



การตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro.) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการวิเคราะห์พหุคูณเคมีในไผ่ 9 สปีชีส์



โดย
นางสาวเพ็ญภา การะเวก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

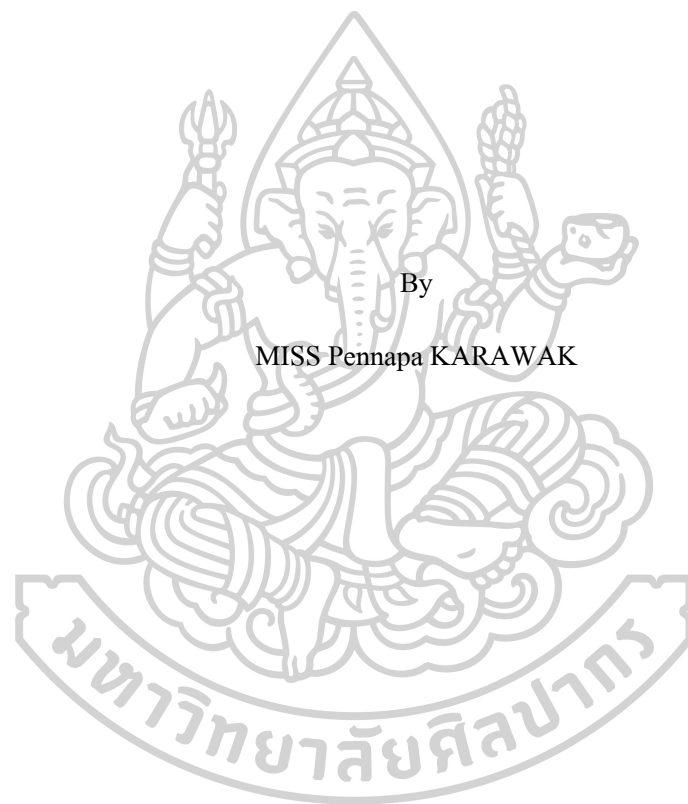
การตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro.) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการวิเคราะห์พหุคูณเคมีในไผ่ 9 สปีชีส์



โดย
นางสาวเพ็ญภา การะเวก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

GENETIC STABILITY TESTING OF *IN VITRO*-DERIVED PLANTLETS OF PAI
SANG MON “NUAN RAJINEE” (*DENDROCALAMUS SERICEUS* MUNRO.) AND
PHYTOCHEMICAL ANALYSIS IN NINE BAMBOO SPECIES



By

MISS Pennapa KARAWAK

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Doctor of Philosophy BIOLOGY

Department of BIOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2020

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” (<i>Dendrocalamus sericeus</i> Munro.) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการวิเคราะห์พฤษเคมีในไผ่ 9 สปีชีส์
โดย	เพ็ญนภา การะเวก
สาขาวิชา	ชีววิทยา แบบ 1.1 ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณัญญา เล็งสาย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาคุษฎีบัณฑิต

	คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)	
พิจารณาเห็นชอบโดย	
	ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิภาห์ ตุ่มน้อย)	
	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณัญญา เล็งสาย)	
	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรัณยพร มากทรัพย์)	
	ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา)	

60303801 : ชีววิทยา แบบ 1.1 ปรัชญาคุณฐิบัณฑิต

คำสำคัญ : ไม้ซางหม่น "นวลราชินี", การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ความเสถียรทางพันธุกรรม, สารพิษเคมี

นางสาว เพ็ญภา การะเวก: การตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของไม้ซางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro.) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการวิเคราะห์พิษเคมีในไม้ 9 สปีชีส์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณฉูญา เส็งสาย

ไม้ซางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro.) เป็นไม้ที่มีลำต้นตรงและเนื้อไม้หนา นิยมนำมาใช้ในงานก่อสร้าง และทำเฟอร์นิเจอร์ ส่งผลให้ความต้องการลำไม้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในสวนใบของไม้หลายชนิดมีสารพิษเคมีที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการค้าได้ เช่น สารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดในไม้ซางหม่น “นวลราชินี” จากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมถึงพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดทวีคูณ และตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของต้น ไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับต้นแม่จากแปลงปลูกด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารพิษเคมีในสารสกัดจากใบไม้ 9 สปีชีส์ และเปรียบเทียบวิธีการจำแนกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC ผลจากการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนข้อไม้ที่เก็บในช่วงฤดูหนาวมี % การปลดเชื้อ และ % การแตกยอดจากข้อที่ปลดเชื้อสูงที่สุดเท่ากับ 83.5% และ 100% ตามลำดับ เมื่อนำส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog’s (MS) ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ thidiazuron (TDZ) 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำการเกิดยอดเฉลี่ย (5.0 ยอด) และความยาวยอด (2.79 เซนติเมตร) ได้สูงที่สุด ส่วนการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอด 4.2-11.9 ยอด โดยมีความยาวยอด 2.69-2.99 เซนติเมตร ยอดมีสีเขียวและมีลักษณะสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม $AdSO_4$ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ PVP-40 ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้น ไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นที่มีการย้ายลงอาหารใหม่ทุกๆ 3 สัปดาห์ รวมทั้งสิ้น 8 รอบการย้ายอาหาร (8 subcultures) เปรียบเทียบกับต้นแม่ที่เก็บจากแปลงปลูกด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์รวม 15 ชนิด (RAPD primer 7 ชนิด และ HAT-RAPD primer 8 ชนิด) ซึ่งให้จำนวนแถบดีเอ็นเอรวม 84 แถบ (ขนาด 300-3000 คู่เบส) พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่แตกต่างจากต้นแม่ที่เก็บจากแปลงปลูก สำหรับผลการศึกษาปริมาณสารพิษเคมีในใบไม้รวม 9 สปีชีส์ ได้แก่ ไม้ซางหม่น “นวลราชินี” ไม้คำ ไม้ปักกิ่ง ไม้กุ่มซุง ไม้เลื้อย ไม้รวก ไม้หวานปราจีน ไม้หน้าเต้า และไม้เหลือง ที่สกัดด้วย 60% เอทานอล พบว่าใบไม้ปักกิ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (5.59 ± 0.14 mg GAE/g DW) สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

(25.72 ± 3.20 mM QE/g DW) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (0.61 ± 0.24 $\mu\text{mol/g}$ DW) สูงที่สุด ส่วนผลการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนโกลโคไซด์โดยใช้สารมาตรฐาน 4 ชนิด ได้แก่ isovitexin, vitexin, isoorientin และ orientin ด้วยเทคนิค TLC พบว่าสารสกัดจากใบไผ่ปักกิ่ง ไผ่ชางหม่น และไผ่ดำ มีแถบของสารกลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์สูงที่สุด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนโกลโคไซด์ในไผ่ 3 สปีชีส์ ดังกล่าวด้วยเทคนิค HPLC ปรากฏว่าสารสกัดจากใบไผ่ปักกิ่งมีปริมาณ orientin (6.68 $\mu\text{g/ml}$) และ vitexin (2.81 $\mu\text{g/ml}$) สูงกว่าไผ่ชางหม่นและไผ่ดำอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วน isoorientin (2.18 $\mu\text{g/ml}$) และ isovitexin (2.05 $\mu\text{g/ml}$) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



60303801 : Major BIOLOGY

Keyword : Pai Sang Mon "Nuan Rajinee", In vitro culture, Genetic stability, Phytochemical content

MISS PENNAPA KARAWAK : GENETIC STABILITY TESTING OF *IN VITRO*-DERIVED PLANTLETS OF PAI SANG MON “NUAN RAJINEE” (*DENDROCALAMUS SERICEUS* MUNRO.) AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS IN NINE BAMBOO SPECIES
THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR SUPANYIKA SENGSAI, Ph.D.

Pai Sang Mon “Nuan Rajinee” (*Dendrocalamus sericeus* Munro.) has a straight and thick culms. The demand of Pai Sang Mon culms has been increased, because its culms are very useful for building construction and furniture making. In addition, many reports showed bamboo leaves contained phytochemicals such as phenolic compounds and flavonoid compounds, that has a potential for commercial uses. From those reasons, this research aimed to investigate the appropriate culture media for shoot induction of Pai Sang Mon from nodal segments and enhanced culture media for shoot multiplication. The genetic stability of *in vitro* raised Pai Sang Mon plantlets was compared with mother plant using RAPD and HAT-RAPD techniques. Furthermore, leave of nine bamboo species (Pai Sang Mon, Pai Pak King, Pai Dum, Pai Wan Prachin, Pai Lieng, Pai Ruak, Pai Lueang, Pai Namtao and Pai Kim Sung) were investigated to determine the quantities of phytochemicals containing. The results showed that the highest percentage of sterile (83.5%) and the highest percentage of bud-break (100%) were found in the explants which were collected in winter season. The nodal segments which were cultured on a solid medium of Murashige and Skoog's (MS) supplemented with 1.0 mg/l BA and 0.2 mg/l thidiazuron (TDZ) for 3 weeks produced the highest shoots number (5.0 shoots) and the highest shoots length (2.79 cm.). Greenish and healthy shoots multiplication was found when the shoot clumps were cultured on MS medium containing 0.5-1.0 mg/l BA alone or in combination with 0.1 mg/l TDZ, in which the shoot number were 4.2-11.9 shoots and the shoot length were 2.69-2.99 cm. In addition, this research found that the culture media supplemented with 40 mg/l AdSO₄, 500 mg/l L-proline, or 200 mg/l PVP-40 increased the efficiency of shoot multiplication. For genetic stability testing, plantlets from nodal segments, which were transferred to fresh medium every 3 weeks for 8 subcultures, were collected. The DNA fingerprint of Pai Sang Mon plantlets was compared with their mother plant using RAPD and HAT-RAPD techniques. Fifteen of primers (7 RAPD primers and 8 HAT-RAPD primers) produced a total of 84 bands (300-3,000 bp in size). Genetic stability of the *in vitro*-derived Pai Sang Mon plant was found, that implied the true-to-type plant characteristic of clones. For phytochemicals content study, leaves of nine bamboo species were extracted with 60% ethanol. The results showed that bamboo leaf extract (BLE) of Pai Pak King contained the highest of total phenolic contents (5.59±0.14 mg GAE/g DW), total

flavonoid contents (25.72 ± 3.20 mM QE/g DW) and antioxidant activity (0.61 ± 0.24 μ mol/g DW). Nine bamboo leaf extracts were also studied for the determination of flavone-C-glycosides (standard: isovitexin, vitexin, isoorientin and orientin) using TLC technique. The flavone C-glycoside band showed the highest intensity in Pai Pak King, Pai Sang Mon and Pai Dum, respectively. The three bamboo species were selected to analyze the flavone glycosides by HPLC technique. It was found that BLE of Pai Pak King significantly ($P < 0.05$) contained higher orientin (6.68 μ g/ml) and vitexin content (2.81 μ g/ml) ($P < 0.05$) than Pai Sang Mon and Pai Dum, while the contents of isoorientin (2.18 μ g/ml) and isovitexin (2.05 μ g/ml) were not significant differences.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณฉีกา เสี่ยงสาย ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรัณยพร มากทรัพย์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิภาห์ ตุ่มน้อย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จีร์รัตน์ มงคลศิริวัฒนา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สละเวลา เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำและตรวจสอบข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้ดียิ่งขึ้น และรองศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ ที่ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนการถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ในการดำเนินงานวิจัย และอาจารย์ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณความอนุเคราะห์ตัวอย่างพี่ชจากรองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ทองภักดี และคุณประสาน สุขสุทธิ สำนักงานเกษตรจังหวัดสระแก้ว และวิสาหกิจชุมชนนวัตกรรมไผ่ บ้านเกาะรัง อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว

ขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านที่คอยให้การช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์การทดลองและการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ เพื่อน ๆ ที่คอยให้กำลังใจและให้คำปรึกษาในการทำการทดลองตลอดจนผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำวิจัยครั้งนี้

เพ็ญญา การะเวก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ	ฉ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
สมมติฐานของการศึกษา.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ขอบเขตการศึกษา.....	3
บทที่ 2	5
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. ไม้	5
1.1 สกุล ไม้ตง (<i>Dendrocalamus</i> Nees)	6
1.2 สกุล ไม้ญี่ปุ่น (<i>Phyllostachys</i> Siebold & Zucc.).....	7
1.3 สกุล ไม้รวก (<i>Thyrsostachys</i> Gamble)	7
1.4 สกุล ไม้ป่า (<i>Bambusa</i> Schreb.).....	8
2. ไม้ซางหม่น “นวลราชินี”	9
2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม้สกุล <i>Dendrocalamus</i>	11

2.2 สารควบคุมการเติบโตและสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม้สกุล	
<i>Dendrocalamus</i>	13
3. อนุมูลอิสระ (free radicals)	16
4. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants).....	17
5. สารพฤษเคมีที่พบในไม้.....	17
5.1 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds).....	18
5.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid compounds).....	21
6. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers).....	25
7. อาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA; RAPD) และแฮตอาร์เอพีดี (High annealing temperature - random amplified polymorphic DNA; HAT-RAPD)	27
8. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไม้.....	28
บทที่ 3	30
วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
วัสดุและอุปกรณ์.....	30
1. พืชทดลอง.....	30
2. สารเคมี	30
3. เครื่องมือ	32
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	34
1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ขางหม่น “นวลราชินี”	34
1.1 การศึกษาการปนเปื้อนและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในช่วงเวลาการเก็บที่แตกต่างกัน	34
1.2 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตในอาหารสูตร MS ที่มีผลต่อการแตกยอดจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้น.....	35
1.3 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ	35

1.4 การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ในสภาพกึ่งแข็งและเหลวต่อการชักนำให้เกิดยอด ทิวคูณ	36
1.5 การศึกษาผลของอะดีนีนซัลเฟต (AdSO ₄) ต่อการเกิดยอดทิวคูณของกลุ่มยอด	37
1.6 การศึกษาผลของสารส่งเสริมการเติบโตของพืชต่อการเกิดยอดทิวคูณ	38
1.7 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดคลัสต์	38
1.8 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดในคลัสต์	39
1.9 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก.....	40
2. การตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมในไม้ชำหม่น “นวลราชินี”	41
2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช	41
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	41
2.3 การสกัดดีเอ็นเอ.....	42
2.4 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ	42
2.5 การคัดเลือกลำพรเมอร์ด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และ HAT-RAPD	43
2.6 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD.....	44
3. การศึกษาสารฟลูกษเคมีในสารสกัดจากใบไม้ทั้ง 9 สปีชีส์.....	46
3.1 การเตรียมตัวอย่างพืช	46
3.2 การสกัดใบไม้ชำหม่น “นวลราชินี” ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	46
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric....	46
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric...47	47
3.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging	47
3.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินโดยวิธี pH-differential	48
3.7 การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)	48

3.8 การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	49
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	49
บทที่ 4	50
ผลการทดลอง	50
1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ชางหม่น “นวลราชินี”	50
1.1 การศึกษาการปนเปื้อนและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในช่วงเวลาการเก็บที่แตกต่างกันในรอบปี	50
1.2 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตในอาหารสูตร MS ที่มีผลต่อการแตกยอดจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้น	53
1.3 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ	57
1.4 การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ในสภาพกึ่งแข็งและเหลวต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ	61
1.5 การศึกษาผลของอะดีนีนซัลเฟต (AdSO ₄) ต่อการเกิดยอดทวีคูณของกลุ่มยอด	66
1.6 การศึกษาผลของสารส่งเสริมการเติบโตของพืชต่อการเกิดยอดทวีคูณ	69
1.7 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดกัลลัส	74
1.8 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดในกัลลัส	78
1.9 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก	82
2. การทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี”	93
2.1 ตัวอย่างชิ้นส่วนพืชจากต้นในแปลงและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ	93
2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ	93
2.3 การคัดเลือกไพรเมอร์ด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ HAT-RAPD	96
2.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD	99
3. การวิเคราะห์สารพฤษเคมีในใบไผ่ 9 สปีชีส์	105

3.1 ผลการสกัดใบไผ่ขางหม่นในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	105
3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ในใบไผ่ 9 สปีชีส์ที่แตกต่างกัน	106
3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมโดยวิธี Aluminum chloride colorimetric	107
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินโดยวิธี pH-differential	108
3.5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging	109
3.6 การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)	111
3.7 การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	112
บทที่ 5	116
สรุปและอภิปรายผล	116
1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ขางหม่น “นวลราชินี”	116
1.1 การศึกษาการปนเปื้อนและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว ที่แตกต่างกัน	116
1.2 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตในอาหารสูตร MS ที่มีผลต่อการแตกยอดจากชิ้นส่วน ข้อเริ่มต้น	117
1.3 การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ในสภาพกึ่งแข็งและเหลวต่อการชักนำให้เกิดยอด ทวีคูณและสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของไผ่ขาง หม่น “นวลราชินี”	119
1.4 การศึกษาผลของอะดีนีนซัลเฟต (AdSO ₄) ต่อการเกิดยอดทวีคูณของกลุ่มยอดไผ่ขาง หม่น “นวลราชินี”	122
1.5 การศึกษาผลของสารส่งเสริมการเติบโตของพืชต่อการเกิดยอดทวีคูณของไผ่ขางหม่น “นวลราชินี”	124

1.6 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตและสารส่งเสริมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิด กัลลัสและยอดในกลุ่มกัลลัส	125
1.7 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก.....	126
2. การศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” เมื่อทำการขยายพันธุ์ด้วย วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	129
3. การวิเคราะห์สารพฤษเคมีในสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์	133
3.1 การศึกษาการสกัดใบไผ่ชางหม่นในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน.....	133
3.2 การศึกษาสารพฤษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระของการสกัดใบไผ่ทั้ง 9 สปีชีส์ ด้วย สารละลายเอทานอล.....	135
3.3 การศึกษาการจำแนกสารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ในสารสกัดจากใบไผ่ ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC.....	137
ภาคผนวก	139
รายการอ้างอิง	189
ประวัติผู้เขียน	206



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ไผ่จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในตระกูลหญ้า (Poaceae: Bambusoideae) ซึ่งพบได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้นมีประมาณ 120 สกุล แยกเป็น 1,641 สปีชีส์ ไผ่เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วซึ่งมีประโยชน์สูงในการบำรุงรักษาดิน น้ำ ระบบนิเวศวิทยา และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Banik, 2015; Jiang, 2002) ในประเทศไทยมีไผ่หลายชนิดที่นิยมปลูกเป็นไผ่เศรษฐกิจในประเทศ เช่น ไผ่รวก ไผ่เลี้ยง ไผ่ปักกิ่ง ไผ่หก ไผ่ตง ไผ่ข้าวหลาม และไผ่ขาง เป็นต้น (Talabgaew and Laemlaksakul, 2007) โดยประโยชน์ของไผ่มีหลากหลาย เช่น การนำส่วนของลำต้นไปใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมด้านการทำเฟอร์นิเจอร์ การก่อสร้าง และรวมถึงการทำถ่านกัมมันต์ (Chaowana et al., 2015; รัชฎาพิสิษฐ์ พวงจิก, 2558) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าส่วนของใบไผ่มีสารพฤกษเคมีที่สำคัญหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระ และแอนโทไซยานิน เป็นต้น คุณสมบัติของสารเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ คุณสมบัติเป็นสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ยาต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ยาต้านไวรัส (antiviral) ยาต้านมะเร็ง และคุณสมบัติทางยาอีกหลายประการ (Cai et al., 2003; Hossain et al., 2015; Lam et al., 2016; Seki et al., 2010) รวมทั้งได้นำสารสกัดเหล่านี้มาใช้เป็นส่วนประกอบในยาและอาหารเสริมซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสารฟลาโวนอยด์ ที่สกัดจากใบไผ่ปรากฏตามท้องตลาดโดยมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ สารฟลาโวนซึ่งประกอบด้วย ไอโซวิติซิน (isovitexin), โอริเอ็นติน (orientin), ไอโซโอริเอ็นติน (Isoorientin) และวิติซิน (vitexin) เป็นต้น (Mu et al., 2004; Wang et al., 2012a)

ปัจจุบันนี้ไผ่ที่เกษตรกรนิยมปลูก ได้แก่ ไผ่ขางหม่น “นวลราชินี” จัดว่าเป็นไผ่ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงเนื่องจากมีลำต้นที่ตรงยาว แข็งแรง เนื้อไม้หนา และมีประโยชน์หลายประการ (รัชฎาพิสิษฐ์ พวงจิก และคณะ, 2556) โดยการขยายพันธุ์ไผ่สามารถทำได้ด้วยวิธีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติโดยใช้เมล็ด ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลานานเพราะขึ้นกับสรีรวิทยาการออกดอกของไผ่รวมทั้งยังมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง (อนันต์ อนันตโชติ, 2534) นอกจากนี้ยังสามารถขยายพันธุ์โดยการตอนและปักชำ โดยวิธีนี้ค่อนข้างจำกัดด้วยปริมาณต้นพันธุ์ที่ดี พื้นที่ แรงงาน

และค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและขนาดสม่ำเสมอ อีกทั้งได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ทั้งนี้สามารถทำการตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคที่หลากหลาย เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และ Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) เป็นต้น (Konzen et al., 2017)

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยเหลือวิสาหกิจชุมชนนวัตกรรมไผ่บ้านเกาะรัง ตำบลหนองหว้า อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว เพื่อขยายพันธุ์ไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ในปริมาณมาก และตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่ามีความเสถียรทางพันธุกรรมเหมือนกับต้นแม่จากแปลงธรรมชาติ โดยใช้เทคนิคการตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD นอกจากนี้ในประเทศไทยยังมีไผ่หลายสปีชีส์ซึ่งเหมาะกับการศึกษาค้นคว้าเพื่อคัดเลือกชนิดพันธุ์ไผ่ที่ให้สารสกัดต่างๆ ในปริมาณที่สูง และนำไปพัฒนาส่งเสริมในทางการแพทย์และทางด้านอื่นๆ อีกหลายประการ จึงทำการศึกษาวิเคราะห์สารสกัดที่ได้จากไผ่จำพวกสารสกัดกลุ่มฟลาโวน สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในไผ่

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาวิธีการขยายพันธุ์จากชิ้นส่วนข้อของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro.) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมถึงการศึกษาช่วงเวลาในการเก็บชิ้นส่วนข้อไผ่ การปนเปื้อน และการแตกตาในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาอาหารสังเคราะห์และสารอินทรีย์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำยอดทิวจากกลุ่มยอด
3. เพื่อศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค RAPD และ HAT-RAPD
4. เพื่อศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมี (สารประกอบฟีนอลิกรวม, สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม, สารต้านอนุมูลอิสระและแอนโทไซยานิน) ในสารสกัดจากไผ่ 9 สปีชีส์ รวมทั้งศึกษาวิธีการจำแนกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC

สมมติฐานของการศึกษา

1. กลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ กลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin) กลุ่มออกซิน (Auxin) หรือไทเดียซุรอน (Thidiazuron) อย่างเดียวหรือร่วมกัน สามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ ยอดทวิคูณ และคัลลัสได้
2. ความเสถียรทางพันธุกรรมของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิค RAPD ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบหลายตำแหน่ง (multi-locus marker)
3. สารสกัดจากใบไผ่แต่ละสปีชีส์มีสารพฤกษเคมีที่แตกต่างกันและมีปริมาณของสารพฤกษเคมีในแต่ละสปีชีส์ต่างกันด้วย อีกทั้งเทคนิค TLC และ HPLC สามารถใช้จำแนกสารกลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์ในสารสกัดจากใบไผ่ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถขยายพันธุ์ไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ให้เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ
2. ทราบถึงความเสถียรทางพันธุกรรมของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อสร้างความเชื่อมั่นต่อเกษตรกรในการนำไปปลูกต่อไป
3. สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากใบไผ่สปีชีส์ต่างๆ เพื่อเลือกสปีชีส์ไผ่ให้ตรงกับนำไปใช้ในการพัฒนาในด้านต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น
4. เทคนิค TLC เป็นวิธีที่รวดเร็วและใช้จำแนกสารกลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์ในสารสกัดจากใบไผ่ได้
5. เทคนิค HPLC สามารถจำแนกและวัดปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์ในสารสกัดจากใบไผ่ได้

ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาการขยายพันธุ์ไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 1.1 ศึกษาการปนเปื้อนและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในช่วงเวลาการเก็บที่แตกต่างกันในรอบปี

- 1.2 ศึกษาสารควบคุมการเติบโตในอาหารสูตร MS ที่มีผลต่อการแตกยอดจากชิ้นส่วนข้อ
เริ่มต้น
 - 1.3 ศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ
 - 1.4 ศึกษาผลของอาหารสูตร MS ในสภาพกึ่งแข็งและเหลวต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ
 - 1.5 ศึกษาผลของอะดีนีนซัลเฟต (AdSO₄) ต่อการเกิดยอดทวีคูณของกลุ่มยอด
 - 1.6 ศึกษาผลของสารส่งเสริมการเติบโตของพืชต่อการเกิดยอดทวีคูณ
 - 1.7 ศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดคัลลัส
 - 1.8 ศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดในคัลลัส
 - 1.9 ศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก
2. ศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี”
 - 2.1 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ
 - 2.2 คัดเลือกไพรเมอร์ด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ
HAT-RAPD
 - 2.3 ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD
3. ศึกษาวิเคราะห์สารพฤกษเคมีในสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์
 - 3.1 วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric
 - 3.2 วิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมโดยวิธี Aluminum chloride colorimetric
 - 3.3 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging
 - 3.4 วิเคราะห์สารแอนโทไซยานิน โดยวิธี pH-differential
 - 3.5 จำแนกฟลาโวนไกลโคไซด์ด้วยเทคนิค TLC
 - 3.6 จำแนกฟลาโวนไกลโคไซด์ด้วยเทคนิค HPLC

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ไม้

ไม้เป็นพืชตระกูลหญ้า วงศ์ Poaceae วงศ์ย่อย Bambusoideae โดยมีประมาณ 120 สกุล 1,641 สปีชีส์ มีกระจายตัวอยู่ในเขตร้อนชื้น และมีการเจริญเติบโตเร็ว (Soreng et al., 2015) ส่วนใหญ่เมื่อออกดอกแล้วต้นจะตายและบางชนิดมีอายุถึง 120 ปี (Banik, 2015) ในประเทศไทยพบไม้ประมาณ 15-17 สกุล 80-100 สปีชีส์ (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554) และจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำนักงานปฏิรูปที่ดินเพื่อเกษตรกรรมส่งเสริมให้เกษตรกรในพื้นที่เขตปฏิรูปที่ดินปลูก เนื่องจากมีประโยชน์หลายด้าน เช่น ไม้ใช้ประโยชน์ทางด้านการก่อสร้างที่อยู่อาศัย ใช้ทำเครื่องใช้เฟอร์นิเจอร์ และถ่านเป็นถ่าน ส่วนหน่อยังสามารถนำมาประกอบอาหารได้อีกด้วย ทั้งนี้นอกจากประโยชน์เหล่านี้ ไม้ยังเป็นพืชที่ช่วยเรื่องระบบนิเวศ และการอนุรักษ์ดินและน้ำ ดังนั้นการส่งเสริมให้เกษตรกรมีการปลูกไม้เชิงเศรษฐกิจนอกจากเป็นการกระตุ้นเศรษฐกิจยังเป็นการช่วยรักษาระบบนิเวศและสภาพแวดล้อมของประเทศไทยอีกด้วย (Chaowana et al., 2015; เขียวลักษณะ แก้วยอด, 2555)

ไม้สามารถขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual propagation) โดยการเพาะเมล็ด ซึ่งวิธีนี้จะพบการกลายพันธุ์สูง แต่ไม้ที่ได้จะมีอายุค่อนข้างยืนยาว และการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (vegetative propagation) ได้แก่ การปักชำลำและข้อ วิธีนี้ทำโดยเลือกตัดลำที่มีตากิ่งซึ่งพัฒนาเป็นกอไม้ได้ นิยมใช้กับไม้ที่ออกดอกยากและมีลำค่อนข้างใหญ่ ส่วนการตอนกิ่งถือเป็นวิธีที่นิยมกันมากเช่นกัน แต่ต้องอาศัยความชำนาญในการทำและเลือกกิ่ง นิยมตอนในพันธุ์ไม้ที่มีกอขนาดใหญ่ เช่น ไม้ตง และ ไม้กิมซุง เป็นต้น และการแยกเหง้า จัดเป็นวิธีที่นิยมกันมากโดยเฉพาะในไม้ที่มีโคนลำค่อนข้างหนา เช่น ไม้รวก ไม้เลื้อย เป็นต้น เพราะต้นไม้ที่ได้จะมีอัตราการรอดตายสูง แต่วิธีนี้สิ้นเปลืองเวลาและแรงงานในการจัดการมาก อีกทั้งวิธีเหล่านี้ควรเลือกกิ่งหรือเหง้าที่มีอายุ 1-2 ปี ในการนำมาขยายพันธุ์ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ไม้ เนื่องจากการปักชำและตอนไม้บางชนิดทำได้ค่อนข้างยากและได้จำนวนต้นใหม่ในปริมาณน้อย โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถแก้ไขปัญหการขาดแคลนต้นพันธุ์และได้

ปริมาณมากเพียงพอกับความต้องการ อีกทั้งยังคงมีลักษณะเหมือนต้นเดิม (กิสณะ ต้นเจริญ และสุพล ชาญรักษ์, 2538; เขียวลักษณ์ แก้วยอด, 2555; สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554)

การจำแนกสปีชีส์ของไผ่ สามารถจำแนกได้จากทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกันในแต่ละสกุล เช่น ลักษณะการเจริญเติบโตของเหง้า (rhizome) หน่อและลำไผ่ (culm shoot and culm) กิ่งและการเจริญเป็นกิ่ง (branch and branch complement) ใบ (leaf) และดอก (flower or floret) เป็นต้น ซึ่งในประเทศไทยได้จัดจำแนกไผ่สกุลต่างๆ ไว้รวม 16 สกุล ดังนี้ คือ 1. สกุลไผ่ป่า (*Bambusa* Schreb.) 2. สกุลไผ่สีเหลือง (*Chimonobambusa* Makino) 3. สกุลไผ่ตง (*Dendrocalamus* Nees) 4. สกุลไผ่ไร่ (*Gigantochloa* Kurz ex Munro) 5. สกุลไผ่เลื้อย (*Dinochloa* Büse) 6. สกุลไผ่เครือวัลย์ (*Melocalamus* Benth.) 7. สกุลไผ่ออถอ (*Pseudostachyum* Munro) 8. สกุลไผ่ราชวังหรือไผ่ลาดวัง (*Neohouzeoua* Benth.) 9. สกุลไผ่รวกฝรั่ง [*Oatea* (McClure & E.W.Sm.) C.E.Calderón & Soderstrom] 10. สกุลไผ่ญี่ปุ่น (*Phyllostachys* Siebold & Zucc.) 11. สกุลไผ่ภูพาน (*Phuphanochloa* Sungkaew & Teerawat.) 12. สกุลไผ่ลูกศร (*Pseudosasa* Makino ex Nakai) 13. สกุลไผ่ทอง (*Schizostachyum* Nees) 14. สกุลไผ่อาจารย์เต็ม (*Temchloa* S.Dransf.) 15. สกุลไผ่รวก (*Thyrsostachys* Gamble) 16. สกุลไผ่เพ็ก (*Vietnamosasa* T.Q.Nguyen) (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554) ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่สกุลไผ่ตง คือ ไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” และวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลิกอยเคมีนในใบไผ่ 4 สกุล ได้แก่ สกุลไผ่ตง (*Dendrocalamus* Nees) สกุลไผ่ญี่ปุ่น (*Phyllostachys* Siebold & Zucc.) สกุลไผ่รวก (*Thyrsostachys* Gamble) และสกุลไผ่ป่า (*Bambusa* Schreb.)

1.1 สกุลไผ่ตง (*Dendrocalamus* Nees)

ลักษณะไผ่สกุลนี้เป็นไผ่ขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ สูง 7-40 เมตร แตกกอขนาดใหญ่ค่อนข้างแน่น บางชนิดแตกกอพาดเลื้อย ปลายลำโค้ง ขนาดลำค่อนข้างใหญ่ มีขนสีขาวปกคลุม ลักษณะการแตกกิ่งจะแตกกิ่งหลายกิ่งที่ข้อ กิ่งกลางเด่น 2 กิ่ง แตกกิ่งต่ำเกือบตลอดลำหรือตั้งแต่กลางลำขึ้นไป ขอบกาบบางและกาบหุ้มลำแห้งร่วงง่าย ใบยอดกาบเป็นรูปหอกขนาดใหญ่ขอบมักม้วนขึ้นด้านบนและพับลง หูกาบและลิ้นกาบค่อนข้างเด่นชัด ข้อดอกย่อยส่วนมากเป็นแบบเรียงอัดแน่นเป็นกระจุกกลมหรือกระจุกรูปดาว ดอกย่อย 1-8 ดอก แกนข้อดอกย่อยสั้นและไม่หลุดร่วง มีรายงานว่าใน

ประเทศไทยมีไผ่สกุลนี้ประมาณ 10-15 สปีชีส์ เช่น ไผ่หก (*D. hamiltonii*) ไผ่ตง (*D. asper*) ไผ่ซางหม่น (*D. sericeus*) ไผ่มันหมู (*D. copelandii*) ไผ่ซางนวล (*D. membranaceus*) ไผ่ซางดำ (*D. strictus*) ไผ่ยักษ์ (*D. giganteus*) และไผ่บงใหญ่ (*D. brandisii*) เป็นต้น ประโยชน์ของไผ่สกุลนี้นิยมปลูกเพื่อบริโภคหน่อ ส่วนลำใช้ในการก่อสร้าง ทำเฟอร์นิเจอร์ และไม้ค้ำยัน (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554; สุทัศน์ เส้าสกุล และคณะ, 2557)

1.2 สกุลไผ่ญี่ปุ่น (*Phyllostachys* Siebold & Zucc.)

ลักษณะทั่วไปของไผ่สกุลนี้เป็นไผ่ประเภทเหง้าลำเดี่ยว (monopodial clump) ขนาดเล็กถึงขนาดกลาง สูง 3-20 เมตร ลำไผ่ที่ขึ้นจะเป็นลำเดี่ยวๆ กระจายห่างๆ ส่วนใหญ่มักพบบรรจงตามยาวลำบริเวณด้านเดียวกันกับที่เกิดตาหรือแตกกิ่ง การแตกกิ่งจะแตกตั้งแต่กลางลำขึ้นไป ข้อละ 2 กิ่งขนาดเท่าๆ กัน ลักษณะกาบหุ้มลำเป็นสีน้ำตาลมีปื้นหรือสีน้ำตาลดำทั่วทั้งกาบ ใบยอดกาบเป็นรูปแถบหรือลักษณะคล้ายริบบิ้น กางออกหรือพับลง หูกาบและเส้นกาบค่อนข้างเด่นชัด มักมีขนยาวปกคลุม กาบหลุดร่วงง่าย ลักษณะช่อดอกส่วนใหญ่มีใบประดับขนาดใหญ่รองรับ ไผ่สกุลนี้มักเจริญเติบโตได้ดีในอากาศหนาวเย็น ตัวอย่างไผ่สกุลนี้ เช่น ไผ่ลาย (*Phyllostachys sp.*) ไผ่ลิโต (*P. lithophila*) และไผ่ญี่ปุ่น (*P. bambusoides*) เป็นต้น ประโยชน์ของไผ่สกุลนี้นิยมปลูกเป็นไม้ประดับและนำเข้าไปปลูกในเขตหนาวของหลายประเทศ นอกจากนี้ไผ่ขน (*P. edulis*) ซึ่งเป็นไผ่ในสกุลนี้ยังสามารถรับประทานได้อีกด้วย ชาวจีนนิยมนำหน่อมาทำหน่อไม้แห้ง หรือที่เรียกว่า “หน่อไม้จีน” ส่วนลำสามารถนำมาใช้ทำเป็นเครื่องเรือน และหัตถกรรม (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554; สุทัศน์ เส้าสกุล และคณะ, 2557)

1.3 สกุลไผ่รวก (*Thyrsostachys* Gamble)

ลักษณะทั่วไปของไผ่สกุลนี้เป็นไผ่ขนาดเล็กถึงขนาดกลาง สูง 3-15 เมตร พบทุกภาคในประเทศไทย ยกเว้นภาคใต้ ลำตรงขึ้นเป็นกอและแน่นมาก ปลายลำโค้งเล็กน้อย สามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ค่อนข้างแห้งแล้ง แตกกิ่งตั้งแต่กลางลำหรือเลยกลางลำขึ้นไปเล็กน้อย แต่ละข้อมี 3-5 กิ่ง กิ่งเด่นอยู่ตรงกลาง 1 กิ่งและมีกิ่งรองเด่น 2 กิ่ง ส่วนกิ่งที่เหลือมีขนาดใกล้เคียงกัน ลักษณะกาบจะอยู่แนบติดกับลำไม่ค่อยหลุดร่วงเมื่อแก่ ยอดกาบบางเรียบ ใบยอดกาบเป็นรูปสามเหลี่ยมรูปลิ่มหรือรูปหอกตั้งตรง ไม่มีหูกาบ ประโยชน์ของไผ่สกุลนี้นิยมปลูกเป็นแนวรั้ว งานจัก

สาน ถ้าใช้ก่อสร้าง ทำไม้ค้ำยัน ไม้ค้ำงัดฝักฝักผลไม้ และเยื่อกระดาษ เป็นต้น ตัวอย่างไผ่สกุลนี้ เช่น ไผ่รวก (*T. siamensis*) และไผ่รวกดำ (*T. oliveri*) เป็นต้น ซึ่งหน่อสามารถนำมาประกอบอาหารได้อีกด้วย นอกจากนี้ไผ่รวกยังนิยมนำมาทำด้ามไม้กวาด ไม้เท้า ด้ามร่ม ขลุ่ย และในอุตสาหกรรมต่างๆ (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554; สุทัศน์ เต้าสกุล และคณะ, 2557)

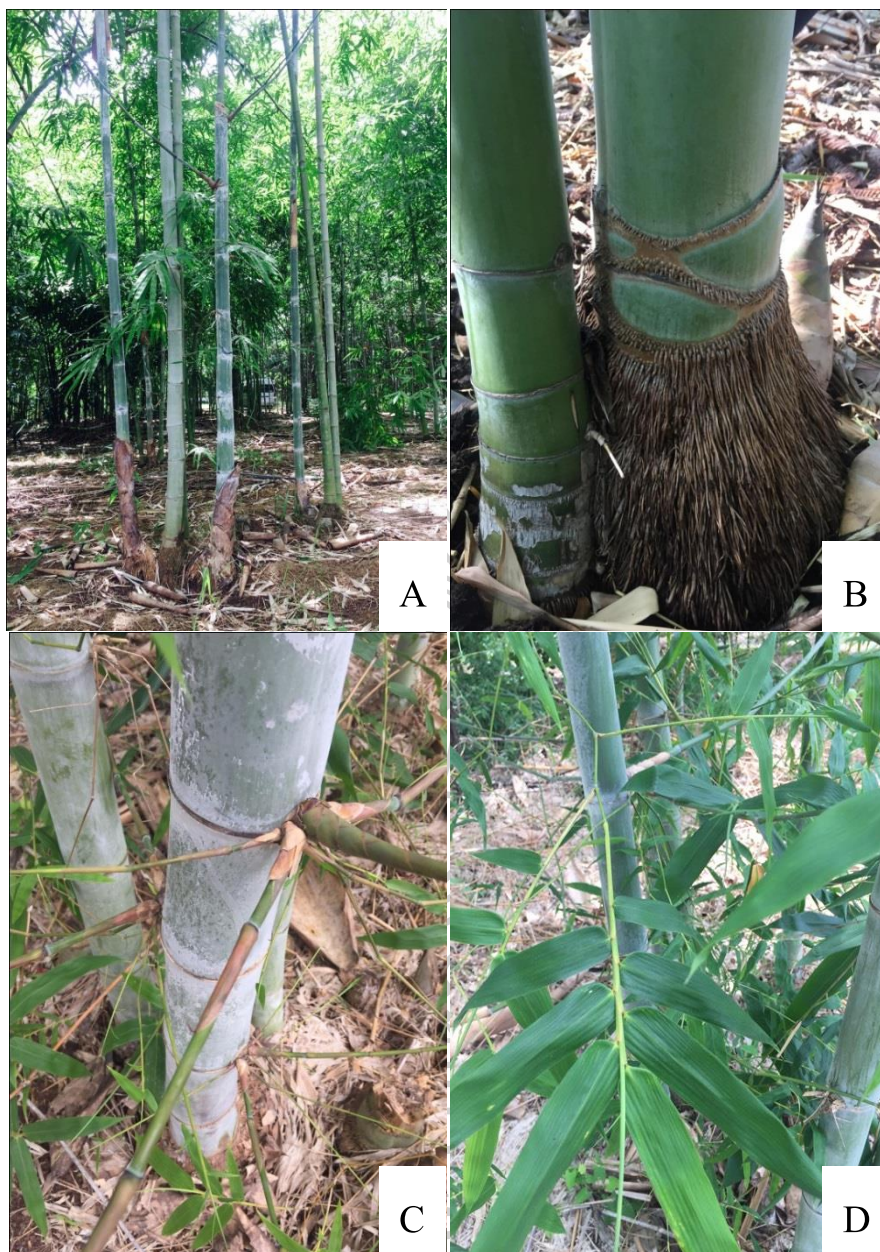
1.4 สกุลไผ่ป่า (*Bambusa* Schreb.)

ลักษณะทั่วไปของไผ่สกุลนี้เป็นไผ่ประเภทเหง้ากอขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ ลำส่วนใหญ่โค้งออกจากกลางกอและปลายลำโค้ง มีความสูง 1-25 เมตร ไผ่สกุลนี้กอจะอัดแน่นและรก เนื่องจากมีการแตกกิ่งหลายกิ่งตามข้อ และแตกกิ่งตลอดลำตั้งแต่กลางลำขึ้นไป โดยในไผ่หลายชนิดจะมีกิ่งแขนงย่อยลดรูปเป็นหนามบริเวณโคนกอจึงทำให้นิยมปลูกเป็นแนวกัน ลักษณะกาบหุ้มลำ ใบยอดกาบเป็นรูปโดมหรือรูปสามเหลี่ยม กว้าง หูกาบเป็นพู่กว้างส่วนมากหยักเป็นคลื่น หูกาบไม่สมมาตรกันระหว่างทางด้านซ้ายและขวา กาบหุ้มลำร่วงง่าย ช่อดอกเป็นช่อดอกย่อยขนาดใหญ่ ยาวมากกว่า 1 เซนติเมตร ประกอบด้วยดอกย่อย 1-12 ดอก แกนช่อดอกย่อยยึดยาวระหว่างดอกและหลุดเป็นท่อน โลติคูล 3 อัน นอกจากนี้แล้วไผ่สกุลนี้ยังพบในป่าธรรมชาติและปลูกในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศ จำนวน 12 สปีชีส์ ได้แก่ ไผ่เหลือง ไผ่น้ำเต้า ไผ่ล้ามะลอก ไผ่บงหวาน ไผ่ป่า ไผ่สีสุก ไผ่กำยาน ไผ่บงดำ ไผ่บงบ้าน ไผ่หลอด ไผ่ลิ้นจู้ และไผ่กิมชุง ประโยชน์ของไผ่สกุลนี้นอกจากเป็นแนวกันยังมีการนำเนื้อไม้มาทำงานก่อสร้าง งานจักสาน และเยื่อกระดาษ ซึ่งในไผ่บางชนิดในสกุลนี้ นิยมปลูกเพื่อกินหน่อและทำเป็นหน่อไม้แปรรูป เช่น ไผ่กิมชุง ไผ่บงหวาน เป็นต้น (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554; สุทัศน์ เต้าสกุล และคณะ, 2557) นอกจากนี้ยังพบว่าไผ่เลี้ยงที่นิยมปลูกในประเทศไทยเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทั้งลำและหน่อ เดิมมีการใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Bambusa multiplex* แต่เมื่อปี พ.ศ. 2561 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ไผ่เลี้ยงพบว่าไผ่เลี้ยงเป็นลูกผสมต่างสกุลกัน คือ เป็นลูกผสมระหว่างไผ่ชางนวล (*D. membranaceus*) และไผ่รวก (*T. siamensis*) จึงได้มีการตั้งชื่อสกุลใหม่และใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ไผ่เลี้ยง คือ *Thyrsoclamus liang* Sungkeaw & W.L. Goh (GOH et al., 2018)

2. ไม้ซางหม่น “นวลราชินี”

ไม้ซางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro "Nuan Rajinee") เป็นไม้ที่พบมากทางภาคเหนือ จัดอยู่ในสกุลไผ่ตง ซึ่งเป็นสกุลที่มีลักษณะเด่น คือ ขนาดลำค่อนข้างใหญ่ และมีขนสีขาวปกคลุม โดยไม้ซางหม่นมีแหล่งกำเนิดอยู่ที่จังหวัดอุตรดิตถ์ มีลำต้นสีเขียว ตั้งตรง ไม่มีหนาม และมีลำขนาดใหญ่เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-10 เซนติเมตร สูงประมาณ 15-20 เมตรลำต้นมีลักษณะมีนวลแป้ง เนื้อไม้หนา และแข็งซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมกับอุตสาหกรรมหลายชนิดนิยมนำส่วนโคนและลำมาทำเป็นเฟอร์นิเจอร์ ไม้ปาร์เก้ ไม้ค้ำยัน และวัสดุก่อสร้าง ลักษณะใบเรียวยาวเล็ก ส่วนหน่อมีลักษณะสีน้ำตาลนำมารับประทานได้มีรสชาตือร่อย และสามารถปลูกผลิตหน่อไม้นอกฤดู ดังรูปที่ 1 (ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก และคณะ, 2556; สุทัศน์ เล้าสกุล และณัฐฎากร เสมสันทัต, 2556)

การขยายพันธุ์ไม้ซางหม่นสามารถทำได้โดยการตอนกิ่ง การชำกิ่งแขนง และการเพาะเมล็ด ซึ่งการตอนกิ่งและการชำกิ่งค่อนข้างมีข้อจำกัด เนื่องจากการตอนกิ่งไผ่ต้องอาศัยต้นพันธุ์จำนวนมากและการตอนควรเลือกต้นพันธุ์ที่สมบูรณ์และอายุเหมาะสม ทำให้กิ่งพันธุ์ที่ได้มีจำนวนจำกัด อีกทั้งการเพาะเมล็ดถึงแม้จะมีข้อดีคือ ทราบอายุที่แน่นอนของต้นไผ่ทำให้ไม่มีปัญหาเรื่องการออกดอกของไผ่เหมือนกรณีกิ่งที่ได้จากการตอนโดยไม่ทราบอายุต้นพันธุ์ที่ใช้ แต่มีข้อเสียคือ อาจพบความผันแปรของลักษณะต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดต้องใช้เวลาในการพัฒนาเหง้าเพื่อเป็นหน่อหรือลำช้ากว่าวิธีการขยายพันธุ์แบบอื่น โดยในปัจจุบันนี้ได้มีวิธีการขยายพันธุ์ไผ่ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำให้ได้ต้นจำนวนมากและใช้พื้นที่น้อย อีกทั้งกิ่งพันธุ์ที่ได้มีลักษณะเหมือนต้นพันธุ์ที่ใช้ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2559; สุทัศน์ เล้าสกุล และณัฐฎากร เสมสันทัต, 2556)



รูปที่ 1 ลักษณะของไผ่ซางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro "Nuan Rajinee")

A ลักษณะต้น

B ลักษณะ โคน และหน่อ

C ลักษณะข้อ และกิ่ง

D ลักษณะใบ

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่สกุล *Dendrocalamus*

การขยายพันธุ์ไผ่สกุล *Dendrocalamus* ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำ zygotic embryo ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ได้จากส่วนข้อเริ่มต้น (nodal segment) ตาข้าง (axillary bud) ลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) และปลายยอด (shoot tip) มาเพาะเลี้ยงได้ (Mudoi et al., 2013) มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ในหลอดทดลองโดยใช้เมล็ดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1968 จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1982 มีผู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดของไผ่ *D. strictus* และ *Bambusa bambos* ได้สำเร็จ และในปี ค.ศ. 1984 มีการศึกษาและขยายพันธุ์ไผ่สปีชีส์เดียวกันโดยใช้กิ่งแขนงได้สำเร็จ หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 2014 มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสำหรับการขยายพันธุ์ไผ่ *D. strictus* จากตาข้างของกิ่งแขนงให้ได้จำนวนต้นปริมาณมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมไม้อัด (Alexander and Rao, 1968; Kapruwan et al., 2014b; U. I. Mehta et al., 1982; Nadgir et al., 1984)

การศึกษาวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ได้มีการศึกษาและรายงานในไผ่หลากหลายสปีชีส์ เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ *D. hamiltonii* จากใช้ชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นที่คัดเลือกจากต้นกล้าที่เพาะด้วยเมล็ดโดยมีอายุ 3-4 ปี ในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นครั้งสูตร (1/2MS) ประกอบด้วยน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA สำหรับช่วยในการแตกตาและการชักนำให้เกิดยอด ส่วนการชักนำให้เกิดรากมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (IAA, IBA, NAA) หรือร่วมกับสารยับยั้งการเจริญเติบโต (choline chloride, TIBA, B₉, maleic hydrazide) ฟีนอล (catechol, phloroglucinol, coumarin) และ activated charcoal ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบการเกิดราก 3 แบบ ดังนี้ แบบแรกรากมีสีน้ำตาลเล็กน้อย ลักษณะสั้น มีขนราก ซึ่งพบในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ phloroglucinol ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ แบบที่สองรากมีสีขาว ลักษณะยืดยาวแต่ไม่มีขนราก มีจำนวนรากน้อย พบในอาหารสูตร 1/2MS ที่ประกอบด้วย 0.3% (w/v) activated charcoal หรือพบในอาหารสูตร 1/2MS ที่ประกอบด้วย choline chloride ความเข้มข้น 3.0, 9.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA หรือ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แบบที่สามรากที่เกิดขึ้นไม่มีการแตกแขนง และขนรากน้อย พบในอาหารที่มีการเติม coumarin ความเข้มข้น 9.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับหรือปราศจาก IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ IAA/NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใน

อาหารที่มีการเติมสารยับยั้งการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ TIBA, B₉ และ maleic hydrazide ไม่เกิดราก (Sood et al., 2002) และมีการศึกษาการขยายพันธุ์ในไฟ *D. strictus* โดยใช้ชิ้นส่วนข้อจากต้นเจริญเต็มวัยเพื่อให้แน่ใจว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหมือนต้นพันธุ์ที่นำมาจากแปลง ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงย้ายลงอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะดีนีนซัลเฟต ความเข้มข้น 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณเพิ่มขึ้น 3 เท่า และนำยอดที่ได้จำนวนอย่างน้อย 3 ยอด และมีความยาวมากกว่า 2 เซนติเมตร เพื่อชักนำให้เกิดรากโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ IAA, IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีการผสมที่หลากหลายถึง 9 สูตร จากการศึกษาพบว่าเกิดรากเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเพาะเลี้ยงเพียงสูตรเดียว คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Pandey and Singh, 2012)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ในไฟ *D. hamiltonii* ผ่านการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis) โดยใช้ชิ้นส่วนข้อที่มีความยาว 2-4 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-0.8 เซนติเมตร ซึ่งกิ่งที่ได้มาจากต้นที่ปลูกในแปลงอายุ 8-10 ปี นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีการแตกกลุ่มยอดเพิ่มขึ้นและมีความยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร จึงนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดคัลลัส พบว่าคัลลัสที่เกิดขึ้นมีสองแบบ คือ มีการเจริญเติบโตเร็วเป็น friable กับมีการเจริญเติบโตช้าเป็นแบบ compact และ nodular มีเพียงคัลลัสที่เป็นแบบ compact และ nodular ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นตัวอ่อนโซมาติก (somatic embryos) ส่วนคัลลัสที่เป็นแบบ friable ไม่มีการตอบสนอง และเมื่อนำเอ็มบริโออยด์ (embryoid) ที่แยกมาจากคัลลัสแบบ compact และ nodular ย้ายลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิด secondary embryogenesis (Godbole et al., 2002) และยังมีการศึกษาการขยายพันธุ์ในไฟ *D. giganteus* จากชิ้นส่วนข้อจากต้นที่ปลูกในแปลงอายุ 10-15 ปี โดยในการศึกษานี้ได้มีการศึกษาการชักนำให้เกิดคัลลัส การพัฒนาอวัยวะ (organogenesis) และการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ โดยนำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบน

อาหารแห้งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA, 2,4-D และ NAA ความเข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) 4.52 ไมโครโมลาร์ (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ 5.37 ไมโครโมลาร์ (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามลำดับ เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดคัลลัส และย้ายคัลลัสลงบนอาหารแห้งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 11.1 ไมโครโมลาร์ (2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.32 ไมโครโมลาร์ (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากคัลลัส นอกจากนี้การชักนำให้เกิดรากสูงถึง 91 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำยอดทิวทัศน์ที่พัฒนาจากคัลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 98.41 ไมโครโมลาร์ (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) กลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส 2.5 เปอร์เซ็นต์ (Yasodha et al., 2010)

2.2 สารควบคุมการเติบโตและสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่สกุล

Dendrocalamus

สารควบคุมการเติบโตพืช (plant growth regulators; PGRs) จัดเป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช (plant hormones หรือ phytohormones) โดยมีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ (organic compound) ซึ่งพืชสร้างขึ้นเองหรือเป็นสารสังเคราะห์ และเมื่อใช้ในปริมาณน้อยจะมีผลทั้งส่งเสริม ยับยั้ง หรือ ชะลอการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืช (physiological response) ได้แก่ การออกดอก การเจริญเติบโต การสุก การติดผล เป็นต้น ทั้งนี้สารควบคุมการเติบโตพืชไม่จัดเป็นธาตุอาหารพืช ดังนั้นธาตุอาหารที่ให้แก่พืชหรือที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเองและพืชเก็บสะสม เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล แป้ง จึงไม่จัดเป็นสารควบคุมการเติบโต โดยกลุ่มสารควบคุมการเติบโต แบ่งเป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มออกซิน (auxins) กลุ่มไซโทไคนิน (cytokinins) กลุ่มจิบเบอเรลลิน (gibberellins) สารชะลอการเจริญเติบโตของพืช (plant growth retardants) เอทิลีนและสารปล่อยเอทิลีน (ethylene and ethylene releasing compound) สารยับยั้งการเจริญเติบโต (plant growth inhibitors) และสารอื่นๆ สารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติแตกต่างจากสาร 6 กลุ่มที่กล่าวมา เนื่องจากสารกลุ่มนี้เป็นสารที่มีประโยชน์เฉพาะอย่าง เช่น ป้องกันผลร่วง กระตุ้นการร่วงของใบ เพิ่มผลผลิต กระตุ้นการงอกของเมล็ด และขยายขนาด เป็นต้น (ทวีศักดิ์ แสงอุดม, 2559)

การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในไผ่สกุล *Dendrocalamus* มีการใช้สารควบคุมการเติบโตหลายกลุ่มโดยขึ้นอยู่กับการพัฒนาและชักนำส่วนต่างๆ เช่น กลุ่มไซโทไคนิน โดยเฉพาะ

สารควบคุมการเติบโต BA เป็นสารที่มีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดยอดในไผ่หลายสปีชีส์ ได้แก่ *B. arundinacea*, *B. vulgaris*, *D. strictus*, *D. asper* และ *D. membranaceus* เป็นต้น (S. Arya et al., 1999; Nadgir et al., 1984; Yasodha et al., 1997) บางการศึกษาได้มีการใช้อะดีนีนซัลเฟตร่วมกับ IBA และ กรดจิบเบอเรลลิน (GA_3) เพื่อช่วยในการเพิ่มจำนวนยอดในไผ่ *B. vulgaris*, *D. giganteus* และ *D. strictus* (Rout and Das, 1994) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาว่าการใช้ thidiazuron (TDZ) สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณได้ดีในไผ่ *D. strictus* (M. Singh et al., 2001) ซึ่งเคยมีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าเมื่อใช้สารควบคุมการเติบโต BA ร่วมกับ Kn ในไผ่ *D. strictus* สามารถชักนำการเกิดยอดทวีคูณได้เช่นกัน (Ravikumar et al., 1998) อีกทั้งยังมีการศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโต BA และ Kn ในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในไผ่ *D. asper* พบว่า BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดทวีคูณสูงสุด และเมื่อเติมสารอะดีนีนซัลเฟตความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดทวีคูณ จำนวนยอด และความยาวสูงขึ้น (Banerjee et al., 2011)

