การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของปัญจขันธ์และสารสำคัญ

Plant Tissue Culture of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino and its constituents

นฤมล มงคลชัยภักดิ์*
ธิดารัตน์ บุญรอด
ปภาวดี สุฉันทบุตร
ปราณี ชวลิตธำรง

บทคัดย่อ

นำยอดอ่อนของปัญจขันธ์เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP รวมกับ NAA หรือ KN รวมกับ 2,4D หรือ KN รวมกับ IAA และ GA ขนาดความเข้มข้น 0.1 - 9 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน ทำให้เกิดยอดอ่อนหลายยอด สูตรอาหารที่ดีที่สุดเมื่อนำสูตรอาหาร MS มาปรับความสมบูรณ์ของอาหารโดยใช้ BAP , GA และ citric acid ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. , 5 มก./ล. และ 150 มก./ล. และเพิ่มเหล็กเท่าตัว (MS58) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ทำให้มีจำนวนยอดอ่อนเฉลี่ย 4.3 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ย 2.4 ซม. เมื่อนำยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน NAA , IAA และ IBA ขนาดความเข้มข้น 0.1 , 1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 - 1$^1/_2$ เดือน เพื่อให้เกิดราก พบว่าฮอร์โมน IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ทำให้เกิดรากได้ดีที่สุดและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเฉลี่ย 85 % เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และเฉลี่ย 93.3 % เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1$^1/_2$ เดือน ที่ 1 $^1/_2$ เดือน ฮอร์โมน IAA 1 มก./ล. ดีกว่า IAA 0.1 มก./ล. ทำให้ความ

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ยาวยอดหลักเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์ต้นที่สูงเกิน 3 ซม. เฉลี่ย และจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 4.2 ซม., 92.8 % และ 7.4 ราก ตามลำดับ ทำให้ได้ต้นที่สมบูรณ์กว่า เมื่อนำต้นอ่อนออกปลูกในเรือนเพาะชำ มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ย 94.25 % เมื่อปลูกได้ 1 เดือน เมื่อนำยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนและสายพันธุ์ไทยมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS58 ที่มีหรือไม่มี Chitosan 0.1 % ขนาดความเข้มข้น 5 มล./ล. (C5) มีค่า total saponin ของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนบนสูตรอาหาร MS58 และ MS58+C5 เท่ากับ 5.10 % และ 5.08 % และของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยเท่ากับ 5.21 % และ 5.45 % ตามลำดับ ต้นปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยที่ปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 3 เดือน มีค่า total saponin เท่ากับ 6.67 %

ABSTRACT

Shootlets from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino were grown on MS medium supplemented with hormone BAP and NAA or KN and 2,4D or KN and IAA and GA with concentration of 0.1 - 9 mg/lit for 1 month. The multiple shoots were grown. The best multiple shoots was on MS medium supplemented with BAP, GA and citric acid with the concentration of 0.1 mg/l , 5 mg/l and 150 mg/l respectively and increase the iron in MS medium for equal amount (MS58) in one month. The average of multiple shoots was 4.3 shoots, the average length of shoots was 2.4 cm. When the shootlets were grown on MS medium supplemented with hormone NAA , IAA and IBA with the concentration of 0.1, 1 and 2 mg/l for rooting medium in one to one and a half month. The best medium was MS medium supplemented with IAA 0.1 mg/l having the average percentage of rooting 85 % in one month of culture and 93.3 % in one and a half month of culture. When culture for one and a half month hormone IAA 1 mg/l is better than hormone IAA 0.1 mg/l that has average main shoot length , average shoot higher than 3 cm. and average amount of roots equal to 4.2 cm. 92.8 % and 7.4 roots respectively. There fore the plantlets are more healthy. The average percentage of survival of plantlets when growing in nursery for 1 month was 94.25 %. Total saponin content of multiple shoots from Chinese and Thai variety on MS58 and MS58+C5 medium were 5.10 % and 5.08 % for Chinese variety, 5.21 % and 5.45 % for Thai variety respectively. The total saponin for three months of Thai variety plants growing in the nursery was 6.67 %.

Key Words : *Gynostemma pentaphyllum* , Tissue culture , Total saponin.

