึ้นกับปริมาณธาตุอาหารในดิน การสร้างสารในพืชบางชนิดค่อนข้างจำกัดเนื่องจากการเจริญเติบโตช้า

เช่น รากของ *Panax ginseng* ต้องใช้ระยะเวลาถึง 6 ปีจึงจะเก็บเกี่ยวมาสกัดสารมาใช้ประโยชน์ได้ (Bonfill *et al.*, 2002) ในขณะที่ *Taxus* มีปริมาณสาร taxol สะสมมากที่สุดในช่วงอายุ 60 ปี ของการเจริญเติบโต (Bedi *et al.*, 1996) ดังนั้นจึงมีการศึกษาการเพิ่มปริมาณสารในพืชเกิดขึ้นอย่างมากมาย รวมถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็เป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับคามนิยมในปัจจุบันสำหรับเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับกระบวนการ elicitation

Elicitation คือ เทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำเซลล์พืชให้สร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) โดยอาศัยการทำงานของสารกระตุ้น (elicitor) สำหรับสารกระตุ้นนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ สารกระตุ้นทางชีวภาพ (biotic elicitor) และ สารกระตุ้นทางกายภาพ (abiotic elicitor) (Shakya *et al.*, 2019) แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ชนิดของ elicitor
(Shakya *et al.*, 2019)

1. สารกระตุ้นที่มีชีวิต (biotic elicitor)

สารกระตุ้นในกลุ่มนี้จะช่วยกระตุ้นการสร้างสาร phytoalexin และสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในระบบการปกป้องพืช (plant defense) ซึ่งจำกัดความโดยรวมของสารกระตุ้นทางชีวภาพ ก็คือ สารที่สร้างมาจากสิ่งมีชีวิตก่อโรค (pathogen) ซึ่งเป็น exogenous elicitors ส่งผลให้เกิดการสร้างสารภายในพืช (endogenous elicitors) หลังจากถูก pathogen จู่โจม (Klarzynski and Fritig, 2001) ในส่วนของ exogenous elicitors ประกอบไปด้วยสารที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์ (microorganism) หรือสารประกอบที่เกิดจากเอนไซม์ของพืชไปทำปฏิกิริยาบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น fungal lysates และ bacterial lysates หรือ สารในกลุ่ม polysaccharides ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น glucans และ chitin เป็นต้น ส่วน endogenous elicitors ประกอบไปด้วยโปรตีนขนาดเล็ก หรือโมเลกุลขนาดเล็กที่เซลล์พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งมีชีวิตก่อโรคที่มาจู่โจม เช่น ฮอร์โมนพืช เป็นต้น (Ramirez-Estrada *et al.*, 2016)

2. สารกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (abiotic elicitor)

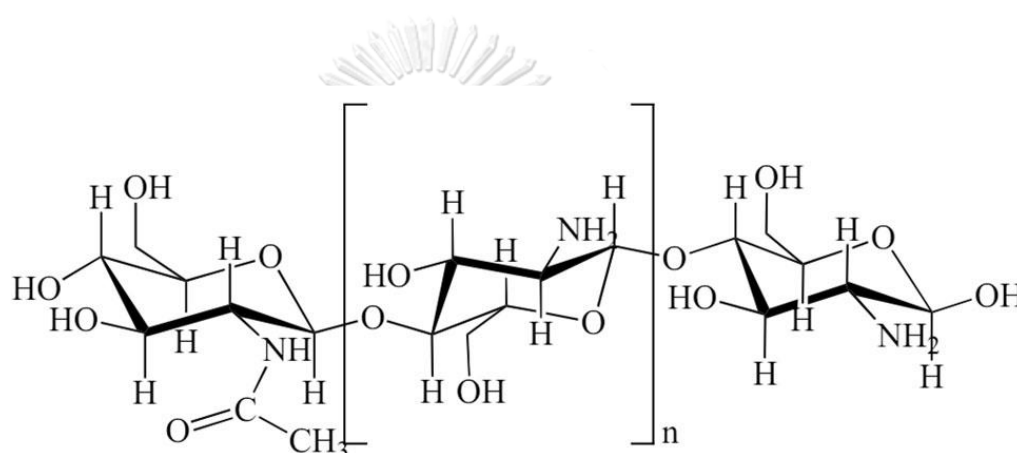
สารกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต ตัวอย่างเช่น เกลือ หรือโลหะต่าง ๆ ได้แก่ AgNO_3 AlCl_3 CaCl_2 CdCl_2 CoCl_2 CuCl_2 HgCl_2 KCl MgSO_4 NiSO_4 VOSO_4 Zn และ Mn นอกจากนี้ยังรวมถึงปัจจัยทางกายภาพ เช่น แสง อุณหภูมิ ความชื้น และ pH เป็นต้น (Verpoorte *et al.*, 2002)

ในที่นี้จะขอกล่าวถึง elicitor 2 ชนิด คือ chitosan และ methyl jasmonate ซึ่งเป็นสารกระตุ้นชีวภาพ

ไคโทซาน (Chitosan) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไคโดซานเป็นอนุพันธ์หนึ่งของไคติน โดยโมเลกุลของไคโดซานเกิดจากสายยาวของไคติน (β -1->4)-N-acetyl-D-glucosamine) ซึ่งเกิดปฏิกิริยา deacetylation ภายใต้สภาวะต่างทำให้หมู่ฟังก์ชัน acetyl ($\text{CO}-\text{CH}_3$) หลุดออก เกิดเป็นโมเลกุลของไคโดซาน ดังรูปที่ 3 ไคตินพบที่ผนังเซลล์ของพวกเห็ดราและยังเป็นองค์ประกอบหลักของเปลือกแข็งที่ห่อหุ้มตัวสัตว์ที่มีข้อปล้อง ได้แก่ แมลงต่างๆ ปู และกุ้ง (Malerba and Cerana, 2016) สำหรับไคโดซานนั้นมีบทบาททางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งยังสามารถชักนำกลไกการป้องกันตัวเองของพืชเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Katiyar *et al.*, 2015) ในปี 2006 Rinaudo และคณะ รายงานว่าไคโดซานมีคุณสมบัติเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลในพืช (Rinaudo, 2006) ดังนั้นจึงมีนักวิจัยมากมายนำไคโดซานมาทดลองเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืช ตัวอย่างดังตารางที่ 1 เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ *Linum album* ในอาหารที่มีไคโดซานความเข้มข้น 200 mg/l พบว่ามีปริมาณของสาร

podophyllotoxin เพิ่มขึ้น และยังมีรายงานว่าโคโทซานสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร podophyllotoxin อีกด้วย (Bahabadi *et al.*, 2011) การเติมโคโทซาน 50 mg/l ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Taxus chinensis* ทำให้การสร้างสาร paclitaxel เพิ่มขึ้น (Zhang *et al.*, 2000) และนอกจากนั้นการเติมโคโทซาน 150 mg/l ยังช่วยเพิ่มปริมาณสาร artemisinin ใน hairy root ของ *Artemisia annua* (Putalun *et al.*, 2007) และการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของฟ้าทะลายโจรที่ประกอบด้วยโคโทซาน 20 mg/l สามารถเพิ่มปริมาณ flavonoid ได้ (Mendhulkar and Vakil, 2013) เป็นต้น



รูปที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของโคโทซาน

(Islam *et al.*, 2017)

สำหรับกลไกการเข้าจับของโคโทซานในพืชยังไม่เป็นที่ชัดเจน แต่มีรายงานว่าโคโทซานจับกับ receptor ที่เฉพาะเจาะจงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์พืช เช่น pathogen associated molecular pattern (PAMP) receptor หลังจากโคโทซานเข้าจับจะเกิดการกระตุ้น PAMP-triggered immunity (Klarzynski and Fritig, 2001) และเกิดสารส่งสัญญาณทุติยภูมิ (second messenger) ซึ่งส่งผลไปชักนำการส่งสัญญาณต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยชักนำการทำงานของยีน และ เกิดการสะสมโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันพืช รวมถึงการสร้างสารทุติยภูมิในพืชด้วย (Malerba and Cerana, 2019)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการทดลองเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิโดยใช้ไคโทซาน

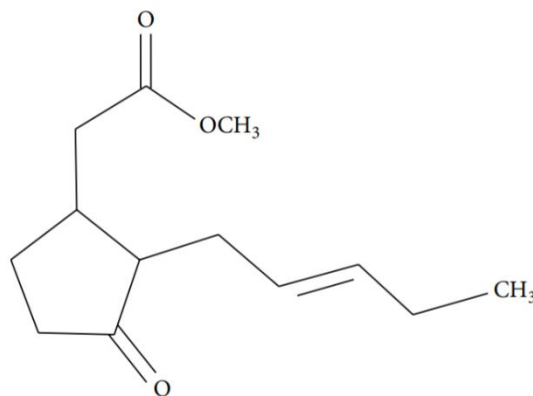
ลำดับ	ชนิดของพืช	สารทุติยภูมิ	ความเข้มข้นของไคโทซาน	เอกสารอ้างอิง
1	<i>Rubia akane</i>	anthraquinone	25 mg/l	Jin <i>et al.</i> , 1999
2	<i>Polygonum tinctorium</i>	indirubin	200 mg/l	Kim <i>et al.</i> , 1997
3	<i>Taxus chinensis</i>	paclitaxel	50 mg/l	Zhang <i>et al.</i> , 2000
4	<i>Cistanche deserticola</i>	phenylethanoid glycosides	50 mg/l	Cheng <i>et al.</i> , 2006
5	<i>Cocos nucifera</i>	phenylpropanoid	200 mg/l	Chakraborty <i>et al.</i> , 2009
6	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	tanshinone	50 mg/l	Zhao <i>et al.</i> , 2010
7	<i>Withania somnifera</i>	withanolides	100 mg/l	Sivanandhan <i>et al.</i> , 2012
8	<i>Psoralea corylifolia</i>	psoralen	100 mg/l	Ahmed and Baig, 2014
9	<i>Conium maculatum</i>	furanocoumarins	110 mg/l	Meier <i>et al.</i> , 2015
10	<i>Curcuma longa</i>	curcumin	0.1% (w/v)	Sathiyabama <i>et al.</i> , 2016
11	<i>Stemona curtisii</i>	stemona alkaloids	20 mg/l	Palee <i>et al.</i> , 2016
12	<i>Isatis tinctoria</i>	flavonoid	150 mg/l	Jiao <i>et al.</i> , 2018
13	<i>Melissa officinalis</i>	rosmarinic acid	100 mg/l	Fooladi <i>et al.</i> , 2019
14	<i>Vitis vinifera</i>	phenolic compounds	0.1% (w/v)	Silva <i>et al.</i> , 2020
15	<i>Linum album</i>	phenolic compounds	200 mg/l	Samari <i>et al.</i> , 2020

Methyl jasmonate (MeJA)

MeJA เป็นอนุพันธ์หนึ่งของ Jasmonates (JAs) โครงสร้างโมเลกุลแสดงดังรูปที่ 4 ซึ่งเป็นฮอร์โมนส่งสัญญาณที่มีความจำเพาะกับพืช โดยมีบทบาทสำคัญต่อสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของพืช (Farmer *et al.*, 2003) เช่น การสุกของผล การหลุดร่วงของใบ และการออกดอก เป็นต้น สำหรับการสังเคราะห์ฮอร์โมนชนิดนี้ถูกเหนี่ยวนำด้วย pathogen และพืชเกิดการตอบสนองต่อ pathogen โดยการทำให้ linoleic acid บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์หลุดออกมาและเกิดกระบวนการสังเคราะห์ JAs ผ่าน chloroplast และ peroxisome และออกสู่ cytosol ในเซลล์ สำหรับ MeJA มีรายงานว่ามียบทบาทสำคัญต่อกระบวนการส่งต่อสัญญาณ (signal transduction) ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ป้องกันพืชจากเชื้อโรค (Farmer and Ryan, 1990) ปัจจุบันมีการนำ MeJA มาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เนื่องจากมีคุณสมบัติกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิ ทำให้ผลผลิตของสารหลายกลุ่มเพิ่มขึ้น ได้แก่ terpenoids flavonoids และ alkaloids เป็นต้น (Ramirez-Estrada *et al.*, 2016) ดังนั้นจึงมีการใช้ MeJA ในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิเกิดขึ้นมากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2 เช่น 0.1 mM MeJA สามารถเพิ่มปริมาณสาร ginsenoside ในการเพาะเลี้ยง hairy root ของ *Panax ginseng* (Kim *et al.*, 2009) แต่ในการทดลองของ Thanh และคณะในปี 2005 พบว่า 200 μ M

MeJA สามารถเพิ่มปริมาณสาร ginsenoside ได้มากขึ้นถึง 28 เท่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาใช้ MeJA เป็นสารกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณ tropane alkaloids คือ scopolamine และ hyoscyamine ของ *Hyoscyamus niger* ด้วย 100 mg/l MeJA หรือปริมาณ peruvoside ใน *Thevetia peruviana* ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยในการทำงานของหัวใจ ด้วย 50 μ M MeJA (Zabala *et al.*, 2010; Zhang, 2007)

สำหรับกลไกการเข้าจับของ MeJA กับเซลล์พืชมีรายงานว่า MeJA เข้าจับกับ receptor ที่เฉพาะเจาะจงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์พืชจากนั้นจะส่งผลไปชักนำการส่งสัญญาณต่าง ๆ ภายในเซลล์ทำให้โปรตีนที่ขัดขวางการตอบสนองต่อ MeJA ถูกย่อยสลายไป (degradation) ทำให้เซลล์พืชตอบสนองต่อ MeJA ได้ โดยชักนำการทำงานของยีน และ เกิดการสะสมโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันพืช รวมถึงการสร้างสารทุติยภูมิในพืชด้วย (Reyes-Díaz *et al.*, 2016)



รูปที่ 4 โครงสร้างโมเลกุลของ MeJA
(Cesari *et al.*, 2014)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการทดลองเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิโดยใช้ MeJA

ลำดับ	ชนิดของพืช	สารทุติยภูมิ	ความเข้มข้นของ MeJA	เอกสารอ้างอิง
1	<i>Vaccinium phalae</i>	anthocyanin	0.5 μ M	Fang <i>et al.</i> , 1999
2	<i>Vitis vinifera</i>	anthocyanin	20 μ M	Zhang <i>et al.</i> , 2002
3	<i>Panax ginseng</i>	ginsenoside	100 μ M	Kim <i>et al.</i> , 2004
4	<i>Silybum marianum</i>	silymarin	100 μ M	Firouzi <i>et al.</i> , 2013
5	<i>Solanum trilobatum</i>	solasodine	4 μ M	Shilpha <i>et al.</i> , 2015
6	<i>Hypericum perforatum</i>	flavonoids	100 μ M	Wang <i>et al.</i> , 2015
7	<i>Scrophularia kakudensis</i>	phenolics, flavonoids	200 μ M	Manivannan <i>et al.</i> , 2016
8	<i>Satureja khuzistanica</i>	rosmarinic acid	100 μ M	Khojasteh <i>et al.</i> , 2016
9	<i>Thevetia peruviana</i>	phenolic compounds	3 μ M	Mendoza <i>et al.</i> , 2018
10	<i>Gardenia jasminoides</i>	chlorogenic acid	200 μ M	Liu <i>et al.</i> , 2018
11	<i>Nardostachys jatamansi</i>	polyphenols	6 μ M	Rawat <i>et al.</i> , 2019
12	<i>Allium cepa</i>	flavonoid	200 μ M	Iqbal <i>et al.</i> , 2019
13	<i>Lactuca indica</i>	phenolic compounds	100 μ M	Yi <i>et al.</i> , 2019
14	<i>Satureja khuzistanica</i>	rosmarinic acid	50 μ M	Fatemi <i>et al.</i> , 2020
15	<i>Vitis labrusca</i>	phenolic compounds	10 mM	Moro <i>et al.</i> , 2020

