บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

5.1 ศึกษาผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดของผักดีด

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ชิ้นส่วนปล้องสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบเนื่องมาจากกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อในชิ้นส่วนปล้อง และชิ้นส่วนใบมีชนิดของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน โดยชิ้นส่วนปล้องมีเนื้อเยื่อชั้น vascular cambium ซึ่งเป็นชั้นเนื้อเยื่อพืชที่มีการแบ่งเซลล์เป็นเนื้อเยื่อเจริญอยู่ตลอดเวลา ส่วนชนิดของเนื้อเยื่อในชิ้นส่วนใบนั้น เป็นเนื้อเยื่อถาวร (เทียมใจ คมกฤส, 2549) จึงทำให้ชิ้นส่วนปล้องมีความสามารถในการเกิด differentiated เป็นอวัยวะใหม่ได้ง่ายกว่าชิ้นส่วนใบ และจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้นั้น อาจเกิดจากชนิดของต้นพืช อายุของต้นพืช และความไม่สัมพันธ์กันระหว่างความเข้มข้นของฮอร์โมนภายใน (endogenous PGR) ของชิ้นส่วนใบกับฮอร์โมนสังเคราะห์ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยง (exogenous PGR) (Robert and Dennis, 2005)

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

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

5.2 ศึกษาผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของผักดีด

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

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

5.3 เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักดีดเพื่อศึกษาการเติบโต และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

5.3.1 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยของผักดีด

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

น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมากขึ้นตามไปด้วย (Endress,1994) หลังจากนั้นเซลล์จะเติบโตคงที่ (stationary phase) ในช่วงวันที่ 17, 21 และ 25 วัน และหลังจากช่วงวันที่ 25 เซลล์มีสีคล้ำ และเป็นสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเซลล์ตาย

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

5.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเซลล์แขวนลอยของผักดีด

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของผักดีดเพื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน พบว่า เซลล์แขวนลอยในช่วงวันที่ 25 และวันที่ 21 เป็นช่วงเวลาที่มีเปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุด ตามลำดับ (ภาพที่ 9 และ 10) ซึ่งความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทั้งสดและแห้งของผักดีด อีกทั้งความสามารถในการต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลาย DPPH เริ่มต้นที่ใช้ทำปฏิกิริยากับสารสกัดตัวอย่างด้วย (Sanchez-moreno, 2002; กมลวรรณ โชติพฤฒิพงศ์, 2554) ในขณะที่พบการสะสมฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์มากที่สุดในเซลล์แขวนลอยช่วงวันที่ 25 และวันที่ 21 เช่นเดียวกัน ดังนั้นสารสกัดของเซลล์แขวนลอยสามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น อาจเนื่องมาจากภายในเซลล์แขวนลอยของผักดีดมีการสร้างสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยในโมเลกุลของสารต้านออกซิเดชันเกิดการให้ไฮโดรเจนอะตอม หรือรับอิเล็กตรอนจึงเป็นผลให้สารละลาย $DPPH^{\cdot}$ มีสีจางลง ซึ่งทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ลดลง (Ferreira *et al.*, 2007)

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

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