บทนำ

ปัญจขันธ์หรือชื่อจีนว่า เจียวกู่หลาน เซียนเฉ่า (สมุนไพรอมตะ) และมีชื่อญี่ปุ่นว่า อะมาชาซูรู (ชาหวานจากเถา) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb.) Makino. เป็นพืชในวงศ์ Cucurbitaceae ชื่อภาษาอังกฤษมีหลายชื่อ เช่น Miracle grass (หญ้ามหัศจรรย์), Southern gingseng (โสมภาคใต้), 5 - Leaf gingseng (โสมห้าใบ)[1] ปัญจขันธ์มีสารสำคัญชื่อ gypenosides เป็นสารไตรเทอร์ปีนซาโปนิน (triterpene saponins) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับ ginsenosides ที่พบในโสม (Panax gingseng) ซาโปนินที่พบในปัญจขันธ์มีจำนวน 82 ชนิด แต่ซาโปนินที่พบในโสมมีเพียง 28 ชนิด ในจำนวนนี้มี 4 ชนิดที่เหมือนกันได้แก่ gypenosides Rb1 (gypenoside III หรือ gynosaponin C) , ginsenosides Rb3 (gypenoside IV) , ginsenoside Rd (gypenoside VIII) และ ginsenoside F3 (gypenoside XII)[1] ปัญจขันธ์มีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[2,3] ช่วยให้นอนหลับ[4] ลดระดับไขมันในเลือด[5] เสริมระบบภูมิคุ้มกัน[6,7] ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิด[8] ยับยั้งการเกาะตัวกันของเกร็ดเลือด[9] ต้านอักเสบ[10,11] และลดระดับน้ำตาลในเลือด[12] แพทย์จีนใช้เป็นยาแก้อักเสบ แก้ไอ ขับเสมหะและแก้หลอดลมอักเสบชนิดเรื้อรัง[13] สารสกัดกีปีโนไซด์ 10 มก./เม็ด ใช้บำรุงร่างกาย ใช้เป็นยาเสริมการรักษาในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคความดันโลหิตสูง โรคมะเร็ง[14] การศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในปัญจขันธ์เพื่อการขยายพันธุ์และสารสำคัญคือ total saponin ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต ในการสร้างสารสำคัญในขวดเนื้อเยื่อพืชที่อาจนำมาผลิตเป็นยาได้ โดยไม่ต้องผ่านการปลูกในแปลงปลูก

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ

1. ปัญจขันธ์สายพันธุ์จีน ได้รับจาก สถาบันการแพทย์แผนไทย-จีน เอเซียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก
2. ปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทย ได้รับจาก เรือนเพาะชำนนทบุรี สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วิธีการ (ดูแผนผังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของปัญจขันธ์ประกอบ)

1. <u>การเตรียมพืชปลอดเชื้อ</u>

นำยอดอ่อนปัญจขันธ์มาล้างทำความสะอาด และฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 10 % เติม tween 20 จำนวน 2 - 3 หยด เขย่านาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่าที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำยอดอ่อนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog Medium) ที่ไม่มีฮอร์โมน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลานาน 1 เดือน

2. การพัฒนาให้เกิดต้นอ่อนจำนวนมาก

นำยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมนที่เจริญเติบโตและปลอดเชื้อ มาเพาะเลี้ยงต่อบนสูตรอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน benzyl amino purine (BAP) ขนาดความเข้มข้น 0.1,0.5,1,3,5,7 และ 9 มิลลิกรัม/ลิตร (มก./ล.) ที่มีและไม่มีฮอร์โมน naphthalene acetic acid (NAA) ขนาดความเข้มข้น 0.1 และ 1 มก./ล. และเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS 58 ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน BAP ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. , giberellic acid (GA) ขนาดความเข้มข้น 5 มก./ล. , citric acid ขนาดความเข้มข้น 150 มก./ล. และเพิ่มเหล็กเท่าตัว เพื่อเพิ่มความสูงของยอดอ่อนรวมทั้งป้องกันสารสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อที่ปล่อยออกมาในอาหาร และเพิ่มการเจริญเติบโตของใบ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

อีกการทดลองหนึ่งใช้สูตรอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน kinetin (KN) ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. รวมกับ 2,4 dichorophenoxy acetic acid (2,4D) ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. และเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน KN ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. รวมกับ GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และ 3 - indole acetic acid (IAA) ขนาดความเข้มข้น 0.1 และ 1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

3. การพัฒนาให้เกิดราก

นำยอดอ่อนที่ขยายได้จากสูตรอาหารที่มีฮอร์โมนที่เหมาะสมในข้อ 2. มาพัฒนาให้เกิดราก โดยนำยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน 3 - indole acetic acid (IAA) , 3 - indole butyric acid (IBA) และ naphthalene acetic acid (NAA) ขนาดความเข้มข้น 0.1 ,1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนและ $1^1/_2$ เดือน

4. การนำต้นอ่อนออกปลูก

นำต้นอ่อนที่ได้มาปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมภายนอก 2 สัปดาห์ แล้วนำมาล้างเอาวุ้นออกให้สะอาด และนำออกปลูกโดยใช้วัสดุปลูกที่มี ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ปุ๋ยคอก เท่ากับ 2 : 2 : 1 ปลูกในเรือนเพาะชำรดน้ำวันละ 1 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ให้น้ำอัตโนมัติโดยใช้เครื่องควบคุมการให้น้ำปลูกเป็นเวลา 1 - 2 เดือน เมื่อต้นอ่อนแข็งแรงดี สูงประมาณ 0.5 ฟุต สามารถนำออกปลูกในแปลงปลูกหรือปลูกในกระถางดินในสภาพธรรมชาติ

5. การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญ

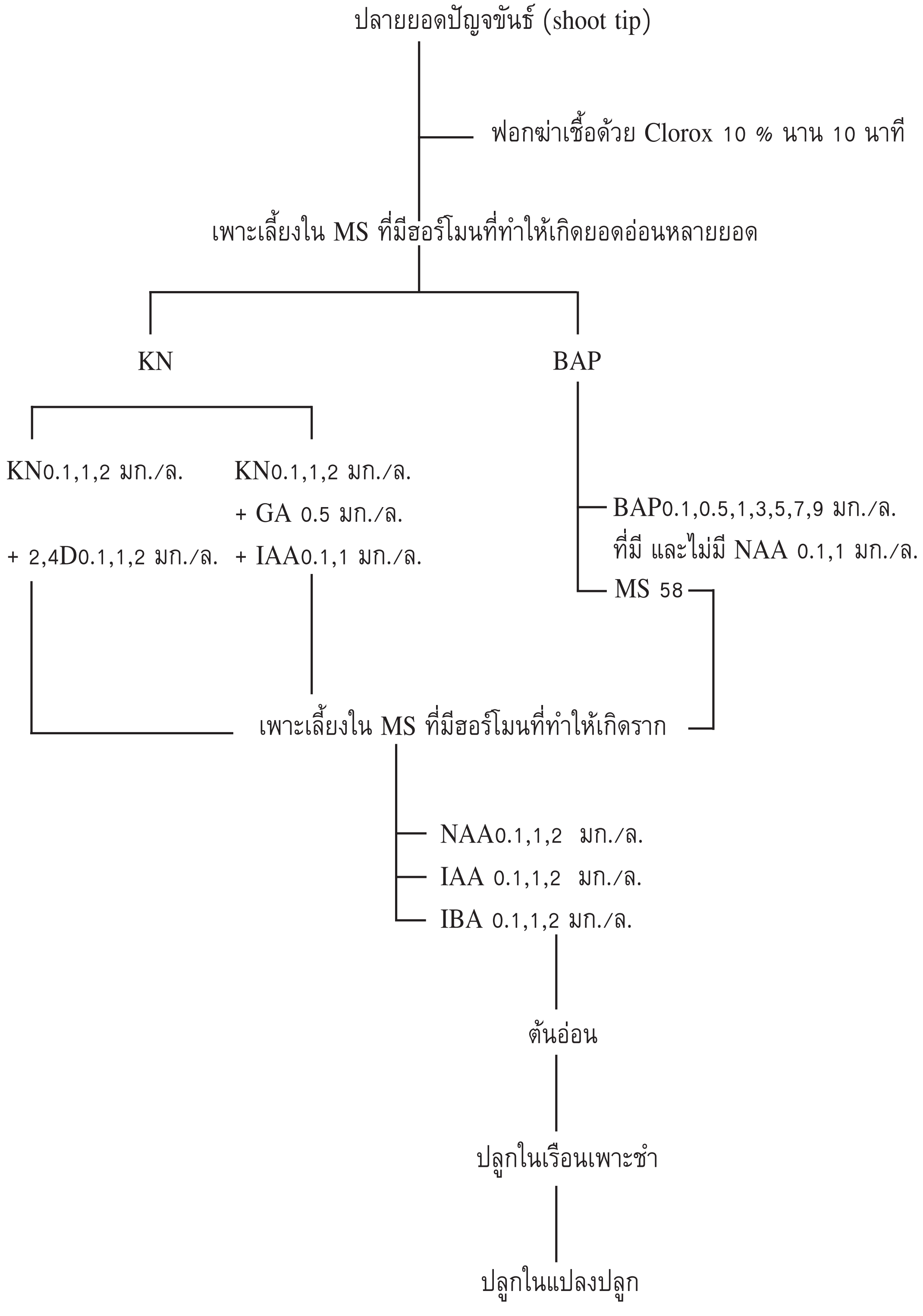
นำยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนและสายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS 58 ที่มีหรือไม่มี chitosan 0.1 % ขนาดความเข้มข้น 5 มล./ล. (C5) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนและต้นปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยที่ปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 3 เดือน มาตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของ Total Saponin.