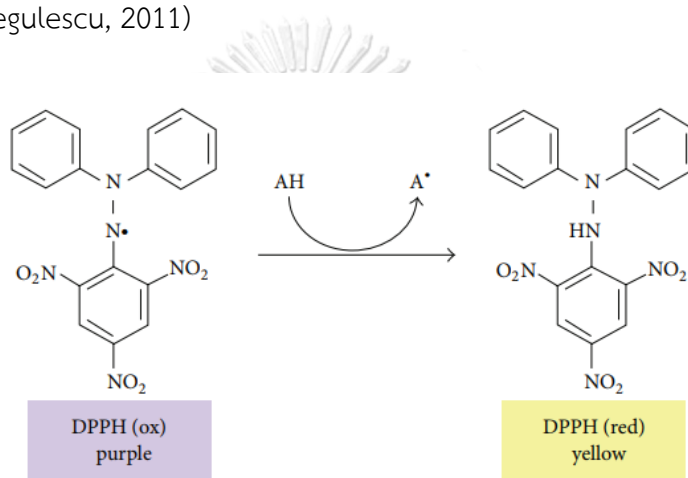
2.3 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการตรวจสอบฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ คือการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่างต่าง ๆ ซึ่งแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกันและแต่ละวิธีนั้นมีความจำเพาะที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้วมักทำการทดลองหลายวิธีแล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง (Phansawan, 2013)

สำหรับงานวิจัยนี้ขอกล่าวถึงเพียงการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ โดยวิธีที่นิยมศึกษาประกอบด้วย

DPPH assay

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คือ DPPH ซึ่งเป็น stable radical ละลายในเอทานอลเกิดเป็นสารละลายสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ 520 นาโนเมตร โดย DPPH • จะอยู่ในรูปรีดิวซ์ (reduced form) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ สีม่วงของสารละลาย DPPH จะจางลงจนเป็นสีเหลืองหลังจากได้รับไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 5 ซึ่งสามารถหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของสารละลาย DPPH และใช้โทรล็อกซ์ (trolox) เป็นสารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (Pisoschi and Negulescu, 2011)



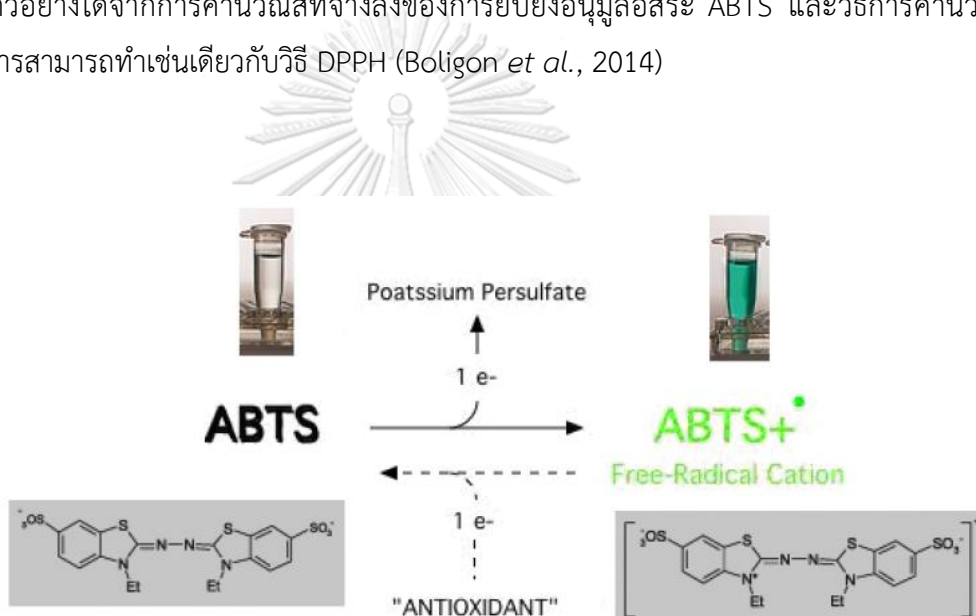
รูปที่ 5 ปฏิกิริยาของ DPPH

(Teixeira *et al.*, 2013)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ไม่ซับซ้อน เป็นวิธีที่นิยมใช้ทั่วไปในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ข้อเสีย คือ DPPH• เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร มีความว่องไวของปฏิกิริยาน้อยกว่าสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย จึงทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ช้า ดังนั้นปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้มีค่าน้อยกว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจริง หรือในกรณีที่มีการปนเปื้อนของสารอื่น เช่น โลหะ สามารถเป็นตัวรีดิวซ์ได้ ส่งผลให้เกิดสีม่วงจางลงเช่นเดียวกัน (Phansawan, 2013)

ABTS assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) assay ซึ่งเป็น cation radical โดยปกติแล้ว ABTS เป็นสารสังเคราะห์ที่ไม่มีสีแต่จะเปลี่ยนเป็นสารสีฟ้าเขียวเมื่อสูญเสียอิเล็กตรอนที่ตำแหน่งของไนโตรเจนให้กับสารอื่น โดยสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 743 นาโนเมตร ABTS⁺ สามารถเปลี่ยนรูปได้โดยการรับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งส่งผลทำให้สีของสารละลายจางลง ปฏิกริยาแสดงดังรูปที่ 6 สำหรับการทดลองส่วนใหญ่มักใช้โทรล็อกซ์ (trolox) เป็นสารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และวิธีการคำนวณปริมาณสารสามารถทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH (Boligon *et al.*, 2014)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 6 การเกิดปฏิกิริยาของ ABTS

(Boligon *et al.*, 2014)

ข้อดีของวิธีนี้คือ ABTS⁺ มีคุณสมบัติละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ และสามารถทำปฏิกิริยาได้รวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง สำหรับข้อเสีย คือ ABTS⁺ เป็นสารที่ไม่พบในธรรมชาติต้องนำมาทำปฏิกิริยากับสารเคมีอื่น ๆ ก่อนเพื่อให้เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระ (Phansawan, 2013)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- Autoclave (Gemmy Industrial, Taiwan)
- Homogenizer (POLYTRON®PT2500E, Switzerland)
- Hot air oven (BINDER, Germany)
- Laminar air flow cabinet
- Microplate reader (SpectraMax®M3, China)
- pH meter (Mettler toledo S220, Switzerland)
- กระจกน้ำแข็งอะลูมิเนียม
- กระบอกฉีดยา (syringe)
- กระบอกตวงขนาด 10 50 100 500 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- กล้องถ่ายภาพดิจิทัล (Olympus, Japan)
- กล้องโพร้ม
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- เข็มฉีดยา (needle)
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Hettich, Germany)
- ปีกเกอร์ขนาด 50 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตและทิป (micropipette and tip)
- หลอด microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมี

- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma-Aldrich, USA)
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA)
- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Sigma-Aldrich, USA)
- 6-Benzyladenine (BA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Acetic acid (Merck, Germany)
- Acetone (Merck, Germany)
- Aluminium chloride ($AlCl_3$) (Sigma-Aldrich, USA)
- Chitosan high molecular weight (Sigma-Aldrich, USA)
- Chitosan low molecular weight (Sigma-Aldrich, USA)
- Dimethyl sulfoxide (Fisher Scientific, England)
- Ethanol (QReC, New Zealand)
- Folin-Ciocalteu reagent (NWR International, France)
- Gallic acid (Sigma-Aldrich, USA)
- Haiter™
- Methanol (Merck, Germany)
- Methyl jasmonate (Sigma-Aldrich, USA)
- Potassium acetate (CH_3COOK) (Quality Reagent chemical, New Zealand)
- Potassium disulfate ($K_2S_2O_7$) (Ajex Finechem, Australia)
- Quercetin (Sigma-Aldrich, USA)
- Rutin (Glenthams Life Sciences, United Kingdom)
- Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Ajex Finechem, Australia)
- Trolox (Sigma-Aldrich, USA)
- Tween 20 (Acros Organics, USA)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมพืชให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ (axenic culture)

ลำเมล็ดฟักข้าวจากผลสุกด้วยน้ำเปล่าให้น้ำเยื่อสีแดง (aril) หลุดออกจากผิวเมล็ดเมื่อล้างสะอาดแล้วตากเมล็ดให้แห้ง และฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด (surface sterilization) โดยแช่เมล็ดด้วย 20% (v/v) Haiter™ + 0.01% (v/v) Tween20 เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ รอบละ 5 นาที จากนั้นแช่เมล็ดใน 95% (v/v) เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ รอบละ 5 นาที จากนั้นนำเมล็ดฟักข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเพาะเปลือกออกด้วยมีดและกรรไกรในตู้ laminar flow และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอก จำนวนเมล็ดที่ปนเปื้อน และคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอก

นำต้นฟักข้าวปลอดเชื้อที่ได้มา subculture ลงบนอาหาร MS ใหม่ ทุกๆ 30 วัน

3.3.2 การชักนำแคลลัส (callus induction)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส

3.3.2.1 ตัดส่วนยอดของต้นฟักข้าวที่ปลอดเชื้อ ความยาว 0.5 เซนติเมตร จากข้อ 3.3.1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (control) และอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ benzyladenine (BA) ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นต่างกัน 12 สูตร (Shanmugapriya and Poornima, 2016) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 27 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยศึกษาอย่างน้อยสูตรละ 6 ขวด ขวดละ 3 ตัวอย่าง สูตรอาหารแสดงดังในตารางที่ 3 บันทึกผลการทดลองหลังผ่านไป 4 สัปดาห์ และเก็บผลการเจริญเติบโต โดยชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ถ่ายภาพ บันทึกสี และลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการชักนำในแต่ละสูตร

3.3.2.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.3.2.1 แต่ใช้เนื้อเยื่อพืชส่วนข้อ (node) ความยาว 0.5 เซนติเมตร

3.3.2.3 วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย one-way ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการชักนำการเกิดแคลลัสจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อในอาหารแข็งสูตร MS

สูตรที่	2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)
1	0	0
2	0.8	0
3	0.8	0.4
4	0.8	0.8
5	0.8	1.6
6	1.4	0
7	1.4	0.7
8	1.4	1.4
9	1.4	2.0
10	2.0	0
11	2.0	1.0
12	2.0	2.0

3.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวที่เลี้ยงในอาหารเหลวเมื่อเติมเอลิซิเทอร์

3.3.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัส

นำแคลลัส 0.2 กรัม มาเพาะเลี้ยงใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.8 mg/l 2,4-D และ 0.8 mg/l BA โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตโดยชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสทุกๆ 4 วัน นับจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 28 รวมเป็น 8 ช่วงเวลา ซึ่งจะบันทึกผลการทดลองในแต่ละช่วงเวลาอย่างน้อย 6 ซ้ำ (Yang *et al.*, 2019) จากนั้นนำข้อมูลผลการทดลองมาสร้าง growth curve หาช่วงเวลาที่แคลลัสมีอัตราการเติบโตที่ลดลงเพื่อนำมาใช้ในการทดลองข้อ 3.3.3.2

3.3.3.2 ผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) เพื่อศึกษาผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวที่เลี้ยงในอาหารเหลว

เพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1 แต่มีการเติมเอลิสิเทอร์ในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส สำหรับเอลิสิเทอร์ที่ใช้ประกอบด้วยไคโทซาน 2 ชนิด คือ high molecule weight chitosan (HMC) และ low molecule weight chitosan (LMC) ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร MeJA 100 และ 150 ไมโครโมลาร์ โดยมีชุดควบคุม 3 ชุด ประกอบด้วย ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเอลิสิเทอร์ ชุดควบคุม 0.002% (v/v) กรดอะซิติก ซึ่งเป็นตัวทำละลายของไคโทซาน และชุดควบคุม 1.2% (v/v) เอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ MeJA โดยความเข้มข้นที่กล่าวเป็นความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเหลว จากนั้นเก็บผลการทดลองในวันที่ 2 และ 4 หลังเติมเอลิสิเทอร์ สู่ตรละ 6 ตัวอย่าง โดยใช้น้ำหนักแคลลัสที่ได้และใช้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Cheng *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2017)

ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากแคลลัส ทำโดยนำตัวอย่างแคลลัสมาสกัดโดยดัดแปลงวิธีของ Giri และคณะ (2012) ดังนี้ สกัดแคลลัสด้วย 80% (v/v) methanol ในสัดส่วน 1 กรัมต่อ 8 มิลลิลิตร สำหรับศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic content) สกัดแคลลัสด้วย 80% (v/v) methanol ในสัดส่วน 1 กรัมต่อ 7 มิลลิลิตร สำหรับศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content) จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วย homogenizer แล้วดูดส่วนใสกรองผ่าน nylon syringe filter เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Chang *et al.*, 2018; Chung *et al.*, 2017)

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากแคลลัส ประกอบด้วย

- การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงตามวิธีของ (Thiruvengadam *et al.*, 2016) และ (Chung *et al.*, 2016) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแคลลัสเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ Trolox (ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ด้วย 80% เอทานอลปริมาตร 180 ไมโครลิตรผสมกับสารสกัดจากแคลลัสปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใน 96 well microplate บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (technical replicate) และในส่วนของสาร Trolox นำมาทำเช่นเดียวกับสารสกัดแคลลัส หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox

ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน แสดงผลการทดลองเป็นค่าไมโครกรัมสมมูลของ Trolox ต่อน้ำหนักสดของแคลลัส 1 กรัม ($\mu\text{g trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/ g FW}$)

- การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงตามวิธีของ Katerere และ Eloff (2005) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแคลลัสเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ Trolox (ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ผสมกับ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเจือจางและวัดค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.700 ± 0.020 นำสารสกัดจากแคลลัสปริมาตร 15 ไมโครลิตรผสมกับ ABTS ปริมาตร 185 ไมโครลิตรใน 96 well microplate บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (technical replicate) และในส่วนของสาร Trolox นำมาทำเช่นเดียวกับสารสกัดแคลลัส หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน แสดงผลการทดลองเป็นค่าไมโครกรัมสมมูลของ Trolox ต่อน้ำหนักสดของแคลลัส 1 กรัม ($\mu\text{g trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/ g FW}$)
- สารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic content) โดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ดัดแปลงตามวิธีของ Thiruvengadam, Rekha และ Chung (2016) (Thiruvengadam *et al.*, 2016) ทดสอบสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากแคลลัสเทียบกับสารมาตรฐาน คือ gallic acid (ความเข้มข้น 0, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำสารสกัดแคลลัสปริมาตร 30 ไมโครลิตรผสมกับ 50% (v/v) Folin Ciocalteu's reagent 100 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 70 ไมโครลิตร บ่ม 15 นาที หลังจากนั้นเติม 2% (w/v) Na_2CO_3 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (technical replicate) และในส่วนของสารมาตรฐานนำมาทำเช่นเดียวกับสารสกัดแคลลัส หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน แสดงผลการทดลองเป็นค่าไมโครกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อน้ำหนักสดของแคลลัส 1 กรัม ($\mu\text{g gallic acid equivalent (GAE)/ g FW}$)

- สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content) โดยวิธี Aluminum chloride colorimetry ดัดแปลงตามวิธีของ Thiruvengadam, Rekha และ Chung (2016) (Thiruvengadam *et al.*, 2016) ทดสอบสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากแคลลัสเทียบกับสารมาตรฐาน คือ rutin (ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำสารสกัดแคลลัสปริมาตร 15 ไมโครลิตรผสมกับ 10% (w/v) $AlCl_3$ 4 ไมโครลิตร 1 M CH_3COOK 4 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 38 ไมโครลิตร และ Absolute ethanol 54 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และในส่วนของสารมาตรฐานนำมาทำเช่นเดียวกับสารสกัดแคลลัส หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากแคลลัสที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน rutin ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน แสดงผลการทดลองเป็นค่าไมโครกรัมสมมูลของ rutin ต่อน้ำหนักสดของแคลลัส 1 กรัม (μg rutin equivalent (RUE)/ g FW)

3.3.3.3 นำแคลลัสจากข้อ 3.3.3.2 มาสกัดและตรวจสอบปริมาณของแคโรทีนอยด์ (carotenoid content) โดยดัดแปลงตามวิธีของ Devesa และคณะ (2007) (Devesa *et al.*, 2007) สกัดแคลลัสด้วย acetone ในสัดส่วน 1 กรัมต่อ 8 มิลลิลิตร นำมาปั่นให้ละเอียดด้วย homogenizer และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 646.8 และ 663.2 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ } (C_a) = 12.25(A_{663.2}) - 2.79(A_{646.8})$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ บี } (C_b) = 21.5(A_{646.8}) - 5.1(A_{663.2})$$

$$\text{แคโรทีนอยด์} = [1000(A_{470}) - 1.82(C_a) - 85.02(C_b)]/198$$

3.3.3.4 ผลการทดลองจะถูกวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย one way ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