สารควบคุมการเติบโตที่ใช้สำหรับชักนำให้เกิดรากนั้นมีการใช้สารกลุ่มออกซิน หรือ สารกลุ่มออกซินร่วมกับสารกลุ่มไซโทไคนินเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น สำหรับการชักนำให้เกิดรากนอกจากความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตที่เหมาะสมแล้วขนาดของกลุ่มยอดก็เป็นปัจจัยที่สำคัญมากเช่นกัน การเลือกกลุ่มยอดควรมีลักษณะยอดที่ดี และมีจำนวน 2-3 ยอด ความยาว 1.0-2.0 เซนติเมตร (Mudoi et al., 2013) และยังมีการศึกษาในไผ่ *D. asper* พบว่ากลุ่มยอดจำนวน 3 ยอดสามารถเกิดรากได้ดีที่สุด (I. D. Arya et al., 2001) ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตสำหรับการชักนำให้เกิดรากแตกต่างกันขึ้นอยู่กับไผ่แต่ละสปีชีส์ซึ่งไผ่บางสปีชีส์อาจใช้สารควบคุมการเติบโตเพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับชนิดอื่น เช่น การชักนำให้เกิดรากในไผ่ *D. asper* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (S. Arya et al., 2008) ขณะที่มีการศึกษาการชักนำรากในไผ่ *D. asper* โดยมีการศึกษาสารควบคุมการเติบโตระหว่าง IBA และ IAA พบว่าสารควบคุมการเติบโต IBA มีอัตราการเกิดราก จำนวนราก และความยาวรากดีกว่า IAA และพบว่า IBA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากสูงถึง 93 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากสูงสุด (7 ราก) และความยาวรากสูงสุด (6.43 เซนติเมตร) (Banerjee et al., 2011) และในไผ่ *D. giganteus* พบว่าสารควบคุมการเติบโต IBA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดราก (Devi et al.,

2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในไฟ *D. giganteus* และ *D. hookeri* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ร่วมกับ TDZ และ coumarin พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ (Ramanayake et al., 2008) และเมื่อใช้สารควบคุมการเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกันพบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี เช่น การชักนำให้เกิดรากในไฟ *D. farinosus* โดยใช้สารควบคุมการเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (S. Hu et al., 2011)

นอกจากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นแล้วนั้นยังมีการศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดคลัสต์อีกด้วย เช่น การศึกษาการชักนำคลัสต์ในไฟ *D. latiflorus* พบว่าอัตราการเกิดคลัสต์สูงสุดเมื่อใช้สารควบคุมการเติบโต NAA ความเข้มข้น 5.37 ไมโครโมลาร์ (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.33 ไมโครโมลาร์ (0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร) และกรดพีนอลอะซีติก (PAA) ความเข้มข้น 110.17 ไมโครโมลาร์ (Qiao et al., 2013) ส่วนในไฟ *D. hamiltonii* พบว่าสามารถชักนำการเกิดคลัสต์ได้ดีในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.0-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (N. Zhang et al., 2010) และต่อมาได้มีการศึกษาการชักนำคลัสต์ในไฟ *D. hamiltonii* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ กลูตามีน โปรีติน และเคซินไฮโดรไลเซต ความเข้มข้นอย่างละ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราชักนำการเกิดคลัสต์สูงสุด และคลัสต์เป็นแบบก้อนเกาะแน่น (granular-compact callus) (Zang et al., 2016) โดยกรดอะมิโน เช่น โปรีติน และกลูตามีน มีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนอกเหนือจากไฟ เช่น ข้าว และกุหลาบ เป็นต้น เนื่องจากจัดเป็นแหล่งสารอินทรีย์ในโตรเจน ที่ช่วยส่งเสริมการชักนำการเกิดคลัสต์ การพัฒนาโชมาทิกเอ็มบริโอ และการพัฒนาของพืช (A. Das and Mandal, 2010; Pawar et al., 2015) อีกทั้งกรดอะมิโนสามารถดูดซึมเข้าสู่พืชได้เร็วกว่าอินทรีย์ในโตรเจน (inorganic nitrogen) (George et al., 2007)

จากการศึกษาที่กล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าไฟแต่ละสปีชีส์มีความต้องการสารควบคุมการเติบโตสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำส่วนต่างๆ เช่น ยอด ราก และคลัสต์ ที่แตกต่างกัน รวมทั้งปริมาณความเข้มข้นอาจต่ำหรือสูงขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของไฟเช่นเดียวกัน โดยไฟบางสปีชีส์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อมีการเติมสารอินทรีย์ในปริมาณที่เหมาะสม (ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์ และอารีย์ วรรณวัฒน์, 2551)

3. อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือ สารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว มีความไม่เสถียร ทำให้มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยาได้ง่ายกับ โมเลกุลอื่น โดยรับอิเล็กตรอนจาก สารชีวโมเลกุลอื่นเพื่อให้ตนเองเกิดความเสถียรขึ้น และสารชีวโมเลกุลที่สูญเสียอิเล็กตรอนไปทำให้อิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จึงมีโครงสร้างและคุณสมบัติการทำงานเปลี่ยนไป ทำให้เกิดความบกพร่อง หรือเซลล์ถูกทำลายซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดโรค สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลจะแสดงเป็นจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล A^{\cdot} อนุมูล A^- และอนุมูล A^+ อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องทางชีววิทยาแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species; ROS) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion radical; $O_2^{\cdot-}$) อนุมูลเพอร์ออกซิล (peroxyl; RO_2^{\cdot}) อนุมูลคาร์บอเนต (carbonate; $CO_3^{\cdot-}$) และอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical; $\cdot OH$) เป็นต้น กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species; RNS) เช่น อนุมูลไนตริกออกไซด์ (nitric oxide radical; NO^{\cdot}) และอนุมูลไนโตรเจนไดออกไซด์ (nitrogen dioxide radical; NO_2^{\cdot} , NO^{\cdot}) เป็นต้น และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species; RCS) เช่น อนุมูลคลอรีน (chlorine radical; Cl^{\cdot}) และกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid; HOCl) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เพอร์ออกซิไนเตรต (ONOO \cdot) การเกิดอนุมูลอิสระในระบบของสิ่งมีชีวิตเป็นสิ่งที่ได้จากการเผาผลาญของเซลล์ โดยการใช้ออกซิเจน ซึ่งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและอนุมูลไฮดรอกซิลเป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่นๆ อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายสาเหตุ ได้แก่ ความผิดปกติของระบบการทำงานของไมโทคอนเดรีย กรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและระบบสื่อประสาท (excitatory amino acids) เมตาบอลิซึมของสารสื่อประสาท และสารพิษทำลายเซลล์ประสาท (neurotoxin) เป็นต้น อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดกระบวนการเผาผลาญในร่างกายและหลุดออกทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันก่อให้เกิดความเสียหาย และมีผลกระทบต่อกระบวนการที่นำไปสู่การแสดงออกของโรค (โอภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2549)

4. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือสารที่ทำลายอนุมูลอิสระ (radical scavenger) เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ไม่ให้เกิดการต่อ สารกำจัดอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติและสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ ได้แก่ กรดยูริก บิลิรูบิน เป็นต้น ส่วนสารกำจัดอนุมูลอิสระที่หยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ของการเกิดอนุมูลและทำให้ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุดลง ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระควรมีคุณสมบัติดังนี้ มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการเข้าจับอนุมูลอิสระโดยตรงและกำจัดอนุมูลให้หมดไป สามารถเกิดปฏิกิริยาที่เลทกับโลหะได้ เป็นสารต้านออกซิเดชัน และไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนส์ อีกทั้งควรมีความสามารถในการถูกดูดซึมหรือส่งผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ ภายนอกเซลล์ และเนื้อเยื่อต่างๆ สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในแหล่งธรรมชาติ เช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร และเนื้อสัตว์ สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติหลายชนิดที่พบในอาหารส่วนใหญ่เป็น วิตามินเอ (carotenoids) วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินอี (tocopherols) และ โพลีฟีนอลต่างๆ ประกอบด้วย ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ไอโคปีน (แคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่ง) แอนโทไซยานิน (ฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่ง) และโคเอนไซม์คิว 10 หรือที่รู้จักในชื่อยูบิควิน (ubiquitin) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ในอาหารที่มีส่วนประกอบของสารโพลีฟีนอลจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กรดคาเฟอิกในกาแฟ เคอร์คูมินในขมิ้น และแคปไซซินในพริกขี้หนู ทั้งนี้ยังพบว่าสารฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชต่างๆ มากกว่า 5,000 ชนิด เช่น เควอซิติน (quercetin) และคาร์ทีชิน (catechin) โครงสร้างทางเคมีของสารสองชนิดนี้มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบซึ่งทำให้มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระนำมาใช้อย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและได้รับการตรวจสอบว่าสามารถป้องกันโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมสุขภาพ อีกทั้งยังมีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางอีกด้วย (Yadav et al., 2016; โอภา วัชรกุลป์ และคณะ, 2549)

5. สารพฤกษเคมีที่พบในไผ่

ไผ่จัดเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตเร็ว และสามารถใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน รวมถึงยังมีรายงานการศึกษาพบสารพฤกษเคมีที่ได้จากไผ่หลายสปีชีส์ที่ทำการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ

เช่น ใฝ่ *Schizostachyum lumampao* มีสารพฤษเคมี ได้แก่ saponin, diterpenes, phenols, phytosterols, tannins และ flavonoids โดยพบว่ามีองค์ประกอบของสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม 15.6 เปอร์เซ็นต์ กรดฟีนอลิก (phenolic acid) 7.9 เปอร์เซ็นต์ และ โพรตีน 1.24 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (Sangeetha et al., 2015) และในสารสกัดใฝ่ *Oxytenanthera abussinica* พบสารพฤษเคมี ได้แก่ polyphenols, saponins, tannins, alkaloids และ flavonoid (Maxwell and Bitrus, 2013) โดยใฝ่แต่ละสปีชีส์จะมีสารพฤษเคมีแตกต่างกัน เช่น ในใฝ่ *O. abyssinica* และ *B. ventricosa* พบสารพฤษเคมี ได้แก่ polyphenols, tannins, flavonoid และ coumarins แต่ในใฝ่ *B. vulgaris vittata* และ *B. vulgaris vulgaris* ไม่พบ tannins และ flavonoids เป็นต้น (Coffie et al., 2014) อีกทั้งในสารสกัดจากใฝ่ *Phyllostachys nigra* ยังพบกรดฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์ เช่นกัน (Gong et al., 2015) จากการที่ใฝ่มีองค์ประกอบของสารเหล่านี้ทำให้ใฝ่คุณสมบัติทางยา เช่น ฤทธิ์การต้านมะเร็ง (anti-cancer activity) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant activity) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ยังยั้งการเจริญพันธุ์ (antifertility activity) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (anti-microbial activity) ป้องกันโรคเบาหวาน (anti-diabetes activity) ฤทธิ์ต้านแผลในกระเพาะอาหาร (anti-ulcer activity) และลดความดันโลหิต (antihypertensive activity) เป็นต้น (Sangeetha et al., 2015) โดยสารพฤษเคมีที่พบในใฝ่จะกล่าวโดยละเอียดดังต่อไปนี้

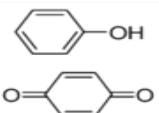
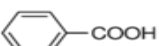
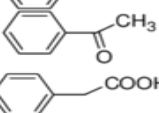
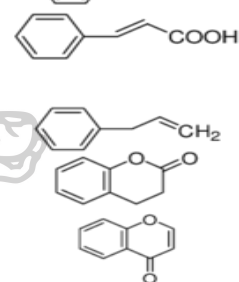
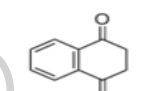
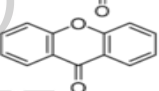
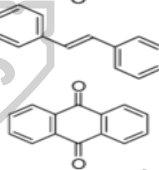
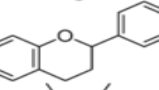

5.1 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารกลุ่ม secondary metabolites ที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนเบนซีนและมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) เป็นองค์ประกอบอย่างน้อย 1 หมู่ สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีหลายชนิดและหลายตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และสารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenics) โดยสารประกอบฟีนอลิกสามารถจำแนกได้ตามโครงสร้างทางเคมี 10 กลุ่ม ดังตารางที่ 1 (Garcia-Salas et al., 2010) หรือจากสูตรโครงสร้างทางเคมีสารประกอบฟีนอลิกสามารถจำแนกเป็นกลุ่มที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ simple phenol, flavonoid และ tannins ที่มีมวลโมเลกุลต่ำและปานกลางซึ่งไม่ยึดจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ และกลุ่มที่ไม่ละลาย ได้แก่ condensed tannins, phenolic acids และสารประกอบฟีนอลิกที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งจับกับโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์หรือโพรตีนที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ (Giada, 2013) และ สารสกัดในใฝ่ยังพบกรดฟีนอลิก (phenolic acid) ทั้งกลุ่ม

hydroxybenzoates (C_6-C_1) เช่น gallic acid และ hydroxycinnamates (C_6-C_3) เช่น caffeic acid, *p*-coumaric acid และ ferulic acid (Basli et al., 2017; Nirmla et al., 2018)



ตารางที่ 1 การจำแนกสารประกอบฟีนอลิกตามโครงสร้างทางเคมี ดัดแปลงจาก Garcia-Salas et al. (2010)

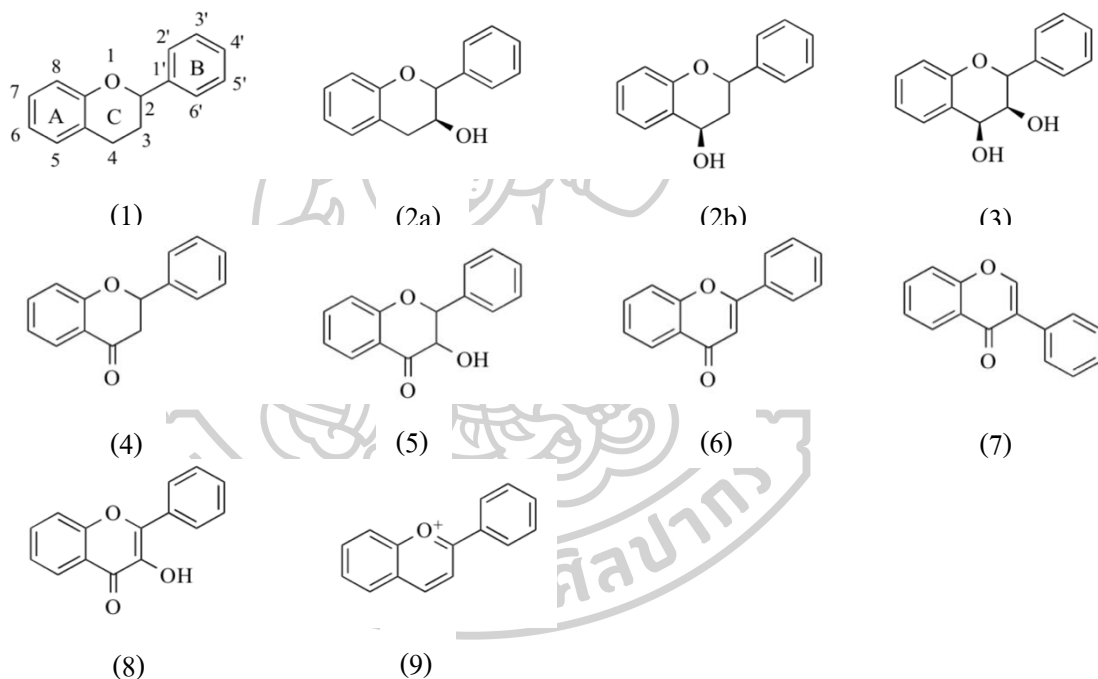
Carbon numbers	Class	Basic structure
C_6	Simple phenols Benzoquinones	
C_6-C_1	Benzoic acid	
C_6-C_2	Acetophenones Phenylacetic acid	
C_6-C_3	Cinnamic acid Phenylpropene Coumarins Chromones	
C_6-C_4	Naphthoquinones	
$C_6-C_1-C_6$	Xanthenes	
$C_6-C_2-C_6$	Stilbenes Anthraquinones	
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoids	
$(C_6-C_3)_2$	Lignans, neolignans	
$(C_6-C_1)_n$	Hydrolysable tannins	Heterogeneous polymer composed of phenolic acids and simple sugars Highly crosslinked aromatic polymer
$(C_6-C_3)_n$	Lignins	

จากการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากใบไผ่หลายสปีชีส์พบว่ามีการประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ เช่น ในสารสกัดจากใบไผ่ *Schizostachyum lumampao* ที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 76.72 mg GAE/100 g air-dried sample และเมื่อสกัดด้วยน้ำจะมีค่าสารประกอบฟีนอลิกรวมลดลง คือ 13.48 mg GAE/100 g air-dried sample (Tongco et al., 2014) และสารสกัดจากใบไผ่ *B. arundinacea* ที่สกัดด้วยเมทานอลพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 14.6 mg GAE/g powder แต่เมื่อสกัดใบไผ่ด้วยน้ำปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะลดลง คือ 2.79 mg GAE/g powder ดังนั้นตัวทำละลายจึงมีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Macwan et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากใบไผ่ *B. nutans* และ *B. vulgaris* พบว่าในสารสกัดจากใบไผ่ *B. nutans* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าในสารสกัดจากใบไผ่ *B. vulgaris* เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าในใบไผ่แต่ละสปีชีส์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกัน (Tripathi et al., 2015) ทั้งนี้สามารถหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธีพื้นฐาน เช่น การใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ phosphomolybdate และ phosphotungstate ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) ซึ่งเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบทำให้ละลายน้ำได้ง่าย นิยมใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานในการเทียบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ, 2560)

5.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid compounds)

สารประกอบฟลาโวนอยด์จัดเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดของสารประกอบฟีนอลิกมีองค์ประกอบเป็นแบบ benzo- γ -pyrone และมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น diphenylpropane ($C_6-C_3-C_6$) นอกจากนี้แล้วสารประกอบ ฟลาโวนอยด์จำแนกได้เป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ flavones, isoflavones, flavonols, dihydroflavanols, flavanones, flavandiols หรือ leucoanthocyanidins, flavanols หรือ catechins ซึ่งอาจแบ่งเป็น flavan-3-ols และ flavan-4-ols และ anthocyanins หรือ anthocyanidins ดังแสดงในรูปที่ 2 (Borges Bubols et al., 2013) โดยสารประกอบฟลาโวนอยด์ถูกนำมาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อาหาร และยา อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต่อด้านริ้วรอย (antiaging) และการใช้ต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (Nirmala et al., 2018; Yang

et al., 2017) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในไผ่ เช่น สารสกัดจากไผ่ *S. lumampao* ที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 76.72 mg GAE/100 g air-dried sample และ 70.24 mg QE/100 g air-dried sample ตามลำดับ และเมื่อสกัดด้วยน้ำ พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 13.48 mg GAE/100 g air-dried sample และ 17.86 mg QE/100 g air-dried sample ตามลำดับ (Tongco et al., 2014) และในสารสกัดจากไผ่ *B. arundinacea* ที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอลพบว่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม 6.71 mM QE/g powder ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric โดยใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน (Chang et al., 2002; Macwan et al., 2010)



รูปที่ 2 จำนวนคาร์บอนในโครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (1) และสูตรโครงสร้างกลุ่มย่อยของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้ง 8 กลุ่ม ดังนี้ flavonols (1) แบ่งเป็น flavan-3-ols (2a) และ flavan-4-ols (2b), flavandiols (3), flavanones (4), dihydroflavanols (5), flavones (6), isoflavones (7), flavonols (8) และ anthocyanidins (9) ที่มา: Borges Bubols et al. (2013)

สารกลุ่ม flavone C-glycosides ได้แก่ orientin, isoorientin, vitexin และ isovitexin เป็นฟลาโวนอยด์ที่พบมากในสารสกัดจากใบไผ่และศึกษาพบว่ามิประโยชน์ในหลายด้าน (รูปที่ 3) โดยสาร orientin ($C_{21}H_{20}O_{11}$) หรือชื่อสารเคมีตามระบบ IUPAC คือ 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one มีน้ำหนักโมเลกุล 448.4 กรัมต่อโมล มีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ฟีนอลเป็นส่วนใหญ่ มีหมู่เอเทอร์ 2 หมู่ และ หมู่คีโตน 1 หมู่ จากโครงสร้างดังกล่าวทำให้การสกัด orientin จากพืชทั่วไปต้องใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เมทานอล เอทานอล หรือ น้ำ ประโยชน์ของ orientin พบว่าช่วยเกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ การต่อต้านไวรัส ฤทธิ์แก้ปวด ต้านการอักเสบ ป้องกันรังสี การขยายตัวของหลอดเลือด และป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น (Lam et al., 2016) สาร isoorientin ($C_{21}H_{19}O_{11}$) หรือ homoorientin มีน้ำหนักโมเลกุล 447.4 กรัมต่อโมล พบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน โรคอ้วน โรคไขข้ออักเสบ รูมาตอยด์ และโรคมะเร็ง (Anilkumar et al., 2017) ส่วนสาร vitexin ($C_{21}H_{20}O_{10}$) หรือ apigenin-8-C-glucoside มีประโยชน์ช่วยในการลดการตายของเซลล์ประสาทที่พบในโรค neurodegenerative และ acute insults นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบสำคัญของยาจีนโบราณหลายชนิดและได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และต้านระบบประสาท (He et al., 2016; Lima et al., 2018) และสาร isovitexin หรือ apigenin-6-C-glucoside ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ของ vitexin จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพ และได้มีการศึกษาในหนูพบว่า isovitexin นั้นสามารถยับยั้งการแสดงออกของ nitric oxide synthase (iNOS) และสามารถลดการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ชักนำโดย lipopolysaccharide (LPS) ในเซลล์เม็ดเลือดขาว RAW264.7 ได้จึงจัดเป็นสารที่มีความสำคัญทางชีวภาพอย่างมาก (He et al., 2016; C.-M. Lin et al., 2005)

จากการศึกษาสารสกัดในใบไผ่หลายสปีชีส์ ได้แก่ *B. textilis*, *Dendrocalamopsis oldham*, *Sasa borealis* และ *P. nigra* พบว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะกลุ่ม flavone C-glycosides ที่ประกอบด้วย orientin, vitexin, isoorientin และ isovitexin ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นสารที่มีการออกฤทธิ์สูงและใช้เป็นสารมาตรฐานทางการค้าสำหรับจำแนกชนิด flavone C-glycosides ด้วยเทคนิค TLC, HPTLC และ HPLC (Gong et al., 2015; Z.-L. Lv et al., 2012; Park et

al., 2007; Wang et al., 2012b) และนอกจากนี้เมื่อทำการจำแนกสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC ในสารสกัดจากใบไม้ *Dendrocalamopsis Oldham* ยังพบว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์กลุ่มย่อยชนิดอื่นนอกจากสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดที่กล่าวข้างต้น ได้แก่ O-pentosyl 8-C-hexosyl luteolin, O-pentosyl 6-C-hexosyl luteolin, O-pentosyl 8-C-hexosyl apigenin, O-hexosyl luteolin, O-deoxyhexose-hexosyl apigenin และ O-hexosyl tricetin เป็นต้น (Z. Lv et al., 2012)

ในหลายงานวิจัยได้ทำการมุ่งเน้นในศึกษาเกี่ยวกับกลุ่ม flavone C-glycosides ได้แก่ orientin, vitexin, isorientin และ isovitexin รวมถึงในงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาสารสกัดในใบหลายชนิด พบว่าในใบไม้แต่ละชนิดมีองค์ประกอบของกลุ่ม flavone C-glycosides แตกต่างกันและปริมาณไม่เท่ากัน อาทิเช่น การศึกษาการจำแนกสารกลุ่ม flavone C-glycosides ได้แก่ orientin, vitexin, isorientin และ isovitexin ด้วยเทคนิค TLC ในใบไม้ 17 สกุล จำนวน 51 สปีชีส์ พบว่าในใบไม้ 40 สปีชีส์มีสารกลุ่ม flavone C-glycosides เป็นองค์ประกอบและในใบไม้ส่วนมากพบ isorientin เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังจำแนก flavone C-glycosides ในใบไม้ *B. multiplex*, *P. heterocycla* และ *P. acuta* ด้วยเทคนิค HPLC ผลการศึกษาพบว่าค่า retention time (RT) ของ isorientin, orientin, vitexin และ isovitexin มีค่าเท่ากับ 14.09, 15.89, 23.55, 25.93 นาที ตามลำดับ และช่วงความเข้มข้นของสารทั้ง 4 ชนิด ที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1.00-2.78, 0-0.07, 0.20-0.68 และ 0-0.31 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าในใบไม้ *P. heterocycle* มีองค์ประกอบของสารทั้ง 4 ชนิดนี้ ในขณะที่ใบของไม้ *P. acuta* ไม่พบ vitexin และในใบไม้ *B. multiplex* ไม่พบทั้ง vitexin และ orientin ซึ่งสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC (Wang et al., 2012a)

นอกจากสารกลุ่ม flavone C-glycosides แล้วแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ยังมีคุณสมบัติเด่นเช่นกัน โครงสร้างของแอนโทไซยานินประกอบด้วยอะไกลโคน (aglycone) น้ำตาล และหมู่เอซิล (acyl group) จัดเป็นรงควัตถุที่ให้สีแดง สีม่วง และสีน้ำเงิน ที่พบในพืชและสามารถละลายน้ำได้ดี มีมากกว่า 200 ชนิด แอนโทไซยานินที่พบในพืช ได้แก่ peonidin, malvidin, cyanidin, petunidin, delphinidin และ pelargonidin เนื่องจากแอนโทไซยานินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทำให้มีประโยชน์ช่วยในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน เป็นต้น ซึ่งสามารถพบในอุ้งน้หนากหลายสายพันธุ์ที่น้ำหนัก 100 กรัม จะพบปริมาณแอนโทไซยานินในช่วง 30-750 มิลลิกรัม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในใบไม้ *Indosasa hispida* มีอินที่

การศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรม การศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545; อรรถนัย มงคลพร, 2548)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และสามารถตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในแต่ละชนิดได้ โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สามารถทำได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งพร้อมกัน (multi-locus PCR) โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) หรือ พีซีอาร์ (PCR) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นจำนวนมากเป็นล้านเท่า และเกิดขึ้นต่อเนื่องซ้ำๆ เป็นลูกโซ่ในแต่ละรอบ ซึ่งการทำพีซีอาร์ต้องอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ จำนวน 20-30 เบส ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเกาะตั้งต้น หรือไพรเมอร์ (primer) ที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เพื่อให้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสสามารถสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ได้ ดังนั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ โดยมีวิธีการ คือนำดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์มาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ คือออกซิโรโบนิวคลีโอไซค์ไตรฟอสเฟตทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP จากนั้นแยกดีเอ็นเอต้นแบบสายเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยว (denaturation) เป็นการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยใช้ความร้อนแล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสคู่สมเข้าจับกับลำดับดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) โดยอุณหภูมิในช่วงนี้ขึ้นอยู่กับลำดับเบสของไพรเมอร์ซึ่งส่วนมากอยู่ในช่วง 40-72 องศาเซลเซียส จากนั้นขั้นตอนสุดท้ายจะใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสแต่ละชนิด ได้แก่ Taq DNA polymerase และการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมเพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเออย่างมีประสิทธิภาพ โดยขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นจะต้องอาศัยเครื่อง Thermal cycler ในการปรับอุณหภูมิดังกล่าว เนื่องจากสามารถตั้งโปรแกรมให้เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างรวดเร็วได้ อีกทั้งยังสามารถควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองได้ตามเวลาที่ตั้งไว้อีกด้วย (คำรพ รัตนสุด, 2561; สุมาลี ตั้งประดับกุล, 2553; สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ 1. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (Hybridization-based DNA marker) ซึ่งต้องอาศัยเทคนิค DNA Hybridization ตัวอย่างเครื่องหมายประเภทนี้ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism หรือ RFLP) 2. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR-based DNA marker) เพื่อเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอจากในหลอดทดลองตัวอย่างเครื่องหมายประเภทนี้ที่ถูกนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA หรือ RAPD) และเครื่องหมาย เอสเอสอาร์ (simple sequence repeat หรือ SSR) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเทคนิคการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบอื่นๆ คือ เครื่องหมายเอแอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism หรือ AFLP) ซึ่งอาศัยหลักการพื้นฐานทั้งพีซีอาร์ และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) เช่นเดียวกับเครื่องหมาย RFLP (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล, 2545; อรรถนัย มงคลพร, 2548)

7. อาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA; RAPD) และแฮตอาร์เอพีดี (High annealing temperature - random amplified polymorphic DNA; HAT-RAPD)

RAPD เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอวิธีหนึ่ง โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) เทคนิค RAPD ถูกพัฒนาขึ้นโดย William และคณะ (1990) ด้วยไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียว ซึ่งจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายแบบสุ่มในบริเวณที่มีเบสเป็นคู่สมกัน จากนั้นนำไปแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) แล้วย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์จนได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถตรวจหาพอลิมอร์ฟิซึมได้จากความแตกต่างจากการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นว่ามีหรือไม่มี ณ ตำแหน่งนั้นๆ ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว และไม่ยุ่งยาก แต่ข้อจำกัดสำหรับเทคนิค RAPD ในการทดลองซ้ำอาจไม่ได้ผลเหมือนเดิม เนื่องจากมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงในสภาวะต่างๆ มาก จึงควรควบคุมสภาวะการทดลองให้เหมือนเดิม (เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ, 2559; สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล, 2545)

HAT-RAPD เป็นเทคนิคที่คล้ายกับเทคนิค RAPD แต่มีความแตกต่างกันในขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ในขณะที่ทำพีซีอาร์ที่ใช้อุณหภูมิสูงขึ้นจากเทคนิค RAPD (35-42 องศาเซลเซียส) ปรับเป็นช่วงอุณหภูมิ 46-62 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ข้อดีของเทคนิค HAT-RAPD คือ เป็นวิธีที่ง่ายขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายต่ำ ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอ และเป็นเทคนิคที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้สูง (Anuntalabhochai et al., 2002) ทั้งนี้ยังมีงานวิจัยที่ทำการศึกษเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดของพืชหลายชนิด เช่น ในการศึกษาการจำแนกไผ่สกุล *Dendrocalamus* Nees

จำนวน 8 สปีชีส์ ได้มีการใช้เทคนิค HAT-RAPD โดยใช้อุณหภูมิในการทำซีอาร์ในขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์จำนวน 50 ชนิด (Rangsiruji et al., 2018)

8. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไผ่

ในการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่หลายสปีชีส์ได้มีการนำเทคนิค RAPD มาใช้ในการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ *D. hamiltonii* ที่ทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยชักนำจากส่วนข้อของกิ่งไผ่จากต้นแปลง โดยเก็บตัวอย่างยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ทุก 3 subcultures (subculture รอบที่ 3-30) และเก็บใบจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำออกปลูกอายุ 1 และ 2 ปี ซึ่งเทียบกับต้นแม่ที่ได้จากแปลงปลูกก่อนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ 23 ชนิด จากการทดสอบไพรเมอร์ทั้งหมดรวม 25 ชนิด (OPA18, OPJ02, OPJ04, OPJ06, OPJ07, OPJ09, OPE01-07, OPE10-11, OPE16, OPO01, OPO04-07, OPO10-11, OPM11 และ OPF02) พบว่าแถบดีเอ็นเอของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่แตกต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นแม่จากแปลงปลูก (S. R. Singh, Dalal, et al., 2013a) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ *D. strictus* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยชักนำจากส่วนข้อเทียบกับต้นแม่จากแปลงปลูก เมื่อนำมาทำการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD พบว่าสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้ 10 ชนิด จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 24 ชนิด และปรากฏรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ *D. strictus* เหมือนกับต้นแม่จากแปลงปลูกทุกประการ แสดงให้เห็นว่าการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในไผ่สปีชีส์นี้ไม่นำไปสู่การเกิด somaclonal variation (Goyal et al., 2015)

การตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ได้มีการศึกษาหลายเทคนิคด้วยกัน นอกเหนือจากเทคนิค RAPD ได้แก่ inter-simple sequence repeats (ISSR), simple sequence repeat (SSR) และ AFLP เป็นต้น ดังรายงานการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ *B. tulda* และ *B. balcooa* โดยใช้เทคนิค RAPD (M. Das et al., 2005) ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ *B. balcooa* โดยใช้เทคนิค ISSR (Negi and Saxena, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในไผ่ *B. nutans* ด้วยเทคนิค AFLP อีกด้วย (R. Mehta et al., 2011) รวมถึงการศึกษาในไผ่ *B.*

bambos และ *Guadua angustifolia* ด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR (Anand et al., 2013; H. K. Nadha et al., 2011) และมีการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไม้ *B. bambos* และ *B. vulgaris* ที่เกิดจากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนข้อเทียบกับต้นแม่จากแปลงปลูกด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด (Desai et al., 2019) ซึ่งแต่ละเทคนิคมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันไป โดยในการศึกษานี้ได้คัดเลือกเทคนิค RAPD สำหรับการตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของไม้ขางหม่น เนื่องจากมีรายงานการศึกษาที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไม้ *D. asper* และ *D. hamiltonii* ด้วยเทคนิค RAPD, ISSR, SSR และ AFLP พบว่าเทคนิค RAPD และ ISSR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ง่าย และสามารถตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมได้ดี (S. R. Singh, Dalal, et al., 2013a, 2013b) และยังมีการศึกษาในไม้ *D. membranaceus* โดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR พบว่าการตรวจสอบความเสถียรของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและต้นแม่จากแปลงไม่นำไปสู่การเกิด somaclonal variation ทั้งสองเทคนิค (Brar et al., 2012) นอกจากนี้แล้วยังมีการนำความรู้เกี่ยวกับการใช้เทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อช่วยจำแนกและระบุชนิดของไม้ เนื่องจากการศึกษาอนุกรมวิธานของไม้นั้นต้องมีการศึกษาพื้นฐานทางสัณฐานวิทยาของดอกไม้ แต่ไม้บางสปีชีส์ใช้เวลาหลายปีในการออกดอกจึงทำให้มีการศึกษาที่จำกัด ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่มีการนำเทคนิคระดับโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกสปีชีส์ไม้และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกไม้ 12 สปีชีส์ ได้แก่ *B. vulgaris*, *B. vulgaris* var. *striata*, *B. ventricosa*, *B. multiplex* var *Silver stripe*, *B. multiplex*, *B. arundinacea*, *B. balcooa*, *Cephalostachyum pergracil*, *D. giganteus*, *D. strictus*, *Dinocloa m'Clellandi* และ *Sasa* sp. โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าเทคนิค RAPD มีประสิทธิภาพสามารถใช้จำแนกสปีชีส์ของไม้และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ (Nayak et al., 2003) และยังมีการใช้เทคนิค RAPD เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในไม้ 26 สปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ 50 ไพรเมอร์ (OPM, OPH, OPO, OPR, OPS และ OPB) สำหรับการทดสอบ (Eevera et al., 2008)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

ไม้ที่ใช้ในการทดลอง 9 สปีชีส์ คือ ไม้ชางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro "Nuan Rajinee"), ไม้ดำ (*Phyllostachys nigra* (Lodd. ex Lindl.) Munro) และ ไม้ปักกิ่ง (*Dendrocalamus* sp.) ซึ่งเก็บจากตำบลหนองบัว อำเภอเมือง จังหวัดสระแก้ว (พิกัด $13^{\circ}36'06.2''\text{N}$ $101^{\circ}56'26.8''\text{E}$) ไม้เลี้ยง (*Bambusa multiplex* (Lour.) Raeusch), ไม้รวก (*Thyrsostachys siamensis* Gamble), ไม้กิมซุง (*B. beecheyana* Munro), ไม้เหลียง (*B. vulgaris* Schrader ex Wendland cv. Vittata McClure), ไม้หน้าเต้า (*B. ventricosa* McClure) และ ไม้หวานปร่าจีน (*Bambusa* sp.) เก็บตัวอย่างจากอำเภอเมืองจังหวัดนครปฐม (พิกัด $13^{\circ}50'29.0''\text{N}$ $100^{\circ}03'42.1''\text{E}$)

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- MS (Murashige and Skoog, 1962)
- gellan gum
- 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) (Ajax Finechem, Australia)
- Indole-3-butylic acid (IBA) (SRL, India)
- Indole-3-acetic acid (IAA) (Fluka, China)
- 6-Benzyladenine (BA) (Alfa Aesar, Great Britain)
- Kinetin (Kn) (SRL, India)
- Thidiazuron (TDZ) (Riedek-de Haën, Germany)
- Ethyl alcohol 95% (L PURE, Thailand)
- Haiter (Kao, Thailand)
- Tween 20 (Scharlau, European Union)
- Mercury (II) chloride (Alpha chemika, India)

2.2 สารเคมีสำหรับการทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรม

- CTAB buffer
- β -Mercapto-ethanol (Fluka Chemika, Switzerland)
- Chloroform:isoamyl (24:1) (VWR Chemicals, France)
- Isopropanol (Daejung, Korea)
- TE buffer (1X) pH 8.0 Molecular biology grade (Applichem, Germany)
- Liquid Nitrogen
- 70% ethanol
- LE Agarose for gel electrophoresis premium grade (QP, USA)
- 50X Tris acetic EDTA (TAE) buffer (Vivantis, Malaysia)
- Redsafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRon, Korea)
- 1bp DNA ladder (Vivantis, Malaysia)
- *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Malaysia)
- PCR buffer
- dNTP set (Vivantis, Malaysia)
- Magnesium chloride ($MgCl_2$)

2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์ในใบไม้

- Gallic acid (Merck, China)
- 10% Folin-Ciocalteu reagent (VWR Chemicals, France)
- 7.5% Sodium Carbonate (Na_2CO_3) (Alpha chemika, India)
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (SIGMA, Switzerland)
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (SIGMA, Germany)
- Quercetin (HPLC grade) (SIGMA, India)
- 1M Potassium acetate (PanReac AppliChem, Germany)
- 10% Aluminium chloride (VWR Chemicals, Belgium)

- Methanol (VWR Chemicals, France)
- Potassium chloride buffer (pH 1) (Merck, Germany)
- Sodium acetate buffer (pH 4.5) (Merck, Germany)
- Isoorientin (HPLC grade) (SIGMA, China)
- Orientin (HPLC grade) (SIGMA, China)
- Isovitexin (HPLC grade) (SIGMA, France)
- Vitexin (HPLC grade) (SIGMA, Germany)
- Ethyl acetate (Merck, Sweden)
- Acetic acid (BDH, England)
- Ethanol (VWR Chemicals, France)
- Formic acid (Fisher Chemical, UK)
- Acetonitrile (HPLC grade)
- 2-aminoethyl diphenylborinate (Sigma, Germany)
- Polyethylene glycol 400 (PEG 400) (Merck, Germany)
- Dichloromethane (Scharlau, European Union)

3. เครื่องมือ

3.1 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- เครื่องชั่งแบบละเอียดและแบบหยาบ (METTLER TOLEDO)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) (METTLER TOLEDO)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave) รุ่น FD 80A (ZEALWAY, China)
- เครื่องอบไฟฟ้า (Hot air oven) รุ่น BD/ED/FD with R3-Controller (BINDER)
- เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ปีกเกอร์, แท่งแก้ว และกระบอกตวง เป็นต้น
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) รุ่น AVC-4A1 (Esco)
- ขวดแช่เครื่องมือ
- ด้ามมีดเบอร์ 4 และ 7 พร้อมใบมีดเบอร์ 11 และ 14
- ชั้นสำหรับวางต้นพืช

- ไมโครเวฟ รุ่น MS28H5125BK (Samsung, Malaysia)

3.2 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับการทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรม

- โกร่งและสาก
- หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Gibthai)
- Micropipette (Thermo scientific, Finland)
- pipette tips (Biologix)
- เครื่อง Heating block รุ่น HB – 48 (DAIHAN Scientific, Korea)
- เครื่อง Gel Documentation (InGenius United 3, UK)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น Megafuge8/8R (Thermo Scientific, Germany)
- เครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น ME204 (METTLER TOLEDO)
- ไมโครเวฟ รุ่น R-280 (Sharp, Thailand)
- Minirun gel electrophoresis system GE-100 and Gel cast (Hangzhou bioer technology CO., LTD)
- PCR tube (ExtraGene, Taiwan)
- เครื่อง Thermal cycler (BIO-RAD, Singapore)

3.3 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับการวิเคราะห์พหุคูณเคมีในไบโอฟ

- โกร่งและสาก
- 15 ml and 50 ml microcentrifuge tube (Gibthai)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น Megafuge8/8R (Thermo Scientific, Germany)
- เครื่องเขย่าสาร Vortex รุ่น TT-2800-VVM (Hercuvan)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WNB 45 (Memmert, Germany)
- ตู้แช่แข็ง รุ่น SJC-318-WH (Sharp, Thailand)
- เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer รุ่น Optizen 3220UV (Mecasys, Korea)
- Quart Cuvette (Starnascientific, UK)
- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography

- C₁₈ column (4.6 x 250 mm, 5 μm, YMC pack R&D ODS-A, YMC Japan)
- TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany)
- เครื่องแก้ว เช่น กระจบอขวด บีกเกอร์ และ ขวด duran
- Micropipette and pipette tips

ค่าใช้จ่ายทั้งหมดในการวิจัย

- 400,000 บาท

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไฟซางหม่น “นวลราชินี”

1.1 การศึกษาการปนเปื้อนและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในช่วงเวลาการเก็บที่แตกต่างกัน

เก็บชิ้นส่วนข้อไฟซางหม่นตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2562 เก็บข้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-0.8 เซนติเมตร ยาว 4 เซนติเมตร ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน และน้ำเปล่าให้สะอาด แช่ข้อไฟในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ย้ายข้อไฟลงสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้ายข้อลงในสารละลายเมอร์คิวริก (II) คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำข้อไฟมาตัดปลายทั้ง 2 ด้านแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมผงวุ้น (gellan gum) 1.8 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.6 ด้วยสารละลายโพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ หรือ กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปล่อยให้อาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพความเข้มแสงประมาณ 35-40 μmol m⁻²s⁻¹ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

1. เปรียบเทียบอุณหภูมิ
2. ปริมาณน้ำฝน
3. เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน
4. เปอร์เซ็นต์การแตกยอดในแต่ละช่วงเวลาการเก็บ

1.2 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตในอาหารสูตร MS ที่มีผลต่อการแตกยอดจากชิ้นส่วน ข้อเริ่มต้น

นำชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เพื่อให้ได้ปริมาณยอดสูงสุดบนอาหารสูตรต่างๆ 8 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 MS + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหาร 8 สูตร แต่ละสูตรเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผง
วุ้น (gellan gum) 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองสูตรอาหารละ 20 ซ้ำ นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความ
เข้มแสงประมาณ $35-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนยอด
2. ความยาวของยอด
3. ลักษณะของยอด
4. วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความ
เชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.3 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ

นำกลุ่มยอดประมาณ 3-7 ยอด จากส่วนข้อเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 ในสูตรที่ดี
ที่สุดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลงเพื่อชักนำให้เกิดยอดทวีคูณบนสูตรอาหารที่
ประกอบด้วย BA เพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับ TDZ ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 12 สูตรดังนี้
สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 MS + BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 MS + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 MS + BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 9 MS + BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 10 MS + BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 11 MS + BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 12 MS + BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหาร 12 สูตร แต่ละสูตรเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น(gellan gum) 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองสูตรอาหารละ 15 ซ้ำ นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ $35-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนยอด
2. ความยาวยอด
3. ลักษณะของยอด
4. วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความ

เชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.4 การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ในสภาพกึ่งแข็งและเหลวต่อการชักนำให้เกิดยอดทวิคูณ

นำยอดที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 มาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอดทวิคูณบนอาหารกึ่งแข็งและเหลวสูตร MS ต่างๆ 5 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหาร 5 สูตร แต่ละสูตรเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และในอาหารกึ่งแข็งเติมผงวุ้น (gellan gum) 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองสูตรอาหารละ 15 ซ้ำ นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ $35-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนยอด
2. ลักษณะของยอด
3. วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.5 การศึกษาผลของอะดีนีนซัลเฟต (AdSO₄) ต่อการเกิดยอดทวิคูณของกลุ่มยอด

คัดเลือกสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.2 คือ อาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารละลายอะดีนีนซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 80, 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหาร 6 สูตร แต่ละสูตรเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองสูตรอาหารละ 15 ซ้ำ นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ $35-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนยอด
2. ลักษณะของยอด
3. วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.6 การศึกษาผลของสารส่งเสริมการเติบโตของพืชต่อการเกิดยอดทวิคูณ

นำกลุ่มยอดจากการทดลองที่ 1.2 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารต่างๆ ดังนี้

สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + PVP-40 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + PVP-40 200 มิลลิกรัมต่อลิตร + ascorbic acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหารกึ่งแข็งและเหลวอย่างละ 5 สูตร แต่ละสูตรเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และสารละลายอะดีนีนซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับอาหารกึ่งแข็งเติมผงวุ้น (gellan gum) 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองสูตรอาหารละ 15 ซ้ำ นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ $35-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนยอด
2. ลักษณะของยอด
3. วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.7 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดคลัสต์

นำบริเวณปลายยอดจากการทดลองที่ 1.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตต่างๆ ดังนี้

สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร*

สูตรที่ 4 MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร*

สูตรที่ 6 MS + NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 MS + NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร*

*เติม casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหารกึ่งแข็ง 7 สูตร แต่ละสูตรเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น (gellan gum) 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองสูตรอาหารละ 15 ช้ำ นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ $35-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

1. เปอร์เซ็นต์การเกิดคลัสต์ในอาหารสูตรต่างๆ
2. การเติบโตของคลัสต์ในสูตรต่างๆ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)
3. ลักษณะของคลัสต์
4. วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.8 การศึกษาการควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดในคลัสต์

นำกลุ่มคลัสต์จากสูตรที่ดีที่สุดในการทดลองที่ 1.7 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตต่างๆ ดังนี้

สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 MS + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 MS + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 MS + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหารกึ่งแข็ง 5 สูตร แต่ละสูตรเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น (gellan gum) 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองสูตรอาหารละ 10 ช้ำ นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ $35-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

1. จำนวนยอด
2. ลักษณะของยอด
3. ลักษณะของคัลลัส
4. วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.9 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก

นำกลุ่มยอดที่ได้จากการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากการทดลองที่ 1.3 มาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตต่างๆ ดังนี้

- สูตรที่ 1 MS (ชุดควบคุม)
- สูตรที่ 2 MS + IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สูตรที่ 3 MS + IBA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สูตรที่ 4 MS + IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สูตรที่ 5 MS + IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สูตรที่ 6 MS + IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สูตรที่ 7 MS + IBA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สูตรที่ 8 MS + NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้ประกอบด้วยสูตรอาหารกึ่งแข็ง 8 สูตร แต่ละสูตรเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น (gellan gum) 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองสูตรอาหารละ 10 ชำ นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ $35-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

1. เปอร์เซ็นต์การเกิดรากในสูตรอาหารต่างๆ
2. ลักษณะของราก

2. การตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ชางหม่น “นวลราชินี”

2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

2.1.1 ต้นในแปลง

ใบไผ่ที่นำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอในการศึกษานี้คือใบไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro) ที่ได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกของสมาชิกในวิสาหกิจชุมชนนวัตกรรมไผ่บ้านเกาะรัง อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว โดยเก็บส่วนใบไผ่ลักษณะที่เป็นใบม้วนจำนวน 5 ตัวอย่างจากต้นในแปลง นำมาล้างทำความสะอาดและห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวและนำชิ้นส่วนตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ

2.1.2 ใบจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำชิ้นส่วนข้อไผ่ทั้ง 5 กอ (กอเดียวกับที่เก็บใบอ่อนทั้ง 5 ตัวอย่าง ในข้อ 2.1.1) มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ พร้อมทั้งเก็บยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในทุกรอบของการย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) สูงสุดจำนวน 8 subcultures เนื่องจากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีขนาดเล็กและไม่สมบูรณ์เมื่อทำการขยายมากกว่า 8 รอบการย้ายเนื้อเยื่อ นำยอดที่เก็บในแต่ละรอบการย้ายเนื้อเยื่อห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวและนำชิ้นส่วนตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำส่วนข้อของไผ่ชางหม่นจาก 5 กอ มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากส่วนข้อ จากนั้นย้ายลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ โดยมีการย้ายลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเติบโตเพื่อปรับสภาพต้นในบางรอบของการย้ายอาหาร (subculture) จากนั้นเก็บส่วนยอดที่เจริญขึ้นใหม่ทุก 3 สัปดาห์

2.3 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีประยุกต์ของ Sharma และคณะ (2008) ดังนี้

2.3.1 นำใบไม้ 0.5 กรัม บดละเอียดลงในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติมน้ำยาสกัด CTAB buffer 10 มิลลิลิตร ผสมกับ β -Mercapto-ethanol 50 ไมโครลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และแบ่งตัวอย่างที่ผสมด้วย CTAB buffer ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด

2.3.2 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.3.3 เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย ตัวอย่างในแต่ละหลอดทดลองข้อ 2.3.1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.3.4 เก็บสารละลายส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนข้อ 2.3.3 อีก 1 ครั้ง

2.3.5 เก็บสารละลายส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ และเติม isopropanol ที่แช่เย็น 0.7 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ดูมาผสมให้เข้ากัน และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน

2.3.6 เก็บตะกอนดีเอ็นเอโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนออกแล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.3.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.3.8 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 25-50 ไมโครลิตร แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.4 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

2.4.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (Nanodrop)

ตั้งค่าเครื่อง Nanodrop และใช้ TE buffer เป็น Blank เนื่องจากการทดลองนี้ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer จากนั้นดูสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการทดลองที่ 2.3 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนฐานที่ใช้สำหรับวัดปริมาณดีเอ็นเอ ทำการวัดค่าและบันทึกค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ก่อนการวัดค่าสารสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างต่อไปควรงล้างด้วยน้ำ DI (Deionized water) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและเช็ดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ (Kimwipes®) สำหรับเครื่อง Nanodrop

2.4.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)

เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคการแยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันด้วยกระแสไฟฟ้า โดยทำการเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ใน 1X TAE buffer (ซึ่ง agarose 0.4 กรัม ละลายใน 1X TAE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยหลอมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน) ที่เติมสีย้อม (Redsafe) 2.5 ไมโครลิตร และเขย่าให้เข้ากัน เมื่อเจลเริ่มเย็นลงจึงเทเจลใส่ถาดที่เตรียมไว้โดยให้เจลหนาประมาณ 4-5 มิลลิลิตร รอจนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงดึงหัวเสียบออกช้าๆ และนำเจลวางลงในเครื่องสำหรับทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและเติม 1X TAE buffer จนท่วมแผ่นเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครลิตร กับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละช่องของแผ่นเจล และเทียบด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1 kb เพื่อเทียบขนาดของสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ เปิดเครื่องให้ทำงานโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เมื่อแถบดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ประมาณ 3 ใน 4 ของเจล จึงปิดเครื่องแล้วนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต หรือภายใต้เครื่อง Gel Documentation เพื่อตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

2.5 การคัดเลือกไพรเมอร์ด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และ HAT-RAPD

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นในแปลงจากข้อ 2.1.1 และผ่านการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 5 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้น 50 ng/μl ผสมรวมกันทั้ง 5 ตัวอย่าง เพื่อใช้สำหรับการคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่มทั้ง 40 ชนิด ได้แก่ OPF1-OPF20 และ OPW1-OPW20 ในขั้นตอนนี้จะทำการตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มโดยใช้เทคนิค RAPD และ HAT-RAPD ที่มีอุณหภูมิแตกต่างกันในช่วง annealing โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 47 องศาเซลเซียส สำหรับ RAPD และ HAT-RAPD ตามลำดับ เป็นเวลา 1 นาที ส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์มีดังนี้

Pooled DNA	2	ไมโครลิตร
10X buffer A	8.63	ไมโครลิตร

50 mM MgCl ₂	1.5	ไมโครลิตร
2 mM dNTP	0.75	ไมโครลิตร
10 pmol/μl OPF or OPW primers	1.5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.5	ไมโครลิตร
H ₂ O molecular grade	0.12	ไมโครลิตร

และใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นที่ 1 Pre-heat denaturation	94	องศาเซลเซียส	3	นาที	} 39 รอบ
ขั้นที่ 2 Heat denaturation	94	องศาเซลเซียส	1	นาที	
Annealing	37	องศาเซลเซียส	1	นาที	
Primer Extension	72	องศาเซลเซียส	2	นาที	
ขั้นที่ 3 Extension	72	องศาเซลเซียส	5	นาที	

*หมายเหตุ สำหรับ HAT-RAPD ช่วง annealing ใช้อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส

เมื่อสิ้นสุดการทำปฏิกิริยานำผลผลิตพีซีอาร์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปศึกษาต่อไป ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไส้ชางหม่นแต่ละตัวอย่างด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำโดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยอดลงในเจลและเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb plus DNA Ladder) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง Gel Documentation และบันทึกผลเพื่อวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไส้ชางหม่นแต่ละตัวอย่าง โดยเกณฑ์สำหรับการคัดเลือกไพรมอร์จะคัดเลือกไพรมอร์ที่ให้แถบที่ชัดเจน และมีจำนวนแถบจำนวนมาก

2.6 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD

นำไพรมอร์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 2.5 มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD ของไส้ชางหม่นที่เก็บส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแต่ละต้น (8 subculture) เทียบกับไส้ชางหม่นจากแปลงธรรมชาติทั้ง 5 กอ โดยใช้ส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์ดังนี้

DNA template (50 ng/μl)	2	ไมโครลิตร
-------------------------	---	-----------

H ₂ O molecular grade	8.63	ไมโครลิตร
10X buffer A	1.5	ไมโครลิตร
50 mM MgCl ₂	0.75	ไมโครลิตร
2 mM dNTP	1.5	ไมโครลิตร
10 pmol/μl OPF or OPW primers	0.5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.12	ไมโครลิตร

และใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นที่ 1 Pre-heat denaturation	94	องศาเซลเซียส	3	นาที	} 39 รอบ
ขั้นที่ 2 Heat denaturation	94	องศาเซลเซียส	1	นาที	
Annealing	37	องศาเซลเซียส	1	นาที	
Primer Extension	72	องศาเซลเซียส	2	นาที	
ขั้นที่ 3 Extension	72	องศาเซลเซียส	5	นาที	

*หมายเหตุ สำหรับ HAT-RAPD ช่วง annealing ใช้อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส

เมื่อสิ้นสุดการทำปฏิกิริยานำผลผลิตพีซีอาร์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปศึกษาต่อไป ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่ซ้ำกันแต่ละตัวอย่างด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทำโดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยอดลงในเจลและเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp plus DNA Ladder) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง Gel Documentation และบันทึกผล แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยเกณฑ์ที่ใช้สำหรับการบันทึกจำนวนแถบดีเอ็นเอจะต้องปรากฏแถบที่เหมือนกันทั้ง 2 ครั้ง แถบมีความชัดเจน และวิเคราะห์ค่า %polymorphism ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการแยกความแตกต่างของตัวอย่าง มีสูตรคำนวณดังนี้

$$\%polymorphism = \left[\frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic bands จากไพรมอร์แต่ละชนิด}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของไพรมอร์ชนิดเดียวกัน}} \right] \times 100$$

3. การศึกษาสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากใบไผ่ทั้ง 9 สปีชีส์

3.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการเก็บใบไผ่จากจังหวัดสระแก้ว และนครปฐม จำนวน 9 สปีชีส์ ได้แก่ ไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ไผ่ดำ ไผ่ปักกิ่ง ไผ่เหลือง ไผ่น้ำเต้า ไผ่เหลือง ไผ่กิมชุง ไผ่รวก และไผ่เลี้ยง จากนั้นนำไปโอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยเก็บใบไผ่แต่ละสปีชีส์จากไผ่ 3 กอที่แตกต่างกันในช่วงเดือนพฤษภาคมปี พ.ศ. 2561

3.2 การสกัดใบไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

นำใบไผ่ชางหม่นมาสกัดโดยดัดแปลงวิธีการของ Macwan et al. (2010) ซึ่งมีวิธีโดยย่อดังนี้ นำใบไผ่มาบดให้ละเอียดด้วยในโตรเจนเหลว จากนั้นเตรียมใบไผ่ที่บดละเอียดจำนวน 1 กรัม เติมสารละลายที่แตกต่างกันดังนี้ 60%, 80%, 100% เอทานอล และ 100% เมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าสารด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนเก็บไว้เพื่อนำไปวัดค่าฟีนอลิกรวมต่อไปเพื่อเลือกสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดใบไผ่ ส่วนตะกอนนำไปสกัดซ้ำ 4 ครั้ง และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยสารละลายแต่ละชนิด สารละลายที่ได้ควรเก็บในภาชนะที่บดแสงที่ 4 องศาเซลเซียส (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

การตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในใบไผ่ 9 สปีชีส์ โดยดัดแปลงวิธีการของ Macwan et al. (2010) และ Singleton and Rossi (1965) ซึ่งมีวิธีโดยย่อดังนี้ นำสารสกัดจากใบไผ่ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติม 10% Folin-Ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที และเก็บไว้ในที่มืด 1 นาที จากนั้นเติม 7.5% Sodium carbonate ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปมิลลิกรัมของ Gallic acid equivalents (GAE) ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งใบไผ่ ซึ่งมีหน่วยเป็น mg GAE/g DW

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric

การตรวจสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในใบ 9 สปีชีส์ โดยดัดแปลงวิธีการของ Chang et al. (2002) ซึ่งมีวิธีโดยย่อดังนี้ นำสารสกัดจากใบไม้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอล (methanol) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 10% Aluminium chloride ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ 1M Potassium acetate ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอควีติน (Quercetin) และคำนวณปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในรูปมิลลิโมลาร์ของ Quercetin equivalents (QE) ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งใบไม้ ซึ่งมีหน่วยเป็น mM QE/g DW

3.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging

การตรวจสอบหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในใบ 9 สปีชีส์ โดยดัดแปลงวิธีการของ Yue and Xu (2008) ซึ่งมีวิธีโดยย่อดังนี้ เตรียมสารละลาย DPPH โดยชั่ง DPPH 0.0125 กรัม ละลายในเมทานอล 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในสารสกัดใบไม้แต่ละตัวอย่างและสารละลาย Trolox ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานปริมาตร 0, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (OD_{0}) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (OD_{30}) อีกครั้งโดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง และคำนวณหา %DPPH inhibition โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%DPPH \text{ inhibition} = [(OD_{0} - OD_{30})/OD_{0}] \times 100$$

OD_{0} = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ที่เวลา 0 นาที

OD_{30} = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ที่เวลา 30 นาที

สารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้น 0.5 mM ซึ่งละลายในเมทานอลใช้เป็นสารมาตรฐานและคำนวณหาค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) โดยนำความชันของกราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไม้หารด้วยความชันของกราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox และรายงานผลค่า TEAC ในรูปไมโครโมลต่อกรัมของน้ำหนักแห้งใบไม้ ($\mu\text{mol/g DW}$)

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินโดยวิธี pH-differential

การตรวจสอบหาปริมาณสารแอนโทไซยานินโดยดัดแปลงวิธีการของ Giusti and Wrolstad (2001) ซึ่งมีวิธีโดยย่อดังนี้ นำสารสกัดจากใบไม้ 9 สปีชีส์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด โดยขวดที่ 1 เติมสารละลาย potassium chloride buffer ที่ค่า pH 1.0 ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ขวดที่ 2 เติมสารละลาย sodium acetate buffer ที่ค่า pH 4.5 ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง และใช้ Cyanidin-3-O-glucoside เป็นสารมาตรฐาน นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้คำนวณด้วยสูตรดังนี้

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

$$\text{Monomeric anthocyanin (mg/L)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) (\Sigma \times L)^{-1}$$

MW = มวลโมเลกุลของ cyanidin-3-O-glucoside (449.2 g/mol)

DF = Dilution factor (DF = 10)

Σ = Molar absorptivity (26,900 L⁻¹M⁻¹cm⁻¹)

L = ระยะทาง (Path length in centimeter = 1 cm.)