ผลการวิจัย

จากการทดลอง การทำให้เกิดยอดอ่อนหลายยอดโดยใช้สูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP รวมกับ NAA จะทำให้จำนวนยอดและความยาวยอดเพิ่มมากกว่าการใช้ฮอร์โมน KN รวมกับ 2,4D หรือ KN รวมกับ IAA และ GA โดยที่ฮอร์โมน BAP รวมกับ NAA ขนาดความเข้มข้น 1 และ 0.1 มก./ล. มีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.8 ยอด ความยาวยอดหลักเฉลี่ย 2.4 ซม. (ตารางที่ 1 , รูปที่ 1 ,4) ฮอร์โมน KN ขนาดความเข้มข้น 2 มก./ล. รวมกับ 2,4D ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.4 ยอด ความยาวยอดหลักเฉลี่ย 1.17 ซม. (ตารางที่ 2) ฮอร์โมน KN ขนาดความเข้มข้น 2 มก./ล. รวมกับ IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. รวมกับ GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล. มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.6 ยอด ความยาวยอดหลักเฉลี่ย 1.7 ซม. (ตารางที่ 3 , รูปที่ 2) เมื่อนำสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. มาปรับปรุงความสมบูรณ์ของอาหารด้วย GA ขนาดความเข้มข้น 5 มก./ล. Citric acid ขนาดความเข้มข้น 150 มก./ล. และเพิ่มเหล็กเท่าตัว ทำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 4.3 ยอด และความยาวยอดหลักเฉลี่ย 2.4 ซม. (ตารางที่ 1, รูปที่ 3,4) เมื่อนำยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดรากโดยใช้สูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน NAA , IAA และ IBA ขนาดความเข้มข้น 0.1 , 1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ $1^{1}/_{2}$ เดือน (ตารางที่ 4,5 , รูปที่ 5 ,6,7,8) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ฮอร์โมน IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ความยาวยอดหลัก เปอร์เซ็นต์ต้นที่สูงเกิน 3 ซม. มากที่สุดเฉลี่ย 85 % , 3.3 ซม. และ 40 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4 , รูปที่ 5) IBA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. จะมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุดที่ 4 ราก (ตารางที่ 4) IAA ขนาดความเข้มข้น 2 มก./ล. มีความยาวรากเฉลี่ยสูงที่สุดที่ 3.8 ซม. (ตารางที่ 4) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา $1^{1}/_{2}$ เดือน IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. จะมีจำนวนรากเฉลี่ย 7.4 ราก ความยาวยอดหลักเฉลี่ย 4.2 ซม. และเปอร์เซ็นต์ต้นที่สูงเกิน 3 ซม. มากที่สุด 92.8 % (ตารางที่ 5 , รูปที่5,8) ส่วนฮอร์โมน IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากและความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดมีค่าเท่ากับ 93.3 % และ 5.7 ซม. ตามลำดับ (ตารางที่ 5 , รูปที่ 5,8) ส่วนฮอร์โมน NAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 ,1 และ 2 มก./ล. ทำให้เกิดรากได้แต่ต้นจะเตี้ย และเกิด Callus (ตารางที่ 5, รูปที่ 9) ฮอร์โมน IAA , IBA , NAA ทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยประมาณ 1 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 ถึง $1^{1}/_{2}$ เดือน (ตารางที่ 4, 5) ต้นอ่อนสามารถนำออกปลูกในเรือนเพาะชำในสภาพธรรมชาติและมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 94.25 % เมื่อปลูกได้ 1 เดือน (ตารางที่ 6 , รูปที่ 10A , 10B)

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญ total saponin ยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS58 และ MS58+C5 เป็นเวลา 1 เดือน (ตารางที่ 7 , รูปที่ 11) มีค่า total saponin เท่ากับ 5.10 % และ 5.08 % ตามลำดับ ยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS58 และ MS58+C5 เป็นเวลา 1 เดือน มีค่า total saponin เท่ากับ 5.21 % และ 5.45 % (ตารางที่ 7 , รูปที่ 11) ต้นปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยที่ปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 3 เดือน (ตารางที่ 7, รูปที่ 10C) มีค่า total saponin เท่ากับ 6.67%

แผนผังแสดงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของปัญจขันธ์



ตารางที่ 1 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดหลักเฉลี่ยของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP ขนาดความเข้มข้น 0.1 , 0.5 ,1 ,3 , 5 , 7 ,9 มก./ล. อย่างเดียวหรือร่วมกับ NAA ขนาดความเข้มข้น 0.1, 1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ระดับฮอร์โมน		จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	ความยาวยอดหลักเฉลี่ย (ซม.)
BAP (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)		
1	0.1	2.8	2.4
3	0.1	1.9	2.0
5	0.1	1.7	1.7
7	0.1	1.6	1.7
9	0.1	1.5	1.5
1	-	2.1	1.9
3	-	1.8	1.8
5	-	1.6	1.5
7	-	1.4	1.2
9	-	1.4	1
0.1	0.1	1.2	1.2
0.1	1	1.2	1
0.5	0.1	1	0.9
0.5	1	1	0.8
MS 58		4.3	2.4

<u>**หมายเหตุ**</u> MS 58 = สูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP 0.1 มก./ล. รวมกับ GA 5 มก./ล. Citric acid 150 มก./ล. และเพิ่มเหล็กเท่าตัว

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดหลักเฉลี่ยของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน KN0.1 ,1 และ 2 มก./ล. รวมอยู่กับ 2,4D0. 1 ,1, และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ระดับฮอร์โมน		จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	ความยาวยอดหลักเฉลี่ย (ซม.)
KN (มก./ล.)	2,4D (มก./ล.)		
0.1	0.1	1.25	1.28
1	0.1	1.00	0.73
2	0.1	1.05	0.82
0.1	1	1.00	0.80
1	1	1.05	1.10
2	1	1.40	1.17
0.1	2	1.00	0.79
1	2	1.20	0.87
2	2	1.40	0.81