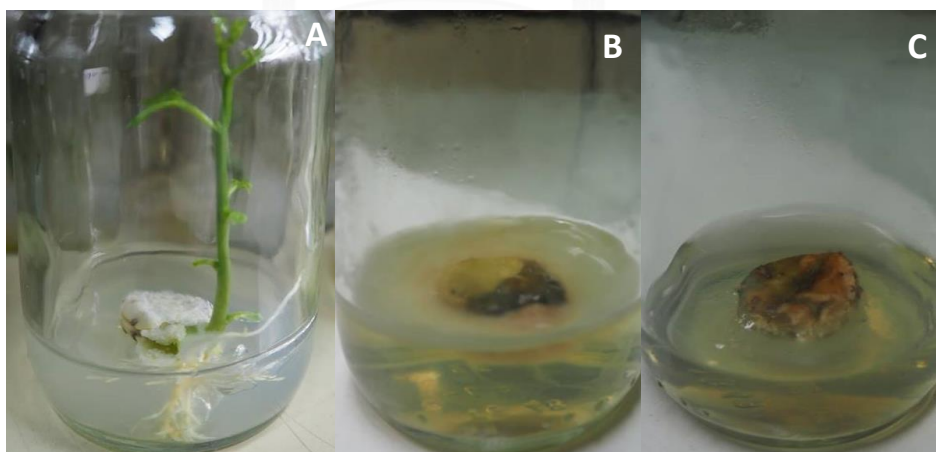
ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมพืชให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ

ผลการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดฟักข้าวจำนวน 75 เมล็ด และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS แสดงดังในตารางที่ 4 และรูปที่ 7 พบว่าเมล็ดฟักข้าวปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จำนวน 5 ชนิด คิดเป็นการปนเปื้อน 6.67 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองพบเมล็ดงอก 64 เมล็ด คิดเป็นการงอก 91.43 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการงอกของเมล็ดนั้นใช้เวลาประมาณ 4 สัปดาห์หลังจากนำเมล็ดมาเพาะบนอาหารแข็ง MS และจากผลการทดลองกล่าวได้ว่าเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพที่สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่ผิวเมล็ดได้ หลังจากได้ต้นฟักข้าวปลอดเชื้อในห้องทดลองแล้วได้ทำการเพิ่มจำนวนให้เพียงพอในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 ผลการฟอกฆ่าเชื้อของเมล็ดฟักข้าว

จำนวนเมล็ดที่ ปนเปื้อน (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์ การปนเปื้อน (%)	จำนวนเมล็ดที่ งอก (เมล็ด)	จำนวนเมล็ดที่ ไม่งอก (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์ การงอก (%)
5	6.67	64	6	91.43



รูปที่ 7 ผลฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดฟักข้าว

(A) ต้นฟักข้าวที่งอกจากเมล็ด (B) เมล็ดฟักข้าวที่ปนเปื้อน (C) เมล็ดฟักข้าวที่ไม่งอก

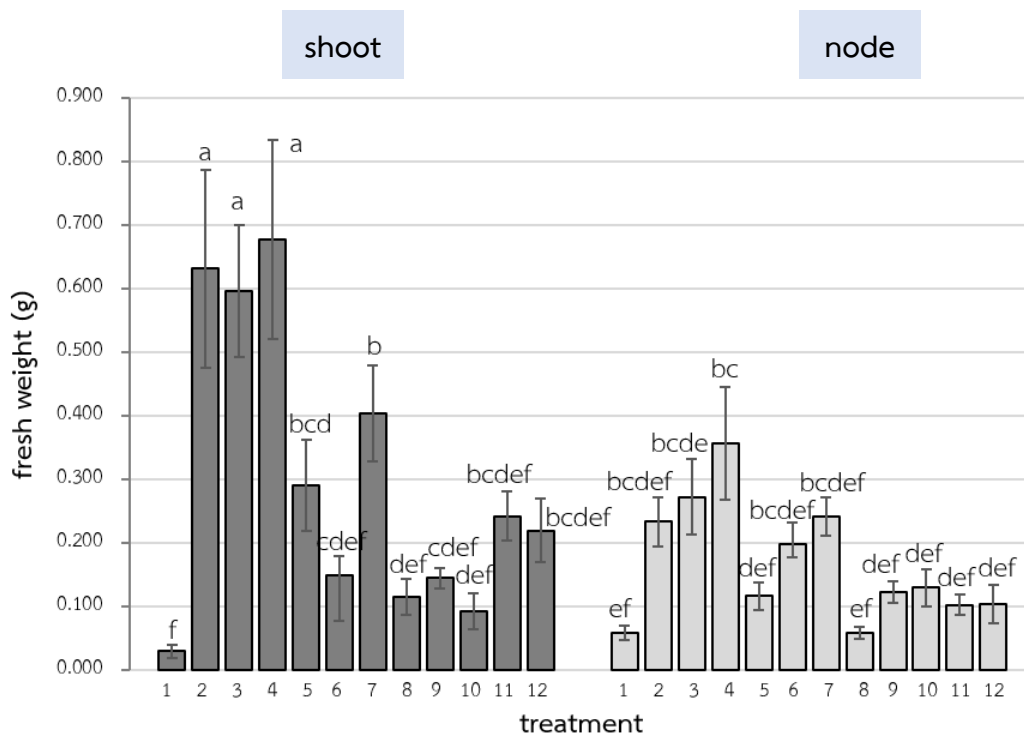
4.2 การชักนำแคลลัส

การชักนำแคลลัสของเนื้อเยื่อส่วนยอดและส่วนข้อของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้ววัดการเจริญเติบโตด้วยการชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยน้ำหนักสดของแคลลัสแสดงดังรูปที่ 8 และน้ำหนักแห้งของแคลลัสแสดงดังรูปที่ 9 โดยพบว่าสูตรอาหารที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ทั้งส่วนยอดและส่วนข้อเกิดแคลลัสต่ำกว่าสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยแคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอดในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ 2 (0.8 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA) สูตรที่ 3 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.4 mg/l BA) และ สูตรที่ 4 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l BA) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดมากที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่น คือ 0.631 0.596 และ 0.677 กรัม ตามลำดับ เช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของแคลลัส คือ 0.061 0.060 และ 0.064 กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 8 และรูปที่ 9)

ส่วนแคลลัสจากส่วนข้อของต้นฟักข้าวที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรที่ 4 มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ดังนี้ คือ 0.357 และ 0.042 กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 8 และรูปที่ 9)

ในส่วนของสีแคลลัสที่เกิดขึ้นจะเป็นสีเขียวออกเหลืองและสำหรับลักษณะของแคลลัสในสูตรอาหารแต่ละสูตรพบว่าด้านนอกของแคลลัสมีลักษณะเป็น friable คือ เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์อย่างหลวมๆ และด้านในของแคลลัสมีลักษณะเป็น compact คือ เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์โดยเกาะกลุ่มกันแน่น ซึ่งแสดงดังรูปที่ 10 และ 11

สำหรับการทดลองศึกษาผลของเอลิซิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวที่เลี้ยงในอาหารเหลว ได้นำแคลลัสที่ชักนำจากยอดด้วยอาหารสูตรที่ 4 ไปศึกษาเนื่องจากแคลลัสที่เกิดขึ้นในสูตรที่ 4 มีการเกิดแคลลัสกระจายตัวรอบๆเนื้อเยื่อพืชมากกว่าอาหารสูตรที่ 2 และ 3

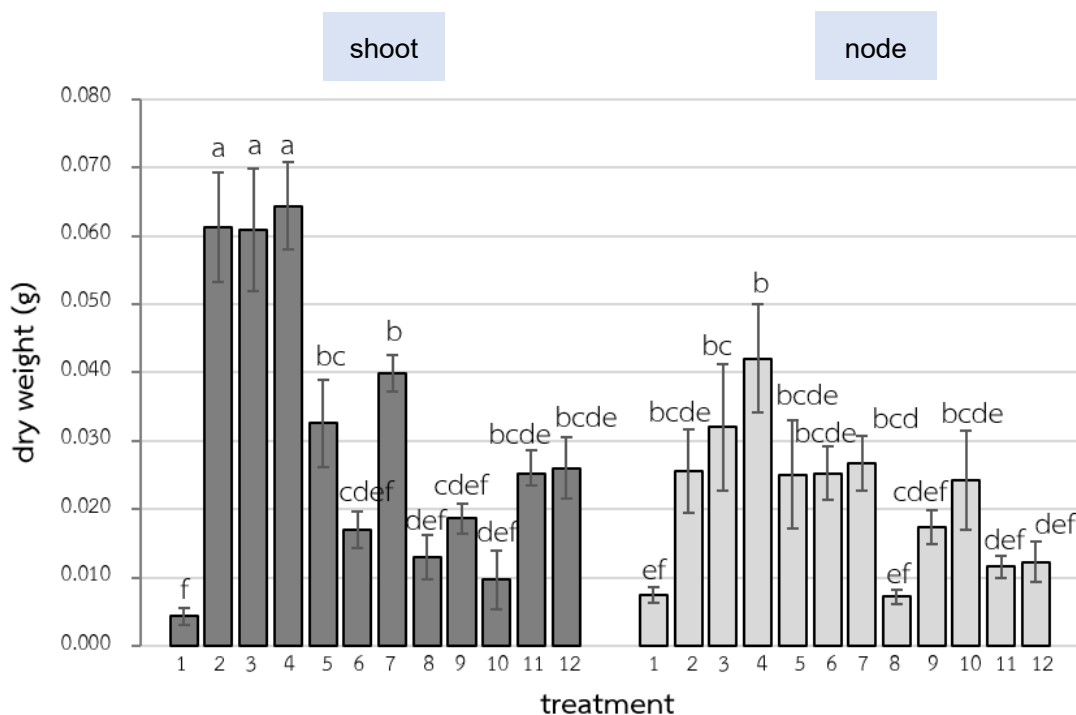


รูปที่ 8 แสดงน้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 1 (0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 2 (0.8 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
 แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 3 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.4 mg/l BA) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 4 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l BA)
 แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 5 (0.8 mg/l 2,4-D + 1.6 mg/l BA) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 6 (1.4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
 แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 7 (1.4 mg/l 2,4-D + 0.7 mg/l BA) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 8 (1.4 mg/l 2,4-D + 1.4 mg/l BA)
 แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 9 (1.4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BA) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 10 (2.0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
 แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 11 (2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 12 (2.0 mg/l 2,4-D + 2.0 mg/l BA)

หมายเหตุ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ของตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี

Duncan's Multiple Range Test

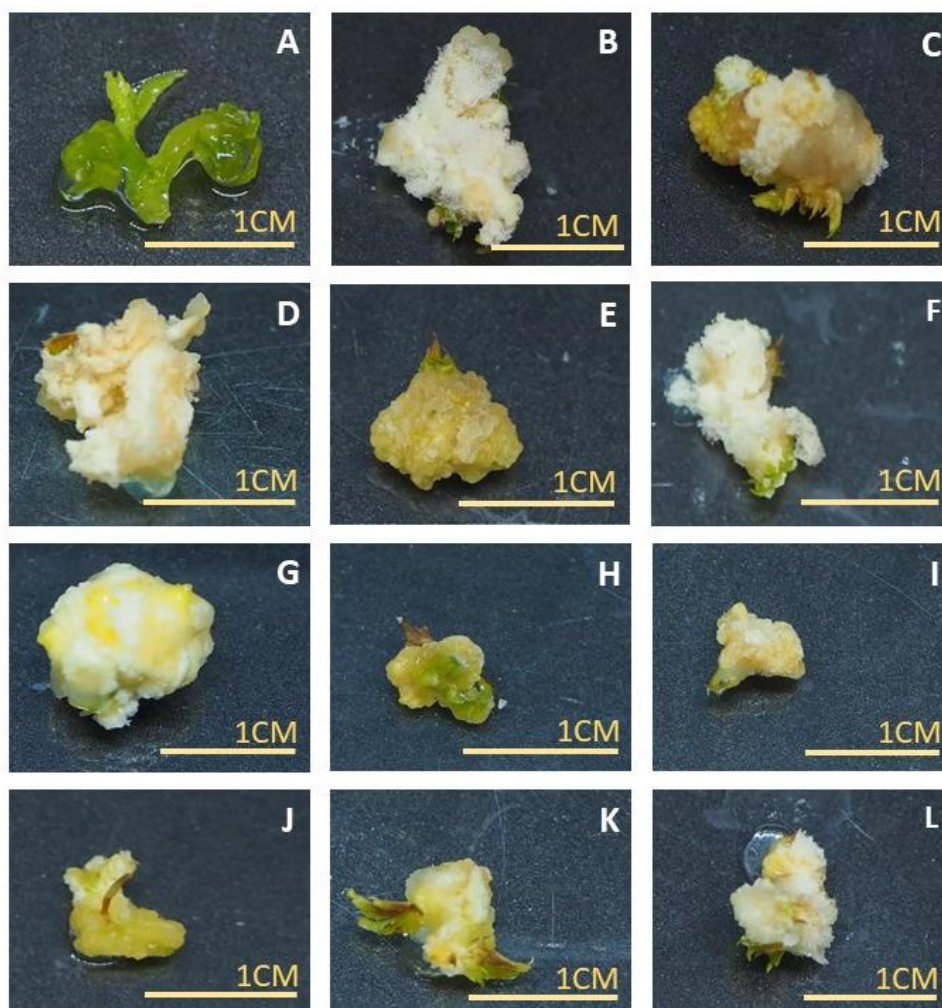


รูปที่ 9 แสดงน้ำหนักแห้งของแคลลัสที่ชั่งนำจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นปักชำข้าวปลอด
 เชื้อบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มี
 สัดส่วนความเข้มข้นต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 1 (0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)	แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 2 (0.8 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 3 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.4 mg/l BA)	แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 4 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l BA)
แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 5 (0.8 mg/l 2,4-D + 1.6 mg/l BA)	แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 6 (1.4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 7 (1.4 mg/l 2,4-D + 0.7 mg/l BA)	แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 8 (1.4 mg/l 2,4-D + 1.4 mg/l BA)
แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 9 (1.4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BA)	แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 10 (2.0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 11 (2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA)	แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 12 (2.0 mg/l 2,4-D + 2.0 mg/l BA)

หมายเหตุ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ของตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงความ
 แตกต่างอย่างไม่มีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี

Duncan's Multiple Range Test

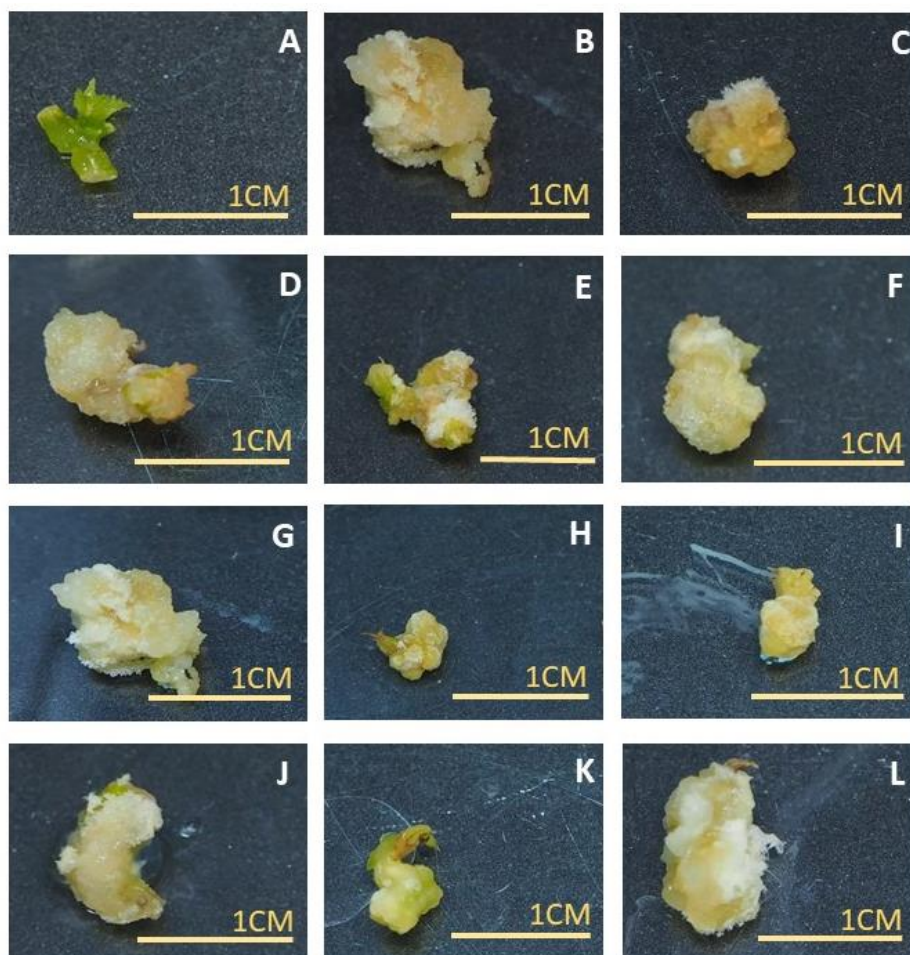


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 10 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอดของต้นฟักข้าวปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(A) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 1 (0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA) (B) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 2 (0.8 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
 (C) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 3 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.4 mg/l BA) (D) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 4 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l BA)
 (E) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 5 (0.8 mg/l 2,4-D + 1.6 mg/l BA) (F) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 6 (1.4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
 (G) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 7 (1.4 mg/l 2,4-D + 0.7 mg/l BA) (H) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 8 (1.4 mg/l 2,4-D + 1.4 mg/l BA)
 (I) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 9 (1.4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BA) (J) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 10 (2.0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
 (K) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 11 (2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA) (L) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 12 (2.0 mg/l 2,4-D + 2.0 mg/l BA)