3.7 การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)

การจำแนกสารฟลาโวนอยด์จำพวก Flavone C-glycosides โดยใช้เทคนิค TLC ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Wang et al. (2012a) และ Chelyn et al. (2014) โดยนำสารสกัดจากใบไม้ซึ่งสกัดจากใบ 9 สปีชีส์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ทำจุด (spot) ลงบนแผ่น TLC (silica gel 60 F254) โดยให้ แถบแบนห่างกันประมาณ 7 มิลลิเมตร จากนั้นใส่ลงใน Chamber ที่มีตัวทำละลายผสมกันใน อัตราส่วนดังต่อไปนี้ ethyl acetate : formic acid : acetic acid : water (100 : 11 : 11 : 27 v/v/v/v) เมื่อ สารเคลื่อนที่ได้ระยะประมาณ 8 เซนติเมตร นำมาแช่ด้วย diphenylborinic acid 2- aminoethyl ester 1 กรัม ที่ละลายใน ethyl acetate ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมกับ PEG 400 น้ำหนัก 20 กรัม ที่ละลาย ใน dichloromethane ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยสารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ isoorientin, orientin, isovitexin และ vitexin (Sigma-aldrich, USA)

3.8 การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำสารสกัดจากใบไผ่ชางหม่น ไผ่ปักกิ่ง และไผ่ดำ มาจำแนกสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC โดยทำการวิเคราะห์ ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Wang et al. (2012a) และ Chelyn et al. (2014) โดยใช้คอลัมน์ C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m, YMC pack R&D ODS-A, YMC Japan) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายประกอบด้วยน้ำ 0.5% (v/v) glacial acetic acid และ 12.5% (v/v) acetonitrile ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยสารมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ isoorientin, orientin, isovitexin และ vitexin

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้แต่ละตัวอย่างโดยทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ด้วย One way analysis of variance (ANOVA) และ Post Hoc โดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไข่ซางหม่น “นวลราชินี”

1.1 การศึกษาการปนเปื้อนและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในช่วงเวลาการเก็บที่แตกต่างกันในรอบปี

นำส่วนข้อจากกิ่งแขนงไข่ซางหม่นที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-0.8 เซนติเมตร ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและน้ำเปล่าให้สะอาด แช่ข้อไข่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ย้ายข้อไข่ลงในสารละลายไฮเตอร์ (6% w/w sodium hypochlorite) ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้ายข้อไข่ลงในสารละลายเมอร์คิวริก (II) คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำข้อไข่มาตัดปลายทั้ง 2 ด้านแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรคัดแปลง MS เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ในรอบ 3 ปี ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2560 – 2562 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนของข้อไข่ซางหม่นในฤดูหนาวช่วงเดือนพฤศจิกายน และ ธันวาคม มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ (83.5 เปอร์เซ็นต์) และเปอร์เซ็นต์การแตกยอดสูงสุด (100 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 2 และ 3) โดยฤดูกาลของประเทศไทยแบ่งเป็น 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูร้อน เริ่มประมาณกลางเดือนกุมภาพันธ์ถึงประมาณกลางเดือนพฤษภาคม ฤดูฝน เริ่มประมาณกลางเดือนพฤษภาคมถึงประมาณกลางเดือนตุลาคม และฤดูหนาว เริ่มประมาณกลางเดือนตุลาคมถึงประมาณกลางเดือนกุมภาพันธ์ (กรมอุตุนิยมวิทยา, <https://www.tmd.go.th/info/info.php?FileID=23>)

จากผลการทดลองการเก็บตัวอย่างข้อไข่เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแต่ละเดือนในรอบ 3 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560 ถึง ปี พ.ศ. 2562 พบการปลอดเชื้อหลังการฟอกฆ่าเชื้อตั้งแต่ 0-96.0 เปอร์เซ็นต์ และการแตกยอดจากชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อตั้งแต่ 0-100.0 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน และฤดูกาล (ตารางที่ 3) ถึงแม้ว่าในแต่ละฤดูในช่วงที่เก็บตัวอย่างมีอุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดไม่แตกต่างกันมากนัก แต่มีปริมาณน้ำฝนต่ำสุดและสูงสุดที่แตกต่างกันคือ 175/400 มิลลิเมตร ในฤดูฝน 1/45 มิลลิเมตร ในฤดูหนาว และ 15/100 มิลลิเมตร ในฤดูร้อน โดยในฤดูฝน ปริมาณน้ำฝนมากทำให้ไม่มีการแตกยอดมาก และกิ่งเจริญเติบโตได้ดี มีกิ่งอ่อนที่มีตาข้างอ่อนอยู่มาก

นอกจากนี้ทำให้ส่วนของข้อไม้มีความชื้นสูง ทำให้มีการปลดเชื้อหลังการฟอกฆ่าเชื้อต่ำ 34.8 เปอร์เซ็นต์ และมีการแตกยอดจากข้อที่ปลดเชื้อไม่สูงมากนัก 82.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ซึ่งให้ผลการแตกยอดจากข้อที่ปลดเชื้อใกล้เคียงกับในฤดูร้อน 84.4 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความชื้นต่ำ มีการปลดเชื้อสูง 82.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) แต่มีข้อที่สมบูรณ์น้อย เพราะตาที่ข้อแห้ง ส่วนฤดูหนาวในเดือนพฤศจิกายน ธันวาคมและมกราคม เป็นช่วงต่อจากฤดูฝน ไม้มีตาที่สมบูรณ์ และไม่ขึ้นเกินไป ทำให้ได้การปลดเชื้อหลังการฟอกฆ่าเชื้อสูง 83.5 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การแตกยอดจากข้อที่ปลดเชื้อสูงที่สุดถึง 100.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) แต่ในฤดูนี้ได้จำนวนตาที่สมบูรณ์ค่อนข้างจำกัดเนื่องจากการเจริญของกิ่งใหม่ที่มีตาที่สมบูรณ์น้อย



ตารางที่ 2 ผลการปลอດเชื้อและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นไผ่ซางหม่น “นวลราชินี”
ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

ปี พ.ศ	เดือนที่ทำการ ทดลอง	ฤดู	อุณหภูมิ ^{1/} (°C)	ปริมาณน้ำฝน ^{1/} (มิลลิเมตร)	% การปลอດเชื้อ ^{2/}	% การแตกยอด ^{2/} (จากข้อที่ปลอດ)
2560	พฤษภาคม	ฝน	26-35	220-270	0	0
	กันยายน	ฝน	24-34	290-400	50	90
	ตุลาคม	ฝน	23-33	190-260	60	91.5
	พฤศจิกายน	หนาว	23-33	25-45	70	100
	ธันวาคม	หนาว	21-33	1-3	96	100
2561	กุมภาพันธ์	ร้อน	23-34	15-40	81	88.8
	กรกฎาคม	ฝน	25-33	235-320	31	90.3
	สิงหาคม	ฝน	25-33	250-325	65	70.6
	กันยายน	ฝน	24-33	285-380	9	100
	ตุลาคม	ฝน	24-34	175-255	15	83.3
	พฤศจิกายน	หนาว	23-34	15-45	80	100
	ธันวาคม	หนาว	21-33	<10	88	100
2562	มกราคม	หนาว	21-34	15-30	86	100
	เมษายน	ร้อน	25-36	70-100	84	80
	พฤษภาคม	ฝน	25-35	190-260	40	100
	มิถุนายน	ฝน	24-36	225-300	53	100
	กรกฎาคม	ฝน	25-33	245-370	25	100

^{1/} (กรมอุตุนิยมวิทยา, <https://www.tmd.go.th/info/info.php?FileID=23>)

^{2/} ตัวอย่างไผ่ซางหม่น ‘นวลราชินี’ จากสวนไผ่ป๋วยแจ่ม ตำบลหนองหว้า อำเภอเขาลงกรณ์ จังหวัดสระแก้วพิกัด 13°36'06.2"N 101°56'26.8"E

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยการปลดเชื้อและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นไผ่ขางหม่น “นวลราชินี”
ในช่วงปี พ.ศ. 2560-2562

ฤดู	อุณหภูมิ (°C) ต่ำสุด/สูงสุด ^{1/}	ปริมาณน้ำฝน (มิลลิเมตร)	% การปลดเชื้อ ^{1/}	% การแตกยอด ^{1/} (จากข้อที่ปลดเชื้อ)
ฝน	23/36	175/400	34.8	82.6
หนาว	21/34	1/45	83.5	100.0
ร้อน	23/36	15/100	82.5	84.4

^{1/}ค่าเฉลี่ยจากตารางที่ 2

1.2 การศึกษาการควบคุมการเติบโตในอาหารสูตร MS ที่มีผลต่อการแตกยอดจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้น

นำข้อไผ่ขางหม่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-0.8 เซนติเมตร ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวส่วนข้อมาตัดส่วนปลายทั้ง 2 ด้าน ให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นนำข้อมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kn ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารทุกสูตรเกิดยอดจากตาข้าง 100 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่มีสารควบคุมการเติบโตให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกันในช่วง 4.5-5.4 ยอดต่อตาข้าง อย่างไรก็ตามสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้จำนวนยอด 5.0 ยอดต่อตาข้าง มีความยาวยอดสูงที่สุดเฉลี่ย 2.79 เซนติเมตร ลักษณะยอดมีความเรียวยาวสม่ำเสมอ ไม่มีอาการน่าน้ำและแตกใบบาน (ตารางที่ 4, รูปที่ 4b) ซึ่งจำนวนยอดและความสูงยอดเทียบเท่ากับอาหารที่เติมสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ลักษณะยอดอวบและมีอาการน่าน้ำ (ตารางที่ 4, รูปที่ 4d) จากผลการทดลองยังพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสารควบคุมการเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดจำนวนยอดเฉลี่ย 4.6 และ 5.4 ยอด ตามลำดับ มีความยาวยอด 2.01 และ 1.68 เซนติเมตร ตามลำดับ ลักษณะยอดอวบสั้น และน่าน้ำ (ตารางที่ 4, รูปที่ 4e, 4f) ส่วนสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kn ความ

เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.5-4.7 ยอด ความสูงยอดเฉลี่ย 2.33-2.46 เซนติเมตร ลักษณะยอดเรียวเล็กและมีความยาวไม่สม่ำเสมอ (ตารางที่ 4, รูปที่ 4g, 4h) นอกจากนี้ อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเติบโต มีการแตกตาข้าง 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับสูตรอาหารอื่น แต่มีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.4 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ย 2.27 เซนติเมตร ให้ ลักษณะยอดเรียวเล็ก ความยาวไม่สม่ำเสมอ และใบแผ่กางเร็ว (ตารางที่ 4, รูปที่ 4a)

ตารางที่ 4 ผลสารควบคุมการเติบโต BA TDZ และ Kn ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเกิดยอดจากตาข้างของข้อไผ่ซาห่ม่น “นวลราชินี” ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

สารควบคุมการเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)			% การเกิดยอด	การเจริญเติบโตของยอดจากส่วนข้อ ^{1/}		
BA	TDZ	Kn		จำนวนยอด	ความยาวยอด (ซม)	ลักษณะยอด
-	-	-	100	3.4 ± 0.9 ^b	2.27 ± 0.74 ^{ab}	เรียวเล็ก
1.0	0.2	-	100	5.0 ± 1.5 ^a	2.79 ± 0.81 ^a	ยอดยาวสม่ำเสมอ
1.0	0.3	-	100	5.0 ± 1.2 ^a	2.43 ± 0.88 ^{bc}	อวบ น้ำน้ำ
1.0	0.4	-	100	5.2 ± 1.8 ^a	2.63 ± 1.11 ^a	อวบ น้ำน้ำ
2.0	0.2	-	100	4.6 ± 1.5 ^a	2.01 ± 1.05 ^{bc}	อวบ น้ำน้ำ
2.0	0.3	-	100	5.4 ± 1.4 ^a	1.68 ± 0.76 ^c	อวบ น้ำน้ำ
1.0	0.2	1.0	100	4.7 ± 1.4 ^a	2.33 ± 0.59 ^{ab}	เรียวเล็ก
1.0	0.3	1.0	100	4.5 ± 1.5 ^a	2.46 ± 0.81 ^{ab}	ยาวไม่สม่ำเสมอ

^{1/} จากการทดลอง 20 ซ้ำ, ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New Multiple Range Test

- รูปที่ 4** ลักษณะของยอดที่เจริญจากส่วนข้อของไฟหางหม่น “นวลราชินี” บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ร่วมกับ TDZ ที่มีหรือปราศจาก Kn เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (สเกล = 1 เซนติเมตร)
- a) ปราศจากสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม)
 - b) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - c) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - d) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - e) BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - f) BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - g) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - h) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร



1.3 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ

นำกลุ่มยอดประมาณ 4 ยอดต่อกลุ่ม ที่ได้จากส่วนข้อเริ่มต้นจากการทดลองที่ 1.2 ในสูตรที่ดีที่สุด (อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA เพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับ TDZ ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างเพื่อชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ พบว่าอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดในช่วง 4.2-11.9 ยอด และมีความยาวยอดในช่วง 2.69-2.99 เซนติเมตร โดยให้ยอดสีเขียวที่มีลักษณะสมบูรณ์ (ตารางที่ 5, รูปที่ 5b, 5c, 5d และ 5e) ซึ่งแตกต่างจากสูตรที่มีความเข้มข้น BA ในปริมาณสูง ที่ให้ยอดจำนวนมาก แต่ยอดที่ได้สั้นและเป็นกระจุกเล็ก มีสีน้ำตาลและไม้แข็งแรง (ตารางที่ 5, รูปที่ 5f, 5g, 5h, 5i, 5j, 5k และ 5l) ส่วนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม) ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 2.3 ยอด ที่มีความยาวยอด 2.4 เซนติเมตร ลักษณะยอดเหลืองมีการแตกยอดใหม่น้อยและใบแผ่กางเร็ว จากผลการทดลองนี้ พบว่า BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของไผ่ชางหม่น ที่มีความยาวยอด และลักษณะโดยรวมของยอดไผ่ชางหม่นดีที่สุด รองลงมาเป็น BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร



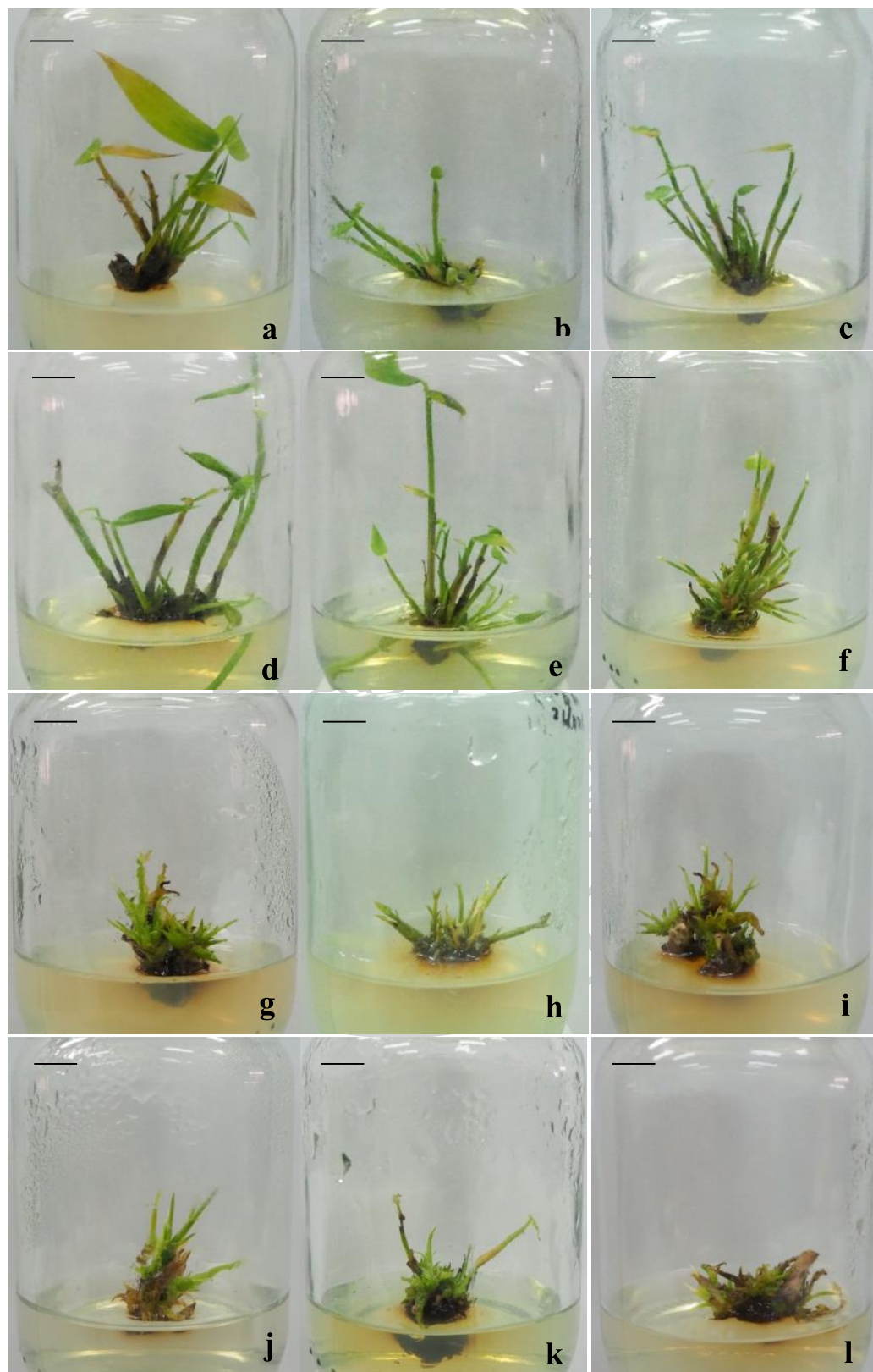
ตารางที่ 5 ผลสารควบคุมการเติบโต BA และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากกลุ่มยอดของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

สารควบคุมการเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		การเจริญเติบโตของกลุ่มยอด (เฉลี่ย)*			
BA	TDZ	จำนวนยอด เริ่มต้นใน กลุ่มยอด	จำนวนยอด ทั้งหมด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	ลักษณะยอด
-	-	3.9 ± 0.3 ^a	2.3 ± 1.3 ^f	2.40 ± 1.24 ^a	ใบแผ่กางเร็วและเหลือง
0.5	-	4.1 ± 0.3 ^a	4.2 ± 1.6 ^{ef}	2.98 ± 0.65 ^a	ยอดเขียว เรียวเล็ก
0.5	0.1	4.1 ± 0.2 ^a	7.3 ± 2.3 ^d	2.99 ± 0.97 ^a	ยอดเขียว เรียวเล็ก ยาวใกล้เคียงกัน
1.0	-	3.9 ± 0.3 ^a	9.1 ± 3.0 ^{cd}	2.69 ± 0.78 ^a	ยอดเขียว ยาวใกล้เคียงกัน
1.0	0.1	4.3 ± 0.4 ^a	11.9 ± 3.4 ^b	2.88 ± 1.04 ^a	ยอดเขียว ยาวต่างกัน
2.0	0.2	4.5 ± 0.4 ^a	18.9 ± 4.8 ^a	0.92 ± 0.46 ^b	แตกเป็นยอดกลุ่มเล็ก ๆ
3.0	0.1	4.3 ± 0.3 ^a	9.9 ± 2.6 ^{bc}	1.11 ± 0.60 ^b	แตกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ยอดเหลือง
4.0	0.1	4.2 ± 0.3 ^a	3.5 ± 1.8 ^{ef}	0.86 ± 0.45 ^b	แตกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ยอดสีน้ำตาล
5.0	0.1	4.3 ± 0.4 ^a	8.9 ± 3.2 ^{cd}	0.96 ± 0.57 ^b	แตกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ยอดสีน้ำตาลดำ
3.0	0.2	4.4 ± 0.3 ^a	7.1 ± 2.0 ^d	1.08 ± 0.61 ^b	แตกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ยอดเหลือง
4.0	0.2	4.2 ± 0.2 ^a	4.6 ± 2.2 ^e	0.98 ± 0.53 ^b	แตกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ยอดสีน้ำตาล
5.0	0.2	3.9 ± 0.3 ^a	4.5 ± 2.5 ^{ef}	1.03 ± 0.59 ^b	แตกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ยอดสีน้ำตาลดำ

^{1/} จากการทดลอง 15 ซ้ำ, ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New Multiple Range Test

รูปที่ 5 ลักษณะของยอดทวีกุณของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (สเกล = 1 เซนติเมตร)

- a) ปราศจากสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม)
- b) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- c) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- d) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- e) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- f) BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- g) BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- h) BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- i) BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- j) BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- k) BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- l) BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร



1.4 การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ในสภาพกึ่งแข็งและเหลวต่อการชักนำให้เกิดยอดทวิคูณ

นำกลุ่มยอดประมาณ 4-5 ยอด จากส่วนข้อเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 ในสูตรที่ดีที่สุด (อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA เพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับ TDZ ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างเพื่อชักนำให้เกิดยอดทวิคูณ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนยอดที่ได้จากอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ โดยอาหารสูตรที่ปราศจากสารควบคุมการเติบโต และอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร บนอาหารแข็งให้จำนวนยอดอยู่ในช่วง 3.5-7.7 ยอด ส่วนในอาหารเหลวให้จำนวนยอด 8.0-11.3 ยอด เมื่อเปรียบเทียบความยาวยอดที่ได้จากอาหารกึ่งแข็งและเหลว พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ โดยให้ความยาวยอดอยู่ในช่วง 2.67-3.27 เซนติเมตร ยอดมีสีเขียว มีลักษณะสมบูรณ์ (ตารางที่ 6, รูปที่ 6a-6j) อย่างไรก็ตามอาหารเหลวที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดทวิคูณได้สูงที่สุด 11.3 และ 11.1 ยอด ที่มีความยาวยอด 2.75 และ 3.26 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยให้ยอดสีเขียวสมบูรณ์ (ตารางที่ 6, รูปที่ 6h และ 6j)

การเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดยอดทวิคูณบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว พบว่าสภาพของอาหาร (อาหารแข็ง และอาหารเหลว) และสูตรอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 5 สูตร เมื่อใช้ 2 ปัจจัยร่วมกันมีผลต่อการเกิดยอดทวิคูณ และเมื่อพิจารณาเพียงปัจจัยเดียวพบว่าสภาพของอาหาร หรือปัจจัยของสารควบคุมการเติบโตก็มีผลต่อการเกิดยอดทวิคูณ (ตารางที่ 6.1)

ตารางที่ 6 ผลสารควบคุมการเติบโต BA และ TDZ ในอาหารกิ่งแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

สภาพอาหาร	สารควบคุมการเติบโต		จำนวนยอดเริ่มต้นใน กลุ่มยอด	การเจริญเติบโตของกลุ่มยอด ^{1/}		
	(มิลลิกรัม/ลิตร)			จำนวนยอดทั้งหมด	ความยาวยอด (ซม)	ลักษณะยอด
	BA	TDZ				
อาหารกิ่งแข็ง	0	0	4.9 ± 0.3 ^a	3.9 ± 0.4 ^d	2.72 ± 0.22 ^a	ยอดมีใบแผ่บาน สีเหลืองน้ำตาล
	0.5	-	4.4 ± 0.3 ^a	3.5 ± 0.5 ^d	2.70 ± 0.20 ^a	ยอดเขียวเล็กยาวไม่สม่ำเสมอ
	0.5	0.1	4.8 ± 0.3 ^a	6.0 ± 0.5 ^c	2.79 ± 0.24 ^a	ยอดเขียวเล็ก ใบแผ่กางมีสีน้ำตาล
	1.0	-	4.1 ± 0.2 ^a	6.1 ± 0.6 ^c	2.93 ± 0.19 ^a	ยอดเขียวเล็ก ใบแผ่กางมีสีน้ำตาล
	1.0	0.1	4.6 ± 0.3 ^a	7.7 ± 0.9 ^{bc}	3.01 ± 0.24 ^a	ยอดเขียว เรียว สมบูรณ์
อาหารเหลว	0	0	4.2 ± 0.3 ^a	9.5 ± 0.9 ^{ab}	2.67 ± 0.20 ^a	ยอดเหลือง ใบแผ่กาง
	0.5	-	4.6 ± 0.3 ^a	8.0 ± 0.6 ^{bc}	2.78 ± 0.19 ^a	ยอดเขียว เรียว สมบูรณ์
	0.5	0.1	4.4 ± 0.3 ^a	11.3 ± 0.8 ^a	2.75 ± 0.22 ^a	ยอดเขียว เรียว สมบูรณ์
	1.0	-	4.6 ± 0.3 ^a	8.6 ± 0.6 ^b	3.27 ± 0.21 ^a	ยอดเขียว เรียว สมบูรณ์
	1.0	0.1	4.2 ± 0.3 ^a	11.1 ± 0.8 ^a	3.26 ± 0.18 ^a	ยอดเขียว เรียว สมบูรณ์

^{1/} จากการทดลอง 15 ซ้ำ, ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 6.1 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Two-way anova (Tests of Between-Subjects Effects) ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ในการเปรียบเทียบสภาพอาหาร และสูตรอาหารต่อการเกิดยอดทิวของของกลุ่มยอดไผ่ชางหม่น “นวลราชินี”

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: number

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	1000.560 ^a	9	111.173	15.688	.000	.502
Intercept	8603.307	1	8603.307	1214.013	.000	.897
สูตรอาหาร	842.093	4	210.523	29.707	.000	.459
ชนิดอาหาร	83.627	1	83.627	11.801	.001	.078
สูตรอาหาร * ชนิดอาหาร	74.840	4	18.710	2.640	.036	.070
Error	992.133	140	7.087			
Total	10596.000	150				
Corrected Total	1992.693	149				

a. R Squared = .502 (Adjusted R Squared = .470)



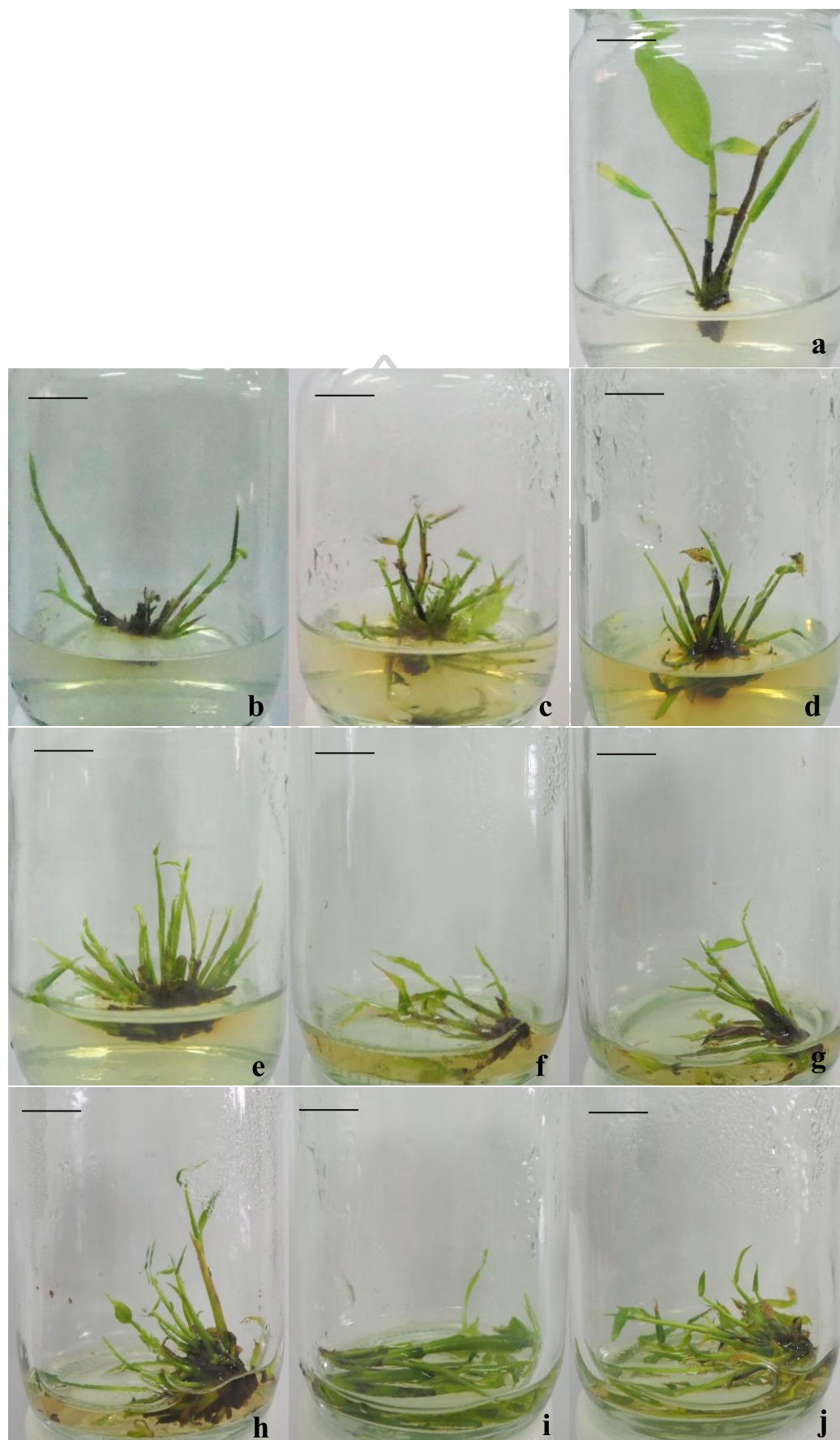
รูปที่ 6 ลักษณะยอดบนอาหารกึ่งแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (สเกล = 1.0 เซนติเมตร)

a-e อาหารกึ่งแข็ง

- a) ปราศจากสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม)
- b) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- c) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- d) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- e) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

f-j อาหารกึ่งแข็ง

- f) ปราศจากสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม)
- g) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- h) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- i) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- j) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร



1.5 การศึกษาผลของอะดีนีนซัลเฟต (AdSO_4) ต่อการเกิดยอดทวิคูณของกลุ่มยอด

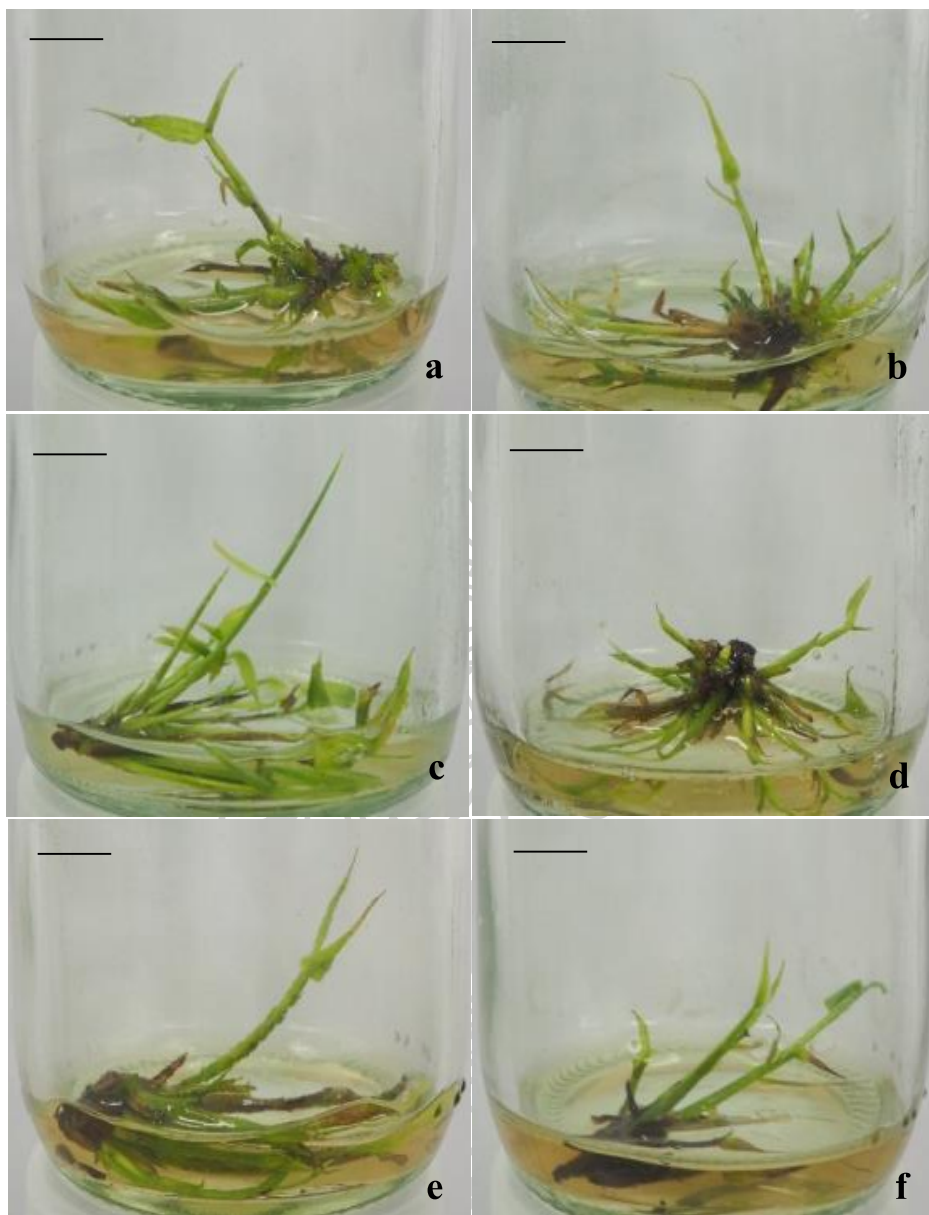
นำกลุ่มยอดประมาณ 4 ยอดต่อกลุ่ม จากการทดลองที่ 1.2 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารละลายอะดีนีนซัลเฟต (AdSO_4) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 80, 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าจำนวนยอด ความยาวยอดและลักษณะยอดของไผ่บนอาหารที่มี AdSO_4 ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 5.4 ยอด และมีความยาวยอดเฉลี่ย 3.58 เซนติเมตร ยอดที่ได้มีลักษณะสมบูรณ์ สีเขียว ยอดเรียวไม่เล็ก และไม่เกิดอาการน้ำท่วม อีกทั้งไม่เกิดสารประกอบฟีนอลิกขึ้นในอาหาร เพาะเลี้ยงด้วย (ตารางที่ 7, รูปที่ 7c) ซึ่งแตกต่างจากความเข้มข้นอื่นที่เกิดสารประกอบฟีนอลิกสีน้ำตาลในระดับปานกลางถึงมากรวมทั้งยอดบางส่วนเกิดสีน้ำตาล จากผลการทดลองยังพบว่า เมื่อเติม AdSO_4 ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด 8.3 ยอด ที่มีความยาวยอด 2.77 เซนติเมตร แต่ยอดมีความยาวไม่สม่ำเสมอ และเกิดสารประกอบฟีนอลิกสูงในอาหาร ส่วน AdSO_4 ที่ความเข้มข้น 80, 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอด 6.5, 7.9 และ 3.0 ยอด มีความยาวยอดในช่วง 2.24-3.10 เซนติเมตร มีอาการน้ำท่วม ยอดไม่สมบูรณ์ เกิดสารประกอบฟีนอลิกสูงในอาหาร (ตารางที่ 7, รูปที่ 7b, 7d, 7e และ 7f) และในอาหารที่ปราศจาก AdSO_4 (ชุดควบคุม) ให้ความยาวยอดเฉลี่ย 2.48 เซนติเมตร โดยยอดยาวไม่สม่ำเสมอ ยอดเรียวเล็ก และเกิดสารประกอบฟีนอลิกในอาหารสูงเช่นกัน (ตารางที่ 7, รูปที่ 7a)

ตารางที่ 7 ผลอะดีนีนซัลเฟต (AdSO₄) ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการชักนำให้เกิดยอดทิวทัศน์ของกลุ่มยอดไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

ความเข้มข้น AdSO ₄ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอด เริ่มต้นจาก กลุ่มยอด	การเจริญเติบโตของกลุ่มยอด ^{1/}		
		จำนวนยอด ทั้งหมด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	ลักษณะยอด
0	4.3 ± 0.4 ^a	4.4 ± 1.5 ^{bc}	2.48 ± 0.26 ^b	ยอดยาวไม่สม่ำเสมอ เกิดฟีนอลิกสูง
20	4.4 ± 0.5 ^a	8.3 ± 1.3 ^a	2.77 ± 0.42 ^{ab}	ยอดเล็ก สั้น สีเขียวอ่อน
40	4.1 ± 0.5 ^a	5.4 ± 0.8 ^{abc}	3.58 ± 0.50 ^a	ยอดยาวสม่ำเสมอ สีเขียว ไม่เกิดฟีนอลิก
80	4.4 ± 0.5 ^a	6.5 ± 1.4 ^{ab}	2.39 ± 0.31 ^b	ยอดเรียวเล็กบางส่วนสีน้ำตาล
100	4.3 ± 0.3 ^a	7.9 ± 0.7 ^a	3.10 ± 0.75 ^{ab}	ยอดสีเขียว มีอาการน้ำ
120	4.7 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.6 ^c	2.24 ± 0.58 ^b	ยอดไม่สมบูรณ์ เกิดฟีนอลิกสูง

^{1/}จากการทดลอง 10 ซ้ำ, ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New Multiple Range Test, Mean ± SE





รูปที่ 7 ลักษณะยอดทวีกุณของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมอะดีนีนซัลเฟต (AdSO_4) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (สเกล = 1 เซนติเมตร)

a) ปราศจากอะดีนีนซัลเฟต (ชุดควบคุม)

b) AdSO_4 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

c) AdSO_4 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

d) AdSO_4 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

e) AdSO_4 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

f) AdSO_4 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.6 การศึกษาผลของสารส่งเสริมการเติบโตของพืชต่อการเกิดยอดทวิคูณ

นำกลุ่มยอดประมาณ 4 ยอดต่อกลุ่ม จากการทดลองที่ 1.2 (ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารส่งเสริมการเติบโตของพืช ได้แก่ L-proline, L-glutamine, polyvinylpyrrolidone average molecular weight 40,000 (PVP-40) และ ascorbic acid เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่าจำนวนยอดที่เกิดขึ้นทั้งในอาหารกึ่งแข็งและเหลวทุกสูตร ไม่มีความแตกต่างกัน โดยอยู่ในช่วง 2.7-5.9 ยอด (ตารางที่ 8) เมื่อเปรียบเทียบความยาวยอดพบว่าอาหารเหลวที่มีการเติม L-proline ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PVP-40 ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.54-2.76 เซนติเมตร โดยลักษณะยอดที่เกิดขึ้นมีสีเขียวเข้ม สมบูรณ์ มีความยาวยาวสม่ำเสมอ (ตารางที่ 8, รูปที่ 8h, 8i) ซึ่งลักษณะยอดโดยรวมสภาพสมบูรณ์และแข็งแรงกว่าอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติมสารอินทรีย์ชนิดเดียวกัน รองลงมาเป็นอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวที่เติม L-proline ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ L-glutamine ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ลักษณะยอดสีเขียว สมบูรณ์ และมีการแตกใบบานเร็วกว่าสูตรอื่น (รูปที่ 8g) ส่วนในอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวที่เติม PVP-40 ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ascorbic acid ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าลักษณะมีลักษณะของยอดดีกว่ายอดจากอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ปราศจากสารส่งเสริมการเติบโตของพืช (ชุดควบคุม) (รูปที่ 8a, 8f และ 8j)

การเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดยอดทวิคูณบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว พบว่าสูตรอาหารที่เติมสารส่งเสริมการเติบโตของพืชที่แตกต่างกันทั้ง 5 สูตร และสภาพของอาหาร (อาหารกึ่งแข็ง และอาหารเหลว) เมื่อใช้ 2 ปีจรร่วมกันนั้น ไม่มีผลต่อการเกิดยอดทวิคูณของไผ่ เมื่อพิจารณาเพียงปัจจัยเดียวพบว่าสภาพของอาหาร ไม่มีผลต่อการเกิดยอดทวิคูณ แต่ปัจจัยของสูตรอาหาร มีผลต่อการเกิดยอดทวิคูณ (ตารางที่ 8.1)

ตารางที่ 8 ผลสารส่งเสริมการเติบโตของพืชทั้งชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกันในอาหารกึ่งแข็ง และอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

สภาพของ อาหาร	สารส่งเสริมการเติบโต ^{1/}				จำนวนยอด เริ่มต้นจาก กลุ่มยอด	การเติบโตของกลุ่มยอด ^{2/}			ลักษณะยอด
	(มิลลิกรัมต่อลิตร)					จำนวนยอด ทั้งหมด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)		
	LP	LG	PVP	AA					
อาหารกึ่งแข็ง	-	-	-	-	3.8 ± 0.2 ^a	2.1 ± 0.4 ^c	1.06 ± 0.17 ^d	เขียว ขนาดเล็ก	
	500	500	-	-	3.9 ± 0.3 ^a	3.7 ± 0.8 ^{abc}	1.36 ± 0.23 ^{cd}	เขียวปนเหลือง	
	500	-	-	-	3.8 ± 0.3 ^a	4.7 ± 0.8 ^{ab}	1.97 ± 0.17 ^{bc}	เขียวปนเหลือง	
	-	-	200	-	3.9 ± 0.3 ^a	5.1 ± 0.6 ^{ab}	1.67 ± 0.13 ^{cd}	เขียวปนเหลือง	
	-	-	200	100	3.9 ± 0.3 ^a	2.7 ± 0.6 ^{bc}	1.28 ± 0.25 ^d	เขียวปนเหลือง	
อาหารเหลว	-	-	-	-	3.8 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.4 ^c	1.02 ± 0.20 ^d	เขียว ขนาดเล็ก	
	500	500	-	-	3.5 ± 0.2 ^a	4.1 ± 0.5 ^{abc}	2.39 ± 0.17 ^{ab}	ใบแผ่กางเร็ว	
	500	-	-	-	3.8 ± 0.3 ^a	4.3 ± 1.1 ^{abc}	2.76 ± 0.20 ^a	เขียวยาวสม่ำเสมอ	
	-	-	200	-	4.0 ± 0.3 ^a	5.9 ± 0.8 ^a	2.54 ± 0.19 ^{ab}	เขียวยาวสม่ำเสมอ	
	-	-	200	100	4.2 ± 0.3 ^a	3.8 ± 1.0 ^{abc}	1.63 ± 0.30 ^{cd}	ปลายยอดเหลือง	

^{1/} LP = L-proline, LG = L-glutamine, PVP = PVP-40, AA = ascorbic acid

^{2/} จากการทดลอง 15 ซ้ำ, ตัวเลข (Mean ± SE) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 8.1 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Two-way anova (Tests of Between-Subjects Effects) ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ในการเปรียบเทียบสภาพอาหาร และสูตรอาหาร (สารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช) ต่อการเกิดยอดทิวทัศน์ของกลุ่มยอดไผ่ช่างหม่น “นวลราชินี”

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: number

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	219.840 ^a	9	24.427	2.891	.004	.157
Intercept	2227.227	1	2227.227	263.592	.000	.653
สูตรอาหาร	203.840	4	50.960	6.031	.000	.147
สภาพอาหาร	3.840	1	3.840	.454	.501	.003
สูตรอาหาร* สภาพอาหาร	12.160	4	3.040	.360	.837	.010
Error	1182.933	140	8.450			
Total	3630.000	150				
Corrected Total	1402.773	149				

a. R Squared = .157 (Adjusted R Squared = .103)

รูปที่ 8 ลักษณะยอดของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” บนอาหารกึ่งแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS ที่

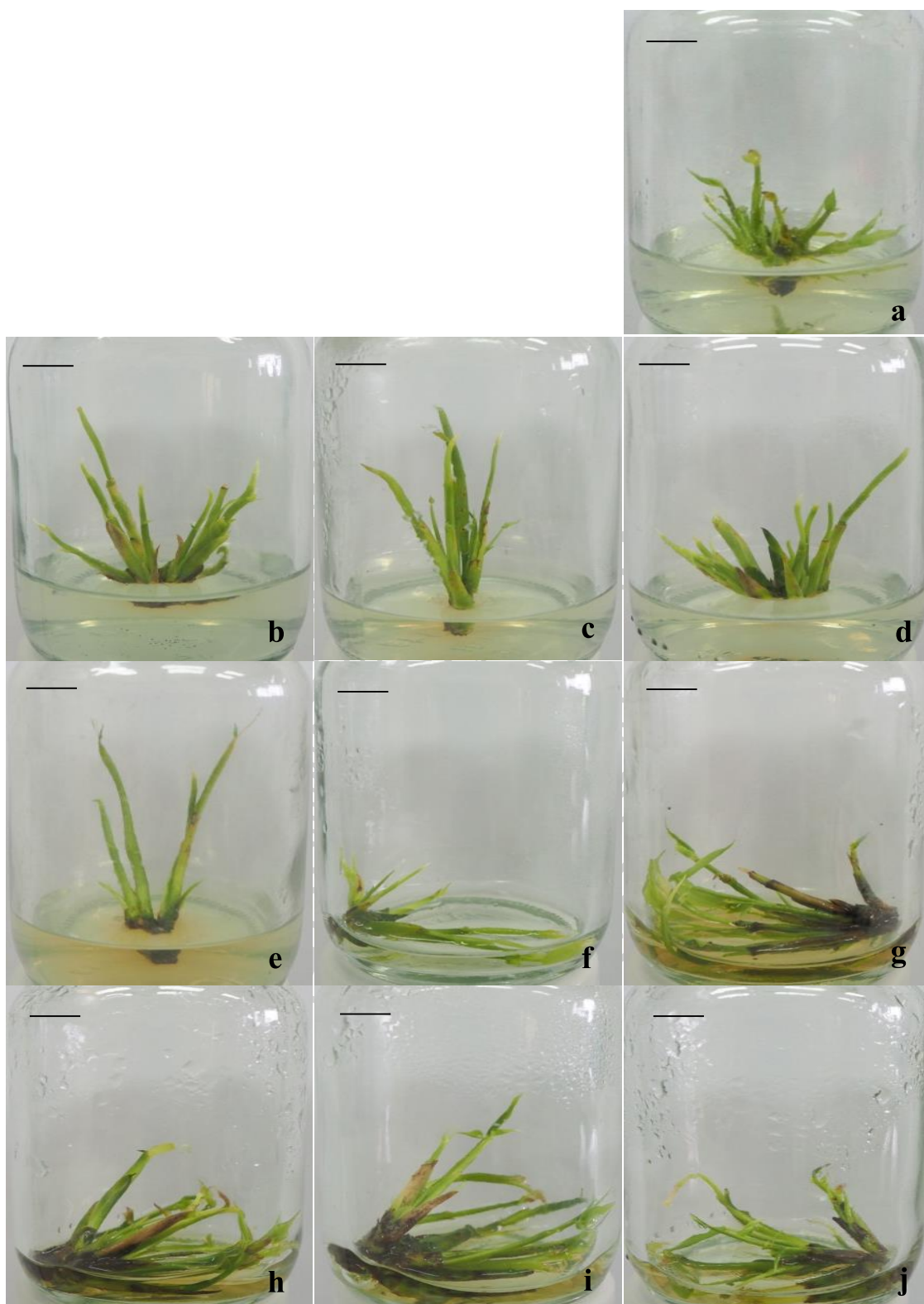
ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารส่งเสริมการเติบโตของพืชทั้งชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (สเกล = 1 เซนติเมตร)

a-e อาหารกึ่งแข็ง

- a) BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม)
- b) L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร
- c) L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร
- d) PVP-40 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
- e) PVP-40 200 มิลลิกรัมต่อลิตร + ascorbic acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

f-j อาหารเหลว

- f) BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม)
- g) L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร
- h) L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร
- i) PVP-40 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
- j) PVP-40 200 มิลลิกรัมต่อลิตร+ ascorbic acid 100 มิลลิกรัมต่อลิตร



1.7 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดคัลลัส

นำชิ้นส่วนบริเวณปลายยอด (shoot tips) ความยาวประมาณ 1.0 เซนติเมตร จากการทดลองที่ 1.2 (ที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวน 3 ปลายยอด เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kn ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA ความเข้มข้น 0.2 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการเติมและไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสต (casein hydrolysate) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเติบโต 2,4-D, Kn, BA และ NAA ทุกระดับความเข้มข้น มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นคัลลัสอยู่ในช่วง 70-90 เปอร์เซ็นต์ โดยยอดที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่เติม casein hydrolyzate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมและไม่เติม casein hydrolyzate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดคัลลัสดีที่สุด คือ 0.24, 0.28 และ 0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 9, รูปที่ 9d, 9b และ 9c) คัลลัสมีลักษณะกลมเกาะกลุ่มกันหนาแน่นขนาดเล็กสีขาว (nodular callus) ซึ่งขนาดคัลลัสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ สำหรับอาหารกึ่งแข็งสูตรอื่น ให้ผลในการเกิดคัลลัสที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ โดยมีขนาดคัลลัสเฉลี่ย 0.18-0.28 เซนติเมตร (ตารางที่ 9, รูปที่ 9e, 9f, 9g) คัลลัสส่วนใหญ่ที่ได้มีลักษณะเหมือนกับคัลลัสที่ได้จากอาหารสูตรมีลักษณะเกาะกลุ่มกันหนาแน่นเป็นก้อนเหนียวชุ่มน้ำ (mucilaginous callus) ขนาดเล็กสีขาว (รูปที่ 9e) แต่สำหรับคัลลัสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมและไม่เติม casein hydrolyzate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดคัลลัสเป็นกลุ่มเล็กสีขาว และเกิดราก (รูปที่ 9f และ 9g) ส่วนปลายยอดที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่มี

การเติมสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม) พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นคัลลัส (รูปที่ 9a)

ตารางที่ 9 ผลสารควบคุมการเติบโตชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกันในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ต่อการชักนำให้เกิดคัลลัสจากส่วนยอด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

สารควบคุมการเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)				%	การเจริญเติบโตของคัลลัส**	
2,4-D	BA	Kn	NAA		เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	ลักษณะคัลลัส
-	-	-	-	0	0.00 ± 0.00 ^b	-
3.0	1.0	-	-	73.3	0.28 ± 0.05 ^a	friable
3.0 ^{1/}	1.0	-	-	80.0	0.26 ± 0.04 ^a	nodular
3.0	-	2.0	-	86.6	0.24 ± 0.03 ^a	compact
3.0 ^{1/}	-	2.0	-	73.3	0.26 ± 0.05 ^a	mucilaginous
-	0.2	-	5.0	80.0	0.18 ± 0.03 ^a	mucilaginous มีราก
- ^{1/}	0.2	-	5.0	73.3	0.26 ± 0.04 ^a	mucilaginous มีราก

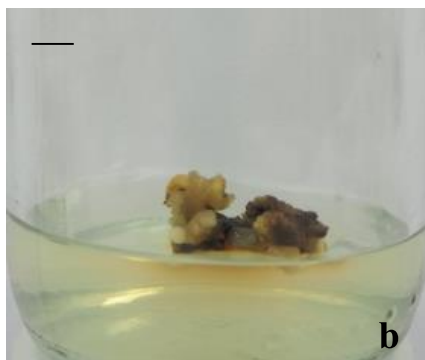
^{1/} เติม casein Hydrolyzate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

^{2/} จากการทดลอง 15 ซ้ำ, ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New Multiple Range Test, Mean ± SE

รูปที่ 9 ลักษณะคัลลัสที่เกิดจากส่วนยอดของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตที่แตกต่างกันต่อการชักนำให้เกิดคัลลัส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (สเกล = 0.1 เซนติเมตร)

- a) ปราศจากสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม)
- b) 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- c) 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร^{1/}
- d) 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- e) 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร^{1/}
- f) NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- g) NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร^{1/}

^{1/} เติม casein hydrolyzate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร



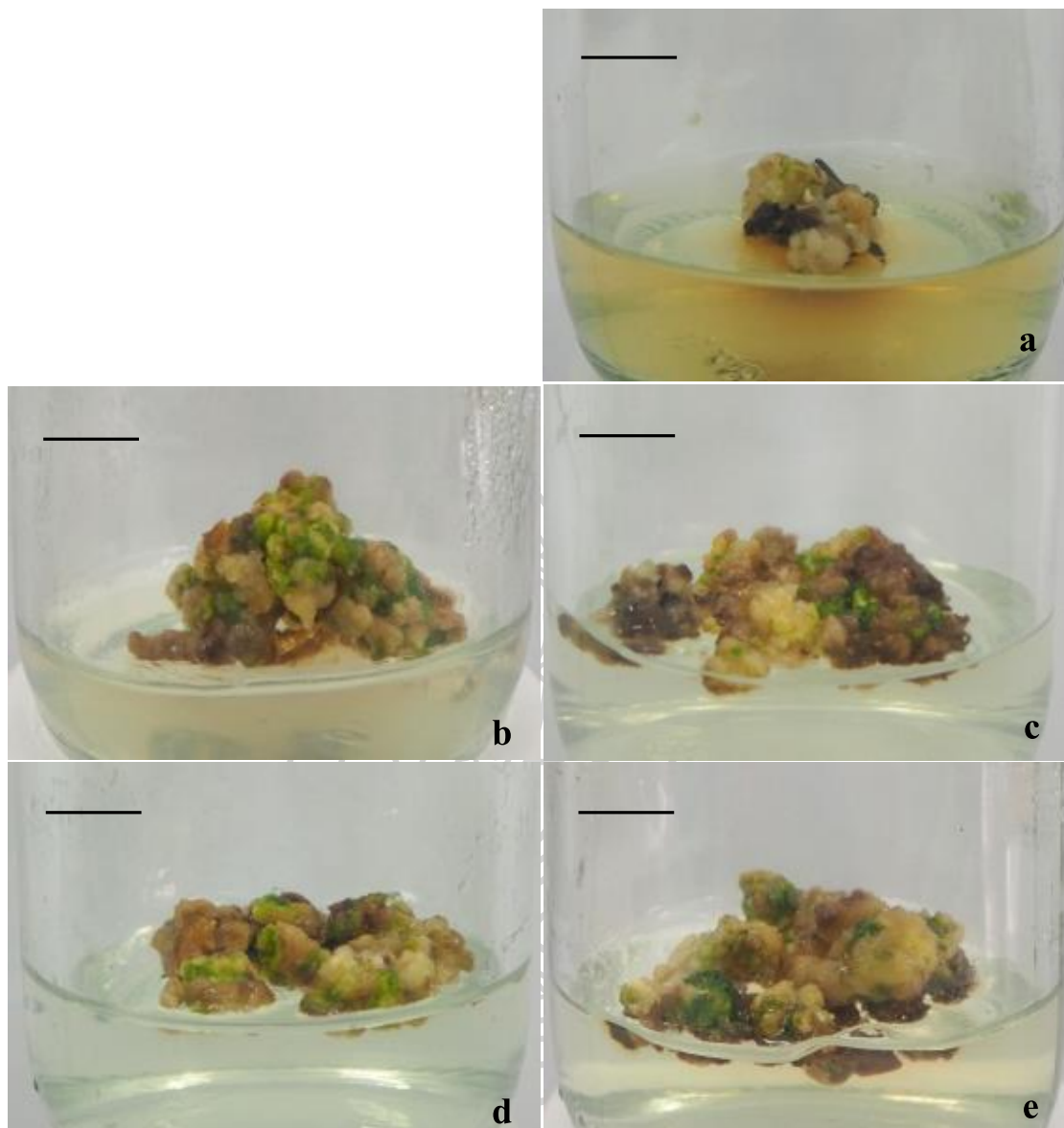
1.8 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดในคัลลัส

นำคัลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองที่ 1.7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงให้คัลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นในอาหารสูตรเดิมเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ จากนั้นนำคัลลัสที่มีขนาดใหญ่ขึ้นขยายชักนำให้เกิดยอดโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0-0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มคัลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ TDZ ได้ทุกสูตร ยกเว้นในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม) พบว่าไม่เกิดการพัฒนาไปเป็นยอด กลุ่มคัลลัสเป็นสีเขียวและมีสีน้ำตาลบางส่วน (ตารางที่ 10, รูปที่ 10a และ 11a) โดยอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่งเสริมการพัฒนาคัลลัสไปเป็นยอดจำนวนเล็กน้อยซึ่งยอดมีลักษณะเรียวยาวเล็ก สีเขียว และลักษณะคัลลัสส่วนใหญ่เป็นแบบ friable มีสีเขียวเป็นส่วนใหญ่ แต่ในอาหารที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสีของคัลลัสนอกจากสีเขียว จะมีสีขาว และสีน้ำตาลเป็นบางบริเวณ (ตารางที่ 10, รูปที่ 10b, 10d, 11b และ 11d) ส่วนในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณยอดสูงที่สุดประมาณ 12 ยอด ลักษณะกลุ่มยอดขนาดเล็ก สีเขียว ส่วนลักษณะคัลลัสเป็นแบบ friable และ compact มีทั้งส่วนที่เป็นสีเขียว สีเหลือง และสีน้ำตาล (ตารางที่ 10, รูปที่ 10e และ 11e) อีกทั้งลักษณะยอดโดยรวมดีกว่าสูตรอื่นๆ นอกจากนี้ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะเรียวยาวเล็ก ปลายแหลม มีสีเขียวอ่อน และคัลลัสเป็นแบบ friable สีขาวและสีน้ำตาล (ตารางที่ 10, รูปที่ 10c และ 11c)

ตารางที่ 10 ผลสารควบคุมการเติบโต BA และ TDZ ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ต่อการชักนำให้
 คัลลัสเกิดยอด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		การเจริญเติบโตของคัลลัส ^{1/}		
BA	TDZ	จำนวนยอด	ลักษณะของยอด	ลักษณะของคัลลัส
-	-	0.0 ± 0.0 ^c	-	friable สีขาวและสีน้ำตาล
0.5	-	2.5 ± 0.8 ^c	ยอดขนาดเล็ก สีเขียว	friable ส่วนใหญ่มีสีเขียว
0.5	0.1	3.3 ± 1.4 ^{bc}	ยอดเรียวเล็กปลายแหลม เขียว	friable สีขาวและสีน้ำตาล
1.0	-	6.3 ± 0.9 ^b	ยอดขนาดเล็ก	friable สีเขียว สีขาวและสีน้ำตาล
1.0	0.1	12.4 ± 1.7 ^a	กลุ่มยอดขนาดเล็ก สีเขียว	friable และ compact สีเขียว สีเหลือง และสีน้ำตาล

^{1/} จากการทดลอง 10 ซ้ำ, ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย Duncan's New Multiple Range Test, Mean



รูปที่ 10 ลักษณะคัลลัสและยอดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตชนิดและความเข้มข้นที่ต่างต่างกัน เพราะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (สเกล = 1 เซนติเมตร)

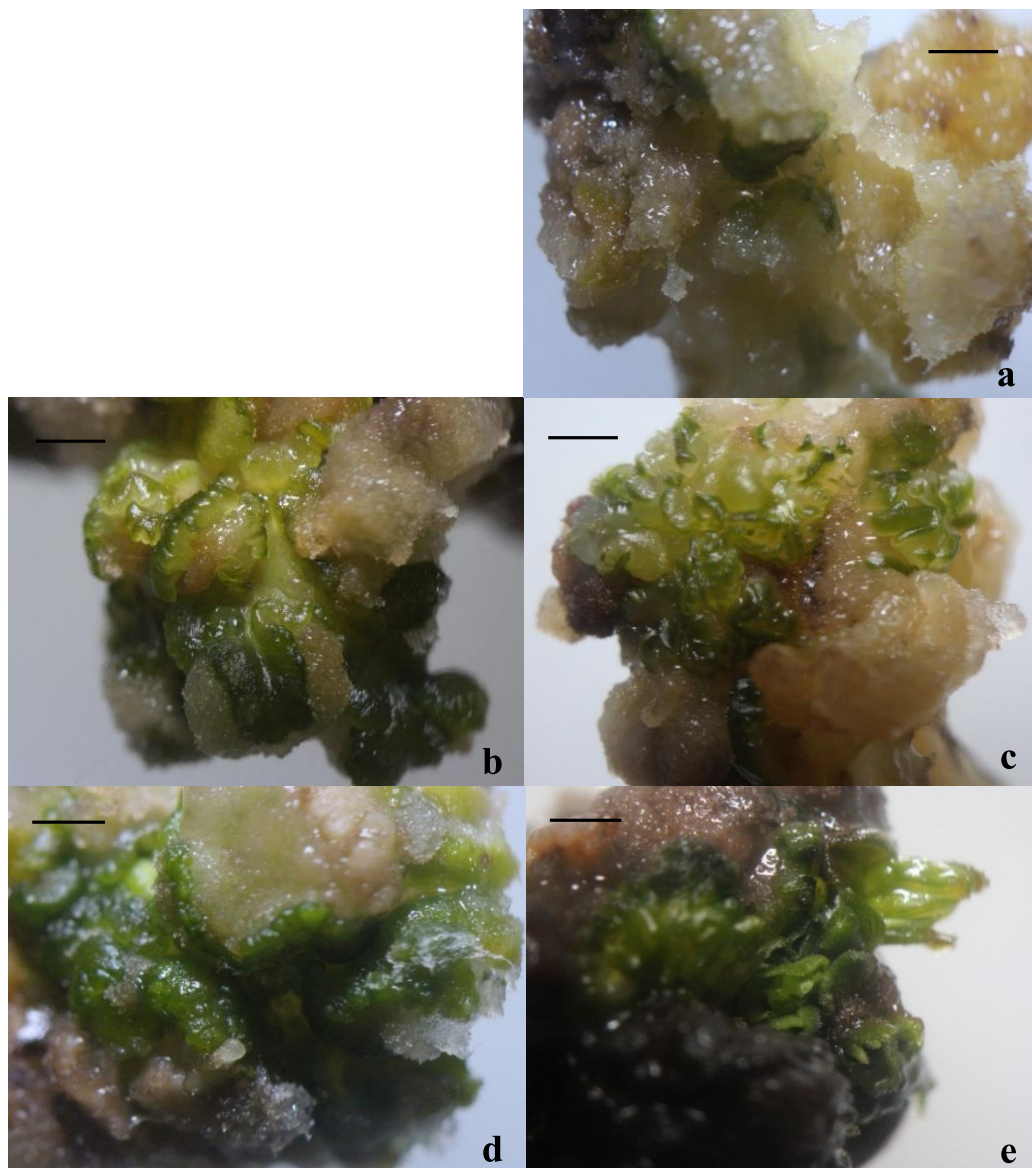
a) ปราศจากสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม)

b) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

c) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

d) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

e) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 11 ลักษณะคัลลัสและยอดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ) (สเกล = 2.0 มิลลิเมตร)

a) ปราศจากสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม)

b) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

c) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

d) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

e) BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

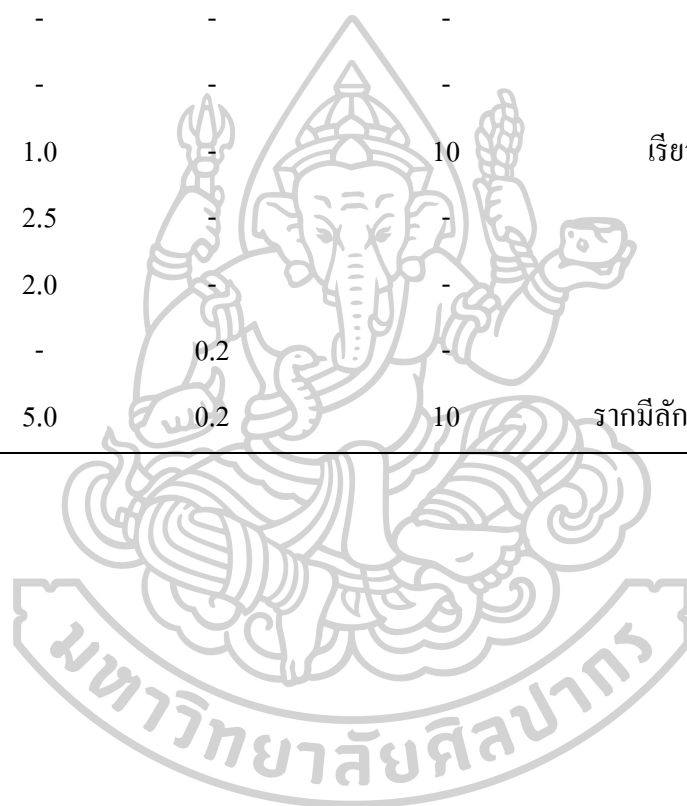
1.9 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก

นำกลุ่มยอดที่ได้จากการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณจากการทดลองที่ 1.3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มาชักนำให้เกิดราก ในอาหารทั้งหมด 8 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต IBA และ NAA ความเข้มข้นละ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากโดยมีลักษณะเรียวยาวและยอดมีการเหี่ยวและตาย ส่วนรากยังคงเจริญต่อไป (รูปที่ 12a และ 13a) ขณะเดียวกันในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากเช่นกัน โดยลักษณะรากจะมีความอวบและยอดมีการเหี่ยวและเริ่มตายเรื่อยๆ (รูปที่ 12b, 13b, 13c และ 12c) ส่วนในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดเป็นตุ่มและไม่พัฒนาต่อจากนั้นต้นก็เหี่ยวเฉาและตายเช่นเดียวกับในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 12d และ 12e) และในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตชนิดและความเข้มข้นที่ต่างจากดังกล่าวข้างต้นพบว่าไม่เกิดรากและยอดตายดังแสดงในตารางที่ 11 และ รูปที่ 12



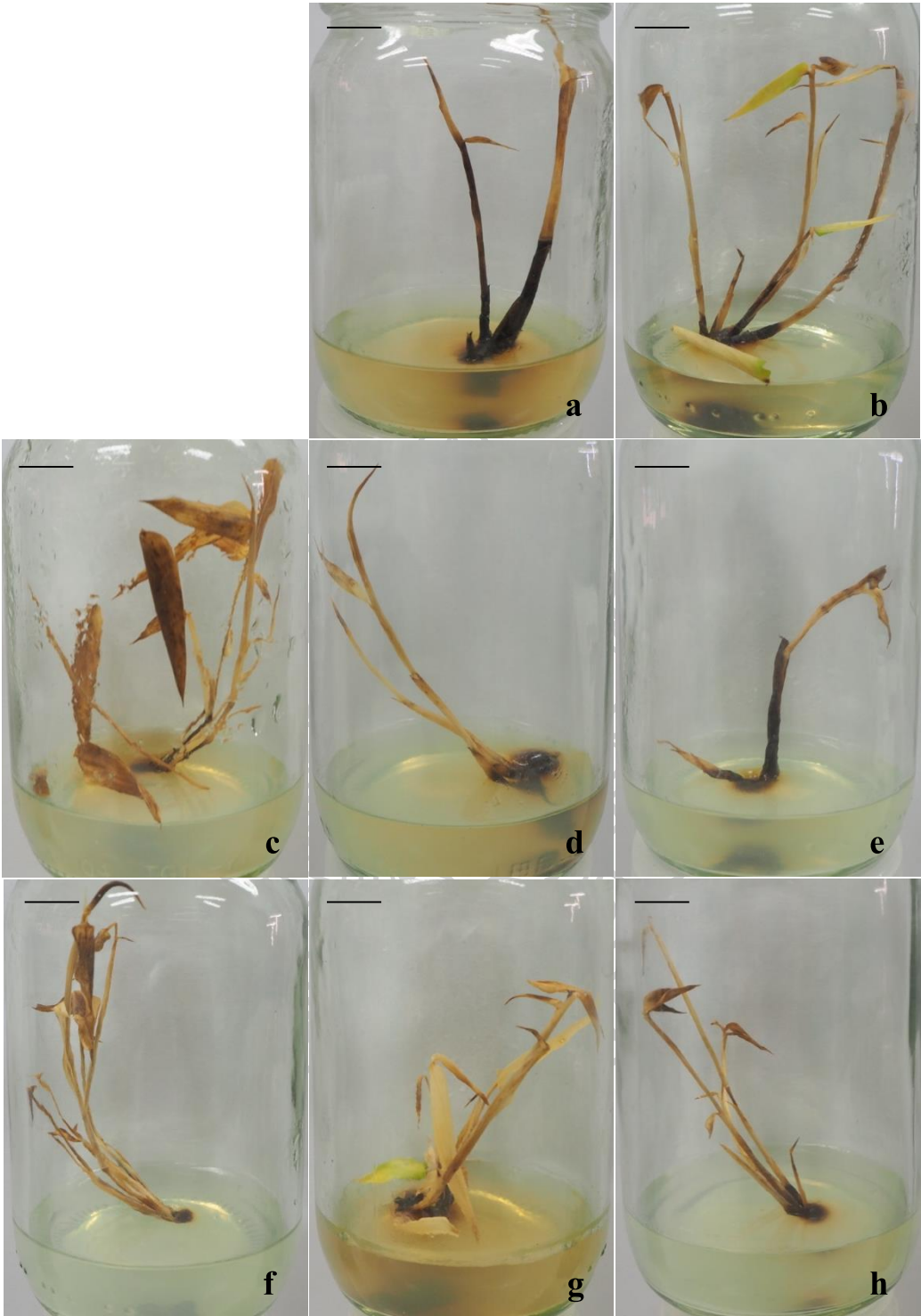
ตารางที่ 11 ผลสารควบคุมการเติบโต IBA NAA และ BA ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ต่อการชักนำให้เกิดราก เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

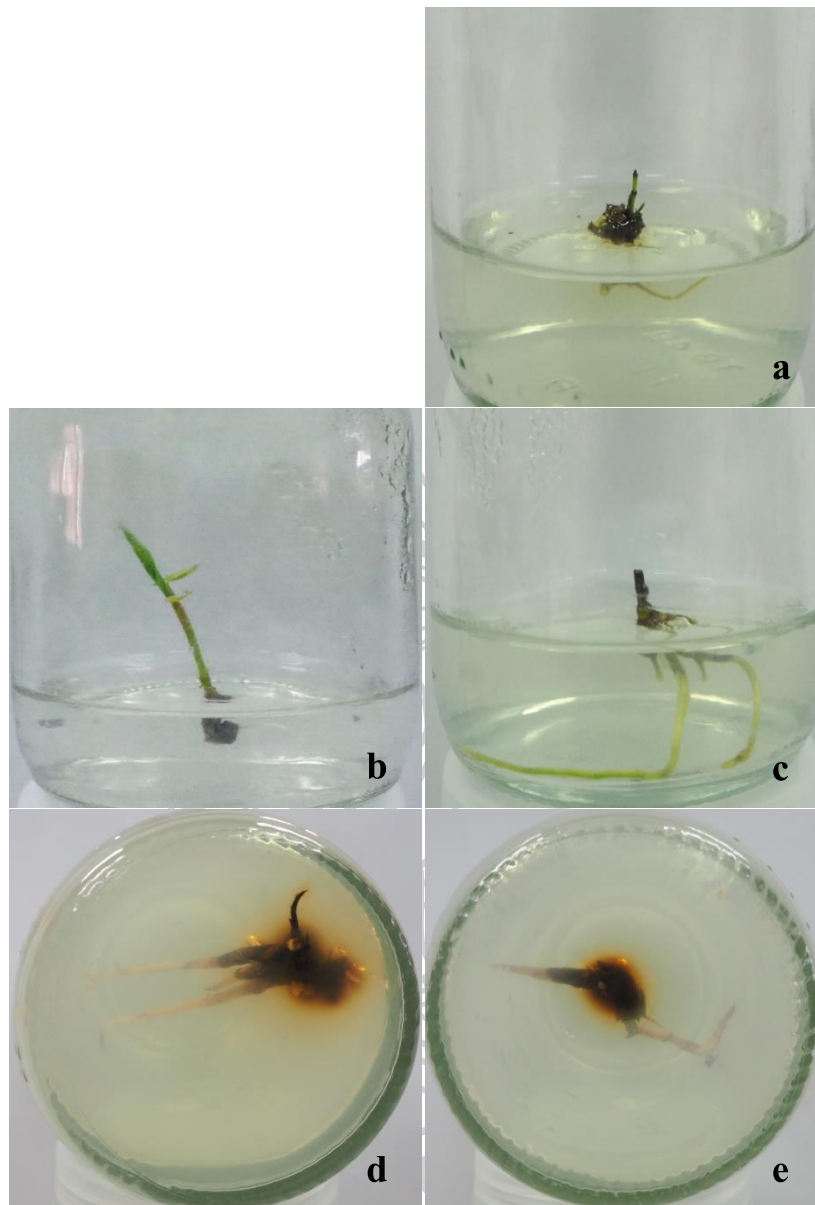
สารควบคุมการเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)			การเกิดราก (%)	ลักษณะราก
IBA	NAA	BA		
-	-	-	-	-
1.0	-	-	-	-
3.0	-	-	-	-
1.0	1.0	-	10	เรียวยาว และยอดเริ่มตายเรื่อยๆ
1.0	2.5	-	-	เกิดเป็นตุ่ม
2.0	2.0	-	-	เกิดเป็นตุ่ม
5.0	-	0.2	-	-
-	5.0	0.2	10	รากมีลักษณะอวบ และยอดเริ่มตายเรื่อยๆ



รูปที่ 12 ผลสารควบคุมการเติบโต IBA NAA และ BA ต่อการชักนำให้เกิดรากในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตชนิดและความเข้มข้นที่ต่างกัน (สเกล = 1.0 มิลลิเมตร)

- a) ปราศจากสารควบคุมการเติบโต (ชุดควบคุม)
- b) IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- c) IBA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- d) IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- e) IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- g) IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- h) IBA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- i) NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร





รูปที่ 13 ลักษณะรากบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

a) IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

b) NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

c) NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์)

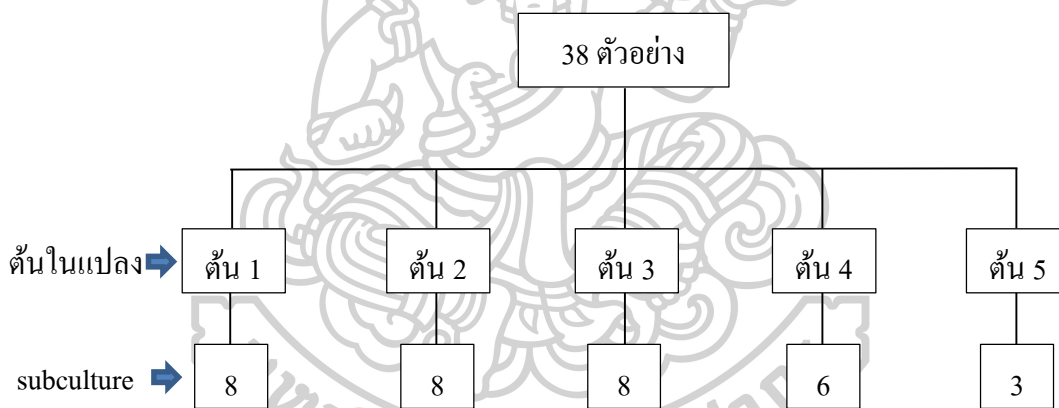
d) IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

e) IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของไฟซางหม่น “นวลราชินี”

2.1 ตัวอย่างชิ้นส่วนพืชจากต้นในแปลงและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ

จากการเก็บตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ เก็บใบม้วนจากแปลงธรรมชาติ และใบและยอดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการทดลองนี้เก็บใบม้วนจากแปลงธรรมชาติจำนวน 5 ต้น และแต่ละต้นจะมีการนำส่วนข้อไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อและเก็บยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทุก 3 สัปดาห์ ซึ่งต้นที่ 1 2 และ 3 เก็บยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นละ 8 subcultures ต้นที่ 4 เก็บยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 6 subcultures ส่วนต้นที่ 5 เก็บยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 subcultures เนื่องจากในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียทำให้บางตัวอย่างเกิดการตายระหว่างการชักนำให้เกิดยอด รวมทั้งหมด 38 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการสกัดดีเอ็นเอแสดงดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 ตัวอย่างไฟซางหม่นจากต้นในแปลงและจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งหมดในการสกัดดีเอ็นเอ

2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

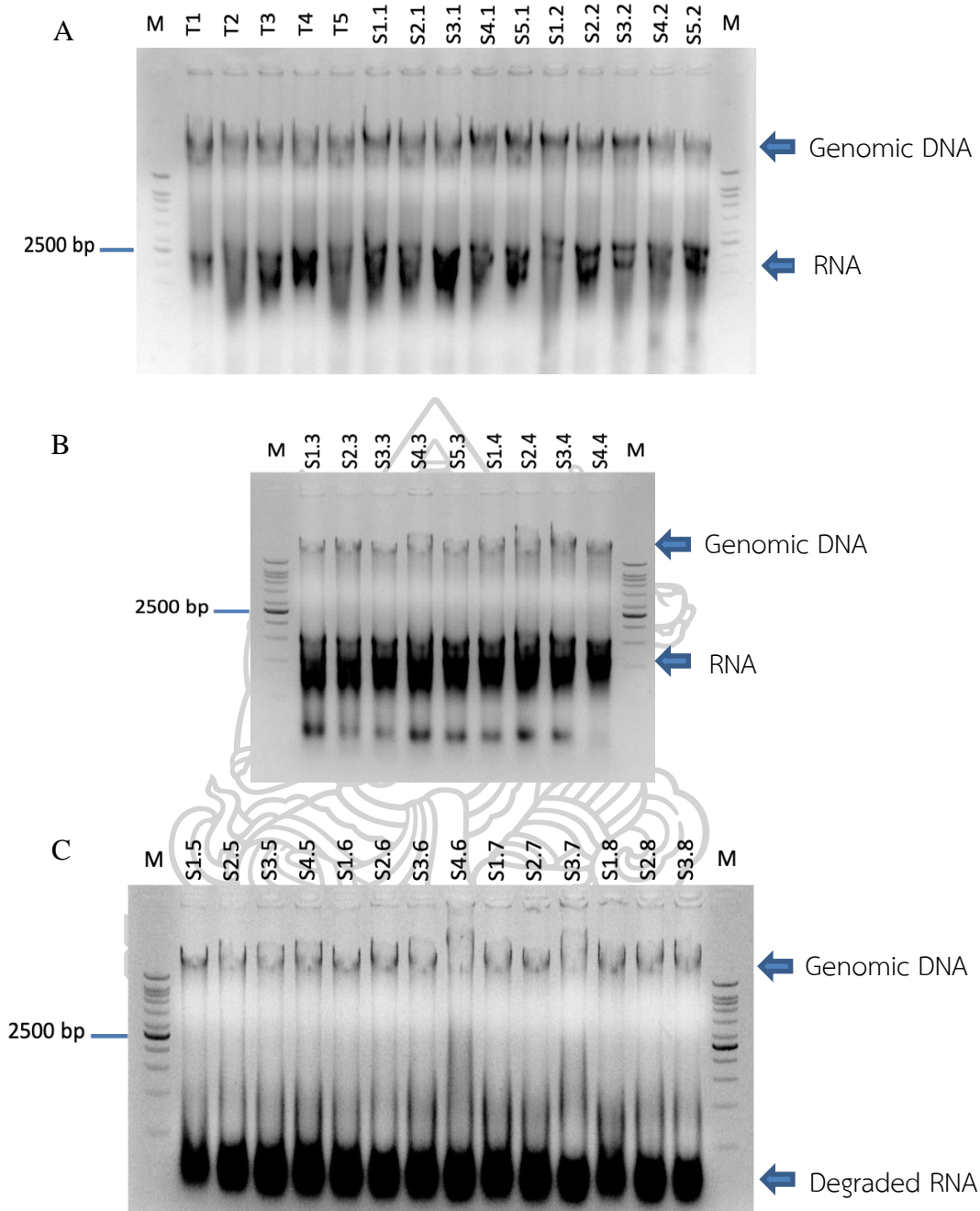
2.2.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (Nanodrop)

จากการสกัด genomic DNA ของใบไฟซางหม่น “นวลราชินี” 5 ตัวอย่างจากต้นในแปลง เมื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ที่ความยาวคลื่น 260 nm (A260) ค่าการดูดกลืน

แสงของโปรตีนและฟีนอลที่ 280 nm (A280) อัตราการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 และ A260/A230 และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดใน 38 ตัวอย่าง (แสดงดังภาคผนวก ข ตารางที่ S1) อยู่ในช่วง 1500-5200 ng/ μ l และค่าอัตราการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ 38 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 1.94-2.07 ซึ่งเป็นค่าอัตราการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 ที่บ่งบอกถึงค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยถ้าค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แสดงว่ามีดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและมีความบริสุทธิ์เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์ แต่ถ้าค่าที่วัดได้ต่ำกว่าช่วงนี้แสดงว่ามีการปนเปื้อน โปรตีนสูง และถ้าค่าที่วัดได้สูงกว่าช่วงนี้แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่ ส่วนค่าอัตราการดูดกลืนแสงที่ A260/A230 ของดีเอ็นเอทั้ง 38 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 1.94-2.25 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างมีการปนเปื้อนของคาร์โบไฮเดรต เกลือ หรือตัวทำลายอินทรีย์ปริมาณเล็กน้อย เนื่องจากอัตราการดูดกลืนแสงที่ A260/A230 ที่ใช้ยอมรับว่ากรณีที่มีความบริสุทธิ์ คือ 2.0-2.2 (คำรพ รัตนสุด, 2561)

2.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)

จากการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของไบโไฟซิ่งหม่น “นวราชินี” ทั้ง 38 ตัวอย่าง พบว่ามีการแตกหักของดีเอ็นเอเล็กน้อย และพบการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอสอดคล้องกับผลการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน แสดงดังรูปที่ 15 (A-C) นอกจากนี้ยังพบอาร์เอ็นเอที่เสียดสภาพในรูป 15C ปริมาณมาก เนื่องจากในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างก่อนการสกัดดีเอ็นเอผู้ทำความเย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เกิดขัดข้องจึงต้องมีการย้ายตัวอย่างมาเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอ



รูปที่ 15 ผลการสกัด DNA ของไหมช่างหม่อน “นวลราชินี” 38 ตัวอย่าง (A-C)

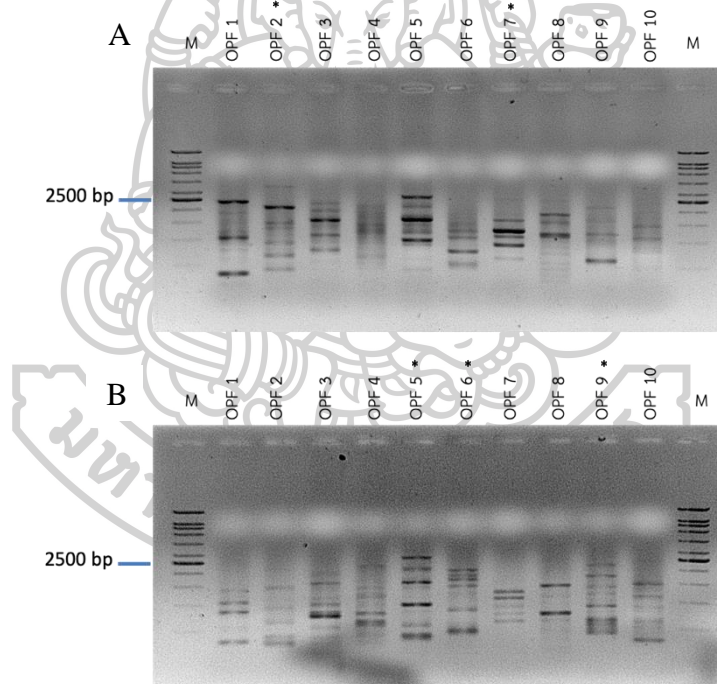
A คือ ตัวอย่างจากต้นในแปลง ต้นที่ 1-5 (T1-T5) และ subculture ครั้งที่ 1 (S1.1-S5.1) และ ครั้งที่ 2 (S1.2-S5.2)

B คือ subculture ครั้งที่ 3 (S1.3-S5.3) และครั้งที่ 4 (S1.4-S4.4)

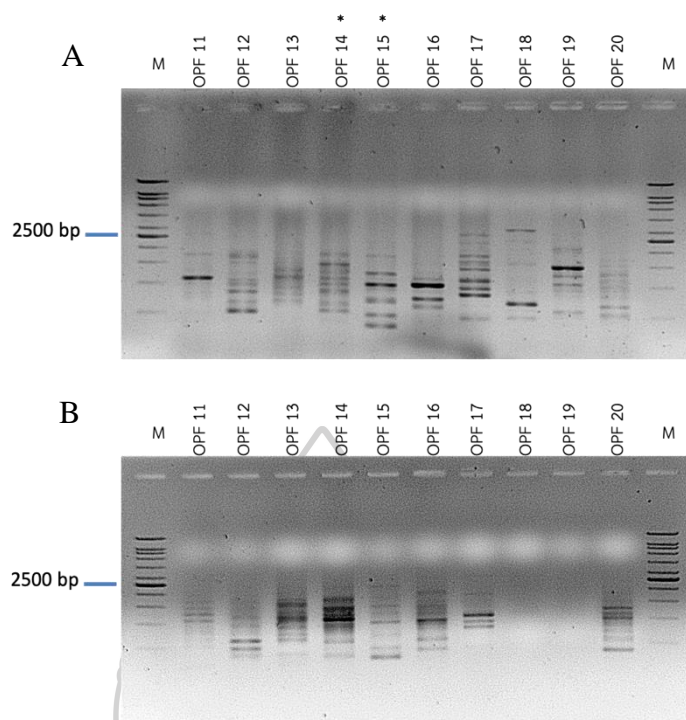
C คือ subculture ครั้งที่ 5 (S1.5-S4.5) ครั้งที่ 6 (S1.6-S4.6) ครั้งที่ 7 (S1.7-S3.7) และครั้งที่ 8 (S1.8-S3.8) โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

2.3 การคัดเลือกไพรเมอร์ด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ HAT-RAPD

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของไข่ชางหม่น “นวลราชินี” ทั้ง 5 ตัวอย่างจากต้นในแปลง ด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 40 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ทั้งหมดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่มีไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 15 ชนิด หรือคิดเป็น 37.5 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนและมีจำนวนแถบมาก ซึ่งแบ่งเป็นไพรเมอร์ RAPD จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ OPF2, OPF7, OPF14, OPF15, OPW1, OPW3 และ OPW10 และไพรเมอร์ HAT-RAPD จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ OPF5, OPF6, OPF9, OPW2, OPW5, OPW8, OPW17 และ OPW18 ดังแสดงใน รูปที่ 16, 17, 18 และ 19

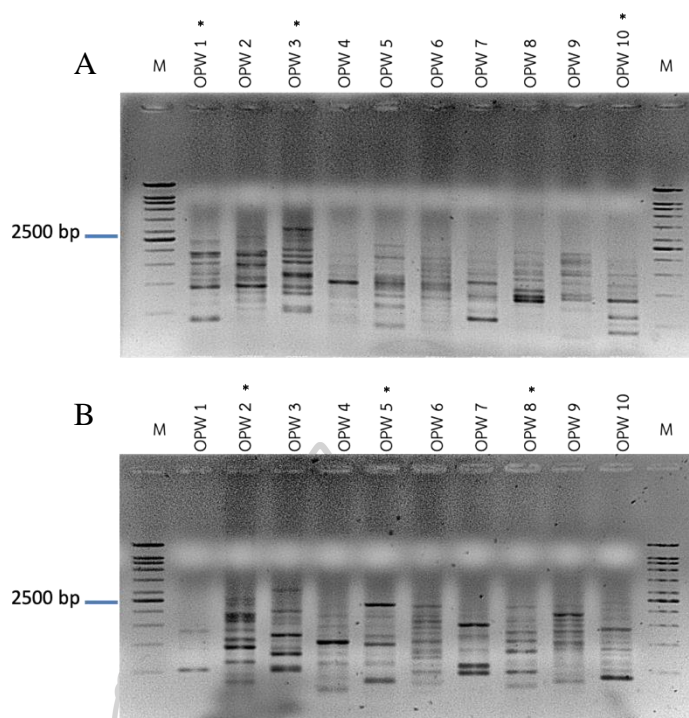


รูปที่ 16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF 1-10 (A) และเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF 1-10 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (* คือ ไพรเมอร์ที่เลือกใช้สำหรับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)



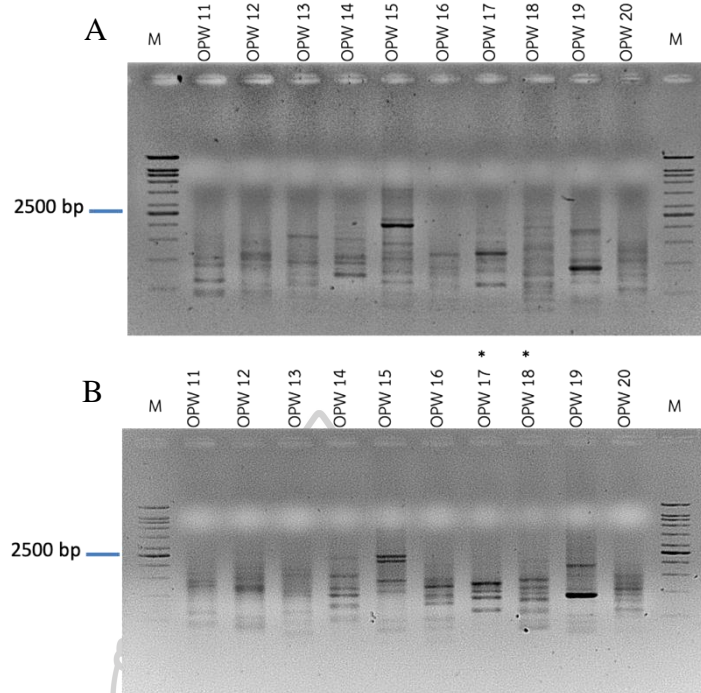
รูปที่ 17 แอปติเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF 11-20 (A) และเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF 11-20 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (* คือ ไพรเมอร์ที่เลือกใช้สำหรับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)





รูปที่ 18 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW 1-10 (A) และเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW 1-10 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (* คือ ไพรเมอร์ที่เลือกใช้สำหรับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)



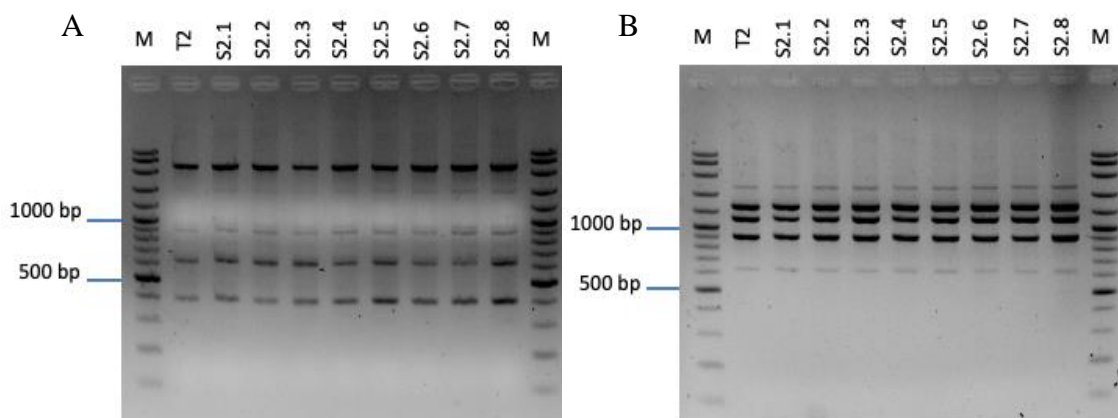


รูปที่ 19 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW 11-20 (A) และเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW 11-20 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (* คือ ไพรเมอร์ที่เลือกใช้สำหรับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)

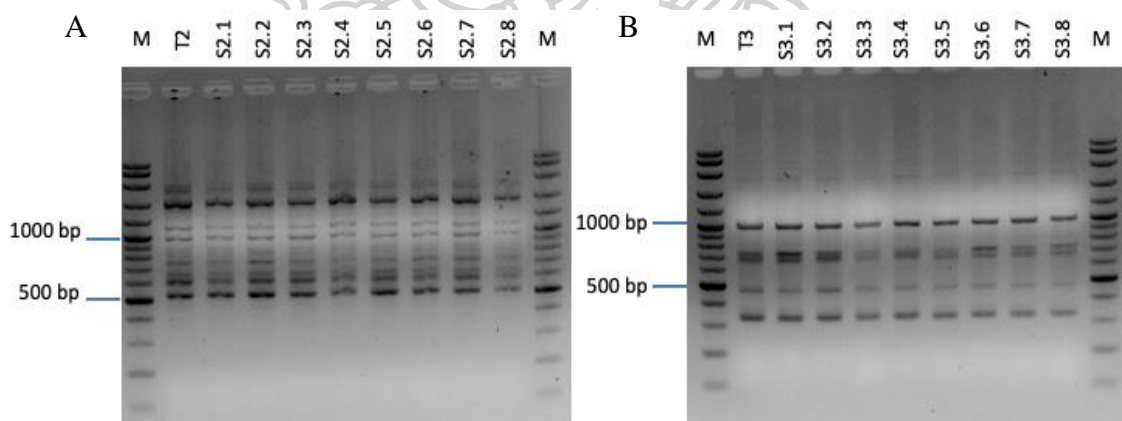
2.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD

เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 15 ชนิด ที่คัดเลือกได้มาใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไส้ซางหม่น “นวลราชินี” ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรวม 33 ตัวอย่าง (S1.1-S5.3) ด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไส้ต้นแม่ที่เก็บจากต้นแปลงจำนวน 5 ตัวอย่าง (T1-T5) ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ซ้ำต่อไพรเมอร์ ผลการสร้างลายพิมพ์ปรากฏดังรูปที่ 17-24 โดยพบว่าไพรเมอร์แต่ละชนิดให้จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 4-8 แถบ มีขนาดแถบอยู่ระหว่าง 300-3,000 คู่เบส และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอรวมกันเท่ากับ 84 แถบ ทั้งนี้พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD มีจำนวนแถบเฉลี่ย 5.42 แถบต่อไพรเมอร์ ส่วนลายพิมพ์ที่ตรวจสอบด้วย HAT-RAPD มีจำนวนแถบเฉลี่ย 5.75 แถบต่อไพรเมอร์ (ตารางที่ 12-13) ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่พบในลายพิมพ์ที่สร้างจากทั้ง 2 เทคนิค มีความชัดเจนเหมือนกันและสามารถระบุแถบได้ ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไส้ซางหม่น “นวลราชินี” ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและผ่านการเปลี่ยนอาหาร (subculture) จำนวน 3-8 ครั้ง ด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-

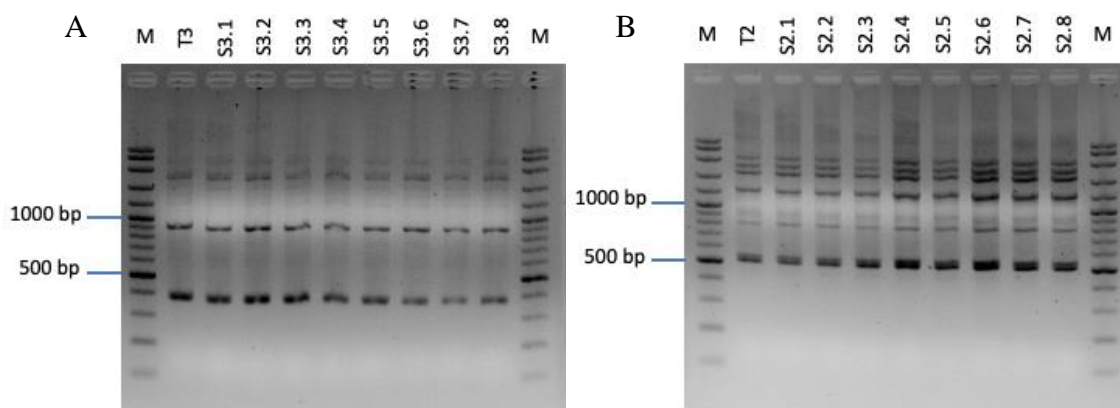
RAPD โดยใช้ไพรเมอร์รวม 15 ชนิด ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอรวม 84 แถบ เปรียบเทียบกับต้นแม่ปรากฏว่าไม่พบแถบที่มีความแตกต่างจากลายพิมพ์ของไส้เดือนแม่ที่เก็บจากแปลงปลูก



รูปที่ 20 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF2 (A) และไพรเมอร์ OPF7 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder T2 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 2 S2.1-S2.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นที่ 2

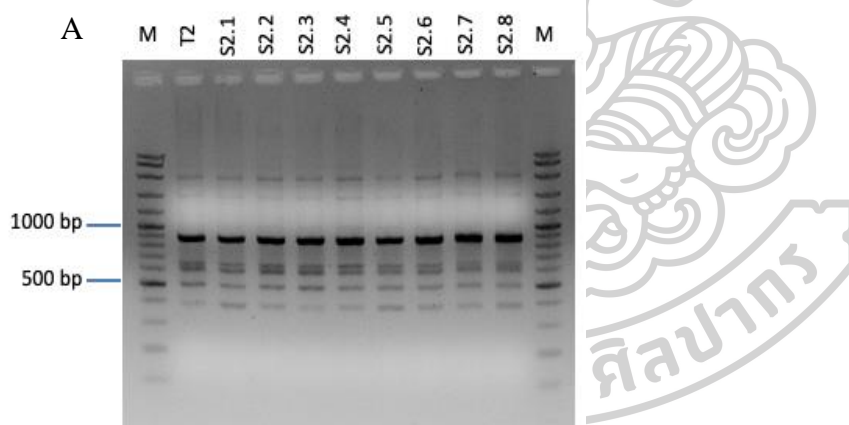


รูปที่ 21 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF14 (A) และไพรเมอร์ OPF15 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder T2 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 2 T3 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 3 S2.1-S2.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นที่ 2 S3.1-S3.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นที่ 3



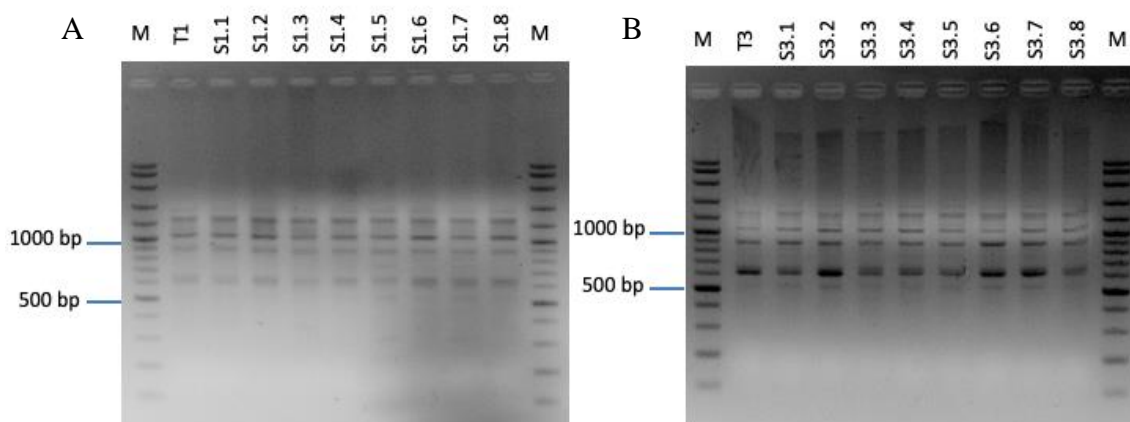
รูปที่ 22 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW1

(A) และ ไพรเมอร์ OPW3 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder T2 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 2 T3 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 3 S2.1-S2.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเขื่อนต้นที่ 2 S3.1-S3.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเขื่อนต้นที่ 3



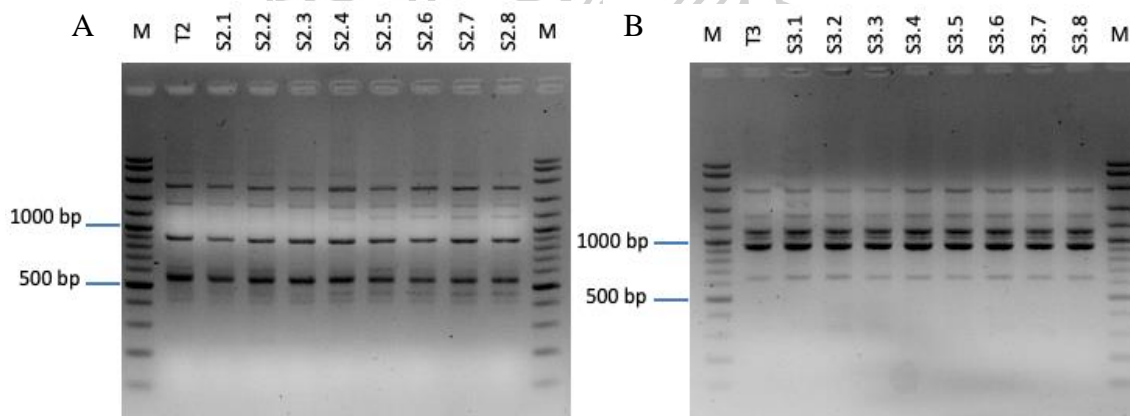
รูปที่ 23 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW10

(A) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder T2 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 2 S2.1-S2.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเขื่อนต้นที่ 2



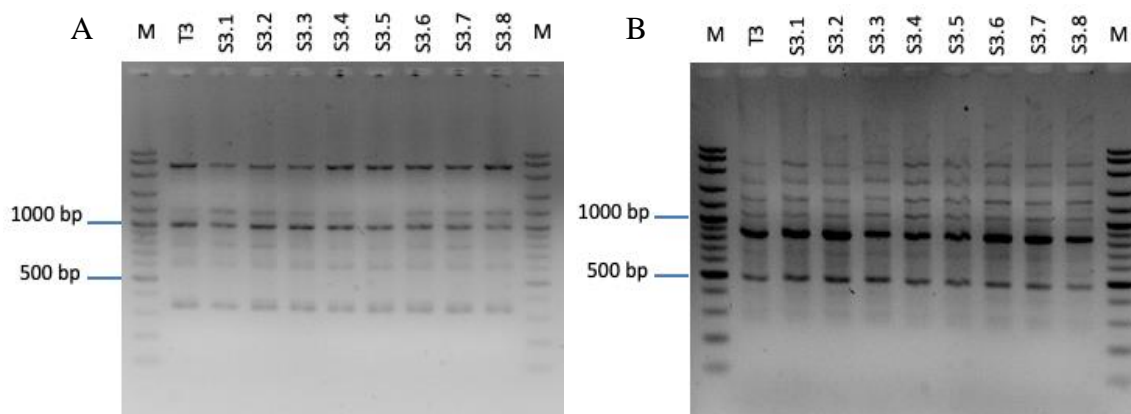
รูปที่ 24 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์

OPF5 (A) และไพรเมอร์ OPF6 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder T1 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 1 T3 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 3 S1.1-S1.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นที่ 1 S3.1-S3.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นที่ 3

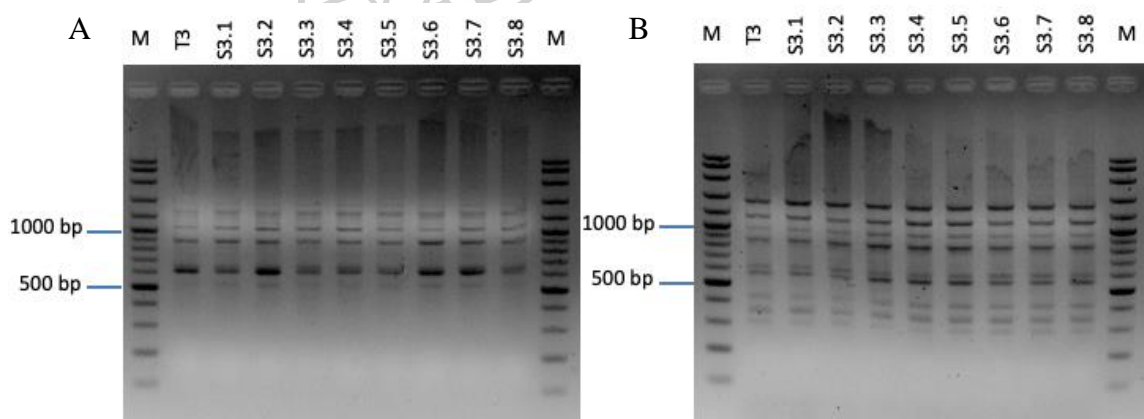


รูปที่ 25 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์

OPF9 (A) และไพรเมอร์ OPW2 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder T2 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 2 T3 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 3 S2.1-S2.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นที่ 2 S3.1-S3.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นที่ 3



รูปที่ 26 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW5 (A) และไพรเมอร์ OPW8 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder T3 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 3 S3.1-S3.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นที่ 3



รูปที่ 27 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW17 (A) และไพรเมอร์ OPW18 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder T3 คือ ต้นในแปลงต้นที่ 3 S3.1-S3.8 คือ subculture รอบที่ 1-8 ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นที่ 3

ตารางที่ 12 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบที่แสดงความต่าง (Polymorphic band) %Polymorphic และขนาดของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ด้วยเทคนิค RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ	จำนวนแถบที่ แสดงความต่าง (Polymorphic band)	%Polymorphic	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (คู่เบส)
OPF2	-GAGGATCCCT-	4	0	0	400-2,500
OPF7	-CCGATATCCC-	5	0	0	600-2,000
OPF14	-TGCTGCAGGT-	7	0	0	500-2,000
OPF15	-CCAGTACTCC-	5	0	0	300-2,000
OPW1	-CTCAGTGTCC-	4	0	0	300-2,500
OPW3	-GTCCGGAGTG-	7	0	0	500-2,500
OPW10	-TCGCATCCCT-	6	0	0	400-2,500
รวม		38	0	0	-
จำนวนแถบเฉลี่ย		5.42 แถบต่อไพรเมอร์			

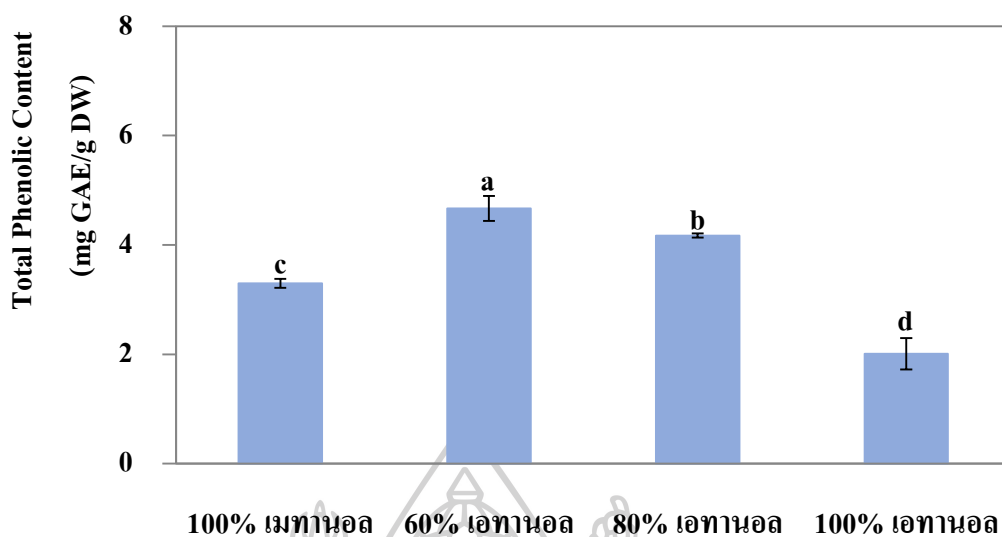
ตารางที่ 13 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบที่แสดงความต่าง (Polymorphic band) %Polymorphic และขนาดของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ด้วยเทคนิค HAT-RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	จำนวนแถบที่แสดงความต่าง (Polymorphic band)	%Polymorphic	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (คู่เบส)
OPF5	-CCGAATTCCC-	7	0	0	300-3,000
OPF6	-GGGAATTCGG-	6	0	0	400-2,500
OPF9	-CCAAGCTTCC-	4	0	0	400-2,500
OPW2	-ACCCCGCCAA-	5	0	0	300->3,000
OPW5	-GGCGGATAAG-	6	0	0	300-2,500
OPW8	-GACTGCCTCT-	6	0	0	300-2,500
OPW17	-GTCCTGGGTT-	4	0	0	500-1,500
OPW18	-TTCAGGGCAC-	8	0	0	300-1,500
	รวม	46	0	0	-
	จำนวนแถบเฉลี่ย		5.75 แถบต่อไพรเมอร์		

3. การวิเคราะห์สารพฤกษเคมีในใบไผ่ 9 สปีชีส์

3.1 ผลการสกัดใบไผ่ข้างหม่นในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

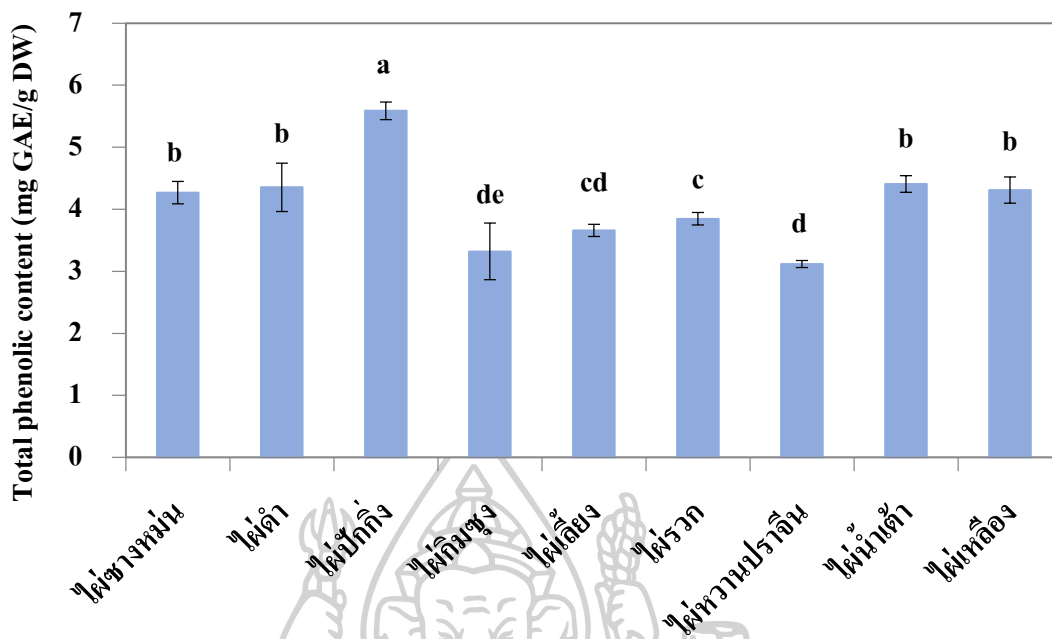
จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบไผ่ข้างหม่น “นวลราชินี” ในสารละลายที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ 60% เอทานอล 80% เอทานอล 100% เอทานอล และ 100% เมทานอล พบว่าสารละลาย 60% เอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (4.67 ± 0.23 mg GAE/g DW) อย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาได้แก่ 80% เอทานอล (4.17 ± 0.04 mg GAE/g DW) 100% เมทานอล (3.30 ± 0.08 mg GAE/g DW) และ 100% เอทานอล (2.01 ± 0.29 mg GAE/g DW) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 28



รูปที่ 28 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวทำละลายที่แตกต่างกันของใบไผ่ชางหม่น (*Dendrocalamus sericeus*)

3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ในใบไผ่ 9 สปีชีส์ที่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองที่ 3.1 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีค่าสูงสุดเมื่อสกัดใบไผ่ชางหม่นด้วยสารละลาย 60% เอทานอล จึงได้คัดเลือกสารละลาย 60% เอทานอล เป็นตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการสกัดใบไผ่ทั้ง 9 สปีชีส์ ได้แก่ ไผ่ชางหม่น ไผ่ดำ ไผ่ปักกิ่ง ไผ่กิมซุง ไผ่เลี้ยง ไผ่รวก ไผ่หวานปราจีน ไผ่น้ำเต้า และไผ่เหลือง ซึ่งผลการทดลองเมื่อวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในใบไผ่ทั้ง 9 สปีชีส์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในใบไผ่ปักกิ่งสูงที่สุด (5.59 ± 0.14 mg GAE/g DW) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนไผ่น้ำเต้า (4.40 ± 0.13 mg GAE/g DW) ไผ่ดำ (4.35 ± 0.39 mg GAE/g DW) ไผ่เหลือง (4.31 ± 0.21 mg GAE/g DW) และไผ่ชางหม่น (4.27 ± 0.18 mg GAE/g DW) เป็นกลุ่มที่มีค่าสารประกอบฟีนอลิกรวมรองลงมาจากใบไผ่ปักกิ่ง นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกรวมของไผ่ชนิดอื่นได้แก่ ไผ่รวก (3.85 ± 0.10 mg GAE/g DW) ไผ่เลี้ยง (3.66 ± 0.10 mg GAE/g DW) ไผ่กิมซุง (3.32 ± 0.46 mg GAE/g DW) และไผ่หวานปราจีนมีค่าสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด (3.12 ± 0.06 mg GAE/g DW) ดังแสดงในรูปที่ 29



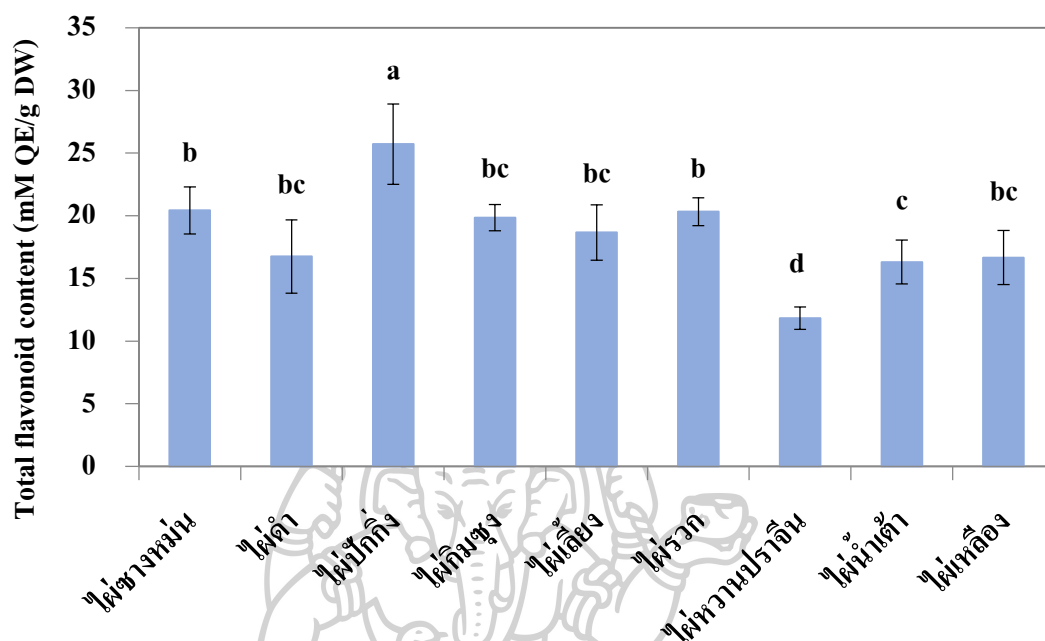
รูปที่ 29 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากใผ่ 9 สปีชีส์ ที่แตกต่างกันด้วยวิธี

Folin-Ciocalteu colorimetric

3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมโดยวิธี Aluminum chloride colorimetric

นำสารสกัดใผ่ทั้ง 9 สปีชีส์ ที่สกัดด้วย 60% เอทานอล เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม โดยผลการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากใผ่ทั้ง 9 สปีชีส์ พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในใผ่ปักกิ่งสูงที่สุด (25.72 ± 3.20 mM QE/g DW) อย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาได้แก่ ใผ่ขางหม่น (20.43 ± 1.88 mM QE/g DW) ใผ่รวก (20.33 ± 1.11 mM QE/g DW) ใผ่กิมชุง (19.85 ± 1.04 mM QE/g DW) ใผ่เลี้ยง (18.67 ± 2.21 mM QE/g DW) ใผ่ดำ (16.75 ± 2.92 mM QE/g DW) ใผ่เหลือง (16.66 ± 2.15 mM QE/g DW) ใผ่น้ำเต้า (16.31 ± 1.75 mM QE/g DW) ขณะที่ใผ่หวานปราจีนมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุด (11.83 ± 0.90 mM QE/g DW) ดังแสดงในรูปที่ 30 จากผลดังกล่าวพบว่านอกจากสารสกัดจากใผ่ปักกิ่งจะมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดแล้วนั้น ใผ่ที่น่าสนใจรองลงมาได้แก่ ใผ่ขางหม่นและใผ่รวก ซึ่งเป็นกลุ่มที่รองลงมา ขณะเดียวกัน ใผ่ดำและใผ่เหลืองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับใผ่ชนิดอื่นๆ และเมื่อวิเคราะห์ผลปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในตัวอย่างใผ่สองสปีชีส์นี้พบว่ามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมไม่แตกต่างกับใผ่ขางหม่นและใผ่รวก การทดลองนี้จึงนำไปสู่การวิเคราะห์และ

จำแนกสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกประเภทของสารประกอบฟลาโวนไกลโคไซด์ต่อไป

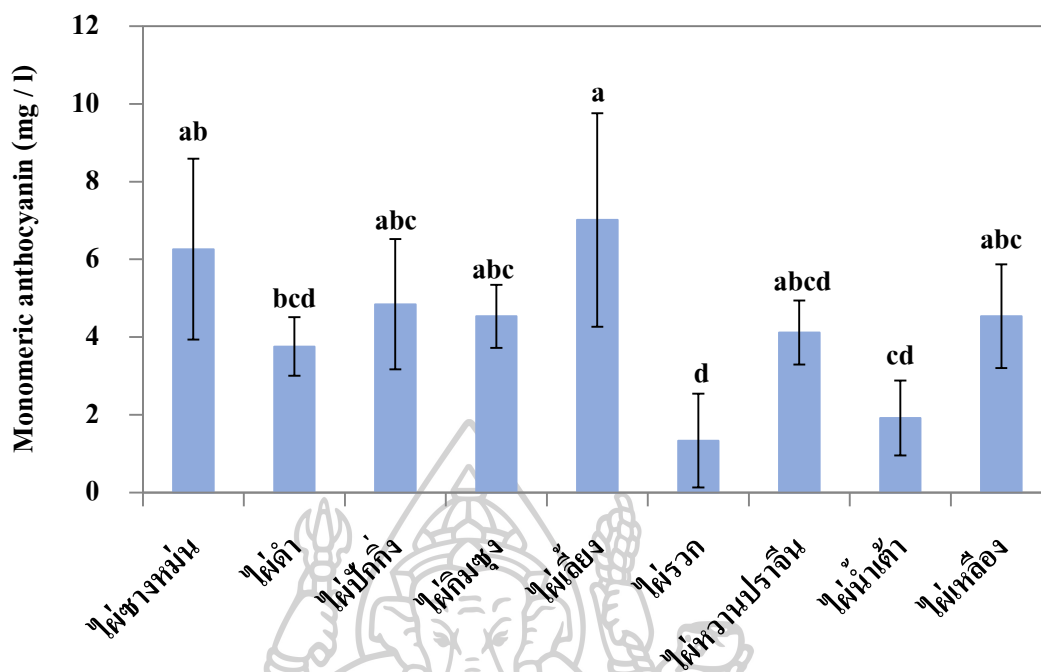


รูปที่ 30 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากใบใฝ่ 9 สปีชีส์ ที่แตกต่างกันด้วยวิธี

Aluminum chloride colorimetric

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินโดยวิธี pH-differential

นำสารสกัดใบใฝ่ทั้ง 9 สปีชีส์ ที่สกัดด้วย 60% เอทานอล เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานิน ผลการศึกษาปริมาณสารแอนโทไซยานินในใบใฝ่ทั้ง 9 สปีชีส์ พบว่าปริมาณสารแอนโทไซยานินในใบใฝ่เลี้ยง (7.01 ± 2.75 mg/l) ใฝ่ชางหม่น (6.26 ± 2.33 mg/l) ใฝ่ปักกิ่ง (4.84 ± 1.68 mg/l) ใฝ่กิมซุง (4.54 ± 0.81 mg/l) ใฝ่เหลือง (4.54 ± 1.34 mg/l) ใฝ่หวานปราจีน (4.12 ± 0.82 mg/l) ใฝ่ดำ (3.76 ± 0.75 mg/l) ใฝ่น้ำเต้า (1.92 ± 0.96 mg/l) และใฝ่รวก (1.34 ± 1.20 mg/l) ดังแสดงในรูปที่ 31 จากการศึกษาพบว่าสารแอนโทไซยานินมีค่าสูงสุดในสารสกัดจากใบใฝ่เลี้ยง ขณะที่สารสกัดจากใบใฝ่ชางหม่นพบว่าค่าสารแอนโทไซยานินไม่แตกต่างกับใฝ่เลี้ยงเมื่อเทียบทางสถิติ โดยที่สารสกัดจากใบใฝ่ปักกิ่งมีค่าสารแอนโทไซยานินไม่แตกต่างกับสารสกัดจากใบใฝ่เลี้ยงและใฝ่ชางหม่น



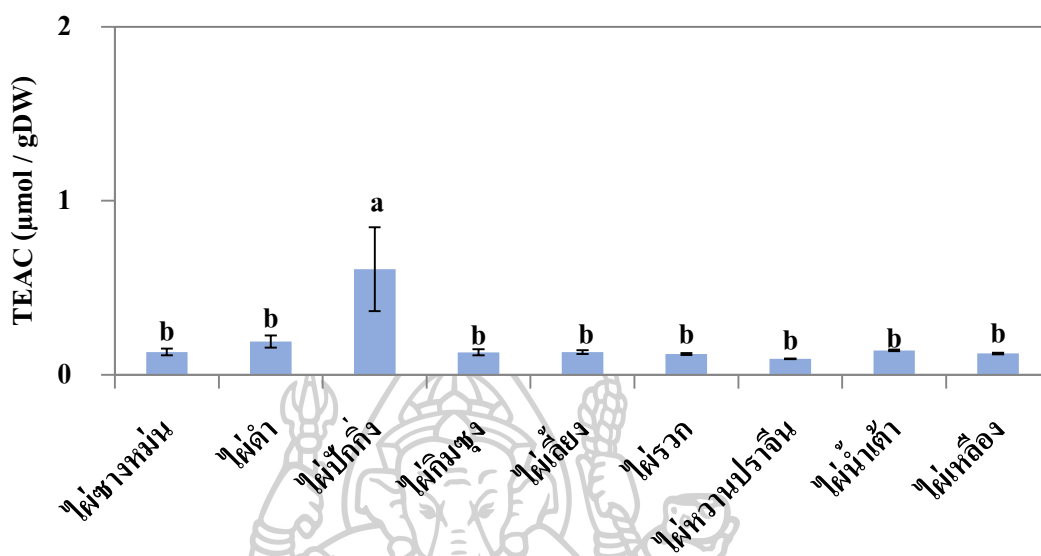
รูปที่ 31 ปริมาณสารแอนโทไซยานินในสารสกัดจากใบไม้ 9 สปีชีส์ ที่แตกต่างกันด้วยวิธี pH-differential

3.5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging

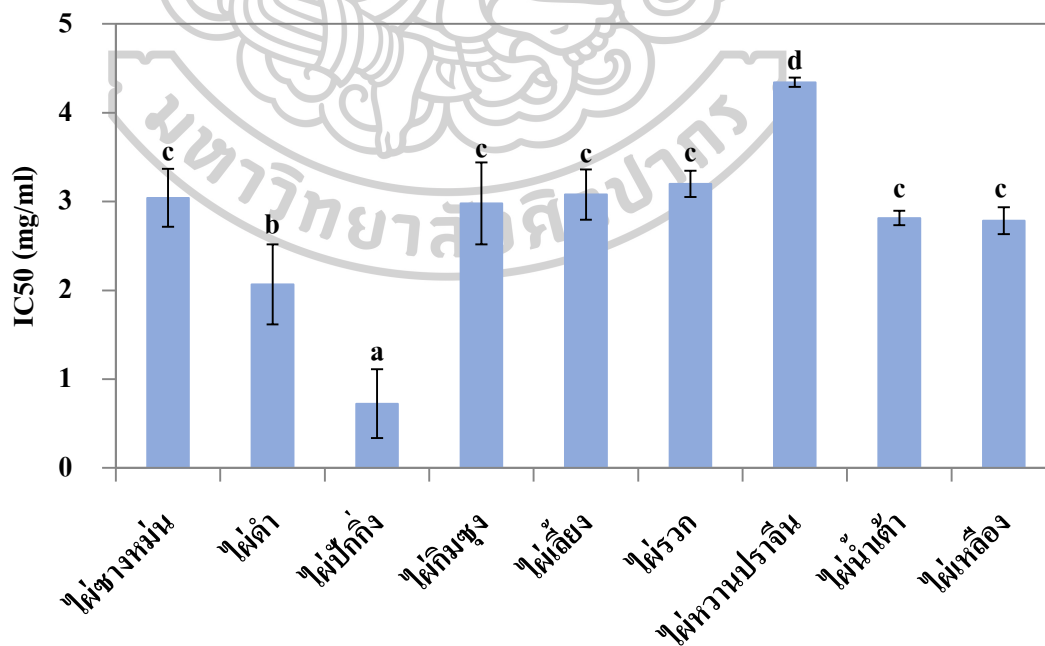
ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบไม้ทั้ง 9 สปีชีส์ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแสดงในค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ในสารสกัดใบไม้ ปักกิ่ง ($0.61 \pm 0.24 \mu\text{mol/g DW}$) มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับไม้ชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาได้แก่ ฝรั่งน้ำเต้า ($0.19 \pm 0.04 \mu\text{mol/g DW}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($0.14 \pm 0.00 \mu\text{mol/g DW}$) ฝรั่งขี้นก ($0.13 \pm 0.02 \mu\text{mol/g DW}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($0.13 \pm 0.01 \mu\text{mol/g DW}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($0.13 \pm 0.02 \mu\text{mol/g DW}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($0.12 \pm 0.00 \mu\text{mol/g DW}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($0.12 \pm 0.01 \mu\text{mol/g DW}$) และฝรั่งน้ำเต้า ($0.09 \pm 0.00 \mu\text{mol/g DW}$) ดังแสดงในรูปที่ 32

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแสดงค่าในการกำจัดอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ในสารสกัดจากใบไม้ 9 สปีชีส์ ที่แตกต่างกัน โดยค่า IC_{50} จะมีค่าสวนทางกับค่า TEAC ซึ่งค่า IC_{50} ในสารสกัดจากใบไม้ ปักกิ่ง ($0.72 \pm 0.39 \text{ mg/l}$) มีค่าน้อยที่สุด รองลงมาได้แก่ ฝรั่งน้ำเต้า ($2.07 \pm 0.45 \text{ mg/l}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($2.78 \pm 0.15 \text{ mg/l}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($2.82 \pm 0.08 \text{ mg/l}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($2.98 \pm 0.46 \text{ mg/l}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($3.04 \pm 0.33 \text{ mg/l}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($3.08 \pm 0.28 \text{ mg/l}$) ฝรั่งน้ำเต้า ($3.20 \pm 0.15 \text{ mg/l}$) และฝรั่งน้ำเต้า ($4.34 \pm 0.05 \text{ mg/l}$)

ตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 33 ซึ่งผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าค่า TEAC และ IC50 มีความสอดคล้องกันคือถ้าค่า TEAC สูงที่สุดจะมีค่า IC50 น้อยที่สุดเช่นกัน



รูปที่ 32 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแสดงในค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ในสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์ ที่แตกต่างกันด้วยวิธี DPPH radical scavenging

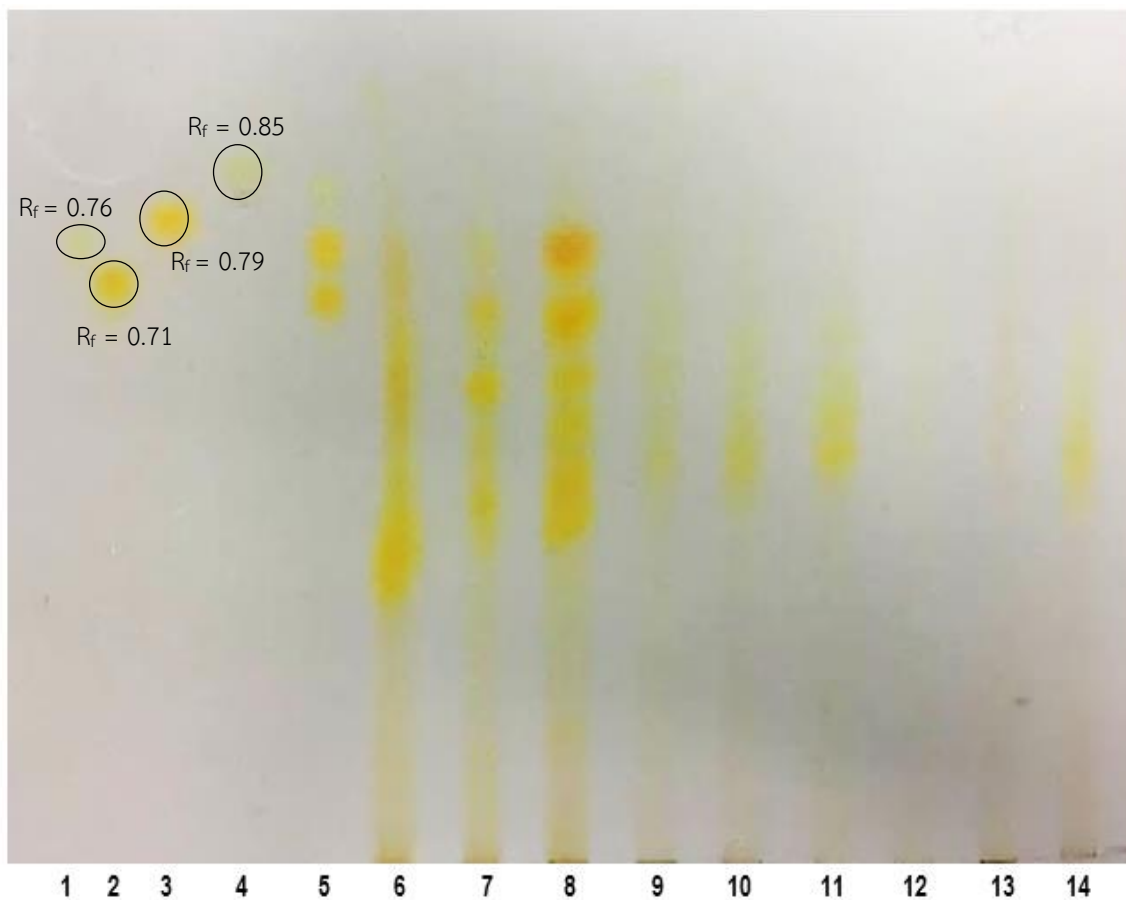


รูปที่ 33 ปริมาณสารสกัดจากใบไผ่ที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระให้ลดลง 50% (IC50) ของสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์ ที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging

3.6 การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)

จากการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric ในสารสกัดจากใบไผ่ทั้ง 9 สปีชีส์ แล้วนั้นจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อจำแนกสารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์ด้วยเทคนิค TLC โดยทำการเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้ทางการค้าทั้ง 4 ชนิด คือ isovitexin, isoorientin, orientin และ vitexin พบว่าสารมาตรฐาน isovitexin และ vitexin ปรากฏแถบเป็นสีเขียวอ่อนและมีค่า R_f เท่ากับ 0.76 และ 0.85 ตามลำดับ ส่วนสาร isoorientin และ orientin ปรากฏแถบเป็นสีเหลืองและมีค่า R_f เท่ากับ 0.71 และ 0.79 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 34 และสารสกัดจากใบไผ่ทั้ง 9 สปีชีส์ ซึ่งแทนด้วยหมายเลข 6-14 ได้แก่ ไผ่ชางหม่น (6) ไผ่ดำ (7) ไผ่ปักกิ่ง (8) ไผ่กิมซุง (9) ไผ่เลี้ยง (10) ไผ่รวก (11) ไผ่หวานปราจีน (12) ไผ่น้ำเต้า (13) และไผ่เหลือง (14) ตามลำดับ พบว่าสารสกัดจากใบไผ่ชางหม่น ไผ่ดำ และไผ่ปักกิ่งมีแถบของสารกลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์สูงสุดเมื่อเทียบด้วยความเข้มของแถบสีที่ปรากฏ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์ นี้มีสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นองค์ประกอบ จากผลการศึกษาที่พบนี้ นำไปสู่การคัดเลือกสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์ ได้แก่ ไผ่ชางหม่น ไผ่ดำ และไผ่ปักกิ่ง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์ด้วยเทคนิค HPLC





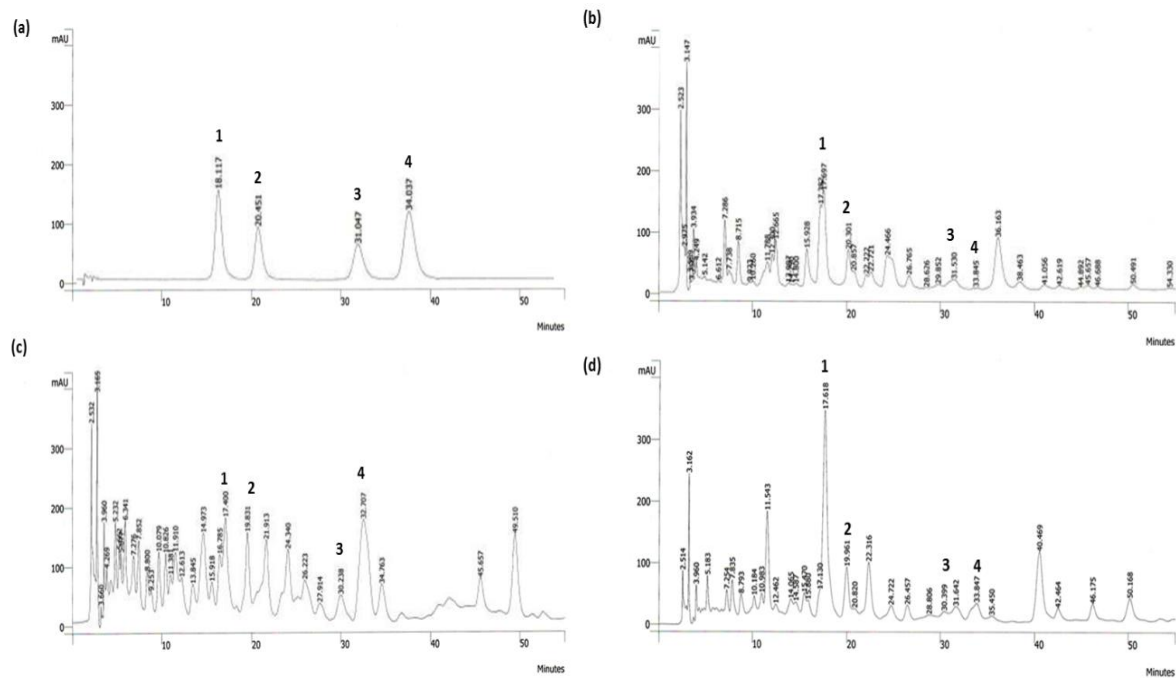
รูปที่ 34 ชนิดของฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ (Flavone C-glycoside) ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography โดยมีสารมาตรฐานและตัวอย่างสารสกัดเรียงตามลำดับหมายเลขดังนี้ isovitexin (1) isorientin (2) orientin (3) vitexin (4) สารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดผสมกัน (5) ไผ่ชางหม่น (6) ไผ่ดำ (7) ไผ่ปักกิ่ง (8) ไผ่กิมชุง (9) ไผ่เลี้ยง (10) ไผ่รวก (11) ไผ่หวานปราจีน (12) ไผ่น้ำเต้า (13) ไผ่เหลือง (14)

3.7 การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

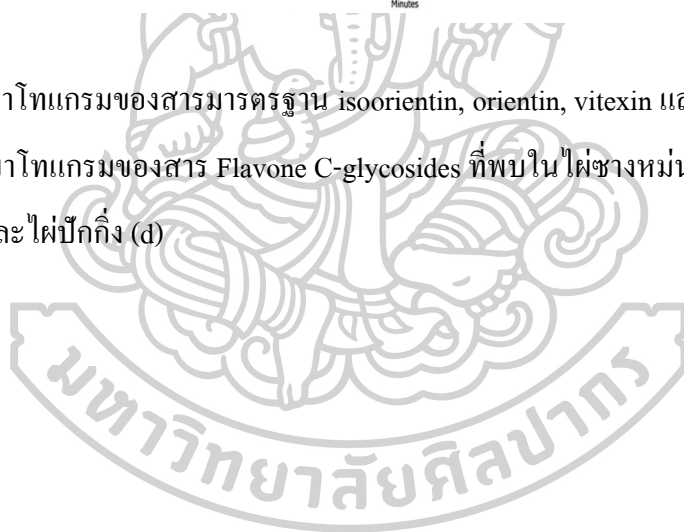
จากการศึกษาวิเคราะห์สารพฤกษเคมี ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกรวม สารฟลาโวนอยด์ สารแอนโทไซยานิน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในใบไผ่ 9 สปีชีส์ พบว่าสารสกัดจากใบไผ่ชางหม่น ไผ่ดำ และไผ่ปักกิ่ง มีส่วนประกอบของสารพฤกษเคมีดังที่กล่าวข้างต้นในปริมาณโดยรวมที่อยู่ในเกณฑ์ที่สูงกว่าไผ่ชนิดอื่นๆ และผลจากการศึกษาสารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์

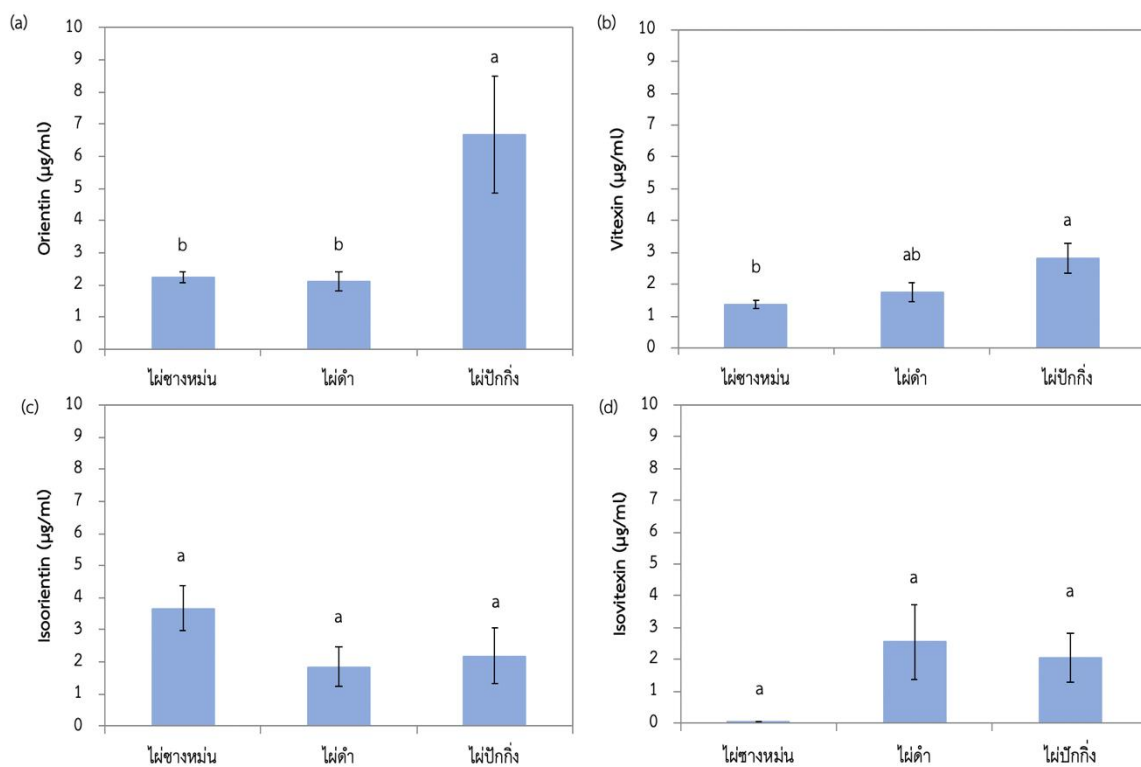
ด้วยเทคนิค TLC พบว่าสารสกัดจากใบไผ่ทั้ง 3 สปีชีส์ นี้มีสารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ทั้ง 4 ชนิด เป็นองค์ประกอบ จึงทำการคัดเลือกสารสกัดจากใบไผ่ชางหม่น ไผ่ดำ และไผ่ปักกิ่ง มาวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ด้วยเทคนิค HPLC โดยทำการเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้ทางการค้าทั้ง 4 ชนิด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารมาตรฐานของ isoorientin, orientin, vitexin และ isovitexin โดยมีค่า retention time (RT) เท่ากับ 18.12, 20.45, 31.05 และ 34.04 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 35a) และพบว่าสารสกัดจากใบไผ่ชางหม่น (รูปที่ 35b) ไผ่ดำ (รูปที่ 35c) และไผ่ปักกิ่ง (รูปที่ 35d) มีสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด เป็นองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน จากการคำนวณปริมาณสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ในสารสกัดจากใบไผ่ชางหม่น ไผ่ดำ และไผ่ปักกิ่ง ดังแสดงในรูปที่ 36 พบว่า สารสกัดจากใบไผ่ทั้ง 3 สปีชีส์ มีปริมาณของ isoorientin อยู่ในช่วง 1.86-3.67 $\mu\text{g/ml}$ และมีปริมาณของ isovitexin อยู่ในช่วง 0.05-2.55 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สาร orientin และ vitexin มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยในไผ่ปักกิ่ง มีปริมาณของสาร orientin สูงที่สุด คือ 6.68 $\mu\text{g/ml}$ และในสารสกัดจากใบไผ่ปักกิ่งและไผ่ดำมีสาร vitexin สูงที่สุดคือ 2.81 $\mu\text{g/ml}$ และ 1.73 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ





รูปที่ 35 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน isorientin, orientin, vitexin และ isovitexin (a) และ โครมาโทแกรมของสาร Flavone C-glycosides ที่พบในไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” (b) ไผ่ดำ (c) และไผ่ปักกิ่ง (d)





รูปที่ 36 ปริมาณของฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ (Flavone C-glycoside) ได้แก่ orientin (a) vitexin (b) isoorientin (c) และ isovitexin (d) ที่พบในสารสกัดจากใบไม้ 3 สีที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ขางหม่น “นวลราชินี”

1.1 การศึกษาการปนเปื้อนและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาการปนเปื้อนและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในช่วงเวลาปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2562 พบว่าในแต่ละฤดูกาลมีการปนเปื้อนที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะฤดูฝนจะมีร้อยละการปนเปื้อนสูงที่สุด เนื่องจากในช่วงฤดูฝนเป็นช่วงที่อากาศชื้นมากและมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ดี ส่วนในฤดูแล้งพบว่ามีร้อยละการปนเปื้อนต่ำที่สุดและร้อยละการแตกยอดจากข้อที่ปลอดเชื้อคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ขางหม่นจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการปนเปื้อนและการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้น โดยมีหลายงานวิจัยได้ศึกษาช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างที่มีผลต่อการปนเปื้อนและการแตกยอด เช่น การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ *D. giganteus* จากส่วนข้อโดยมีการเก็บส่วนข้อในแต่ละช่วงเดือนพบว่า ปริมาณน้ำฝนและฤดูกาลมีผลต่อการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรีย อีกทั้งยังส่งผลต่อการแตกตาของส่วนข้อ (Ramanayake and Yakandawala, 1997) และการศึกษาในไผ่ *Arundinaria callosa* ยังพบว่า การเก็บชิ้นส่วนข้อในช่วงฤดูฝนจะเป็นช่วงที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียสูง แต่เมื่อทำการเก็บตัวอย่างหลังจากช่วงมรสุมพบว่าร้อยละการปลอดเชื้อสูงขึ้น (Devi and Sharma, 2009) จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสอดคล้องกับการศึกษาในที่พบว่าร้อยละการปลอดเชื้อต่ำเมื่อทำการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูฝน และการปนเปื้อนจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อทำการเก็บตัวอย่างในวันที่มีฝนตก อีกทั้งยังพบว่าไผ่ *D. asper* ในประเทศอินเดียจะมีการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นได้ดีในช่วงฤดูฝน แต่เชื้อราและแบคทีเรียที่อยู่บริเวณใต้กาบใบอาจนำไปสู่การปนเปื้อนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และจะลดลงในช่วงฤดูแล้ง ขณะที่ในช่วงฤดูใบไม้ร่วงมีการปนเปื้อนต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 8-12 เปอร์เซ็นต์ และการแตกยอดอยู่ในช่วง 84-94 เปอร์เซ็นต์ (S. R. Singh et al., 2012a) ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยในไผ่ *Thyrsostachys siamensis* ที่เก็บชิ้นส่วนข้อในช่วงฤดูร้อน ฝน และหนาว ของประเทศไทย พบว่าในฤดูฝนร้อยละการปลอดเชื้อและเกิดยอด (46.6-56.0

เปอร์เซ็นต์) ต่ำกว่าในฤดูหนาวและร้อน (Obsuwan et al., 2019) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่สอดคล้องกับการทดลองนี้โดยศึกษาการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนข้อของไผ่ *B. mutans* ซึ่งตัวอย่างเก็บจากประเทศอินเดียในช่วงฤดูกลางที่แตกต่างกันพบว่าฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาวร้อยละการแตกยอดของชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 35-45 เปอร์เซ็นต์ แต่ในช่วงมรสุมร้อยละการแตกกิ่งเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ (Mudoi et al., 2014) อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาช่วงเวลาในการเก็บชิ้นส่วนข้อของไผ่ *D. hamiltonii* ในประเทศอินเดียเพื่อนำมาขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีการแตกยอดดีที่สุดในช่วงเริ่มเข้าฤดูร้อน และมีการปนเปื้อนต่ำที่สุดในช่วงนี้ (S. R. Singh et al., 2012b)

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ขางหม่นจากส่วนข้อเริ่มต้นเพื่อให้มีการปลอดเชื้อมากที่สุดควรหลีกเลี่ยงในช่วงที่อากาศมีความชื้นสูง โดยฤดูที่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่างในประเทศไทยคือช่วงหลังฤดูฝน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าตาขอดอ่อนสามารถสร้างออกซินในฤดูใบไม้ผลิและกระตุ้นการแบ่งเซลล์ในชั้นแคมเบียมเพื่อแบ่งเซลล์ในการเจริญเติบโต (Funada et al., 2001) เนื่องจากในประเทศไทยตั้งอยู่บนคาบสมุทรอินโดจีนขนาดด้วยมหาสมุทรอินเดียกับทะเลจีนใต้ จึงทำให้ประเทศไทยมี 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว (ศูนย์การเรียนรู้วิทยาศาสตร์โลกและดาราศาสตร์, <http://www.lesa.biz/astro-events/seasons>) การทดลองนี้จึงพบว่าในช่วงฤดูฝนมีปริมาณน้ำฝนมากไผ่จึงมีการแตกยอดจำนวนมาก แต่เมื่อนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดการปนเปื้อนสูง ขณะที่ฤดูหนาวเป็นช่วงที่ต่อจากฤดูฝนทำให้กิ่งที่แตกยอดจำนวนมากนั้นมีการเจริญเติบโตเป็นกิ่งที่เหมาะสม ตามสมบูรณณ์เมื่อคัดเลือกชิ้นส่วนข้อมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีการปนเปื้อนต่ำเนื่องจากอากาศไม่ชื้นจนเกินไป

1.2 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตในอาหารสูตร MS ที่มีผลต่อการแตกยอดจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้น

จากการศึกษาสารควบคุมการเติบโตในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีผลต่อการแตกยอดจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นของไผ่ขางหม่นพบว่าเมื่อใช้สารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดและความยาวสูงสุด และมีลักษณะยอดยาวสม่ำเสมอและสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในไผ่ *D. strictus* ที่มีจำนวนยอดและความยาวยอดสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และการใช้สารควบคุมการเติบโตสองชนิดนี้ร่วมกันให้ผลที่ดีกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียว (Kapruwan

et al., 2014a) และการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในไผ่ *B. bambos* พบว่า อัตราการเกิดยอดสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังมีจำนวนยอด (3 ยอด) ความยาวยอดสูงสุด (3.4 เซนติเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Raju and Roy, 2016) โดยสารควบคุมการเติบโต BA เป็นสารกลุ่มไซโทไคนินซึ่งกระตุ้นการแบ่งเซลล์และทำให้เนื้อเยื่อเจริญนั้นเจริญเป็นตา ใบ และลำต้น ส่วนสารควบคุมการเติบโต TDZ เป็นสารกลุ่มฟีนิลยูเรียซึ่งออกฤทธิ์คล้ายกลุ่มไซโทไคนินและนอกจากนี้แล้ว TDZ ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำการเจริญของตาข้างได้ดี (Pai and Desai, 2018) ส่วน BA ความเข้มข้น 1.0-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถช่วยในการแตกยอด 30-37 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไม่มีการเติม BA พบว่าสามารถชักนำการแตกยอดได้เพียง 13 เปอร์เซ็นต์ ในไผ่ *Guadua angustifolia* (Jiménez et al., 2006) และในไผ่ *D. asper* พบว่าสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ หรือประมาณ 1.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการแตกตาอยู่ที่ 91 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวยอดสูงสุดเมื่อเทียบกับ BA ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ขณะเดียวกัน การศึกษานี้ยังพบว่าสารควบคุมการเติบโต Kn จะมีอัตราการส่งเสริมการแตกตาจำนวนยอดน้อยกว่า BA และ Kn ความเข้มข้นสูงกว่า 15 ไมโครโมลาร์ หรือประมาณ 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการแตกตาและความยาวยอดจะลดลง (S. R. Singh et al., 2012a) นอกจากนี้สารควบคุมการเติบโต Kn ยังสามารถช่วยเพิ่มจำนวนยอดได้เช่นกันและได้มีการศึกษาในไผ่ *D. strictus* พบว่าในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA และ Kn สามารถชักนำให้เกิดยอดจากข้อเริ่มต้น 3-8 ยอด (Ravikumar et al., 1998)

จากการศึกษาการแตกยอดของไผ่แต่ละสปีชีส์ก่อนข้างมีความแตกต่างกันเกี่ยวกับสปีชีส์ และปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโต เนื่องจากสารควบคุมการเติบโตมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไปดังกล่าวข้างต้น โดยงานวิจัยนี้ได้ศึกษาไผ่ขางหม่นในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ร่วมกับ TDZ และ Kn ให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกันกับอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจาก Kn แต่มีลักษณะยอดเรียวยาวและไม่สม่ำเสมอเมื่อเทียบกับอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ร่วมกับ TDZ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในไผ่ *Ochlandra wightii* โดยใช้สารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มอัตราการเกิดยอดได้สูงสุด และมี

จำนวนยอดสูงกว่าการใช้สารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว (Bejoy et al., 2012) นอกจากนี้การศึกษาในไม้ *D. hamitonii* พบว่าการแตกยอดจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA และ TDZ มีจำนวนยอดและร้อยละการแตกยอดสูงกว่าในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA เพียงอย่างเดียว (Kapruwan et al., 2014a) ทั้งนี้จากการศึกษานี้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ BA และ TDZ สูงเกินไปอาจจะทำให้ยอดมีลักษณะอวบ สั้น น้ำหนัก และเหลือง เป็นต้น

1.3 การศึกษาผลของอาหารสูตร MS ในสภาพกึ่งแข็งและเหลวต่อการชักนำให้เกิดยอด ทวีคูณและสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของไม้ชางหม่น “นวลราชินี”

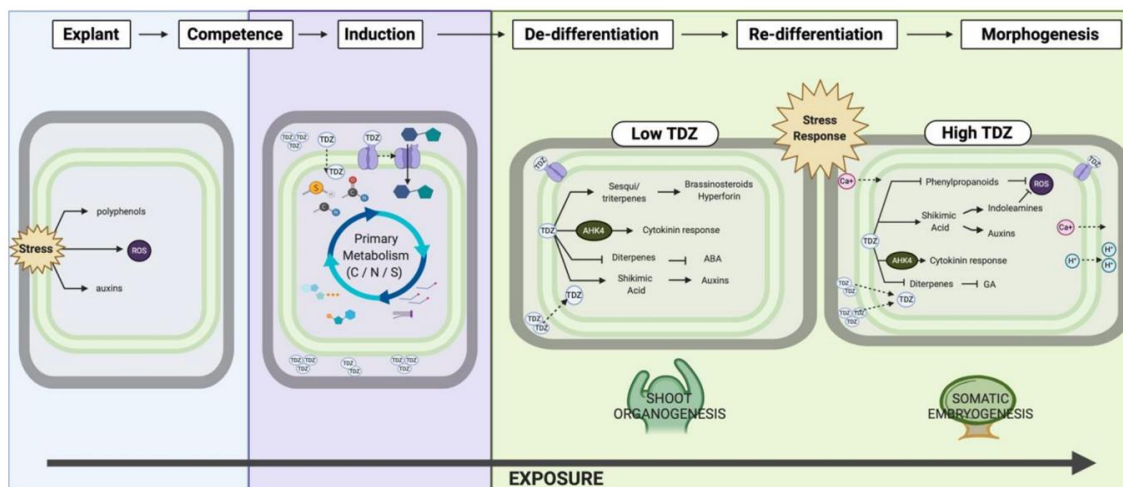
การชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของไม้ชางหม่นในอาหารสูตร MS ในสภาพกึ่งแข็งและเหลว พบว่าสภาพอาหารมีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ โดยในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโตชนิดและความเข้มข้นเดียวกันในสภาพอาหารเหลวสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดสูงกว่าอาหารกึ่งแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาการชักนำยอดทวีคูณในไม้ *B. oldhamii* โดยทำการเปรียบเทียบในอาหารสูตร MS สภาพกึ่งแข็งและเหลวที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารเหลวสามารถชักนำยอดทวีคูณได้ดีกว่าอาหารกึ่งแข็ง (C.-S. Lin et al., 2007) อีกทั้งยังมีการศึกษาการชักนำยอดทวีคูณในไม้ 6 สปีชีส์ ได้แก่ *B. balcooa* *B. nutans* *B. salarkhanii* *B. vulgaris* และ *T. oliveri* พบว่าอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ (3-24 ยอด) และยอดมีความยาวยืดยาวได้ดีแต่ทั้งนี้ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลานานประมาณ 4 รอบ จะทำให้การแตกยอดเป็นกลุ่มยอดไม่เรียวยาว (Islam and Rahman, 2005) จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสภาพอาหารมีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ โดยในสภาพอาหารเหลวจะมีประสิทธิภาพที่ดีทั้งในด้านของจำนวนยอดและความยาวยอด

จากการศึกษานี้พบว่าการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของไม้ชางหม่นไม่เพียงแต่สภาพอาหารเท่านั้นที่ส่งผลต่อจำนวนการเกิดยอดทวีคูณและลักษณะยอดที่ดี หากต้องมีสารควบคุมการเติบโตที่เหมาะสมเป็นองค์ประกอบด้วยเช่นกัน ในการศึกษาจึงพบว่าในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น

ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดทวิคูณ โดยมีความยาวยอดและจำนวนที่เหมาะสมอีกทั้งลักษณะยอดที่ได้มีความสมบูรณ์ แต่ทั้งนี้สูตรที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษานี้คือ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดทวิคูณ (7-11 ยอด) และความยาวสูงสุด (3 เซนติเมตร) อีกทั้งลักษณะยอดเขียว เรียว และสมบูรณ์ และจากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA สูงขึ้นถึง 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดเป็นกลุ่มเล็กๆ มีสีเหลืองน้ำตาล ยอดสั้นและน่าน้ำ ซึ่งงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาในไฟ 6 สปีชีส์ พบว่าในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดสั้นกว่าในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Islam and Rahman, 2005) และยังมีงานวิจัยในไฟ *B. oldhamii* ได้ทำการเปรียบเทียบสารควบคุมการเติบโต BA, Kn, TDZ, zeatin และ adenosine (2-ip) พบว่าสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีเทียบเท่ากับ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วง 6 สัปดาห์แรก แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลานาน 9 สัปดาห์ การชักนำให้เกิดยอดในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย BA จะเริ่มลดลง ขณะที่ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย TDZ มีความคงที่เมื่อเวลานานขึ้น (C.-S. Lin et al., 2007) จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้นเพียง 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบเท่ากับการใช้ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นในการศึกษานี้เมื่อใช้ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงทำให้การชักนำยอดและลักษณะยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะและความยาวที่ดี นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดยอดทวิคูณในไฟ *A. callosa* พบว่าสารกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BA สามารถชักนำให้เกิดตาข้างและยอดทวิคูณได้ดี และเมื่อทำงานร่วมกับสารกลุ่มออกซินก็จะสามารถชักนำให้เกิดยอดทวิคูณเพิ่มขึ้น (Devi and Sharma, 2009) แต่ทั้งนี้แล้วยังพบว่าสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้นในช่วง 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดทวิคูณได้ดีในไฟ *D. strictus* (M. Singh et al., 2001)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้กล่าวถึงประโยชน์ของสารควบคุมการเติบโต BA และ TDZ ซึ่งทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติช่วยในการชักนำให้เกิดยอดทวิคูณในไฟหลายสปีชีส์ ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับไฟแต่ละสปีชีส์ และเมื่อทำการศึกษา

การใช้สารสองชนิดนี้ร่วมกันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่ขางหม่นพบว่าประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณสูงขึ้นกว่าการใช้เพียงชนิดเดียว ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาในไผ่ *D. strictus* พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอด (6 ยอด) และความยาวยอดสูงสุด (6.87 เซนติเมตร) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ BA หรือ TDZ เพียงอย่างเดียว (Kapruwan et al., 2014b) และการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในไผ่ *B. bambos* ในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีจำนวนยอด (16 ยอด) และความยาวยอดสูงสุด (9 เซนติเมตร) เมื่อเทียบกับ BA อย่างเดียว หรือร่วมกับ TDZ และ NAA (Raju and Roy, 2016) อีกทั้งยังมีการศึกษาสารควบคุมการเติบโต TDZ พบว่า TDZ มีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphogenesis) โดย TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพซึ่งสามารถตอบสนองต่อการชักนำสัญญาณได้ทั้งสารควบคุมการเติบโตกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน โดยเซลล์จะต้องยอมรับการชักนำสัญญาณและกระบวนการพัฒนาเริ่มต้นไปสู่การสร้างใหม่โดยผ่านวิถีออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) และเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) นอกจากนี้ยังพบว่า TDZ สามารถชักนำเอ็มบริโอที่มีกระบวนการเกิดและพัฒนาจากเซลล์ร่างกายของพืชโดยไม่ผ่านการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ในธรรมชาติ (somatic embryogenesis) ได้ที่ความเข้มข้นสูง และเมื่อใช้ TDZ ที่ความเข้มข้นต่ำยังสามารถชักนำ shoot organogenesis ได้ในพืชหลายชนิด เช่น เจอราเนียม (geraniums) แอฟริกันไวโอเล็ต (african violet) และ ถั่วลิสง (peanut) รวมถึงการเกิด somatic embryogenesis เป็นการเจริญเติบโตที่ยังเกี่ยวข้องกับออกซินอีกด้วย ซึ่งได้มีการตั้งสมมติฐานไว้ก่อนหน้าว่าการแสดงออกของ TDZ อาจจะเป็นกระบวนการโดยผ่านทั้งไซโทไคนินและการดำเนินการคล้ายออกซินรวมถึงการชักนำกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ TDZ อาจจะขึ้นอยู่กับสัญญาณลำดับที่สอง (secondary signals) เหมือนกับแคลเซียมหรือความเครียดทางกายภาพ (Erland et al., 2020) ดังแสดงในรูปที่ 37



รูปที่ 37 แบบจำลองการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่เกิดจากสารควบคุมการเติบโต TDZ

ในต้นแอฟริกันไวโอเล็ต ที่มา: Erland et al., (2020)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารควบคุมการเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยพบว่าที่ระดับไซโทไคนินสูงจะพบบริเวณที่มีการแบ่งตัวของเนื้อเยื่อเจริญรากและยอด ส่วนที่ระดับไซโทไคนินต่ำจะพบในเนื้อเยื่อที่วัฏจักรเซลล์ถูกจับ การใช้สารควบคุมการเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินจากภายนอกไปยังอวัยวะบางส่วนที่ปกติขาดฮอร์โมนชนิดนี้จะแสดงให้เห็นถึงการชักนำการแบ่งเซลล์ อีกทั้งไซโทไคนินมีความเชื่อมโยงกับวัฏจักรเซลล์แต่มีหลักฐานที่ปรากฏเพียงเล็กน้อยว่าในวัฏจักรเซลล์มีบทบาทในการเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (D'Agostino and Kieber, 1999) จากกลไกที่กล่าวมาข้างต้นของสารควบคุมการเติบโต TDZ และไซโทไคนิน แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกับการศึกษานี้ที่เกี่ยวกับการชักนำการเพิ่มยอดทิวทัศน์ในไผ่ชางหม่น “นวลราชินี”

1.4 การศึกษาผลของอะดีนีนซัลเฟต (AdSO_4) ต่อการเกิดยอดทิวทัศน์ของกลุ่มยอดไผ่ชางหม่น “นวลราชินี”

จากการศึกษาผลของอะดีนีนซัลเฟต (AdSO_4) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 20, 40, 80, 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร การเกิดยอดทิวทัศน์ของกลุ่มยอดไผ่ชางหม่นพบว่า AdSO_4 ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดสูงสุด (3.58 เซนติเมตร) อีกทั้ง

ลักษณะยอดเขียวสมบูรณ์ เรียวยาวสม่ำเสมอ และไม่เกิดสารประกอบฟีนอลิกขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการศึกษากการเกิดยอดทิวคูนในไผ่ *D. asper* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และเติม AdSO₄ ที่ความเข้มข้น (25-100 ไมโครโมลาร์) พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม AdSO₄ ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการเกิดยอดทิวคูน (4.03 เท่า) จำนวนยอด (27 ยอด) และความยาวยอด (3.2 เซนติเมตร) มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยปราศจากการเติม AdSO₄ มีอัตราการเกิดยอดทิวคูน จำนวนยอด และความยาวยอดต่ำกว่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติม AdSO₄ (S. R. Singh et al., 2012a) และยังพบว่าในไผ่ *D. asper* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AdSO₄ ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดทิวคูน (14 ยอด) และความยาวยอด (6.77 เซนติเมตร) สูงสุด (Banerjee et al., 2011)

จากการศึกษาพบว่า AdSO₄ เป็นตัวกระตุ้นหรือช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตเมื่อทำงานร่วมกับสารควบคุมการเติบโตจากภายในหรือจากภายนอก และเมื่อใช้ AdSO₄ ร่วมกับสารกลุ่มไซโทไคลนินจะสามารถชักนำให้ยอดมีความยาวมากขึ้น (Gantait et al., 2010; Venkatachalam et al., 2015) ซึ่งความเข้มข้นของ AdSO₄ ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดทิวคูนและมีลักษณะยอดที่ดีนั้นมีความแตกต่างกันในไผ่แต่ละสปีชีส์ เช่น การศึกษาในไผ่ *B. arundinacea* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AdSO₄ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดมีการยืดยาวดีที่สุด (5.82 เซนติเมตร) (Venkatachalam et al., 2015) และในการศึกษาของไผ่ *D. strictus* พบว่าอัตราการเกิดยอดทิวคูนเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AdSO₄ ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chowdhury et al., 2004) อีกทั้งยังมีการศึกษาการชักนำยอดทิวคูนในไผ่ *D. strictus* เช่นกันพบว่าอัตราการเกิดยอดทิวคูนเพิ่มขึ้นประมาณสามเท่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม AdSO₄ ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ขณะเดียวกันเมื่อเติม AdSO₄ ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น คือ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการเกิดยอดทิวคูนลดลง (Pandey and Singh, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่าการเติม AdSO₄ สูงหรือต่ำเกินไปทำให้ยอดสั้น ยาวไม่สม่ำเสมอ และลักษณะยอดไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังมี

งานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาในไฟ *D. asper* และ *B. bambos* พบว่าเกิดยอดทวิคูณสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร Kn ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AdSO₄ ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (Niwash, 2011) โดยในการศึกษานี้พบว่าการชักนำให้เกิดยอดทวิคูณเพิ่มขึ้นและลักษณะยอดยาวสมบูรณ์ในไฟช่วงหม่นเมื่อเติม AdSO₄ ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ ไฟสปีชีส์นี้

1.5 การศึกษาผลของสารส่งเสริมการเติบโตของพืชต่อการเกิดยอดทวิคูณของไฟช่วงหม่น

“นวลราชินี”

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงกลุ่มยอดไฟช่วงหม่นบนอาหารกึ่งแข็งและในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารส่งเสริมการเติบโตของพืช ได้แก่ L-proline, L-glutamine, PVP-40 และ ascorbic acid พบว่าในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย L-proline ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PVP-40 ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดอยู่ในช่วงประมาณ 4-6 ยอดและความยาวยอดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.54-2.76 เซนติเมตร โดยลักษณะยอดที่เกิดขึ้นมีสีเขียวเข้มสมบูรณ์ มีความยาวยาวสม่ำเสมอ สอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาศักยภาพการเกิดยอดทวิคูณในไฟ *D. hamiltonii* จากบริเวณขึ้นสวนข้อ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดทวิคูณโดยมีจำนวนยอด (5 ยอด) และความยาวยอดสูงสุด (3.48 เซนติเมตร) (Bordoloi et al., 2018)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาว่าสารควบคุมการเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน (BA, Kn และ ZT) ถูกใช้บ่อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไฟ (S. R. Singh et al., 2013c) และ TDZ เป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์การทำงานคล้ายกลุ่มไซโทไคนิน อีกทั้งมีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดยอดในพืชยืนต้นอีกด้วย (Maheshwari and Kovalchuk, 2011) และได้มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาศักยภาพการเกิดยอดในไฟ *D. lariflorus* โดยทำการศึกษาศารควบคุมการเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน (BA และ ZT) กลุ่มออก

ซิน (NAA และ IAA) และร่วมกับ TDZ ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Ye et al., 2017)

1.6 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตและสารส่งเสริมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดคัลลัสและยอดในกลุ่มคัลลัส

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดคัลลัสในไผ่ขางหม่น “นวลราชินี” จากชิ้นส่วนบริเวณปลายยอด (shoot tips) พบว่าในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมและไม่เติม casein hydrolyzate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดคัลลัสอยู่ในช่วง 70-90 เปอร์เซ็นต์ และให้ขนาดคัลลัสดีที่สุด คือ 0.24, 0.28 และ 0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ อีกทั้งคัลลัสมีลักษณะกลมเกาะกลุ่มกันหนาแน่นขนาดเล็กสีขาว (nodular callus) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาในไผ่ *D. hamaltonii* ที่ได้ทำการศึกษาศักยภาพการเกิดคัลลัสจากชิ้นส่วนบริเวณปลายยอด พบว่าในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติม casein hydrolyzate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, L-proline 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ L-glutamine 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการชักนำให้เกิดคัลลัสสูงสุด และคัลลัสมีลักษณะกลมเกาะกลุ่มกันหนาแน่น (Zang et al., 2016)

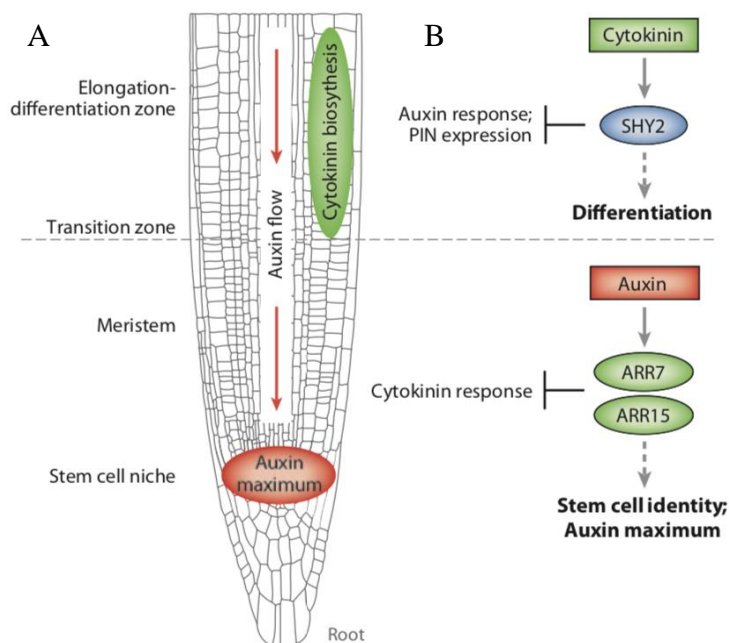
นอกจากนี้ยังมีการศึกษาศักยภาพการชักนำให้เกิดคัลลัสในไผ่ *D. hamaltonii* โดยทำการเปรียบเทียบสูตรอาหาร 4 ชนิด ดังนี้ MS, 1/2MS, NB และ HB และสารควบคุมการเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.3, 1.0, 3.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.0-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการเติม proline, glutamine และ casein hydrolyzate อย่างละ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดคัลลัสได้ดีที่สุด และคัลลัสมีลักษณะเป็นกลุ่มยึดเกาะกันแน่น ทั้งนี้ยังพบว่าในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร Kn ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการแตกยอดดีที่สุด (89.5 เปอร์เซ็นต์) (N. Zhang et al., 2010)

1.7 การศึกษาสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอดของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” พบว่าในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต IBA และ NAA ความเข้มข้นละ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยลักษณะรากเรียวยาว และในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน แต่ลักษณะรากอวบกว่า โดยทั้งสองสูตรนี้เมื่อเริ่มเกิดรากยอดจะมีลักษณะเหี่ยวเฉาและตายในที่สุด แต่รากมีการเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยในไผ่ *D. asper* โดยทำการชักนำให้เกิดรากจากกลุ่มยอดเป็นเวลา 45 วัน ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต NAA ความเข้มข้น 3.67 ไมโครโมลาร์ (0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 14.76 ไมโครโมลาร์ (3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ยประมาณ 6 รากต่อกลุ่มยอด และความยาวเฉลี่ย 3.06 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถเกิดรากได้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IBA เป็น 14.76 ไมโครโมลาร์ (3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถเกิดรากได้สูงขึ้นไปเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น IBA สูงขึ้นจากนี้พบว่าจะไม่มีการเกิดรากและกลุ่มยอดตาย (H. Nadha et al., 2013) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษานี้พบว่าในไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 1.0-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

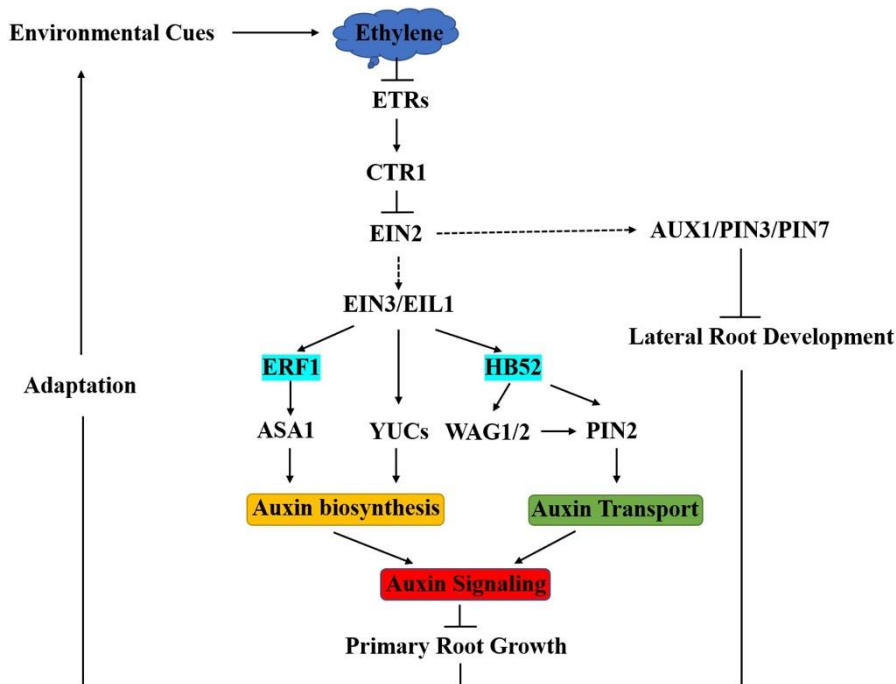
นอกจากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแล้วยังมีการศึกษาการชักนำให้เกิดรากในไผ่ *D. hamiltonii* จากกลุ่มยอดจำนวน 3-5 ยอด ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากสูงถึง 93 เปอร์เซ็นต์ (Agnihotri et al., 2009) อีกทั้งยังมีการศึกษาในไผ่ *D. lariflorus* สามารถชักนำให้เกิดรากได้ประมาณ 73 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร 1/2MS ที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 1 เดือน (Ye et al., 2017) จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไผ่แต่ละสปีชีส์ถึงแม้จะอยู่ในสกุลเดียวกันก็มีความแตกต่างกันในการชักนำให้เกิดรากทั้งชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตรวมถึงสูตรอาหาร เช่น ในไผ่บางสปีชีส์สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีใน

อาหารสูตร MS แต่บางสปีชีส์สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีในอาหารสูตร 1/2MS แต่ทั้งนี้แล้วสารควบคุมการเติบโตกลุ่มออกซินจัดเป็นปัจจัยสำคัญในการชักนำให้เกิดราก และอัตราส่วนกลุ่มออกซินต่อไซโทไคนินที่สูงจะช่วยในการสร้างรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Vanneste and Friml, 2009; Vanstraelen and Benková, 2012) โดยการสร้างรากพิเศษ (adventitious root) เป็นขั้นตอนในการขยายพันธุ์พืชและเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนซึ่งได้รับผลกระทบจากหลายปัจจัย กระบวนการพัฒนารากแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การชักนำให้เกิดราก (root induction) รากเริ่มต้น (root initiation) รากที่ยื่นออกมา (root protrusion) ซึ่งฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินเป็นกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการพัฒนาของราก (Han et al., 2009) โดยในรากจำเป็นต้องมีออกซินสูงในบริเวณ stem cell niche สำหรับการสร้างเนื้อเยื่อเจริญ ส่วนยีนที่สังเคราะห์ไซโทไคนินจะแสดงออกบริเวณ elongation-differentiation เพื่อช่วยให้เซลล์เนื้อเยื่อเจริญมีการแบ่งตัวและยืดยาว ดังแสดงในรูปที่ 38A การตอบสนองของไซโทไคนินในส่วนของเนื้อเยื่อเจริญจะถูกระงับเมื่อออกซินไปกระตุ้น ARR7 และ ARR15 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการส่งสัญญาณของไซโทไคนินทำให้มีออกซินปริมาณสูง ขณะที่บริเวณ elongation-differentiation การตอบสนองของออกซินจะถูกระงับเมื่อไซโทไคนินไปกระตุ้น SHY2 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการตอบสนองของออกซิน ดังนั้นขนาดของเนื้อเยื่อเจริญจึงถูกควบคุมโดยผลของออกซินและไซโทไคนินในบริเวณ meristematic และ differentiation ของราก ดังแสดงในรูป 38B (Chapman and Estelle, 2009)



รูปที่ 38 ลักษณะรากและทิศทางการกระจายของออกซิน (A) การตอบสนองของออกซินและไซโทไคนิน (B) ที่มา: Chapman and Estelle, (2009)

จากการศึกษานี้พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดรากค่อนข้างต่ำอาจเนื่องมาจากระหว่างการพัฒนาเนื้อเยื่อใฝ่ซางหม่นในเขตทดลองนั้นพืชเกิดการปล่อยเอทิลีนซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเกิดรากกล้าโดยข้อคือ เมื่อสิ่งแวดล้อมกระตุ้นให้พืชสังเคราะห์เอทิลีน จากนั้นเอทิลีนจะเข้าจับกับตัวรับ ETR เพื่อไปยับยั้งทำงานของ CTR1 ซึ่งเป็นตัวระงับการทำงานของ EIN2 แต่เมื่อ EIN2 ถูกปล่อยออกมาโดย CTR1 มันจะสามารถถูกตัดออกแล้วช่วยทำให้ EIN3/EIL1 มีความเสถียรขึ้นนำไปสู่การกระตุ้น ERF1 และ HB52 ซึ่งทำหน้าที่เป็น crosstalk nodes ระหว่างเอทิลีนและออกซิน โดยเอทิลีนเป็นตัวยับยั้งการเกิดรากแก้ว (primary root) เนื่องจากควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ออกซิน การขนส่ง และการรับส่งสัญญาณ ทั้งนี้การที่เอทิลีนภายในต้นพืชเพิ่มขึ้นจะช่วยเพิ่มการขนส่งออกซินและลดการเกิดรากแขนง (lateral root) โดยขึ้นอยู่กับ AUX1, PIN3 และ PIN7 ส่วนการควบคุมกลไกการตอบสนองของการเจริญเติบโตของรากถูกควบคุมโดย ERF1 และ HB52 ดังแสดงในรูปที่ 39 (Xu et al., 2020)



รูปที่ 39 กลไกการทำงานของออกซินที่ส่งผลต่อการส่งสัญญาณออกซิน ที่มา: Xu et al. (2020)

2. การศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” เมื่อทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” โดยการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD ของต้นไผ่ที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (S1.1-S5.3) กับลายพิมพ์ของต้นแม่ที่เก็บจากแปลงปลูก (T1-T5) ในการเพิ่มจำนวนต้นไผ่ที่เพาะเลี้ยงใช้วิธีการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณที่สามารถเจริญเติบโตและมีลักษณะที่ดีในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บยอดที่เจริญขึ้นใหม่ทุก 3 สัปดาห์ รวมทั้งหมด 8 subcultures เพื่อนำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ภายหลังจากศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก RAPD ไพโรมอร์รวม 7 ไพโรมอร์ (OPF2, OPF7, OPF14, OPF15, OPW1, OPW3 และ OPW10) โดยพิจารณาจากแถบที่ปรากฏชัดเจนและทำซ้ำได้ พบว่าไพโรมอร์ที่เลือกใช้สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนโดยมีจำนวนแถบ 4-7 แถบ และเมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นแม่ที่เก็บจากแปลงพบว่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งให้เห็นว่าต้นไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” ที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใน 8 subcultures มี

พันธุกรรมไม่แตกต่างจากต้นแม่ที่เก็บจากแปลงปลูกหรือกล่าวได้ว่า มีความเสถียรทางพันธุกรรม (genetics stability)

ความเสถียรทางพันธุกรรมของต้นไผ่ที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่พบในการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ S. R. Singh et al. (2013b) ที่ศึกษาสายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นไผ่ *D. asper* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนถึง 30 subcultures และนำออกปลูกจนมีอายุ 1-2 ปี ด้วยเทคนิค RAPD เปรียบเทียบกับต้นแม่โดยใช้ RAPD ไพโรมอร์จำนวน 22 ชนิด ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 6.6 แถบต่อไพโรมอร์ (ขนาดแถบอยู่ระหว่าง 200-3,000 คู่เบส) และพบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำยอดจากตาข้างของกิ่งแขนงมีความเสถียรทางพันธุกรรมโดยมีสายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกับต้นแม่ทุกประการ

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ *D. hamiltonii* ที่ทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำให้เกิดตาข้างจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 3.0 ไมโครโมลาร์ (0.66 มิลลิกรัมต่อลิตร) และย้ายลงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 1.5 ไมโครโมลาร์ (0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ความเข้มข้น 56 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดทิวคูณ จากนั้นเก็บส่วนยอดต่างๆ 3 subcultures เริ่มตั้งแต่ subculture ครั้งที่ 3 จนถึงครั้งที่ 30 รวมทั้งต้นที่นำออกปลูกในโรงเรือนและในแปลงอายุ 1-2 ปี เปรียบเทียบกับต้นแม่ที่เก็บจากแปลงโดยใช้เทคนิค RAPD ซึ่งไพโรมอร์ที่ปรากฏแถบได้ชัดเจนมีจำนวน 23 ชนิด จากทั้งหมด 25 ชนิด ที่นำมาคัดเลือกและพบว่าสายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับต้นแม่ทุกประการ โดยมีจำนวนแถบตั้งแต่ 3 แถบ (OPO6) ถึง 11 แถบ (OPJ4 และ OPE16) และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 7 แถบต่อไพโรมอร์ โดยมีขนาดแถบอยู่ในช่วง 200-3,000 คู่เบส (S. R. Singh et al., 2013a) และการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ *D. membranaceus* โดยทำการตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นเทียบกับดีเอ็นเอจากต้นที่เก็บจากแปลงปลูกด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพโรมอร์ที่คัดเลือกได้จำนวน 30 ชนิด (OPA, OPO และ OPT) จากทั้งหมด 73 ชนิด พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 2.43 แถบต่อไพโรมอร์ ขนาดแถบอยู่ในช่วง 250-1,500 คู่เบส (Brar et al., 2012) อีกทั้งยังมีการศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมในไผ่ *D. strictus* โดยทำการตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของดี

เอ็นเอจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเทียบกับดีเอ็นเอจากต้นที่เก็บจากแปลงปลูกด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้จำนวน 10 ชนิด จากทั้งหมด 24 ชนิด พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 5.8 แถบต่อไพรเมอร์ ขนาดแถบอยู่ในช่วง 240-1,455 คู่เบส และไม่พบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นแม่ของไม้ *D. strictus* (Goyal et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบว่าไม้ในสกุล *Bambusa* เช่น ไม้ *B. vulgaris* และ *B. bambos* ที่มีการชักนำการเกิดยอดทวีคูณจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 9 subculture เทียบกับต้นที่เก็บจากแปลงปลูกด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด พบว่าไม้ทั้ง 2 สปีชีส์ มีจำนวนแถบสูงกว่า 6 แถบขึ้นไปในทุกไพรเมอร์ และมีขนาดแถบอยู่ในช่วง 245-2,134 คู่เบส และ 240-2,505 คู่เบส ในไม้ *B. bambos* และ *B. vulgaris* ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นแม่ (Desai et al., 2019)

อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยที่พบ somaclonal variation ได้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อมีการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากโซมาติกเซลล์ (somatic embryogenesis) และการชักนำผ่านคัลลัสในพืชหลายชนิด โดยทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยชักนำให้เกิดคัลลัสเป็นและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 ปี พบว่าเกิด somaclonal variation เมื่อตรวจความเสถียรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 24 ไพรเมอร์ (Ngezahayo et al., 2007) และในต้น *Amorphophallus albus* ที่มีการชักนำให้เกิดยอดและรากผ่านคัลลัสพบว่าเกิด somaclonal variation และมีค่า %polymorphic เท่ากับ 20.8% ในจำนวน 20 ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD (J. Hu et al., 2008) รวมทั้งในไม้เช่นกัน เช่น ในไม้ *B. bambos* ที่มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยผ่าน somatic embryogenesis พบว่ามีความเสี่ยงสูงต่อความเสถียรทางพันธุกรรมเนื่องจากมีการเกิด somaclonal variation แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้น ไม่พบว่าเกิด somaclonal variation เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD (Anand et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในกล้วย (*Musa acuminata* L.) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 9 subcultures พบว่าเมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 18 ไพรเมอร์ จาก 30 ไพรเมอร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง (Sheidai, 2008) จากรายงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนของพืช

และชนิดของพืชที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลต่อการชักนำให้เกิด somaclonal variation ที่สามารถตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมได้ด้วยเทคนิค RAPD

ส่วนการคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับการนำไปใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 8 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPF5, OPF6, OPF9, OPW2, OPW5, OPW8, OPW17 และ OPW18 ที่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน โดยมีจำนวนแถบ 4-8 แถบ จากนั้นเมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไฟ้ชางหม่น “นวลราชินี” ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเทียบกับต้นในแปลง พบว่าแถบดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่แตกต่างจากแถบดีเอ็นเอของต้นแม่ที่เก็บจากแปลง และมีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 300->3,000 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในไฟ้ชางหม่น “นวลราชินี” ที่ชักนำจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นมีความเสถียรทางพันธุกรรมเมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยมีการเพิ่มอุณหภูมิในช่วง annealing เป็น 47 องศาเซลเซียส ทำให้ดีเอ็นเอจับกับไพรเมอร์ได้แน่นและมีความจำเพาะมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาการจำแนกพันธุ์ไฟ้ชางหม่นทางเศรษฐกิจในสกุล *Dendrocalamus* ที่ได้มีการใช้เทคนิค HAT-RAPD ซึ่งปรับอุณหภูมิขึ้นในช่วง annealing เป็น 48 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มความสามารถในการทำซ้ำของ RAPD และสามารถเข้าจับกับไพรเมอร์ที่จำเพาะยิ่งขึ้น (Rangsiruji et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามการนำเทคนิค HAT-RAPD มาใช้ในการตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมจัดเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทดสอบ

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าการขยายพันธุ์ไฟ้ชางหม่น “นวลราชินี” ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำจากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นไม่ทำให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรมเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 6 เดือน หรือ 8 subcultures ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผ่านการปรับสภาพโดยการย้ายลงอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเติบโตในบางรอบนั้นไม่ก่อให้เกิดความเครียดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อีกทั้งไม่ก่อให้เกิดแนวโน้มการแปรผันทางพันธุกรรม สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานเกี่ยวกับการตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมในไฟ้ชางหม่นที่เกิดยอดทวิคูณโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต BA ความเข้มข้น 4.4 ไมโครโม

ลาร์ (1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 1.16 ไมโครโมลาร์ (0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) ใน ใฝ่ *B. bambos* และ *D. membranaceus* รวมทั้งการชักนำการเกิดยอคตรีคุณบนอาหารสูตร MS ที่ ประกอบด้วยสารควบคุมการเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1.5 ไมโครโมลาร์ (0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในใฝ่ *D. hamiltonii* พบว่าไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และมีความเสถียรทาง พันธุกรรมเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR (Anand et al., 2013; Brar et al., 2012; S. R. Singh et al., 2013a) แต่เนื่องจากการทำการตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD ก่อนข้างมีตัวแปรควบคุมสูงจึงทำให้การทำซ้ำในบางครั้งอาจมีความแตกต่างจากครั้งแรกเล็กน้อย โดยแถบดีเอ็นเอบางแถบที่ค่อนข้างจางอาจไม่ปรากฏขึ้นเมื่อทำซ้ำครั้งที่ 2 แต่อย่างไรก็ตามในการ ทำซ้ำแต่ละครั้งแถบดีเอ็นเอของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปรากฏขึ้นจะตรงกับแถบของต้น แม่ที่เก็บจากแปลงปลูก ซึ่งให้เห็นว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยภายใน 8 subcultures มีความเสถียรทางพันธุกรรม

3. การวิเคราะห์สารพฤกษเคมีในสารสกัดจากใฝ่ 9 สปีชีส์

3.1 การศึกษาการสกัดใฝ่ขางหม่นในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาใฝ่ขางหม่น “นวลราชินี” ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน ได้แก่ 60%, 80%, 100% เอทานอล และ 100% เมทานอล พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีค่าสูงสุดเมื่อ สกัดด้วย 60% เอทานอล ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Shang และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าปริมาณ สารฟลาโวนอยด์แตกต่างกันในใฝ่คำที่สกัดด้วย 50%, 70% และ 100% เอทานอล โดยใฝ่คำที่ สกัดด้วยสารละลาย 50% และ 70% จะให้ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าเมื่อสกัดด้วย 100% เอทานอล อีกทั้ง Wroblewska และคณะ (2019) ได้เลือกใช้ 60% เอทานอล สำหรับการสกัดใฝ่ 5 สปีชีส์ เนื่องจากมีความเป็นขี้สูงและพบว่าให้ผลผลิตในการสกัดอยู่ในช่วง 7.6-22.2% นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด (10.665 mg/g) เมื่อสกัดยอดหน่อไม้ขมด้วย 60% เอทานอล (X. Hu et al., 2018) สารสกัดจากพืชมีปริมาณของสารทุติยภูมิกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง โดย สารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างเป็นวงแหวน (aromatic rings) และมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl groups) เป็นองค์ประกอบ สารประกอบฟีนอลิกในพืชประกอบด้วยกรดฟีนอลิก (phenolics acids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannins) สติลเบนส์ (stilbenes) และลิกแนน (lignans) ส่วนกลุ่ม

ของฟลาโวนอยด์เป็นฟีนอลเบนโซไพโรน (phenyl benzopyrones) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวน (flavones) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาวานอน (flavanones) ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และแอนโทไซยานิน (anthocyanins) โดยทั่วไป สารประกอบฟลาโวนอยด์มีการสลายตัวในธรรมชาติได้ช้ากว่าสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด ทำให้สารกลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างมาก

สำหรับใบไผ่จะมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงเพราะมีส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดคูมาริก (coumaric acid) กรดพาราคูมาริก (p-coumaric acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) และกรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ เช่น โอริเอนทิน (orientin) ไอโซโอริเอนทิน (isoorientin) ไวเทซิน (vitexin) และไอโซไวเทซิน (isovitexin) เป็นต้น (Nirmala et al., 2018) ซึ่งสารในกลุ่มของกรดฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และฟลาโวนอยด์นี้มีขั้วสูง ดังนั้นความมีขั้วของตัวทำละลายที่ใช้จึงมีผลต่อปริมาณสารพฤษเคมีที่สกัดได้ จากการศึกษาพบว่ากรดฟีนอลิกและแอนโทไซยานินมีการเรียงตัวฟีนอลิกโครงสร้างอย่างง่ายหรือมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ส่วนแทนนินเป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนหรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงทำให้ตัวทำละลายที่มีขั้วมีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ดีกว่าแทนนิน (Dai and Mumper, 2010) ดังนั้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจึงมีค่าสูงเมื่อสกัดด้วย 60% เอทานอล ซึ่งมีความเป็นขั้วสูง อีกทั้งเอทานอลจัดเป็นตัวทำละลายที่ดีและไม่เป็นพิษต่อพืชและมนุษย์อีกด้วย

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Zhu et al. (2018) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากใบไผ่ด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90% และ 100% โดยวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบต่างๆ ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าใบไผ่ที่สกัดด้วย 70% เอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิกรวม และสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด อีกทั้งเมื่อพิจารณากราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟลาโวนอยด์กับกรดฟีนอลิกรวมแสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่วนค่ากรดฟีนอลิกรวมมีค่าลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูงอาจจะเป็นประโยชน์สำหรับการสกัดสารประกอบฟลาโวนอยด์ในขณะที่ยอดส่วนที่เพิ่มขึ้นของน้ำช่วยในการสกัดกรดฟีนอลิกจากใบไผ่ โดยการค้นพบนี้ปรากฏชัดเจนในลำดับ

ความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่าเมทานอล นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบไม้ที่สกัดด้วย 100% เมทานอล มีค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์ และกรดฟีนอลิก รวมต่ำกว่าสารสกัดจากใบไม้ที่สกัดด้วย 50%-70% เอทานอล โดยทำการวิเคราะห์ค่าดังกล่าวด้วย เทคนิค HPLC อีกทั้งสารสกัดจากใบไม้ที่สกัดด้วย 100% เอทานอล พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และกรดฟีนอลิกรวมต่ำกว่าสารสกัดจากใบไม้ที่สกัดด้วย 100% เมทานอล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าสารสกัดจากใบไม้ขางหม่นที่สกัดด้วย 60% เอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ 80% เอทานอล, 100% เมทานอล และ 100% เอทานอล ตามลำดับ

3.2 การศึกษาสารพฤกษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระของการสกัดใบไม้ทั้ง 9 สปีชีส์ ด้วย สารละลายเอทานอล

จากการศึกษาสารพฤกษเคมีในสารสกัดใบไม้ทั้ง 9 สปีชีส์ ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล พบว่า สารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดในใบไม้ปักกิ่งอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมา ได้แก่ ใบน้ำเต้า ใบดำ ใบเหลือง และใบขางหม่น อีกทั้งเมื่อวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจาก ใบไม้ทั้ง 9 สปีชีส์ ยังพบว่าในใบไม้ปักกิ่งมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาได้แก่ ใบขางหม่น ใบรวก ใบกิมซุง ใบเลี้ยง ใบดำ ใบเหลือง ตามลำดับ ทั้งนี้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับใบไม้แต่ละชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในสารสกัดจากใบไม้สกุล *Phyllostachys* จำนวน 20 สปีชีส์ ซึ่งทำการสกัดใบไม้ด้วยสารละลาย 80% เอทานอล พบว่าสารสกัดจากใบไม้ทั้ง 20 สปีชีส์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในช่วง 12.3767–31.8915 mg/g และ 8.963–28.0614 mg/g ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาได้ทำการเปรียบเทียบ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในใบไม้สกุล *Phyllostachys* แสดงให้เห็นว่าใบไม้ในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกันจะมีปริมาณสารสองกลุ่มนี้แตกต่างกัน และ นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ในใบไม้ต่างชนิดกันมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ทั้งนี้จากการศึกษาดังกล่าวนี้ยังพบว่าใบไม้ที่ต่างชนิดกันจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและ

สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมแตกต่างกันแม้ว่าจะปลูกในสภาพที่คล้ายคลึงกันก็ตาม (C. J. Hu et al., 2012)

นอกจากนี้ในการศึกษานี้ได้วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยแสดงผลเป็นค่า TEAC และ IC50 ซึ่งถ้ามีค่า TEAC สูงสุดจะมีค่า IC50 ต่ำสุด ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงของสารสกัดจากใบไผ่ทั้ง 9 สปีชีส์ มีค่า TEAC แตกต่างกัน โดยค่า TEAC ของสารสกัดจากใบไผ่ปักกิ่ง ไผ่ดำ และไผ่ชางหม่น มีค่าสูงสุด ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าในไผ่ 3 สปีชีส์ นี้มีปริมาณสารพฤกษเคมี ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกรวม สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานินในปริมาณสูง จากงานวิจัยของ Choi et al. (2018) ที่ได้มีการศึกษาสารโพลีฟีนอลโดยใช้สารละลายเอทานอลความเข้มข้นที่แตกต่างกันในการสกัดใบไผ่ *P. nigra* โดยพบว่าเมื่อสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80% จะมีปริมาณสารโพลีฟีนอล (0.18 ± 0.02 mg COAE/g DW) และสารฟลาโวนอยด์ (9.57 ± 0.37 mg QE/g DW) สูงสุด แต่เมื่อสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 100% พบว่าสารโพลีฟีนอลมีค่าลดลง (0.13 ± 0.02 mg COAE/g DW) และสารฟลาโวนอยด์ (8.64 ± 0.01 mg QE/g DW) มีค่าลดลงเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในไผ่ *Chusquea bambusoides* ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ แล้วพบว่าเมื่อสกัดด้วย 60% เอทานอลจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (59.53 ± 4.83 mg GAE/g DW) และสารฟลาโวนอยด์รวม (6.44 ± 0.25 mg QE/g DW) สูงที่สุด อีกทั้งยังมีค่า IC50 สูง (218.16 ± 34.56 µg/ml) อีกด้วย (Wróblewska et al., 2019) จากผลการศึกษาดังกล่าวอาจแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (เอทานอลความเข้มข้น 60-80%) สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกจากใบไผ่ได้ดีที่สุด โดยที่สารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวน่าจะเป็นสารในกลุ่ม phenolic acid (เช่น chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, coumaric acid และ caffeic acid) และสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ (เช่น isoorientin, orientin, vitexin และ isovitexin) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยและมีความสามารถในการละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (Ma et al., 2018; Shang et al., 2014) อย่างไรก็ตามยังมีรายงานในสารสกัดจากไผ่ *B. arundinacea* พบว่าเมื่อสกัดด้วย 100% เอทานอล มีค่าสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าเมื่อสกัดด้วย 50% เอทานอล (Soni et al., 2018) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเรื่องผลของชนิดพันธุ์ไผ่ วิธีการสกัดสารหรือความคลาดเคลื่อนบางประการของงานวิจัย

3.3 การศึกษาการจำแนกสารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ในสารสกัดจากใบไผ่ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC

จากการศึกษาสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์ โดยทำการวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ด้วยเทคนิค TLC พบว่าสารสกัดจากใบไผ่ปักกิ่ง ไผ่ดำ และไผ่ซางหม่น มีองค์ประกอบของฟลาโวนไกลโคไซด์ (flavone C-glycosides) ในปริมาณสูงกว่าไผ่ชนิดอื่นเมื่อเทียบด้วยความเข้มของแถบที่ปรากฏ ดังแสดงในรูปที่ 34 ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และพบว่าในสารสกัดจากใบไผ่ทั้ง 3 สปีชีส์ นี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง จากนั้นเมื่อทำการศึกษาการจำแนกสารฟลาโวนไกลโคไซด์ด้วยเทคนิค TLC ในไผ่ทั้ง 3 สปีชีส์ นี้ โดยเลือกใช้สารมาตรฐานทางการค้า 4 ชนิด ได้แก่ isoorientin, isovitexin, orientin และ vitexin พบว่ามีค่า R_f เท่ากับ 0.71, 0.76, 0.79 และ 0.85 ตามลำดับ จากผลของ TLC พบว่าในสารสกัดจากใบไผ่ปักกิ่ง ปรากฏแถบสีเหลืองเข้มของ isoorientin และ orientin ชัดเจน ขณะที่แถบของ isovitexin และ vitexin ปรากฏแถบสีเขียอ่อนค่อนข้างไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังปรากฏแถบที่มีค่า R_f ต่ำกว่า 0.71 ซึ่งเป็นค่าของ isoorientin ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีแถบต่ำกว่า isoorientin ได้แก่ สาร C-Hexosyl O-pentosyl luteolin ที่พบใน *Triticum aestivum* L. ด้วยเทคนิค TLC และยังพบว่าสาร C-Hexosyl O-pentosyl luteolin มีค่า retention time (RT) น้อยกว่า isoorientin ใน *D. oldhami* ด้วยเทคนิค HPLC (Kowalska et al., 2019; Z. Lv et al., 2012) นอกจากนี้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์แล้วยังพบว่ามีสารกลุ่ม phenolic acid ที่มีค่า RT น้อยกว่า isoorientin อีกด้วย โดยมีรายงานของ Jin et al. (2011) ที่ทำการศึกษาในไผ่สกุล *Phyllostachys* จำนวน 9 สปีชีส์ พบสาร chlorogenic acid และ caffeic acid มีค่า RT น้อยกว่า isoorientin เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ดังนั้นสารสกัดจากใบไผ่ปักกิ่ง ไผ่ดำ และไผ่ซางหม่น อาจมีสารในกลุ่มดังกล่าวเป็นองค์ประกอบซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษาการจำแนกสารฟลาโวนไกลโคไซด์ด้วยเทคนิค TLC ทำให้สามารถคัดเลือกชนิดไผ่ที่มีองค์ประกอบของสารกลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ที่มีปริมาณสูงได้ 3 สปีชีส์ คือ ใบไผ่ปักกิ่ง ไผ่ดำ และไผ่ซางหม่น เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนไกลโคไซด์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้สารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด คือ isoorientin, orientin, vitexin และ isovitexin พบว่ามีค่า retention

time เท่ากับ 18.12, 20.45, 31.05 และ 34.04 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 35a) โดยในไม้ปักกิ่งมีปริมาณองค์ประกอบของ orientin (6.68 $\mu\text{g/ml}$) และ vitexin (2.81 $\mu\text{g/ml}$) สูงกว่าไม้ซางหม่นและไม้ค้ำอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณองค์ประกอบของ isoorientin (2.18 $\mu\text{g/ml}$) และ isovitexin (2.05 $\mu\text{g/ml}$) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 36 ซึ่งผลการศึกษาเหล่านี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาการจำแนกสารฟลาโวนโกลโคไซด์ด้วยเทคนิค TLC และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lu et al. (2011) ที่ศึกษาการจำแนกสารประกอบฟลาโวนอยด์และกรดฟีนอลิกในสารสกัดจากใบไม้ด้วยเทคนิค HPLC โดยเทียบกับสารมาตรฐานสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสารประกอบฟลาโวนอยด์ (homoorientin, orientin, isovitexin และ vitexin) และกลุ่มกรดฟีนอลิก (chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid และ ferulic acid) ซึ่งผลการวิจัยพบว่าปรากฏพีคของสาร chlorogenic acid, caffeic acid, Homo-orientin, orientin, p-coumaric acid, isovitexin, vitexin และ ferulic acid โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 11.5 mg/ml และกลุ่มกรดฟีนอลิก เท่ากับ 4.2 mg/ml

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาสารสกัดในใบไม้ที่สกัดด้วย 70% เอทานอล โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกรวม 7 ชนิด ในช่วง RT จากน้อยไปมาก ปรากฏสารดังนี้ neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isoorientin, orientin, vitexin และ isovitexin ตามลำดับ (Zhu et al., 2018) ทั้งนี้ยังมีการศึกษาสารฟลูโวนอยด์ในสารสกัดจากใบไม้ *D. oldhami* และ *P. nigra* พบว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์ อาทิเช่น orientin, vitexin, isoorientin, isovitexin, luteolin, apigenin, tricetin, C-Hexosyl luteolin, O-rutinoside, apigenin และ vattariflavone เป็นต้น (Kim et al., 2009; Z.-L. Lv et al., 2012) จากรายงานวิจัยที่กล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าช่วง RT ที่นอกเหนือจากสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ isoorientin, orientin, vitexin และ isovitexin ที่พบในสารสกัดใบไม้ปักกิ่ง ไม้ค้ำ และ ไม้ซางหม่น อาจจะเป็นสารในกลุ่มดังกล่าวข้างต้น โดยจากการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าผลการศึกษาการจำแนกสารฟลาโวนโกลโคไซด์ด้วยวิธี HPLC ให้ผลสอดคล้องกับวิธีการจำแนกสารฟลาโวนโกลโคไซด์ด้วยเทคนิค TLC ดังนั้นหากไม่ได้มีความจำเป็นที่จะทราบปริมาณสารสำคัญที่มีค่าแม่นยำสูง การจำแนกฟลาโวนโกลโคไซด์ในสารสกัดจากใบไม้ด้วยเทคนิค TLC จึงจัดเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง และมีประสิทธิภาพ เหมาะสมแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อลดต้นทุนในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญได้



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 50X TAE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base	242 กรัม
Glacial acetic acid	57.1 กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม CTAB buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1 M Tris-hydrochloride Molecular biology grade (pH 8.0)	100 มิลลิลิตร
0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt (pH 8.0)	40 มิลลิลิตร
5 M NaCl	400 มิลลิลิตร
2% Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) High purity grade	20 กรัม
2% Polyvinylpyrrolidone K 15 (PVP) High purity grade (MW=40,000)	20 กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม 1 M TE ปริมาตร 1 ลิตร

Tris-hydrochloride Molecular biology grade (pH 8.0)	10 มิลลิลิตร
0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt (pH 8.0)	2 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมไพรเมอร์ 5 พิโกโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

100 pmol/μl primer	10 ไมโครลิตร
Ultrapure water (Serva, Germany)	190 ไมโครลิตร

การเตรียม dNTP 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

100 mM dATP	20 ไมโครลิตร
100 mM dTTP	20 ไมโครลิตร
100 mM dCTP	20 ไมโครลิตร

100 mM dGTP	20 ไมโครลิตร
Ultrapure water	920 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

- การเตรียม 10% Folin-Ciocalteu reagent
เปิด Folin-Ciocalteu ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะขวดสีชาหรือขวดทึบแสง และควรเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งที่ทำทดลอง
- การเตรียม 7.5% Sodium carbonate
ชั่ง Sodium carbonate (Na_2CO_3) 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid
เตรียมสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลาย gallic acid ใน 95% เอทานอล เมื่อละลายแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับความเข้มข้นตามช่วงที่ต้องการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อให้เหมาะสมกับการทดลอง

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric

- การเตรียม 10% Aluminium chloride
ชั่ง Aluminium chloride 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร (เมื่อทำปฏิกิริยาจะเกิดกลิ่นจุนควรเตรียมในตู้ดูดควัน)
- การเตรียม 1M Potassium acetate
ชั่ง Potassium acetate 4.9075 กรัม ละลายในเมทานอลปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร
- การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin
เตรียม Stock solution สาร Quercetin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ชั่ง Quercetin 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร) และทำการเจือจางเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานตามช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการทดลอง

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging

- การเตรียมสารละลาย DPPH

เตรียมสาร DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) น้ำหนักโมเลกุล 394.32 กรัมต่อโมล โดยชั่ง DPPH 12.5 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอลหรือเอทานอล 500 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะทึบแสง

- การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox

เตรียมสาร Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; $C_{14}H_{18}O_4$) น้ำหนักโมเลกุล 250.29 กรัมต่อโมล ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ชั่ง Trolox 12.5 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอลหรือเอทานอล 100 มิลลิลิตร)

การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินโดยวิธี pH-differential

- การเตรียม potassium chloride buffer ที่ค่า pH 1.0
ชั่ง potassium chloride (KCl) 1.86 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 1 ด้วย HCl (ควรใช้ความเข้มข้นของ HCl สูงๆ ในการปรับปริมาตร เพราะถ้าใช้ความเข้มข้น HCl ต่ำจะต้องใช้ปริมาณมาก)
- การเตรียม sodium acetate buffer ที่ค่า pH 4.5
ชั่ง sodium acetate 54.43 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 4.5 ด้วย HCl (ควรใช้ความเข้มข้นของ HCl สูงๆ ในการปรับปริมาตร เพราะถ้าใช้ความเข้มข้น HCl ต่ำจะต้องใช้ปริมาณมาก)

การจำแนกชนิดของสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)

- การเตรียมสารมาตรฐาน isoorientin
เตรียม stock solution สารมาตรฐาน isoorientin โดยละลายด้วยเมทานอล ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- การเตรียมสารมาตรฐาน orientin
เตรียม stock solution สารมาตรฐาน orientin โดยละลายด้วยเมทานอลต่อน้ำ (90:10 v/v) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- การเตรียมสารมาตรฐาน isovitexin

เตรียม stock solution สารมาตรฐาน isovitexin โดยละลายด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

- การเตรียมสารมาตรฐาน vitexin

เตรียม stock solution สารมาตรฐาน vitexin โดยละลายด้วยเมทานอลต่อน้ำ (90:10 v/v) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร





ภาคผนวก ข

แสดงปริมาณและแถบตีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD และ

HAT-RAPD

ตารางที่ S1 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอในไข่ซางหม่น “นวลราชินี” 5

ตัวอย่างจากต้นในแปลง (T1-T5) และต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (S1.1-S5.3)

ตัวอย่าง	Nucleic Acid (ng/μl)	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
ต้น 1 (T1)	1889.7	37.794	18.701	2.02	1.96
S1.1	5113.9	102.278	52.794	1.94	1.97
S1.2	4818.9	96.379	49.106	1.96	2.04
S1.3	1988.8	39.976	19.488	2.05	2.12
S1.4	2138.0	42.761	21.071	2.03	2.05
S1.5	1054.9	21.098	10.377	2.03	2.20
S1.6	1535.0	30.700	14.968	2.05	2.08
S1.7	3615.5	72.309	35.067	2.06	2.17
S1.8	1516.4	30.328	14.718	2.06	2.25
ต้น 2 (T2)	3974.3	79.486	38.989	2.04	2.04
S2.1	4400.9	88.018	44.024	2.00	2.09
S2.2	3574.3	71.487	35.040	2.04	2.16
S2.3	1591.8	31.835	15.750	2.02	2.18
S2.4	2948.3	58.966	28.915	2.04	2.20
S2.5	2200.3	44.007	22.029	2.00	2.09
S2.6	3015.0	60.299	29.478	2.05	2.16
S2.7	1743.6	34.872	16.810	2.07	2.07
S2.8	3263.1	65.261	31.552	2.07	2.10
ต้น 3 (T3)	3193.0	63.860	31.069	2.06	2.00

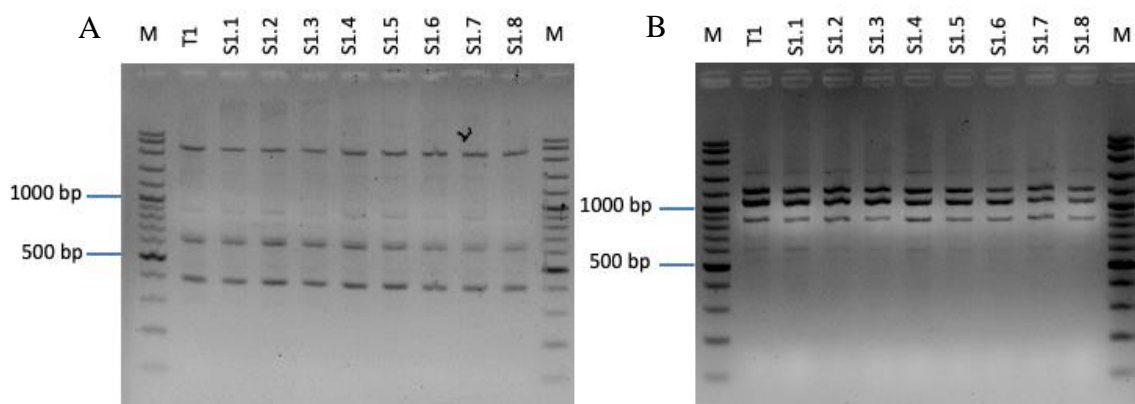
ตัวอย่าง	Nucleic Acid (ng/μl)	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
S3.1	4565.0	91.301	45.277	2.02	2.05
S3.2	3912.8	78.255	38.496	2.03	2.15
S3.3	1837.0	36.740	18.138	2.03	1.96
S3.4	2199.3	43.986	21.642	2.03	2.12
S3.5	2322.3	46.446	22.939	2.02	2.10
S3.6	2629.1	52.582	26.397	1.99	2.08
S3.7	4185.3	83.707	41.567	2.01	1.94
S3.8	2391.5	47.830	23.840	2.01	2.00
ต้น 4 (T4)	3080.0	61.600	29.996	2.05	2.08
S4.1	3603.3	72.066	35.150	2.05	2.12
S4.2	4579.9	91.597	45.889	2.00	2.09
S4.3	2466.0	49.319	24.646	2.00	1.97
S4.4	1929.9	38.597	19.119	2.02	2.10
S4.5	2073.6	41.472	20.459	2.03	1.99
S4.6	5198.8	103.976	53.484	1.94	1.94
ต้น 5 (T5)	4238.8	84.777	41.875	2.02	2.07
S5.1	3180.8	63.617	30.896	2.06	2.15
S5.2	4511.5	90.229	44.983	2.01	2.10
S5.3	1886.8	37.737	18.372	2.05	2.15

*หมายเหตุ SA.B โดย A คือ หมายเลขต้น B คือ จำนวนครั้งในการ subculture

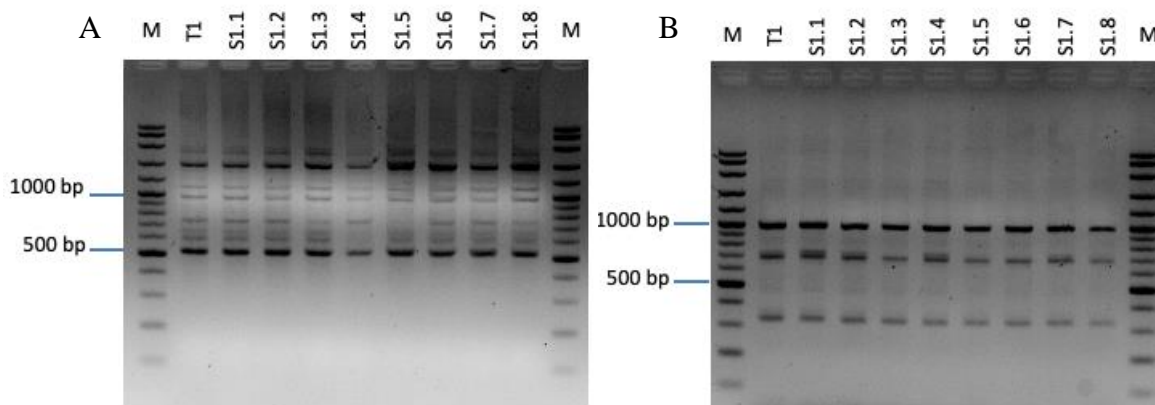
ตารางที่ S2 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ อุณหภูมิช่วง Annealing (°C) จำนวนแถบที่แสดงความต่าง (Polymorphic band) %Polymorphic และขนาดของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	จำนวน แถบ ดีเอ็นเอ	อุณหภูมิช่วง Annealing (°C)	จำนวนแถบที่ แสดงความต่าง (Polymorphic band)	%Polymorphic	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (คู่เบส)
OPF2	GAGGATCCCT	4	37	0	0	400-2,500
OPF5	CCGAATTCCC	7	47	0	0	300-3,000
OPF6	GGGAATTCGG	6	47	0	0	400-2,500
OPF7	CCGATATCCC	5	37	0	0	600-2,000
OPF9	CCAAGCTTCC	4	47	0	0	400-2,500
OPF14	TGCTGCAGGT	7	37	0	0	500-2,000
OPF15	CCAGTACTCC	5	37	0	0	300-2,000
OPW1	CTCAGTGTCC	4	37	0	0	300-2,500
OPW2	ACCCCGCCAA	5	47	0	0	300->3,000
OPW3	GTCCGGAGTG	7	37	0	0	500-2,500
OPW5	GGCGGATAAG	6	47	0	0	300-2,500
OPW8	GACTGCCTCT	6	47	0	0	300-2,500
OPW10	TCGCATCCCT	6	37	0	0	400-2,500
OPW17	GTCCTGGGTT	4	47	0	0	500-1,500
OPW18	TTCAGGGCAC	8	47	0	0	300-1,500
	รวม	84	-	0	0	-

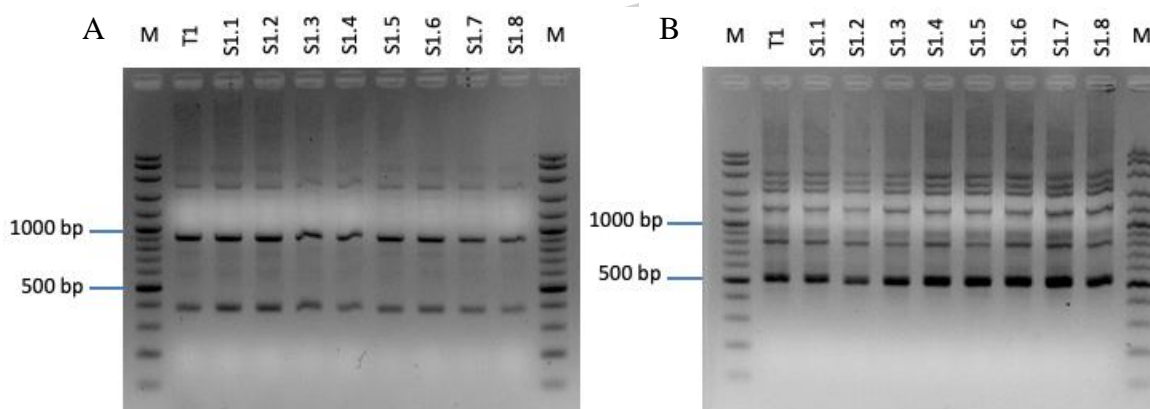
ตอนที่ 1



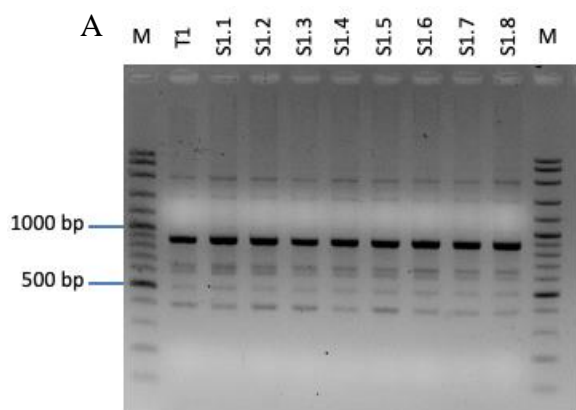
รูปที่ S1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF2 (A) และไพรเมอร์ OPF7 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



รูปที่ S2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF14 (A) และไพรเมอร์ OPF15 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

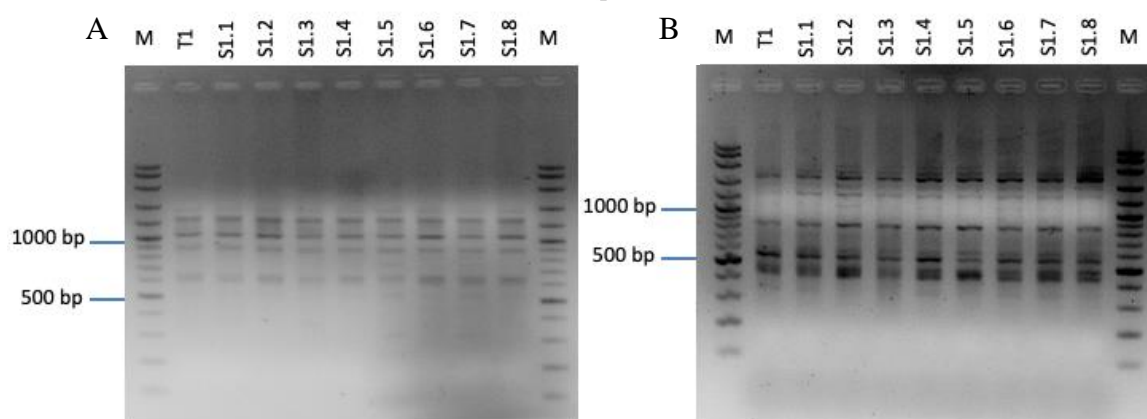


รูปที่ S3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW1 (A) และไพรเมอร์ OPW3 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



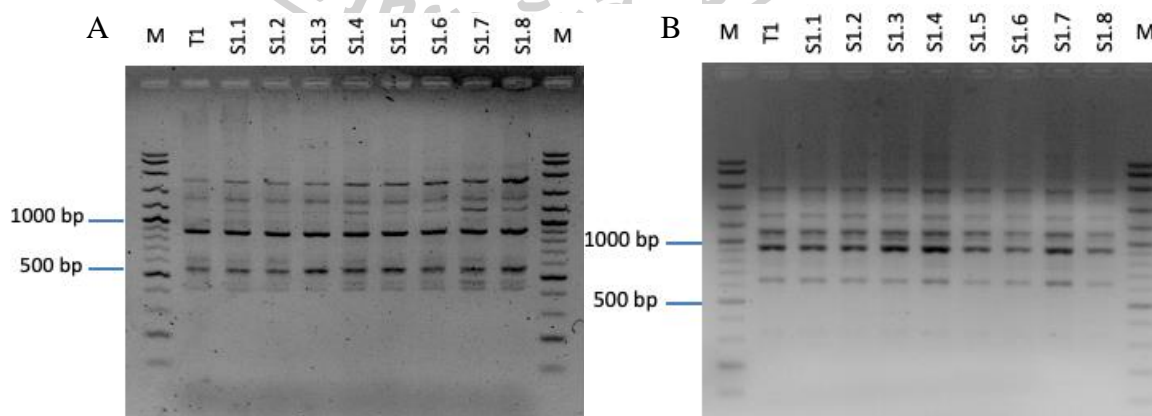
รูปที่ S4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW10

(A) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



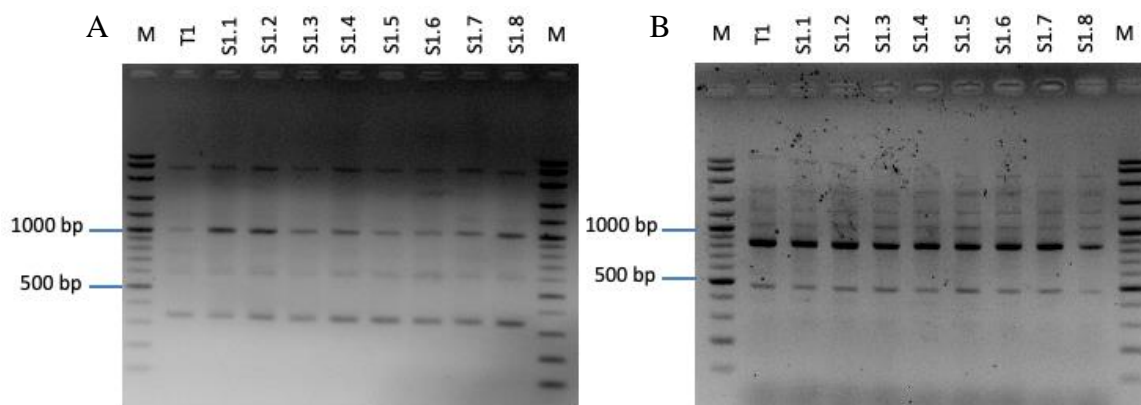
รูปที่ S5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์

OPF5 (A) และไพรเมอร์ OPF6 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

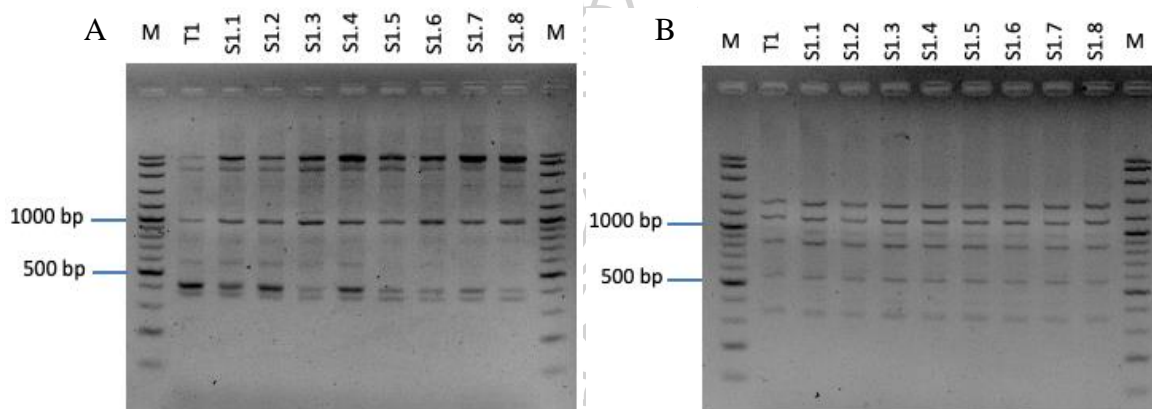


รูปที่ S6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์

OPF9 (A) และไพรเมอร์ OPW2 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

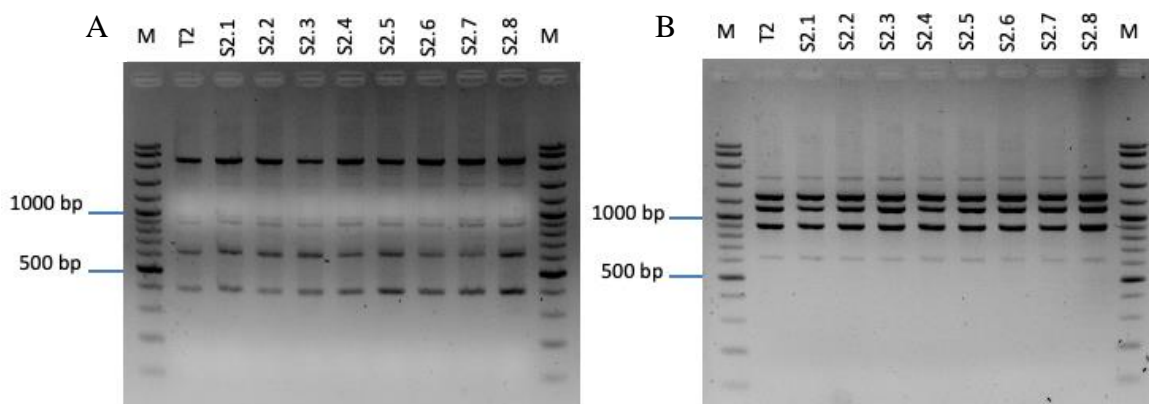


รูปที่ S7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW5 (A) และไพรเมอร์ OPW8 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



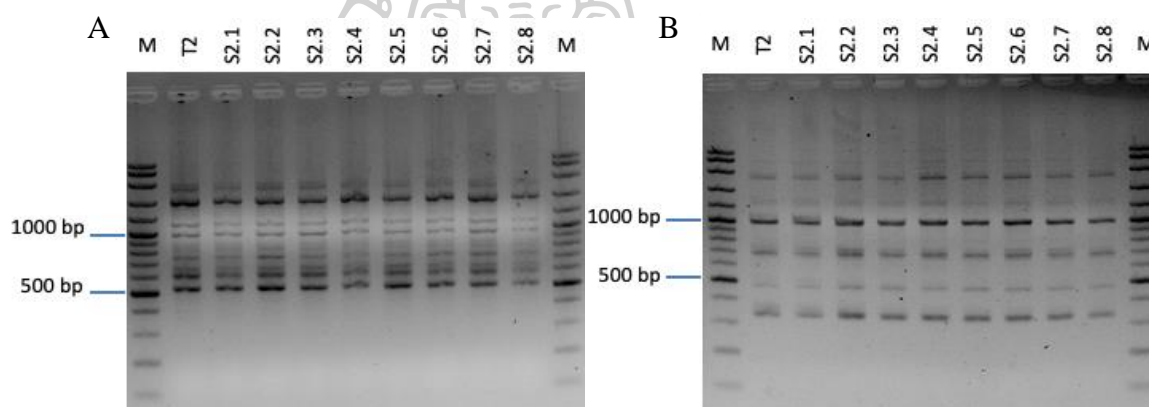
รูปที่ S8 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW17 (A) และไพรเมอร์ OPW18 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

ตอนที่ 2



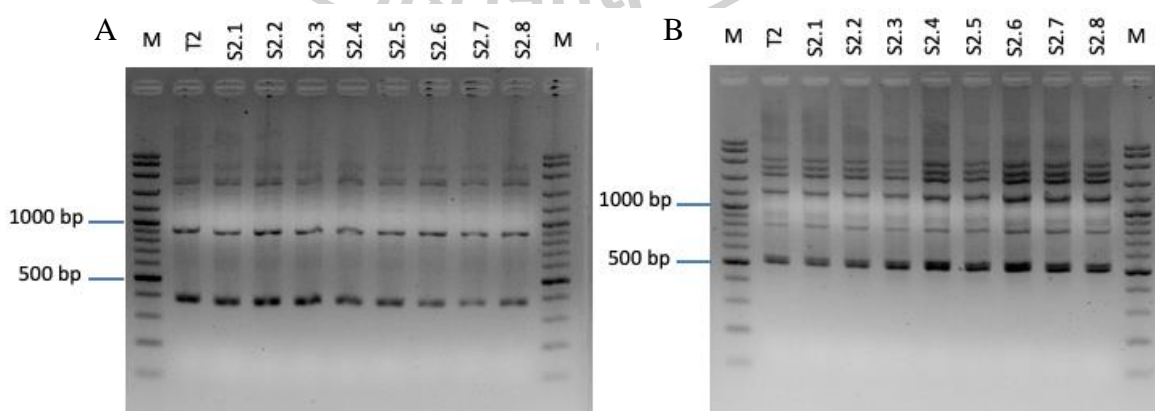
รูปที่ S9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF2

(A) และไพรเมอร์ OPF7 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



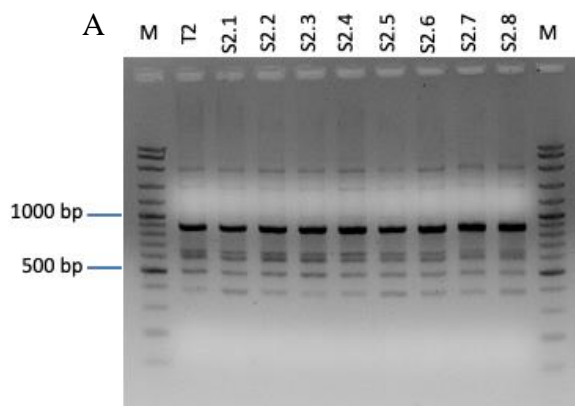
รูปที่ S10 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF14

(A) และไพรเมอร์ OPF15 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

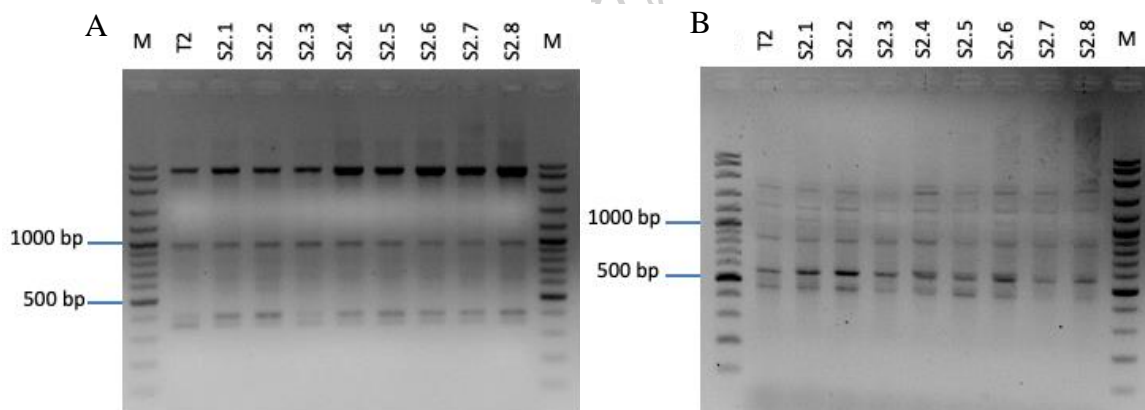


รูปที่ S11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW1

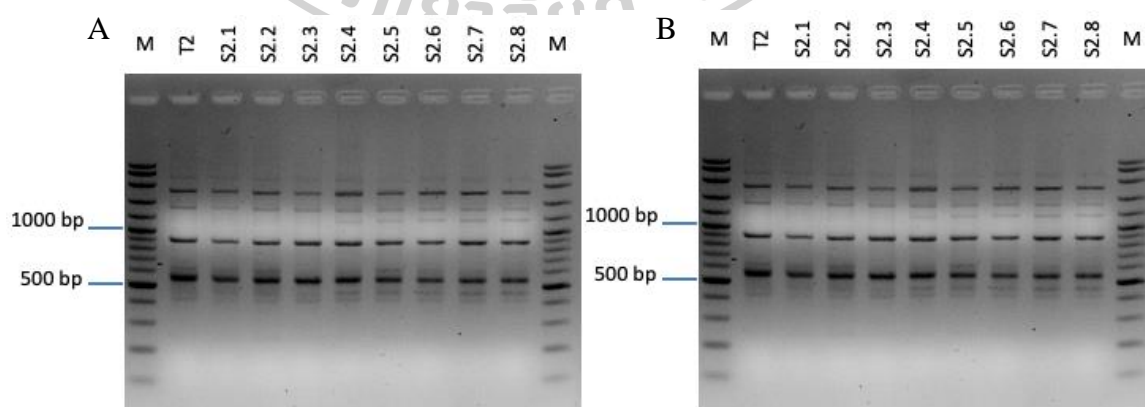
(A) และไพรเมอร์ OPW3 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



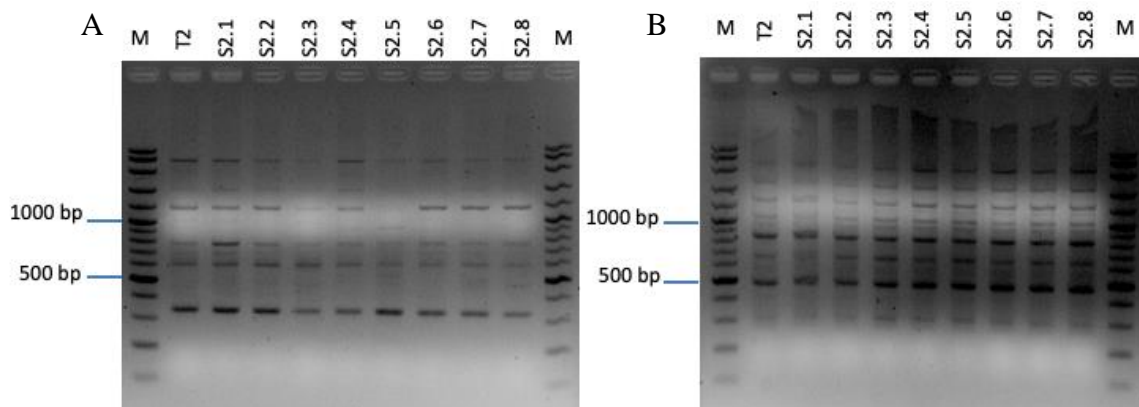
รูปที่ S12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW10
(A) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



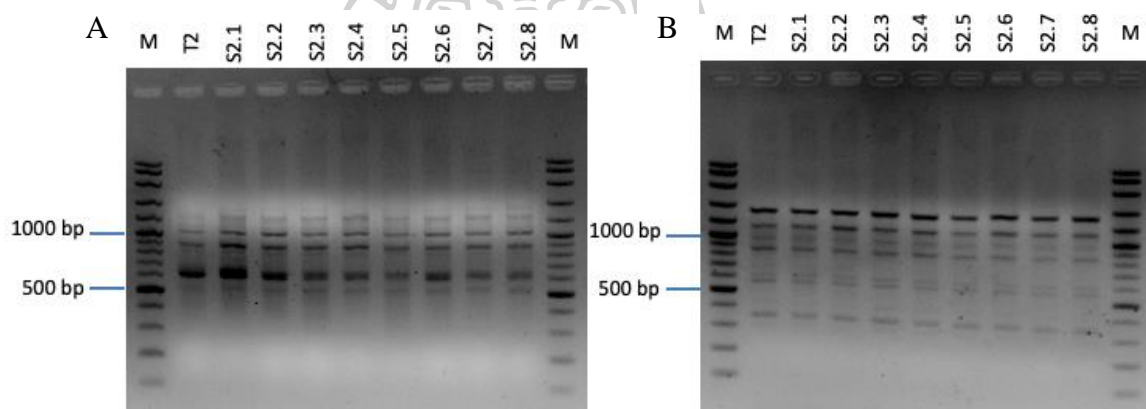
รูปที่ S13 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์
OPF5 (A) และไพรเมอร์ OPF6 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



รูปที่ S14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์
OPF9 (A) และไพรเมอร์ OPW2 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

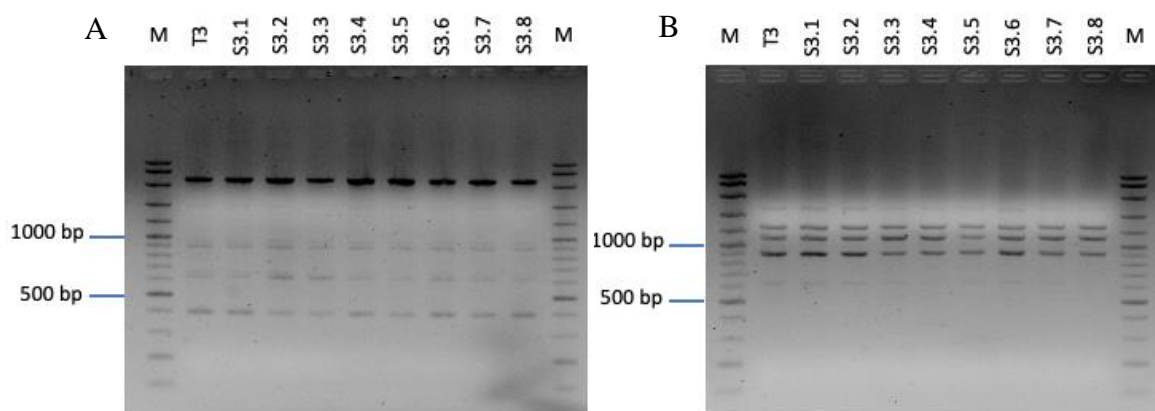


รูปที่ S15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW5 (A) และไพรเมอร์ OPW8 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



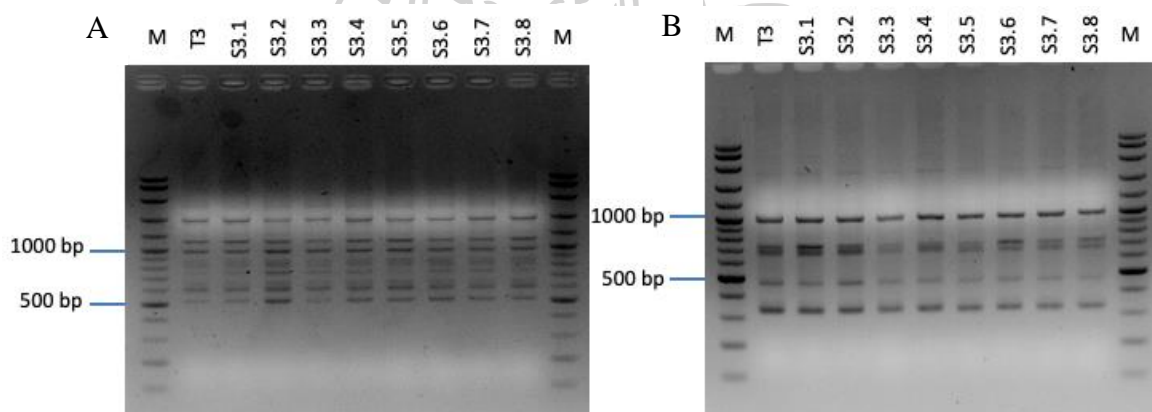
รูปที่ S16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW17 (A) และไพรเมอร์ OPW18 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

ตอนที่ 3



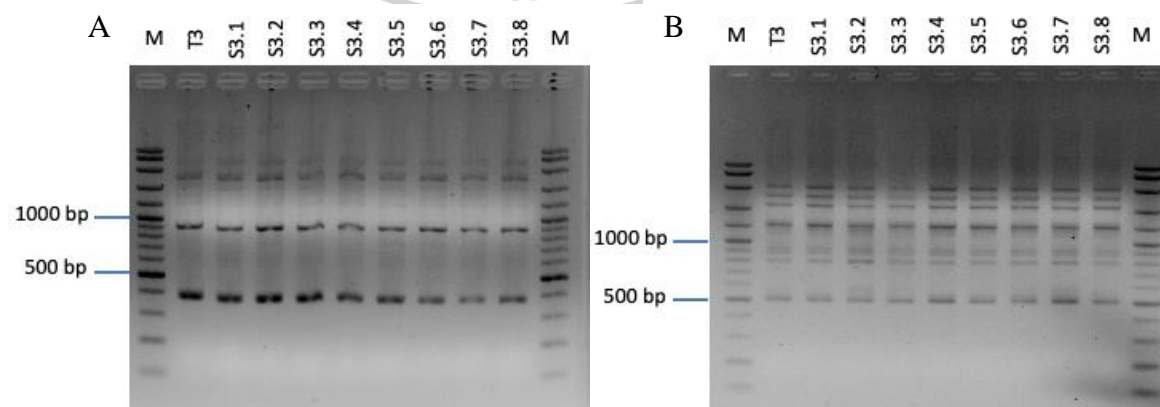
รูปที่ S17 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF2

(A) และไพรเมอร์ OPF7 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



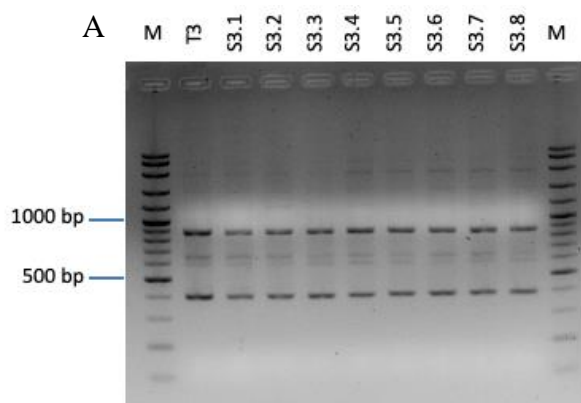
รูปที่ S18 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF14

(A) และไพรเมอร์ OPF15 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

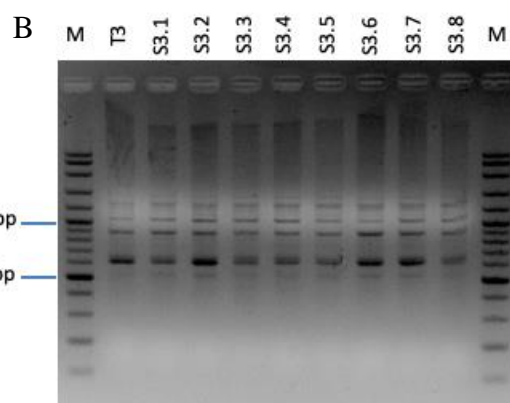
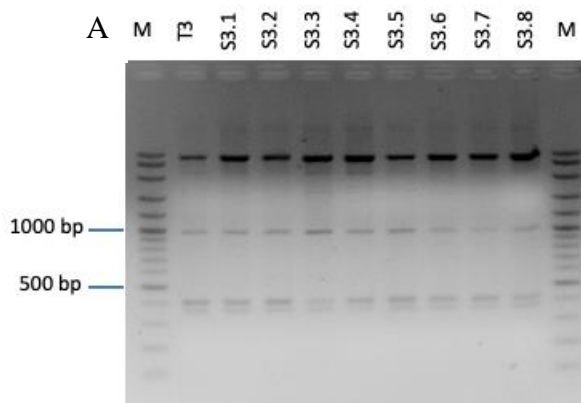


รูปที่ S19 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW1

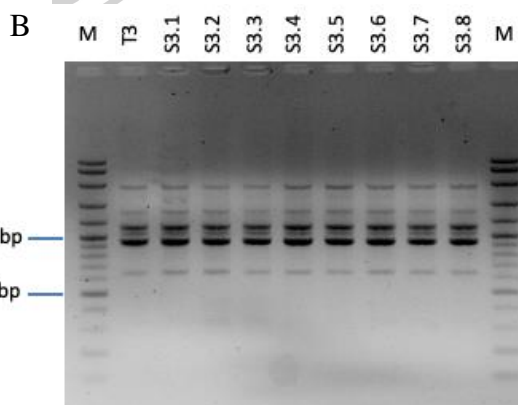
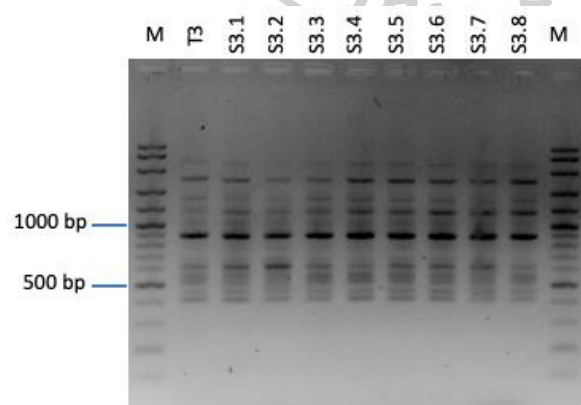
(A) และไพรเมอร์ OPW3 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



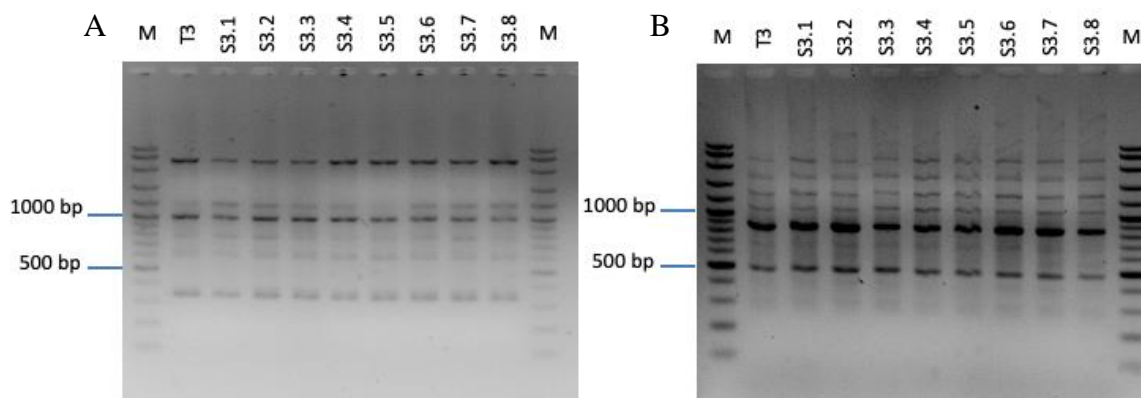
รูปที่ S20 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW10 (A) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



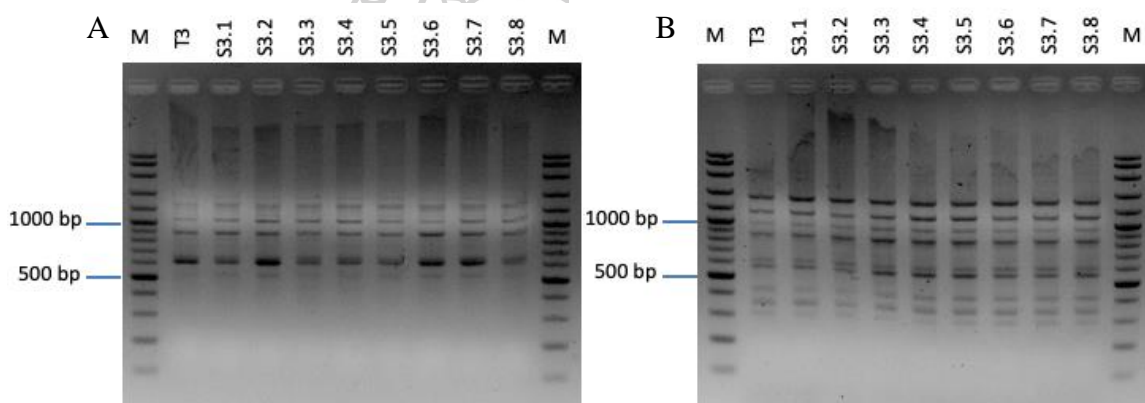
รูปที่ S21 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF5 (A) และไพรเมอร์ OPF6 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



รูปที่ S22 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF9 (A) และไพรเมอร์ OPW2 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

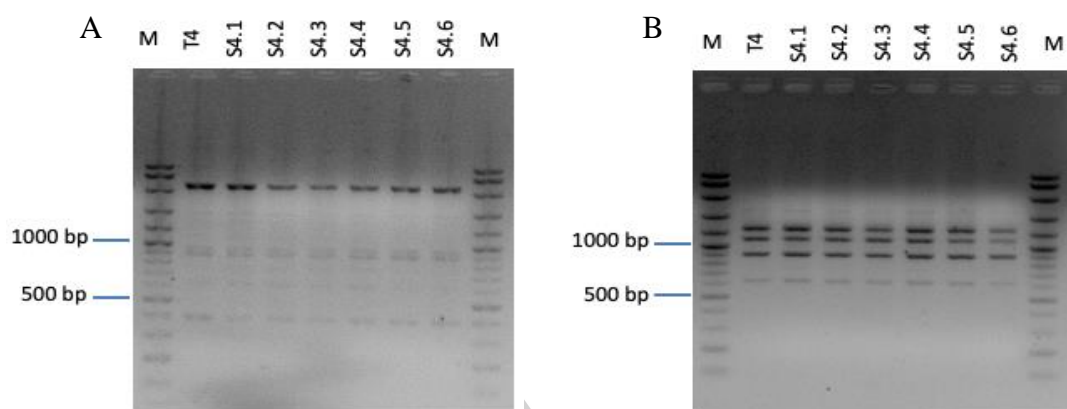


รูปที่ S23 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW5 (A) และไพรเมอร์ OPW8 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



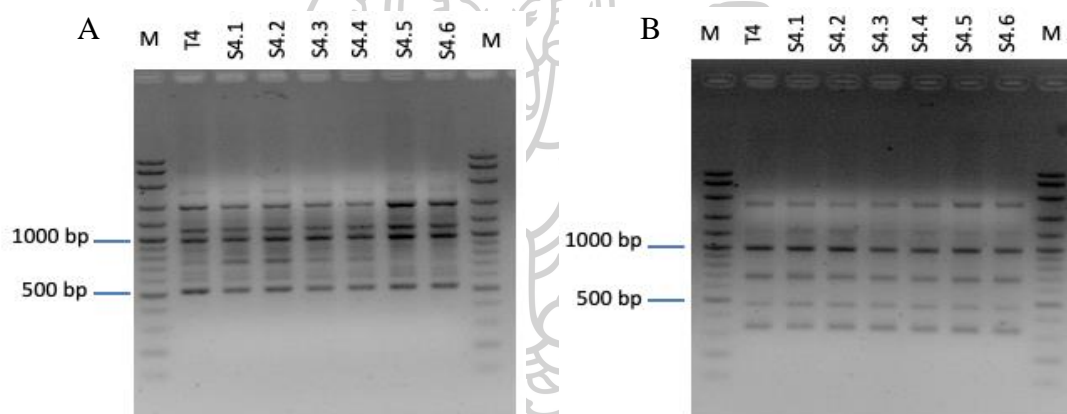
รูปที่ S24 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW17 (A) และไพรเมอร์ OPW18 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

รูปที่ 4



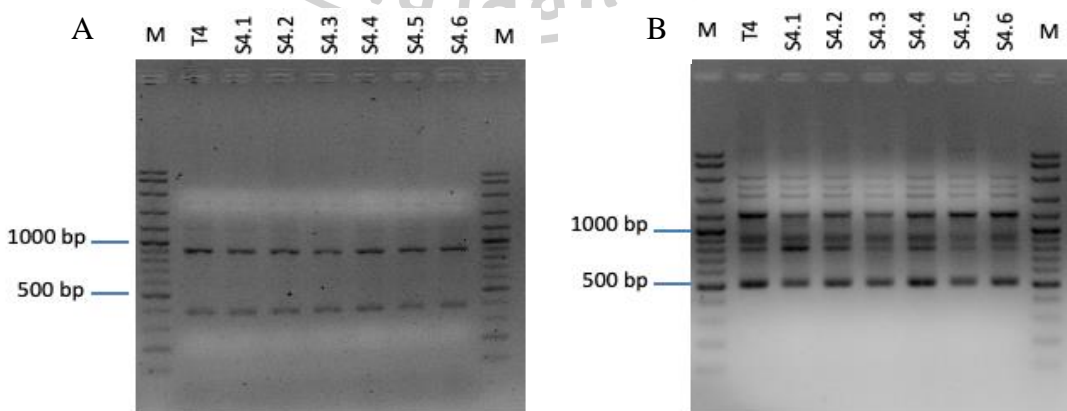
รูปที่ S25 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF2

(A) และไพรเมอร์ OPF7 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



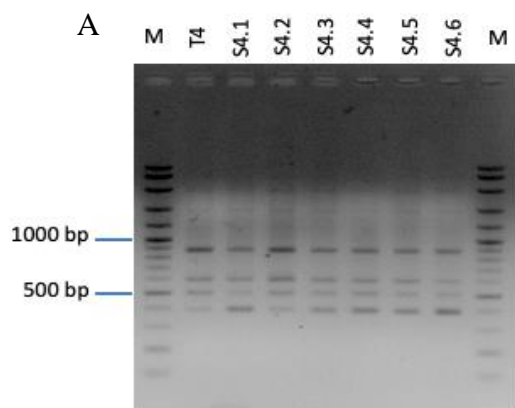
รูปที่ S26 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF14

(A) และไพรเมอร์ OPF15 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



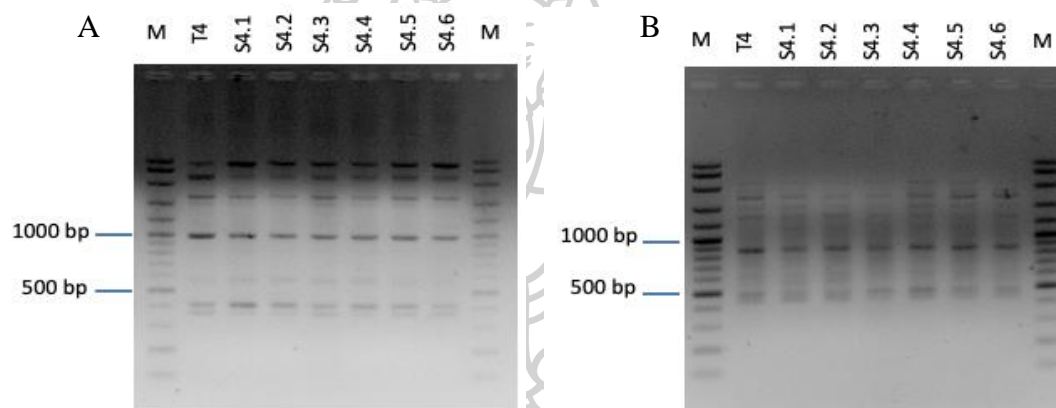
รูปที่ S27 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW1

(A) และไพรเมอร์ OPW3 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



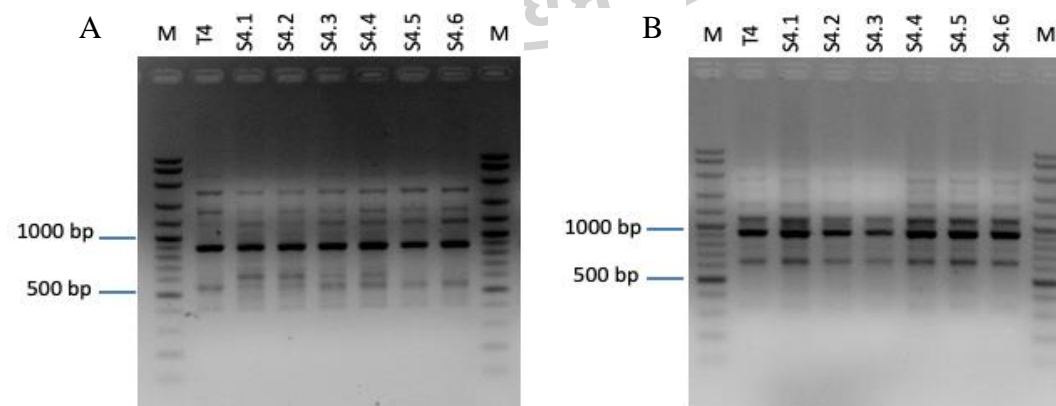
รูปที่ S28 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์

OPW10 (A) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



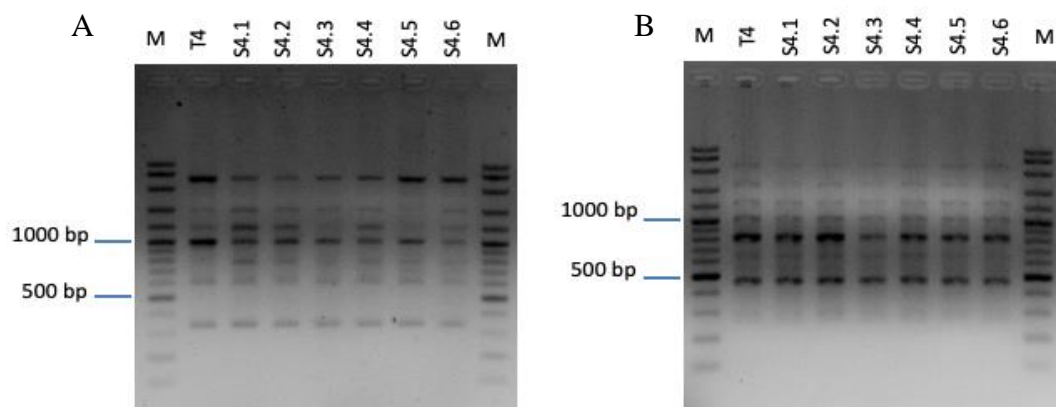
รูปที่ S29 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์

OPF5 (A) และไพรเมอร์ OPF6 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

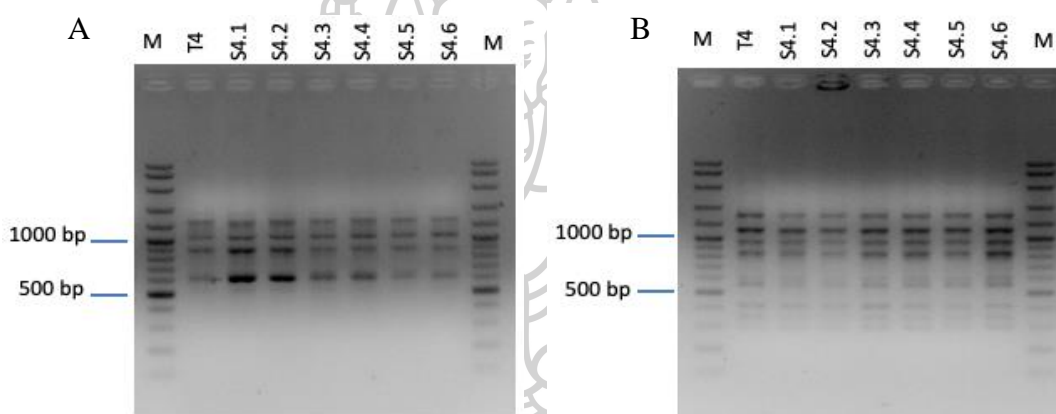


รูปที่ S30 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์

OPF9 (A) และไพรเมอร์ OPW2 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

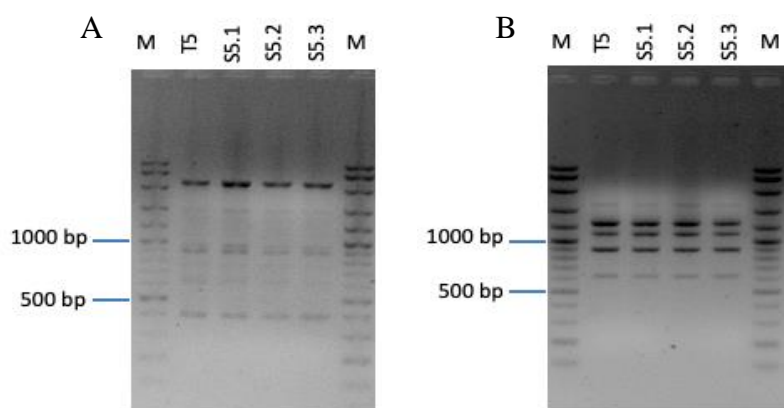


รูปที่ S31 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW5 (A) และไพรเมอร์ OPW8 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



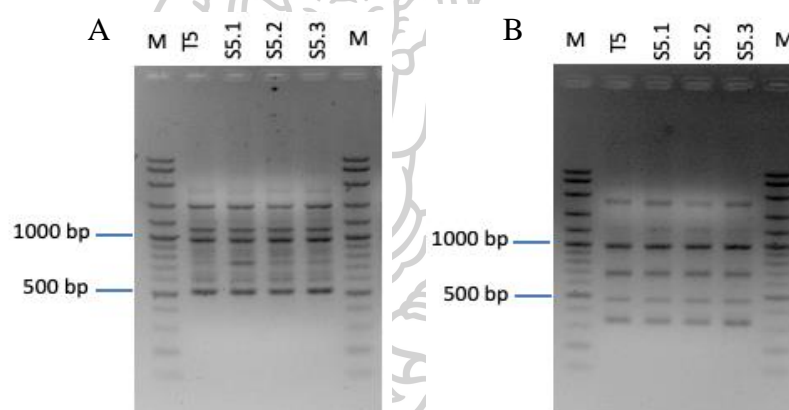
รูปที่ S32 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW17 (A) และไพรเมอร์ OPW18 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

ตอนที่ 5



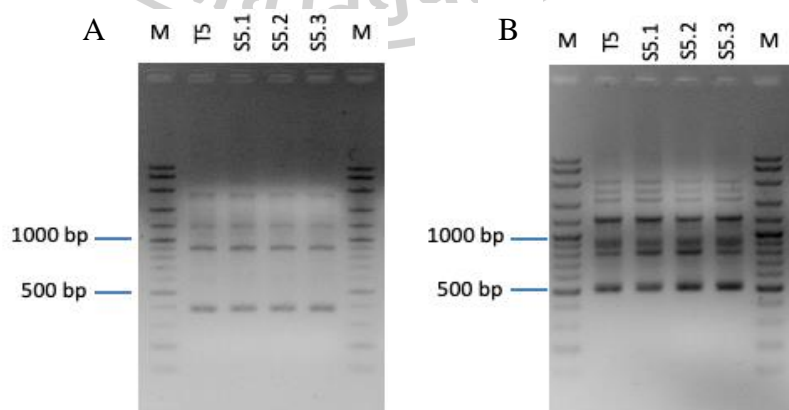
รูปที่ S33 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF2

(A) และไพรเมอร์ OPF7 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



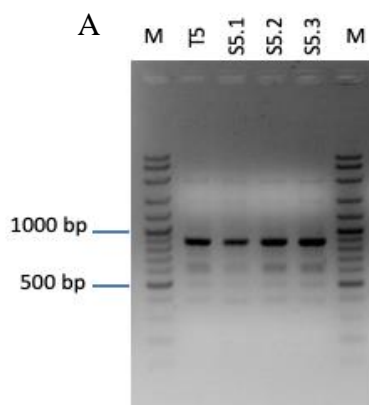
รูปที่ S34 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF14

(A) และไพรเมอร์ OPF15 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

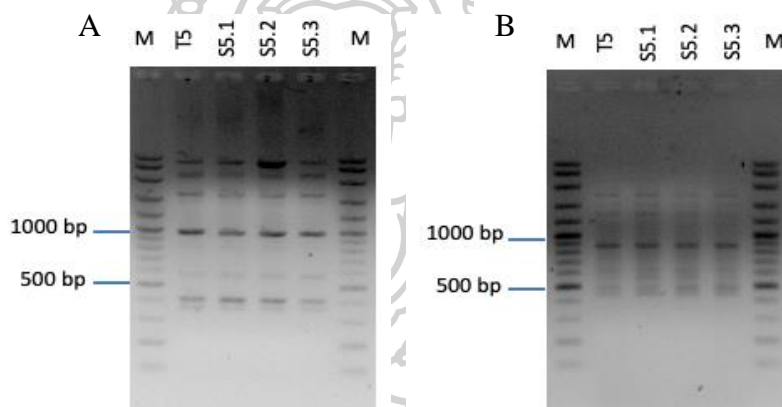


รูปที่ S35 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW1

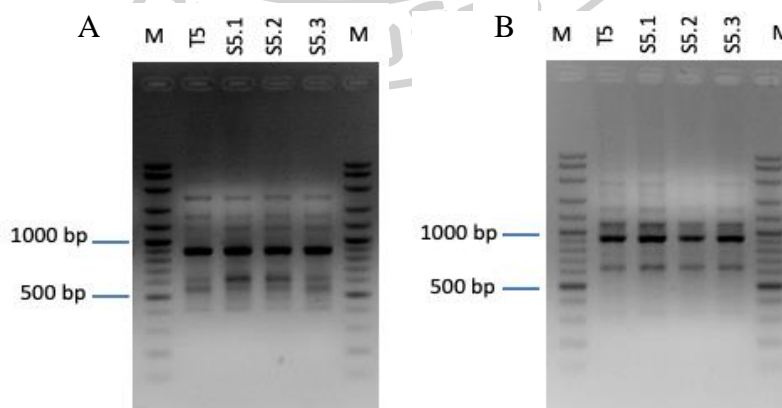
(A) และไพรเมอร์ OPW3 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



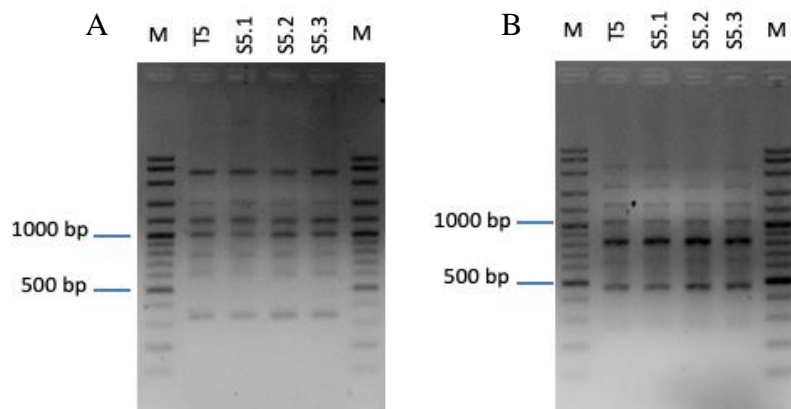
รูปที่ S36 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW10 (A) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



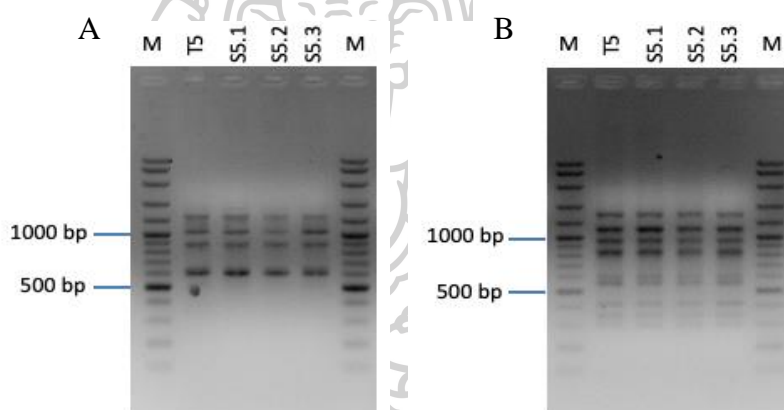
รูปที่ S37 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF5 (A) และไพรเมอร์ OPF6 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



รูปที่ S38 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPF9 (A) และไพรเมอร์ OPW2 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



รูปที่ S39 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW5 (A) และไพรเมอร์ OPW8 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



รูปที่ S40 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPW17 (A) และไพรเมอร์ OPW18 (B) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

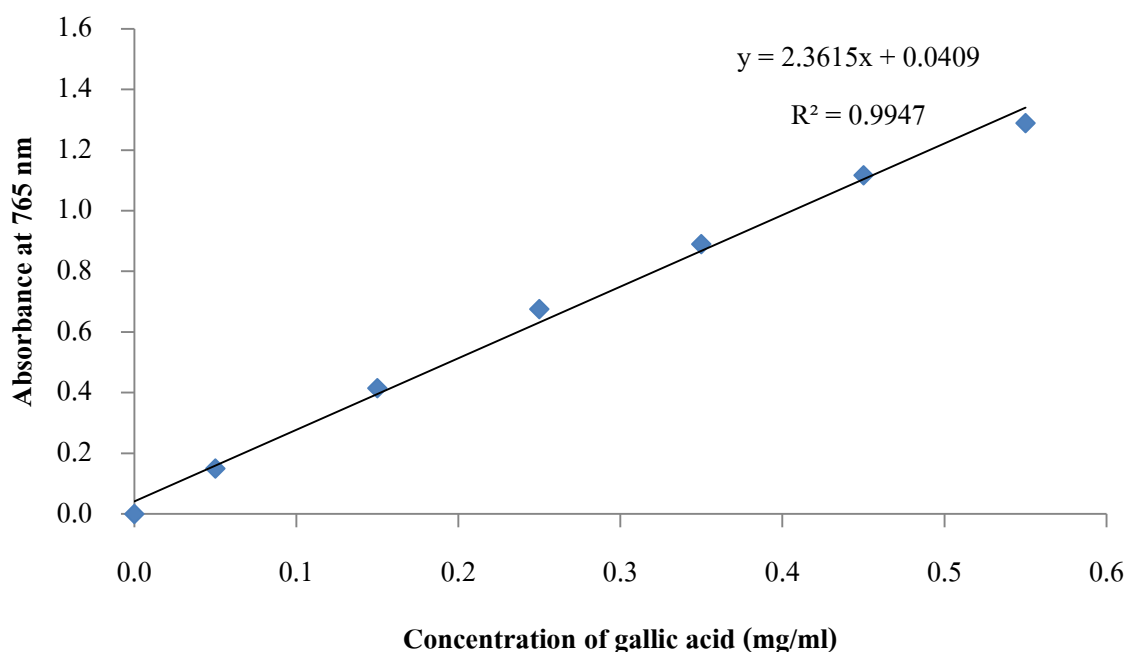


การสร้างกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid standard curve)

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก โดยทำการเตรียมสารละลายกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปรับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้นดังนี้ 0, 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45 และ 0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายกรดแกลลิกปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติม 10% Folin-Ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที และเก็บไว้ในที่มืด 1 นาที จากนั้นเติม 7.5% Sodium carbonate ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

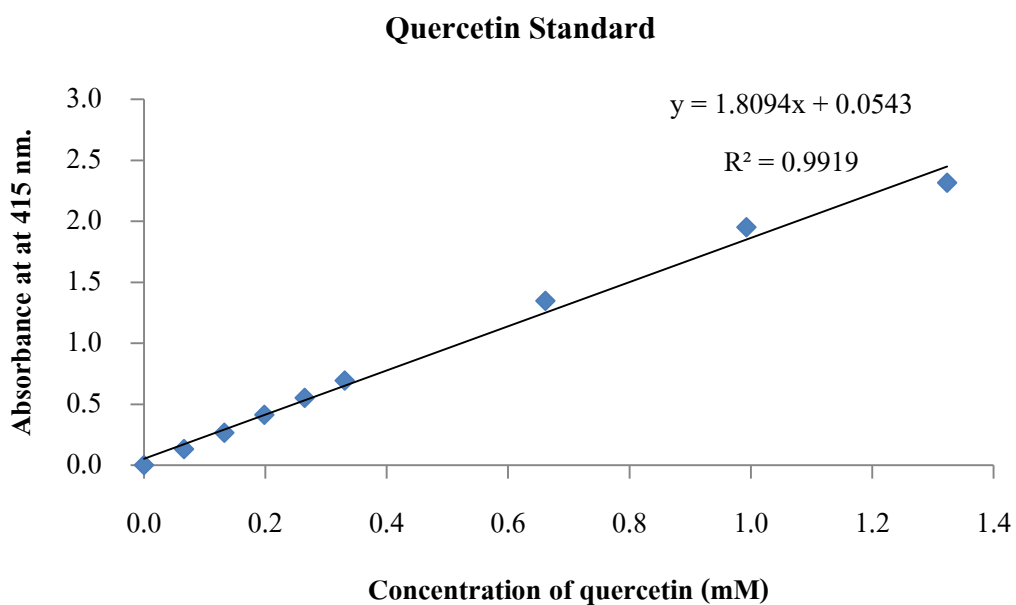
Gallic acid standard



กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก (สารละลายกรดแกลลิก)

กราฟมาตรฐานของเคอควิซิทิน (Quercetin standard curve)

การสร้างกราฟมาตรฐานของเคอควิซิทิน โดยการเตรียมเคอควิซิทินที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปรับความเข้มข้นของเคอควิซิทินให้มีความเข้มข้นดังนี้ 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเคอควิซิทินปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมเมทานอลปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 10% Aluminum chloride ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ 1M Potassium acetate ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของเคอควิซิทิน



กราฟมาตรฐานของสารฟลาโวนอยด์ (เคอควิซิทิน)

กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox (Trolox standard curve)

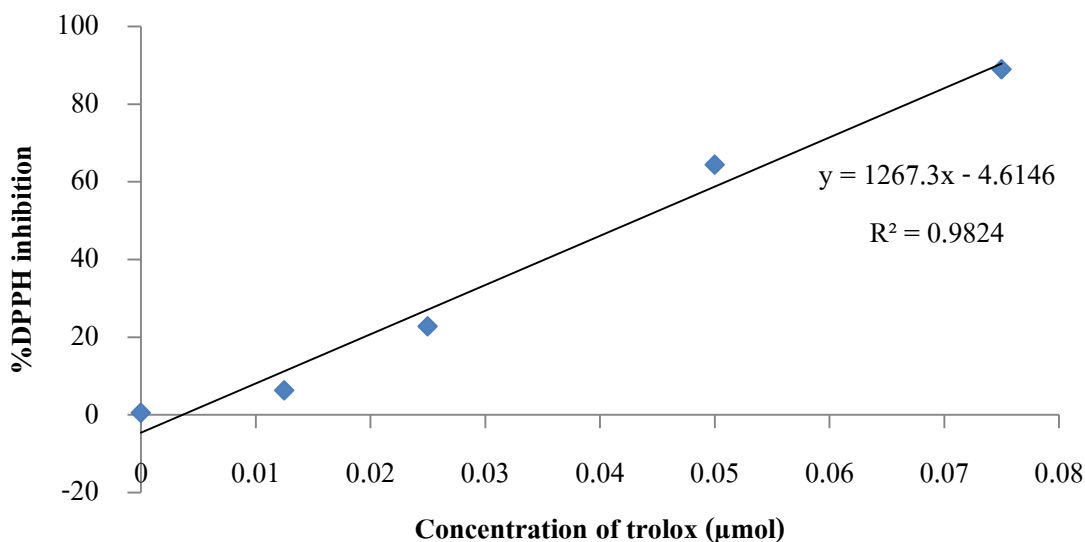
การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox โดยทำการเตรียมสารละลาย DPPH น้ำหนัก 0.0125 กรัม ละลายในเมทานอล 500 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Trolox ความเข้มข้น 0.5 mM ที่ละลายในเมทานอลเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นปีเปิดสารละลาย Trolox ปริมาตร 0, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Trolox ที่เตรียมไว้ จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (OD_{t_0}) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ($OD_{t_{30}}$) อีกครั้งโดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง และคำนวณหา %DPPH inhibition เพื่อใช้สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%DPPH \text{ inhibition} = [(OD_{t_0} - OD_{t_{30}}) / OD_{t_0}] \times 100$$

OD_{t_0} = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ที่เวลา 0 นาที

$OD_{t_{30}}$ = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ที่เวลา 30 นาที

Trolox Standard



กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox



ผลวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ S3 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากใบไผ่ 9
สปีชีส์ ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล

9 species	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
ไผ่ชางหม่น	3	4.2700	.18028	.10408	3.8222	4.7178	4.07	4.42
ไผ่ดำ	3	4.3533	.38812	.22408	3.3892	5.3175	3.94	4.71
ไผ่ปากกึ่ง	3	5.5867	.14224	.08212	5.2333	5.9400	5.49	5.75
ไผ่รวก	3	3.8467	.10066	.05812	3.5966	4.0967	3.74	3.94
ไผ่น้ำเต้า	3	4.4067	.13279	.07667	4.0768	4.7365	4.33	4.56
ไผ่กิมชุง	3	3.3200	.45530	.26287	2.1890	4.4510	2.91	3.81
ไผ่เหลือง	3	4.3100	.21284	.12288	3.7813	4.8387	4.08	4.50
ไผ่หวานปราจีน	3	3.1167	.05859	.03383	2.9711	3.2622	3.05	3.16
ไผ่เลี้ยง	3	3.6600	.09644	.05568	3.4204	3.8996	3.55	3.73
Total	27	4.0967	.72897	.14029	3.8083	4.3850	2.91	5.75

ตารางที่ S4 การจัดกลุ่มทางสถิติของสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์ ด้วย

สารละลาย 60% เอทานอล

Duncan^a

9 species	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
ไผ่หวาน	3	3.1167				
ปราจีน						
ไผ่กิมชุง	3	3.3200	3.3200			
ไผ่เลี้ยง	3		3.6600	3.6600		
ไผ่รวก	3			3.8467		
ไผ่ชางหม่น	3				4.2700	
ไผ่เหลือง	3				4.3100	
ไผ่ดำ	3				4.3533	
ไผ่น้ำเต้า	3				4.4067	
ไผ่ปักกิ่ง	3					5.5867
Sig.		.303	.093	.343	.522	1.000



ตารางที่ S5 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากใบไผ่

9 สปีชีส์ ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล

9 species	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
ไผ่ชางหม่น	3	20.4253	1.88081	1.08589	15.7531	25.0975	18.88	22.52
ไผ่ดำ	3	16.7500	2.92221	1.68714	9.4908	24.0092	13.38	18.52
ไผ่ปากกิ้ง	3	25.7163	3.20597	1.85097	17.7523	33.6804	22.02	27.63
ไผ่รวก	3	20.3277	1.10967	.64067	17.5711	23.0842	19.05	21.00
ไผ่น้ำเต้า	3	16.3063	1.75274	1.01195	11.9523	20.6604	14.29	17.46
ไผ่กิมชุง	3	19.8503	1.04267	.60199	17.2602	22.4405	18.71	20.76
ไผ่เหลือง	3	16.6597	2.15459	1.24396	11.3074	22.0120	14.79	19.01
ไผ่หวานปราจีน	3	11.8330	.89758	.51822	9.6033	14.0627	10.80	12.43
ไผ่เลี้ยง	3	18.6680	2.20939	1.27559	13.1796	24.1564	17.15	21.20
Total	27	18.5041	4.04876	.77918	16.9024	20.1057	10.80	27.63



ตารางที่ S6 การจัดกลุ่มทางสถิติของสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์
ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล

Duncan^a

9 species	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
ไผ่หวานปราจีน	3	11.8330			
ไผ่น้ำเต้า	3		16.3063		
ไผ่เหลือง	3		16.6597	16.6597	
ไผ่ดำ	3		16.7500	16.7500	
ไผ่เลี้ยง	3		18.6680	18.6680	
ไผ่กิมชุง	3		19.8503	19.8503	
ไผ่รวก	3			20.3277	
ไผ่ชางหม่น	3			20.4253	
ไผ่ปักกิ่ง	3				25.7163
Sig.		1.000	.072	.060	1.000



ตารางที่ S7 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมในสารสกัดจากใบไผ่ 9
สปีชีส์ ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล

9 species	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
ไผ่ชางหม่น	3	6.2621	2.32738	1.34372	.4805	12.0436	4.68	8.93
ไผ่ดำ	3	3.7572	.75145	.43385	1.8905	5.6240	3.01	4.51
ไผ่ปากกิ้ง	3	4.8427	1.67614	.96772	.6789	9.0064	3.67	6.76
ไผ่รวก	3	1.3359	1.20417	.69523	-1.6554	4.3272	.00	2.34
ไผ่น้ำเต้า	3	1.9204	.96290	.55593	-.4716	4.3124	.92	2.84
ไผ่กิมชุง	3	4.5365	.81094	.46820	2.5220	6.5510	3.84	5.43
ไผ่เหลือง	3	4.5365	1.33678	.77179	1.2158	7.8573	3.17	5.84
ไผ่หวาน	3	4.1191	.82374	.47558	2.0728	6.1653	3.17	4.68
ปราจีน								
ไผ่เลี้ยง	3	7.0135	2.74772	1.58639	.1878	13.8392	5.43	10.19
Total	27	4.2582	2.17345	.41828	3.3984	5.1180	.00	10.19

ตารางที่ S8 การจัดกลุ่มทางสถิติของปริมาณสารแอนโทไซยานินรวมในสารสกัดจากใบไผ่ 9
สปีชีส์ ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล

Duncan^a

9 species	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
ไผ่รวก	3	1.3359			
ไผ่น้ำเต้า	3	1.9204	1.9204		
ไผ่ดำ	3	3.7572	3.7572	3.7572	
ไผ่หวานปราจีน	3	4.1191	4.1191	4.1191	4.1191
ไผ่กิมชุง	3		4.5365	4.5365	4.5365
ไผ่เหลือง	3		4.5365	4.5365	4.5365
ไผ่ปักกิ่ง	3		4.8427	4.8427	4.8427
ไผ่ชางหม่น	3			6.2621	6.2621
ไผ่เลี้ยง	3				7.0135
Sig.		.058	.055	.096	.057



ตารางที่ S9 การวิเคราะห์ทางสถิติของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแสดงในค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ในสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์ ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล

9 species	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
ไผ่ชางหม่น	3	.1310	.01910	.01103	.0836	.1785	.12	.15
ไผ่ดำ	3	.1910	.03553	.02051	.1027	.2792	.16	.23
ไผ่ปักกิ่ง	3	.6072	.24165	.13952	.0069	1.2075	.33	.75
ไผ่รวก	3	.1192	.00541	.00312	.1058	.1326	.11	.12
ไผ่น้ำเต้า	3	.1401	.00470	.00271	.1285	.1518	.14	.14
ไผ่กิมซุง	3	.1290	.01798	.01038	.0843	.1737	.11	.14
ไผ่เหลือง	3	.1222	.00393	.00227	.1124	.1320	.12	.13
ไผ่หวาน	3	.0919	.00140	.00081	.0884	.0953	.09	.09
ปราจีน								
ไผ่เลี้ยง	3	.1301	.01148	.00663	.1016	.1587	.12	.14
Total	27	.1846	.16869	.03247	.1179	.2514	.09	.75

ตารางที่ S10 การวิเคราะห์ทางสถิติของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแสดงในค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ในสารสกัดจากใบไม้ 9 สปีชีส์ ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล

Duncan^a

9 species	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ไผ่หวานปราจีน	3	.0919	
ไผ่รวก	3	.1192	
ไผ่เทือก	3	.1222	
ไผ่กิมชุง	3	.1290	
ไผ่เลี้ยง	3	.1301	
ไผ่ชางหม่น	3	.1310	
ไผ่น้ำเต้า	3	.1401	
ไผ่ดำ	3	.1910	
ไผ่ปลักกิ่ง	3		.6072
Sig.		.210	1.000



ตารางที่ S11 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าในการกำจัดอนุมลอิสระ (IC50) ในสารสกัดจากใบไผ่ 9

สปีชีส์ ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล

9 species	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
ไผ่ชางหม่น	3	3.0410	.32654	.18853	2.2298	3.8522	2.66	3.24
ไผ่ดำ	3	2.0667	.45015	.25989	.9484	3.1849	1.61	2.51
ไผ่ปากกิ้ง	3	.7233	.38770	.22384	-.2398	1.6864	.47	1.17
ไผ่รวก	3	3.1983	.14806	.08548	2.8305	3.5661	3.08	3.37
ไผ่น้ำเต้า	3	2.8150	.08253	.04765	2.6100	3.0200	2.75	2.91
ไผ่กิมชุง	3	2.9780	.46099	.26615	1.8328	4.1232	2.62	3.50
ไผ่เหลือง	3	2.7837	.15161	.08753	2.4070	3.1603	2.61	2.90
ไผ่หวาน	3	4.3437	.05273	.03044	4.2127	4.4747	4.29	4.40
ปราจีน								
ไผ่เลี้ยง	3	3.0790	.28227	.16297	2.3778	3.7802	2.85	3.39
Total	27	2.7810	.96641	.18599	2.3987	3.1633	.47	4.40

ตารางที่ S12 การจัดกลุ่มทางสถิติของค่าในการกำจัดอนุมูลอิสระ (IC50) ในสารสกัดจากใบไผ่ 9 สปีชีส์ ด้วยสารละลาย 60% เอทานอล

Duncan^a

9 species	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
ไผ่ป๋ากิ่ง	3	.7233			
ไผ่ดำ	3		2.0667		
ไผ่เหลือง	3			2.7837	
ไผ่น้ำเต้า	3			2.8150	
ไผ่กิมชุง	3			2.9780	
ไผ่ชางหม่น	3			3.0410	
ไผ่เลี้ยง	3			3.0790	
ไผ่รวก	3			3.1983	
ไผ่หวานปราจีน	3				4.3437
Sig.		1.000	1.000	.148	1.000

ตารางที่ S13 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณ orientin ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์ ด้วยเทคนิค HPLC

3 species	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ไผ่ดำ	3	2.1038	.49192	.28401	.8818	3.3258	1.69	2.65
ไผ่ป๋ากิ่ง	3	6.6845	3.16378	1.82661	-1.1748	14.5437	3.03	8.59
ไผ่ชางหม่น	3	2.2439	.28495	.16452	1.5360	2.9517	1.91	2.42
Total	9	3.6774	2.77008	.92336	1.5481	5.8066	1.69	8.59

ตารางที่ S14 การจัดกลุ่มทางสถิติของปริมาณ orientin ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์ ด้วย

เทคนิค HPLC

Duncan^a

3 species	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ไผ่ดำ	3	2.1038	
ไผ่ชางหม่น	3	2.2439	
ไผ่ปักกิ่ง	3		6.6845
Sig.		.929	1.000

ตารางที่ S15 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณ vitexin ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์ ด้วย

เทคนิค HPLC

3 species	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ไผ่ดำ	3	1.7319	.51961	.30000	.4412	3.0227	1.14	2.10
ไผ่ปักกิ่ง	3	2.8190	.78195	.45146	.8765	4.7615	2.22	3.70
ไผ่ชางหม่น	3	1.3577	.21506	.12416	.8235	1.8920	1.16	1.59
Total	9	1.9696	.81490	.27163	1.3432	2.5960	1.14	3.70

ตารางที่ S16 การจัดกลุ่มทางสถิติของปริมาณ vitexin ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์ ด้วย

เทคนิค HPLC

Duncan^a

3 species	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ไผ่ชางหม่น	3	1.3577	
ไผ่ดำ	3	1.7319	1.7319
ไผ่ปักกิ่ง	3		2.8190
Sig.		.441	.054

ตารางที่ S17 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณ isoorientin ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์

ด้วยเทคนิค HPLC

3 species	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ไผ่ดำ	3	1.8555	1.07628	.62139	-.8181	4.5291	.87	3.00
ไผ่ปักกิ่ง	3	2.1806	1.50581	.86938	-1.5601	5.9212	.49	3.37
ไผ่ชางหม่น	3	3.6747	1.22359	.70644	.6351	6.7142	2.38	4.81
Total	9	2.5702	1.39165	.46388	1.5005	3.6400	.49	4.81

ตารางที่ S18 การจัดกลุ่มทางสถิติของปริมาณ isoorientin ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์ ด้วย

เทคนิค HPLC

Duncan^a

3 species	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
ไผ่ดำ	3	1.8555	
ไผ่ปากกิ้ง	3	2.1806	
ไผ่ชางหม่น	3	3.6747	
Sig.		.144	

ตารางที่ S19 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณ isovitexin ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์ ด้วย

เทคนิค HPLC

3 species	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					ไผ่ดำ	3		
ไผ่ปากกิ้ง	3	2.0535	1.36614	.78874	-1.3402	5.4471	.53	3.18
ไผ่ชางหม่น	3	.0509	.02603	.01503	-.0138	.1155	.03	.08
Total	9	1.5506	1.67352	.55784	-.2642	2.8369	.03	4.88

ตารางที่ S20 การจัดกลุ่มทางสถิติของปริมาณ isovitexin ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ 3 สปีชีส์ ด้วย

เทคนิค HPLC

Duncan^a

3 species	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
ไผ่ชางหม่น	3	.0509	
ไผ่ปากกิ้ง	3	2.0535	
ไผ่ดำ	3	2.5474	
Sig.		.081	



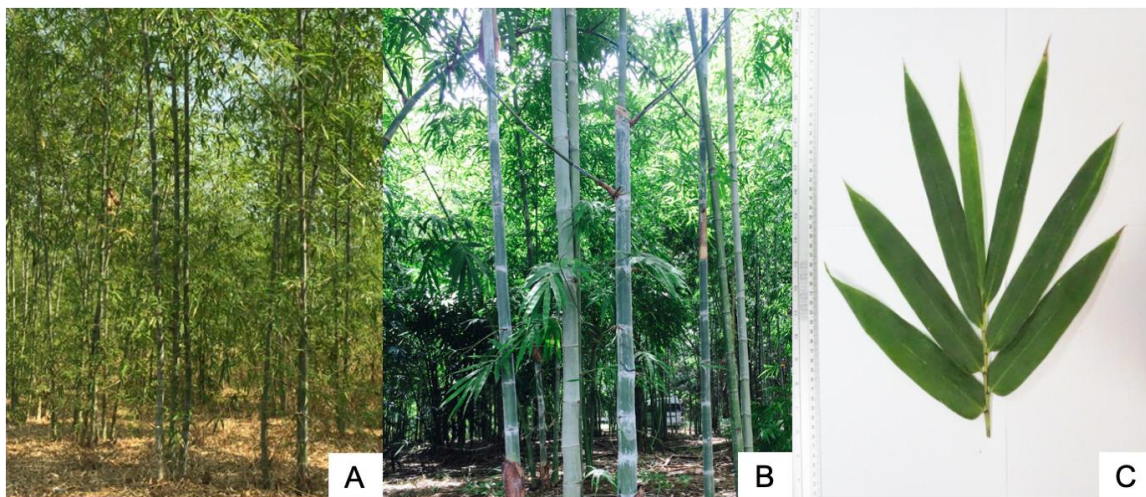
ภาคผนวก จ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไม้ที่ใช้ในการทดลอง



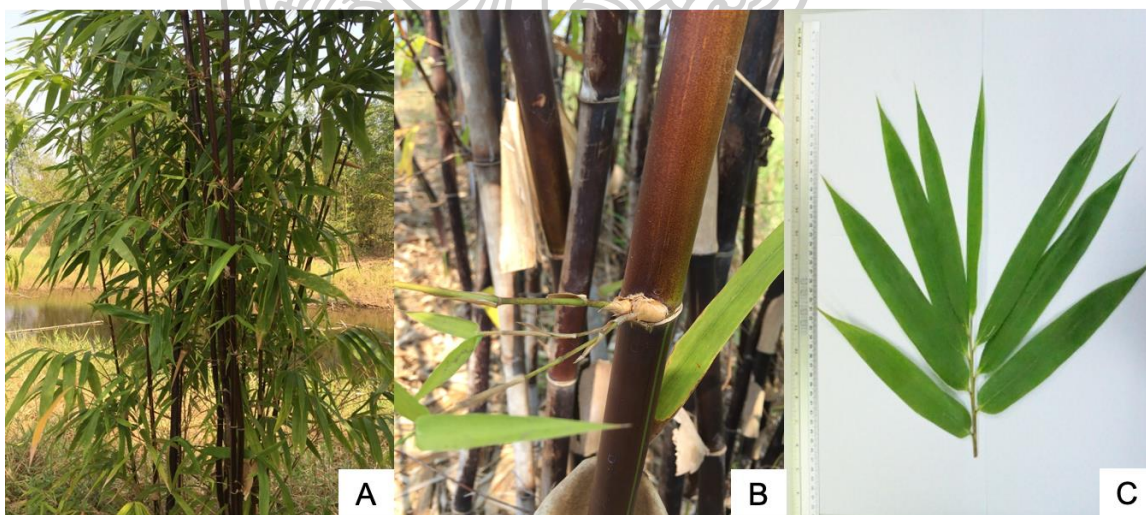
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไม้ที่ใช้ในการทดลอง

ไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro)



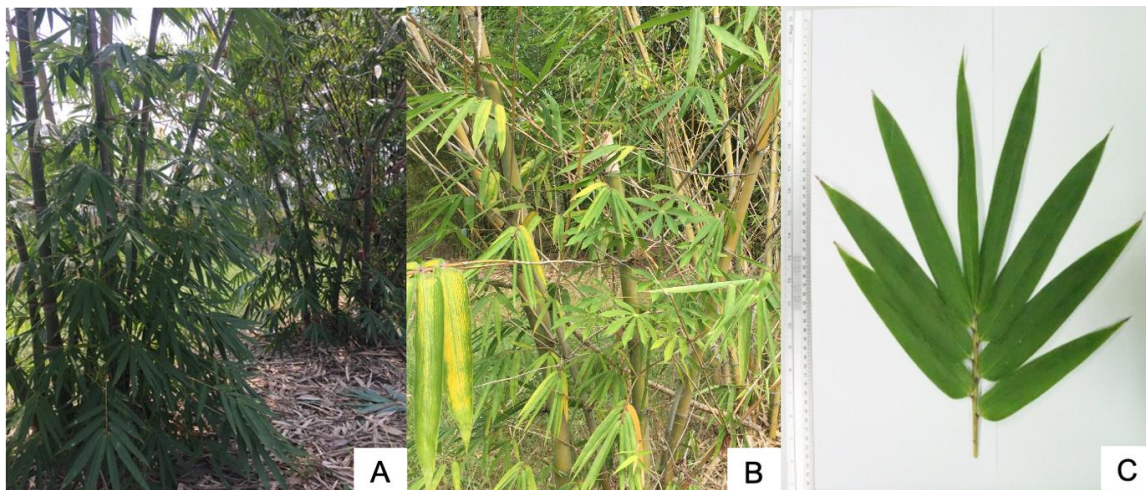
รูปที่ S41 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” (A-C) แสดงลักษณะกอ (A) ลักษณะลำ (B) และลักษณะใบ (C)

ไผ่ดำ (*Phyllostachys nigra* (Lodd. ex Lindl.) Munro)



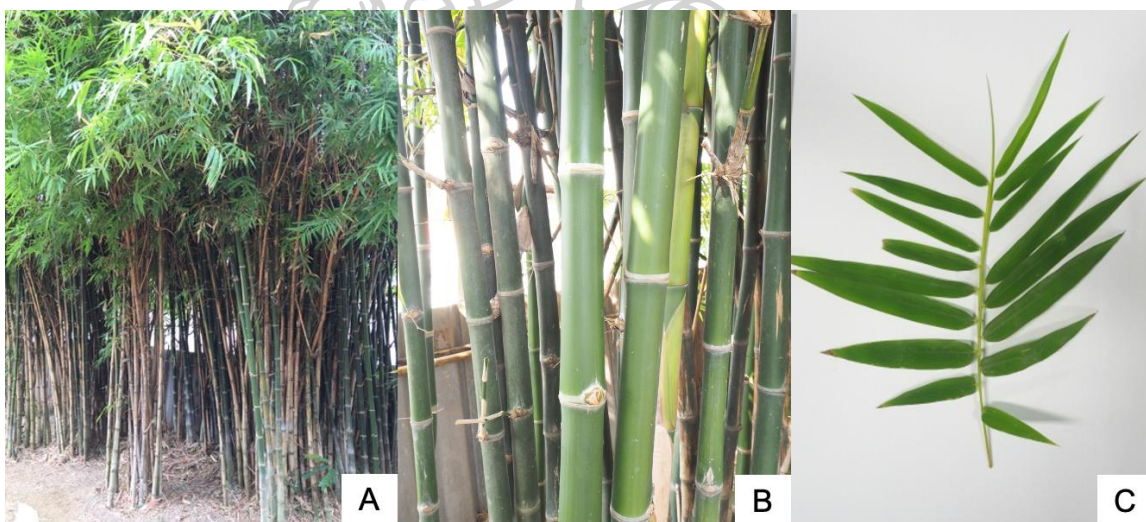
รูปที่ S42 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ดำ (A-C) แสดงลักษณะกอ (A) ลักษณะลำ (B) และลักษณะใบ (C)

ไผ่ป๋ากิ่ง (*Dendrocalamus* sp.)



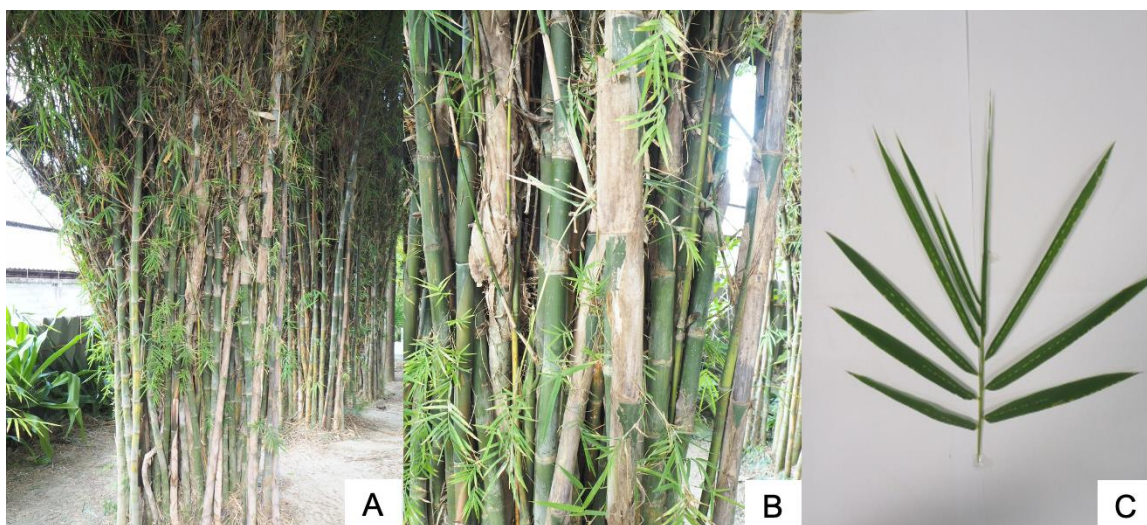
รูปที่ S43 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ป๋ากิ่ง (A-C) แสดงลักษณะกอ (A) ลักษณะลำ (B) และลักษณะใบ (C)

ไผ่เลี้ยง (*Bambusa multiplex* (Lour.) Raeusch)



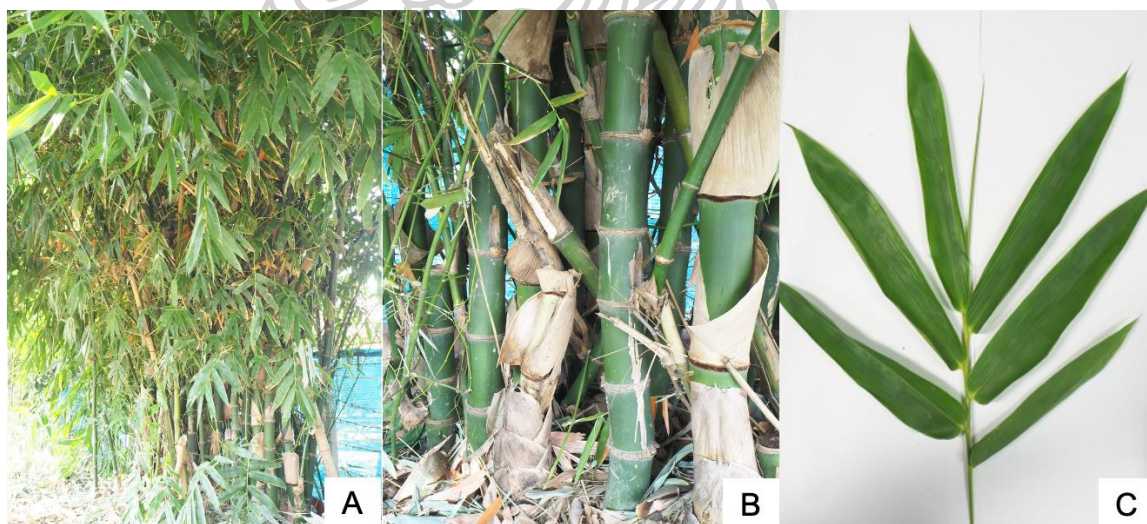
รูปที่ S44 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่เลี้ยง (A-C) แสดงลักษณะกอ (A) ลักษณะลำ (B) และลักษณะใบ (C)

ไผ่รวก (*Thyrsostachys siamensis* Gamble)



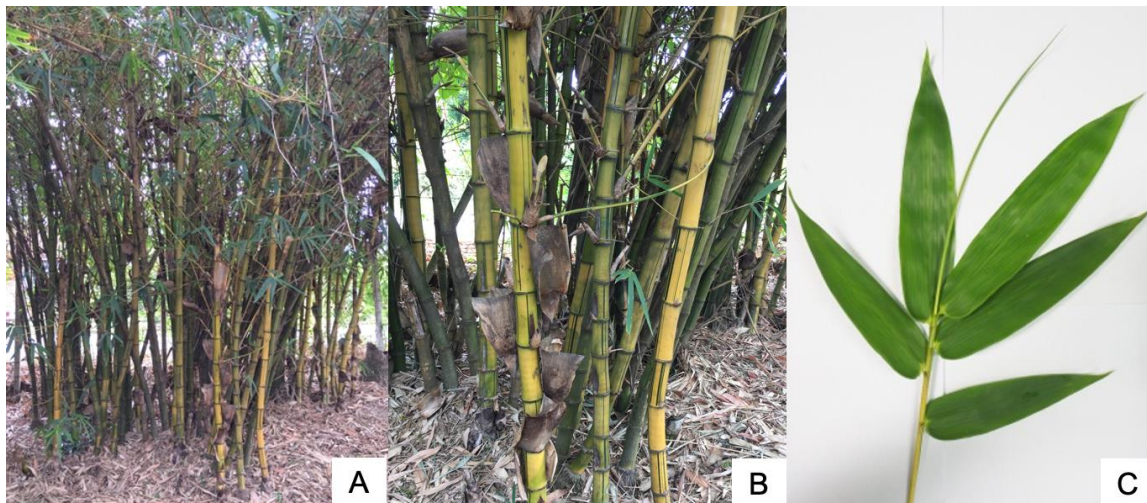
รูปที่ S45 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่รวก (A-C) แสดงลักษณะกอ (A) ลักษณะลำ (B) และลักษณะใบ (C)

ไผ่กิมชุง (*Bambusa beecheyana* Munro)



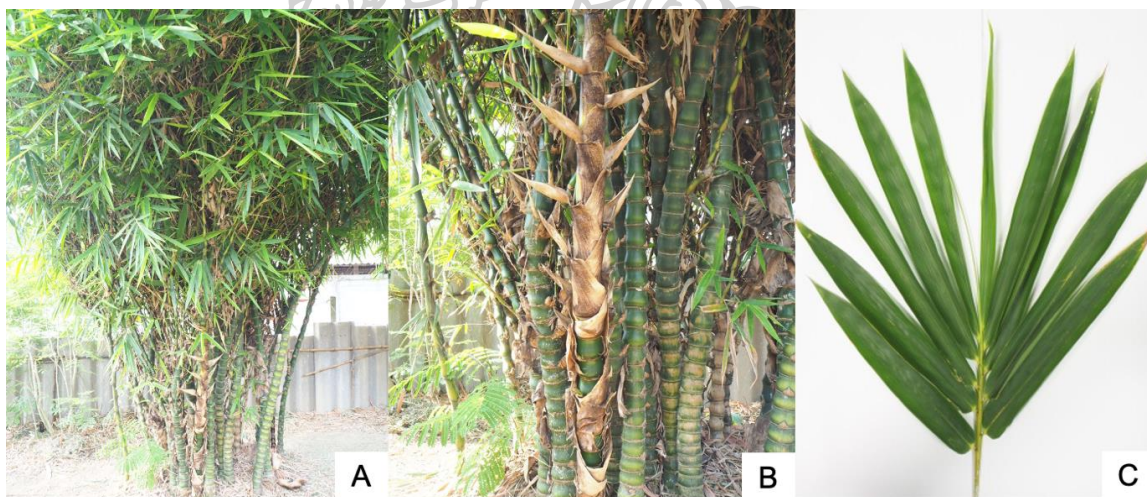
รูปที่ S46 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่กิมชุง (A-C) แสดงลักษณะกอ (A) ลักษณะลำ (B) และลักษณะใบ (C)

ไผ่เหลือง (*Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland cv. *Vittata* McClure)



รูปที่ S47 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่เหลือง (A-C) แสดงลักษณะกอ (A) ลักษณะลำ (B) และลักษณะใบ (C)

ไผ่น้ำเต้า (*Bambusa ventricosa* McClure)



รูปที่ S48 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่น้ำเต้า (A-C) แสดงลักษณะกอ (A) ลักษณะลำ (B) และลักษณะใบ (C)

ไผ่หวานปราจีน (*Bambusa* sp.)



รูปที่ S49 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่หวานปราจีน (A-C) แสดงลักษณะกอ (A) ลักษณะลำ (B) และลักษณะใบ (C)





ชื่อวิทยาศาสตร์ของไม้ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ S21 ชื่อวิทยาศาสตร์ของไม้ 9 สปีชีส์ ที่ใช้ในการวิจัย

ลำดับ	ชื่อไม้	ชื่อวิทยาศาสตร์	อ้างอิง
1	ไผ่ชางหม่น	<i>Dendrocalamus sericeus</i> Munro	พรชัย หาระโคตร และคณะ, 2562
2	ไผ่ดำ	<i>Phyllostachys nigra</i> (Lodd. ex Lindl.) Munro	ศราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554
3	ไผ่ปึกกิ่ง	<i>Dendrocalamus</i> sp.	ชัยพิสิษฐ์ พวงจิก และคณะ, 2556
4	ไผ่เลี้ยง	<i>Bambusa multiplex</i> (Lour.) Raeusch	โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, http://www.rspg.cmru.ac.th/activity.php?activity=3
5	ไผ่รวก	<i>Thyrsostachys siamensis</i> Gamble	ศราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554
6	ไผ่กิมชุง	<i>Bambusa beecheyana</i> Munro	ศราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554
7	ไผ่เหลือง	<i>Bambusa vulgaris</i> Schrader ex Wendland cv. Vittata McClure	ศราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554
8	ไผ่น้ำเต้า	<i>Bambusa ventricosa</i> McClure	ข้อมูลพันธุ์ไม้, https://data.addrun.org/plant/archives/554-bambusa-ventricosa-mcclure
9	ไผ่หวาน ปราจีน	<i>Bambusa</i> sp.	ศูนย์ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ, https://www.dnp.go.th/EPAC/bamboo_ratttan/bamboo27.htm

รายการอ้างอิง

- Agnihotri, R. K., Mishra, J., & Nandi, S. K. (2009). Improved in vitro shoot multiplication and rooting of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro: production of genetically uniform plants and field evaluation. *Acta physiologiae plantarum*, 31(5), 961-967.
- Alexander, M. P., & Rao, T. C. (1968). In vitro culture of bamboo embryos. *Curr Sci*, 37, 415.
- Anand, M., Brar, J., & Sood, A. (2013). In vitro propagation of an edible bamboo *Bambusa bambos* and assessment of clonal fidelity through molecular markers. *Journal of Medical and Bioengineering Vol*, 2(4).
- Anilkumar, K., Reddy, G. V., Azad, R., Yarla, N. S., Dharmapuri, G., Srivastava, A., Kamal, M. A., & Pallu, R. (2017). Evaluation of anti-inflammatory properties of isoorientin isolated from tubers of *Pueraria tuberosa*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Anuntalabhochai, S., Chundet, R., Chiangda, J., & Apavatjirut, P. (2002). Genetic diversity within lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis. *Acta horticulturae*.
- Arya, I. D., Satsangi, R., & Arya, S. (2001). Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. *Journal of Sustainable Forestry*, 14(2-3), 103-114.
- Arya, S., Satsangi, R., & Arya, I. D. (2008). Direct regeneration of shoots from immature inflorescences in *Dendrocalamus asper* (edible bamboo) leading to mass propagation. *Bamboo Science & Culture*, 21(1).
- Arya, S., Sharma, S., Kaur, R., & Arya, I. D. (1999). Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. *Plant cell reports*, 18(10), 879-882.
- Banerjee, M., Gantait, S., & Pramanik, B. R. (2011). A two step method for accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their evaluation in field. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(4), 387.
- Banik, R. L. (2015). Bamboo silviculture. In *Bamboo* (pp. 113-174): Springer.

- Basli, A., Belkacem, N., & Amrani, I. (2017). Health benefits of phenolic compounds against cancers. *Phenolic compounds–Biological activity*. London, UK: IntechOpen, 193-210.
- Bejoy, M., Anish, N., Radhika, B., & Nair, G. (2012). In vitro propagation of *Ochlandra wightii* (Munro) Fisch.: an endemic reed of southern western ghats India. *Biotechnology*, 11(2), 67-73.
- Bordoloi, S., Singha, B. L., Goswami, P., & Hazarika, I. (2018). Improved clonal propagation of superior *Dendrocalamus hamiltonii* Nees germplasm through in vitro techniques.
- Borges Bubols, G., da Rocha Vianna, D., Medina-Reimon, A., von Poser, G., Maria Lamuela-Raventos, R., Lucia Eifler-Lima, V., & Cristina Garcia, S. (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(3), 318-334.
- Brar, J., Shafi, A., Sood, P., Sood, A., & Anand, M. (2012). Micropropagation of *Dendrocalamus membranaceus* Munro. through axillary shoot proliferation and confirmation of clonal fidelity of in vitro raised plants. *J Bamboo Rattan*, 11(1-4), 13-29.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(8), 2288-2294.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- Chaowana, P., Barbu, M. C., & Frühwald, A. (2015). Bamboo: a functionally graded composite material. *Forest Products Journal*, 65(3-4), 48-53.
- Chapman, E. J., & Estelle, M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual review of genetics*, 43, 265-285.
- Chelyn, J. L., Omar, M. H., Mohd Yousof, N. S. A., Ranggasamy, R., Wasiman, M. I., & Ismail, Z. (2014). Analysis of flavone C-glycosides in the leaves of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau by HPTLC and HPLC-UV/DAD. *The Scientific World Journal*, 2014.

- Choi, M.-H., Jo, H.-G., Yang, J. H., Ki, S. H., & Shin, H.-J. (2018). Antioxidative and anti-melanogenic activities of bamboo stems (*Phyllostachys nigra* variety henosis) via PKA/CREB-mediated MITF downregulation in B16F10 melanoma cells. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 409.
- Chowdhury, P., Das, M., Sikdar, S., & Pal, A. (2004). Influence of the physiological age and position of the nodal explants on micropropagation of field-grown *Dendrocalamus strictus* Nees. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 5(1-2), 45-50.
- Coffie, G., Antwi-Boasiako, C., & Darkwa, N. (2014). Phytochemical constituents of the leaves of three bamboo (Poaceae) species in Ghana.
- D'Agostino, I. B., & Kieber, J. J. (1999). Molecular mechanisms of cytokinin action. *Current opinion in plant biology*, 2(5), 359-364.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Das, A., & Mandal, N. (2010). Enhanced development of embryogenic callus in *Stevia rebaudiana* Bert by additive and amino acids. *Biotechnol*, 9(3), 368-372.
- Das, M., Bhattacharya, S., & Pal, A. (2005). Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: a strategy for species-specific marker development in bamboo. *Annals of botany*, 95(5), 835-841.
- Desai, P., Desai, S., & Patel, A. (2019). Development of efficient micropropagation protocol through axillary shoot proliferation for *Bambusa vulgaris* 'wamin' and *Bambusa bambos* and assessment of clonal fidelity of the micropropagated plants through Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Agriculture and Natural Resources*, 53(1), 26-32.
- Devi, W. S., Bengyella, L., & Sharma, G. (2012). In vitro seed germination and micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus giganteus* Munro using seeds. *Biotechnology*, 11(2), 74-80.
- Devi, W. S., & Sharma, G. (2009). In vitro propagation of *Arundinaria callosa* Munro an edible bamboo from nodal explants of mature plants. *The Open Plant Science Journal*, 3(1).

- Evera, T., Rajandran, K., Saradha, S., & Lashmi, A. (2008). Analysis of genetic variation in selected bamboo species using RAPD. *Tree For Sci Biotechnol*, 2(1), 54-56.
- Erland, L. A., Giebelhaus, R. T., Victor, J. M., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (2020). The morphoregulatory role of thidiazuron: Metabolomics-Guided hypothesis generation for mechanisms of activity. *Biomolecules*, 10(9), 1253.
- Funada, R., Kubo, T., Tabuchi, M., Sugiyama, T., & Fushitani, M. (2001). Seasonal variations in endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the cambial region of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. stems in relation to earlywood-latewood transition and cessation of tracheid production. *Holzforschung*, 55(2), 128-134.
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., & Das, P. K. (2010). An elite protocol for accelerated quality-cloning in *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(6), 537-548.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813-8826.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2007). *Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background* (Vol. 1): Springer Science & Business Media.
- Giada, M. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases—A role for antioxidants. InTech*, 87-112.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*(1), F1. 2.1-F1. 2.13.
- Godbole, S., Sood, A., Thakur, R., Sharma, M., & Ahuja, P. S. (2002). Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. *Current science*, 885-889.
- GOH, W., Sungkaew, S., Teerawatananon, A., Ohrnberger, D., Xia, N., CHAN, K., . . . Wong, K. M. (2018). The hybrid origin of Phai Liang, a bamboo of recent introduction into horticulture in

- Southeast Asia, and a new nothogenus, *Thyrsocalamus* (Bambuseae: Bambusinae). *Phytotaxa*, 362(3), 271-281.
- Gong, J., Xia, D., Huang, J., Ge, Q., Mao, J., Liu, S., & Zhang, Y. (2015). Functional components of bamboo shavings and bamboo leaf extracts and their antioxidant activities in vitro. *Journal of medicinal food*, 18(4), 453-459.
- Goyal, A. K., Pradhan, S., Basistha, B. C., & Sen, A. (2015). Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. *Biotech*, 5(4), 473-482.
- Han, H., Zhang, S., & Sun, X. (2009). A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. *African Journal of Biotechnology*, 8(3).
- He, M., Min, J.-W., Kong, W.-L., He, X.-H., Li, J.-X., & Peng, B.-W. (2016). A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, 115, 74-85.
- Hossain, M., Islam, M., & Numan, S. (2015). Multipurpose uses of bamboo plants: a review. *Int Res J Biol Sci*, 4(12), 57-60.
- Hu, C. J., Xu, D. H., Chen, H. L., & Yuan, K. (2012). *Contents of the total flavonoids and the total phenols and antioxidant activities in the leaf from different species of Phyllostachys*. Paper presented at the Advanced Materials Research.
- Hu, J., Gao, X., Liu, J., Xie, C., & Li, J. (2008). Plant regeneration from petiole callus of *Amorphophallus albus* and analysis of somaclonal variation of regenerated plants by RAPD and ISSR markers. *Botanical Studies*, 49(3), 189-197.
- Hu, S., Zhou, J., Cao, Y., Lu, X., Duan, N., Ren, P., & Chen, K. (2011). In vitro callus induction and plant regeneration from mature seed embryo and young shoots in a giant sympodial bamboo, *Dendrocalamus farinosus* (Keng et Keng f.) Chia et HL Fung. *African Journal of Biotechnology*, 10(16), 3210-3215.

- Hu, X., Liao, H., Chen, X., Yin, P., & Liu, X. (2018). Study on extraction conditions and content comparison of total flavonoids from bitter bamboo shoots and *Sinocalamus affinis* shoots. *MS&E*, 394(2), 022010.
- Islam, S., & Rahman, M. M. (2005). Micro-cloning in commercially important six bamboo species for mass propagation and at a large scale cultivation. *Plant Tissue Cult Biotech*, 15, 103-111.
- Jiang, Z. (2002). World bamboo and rattan. *Liaoning Science & Technology Press, Shenyang, Liaoning*.
- Jiménez, V. M., Castillo, J., Tavares, E., Guevara, E., & Montiel, M. (2006). In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 389-395.
- Jin, Y.-c., Liu, H.-l., & Yuan, K. (2011). Simultaneous determination of seven effective constituents in the leaves of bamboo by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(23), 5630-5635.
- Kapruwan, S., Bakshi, M., & Kaur, M. (2014a). Effect of growth regulators on the in vitro multiplication of *Dendrocalamus Hamiltonii*. *Int J Eng Res Appl*, 1(4), 83-86.
- Kapruwan, S., Bakshi, M., & Kaur, M. (2014b). Rapid in vitro propagation of the solid bamboo, *Dendrocalamus strictus* Nees, through axillary shoot proliferation. *Biotechnology International*, 7(3), 58-68.
- Kim, C. Y., Lee, H. J., Jung, S. H., Lee, E. H., Cha, K. H., Kang, S. W., Pan, C.-H., & Um, B.-H. (2009). Rapid identification of radical scavenging phenolic compounds from black bamboo leaves using high-performance liquid chromatography coupled to an online ABTS+-based assay. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(6), 613-619.
- Kowalska, I., Jedrejek, D., Jonczyk, K., & Stochmal, A. (2019). UPLC-PDA-ESI-MS analysis and TLC-DPPH activity of wheat varieties. *Acta Chromatographica*, 31(2), 151-156.
- Lam, K. Y., Ling, A. P. K., Koh, R. Y., Wong, Y. P., & Say, Y. H. (2016). A review on medicinal properties of orientin. *Advances in pharmacological sciences*, 2016.

- Lima, L. K. F., Pereira, S. K. S., Junior, R. d. S. S., Santos, F. P. d. S., Nascimento, A. d. S., Feitosa, C. M., Figuerredo, J. d. S., Araujo, E. C. d. C., & Rai, M. (2018). A brief review on the neuroprotective mechanisms of vitexin. *BioMed research international*, 2018.
- Lin, C.-M., Huang, S.-T., Liang, Y.-C., Lin, M.-S., Shih, C.-M., Chang, Y.-C., Chen, T.-Y., & Chen, C.-T. (2005). Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. *Planta Med.* 2005 Aug, 71(8), 748-753.
- Lin, C.-S., Kalpana, K., Chang, W.-C., & Lin, N.-S. (2007). Improving multiple shoot proliferation in bamboo mosaic virus-free *Bambusa oldhamii* Munro propagation by liquid culture. *Hortscience*, 42(5), 1243-1246.
- Lu, B., Chen, J., Huang, W., Wu, D., Xu, W., Xie, Q., Yu, X., & Li, L. (2011). Determination of flavonoids and phenolic acids in the extract of bamboo leaves using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8448-8455.
- Lv, Z.-L., Lin, X., Miao, Z.-H., Guo, H.-X., Lei, M.-L., Pan, Y., & Zhang, B.-L. (2012). Antioxidant activity of bamboo-leaf extracts from the species *Dendrocalamopsis oldhami*. *Scientific Research and Essays*, 7(44), 3789-3796.
- Lv, Z., Dong, J., & Zhang, B. (2012). Rapid identification and detection of flavonoids compounds from bamboo leaves by LC-(ESI)-IT-TOF/MS. *BioResources*, 7(2), 1405-1418.
- Ma, Y., Zhu, D., Wang, C., Zhang, Y., Shang, Y., Liu, F., Ye, T., Chen, X., & Wei, Z. (2018). Simultaneous and fast separation of three chlorogenic acids and two flavonoids from bamboo leaves extracts using zirconia. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 375-379.
- Macwan, C., Patel, H., & Kalia, K. (2010). A comparative evaluation of in vitro antioxidant properties of Bamboo *Bambusa arundinacea* leaves extracts. *Journal of cell and tissue Research*, 10(3), 2413.

- Maheshwari, P., & Kovalchuk, I. (2011). Efficient shoot regeneration from internodal explants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoids*. *New biotechnology*, 28(6), 778-787.
- Maxwell, E., & Bitrus, H. J. (2013). Phytochemical constituents and in vitro antioxidant capacity of methanolic leaf extract of *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich Munro). *European Journal of Medicinal Plants*, 206-217.
- Mehta, R., Sharma, V., Sood, A., Sharma, M., & Sharma, R. K. (2011). Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of in vitro-derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall., using AFLP markers. *European Journal of Forest Research*, 130(5), 729-736.
- Mehta, U. I., Ramanuja Rao, I., & Mohan Ram, H. (1982). *Somatic embryogenesis in bamboo*. Paper presented at the Plant tissue culture 1982: proceedings, 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at Tokyo and Lake Yamanake, Japan, July 11-16, 1982/edited by Akio Fujiwara.
- Mudoi, K. D., Saikia, S. P., & Borthakur, M. (2014). Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important bamboo, *Bambusa nutans* Wall. ex. Munro. *African Journal of Biotechnology*, 13(19), 1961-1972.
- Mudoi, K. D., Saikia, S. P., Goswami, A., Gogoi, A., Bora, D., & Borthakur, M. (2013). Micropropagation of important bamboos: a review. *African Journal of Biotechnology*, 12(20).
- Nadgir, A. L., Phadke, P. K., Parsharami, V. A., Nair, S., & Mascarenhas, A. F. (1984). Rapid Multiplication of Bamboo by Tissue Culture*. *Silvae Genetica*, 33, 6.
- Nadha, H., Rahul, K., Sharma, R., Anand, M., & Sood, A. (2013). In vitro propagation of *Dendrocalamus asper* and testing the clonal fidelity using RAPD and ISSR markers. *International Journal of Current Research*, 5(8), 2060-2067.

- Nadha, H. K., Kumar, R., Sharma, R. K., An, M., & Sood, A. (2011). Evaluation of clonal fidelity of in vitro raised plants of *Guadua angustifolia* Kunth using DNA-based markers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(23), 5636-5641.
- Nayak, S., Rout, G., & Das, P. (2003). Evaluation of the genetic variability in bamboo using RAPD markers. *Plant Soil and Environment*, 49(1), 24-28.
- Negi, D., & Saxena, S. (2010). Ascertaining clonal fidelity of tissue culture raised plants of *Bambusa balcooa* Roxb. using inter simple sequence repeat markers. *New Forests*, 40(1), 1-8.
- Ngezahayo, F., Dong, Y., & Liu, B. (2007). Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis. *Journal of applied genetics*, 48(4), 329-336.
- Nirmala, C., Bisht, M. S., Bajwa, H. K., & Santosh, O. (2018). Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 91-99.
- Niwash, R. (2011). *Micropropagation studies in important cultivars of bamboo (Bambusa bambos & Dendrocalamus asper)*. CCSHAU.
- Obsuwan, K., Duangmanee, A., & Thepsithar, C. (2019). In vitro propagation of a useful tropical bamboo, *Thyrsostachys siamensis* Gamble, through shoot-derived callus. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(2), 261-267.
- Pai, S. R., & Desai, N. S. (2018). Effect of TDZ on various plant cultures. In *Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator* (pp. 439-454): Springer.
- Pandey, B., & Singh, N. (2012). Micropropagation of *Dendrocalamus strictus* Nees from mature nodal explants. *Journal of Applied and Natural Science*, 4(1), 5-9.
- Park, H.-S., Lim, J. H., Kim, H. J., Choi, H. J., & Lee, I.-S. (2007). Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. *Archives of pharmacal research*, 30(2), 161-166.

- Pawar, B., Prashant, K., Bahurupe, J., Jadhav, A., Anil, K., & Pawar, S. (2015). Proline and glutamine improve in vitro callus induction and subsequent shooting in rice. *Rice Science*, 22(6), 283-289.
- Qiao, G., Li, H., Liu, M., Jiang, J., Yin, Y., Zhang, L., & Zhuo, R. (2013). Callus induction and plant regeneration from anthers of *Dendrocalamus latiflorus* Munro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(4), 375-382.
- Raju, R. I., & Roy, S. K. (2016). Mass propagation of *Bambusa bambos* (L.) Voss through in vitro culture. *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*, 5(2), 15-26.
- Ramanayake, S., Maddegoda, K., Vitharana, M., & Chaturani, G. (2008). Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. *Scientia Horticulturae*, 118(3), 270-273.
- Ramanayake, S., & Yakandawala, K. (1997). Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. *Plant Science*, 129(2), 213-223.
- Rangsiruji, A., Binchai, S., & Pringsulaka, O. (2018). Species identification of economic bamboos in the genus *Dendrocalamus* using SCAR and multiplex PCR. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*.
- Ravikumar, R., Ananthkrishnan, G., Kathiravan, K., & Ganapathi, A. (1998). In vitro shoot propagation of *Dendrocalamus strictus* Nees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52(3), 189-192.
- Rout, G., & Das, P. (1994). Somatic embryogenesis and in vitro flowering of 3 species of bamboo. *Plant cell reports*, 13(12), 683-686.
- Sangeetha, R., Diea, Y., Chaitra, C., Malvi, P., & Shinomol, G. (2015). The amazing bamboo: a review on its medicinal and pharmacological potential. *Indian J Nutr*, 2(1), 1-7.
- Seki, T., Kida, K., & Maeda, H. (2010). Immunostimulation-mediated anti-tumor activity of bamboo (*Sasa senanensis*) leaf extracts obtained under 'vigorous' condition. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7.

- Shang, Y. F., Kim, S. M., & Um, B.-H. (2014). Optimisation of pressurised liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves. *Food Chemistry*, 154, 164-170.
- Sharma, K., Mishra, A. K., & Misra, R. S. (2008). The genetic structure of taro: a comparison of RAPD and isozyme markers. *Plant Biotechnology Reports*, 2(3), 191-198.
- Sheidai, M. (2008). RAPD analysis of somadonal variation in banana (*Musa acuminata* L.) cultivar Valery. *Acta Biologica Szegediensis*, 52(2), 307-311.
- Singh, M., Jaiswal, U., & Jaiswal, V. (2001). Thidiazuron-induced shoot multiplication and plant regeneration in bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 10(2), 133-137.
- Singh, S. R., Dalal, S., Singh, R., Dhawan, A., & Kalia, R. K. (2013a). Ascertaining clonal fidelity of micropropagated plants of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro using molecular markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5), 572-583.
- Singh, S. R., Dalal, S., Singh, R., Dhawan, A., & Kalia, R. K. (2013b). Evaluation of genetic fidelity of in vitro raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA-based markers. *Acta physiologiae plantarum*, 35(2), 419-430.
- Singh, S. R., Dalal, S., Singh, R., Dhawan, A. K., & Kalia, R. K. (2012a). Micropropagation of *Dendrocalamus asper* {Schult. & Schult. F.} Backer ex k. Heyne): an exotic edible bamboo. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21(2), 220-228.
- Singh, S. R., Dalal, S., Singh, R., Dhawan, A. K., & Kalia, R. K. (2012b). Seasonal influences on in vitro bud break in *Dendrocalamus hamiltonii* Arn. ex Munro nodal explants and effect of culture microenvironment on large scale shoot multiplication and plantlet regeneration. *Indian J Plant Physiol*, 17, 9-21.
- Singh, S. R., Singh, R., Kalia, S., Dalal, S., Dhawan, A., & Kalia, R. K. (2013c). Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo—a plant with extraordinary qualities. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(1), 21-41.

- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Soni, V., Jha, A., Dwivedi, J., & Soni, P. (2018). Qualitative and quantitative determination of phytoconstituents in some antifertility herbs. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(1), 79-84.
- Sood, A., Ahuja, P. S., Sharma, M., Sharma, O., & Godbole, S. (2002). In vitro protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(1), 55-63.
- Soreng, R. J., Peterson, P. M., Romaschenko, K., Davidse, G., Zuloaga, F. O., Judziewicz, E. J., Filgueiras, T. S., Davis, J. I., & Morrone, O. (2015). A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *Journal of Systematics and Evolution*, 53(2), 117-137.
- Talabgaew, S., & Laemlaksakul, V. (2007). Experimental studies on the mechanical property of laminated bamboo in Thailand. *World Academy of Sci Eng and Technol*, 34, 327-331.
- Tongco, J. V. V., Aguda, R. M., & Razal, R. A. (2014). Proximate analysis, phytochemical screening, and total phenolic and flavonoid content of Philippine bamboo *Schizostachyum lumampao*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(1), 709-713.
- Tripathi, Y., Jhumka, Z., & Anjum, N. (2015). Evaluation of total polyphenol and antioxidant activity of leaves of *Bambusa nutans* and *Bambusa vulgaris*. *Journal of Pharmacy Research*, 9(4), 271-277.
- Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6), 1005-1016.
- Vanstraelen, M., & Benková, E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 463-487.
- Venkatachalam, P., Kalaiarasi, K., & Sreeramanan, S. (2015). Influence of plant growth regulators (PGRs) and various additives on in vitro plant propagation of *Bambusa arundinacea* (Retz.)

- Wild: A recalcitrant bamboo species. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 193-200.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.
- Wang, J., Yue, Y.-d., Jiang, H., & Tang, F. (2012a). Rapid screening for flavone C-glycosides in the leaves of different species of bamboo and simultaneous quantitation of four marker compounds by HPLC-UV/DAD. *International journal of analytical chemistry*, 2012.
- Wang, J., Yue, Y.-D., Tang, F., & Sun, J. (2012b). TLC screening for antioxidant activity of extracts from fifteen bamboo species and identification of antioxidant flavone glycosides from leaves of *Bambusa textilis* McClure. *Molecules*, 17(10), 12297-12311.
- Wang, Y., Yang, Y., Wang, J., & XiaoLong, Y. (2018). Transcriptome analysis identified genes involved in anthocyanin biosynthesis in Rainbow bamboo (*Indosana hispida* Meclure cv.'Rainbow'). *Plant Omics*, 11(3), 145.
- Wróblewska, K. B., Baby, A. R., Guaratini, M. T. G., & Moreno, P. R. H. (2019). In vitro antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species. *Industrial Crops and Products*, 130, 208-215.
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., & Miron, A. (2016). Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(sup1), S29-S45.
- Xu, P., Zhao, P.-X., Cai, X.-T., Mao, J.-L., Miao, Z.-Q., & Xiang, C.-B. (2020). Integration of jasmonic acid and ethylene into auxin signaling in root development. *Frontiers in plant science*, 11, 271.
- Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J., Srivatva, S., & Prabha, S. (2016). Antioxidants and its functions in human body-A Review. *Res. Environ. Life Sci*, 9(11), 1328-1331.
- Yang, J. H., Choi, M.-H., Yang, S. H., Cho, S. S., Park, S. J., Shin, H.-J., & Ki, S. H. (2017). Potent anti-inflammatory and antiadipogenic properties of bamboo (*Sasa coreana* Nakai) leaves

- extract and its major constituent flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(31), 6665-6673.
- Yasodha, R., Kamala, S., & Kalaiarasi, K. (2010). Anatomical and biochemical changes associated with in vitro rhizogenesis in *Dendrocalamus giganteus*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 19(2), 217-222.
- Yasodha, R., Sumathi, R., Malliga, P., & Gurumurthi, K. (1997). Genetic enhancement and mass production of quality propagules of *Bambusa nutans* and *Dendrocalamus membranaceus*. *Indian Forester*, 123(4), 303-306.
- Ye, S., Cai, C., Ren, H., Wang, W., Xiang, M., Tang, X., . . . Zhu, Q. (2017). An efficient plant regeneration and transformation system of ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) started from young shoot as explant. *Frontiers in plant science*, 8, 1298.
- Yue, X., & Xu, Z. (2008). Changes of anthocyanins, anthocyanidins, and antioxidant activity in bilberry extract during dry heating. *Journal of Food Science*, 73(6), C494-C499.
- Zang, Q., Zhou, L., Zhuge, F., Yang, H., Wang, X., & Lin, X. (2016). Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*. *SpringerPlus*, 5(1), 1799.
- Zhang, C.-S., & Shi, R. (2015). Determination of anthocyanins content in different parts of *Indosasa hispida* McClure cv. 'Rainbow'. *Int J Sci*, 2, 82-85.
- Zhang, N., Fang, W., Shi, Y., Liu, Q., Yang, H., Gui, R., & Lin, X. (2010). Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(3), 325-332.
- Zhu, D., Wang, C., Zhang, Y., Yang, Y., Shang, Y., Niu, X., Sun, L., MA, Y., & Wei, Z. (2018). Insight into solvent effects on phenolic content and antioxidant activity of bamboo leaves extracts by HPLC analysis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 2240-2246.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2559). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ: ชุมชนุมนุสทกรณการเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

กรมอุตุนิยมวิทยา. ความรู้อุตุนิยมวิทยา. Retrieved from <https://www.tmd.go.th/info/info.php?FileID=23>)

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. (2560). การสกัดและวิธีวัดความสามารถ การต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหัวเฉียวเฉลิมพระ เกียรติ, 3(1), 85-93.

กิสณะ ดันเจริญ และสุพล ธนุรักษ์. (2538). ใผ่ตง. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่ง ประเทศไทย จำกัด.

ข้อมูลพันธุ์ไม้. (2017). ใผ่น้ำเต้า *Bambusa ventricosa* McClure. Retrieved from <https://data.addrun.org/plant/archives/554-bambusa-ventricosa-mcclure>

คำรพ รัตนสุด. (2561). พันธุศาสตร์โมเลกุลพื้นฐานจำเป็นสำหรับงานวิจัยด้านพืช. พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร.

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. กิจกรรมที่ 3 กิจกรรมปลูกรักษาพันธุกรรมพืช. Retrieved from <http://www.rspg.cmru.ac.th/activity.php?activity=3>

เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ. (2559). พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลประยุกต์. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ทวีศักดิ์ แสงอุดม. (2559). สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและแนวทางการใช้กับไม้ผล. กรุงเทพฯ: Post Tech.

ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก. (2558). ถ่านกัมมันต์จากไม้ใผ่: ตลาดยังมีความต้องการสูง? วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 23, 945-954.

ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก, ปภาภานต์ พรหมคล้าย และเขาวพา จิระเกียรติกุล. (2556). การศึกษาการเจริญเติบโตของใผ่บางพันธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 21(6), 533-542.

ปิยะดา ดันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรรณวัฒน์. (2551). บทปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: เอเจนเทค.

พรชัย หาระโคตร, ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก และสมพงษ์ ทะบันหาร. (2562). ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำจากลำใผ่พันธุ์นวลราชินี (*Dendrocalamus*

sericeus Munro) และกิมซุง (*Bambusa beecheyana*). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 8(4), 355-366.

เยาวลักษณ์ แก้วยอด. (2555). การศึกษาการบริหารจัดการกลุ่มวิสาหกิจชุมชนแปรรูปไม้ไผ่ในเขตปฏิรูปที่ดิน ตำบลถ้ำกลอง อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี. กรุงเทพฯ: กลุ่มวิจัยและพัฒนากการปฏิรูปที่ดิน สำนักวิชาการและแผนงาน สำนักงานการปฏิรูปที่ดินเพื่อเกษตรกรรม.

ศูนย์การเรียนรู้วิทยาศาสตร์โลกและดาราศาสตร์. ฤดูกาล. Retrieved from <http://www.lesa.biz/astrometry/astro-events/seasons>

ศูนย์ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ. ไม้หวาน. Retrieved from https://www.dnp.go.th/EPAC/bamboo_rattan/bamboo27.htm

สราวุธ สังข์แก้ว, อัจฉรา ตีระวัฒนานนท์ และกิตติศักดิ์ จินดาวงศ์. (2554). ไม้ในเมืองไทย: BAMBOO of Thailand. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

สุทัศน์ เล้าสกุล และฉัฐภากร เสมสันต์. (2556). การขยายพันธุ์ การปลูก และการจัดการสวนไม้เศรษฐกิจ. โครงการฟื้นฟูด้านป่าไม้ในพื้นที่ประสบภัยสึนามิ, กรมป่าไม้.

สุทัศน์ เล้าสกุล, สกลท์ บุญเสริมสุข และสราวุธ สังข์แก้ว. (2557). ไม้ในสวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนากการป่าไม้ กรมป่าไม้.

สุมาลี ตั้งประดับกุล. (2553). ดีเอ็นเอเทคโนโลยีการประยุกต์: ศึกษาแบคทีเรียก่อโรคเมล็ดออชโดซิส. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แมคกรอ-ฮิล.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนันต์ อนันตโชติ. (2534). ไม้ในประเทศไทยที่น่ารู้จัก. กรุงเทพฯ: ภาควิชาการจัดการป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรรรัตน์ มงคลพร. (2548). เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. นครปฐม: ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. (2549). สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พรินท์.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวเพ็ญนภา การะเวก
วัน เดือน ปี เกิด	19 ตุลาคม 2531
สถานที่เกิด	นครปฐม
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม)
ที่อยู่ปัจจุบัน	93/3 ม.3 ต.บางช้าง อ.สามพราน จ.นครปฐม 73110
ผลงานตีพิมพ์	<p>- เพ็ญนภา การะเวก, โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิธา, สุพรรณณิภา เส็งสาย, และ ศรัณยพร มากทรัพย์. (2562). การวิเคราะห์สารฟลาโวนโกลโคไซด์ในสารสกัดจากใบไผ่ช่วงหม่น “นวลราชินี” ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC. <i>Veridian E-Journal สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี</i>, (6)5, 84-94. (TCI กลุ่มที่ 2)</p> <p>- Karawak, P., Obsuwan, K., Sengsai, S. and Thepsithar, C. (2020). Competent callus induction from shoot segments of Sangmon 'Nuan Rajinee' bamboo (<i>Dendrocalamus sericeus</i> Munro). <i>Acta Hort.</i> 1298, 293-298 DOI: 10.17660/ActaHortic.2020.1298.40 https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1298.40</p> <p>- Karawak, P., Obsuwan, K., Sengsai, S. and Thepsithar, C. (2020). Enhancement of adenine sulfate and growth promoting substances on multiple shoot induction of Sangmon 'Nuan Rajinee' bamboo (<i>Dendrocalamus sericeus</i> Munro). <i>Acta Hort.</i> 1298, 299-306 DOI: '10.17660/ActaHortic.2020.1298.41 https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1298.41</p> <p>- Karawak, P., Sengsai, S., Thepsithar, C. and Maksup, S. (2020). Phytochemical content and antioxidant activity of leaf extracts from nine bamboo species and determination of flavone C-glycosides by TLC and HPLC. <i>Acta Hort.</i> 1298, 359-370 DOI: 10.17660/ActaHortic.2020.1298.50 https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1298.50</p>