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดหลักเฉลี่ยของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน KN0.1 ,1, 2 มก./ล. , IAA0.1 และ 1 มก./ล. และ GA 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ระดับฮอร์โมน			จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	ความยาวยอดหลักเฉลี่ย (ซม.)
KN (มก./ล.)	IAA (มก./ล.)	GA (มก./ล.)		
0.1	-	0.5	1.1	1.6
1	-	0.5	1.5	1.5
2	-	0.5	1.6	1.3
0.1	0.1	0.5	1.4	1.5
1	0.1	0.5	1.5	1.5
2	0.1	0.5	1.6	1.2
0.1	1	0.5	1.1	1.4
1	1	0.5	1.3	1.2
2	1	0.5	1.6	1.7

ตารางที่ 4 แสดงความยาวยอดหลักเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์ต้นที่สูงเกิน 3 ซม. จำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของยอดอ่อนปัญจขันธ์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บนอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมน NAA , IAA และ IBA ขนาดความเข้มข้น 0.1 ,1 และ 2 มก./ล.

ระดับฮอร์โมน NAA/IAA/IBA(มก./ล.)	ความยาวยอดหลักเฉลี่ย (ซม.)	เปอร์เซ็นต์ต้นที่สูงเกิน 3 ซม.	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก)	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	หมายเหตุ
NAA0.1	1.5	25	1	3.2	3.4	82.5	รากมี callus
NAA1	1.4	0	1	2.0	1.5	60.0	รากมี callus
NAA2	1.2	0	1	1.2	0.8	15.0	รากมี callus
IAA0.1	3.3	40	1	2.9	2.2	85.0	
IAA1	3.0	40	1	2.8	2.7	80.0	
IAA2	2.4	10	1	3.6	3.8	72.2	
IBA0.1	2.5	15	1	4.0	2.8	84.3	
IBA1	2.8	10	1	3.7	3.7	85.0	
IBA2	2.3	15	1	3.3	2.2	66.6	

○ = เครื่องหมายแสดงจำนวนที่มากที่สุด

ตารางที่ 5 แสดงความยาวยอดหลักเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์ต้นที่สูงเกิน 3 ซม. จำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของยอดอ่อนปัญจขันธ์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา $1^1/_2$ เดือน บนอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมน NAA , IAA และ IBA ขนาดความเข้มข้น 0.1 ,1 และ 2 มก./ล.

ระดับฮอร์โมน NAA/IAA/IBA(มก./ล.)	ความยาวยอดหลักเฉลี่ย (ซม.)	เปอร์เซ็นต์ต้นที่สูงเกิน 3 ซม.	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก)	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	หมายเหตุ
NAA0.1	2.6	42.8	1.10	4.2	3.5	90.0	รากมี callus
NAA1	1.8	14.2	1.10	4.0	2.0	70.8	รากมี callus
NAA2	1.3	14.2	1.00	3.8	1.7	36.6	รากมี callus
IAA0.1	4.0	78.6	1.10	7.0	5.7	93.3	
IAA1	4.2	92.8	1.15	7.4	4.9	90.5	
IAA2	3.9	64.3	1.15	5.1	4.1	80	
IBA0.1	3.2	64.3	1.30	6.4	5.7	85	
IBA1	2.8	42.8	1.00	6.7	4.2	90.9	
IBA2	2.5	42.8	1.15	6.8	3.3	80	

○ = เครื่องหมายแสดงจำนวนที่มากที่สุด

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปัญจขันธ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ปลูกในเรือนเพาะชำ หลังย้ายปลูก 1 เดือน

ครั้งที่	จำนวนต้นที่เริ่มปลูก	จำนวนต้นที่รอดชีวิต หลังปลูก 1 เดือน	เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต หลังปลูก 1 เดือน
1	100	90	90
2	100	94	94
3	100	100	100
4	100	93	93
รวม	400	377	94.25

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ total saponin ของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนและไทย เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS58 และ MS58+C5 เป็นเวลา 1 เดือน และเปอร์เซ็นต์ total saponin ของต้นปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยที่ปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 3 เดือน

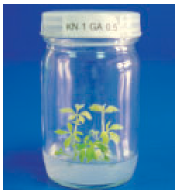
สูตรอาหาร	total saponin (%) ของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	total saponin (%) ของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทย เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	total saponin (%) ของต้นปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทย ที่ปลูกในเรือนเพาะชำ เป็นเวลา 3 เดือน
MS58	5.10	5.21	-
MS58+C5	5.08	5.45	-
-	-	-	6.67

รูปที่ 1 แสดงยอดอ่อนปัญจขันธ์เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP ขนาดความเข้มข้น 1,3,5,7,9 มก./ล. และ NAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

รูปที่ 2 แสดงยอดอ่อนปัญจขันธ์ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน KN ขนาดความเข้มข้น 0.1,1, 2 มก./ล. , IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 และ 1 มก./ล. และ GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

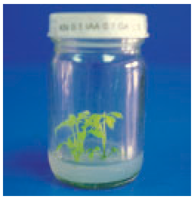
A

B

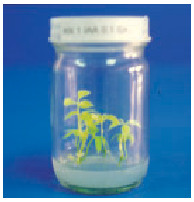


C

D



E



F

G

H

I

J

A = KN ขนาดความเข้มข้น 0.1,1,2 มก./ล. , IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 และ 1 มก./ล., GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

B = KN ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. , GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

C = KN ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. , GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

D = KN ขนาดความเข้มข้น 2 มก./ล. , GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

E = KN ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. , IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. , GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

F = KN ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. , IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. , GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

G = KN ขนาดความเข้มข้น 2 มก./ล. , IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. , GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

H = KN ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. , IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. , GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

I = KN ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. , IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. , GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

J = KN ขนาดความเข้มข้น 2 มก./ล. , IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. , GA ขนาดความเข้มข้น 0.5 มก./ล.

รูปที่ 3 แสดงยอดอ่อนปัญจขันธ์เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับ GA 5 มก./ล. , citric acid 150 มก./ล. และเพิ่มเหล็กเท่าตัว

A

B

A = เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

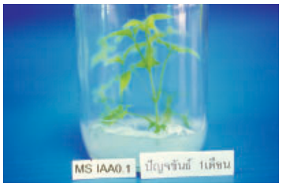
B = เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

รูปที่ 4 เปรียบเทียบอาหารสูตร MS 58 และ BAP 1 NAA 0.1

รูปที่ 5 แสดงรากของยอดอ่อนปัญจขันธ์ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล.

A

B



C

D

E

F

A = IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 ,1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

B = IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 ,1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา $1^1/_2$ เดือน

C = IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

D = IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

E = IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา $1^1/_2$ เดือน

F = IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา $1^1/_2$ เดือน

รูปที่ 6 แสดงรากของยอดอ่อนปัญจขันธ์ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน IBA ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล.

A **B**

A = IBA ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

B = IBA ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา $1^{1}/_{2}$ เดือน

รูปที่ 7 แสดงรากของยอดอ่อนปัญจขันธ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมน NAA 0.1,1 และ 2 มก./ล.

A **B**

A = NAA ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

B = NAA ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา $1^{1}/_{2}$ เดือน

รูปที่ 8 แสดงความยาวยอดและรากของยอดอ่อนปัญจขันธ์ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน IAA,IBA และNAA ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา$1^{1}/_{2}$ เดือน

A **B** **C** **D** **E**

A = IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล.

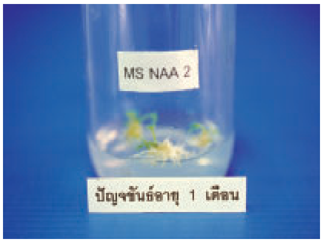
B = IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล.

C = IAA ขนาดความเข้มข้น 2 มก./ล.

D = IBA ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. **(จากซ้ายไปขวา)**

E = NAA ขนาดความเข้มข้น 0.1,1 และ 2 มก./ล. **(จากซ้ายไปขวา)**

รูปที่ 9 แสดงการเกิดรากและ callus ของปัญจขันธ์ในสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน NAA ขนาดความเข้มข้น 2 มก./ล. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 10 แสดงต้นปัญจขันธ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

A

B

C

A เริ่มปลูกในเรือนเพาะชำ

B หลังจากปลูกในเรือนเพาะชำได้ 1 เดือน

C หลังจากปลูกในเรือนเพาะชำได้ 3 เดือน

รูปที่ 11 แสดงยอดอ่อนของปัญจขันธ์สายพันธุ์จีน และสายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS58 , MS58+C5 เป็นเวลา 1 เดือน

จากซ้ายไปขวา ปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS58 และ MS58+C5 เป็นเวลา 1 เดือน
ปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS58 และ MS58+C5 เป็นเวลา 1 เดือน

วิจารณ์

สูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. รวมกับ GA ขนาดความเข้มข้น 5 มก./ล. รวมกับ citric acid 150 มก./ล. และเพิ่มเหล็กเท่าตัว เมื่อเพาะเลี้ยงปัญจขันธ์เป็นเวลา 1 เดือน ทำให้จำนวนยอดหลักเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4.3 ยอด เนื่องจากฮอร์โมน GA ทำให้ยอดสูงขึ้น citric acid ป้องกันสารสีน้ำตาลที่ออกมาในอาหาร เหล็กช่วยทำให้ใบแข็งแรงไม่ร่วง ฮอร์โมน IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ทำให้เกิดรากดีที่ 1 เดือน ส่วนฮอร์โมน IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. ทำให้เกิดรากและต้นที่สมบูรณ์ เมื่อเพาะเลี้ยงไป $1^{1}/_{2}$ เดือน เนื่องจากฮอร์โมน IAA สลายตัวง่าย จะลดลง 40 % ภายใน 1 สัปดาห์เท่านั้น[15] การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปัญจขันธ์ มีประโยชน์ด้านการขยายพันธุ์พืชสายพันธุ์ที่มีคุณภาพ มีสารสำคัญสูง เพื่อให้ได้พืชที่ปลอดโรคจำนวนมาก การขยายพันธุ์ยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนและสายพันธุ์ไทยในสูตรอาหาร MS58 และ MS58+C5 เป็นเวลา 1 เดือน มีค่า total saponin ของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนเท่ากับ 5.10 % และ 5.08 % และของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยเท่ากับ 5.21 % และ 5.45 % ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ปลูกในแปลงปลูก ค่าเกณฑ์มาตรฐานของ total saponin เท่ากับ 8 % ปลูกเป็นเวลา 3 เดือน[16] การปลูกปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยในเรือนเพาะชำ 3 เดือนมีค่า total saponin เท่ากับ 6.67 % ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานในแปลงปลูกแต่สูงกว่าในขวดเนื้อเยื่อ จากการวิจัยแสดงว่าเนื้อเยื่อปัญจขันธ์ที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน สามารถสร้างสารสำคัญได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการติดตามและคัดเลือกต้นพันธุ์ที่จะนำมาขยายพันธุ์ในแปลงปลูก เพื่อให้ได้สารสำคัญในปริมาณสูงเข้าเกณฑ์มาตรฐาน การปลูกปัญจขันธ์ในเรือนเพาะชำก็สามารถสร้างสารสำคัญได้มีประโยชน์ในด้านประชาชนที่นำต้นปัญจขันธ์ไปปลูกเองตามบ้านเรือนหรือที่ร่มเงาสามารถนำต้นปัญจขันธ์ที่ปลูกเองมารับประทานเป็นยาหรืออาหารเสริมได้ การใส่ Chitosan ในปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยทำให้ได้ค่า total saponin สูงที่สุด ซึ่งแสดงว่า Chitosan มีส่วนช่วยในการเป็นสารอาหารที่บำรุงพืชให้เจริญเติบโตได้ดี และทำให้ได้สารสำคัญเพิ่มขึ้น การที่ค่า total saponin ในปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยสูงกว่าสายพันธุ์จีนเล็กน้อย ทั้งที่มีและไม่มี Chitosan เนื่องจากปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยได้ผ่านการเพาะเลี้ยงและขยายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนานกว่าสายพันธุ์จีน จากการทดลองเนื้อเยื่อพืชมีการสร้างสารสำคัญในปริมาณที่ค่อนข้างสูงถึงมากกว่า 5 % แม้ว่าใช้เวลาเพียง 1 เดือน และการใส่ Chitosan ทำให้ปริมาณ total saponin สูงขึ้น น่าจะมีการทดลองต่อไปในการเพิ่มสารอาหารอินทรีย์ตัวอื่น ๆ เพื่อให้ได้ปริมาณ total saponin เข้าเกณฑ์มาตรฐานเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อให้ได้ยาจากเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ผ่านขบวนการปลูกในแปลงปลูกได้ในอนาคต

สรุป

จากการทดลอง ฮอร์โมนที่ทำให้เกิดยอดอ่อนหลายยอดได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน คือ สูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BAP ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. รวมกับ GA ขนาดความเข้มข้น 5 มก./ล. Citric acid 150 มก./ล. และเพิ่มเหล็กเท่าตัว ทำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ย 4.3 ยอด และความยาวยอดเฉลี่ย 2.4 ซม. ฮอร์โมนที่ทำให้เกิดรากได้ดีและเกิดต้นที่สมบูรณ์ คือ ฮอร์โมน

IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 - 1 มก./ล. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 ถึง 1 $^{1}/_{2}$ เดือน โดยที่ฮอร์โมน IAA ขนาดความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยง 1 - 1 $^{1}/_{2}$ เดือน ส่วนฮอร์โมน IAA ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. จะทำให้เกิดรากและต้นที่สมบูรณ์ที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 $^{1}/_{2}$ เดือน ฮอร์โมน IBA สามารถทำให้เกิดรากได้ดีแต่ต้นจะเตี้ยกว่า ใบเล็กกว่าการใช้ฮอร์โมน IAA ฮอร์โมน NAA ทำให้เกิดรากได้แต่ต้นจะเตี้ยและรากเกิดแคลลัส ต้นอ่อนที่ได้นำมาปลูกในเรือนเพาะชำ มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ย 94.25 % เมื่อปลูกได้ 1 เดือน

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญ total saponin ในยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนและสายพันธุ์ไทย ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS 58 และ MS 58+C5 เป็นเวลา 1 เดือน มีค่า total saponin ของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนเท่ากับ 5.10 % และ 5.08 % และของยอดอ่อนปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยเท่ากับ 5.21 % และ 5.45 % ตามลำดับ ต้นปัญจขันธ์สายพันธุ์ไทยที่ปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 3 เดือน มีค่า total saponin เท่ากับ 6.67 %

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณเย็นจิตร เตชะดำรงสิน ที่กรุณาประสานงานด้านการให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และให้ต้นปัญจขันธ์สายพันธุ์จีนจากสถาบันการแพทย์แผนไทย - จีน เอเซียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

ขอขอบคุณ นายแพทย์ชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง ผู้อำนวยการสถาบันการแพทย์ไทย - จีน เอเซียตะวันออกเฉียงใต้ ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในด้านการวิจัยและขอขอบคุณ คุณวารุณี จิรวัฒนาพงศ์ ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร ที่ช่วยตรวจวิเคราะห์ total saponin

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สมุนไพรน่ารู้ (2) ปัญจขันธ์ *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino พิมพ์ที่โรงพิมพ์การศาสนา พิมพ์ครั้งที่ 1 มีนาคม พ.ศ. 2548 หน้า 1 - 104.
2. Li L , JiaoL , Lau BH. Protective effect of gypenosides against oxidative stress in phagocytes , vascular endothelial cells and liver microsomes. Cancer Biother. 1993 ; 8 (3) : 263 - 272.
3. Ma Z , Yang Z. The scavenging effects of Astragalus and *Gynostemma pentaphyllum* with its production on O_2 - and OH. Zhong Yao Cai. 2003 ; 22 (6) : 303 - 306. [Abstract]
4. Kawpinit D. The pharmacological activities of *Gynostemma pentahyllum* Makino. (Thesis)

Faculty of Graduate Studies , Chiangmai University. 1993.

5. La Cour B , Molgaard P , Y ; Z. Traditional Chinese in treatment of hyperlipidemia. J Ethnopharmaclo. 1995 ; 46 (2) : 125 - 129.

6. Hou J , Liu S , Ma Z , Lang X , Wang J , Wang J and Liagn Z. Effects of *Gynostemma pentaphyllum* Makino on the immunological function of cancer patients . J Tradit Chin Med. 1991 ; 11 : 47 - 52.

7. Liao DF , Lu N Lei L S , Yu L and Chen JX. Effects of gypenosides on mouse splenic lymphocyte transformation and DNA polymerase II activity in vitro. Zhongguo Yao Li Xae Bao. 1995 , 16 : 322 - 324.

8. Wang C, Wang X , Li Y , Deng S , Jiang Y , Yue L. A preliminary observation of preventive and blocking effect of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino on esophageal cancer in rats. Hua His I K o Ta Hsueh H sueh Pao. 1995 ; 26 (4) : 430 - 432. [Abstract]

9. Tan H , Lui ZL , Lui M J. Antithrombotic effect of Gynostemma pentaphyllum. Chung Kuo Chung His Chih Ho Tsa Chih 1993 ; 13 (5) : 278 - 280. [Abstract]

10.Lin JM , LinCC , Chiu HF , Yang JJ , Lee SG Evaluation of anti-inflammatory and liver protect effect An Anoectochilus formosanus , Ganoderma lucidum and Gynostemma penaphyllum in rats. Am J Clin Med. 1993 ; 21 (1) : 59 - 69.

11.กัลยา อนุลักขณาปกรณ์ ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก บรรจง ชาวไร่ ยุวดี เมตตาเมธา เย็นจิตร เตชะดำรงสิน ธิดารัตน์ ปลื้มใจ และจารีย์ บันสิทธิ์ การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของปัญจขันธ์ (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) ในหนูขาว รายงานห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ , นนทบุรี 2547.

12. Poomecome W. Hypoglycemic activity of extract from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. [Thesis] Faculty of Graduate Studies , Chiangmai University 1999.

13. Jiang-Xu New Medical College. Jiao - Gu - Lan. Zhong - Yao - Da - Zhi - Dian . Sci.& Tech., Shanghai. 1979 : p. 16 - 17. (in Chinese)

14.เย็นจิตร เตชะดำรงสิน ธิดารัตน์ บุญรอด จารีย์ บันสิทธิ์ วารุณี จิรวัฒนาพงศ์ ประไพ วงศ์สินคงมั่น ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก และจิรานุช มิ่งเมือง ปราณี ชวลิตธำรง คุณภาพทางเคมีของปัญจขันธ์ สมุนไพรน่ารู้ (2) ปัญจขันธ์ พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์กรมการศาสนา 2548 หน้า 45- 82.

15. Mohammed , G. H. and Vidaver , W. E. Root production and plantlet development in tissue - cultured conifers. Plant Cell , Tiss and Org. Cult. 1988 , 14: 137 - 160.

16.เย็นจิตร เตชะดำรงสิน และคณะ แนวทางการผลิตวัตถุดิบปัญจขันธ์ในประเทศไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข พิมพ์ที่ ร้านพุ่มทอง 1 สิงหาคม 2548 หน้า 9 - 19.