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 11 แคลลัสที่ซึกนำจากส่วนข้อของต้นปักชำปลอดเชื้อบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(A) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 1 (0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA) (B) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 2 (0.8 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
 (C) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 3 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.4 mg/l BA) (D) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 4 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l BA)
 (E) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 5 (0.8 mg/l 2,4-D + 1.6 mg/l BA) (F) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 6 (1.4 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
 (G) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 7 (1.4 mg/l 2,4-D + 0.7 mg/l BA) (H) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 8 (1.4 mg/l 2,4-D + 1.4 mg/l BA)
 (I) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 9 (1.4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BA) (J) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 10 (2.0 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA)
 (K) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 11 (2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA) (L) แคลลัสบนอาหารสูตรที่ 12 (2.0 mg/l 2,4-D + 2.0 mg/l BA)

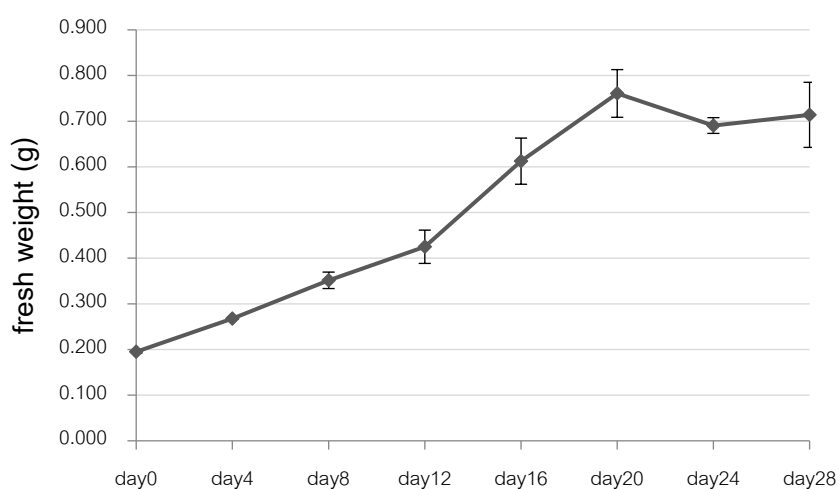
4.3 ผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว

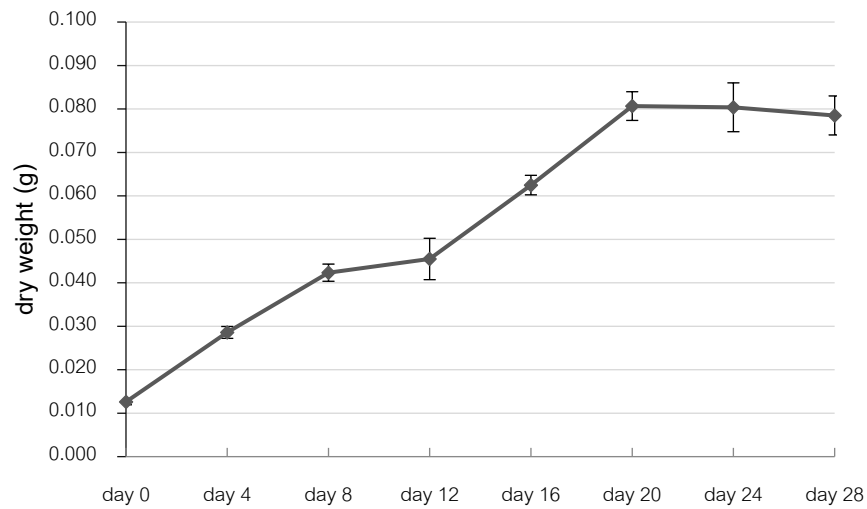
เมื่อนำแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนยอดบนอาหารแข็ง MS สูตรที่ 4 อายุ 4 สัปดาห์มาเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.8 mg/l ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.8 mg/l (สูตรที่ 4) พบว่าในอาหารเหลวแคลลัสมีทั้งที่เป็น compact และแคลลัสที่เป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ ซึ่งเกิดจากการหลุดออกของแคลลัสที่เป็น friable ที่เกิดขึ้นโดยรอบเนื้อเยื่อพืช

บันทึกผลการเจริญเติบโตด้วยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของวันที่ 0 4 8 12 16 20 24 และ 28 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 และรูปที่ 13 พบว่าการเติบโตของแคลลัสเข้าสู่ระยะถดถอย (deceleration stage) หลังวันที่ 16 เนื่องจากมีอัตราการเติบโตที่ลดลงเมื่อเทียบกับช่วงวันที่ 12-16 และเข้าสู่ระยะคงที่ในช่วงวันที่ 20 (stationary stage) ดังนั้นในช่วงหลังวันที่ 16 ถึง 20 จึงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเติมเอลิสิเทอร์ ซึ่งผู้ทดลองเลือกเติมเอลิสิเทอร์ในวันที่ 18 เพื่อศึกษาผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากแคลลัสฟักข้าว

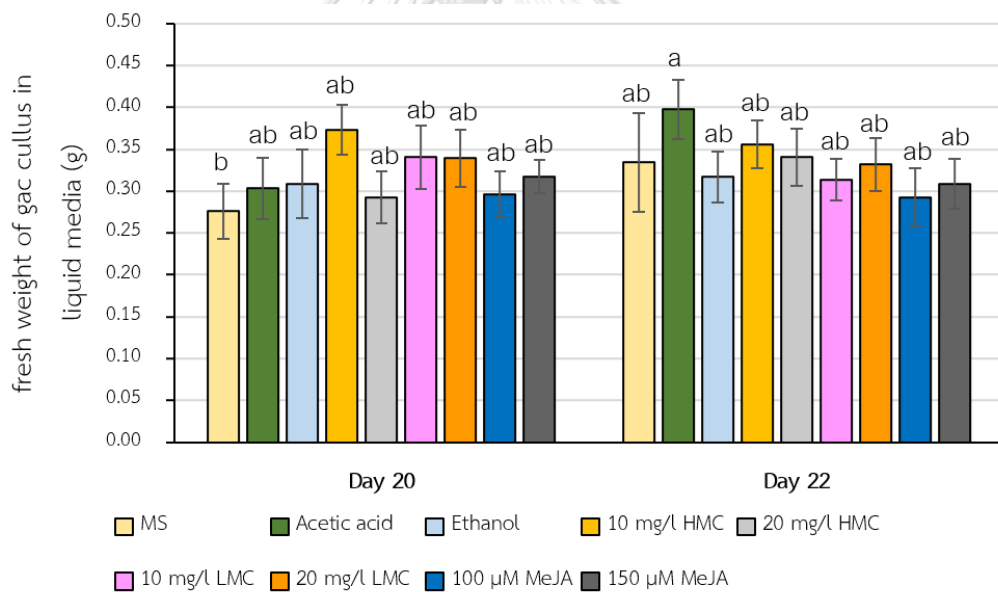
บันทึกน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหลังจากเติมเอลิสิเทอร์ในวันที่ 20 และวันที่ 22 เพื่อนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (รูปที่ 15) พบว่าน้ำหนักสดของแคลลัสไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่นๆ



รูปที่ 12 น้ำหนักสดของแคลลัสฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว



รูปที่ 13 น้ำหนักแห้งของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว



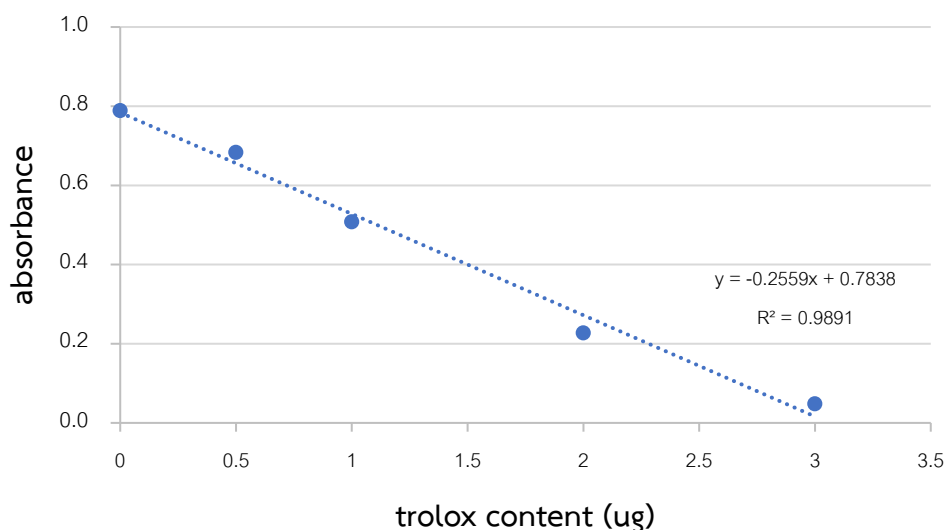
รูปที่ 14 แสดงน้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอดของต้นพริกขี้หนูปลอดเชื้อในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย 0.8 mg/l 2,4-D และ 0.8 mg/l BA ในแต่ละชุดการทดลอง ของวันที่ 20 และ วันที่ 22 หลังการเพาะเลี้ยง

หมายเหตุ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ของตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี

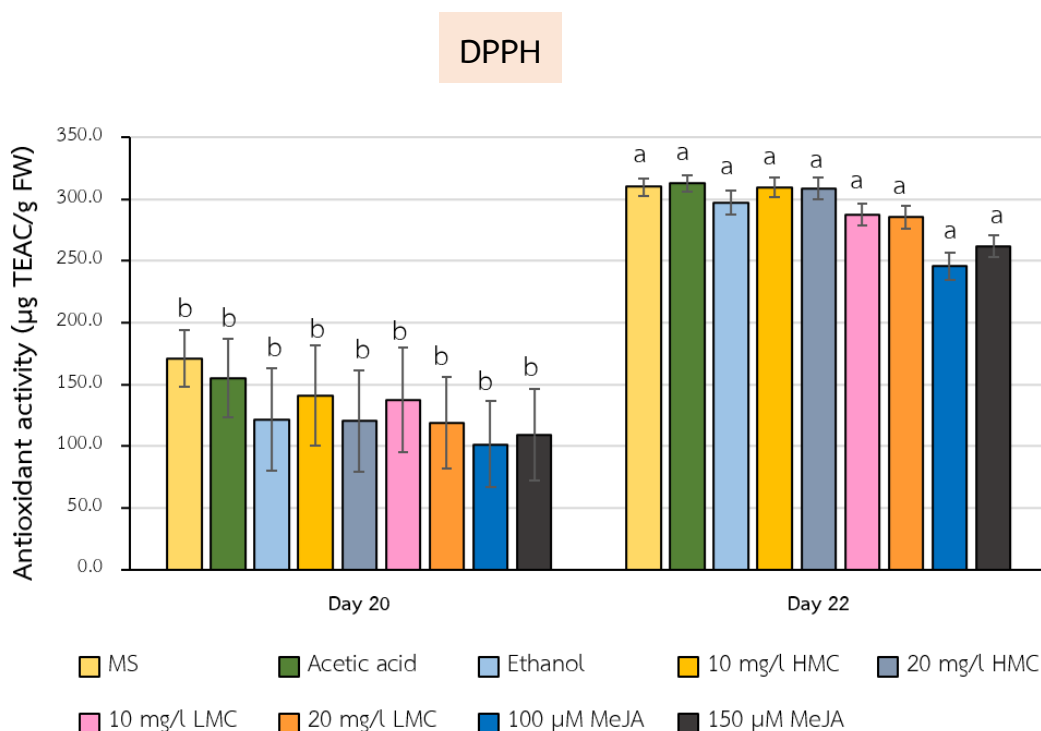
Duncan's Multiple Range Test

4.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวที่เลี้ยงในอาหารเหลวด้วยวิธี DPPH โดยนำสารสกัดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ซึ่งคิดเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย trolox สมการของกราฟคือ $y = -0.2559x + 0.7838$, $R^2 = 0.9891$ (รูปที่ 15) พบว่า สารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 4 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์ (วันที่ 22 ของการเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว) ในสูตรอาหารทุกสูตรรวมทั้งชุดควบคุม มีความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 2 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์ แสดงดังรูปที่ 16 โดยค่าเฉลี่ยความสามารถต้านออกซิเดชันของวันที่ 2 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์อยู่ในช่วง 101.50-171.0 $\mu\text{g TEAC/g FW}$ และค่าเฉลี่ยความสามารถต้านออกซิเดชันของวันที่ 4 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์อยู่ในช่วง 245.59-312.94 $\mu\text{g TEAC/g FW}$ นอกจากนั้นยังพบว่ากรดอะซิติกซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้เตรียมโคโทซาน และเอทานอลซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้เตรียมเมทิลจัสโมเนต เช่นเดียวกับชุดการทดลองอื่น ๆ ไม่มีผลต่อการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมเอลิซิเทอร์ (MS)



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox

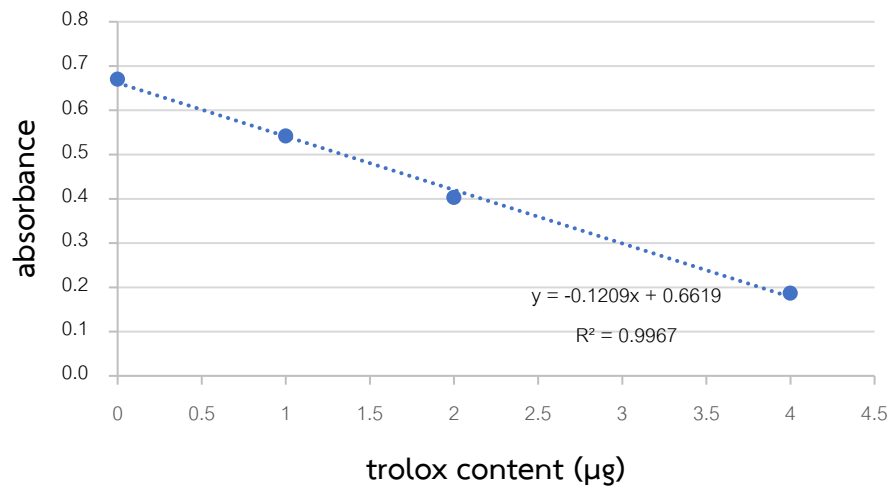


รูปที่ 16 ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างแคลลัสผักขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งทดสอบโดยวิธี DPPH

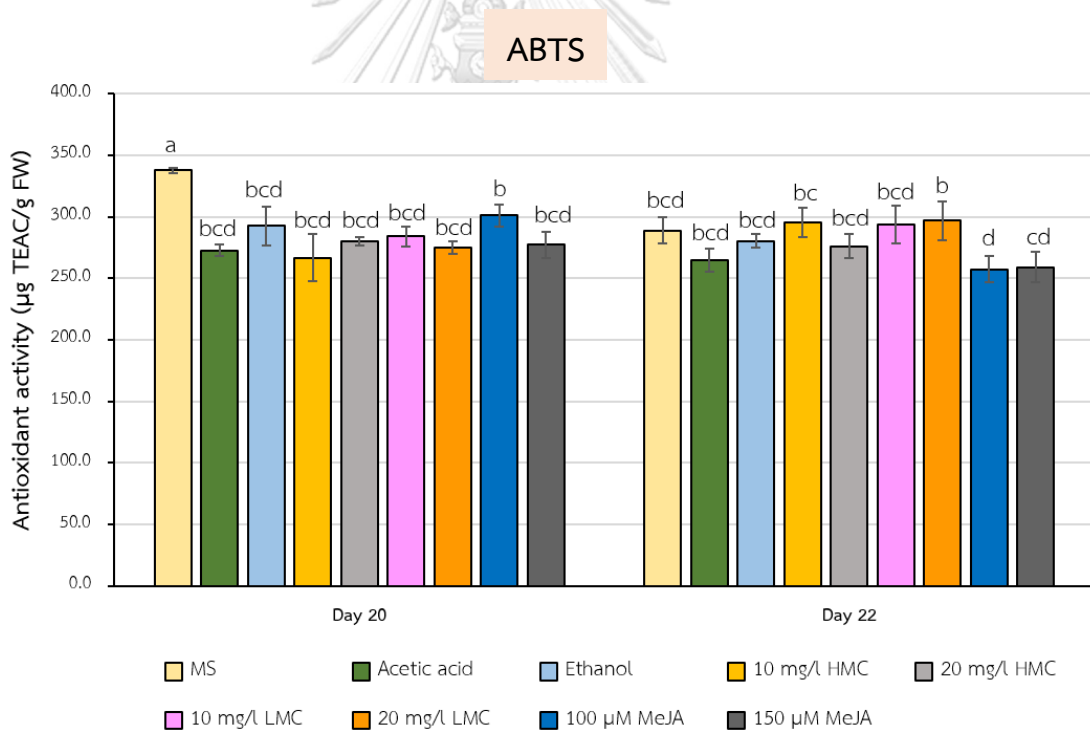
หมายเหตุ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ของตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

4.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสผักขาวที่เลี้ยงในอาหารเหลวด้วยวิธี ABTS โดยนำสารสกัดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ซึ่งคิดเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox สมการของกราฟคือ $y = -0.1209x + 0.6619$, $R^2 = 0.9967$ (รูปที่ 17) พบว่าสารสกัดจากแคลลัสสูตร MS ของวันที่ 2 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์ (วันที่ 20 ของการเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดทดลองอื่น ๆ (รูปที่ 18) โดยมีค่าเท่ากับ $337.59 \mu\text{g TEAC/g FW}$ นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 2 และ 4 หลังเติมเอลิซิเทอร์ชุดทดลองอื่น ๆ ที่เติมกรดอะซิติก เอทานอล ไคโทซาน และ เมทิลจัสโมเนตมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ยกเว้นชุดการทดลองที่เติม $100 \mu\text{M MeJA}$) กล่าวได้ว่าทั้งไคโทซานและเมทิลจัสโมเนตไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และการเก็บตัวอย่างแคลลัสที่ช่วงเวลานี้อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากเซลล์พืชอาจมีการตอบสนองต่อเอลิซิเทอร์ไปแล้ว



รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox



รูปที่ 18 ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างแคลลัสฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงใน

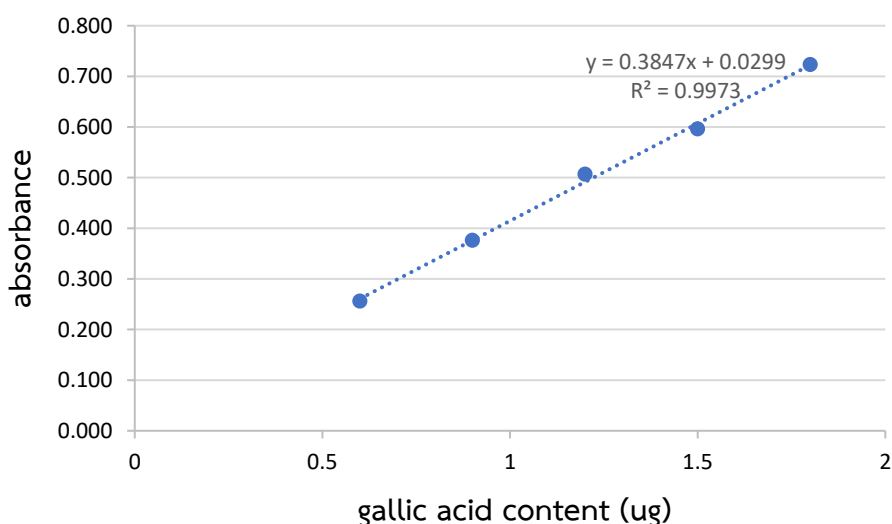
อาหารเหลวซึ่งทดสอบโดยวิธี ABTS

หมายเหตุ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ของตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี

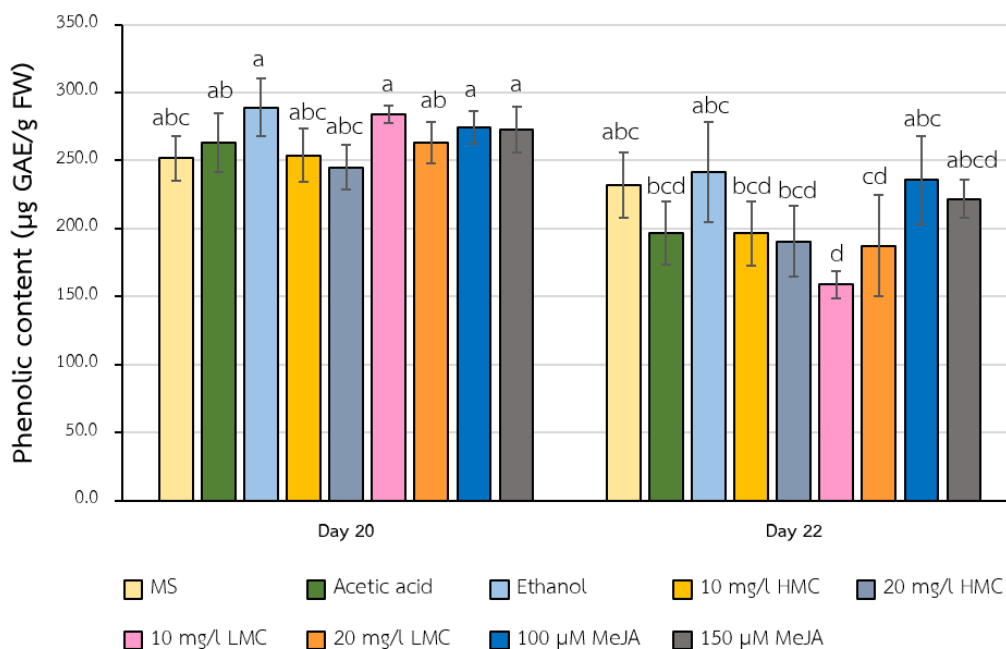
Duncan's Multiple Range Test

4.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากแคลลัส

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากแคลลัสพืชข้าว โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยคิดเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid สมการของกราฟคือ $y = 0.1154x + 0.1453$, $R^2 = 0.9973$ (รูปที่ 19) พบว่าสารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 4 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลลดลงเมื่อเทียบกับวันที่ 2 (รูปที่ 20) กล่าวได้ว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลอาจเพิ่มขึ้นก่อนในช่วงวันที่ 2 ของการเติมเอลิซิเทอร์ แล้วลดลงในช่วงของวันที่ 2 และวันที่ 4 ของการเติมเอลิซิเทอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าไคโทซาน (HMC และ LMC) และเมทิลจัสโมเนตในแต่ละความเข้มข้น รวมถึงชุดควบคุมมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 253.92-283.92 $\mu\text{g GAE/g FW}$ ของวันที่ 2 และมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 158.69-235.69 $\mu\text{g GAE/g FW}$ ของวันที่ 4



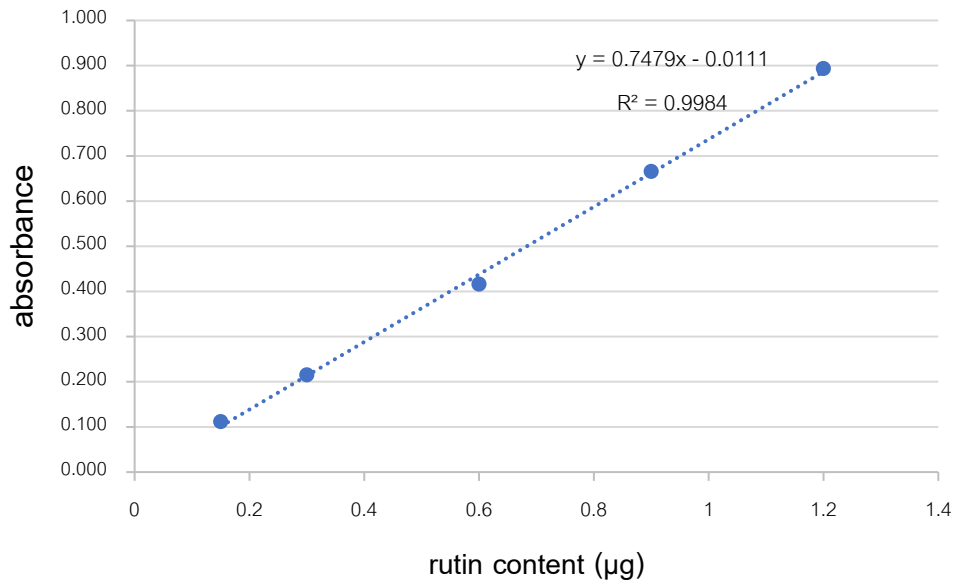
รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid



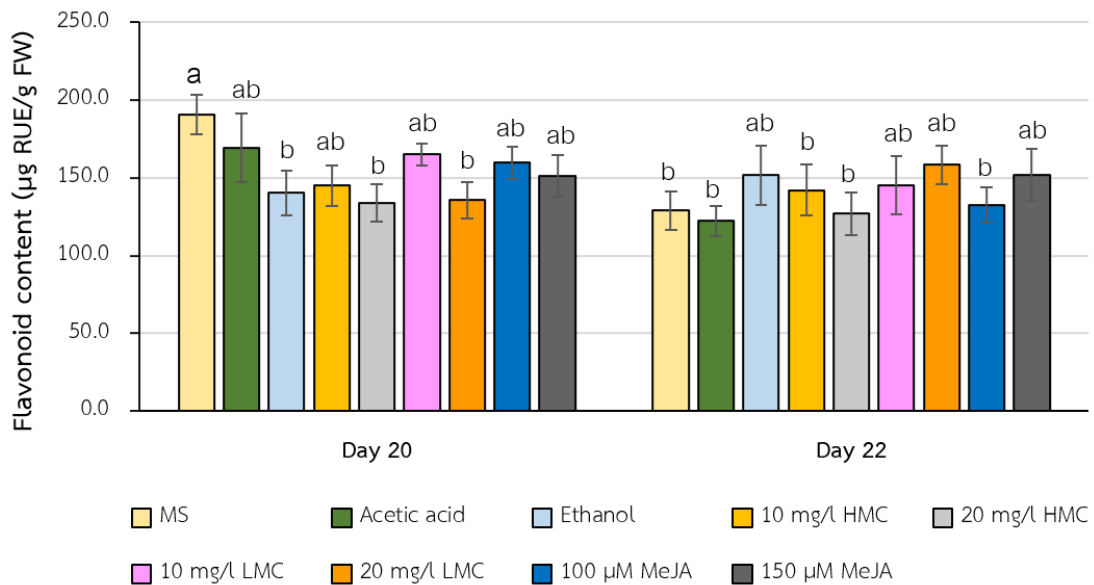
รูปที่ 20 ปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากแคลลัสพักข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว
หมายเหตุ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ของตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่าง
มีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

4.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัส

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัสพักข้าว โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร โดยคิดเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย rutin สมการของกราฟคือ $y = 0.7479x - 0.0111$, $R^2 = 0.9984$ (รูปที่ 21) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 2 และวันที่ 4 หลังจากเติมเอลิสิเทอร์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงดังรูปที่ 22 กล่าวได้ว่าทั้งโคโคซานและเมทิลจัสโมเนตไม่มีผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์



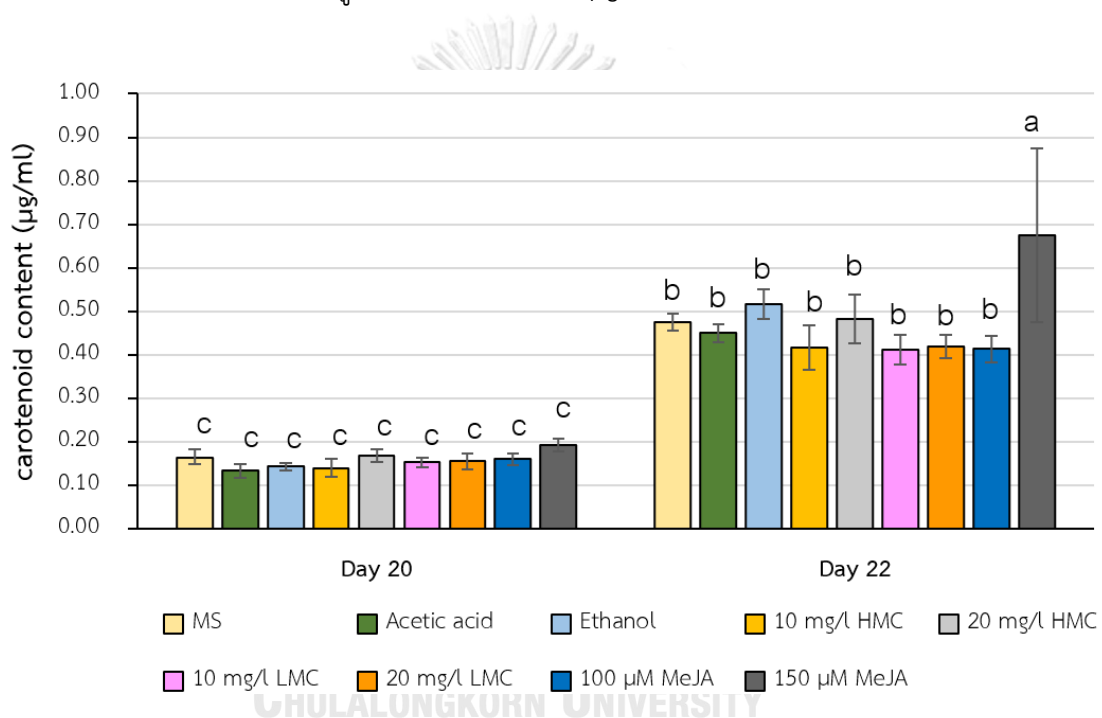
รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลาย rutin



รูปที่ 22 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัสฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว
 หมายเหตุ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ของตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่าง
 มีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

4.3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณของแคโรทีนอยด์ (carotenoid content)

พบว่าสารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 4 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์ (วันที่ 22 ของการเลี้ยงแคลลัส ในอาหารเหลว) สูตรอาหาร MS ที่เติมกรดอะซิติก เอทานอล ไคโทซาน และเมทิลจัสโมเนตในทุก ความเข้มข้นมีปริมาณของแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารสกัดจากแคลลัสของ วันที่ 2 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์ แสดงดังรูปที่ 23 นอกจากนี้ยังพบว่าในแต่ละช่วงเวลาทุกชุดการ ทดลองมีปริมาณของแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ยกเว้นชุดการทดลองที่เติม 150 μM MeJA) โดยค่าเฉลี่ยปริมาณของแคโรทีนอยด์ของวันที่ 2 อยู่ในช่วง 0.134-0.193 $\mu\text{g/ml}$ และปริมาณ ของแคโรทีนอยด์ของวันที่ 4 อยู่ในช่วง 0.411-0.670 $\mu\text{g/ml}$



รูปที่ 23 ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัสฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว หมายเหตุ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ของตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่าง มีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การเตรียมพืชให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ

จากการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดของผักขำด้วย 95% เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที และ 20% Haiter + 0.01% tween 20 เป็นเวลา 20 นาที (Palee, 2016) และนำเมล็ดผักขำที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเพาะเปลือกออก แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบการงอกของเมล็ดเป็น 91.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพ และเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ทั่วไปสำหรับฟอกเมล็ดในพืชหลายชนิด เช่น *Coscinium fenestratum* (Warakagoda and Subasinghe, 2014) และ *Gossypium hirsutum* (Barampuram et al., 2014) โดยต้นอ่อนที่งอกไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และมีความสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนต้นที่เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์คาดว่าเกิดจากสารที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อเข้าไปทำความสะอาดเมล็ดไม่ทั่วถึง อาจยังเหลือเชื้อตรรรอยขรุขระที่ผิวเปลือกหุ้มเมล็ด เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารจึงเกิดการเจริญเติบโตของเชื้อต่าง ๆ ขึ้น หากมีการปรับความเข้มข้นและเวลาให้เหมาะสมกับเมล็ดของพืชแต่ละชนิดก็จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดของพืช เพื่อขยายพันธุ์ต้นพืชหรือการศึกษาต่อยอดในอนาคตได้

5.2 การชักนำแคลลัส

สำหรับในการทดลองนี้ต้องการหาสูตรอาหารที่ดีที่สุดสำหรับชักนำการเกิดแคลลัสผักขำจากเนื้อเยื่อพืช โดยทั่วไปแล้วการเกิดแคลลัสของพืชในห้องทดลองย่อมอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งประกอบไปด้วยออกซินและไซโทไคนินในสัดส่วนที่เหมาะสม (Skoog and Miller, 1975) สำหรับ 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มออกซิน มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ ยับยั้งการเกิดตาข้าง (apical dominant) รวมถึงการพัฒนาของราก (root development) (Perrot-Rechenmann, 2010) ส่วน BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในกลุ่มไซโทไคนิน สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ควบคุมการพัฒนาของส่วนยอดและส่วนราก ยับยั้งการเกิด senescence และกระตุ้นการงอกของเมล็ด (Schmülling, 2013) จากที่ได้กล่าวมาผู้วิจัยจึงเลือกใช้ 2,4-D และ BA เพื่อชักนำการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อผักขำ โดยใช้เนื้อเยื่อพืชส่วนยอดและส่วนข้อของต้นผักขำปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน 2,4-D และ BA ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าสูตรอาหารที่ไม่ได้เติมฮอร์โมน 2,4-D และ BA ทั้งสิ้นส่วนยอดและส่วนข้อเกิดแคลลัสต่ำกว่าสูตรอาหารที่เติมฮอร์โมน เนื่องจากการเกิดแคลลัสต้องอาศัยการชักนำด้วยออกซินและไซโทไคนินในสัดส่วนที่เหมาะสม (Skoog and Miller, 1975) โดยแคลลัสที่ชักนำจากส่วนยอดในอาหารเพาะเลี้ยง

สูตรที่ 2 (0.8 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA) สูตรที่ 3 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.4 mg/l BA) และ สูตรที่ 4 (0.8 mg/l 2,4-D + 0.8 mg/l BA) มีน้ำหนักมากที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองชักนำแคลลัสของ *Momordica tuberosa* ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกับฟักข้าว ซึ่งรายงานว่าการชักนำปล้อง (internode) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วย 0.8 mg/l 2,4-D และ 0.8 mg/l BA สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (Shanmugapriya and Poomima, 2016) แต่ในงานวิจัยนี้ส่วนยอดสามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด อาจกล่าวได้ว่าพืชทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นพืชต่างสปีชีส์กันจึงตอบสนองต่อฮอร์โมนได้ต่างกัน นอกจากนั้น Ikeuchi และคณะในปี 2013 รายงานว่าเนื้อเยื่อเจริญของพืช (meristem) เป็นส่วนที่เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัส เนื่องจากเป็นบริเวณที่เซลล์อยู่ในสภาวะกระตุ้น (active) สามารถพัฒนาไปสู่การเกิดแคลลัสได้ (Ikeuchi *et al.*, 2013) ในส่วนของ homeodomain-containing transcription factor *WUSCHEL* (*WUS*) ซึ่งเป็นโปรตีนที่แสดงออกบริเวณ stem cell organizing center ของเนื้อเยื่อพืชส่วนยอด มีบทบาทช่วยรักษาสภาพเซลล์ให้อยู่ใน undifferentiated state เซลล์จึงไม่พัฒนาไปเป็นอวัยวะอื่นได้ (Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998) นอกจากนั้น Malik ในปี 2003 ได้รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเกิดแคลลัส และ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำจะทำให้พืชเกิดกระบวนการ morphogenesis ดังนั้นในงานวิจัยนี้ 0.8 mg/l 2,4-D จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส (Malik *et al.*, 2003) สำหรับลักษณะของแคลลัสที่เกิดในสูตรอาหารแต่ละสูตรพบว่าด้านนอกของแคลลัสมีลักษณะเป็น friable คือ มีการรวมกลุ่มของเซลล์อย่างหลวม ๆ และด้านในของแคลลัสมีลักษณะเป็น compact คือ การรวมกลุ่มของเซลล์โดยเกาะกลุ่มกันแน่น ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Benítez-García และคณะในปี 2014 ที่ชักนำแคลลัสของ *Tagetes erecta* ด้วย 2,4-D และ BA (Benítez-García *et al.*, 2014) การทดลองในขั้นต่อไป คือ การศึกษาผลของเอลิซิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าว ซึ่งต้องนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว แคลลัสของการทดลองนี้เกิดแบบ friable ที่ด้านนอกขึ้นส่วนพืชและแคลลัสแบบ compact จะเกิดด้านในขึ้นส่วนพืช เมื่อย้ายแคลลัสจากอาหารแข็งลงสู่อาหารเหลว ทำให้แคลลัสด้านนอกหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ และยังมีบางส่วนของแคลลัสที่ยังเกาะกลุ่มกันแน่น ซึ่งอาจทำให้เซลล์ที่อยู่ด้านในนั้นได้รับสารอาหารไม่ทั่วถึง

5.3 ผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

5.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว

เมื่อนำแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.8 mg/l ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.8 mg/l และวัดการเจริญเติบโตด้วยน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของวันที่ 0 4 8 12 16 20 24 และ 28 ผลการทดลองพบว่าแคลลัสเข้าสู่ระยะถดถอย (deceleration stage) หลังวันที่ 16 และเข้าสู่ระยะคงที่ในช่วงวันที่ 20 (stationary stage) ดังนั้นในช่วงหลังวันที่ 16 ถึง 20 จึงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเติมเอลิสิเทอร์ เนื่องจาก deceleration stage เป็นระยะที่มีอัตราการแบ่งเซลล์ลดลงส่งผลให้การเจริญเติบโตช้าลงด้วย อีกทั้งยังเริ่มสะสมสารที่เป็นประโยชน์ต่อเซลล์ หรือสารพิษที่เกิดจากผลผลิตจากเซลล์จากการเจริญเติบโต (Liu *et al.*, 2018) ซึ่งสารเหล่านี้ อาจจะเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารทุติยภูมิในพืช และนอกจากนั้น ยังมีรายงานว่าเมแทบอลิซึมของเซลล์ในระยะนี้สูงกว่า stationary stage ดังนั้น deceleration stage จึงเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการเติมเอลิสิเทอร์ (Buitelaar *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 2006)

5.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

ในการทดลองนี้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน 2 วิธีด้วยกัน คือ DPPH และ ABTS จากผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 4 หลังจากเติมเอลิสิเทอร์ (วันที่ 22 ของการเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว) ในสูตรอาหาร MS และสูตรอาหารที่เติมโคโคซานและเมทิลจัสโมเนต ในทุกความเข้มข้นมีความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 2 หลังจากเติมเอลิสิเทอร์ ซึ่งแต่ละช่วงเวลาหลังเติมเอลิสิเทอร์ ทุกชุดการทดลองมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไม่แตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Ho และคณะในปี 2018 ที่ไม่พบความแตกต่างของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรากของ *Polygonum multiflorum* เมื่อเติมโคโคซานความเข้มข้น 50 100 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในอาหารเพาะเลี้ยง (Ho *et al.*, 2018) แต่การทดลองของ Gabotti ในปี 2019 ได้รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Cannabis sativa* เมื่อเติม 100 μ M MeJA เซลล์มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Gabotti *et al.*, 2019) การทดลองนี้กล่าวได้ว่าเซลล์พืชอาจมีการตอบสนองต่อเอลิสิเทอร์ไปแล้ว ทำให้ไม่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงได้ นอกจากนั้นยังพบว่ากรดอะซิติกซึ่งเป็นสารที่ใช้เตรียมโคโคซาน และเอทานอลซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้เตรียมเมทิลจัสโมเนต ไม่มีผลต่อการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม MS

5.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS

สำหรับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย ABTS ซึ่งมี ABTS⁺ เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีสีฟ้าซึ่งสามารถตรวจสอบได้ทั้ง lipophilic antioxidant และ hydrophilic antioxidant ในขณะที่ DPPH จะใช้ตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี หรือเป็นพวก hydrophobic antioxidant (Kim *et al.*, 2002) กล่าวได้ว่าตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS สามารถวัดได้ครอบคลุมมากกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH (Floegel *et al.*, 2011)

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย ABTS ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากแคลลัสสูตร MS ของวันที่ 2 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์ (วันที่ 20 ของการเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดทดลองอื่น ๆ โดยมีค่าเท่ากับ 337.59 $\mu\text{g TEAC/g FW}$ นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 2 และ 4 หลังเติมเอลิซิเทอร์ชุดทดลองอื่น ๆ ที่เติมกรดอะซิติก เอทานอล ไคโทซาน และ เมทิลจัสโมเนตมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไม่แตกต่างกันทางสถิติ อาจกล่าวได้ว่าทั้งไคโทซานและเมทิลจัสโมเนตไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน Cheng และคณะในปี 2006 รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Cistanche deserticola* ในอาหารที่เติมเอลิซิเทอร์ พบว่า PAL activity (เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการสร้างสารประกอบฟีนอล) ลดลงอย่างรวดเร็วหลังเติมเอลิซิเทอร์ไป 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันลดลงด้วย (Cheng *et al.*, 2006) ซึ่งการเก็บตัวอย่างแคลลัสในช่วงวันที่ 2 และ 4 หลังเติมเอลิซิเทอร์ในการทดลองนี้อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากเซลล์พืชอาจมีการตอบสนองต่อเอลิซิเทอร์ไปแล้ว ทำให้ไม่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงได้

5.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากแคลลัส

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากแคลลัส พบว่าสารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 4 หลังจากเติมเอลิซิเทอร์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลลดลงเมื่อเทียบกับวันที่ 2 (รูปที่ 4) กล่าวได้ว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลอาจเพิ่มขึ้นก่อนในช่วงวันที่ 2 ของการเติมเอลิซิเทอร์ แล้วลดลงในช่วงวันที่ 2 และวันที่ 4 เนื่องจากโมเลกุลของไคโทซาน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ของพวกเห็ดรา (Malerba and Cerana, 2016) สามารถเข้าจับกับเซลล์พืชทำให้เกิดกลไกป้องกันตัวเองของเซลล์พืช โดยส่งผลทางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งยังสามารถชักนำกลไกการป้องกันตัวเองของพืชเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Chung *et al.*, 2016) ซึ่งกลไกการป้องกันตัวเองของพืชอาจเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจึงไม่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่พืชสร้างออกมาป้องกันตัวเองในการทดลองหลังเติมเอลิซิเทอร์แล้ว 2-4 วัน สำหรับเมทิลจัสโมเนตมีรายงานว่ามียาที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการส่งต่อสัญญาณ (signal transduction) ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ป้องกันพืชจากเชื้อโรค (Farmer and Ryan, 1990) ปัจจุบันมีการนำเมทิลจัสโมเนต

มาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เนื่องจากมีคุณสมบัติกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิ (Uppalapati *et al.*, 2005) ซึ่งการตอบสนองของเซลล์จากการเติมเมทิลจัสโมเนตอาจเป็นเช่นเดียวกับการเติมไคโทซาน คืออาจเกิดขึ้นและลดลงก่อนเก็บผลการทดลองในวันที่ 2 และ 4 ทำให้ไม่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงได้

5.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัส

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากแคลลัสฟักข้าว พบว่าผลการทดลองส่วนใหญ่เกือบทั้งหมดของวันที่ 2 และวันที่ 4 หลังจากเติมเอลิซิเตอร์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ Khan และคณะในปี 2019 รายงานว่าแคลลัส *Fagonia indica* ที่เติมไคโทซาน $65.50 \mu\text{M}$ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มปริมาณสารฟลาโวนอยด์ได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Khan *et al.*, 2019) เช่นเดียวกับ Manivannan และคณะในปี 2016 กล่าวว่าเมื่อเติมเมทิลจัสโมเนต 50 100 150 และ $200 \mu\text{M}$ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Scrophularia kakudensis* สามารถเพิ่มปริมาณสารฟลาโวนอยด์ได้ (Manivannan *et al.*, 2016) แต่ผลการทดลองของงานวิจัยนี้ทั้งไคโทซานและเมทิลจัสโมเนตไม่มีผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์หรืออาจเป็นเพราะช่วงเวลาเก็บตัวอย่างแคลลัสไม่เหมาะสม โดยเซลล์พืชอาจมีการตอบสนองต่อเอลิซิเตอร์ไปแล้ว ทำให้ไม่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงได้

5.3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณของแคโรทีนอยด์

การวิเคราะห์หาปริมาณของแคโรทีนอยด์จากแคลลัสฟักข้าว พบว่าสารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 4 หลังจากเติมเอลิซิเตอร์ทุกชุดการทดลอง มีปริมาณของแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารสกัดจากแคลลัสของวันที่ 2 หลังจากเติมเอลิซิเตอร์ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH กล่าวได้ว่าการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในวันที่ 4 อาจเป็นปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแคโรทีนอยด์เป็นสารที่ไม่มีขั้วสามารถละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kim และคณะในปี 2002 ที่กล่าวว่า DPPH จะใช้ตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี (Kim *et al.*, 2002) เป็นไปได้ว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นจากการตรวจสอบด้วย DPPH เป็นปริมาณของแคโรทีนอยด์

ชุดการทดลองที่เติมเอลิสิเทอร์ส่วนใหญ่ให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นใน 150 μM MeJA ที่มีปริมาณของแคโรทีนอยด์มากที่สุด ในวันที่ 4 หลังเติมเอลิสิเทอร์ การทดลองของ Raman และ Ravi ในปี 2011 รายงานว่าปริมาณของแคโรทีนอยด์ของ *Haematococcus pluvialis* ที่ 500 μM MeJA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Raman and Ravi, 2011) จากการทดลองนี้จึงอาจกล่าวได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น MeJA ให้สูงกว่า 150 μM อาจสามารถเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์ในแคลลัสฟักข้าวได้



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาการชักนำแคลลัสฟักข้าวจากต้นปลอดเชื้อในห้องทดลอง พบว่าส่วนยอดที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 0.8 mg/l 2,4-D และ 0.8 mg/l BA มี แนวนอนัมสามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 0.8 mg/l 2,4-D และ 0 mg/l BA รวมทั้งอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 0.8 mg/l 2,4-D และ 0.4 mg/l BA ก็สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีเช่นเดียวกันโดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
2. การศึกษาผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ส่วนใหญ่พบว่าทั้งโคโตซานและเมทิลจัสโมเนต ไม่มีผลเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้งวันที่ 2 และวันที่ 4 หลังการเติมเอลิสิเทอร์ ซึ่งการตอบสนองของเซลล์หลังเติมเอลิสิเทอร์อาจเกิดขึ้นและลดลงก่อนวันที่ 2 หลังการเติม จึงทำให้ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลง ยกเว้นสารสกัดจากแคลลัสในชุดการทดลองที่เติม 150 uM MeJA พบว่าในวันที่ 4 มีปริมาณของแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งข้อมูลจากการทดลองนี้อาจเป็นประโยชน์แก่ผู้ศึกษาผลของเอลิสิเทอร์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแคลลัสฟักข้าวในอนาคตต่อไป

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กรรมกาญจน์ ภมรประวัติ. (2556). *ฟักข้าวพืชพื้นบ้านมากคุณค่า*. กรุงเทพมหานคร: หมอชาวบ้าน

พัชริน ส่งศรี. (2555). ฟักข้าวพืชพื้นบ้านคุณค่าสูงเพื่อสุขภาพ. *แก่นเกษตร*, 40, 1-6.

วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์. (2557). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

<https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/service-knowledge-article-info.php?id=223>

[13 มกราคม 2563]

Ahmed, S. A., and Baig, M. M. (2014). Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 499-504.

Anusha, T. S., Joseph, M. V., and Elyas, K. K. (2016). Callus induction and elicitation of total phenolics in callus cell suspension culture of *Celastrus paniculatus*-willd, an endangered medicinal plant in India. *Pharmacognosy Journal*, 8, 471-475.

Bahabadi, S. E., Sharifi, M., Safaie, N., Murata, J., Yamagaki, T., and Satake, H. (2011). Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. *Plant Biotechnology Reports*, 5, 367-373.

Barampuram, S., Allen, G., and Krasnyanski, S. (2014). Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 118, 179-185.

Bedi, Y. S., Ogra, R. K., Kiran, K., Kaul, B. L., and Kapil, R. S. (1996). Yew (*Taxus* spp.) A new look on utilization, cultivation and conservation. *Supplement to Cultivation and Utilization of Medicinal Plants*, 1, 443-456.

Benítez-García, I., Vanegas-Espinoza, P. E., Meléndez-Martínez, A. J., Heredia, F. J., Paredes-López, O., and Villar-Martínez, A. A. D. (2014). Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17, 107-113.

Boligon, A. A., Machado, M. M., and Athayde, M. L. (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 4, 517-522.

Bonfill, M., Cusidó, R. M., Palazón, J., Piñol, M. T., and Morales, C. (2002). Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 73-78.

- Buitelaar, R. M., Cesário, M. T., and Tramper, J. (1992). Elicitation of thiophene production by hairy roots of *Tagetes patula*. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 2-7.
- Cesari, I. M., Carvalho, E., Figueiredo Rodrigues, M., Mendonça, B. D. S., Amôedo, N. D., and Rumjanek, F. D. (2014). Methyl jasmonate: Putative mechanisms of action on cancer cells cycle, metabolism, and apoptosis. *International Journal of Cell Biology*, 2014, 1-25.
- Chakraborty, M., Karun, A., and Mitra, A. (2009). Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*, 166, 63-71.
- Chang, S. H., Wu, C. H., and Tsai, G. J. (2018). Effects of chitosan molecular weight on its antioxidant and antimutagenic properties. *Carbohydrate polymers*, 181, 1026-1032.
- Cheng, X. Y., Zhou, H. Y., Cui, X., Ni, W., and Liu, C. Z. (2006). Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology*, 121, 253-260.
- Chuethong, J., Oda, K., Sakurai, H., Saiki, I., and Leelamanit, W. (2007). Cochinin B, a novel ribosome-inactivating protein from the seeds of *Momordica cochinchinensis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 428-432.
- Chung, I. M., Rekha, K., Rajakumar, G., and Thiruvengadam, M. (2017). Jasmonic and salicylic acids enhanced phytochemical production and biological activities in cell suspension cultures of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb). *Acta Biologica Hungarica*, 68, 88-100.
- Chung, I. M., Thiruvengadam, M., Rekha, K., and Rajakumar, G. (2016). Elicitation enhanced the production of phenolic compounds and biological activities in hairy root cultures of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, 1-10.
- Chuyen, H. V., Nguyen, M. H., Roach, P. D., Golding, J. B., and Parks, S. E. (2015). Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng.): a rich source of bioactive

- compounds and its potential health benefits. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 567-577.
- Deerobram, J., Chinachit, W., and Songsri., P. (2014). Effects of N6- benzyladenine on Shoot Multiplication of *Momordica cochinchinensis* (Lour) Spreng *in vitro*. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42, 154-159.
- Devesa, R., Moldes, A., Díaz-Fierros, F., and Barral, M. (2007). Extraction study of algal pigments in river bed sediments by applying factorial designs. *Talanta*, 72, 1546-1551.
- Fang, Y., Smith, M., and Pépin, M.-F. (1999). Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium phalae*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35, 106-113.
- Farmer, E. E., Almeras, E., and Krishnamurthy, V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 372-378.
- Farmer, E. E., and Ryan, C. A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 7713-7716.
- Fatemi, F., Abdollahi, M. R., Mirzaie-Asl, A., Dastan, D., and Papadopoulou, K. (2020). Phytochemical, antioxidant, enzyme activity and antifungal properties of *Satureja khuzistanica* *in vitro* and *in vivo* explants stimulated by some chemical elicitors. *Pharmaceutical Biology*, 58, 286-296.
- Firouzi, A., Mohammadi, S. A., Khosrowchahli, M., Movafeghi, A., and Hasanloo, T. (2013). Enhancement of silymarin production in cell culture of *Silybum marianum* (L) Gaertn by elicitation and precursor feeding. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 19, 262-274.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., and Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Food Composition and Analysis*, 24, 1043-1048.
- Fooladi, V. G., Shabani, L., and Razavizadeh, R. (2019). Chitosan enhances rosmarinic acid production in shoot cultures of *Melissa officinalis* L. through the induction of methyl jasmonate. *Botanical Studies*, 60, 1-10.

- Gabotti, D., Locatelli, F., Cusano, E., Baldoni, E., Genga, A., Pucci, L., Consonni, R., and Mattana, M. (2019). Cell suspensions of *Cannabis sativa* (var. Futura): Effect of elicitation on metabolite content and antioxidant activity. *Molecules*, 24, 1-18.
- Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I. D., Nandi, S. K., Rawal, R. S., and Pande, V. (2012). *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. *Industrial Crops and Products*, 39, 1-6.
- Gupta, S., Chauhan, D., Mehla, K., Sood, P., and Nair, A. (2010). An overview of nutraceuticals: current scenario. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 1, 55-62.
- Halliwel, B., Aeschbach, R., Löliger, J., and Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 601-617.
- Ho, T. T., Lee, J. D., Jeong, C. S., Paek, K. Y., and Park, S. Y. (2018). Improvement of biosynthesis and accumulation of bioactive compounds by elicitation in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 102, 199-209.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25, 3159-3173.
- Iqbal, M. S., Iqbal, Z., and Ansari, M. I. (2019). Enhancement of total antioxidants and flavonoid (quercetin) by methyl jasmonate elicitation in tissue cultures of onion (*Allium cepa* L.). *Acta Agrobotanica*, 72, 1-11.
- Islam, S., Bhuiyan, M. R., and Islam, M. N. (2017). Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 25, 854-866.
- Jiao, J., Gai, Q. Y., Wang, X., Qin, Q. P., Wang, Z. Y., Liu, J., and Fu, Y. J. (2018). Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 124, 28-35.
- Jin, J. H., Shin, J. H., Kim, J. H., Chung, I. S., and Lee, H. J. (1999). Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone

- colorants in madder (*Rubia akane* Nakai) cell culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4, 300-304.
- Katerere, D. R., and Eloff, J. N. (2005). Antibacterial and antioxidant activity of *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae), a reputed Anti-HIV/AIDS phytomedicine. *Phytotherapy Research*, 19, 779-781.
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., and Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20, 1-9.
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., Roach, P. D., Parks, S. E., and Stathopoulos, C. (2013). Gac fruit: nutrient and phytochemical composition, and options for processing. *Food Reviews International*, 29, 92-106.
- Khan, T., Khan, T., Hano, C., and Abbasi, B. H. (2019). Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*, 129, 525-535.
- Khojasteh, A., Mirjalili, M. H., Palazon, J., Eibl, R., and Cusido, R. M. (2016). Methyl jasmonate enhanced production of rosmarinic acid in cell cultures of *Satureja khuzistanicain* a bioreactor. *Engineering in Life Sciences*, 16, 740-749.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., and Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food*, 50, 3713-3717.
- Kim, J. H., Shin, J. H., Lee, H. J., Chung, I. S., and Lee, H. J. (1997). Effect of chitosan on indirubin production from suspension culture of *Polygonum tinctorium*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 206-208.
- Kim, O. T., Bang, K. H., Kim, Y. C., Hyun, D. Y., Kim, M. Y., and Cha, S. W. (2009). Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98, 25-33.
- Kim, Y. S., Hahn, E. J., Murthy, H. N., and Paek, K. Y. (2004). Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. *Biotechnology letters*, 26, 1619-1622.

- Klarzynski, O., and Fritig, B. (2001). Stimulation of plant natural defenses. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III. Sciences De La Vie*, 324, 953-963.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J., and Jurgens, G. (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122, 87-96.
- Le, A. V., Huynh, T. T., Parks, S. E., Nguyen, M. H., and Roach, P. D. (2018). Bioactive composition, antioxidant activity, and anticancer potential of freeze-dried extracts from defatted gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) seeds. *Medicines (Basel)*, 5, 1-18.
- Liu, Z. B., Chen, J. G., Yin, Z. P., Shangguan, X. C., Peng, D. Y., Lu, T., and Lin, P. (2018). Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation increase content and yield of chlorogenic acid and its derivatives in *Gardenia jasminoides* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 134, 79-93.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118-126.
- Malerba, M., and Cerana, R. (2016). Chitosan effects on plant systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-15.
- Malerba, M., and Cerana, R. (2019). Recent Applications of Chitin- and Chitosan-Based Polymers in Plants. *Polymers (Basel)*, 11, 1-9.
- Malik, S. I., Rashid, H., Yasmin, T., and Minhas, N. M. (2003). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6, 156-159.
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y. G., and Jeong, B. R. (2016). Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-13.

- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., and Laux, T. (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 95, 805-815.
- Meier, P., Hotti, H., and Rischer, H. (2015). Elicitation of furanocoumarins in poison hemlock (*Conium maculatum* L.) cell culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123, 443-453.
- Mendhulkar, V. D., and Vakil, M. M. A. (2013). Chitosan and *Aspergillus niger* mediated elicitation of total flavonoids in suspension culture of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 4, 731-740.
- Mendoza, D., Cuaspud, O., Arias, J. P., Ruiz, O., and Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, 19, 1-9.
- Milan, E. B., Mandoulakani, B. A., and Kheradmand, F. (2017). The effect of methyl jasmonate on the expression of phenylalanine ammonia lyase and eugenol-o-methyl transferase genes in basil. *Philippines Agricultural Scientist*, 100, 163-167.
- Moro, L., Da Ros, A., da Mota, R. V., Purgatto, E., Mattivi, F., and Arapitsas, P. (2020). LC-MS untargeted approach showed that methyl jasmonate application on *Vitis labrusca* L. grapes increases phenolics at subtropical Brazilian regions. *Metabolomics*, 16, 1-12.
- Muller-Maatsch, J., Sprenger, J., Hempel, J., Kreiser, F., Carle, R., and Schweiggert, R. M. (2017). Carotenoids from gac fruit aril (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) are more bioaccessible than those from carrot root and tomato fruit. *Food Research International*, 99, 928-935.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Palee, J. (2016). Natural Propagation and Micropropagation of *Tupistra albiflora* K. Larsen. *Science and Teachnology RMUTT Journal*, 6, 1-16.

- Palee, J., Dheeranupattana, S., Wangkarn, S., Pyne, S. G., and Ung, A. T. (2016). Effects of chitosan and salicylic acid on stemona alkaloid production in hydroponic culture of *Stemona curtisii* Hook. f. *Chiang Mai Journal of Science*, 43, 1070-1076.
- Pan, Y., Li, L., Xiao, S., Chen, Z., Sarsaiya, S., Zhang, S., ShangGuan, Y., Liu, H., and Xu, D. (2020). Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb.f. using a callus suspension culture. *PLoS One*, 15, 1-14.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 1-15.
- Phansawan, B. (2013). Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. *Journal of Science & Technology, Thammasat University*, 21, 275-286.
- Pisoschi, A. M., and Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1, 1-10.
- Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2007). Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters*, 29, 1143-1146.
- Rahman, M., Mukta, J. A., Sabir, A. A., Gupta, D. R., Mohi-Ud-Din, M., Hasanuzzaman, M., Miah, M. G., Rahman, M., and Islam, M. T. (2018). Chitosan biopolymer promotes yield and stimulates accumulation of antioxidants in strawberry fruit. *PLoS One*, 13, 1-14.
- Raman, V., and Ravi, S. (2011). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 1043-1049.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusido, R. M., and Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21, 1-22.
- Rawat, V., Ghildiyal, A., Singh, L., Jugran, A. K., Bhatt, I. D., Nandi, S. K., and Pande, V. (2019). Methyl jasmonate induced polyphenols and antioxidant production in

- callus suspension culture of *Nardostachys jatamansi*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1, 1-9.
- Reyes-Díaz, M., Lobos, T., Cardemil, L., Nunes-Nesi, A., Retamales, J., Jaakola, L., Alberdi, M., and Ribera-Fonseca, A. (2016). Methyl jasmonate: An alternative for improving the quality and health properties of fresh fruits. *Molecules*, 21, 1-18.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Samari, E., Sharifi, M., Ghanati, F., Fuss, E., and Ahmadian Chashmi, N. (2020). Chitosan-induced phenolics production is mediated by nitrogenous regulatory molecules: NO and PAs in *Linum album* hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140, 563-576.
- Sathiyabama, M., Bernstein, N., and Anusuya, S. (2016). Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). *Industrial Crops and Products*, 89, 87-94.
- Schmülling, T. (2013). Cytokinin. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 1, 627-631.
- Shakya, P., Marslin, G., Siram, K., Beerhues, L., and Franklin, G. (2019). Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71, 70-82.
- Shanmugapriya, R., and Poornima, S. (2016). Callogenetic response of various parts of *Momordica tuberosa* (Cogn) Roxb. *International Journal of Applied Research* 2, 625-627.
- Shilpha, J., Satish, L., Kavikkuil, M., Largia, M. J. V., and Ramesh, M. (2015). Methyl jasmonate elicits the solasodine production and anti-oxidant activity in hairy root cultures of *Solanum trilobatum* L. *Industrial Crops and Products*, 71, 54-64.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91, 31-38.
- Silva, V., Singh, R. K., Gomes, N., Soares, B. G., Silva, A., Falco, V., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Pereira, J. E., Amaral, J. S., et al. (2020). Comparative insight upon

- chitosan solution and chitosan nanoparticles application on the phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of individual grape components of sousao variety. *Antioxidants (Basel)*, 9, 1-14.
- Sivanandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Mariashibu, T. S., Manickavasagam, M., Selvaraj, N., and Ganapathi, A. (2012). Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Industrial Crops and Products*, 37, 124-129.
- Skoog, F., and Miller, C. O. (1975). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-130.
- Soldati, F., and Tanaka, O. (1984). *Panax ginseng*: relation between age of plant and content of ginsenosides. *Planta Medica*, 50, 351-352.
- Srirat, P., Prammanee, S., Sirisansaneeyakul, S., Parakulsuksatid, P., and Vanichsiratana, W. (2017). Callus induction of *Curcuma longa* L. and effect of precursor addition on curcuminoids production. *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, 10, 115-132.
- Tahsili, J., Sharifi, M., Safaie, N., Esmailzadeh-Bahabadi, S., and Behmanesh, M. (2014). Induction of lignans and phenolic compounds in cell culture of *Linum album* by culture filtrate of *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Interactions*, 9, 412-417.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., and Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed Research International*, 2013, 1-11.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., and Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1-12.
- Thiruvengadam, M., Rekha, K., and Chung, I. M. (2016). Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. willd) for the assessment of phenolic compounds and biological activities. *Scientia Horticulturae (Amsterdam)*, 198, 132-141.

- Tran, X. T., Parks, S. E., Roach, P. D., and Nguyen, M. H. (2019). Improved propagation methods for GAC (*Momordica Cochinchinensis* Spreng.). *Experimental Agriculture*, 56, 132-141.
- Uppalapati, S. R., Ayoubi, P., Weng, H., Palmer, D. A., Mitchell, R. E., Jones, W., and Bender, C. L. (2005). The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *The Plant Journal*, 42, 201-217.
- Veraplakorn, V. (2016). Micropropagation and callus induction of *Lantana camara* L.– a medicinal plant. *Agriculture and Natural Resources*, 50, 338-344.
- Verpoorte, R., Contin, A., and Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1, 13-25.
- Wang, J., Qian, J., Yao, L., and Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2, 1-9.
- Warakagoda, P. S., and Subasinghe, S. (2014). *In vitro* seed germination of *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. *Annual Research and Review in Biology*, 4, 3549-3565.
- Wihong, P., Songsri, P., Suriharn, B., Lomthaisong, K., and Lertrat, K. (2014). Lycopene and beta-carotene contents in different spiny bitter gourd (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) clones. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42, 166-171.
- Wimalasiri, D., Piva, T., Urban, S., and Huynh, T. (2015). Morphological and genetic diversity of *Momordica cochinchinensis* (Cucurbitaceae) in Vietnam and Thailand. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63, 19-33.
- Yang, X., Lei, Z., Yu, Y., Xiao, L., Cheng, D., and Zhang, Z. (2019). Phytochemical characteristics of callus suspension culture of *Helicteres angustifolia* L. and its *in vitro* antioxidant, antidiabetic and immunomodulatory activities. *South African Journal of Botany*, 121, 178-185.
- Yi, T. G., Park, Y., Park, J.-E., and Park, N. I. (2019). Enhancement of phenolic compounds and antioxidative activities by the combination of culture medium and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Lactuca indica* L. *Natural Product Communications*, 14, 1-9.

- Young, I. S., and Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.
- Yu, J. S., Sahar, N. E., Bi, Y. R., Jung, K., Pang, C., Huh, J. Y., and Kim, K. H. (2020). The effects of triterpenoid saponins from the seeds of *Momordica cochinchinensis* on adipocyte differentiation and mature adipocyte inflammation. *Plants (Basel)*, 9, 1-10.
- Zabala, M. A., Angarita, M., Restrepo, J. M., Caicedo, L. A., and Perea, M. (2010). Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 46, 233-238.
- Zhang, C. H., Mei, X. G., Liu, L., and Yu, L. J. (2000). Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters* 22, 1561-1564.
- Zhang, L. (2007). Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Planta*, 225, 887-896.
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., and Franco, C. (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, 162, 459-468.
- Zhao, J. L., Zhou, L. G., and Wu, J. Y. (2010). Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 137-144.

ภาคผนวก

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสพักข้าวที่ชักนำจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นพักข้าว
บนอาหารแข็ง 12 สูตร (กรัม)

	N	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
1S	18	.035700	.0041343	.026977	.044423	.0122	.0649
1N	18	.056144	.0043916	.046879	.065410	.0148	.0820
2S	18	.551411	.1010673	.338178	.764645	.1863	2.0461
2N	18	.239044	.0364251	.162194	.315895	.0933	.5681
3S	18	.521689	.0670993	.380122	.663256	.1289	1.1954
3N	18	.261106	.0424617	.171519	.350692	.0612	.6581
4S	18	.578989	.0935747	.381563	.776414	.0586	1.2919
4N	18	.309689	.0466086	.211353	.408024	.1003	.6896
5S	18	.288822	.0481544	.187225	.390419	.0743	.6099
5N	18	.119900	.0140249	.090310	.149490	.0578	.2767
FW	18	.135217	.0175419	.098206	.172227	.0387	.2840
6N	18	.203289	.0273534	.145578	.260999	.1000	.4776
7S	18	.369922	.0463201	.272195	.467649	.0722	.6582
7N	18	.230989	.0217279	.185147	.276831	.1433	.5285
8S	18	.108806	.0180282	.070769	.146842	.0257	.3404
8N	18	.062878	.0049145	.052509	.073246	.0229	.0942
9S	18	.148311	.0167917	.112884	.183739	.0611	.3069
9N	18	.121722	.0130841	.094117	.149327	.0438	.2181
10S	18	.110022	.0148944	.078598	.141447	.0149	.2163
10N	18	.179894	.0569624	.059714	.300075	.0261	1.1146
11S	18	.230533	.0263888	.174858	.286209	.0824	.4280
11N	18	.100056	.0081656	.082828	.117283	.0517	.1725
12S	18	.225894	.0330076	.156255	.295534	.0809	.4917
12N	18	.123811	.0197808	.082077	.165545	.0466	.3107
Total	432	.221410	.0109509	.199886	.242934	.0122	2.0461

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของแคลลัสพืชข้าวที่ชักนำจากส่วนยอดและส่วนข้อของต้นพืชข้าว
บนอาหารแข็ง 12 สูตร (กรัม)

	N	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
1S	18	.003578	.0005610	.002394	.004761	.0007	.0095
1N	18	.006939	.0005821	.005711	.008167	.0023	.0110
2S	18	.053583	.0099513	.032588	.074579	.0191	.2011
2N	18	.026344	.0039753	.017957	.034732	.0104	.0611
3S	18	.052394	.0059194	.039906	.064883	.0111	.1085
3N	18	.030083	.0046756	.020219	.039948	.0071	.0803
4S	18	.061756	.0088666	.043049	.080462	.0081	.1291
4N	18	.032317	.0039192	.024048	.040585	.0130	.0666
5S	18	.032889	.0047756	.022813	.042964	.0111	.0645
5N	18	.022783	.0055616	.011049	.034517	.0080	.1110
6S	18	.017078	.0018773	.013117	.021039	.0058	.0347
6N	18	.025361	.0036425	.017676	.033046	.0108	.0612
7S	17	.037494	.0036073	.029847	.045141	.0105	.0576
7N	19	.024837	.0028536	.018842	.030832	.0105	.0674
8S	18	.011450	.0022727	.006655	.016245	.0025	.0447
8N	18	.007383	.0005774	.006165	.008602	.0029	.0116
9S	18	.018972	.0023444	.014026	.023918	.0084	.0423
9N	18	.017394	.0018396	.013513	.021276	.0058	.0311
10S	18	.011889	.0016661	.008374	.015404	.0020	.0278
10N	18	.026311	.0050591	.015637	.036985	.0045	.0770
11S	18	.024156	.0023909	.019111	.029200	.0093	.0420
11N	18	.011311	.0008835	.009447	.013175	.0058	.0186
12S	18	.026172	.0030023	.019838	.032507	.0124	.0534
12N	18	.014328	.0022301	.009623	.019033	.0011	.0299
Total	432	.024838	.0010896	.022696	.026979	.0007	.2011

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดที่ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว (กรัม)

	N	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
day0	6	.195000	.0034157	.186220	.203780	.1800	.2000
day4	6	.267717	.0016714	.263420	.272013	.2625	.2725
day8	6	.351517	.0180492	.305120	.397914	.2909	.3972
day12	6	.425033	.0364855	.331244	.518822	.3014	.5467
day16	6	.612500	.0505785	.482484	.742516	.4703	.7804
day20	6	.760750	.0522111	.626537	.894963	.5868	.8955
Day24	6	.690533	.0172305	.646241	.734826	.6281	.7444
Day28	6	.713883	.0713033	.530592	.897174	.5007	1.0015
Total	48	.502117	.0325752	.436584	.567650	.1800	1.0015

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งที่ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารเหลว (กรัม)

	N	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
day0	6	.012617	.0006824	.010863	.014371	.0106	.0152
day4	6	.028583	.0013661	.025072	.032095	.0246	.0332
day8	6	.042333	.0019814	.037240	.047427	.0351	.0471
day12	6	.045483	.0047615	.033244	.057723	.0318	.0659
day16	6	.062483	.0022461	.056710	.068257	.0516	.0669
day20	6	.080667	.0033039	.072174	.089160	.0657	.0888
day24	6	.080383	.0056167	.065945	.094821	.0616	.0970
day28	6	.078500	.0044892	.066960	.090040	.0608	.0912
Total	48	.053881	.0036935	.046451	.061312	.0106	.0970

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ($\mu\text{g TEAC/g FW}$)

	N	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
2MS	6	170.9717	22.61082	112.8487	229.0946	95.33	223.07
2A	6	154.8883	31.84592	73.0258	236.7509	48.64	225.36
2E	6	121.4400	41.75699	14.1002	228.7798	11.55	225.36
2-10H	6	140.7700	40.75569	36.0042	245.5358	36.45	241.82
2-20H	6	120.3283	41.44428	13.7924	226.8642	17.59	219.94
2-10L	6	137.3483	42.25316	28.7331	245.9635	21.97	244.74
2-20L	6	118.6617	36.94689	23.6867	213.6367	32.18	225.15
2-100M	6	101.5033	34.73333	12.2185	190.7882	11.55	182.43
2-150M	6	109.2817	37.08003	13.9644	204.5989	1.33	201.81
4MS	6	309.9450	6.87048	292.2839	327.6061	292.28	336.99
4A	6	312.9483	6.89902	295.2138	330.6828	295.09	336.99
4E	6	297.2483	9.61875	272.5225	321.9741	263.73	325.52
4-10H	6	309.4917	7.83358	289.3548	329.6285	279.25	335.11
4-20H	6	309.0250	8.86121	286.2465	331.8035	291.45	348.45
4-10L	6	287.5050	8.58934	265.4254	309.5846	264.46	311.77
4-20L	6	285.6633	9.46466	261.3337	309.9930	252.47	321.04
4-100M	6	245.5950	11.23623	216.7114	274.4786	212.04	279.25
4-150M	6	262.0417	9.15823	238.4997	285.5836	238.51	299.47
Total	108	210.8143	9.92637	191.1364	230.4921	1.33	348.45

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ($\mu\text{g TEAC/g FW}$)

	N	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
2MS	6	337.59000	2.415878	331.37979	343.80021	327.260	342.900
2A	6	272.80667	4.982502	259.99874	285.61460	252.770	287.890
2E	6	292.62167	15.731553	252.18242	333.06091	224.780	326.300
2-10H	6	266.66500	18.998428	217.82799	315.50201	199.890	323.410
2-20H	6	280.04333	3.203504	271.80846	288.27820	272.650	290.210
2-10L	6	283.93667	7.759493	263.99025	303.88308	260.680	308.160
2-20L	6	274.86667	5.373755	261.05299	288.68034	261.070	295.610
2-100M	6	301.01833	8.767179	278.48158	323.55508	272.070	326.690
2-150M	6	277.31000	10.786149	249.58332	305.03668	237.710	305.650
4MS	6	288.76167	10.621813	261.45743	316.06591	253.150	324.180
4A	6	264.67000	9.562574	240.08862	289.25138	228.640	296.190
4E	6	280.43000	5.215674	267.02268	293.83732	264.930	301.600
4-10H	6	295.54833	12.094475	264.45850	326.63817	263.580	341.930
4-20H	6	276.21500	10.134594	250.16320	302.26680	254.700	323.980
4-10L	6	293.49000	15.409339	253.87903	333.10097	235.590	343.670
4-20L	6	296.86833	15.688929	256.53866	337.19801	229.610	345.020
4-100M	6	257.36833	10.548153	230.25344	284.48322	226.330	295.810
4-150M	6	259.00667	12.327222	227.31853	290.69480	211.270	303.330
Total	108	283.28981	2.951981	277.43786	289.14177	199.890	345.020

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{g GAE/g FW}$)

	N	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
2MS	6	251.6183	16.66880	208.7698	294.4668	197.28	296.87
2A	6	263.4783	21.72103	207.6426	319.3140	203.98	323.21
2E	6	288.8900	21.14638	234.5315	343.2485	242.91	364.45
2-10H	6	253.9283	19.32713	204.2464	303.6103	180.53	317.20
2-20H	6	245.0517	16.43882	202.7943	287.3090	191.96	307.50
2-10L	6	283.9283	6.25730	267.8434	300.0132	267.64	302.07
2-20L	6	263.3033	15.33168	223.8920	302.7147	208.25	307.03
2-100M	6	274.3200	11.94148	243.6234	305.0166	227.20	308.19
2-150M	6	272.9917	16.81007	229.7800	316.2033	226.05	339.50
4MS	6	232.1550	23.91716	170.6740	293.6360	157.01	322.07
4A	6	196.6917	23.10449	137.2997	256.0836	140.23	306.24
4E	6	241.3617	36.65986	147.1245	335.5988	131.80	376.97
4-10H	6	196.3283	23.38846	136.2064	256.4503	120.04	272.27
4-20H	6	190.6433	26.17202	123.3660	257.9206	126.92	294.79
4-10L	6	158.6933	9.80492	133.4890	183.8977	127.36	183.20
4-20L	6	187.4600	36.92016	92.5537	282.3663	95.32	275.09
4-100M	6	235.6950	32.19982	152.9227	318.4673	108.24	333.92
4-150M	6	221.7967	14.17301	185.3638	258.2295	187.09	281.93
Total	108	236.5742	5.96027	224.7586	248.3897	95.32	376.97

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ($\mu\text{g RUE/g FW}$)

	N	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval		Min	Max
				for Mean			
				Lower Bound	Upper Bound		
2MS	6	190.75436	12.542165	158.51370	222.99502	145.239	221.676
2A	6	169.59140	22.136755	112.68706	226.49574	115.185	272.841
2E	6	140.28217	14.277597	103.58044	176.98391	103.121	198.381
2-10H	6	145.01394	13.139249	111.23843	178.78945	102.913	184.549
2-20H	6	133.67850	12.120065	102.52288	164.83412	111.129	190.061
2-10L	6	165.27561	7.098399	147.02860	183.52263	134.944	187.357
2-20L	6	135.79306	11.612196	105.94296	165.64316	104.265	175.710
2-100M	6	159.67722	10.657977	132.28002	187.07442	116.745	194.533
2-150M	6	151.21897	13.522715	116.45772	185.98021	116.745	194.533
4MS	6	128.87667	12.162001	97.61325	160.14009	100.830	181.120
4A	6	122.18667	9.661180	97.35181	147.02152	98.550	164.890
4E	6	151.87667	19.004614	103.02375	200.72958	98.650	226.460
4-10H	6	142.08500	16.365082	100.01722	184.15278	92.510	204.930
4-20H	6	127.00500	13.727736	91.71673	162.29327	75.150	171.030
4-10L	6	145.27333	18.625854	97.39405	193.15262	87.520	210.240
4-20L	6	158.27500	12.565444	125.97450	190.57550	124.650	214.920
4-100M	6	132.65667	11.201014	103.86354	161.44979	99.070	175.610
4-150M	6	152.10333	16.683921	109.21595	194.99072	101.670	223.440
Total	108	147.31242	3.466212	140.44106	154.18378	75.150	272.841

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ($\mu\text{g/ml}$)

	N	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
2MS	6	.16450	.016217	.12281	.20619	.105	.213
2A	6	.13400	.015623	.09384	.17416	.061	.170
2E	6	.14333	.008515	.12144	.16522	.104	.163
2-10H	6	.14017	.020835	.08661	.19372	.072	.213
2-20H	6	.16867	.013875	.13300	.20433	.121	.219
2-10L	6	.15333	.010899	.12532	.18135	.110	.178
2-20L	6	.15567	.018266	.10871	.20262	.082	.205
2-100M	6	.16083	.013778	.12542	.19625	.105	.196
2-150M	6	.19333	.014364	.15641	.23026	.159	.248
4MS	6	.47483	.018886	.42628	.52338	.409	.525
4A	6	.45050	.020818	.39699	.50401	.392	.510
4E	6	.51667	.033418	.43076	.60257	.360	.573
4-10H	6	.41633	.050534	.28643	.54623	.289	.634
4-20H	6	.48267	.054953	.34141	.62393	.347	.702
4-10L	6	.41150	.034295	.32334	.49966	.296	.557
4-20L	6	.41967	.026813	.35074	.48859	.357	.536
4-100M	6	.41383	.030804	.33465	.49302	.336	.538
4-150M	6	.67600	.199524	.16311	1.18889	.324	1.622
Total	108	.31532	.020011	.27566	.35499	.061	1.622

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สุพรรณษา พลายเปี่ยม
วัน เดือน ปี เกิด	20 กรกฎาคม 2537
สถานที่เกิด	เพชรบุรี
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และเข้าศึกษาต่อหลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่ง ได้รับการสนับสนุนด้านการศึกษาจากโครงการพัฒนากำลังคนด้าน วิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ทั้งในระดับปริญญา บัณฑิตและปริญญาามหาบัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 25 ม.11 ต.หัวสะพาน อ.เมือง จ.เพชรบุรี 76000
ผลงานตีพิมพ์	ตีพิมพ์ในเอกสารรวมเรื่องเต็ม การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 4 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา