Research Article

Received: August 22, 2019; Accepted: March 9, 2020

การชักนำให้เกิดแคลลัส และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสรางจืด

Callus Induction and Antioxidant Contents in Callus Cultures of *Thunbergia laurifolia*

เยาวพา จิระเกียรติกุล*, ภาณุมาศ ฤทธิไชย,
ขวัญข้าว เมืองเขียว และปิยะมาศ ไพโรจน์
สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Yaowapha Jirakiattikul*, Panumart Rithichai,
Khwankhao Mueangkhiao and Piyamas Pairoj
Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,
Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

รางจืด *(Thunbergia laurifolia* Lindl.*)* เป็นพืชสมุนไพรที่ดอกและใบมีสารอนุมูลอิสระสูง ใช้กำจัดสารพิษในร่างกาย การเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นรูปแบบหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ 2,4-D, NAA และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบรางจืดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างกัน เปรียบเทียบกับยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบที่ตัดจากยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ NAA ความเข้มข้น 0.5-1.0 mg/L เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L เปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (สิ่งทดลองควบคุม) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบพัฒนาเป็นแคลลัสได้บนอาหารทุกสูตรยกเว้นสิ่งทดลองควบคุม โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5-1.0 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L มีน้ำหนักสดและแห้งสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารสูตรอื่น เมื่อนำแคลลัสของรางจืดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L เป็นระยะเวลา 4, 5 และ 6 สัปดาห์ มาวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับยอดรางจืดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ และใบ

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** yjirakia@tu.ac.th

จากต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 4-6 สัปดาห์ และยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด 64.41±1.29 ถึง 67.29±3.17 mg GAE/g dry extract สารฟลาโวนอยด์ 44.38±11.61 ถึง 54.60±9.22 mg CE/g dry extract และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} 15.93±1.33 ถึง 18.99±0.86 µg/mL สูงกว่าค่าดังกล่าวของใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ : รางจืด; ระยะเวลาเพาะเลี้ยง; แคลลัส; ฟีนอลิค; ฟลาโวนอยด์

Abstract

Thunbergia laurifolia Lindl. is a medicinal plant which its flowers and leaves contain high antioxidants and use to detoxify poison from human body. Callus culture is one of plant tissue culture techniques that benefits to produce secondary metabolites of medicinal plants. Therefore, the objectives of this study were to investigate the effect of 2,4-D, NAA and BA at various concentrations for callus induction from *in vitro* leaf explants and antioxidant contents of *T. luarifolia* callus at different culture periods comparing to *in vitro* regenerated shoot and *in vivo* leaf. For callus induction, *in vitro* leaf explants were cultured on MS medium supplemented with 0.5-1.0 mg/L 2,4-D and NAA only or in combination with 0.5 mg/L BA comparing to MS medium without plant growth regulator (control treatment) for 6 weeks. The results showed that callus induction occurred on all test media except control treatment. MS medium supplemented with 0.5-1.0 mg/L NAA in combination with 0.5 mg/L BA, and MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D in combination with 0.5 mg/L BA gave the highest callus fresh and dry weight. Antioxidant contents of 5, 6, and 7 week-old-calli cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA were investigated comparing to *in vitro* regenerated shoot and *in vivo* mature leaf. It was found that the four, five and six-week-old-calli and *in vitro* shoot exhibited greater total phenolic contents (64.41±1.29 - 67.29±3.17 mg GAE/g dry extract), flavonoid contents (44.38±11.61 - 54.60±9.22 mg CE/g dry extract), and DPPH radical scavenging activities (with the EC_{50} values in a range of 15.93±1.33 - 18.99±0.86 µg/mL), than those of *in vivo* mature leaf.

Keywords: *Thunbergia laurifolia*; culture period; callus; phenolic; flavonoid

1. บทนำ

รางจืด *(Thunbergia laurifolia* Lindl.*)* เป็นไม้เถา ใบมีสีเขียว เป็นใบเดี่ยวขอบหยักเล็กน้อย กลีบดอกมีสีม่วง 5 กลีบติดกัน ใจกลางดอกเป็นสีเหลือง มีสรรพคุณในการล้างพิษ ลดอาการอักเสบ แก้เบาหวาน ลดไข้ สารทุติยภูมิที่พบในใบ ได้แก่ iridoid glucoside, grandifloric acid, glucopyranoside และ apigenin [1] นอกจากนี้ยังพบสารฟลาโวนอยด์ เช่น apigenin,

casmosiin, delphinidin-3-5-di-O-β-D-glucoside and chorogenic acid [2] ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของใบรางจืดเมื่อสกัดด้วยน้ำ พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด 2433.9 mg GAE/100 g และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} 0.129±0.01 mg GAE/mL [3] ด้วยสรรพคุณของรางจืดจึงได้นำมาขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยเพิ่มจำนวนต้นและชักนำให้เกิดราก [4] อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงแคลลัสหรือเซลล์พืชก็เป็นอีกวิธีหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อนำมาผลิตสารทุติยภูมิ [5] ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสและปริมาณสารทุติยภูมิในแคลลัสรางจืดโดยสารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulator) ทั้งออกซินและไซโทไคนินเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส [6] มีรายงานผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อชักนำให้เกิดแคลลัสของพืชในวงศ์ Acanthaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกันกับรางจืดแล้ว เช่น *Asteracantha longifolia* Nees [7] และ *Justicia betonica* Linn. [8] พบว่าอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม NAA และ BA สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี ส่วน 2,4-D เป็นสารในกลุ่มออกซินอีกชนิดที่นิยมนำมาใช้ และมีประสิทธิภาพต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของพืช [6] งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบรางจืดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อและวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในแคลลัสรางจืด เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับการปลูกในธรรมชาติ โดยเซลล์พืชมีข้อมูลทางพันธุกรรมและสามารถควบคุมหน้าที่ต่าง ๆ รวมถึงกระบวนการชีวสังเคราะห์สารทุติยภูมิ [9] ซึ่งการผลิตสารทุติยภูมิจากพืชสมุนไพรในสภาพควบคุมด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนี้ มีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ให้คุณภาพสม่ำเสมอ ไม่เปลี่ยนแปลงตามสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ รวมถึงใช้เวลาสั้นกว่าการปลูกพืชทั่วไป [5]

อย่างไรก็ตาม ในการผลิตสารทุติยภูมิหรือสารต้านอนุมูลอิสระด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น พบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณสารทุติยภูมิ ดังที่มีรายงานในยอดหัวข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) [10] เซลล์แขวนลอยของ *Salvia miltiorrhiza* [11] แคลลัสของ *Dioscorea floribunda* [12] และยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) [13] เป็นต้น การนำเนื้อเยื่อพืชมาสกัดสารทุติยภูมิในเวลาที่เหมาะสมจะทำให้ได้สารในปริมาณที่สูง โดยไม่ต้องเสียเวลาในการเพาะเลี้ยงนานเกินไปหรือผลิตสารได้ช้า ซึ่งยังไม่มีรายงานถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสรางจืดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างกัน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ NAA 2,4-D และ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสรางจืด เปรียบเทียบกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดรางจืดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อและใบรางจืดที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำยอดรางจืดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมาย้ายเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 mg/L และ GA_3 ความเข้มข้น 0.4 mg/L เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ นำยอดมาตัดเอา

เฉพาะส่วนใบ โดยใช้ใบที่โตเต็มที่ ตัดให้มีขนาด 0.5 × 0.5 cm แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mg/L เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L โดยอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสิ่งทดลองควบคุม อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลทรายความเข้มข้น 30 g/L และวุ้น 8 g/L ปรับ pH ของอาหารเท่ากับ 5.6 ด้วย NaOH จากนั้นนำไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 ºC ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design มี 9 สูตรอาหาร แต่ละสูตรอาหารมี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (1 ขวดมี 1 ชิ้นใบ) เมื่อครบระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง บันทึกการเกิดแคลลัส (%) น้ำหนักสดและแห้งของแคลลัส (mg) โดยอบที่อุณหภูมิ 50 ºC นาน 48 ชั่วโมง

2.2 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

เพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L (จากผลการทดลองที่ 2.1) เป็นระยะเวลา 4 5 และ 6 สัปดาห์ (รูปที่ 1 A ถึง C) ที่อุณหภูมิ 25±2 °C และให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อครบระยะเวลาการเพาะเลี้ยง นำแคลลัสไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง นอกจากนี้นำยอดรางจืดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 mg/L และ GA_3 ความเข้มข้น 0.4 mg/L นาน 6 สัปดาห์ (รูปที่ 1 D) และใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ อายุประมาณ 5 สัปดาห์ (รูปที่ 1 E) อบที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างแห้งทั้ง 5 สิ่งทดลอง มาสกัดตามวิธี Jaiarree [14] ด้วย ethanol ความเข้มข้น 95 % ในอัตราตัวอย่างแห้ง : ethanol เท่ากับ 1 : 3 สกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งสกัดนาน 3 วัน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยในตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 72 ชั่วโมง จนสารสกัดตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Folin และ Ciocalteu [15] สารฟลาโวนอยด์ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhu และคณะ [16] และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีการของ Yamasaki และคณะ [17] โดยขั้นตอนการวิเคราะห์ตามรายงานใน Autaijamsripon และคณะ [18] วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) มี 5 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

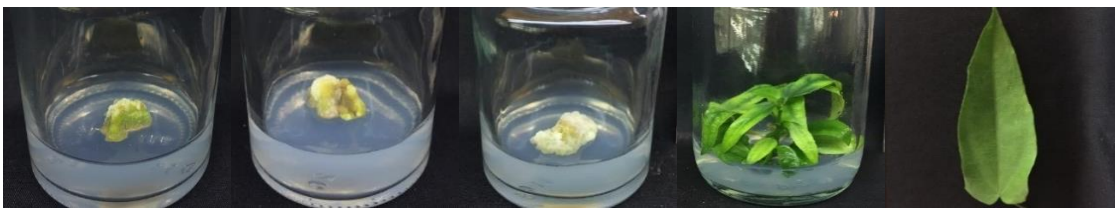

Figure 1 (A) four-week-old callus, (B) five-week-old callus, and (C) six-week-old callus, (D) six-week-old regenerated shoots, and (E) *in vivo* mature leaf of *T. laurifolia* Lindl.

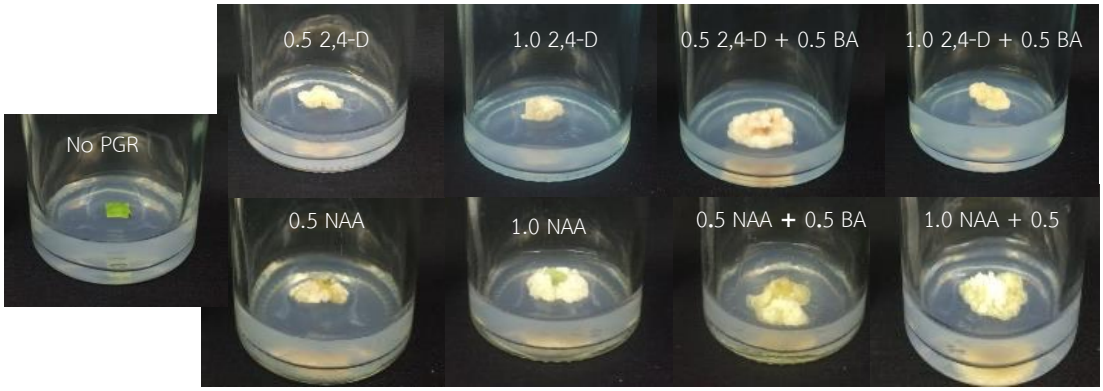

Figure 2 callus development after leaf segments were cultured on MS medium supplemented with 0.5-1.0 mg/L 2,4-D and NAA only or in combination with 0.5 BA mg/L comparing to control treatment (MS medium without plant growth regulator, no PGR) for 6 weeks.

3. ผลการทดลอง

3.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส

ชิ้นส่วนใบรางจืดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D หรือ NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L พบว่าสามารถพัฒนาเป็นแคลลัส 100 % ส่วนชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (สิ่งทดลองควบคุม) ไม่มีการพัฒนาของแคลลัส (รูปที่ 2) แคลลัสที่พัฒนามีลักษณะเป็นแบบ compact callus น้ำหนักสดและแห้งของแคลลัส พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L, NAA ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L มีน้ำหนักสด 457.77±39.47, 446.12±25.86 และ 406.2±99.02 mg ตามลำดับ และมีน้ำหนักแห้ง 55.30±8.42, 56.22±4.13 และ 53.15±11.78 mg ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารสูตรอื่น ๆ (รูปที่ 3 A และ 3 B)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตจำเป็นต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นแคลลัสของชิ้นส่วนใบรางจืด โดยชิ้นส่วนใบพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D หรือ NAA ร่วมกับ BA ซึ่งแคลลัสดีกว่าอาหารที่เติม 2,4-D และ NAA เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจาก 2,4-D และ NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่มีสมบัติต่อการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสและเจริญเติบโตได้ดี ส่วน BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินที่มีสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ [19] เมื่อนำมาใช้ร่วมกันจึงส่งผลดีต่อการแบ่งเซลล์ของพืช โดยเฉพาะเมื่อใช้ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L แคลลัสมีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับพืชในวงศ์ Acanthaceae ชนิดอื่นที่ใช้ NAA และ BA ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การเพาะเลี้ยงลำต้นของ *Asteracantha longifolia* Nees บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/L พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด 86.7±4.4 % [7] และ

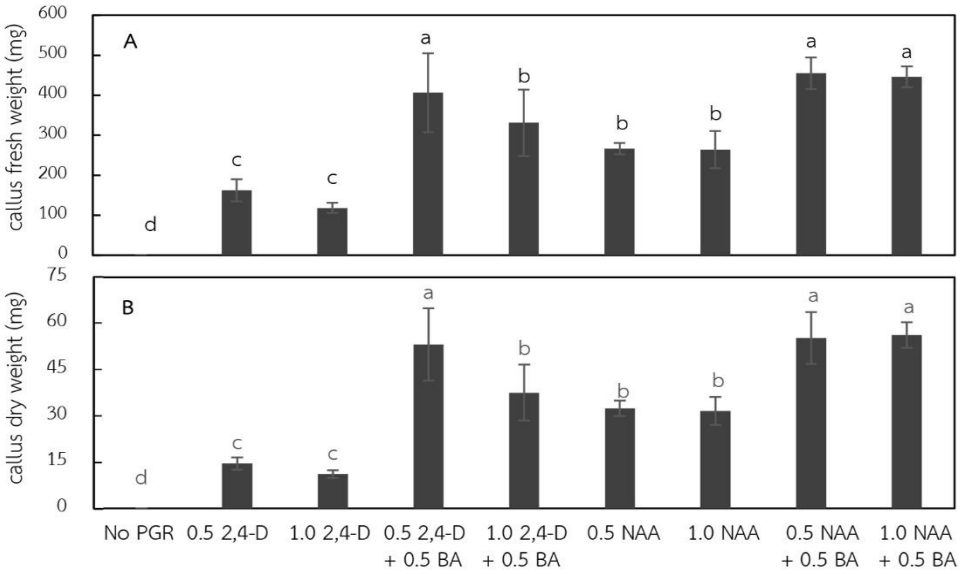

Figure 3 (A) fresh weight, and (B) dry weight of callus cultured on MS medium supplemented with 0.5-1.0 mg/L 2,4-D and NAA only or in combination with 0.5 BA mg/L comparing to control treatment (no PGR) for 6 weeks.

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและลำต้นของ *Justicia betonica* Linn. บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด [8] อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นที่ใช้ก็จะแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด ซึ่งผลการทดลองนี้ได้นำไปขยายเพิ่มจำนวนแคลลัสบนอาหารเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อปริมาณต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของแคลลัสรางจืดที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4, 5 และ 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับยอดรางจืดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ และใบรางจืดที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 4, 5 และ 6 สัปดาห์ และยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ (64.41±1.29 ถึง 67.29±3.17 mg GAE/g dry extract) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าดังกล่าวของใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ (44.77±1.94 mg GAE/g dry extract) (รูปที่ 4 A) นอกจากนี้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของแคลลัสที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 4, 5 และ 6 สัปดาห์ และยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ (44.38±11.61 ถึง 54.60±9.22 mg CE/g dry extract) สูงกว่าใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ (15.71±0.84 mg CE/g dry extract) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4 B) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติมีค่า EC_{50} 122.57±11.02 µg/mL ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 4, 5 และ 6 สัปดาห์ และยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อที่มีค่า EC_{50} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ในช่วง คือ 15.93±1.33 ถึง 18.99±0.86 µg/mL ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH นี้เป็นไปใน

ทิศทางเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ เนื่องจากสารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อแคลลัส และยอดในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารดังกล่าวสูงจึงส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงด้วยเช่นกัน

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาเพาะเลี้ยงแคลลัสรางจืดไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในพืชอื่น ๆ หลายชนิด เช่น ยอดพรมมิที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2-8 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยมีค่าอยู่ในช่วง 83.67±10.04 ถึง 100.50±5.24 mg GAE/g dry extract และ 12.48±0.38 ถึง 13.21±0.39 µg/mL ตามลำดับ [18] เช่นเดียวกันกับยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica*) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 4-12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยปริมาณสารดังกล่าวอยู่ในช่วง 54.17±0.05 ถึง 68.14±0.03 mg GAE/g dry extract และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 39.89±2.14 ถึง 49.97±9.23 µg/mL [13] อย่างไรก็ตาม มีพืชอีกหลายชนิดที่พบว่า ระยะเวลาเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณสารทุติยภูมิ เช่น รายงานของ Chen และ Chen [11] ที่พบว่าปริมาณ total cryptotanshinone และ cryptotanshinone จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *S. miliorrhiza* เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยปริมาณสารเพิ่มสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน และ De และ De [12] ที่รายงานว่าปริมาณสาร diosgenin ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *D. floribunda* เป็นเวลา 6-18 วัน พบว่าสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นนาน 9 วัน หลังจากนั้นลดลงและมีแนวโน้มคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้การทดลองยังพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของแคลลัสและยอดรางจืดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อสูงกว่าใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในธรรมชาติ สอดคล้องกับ Lashin และ Elhaw [20] ที่รายงานว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (84.2±0.4 mg/gm rutin) และกรดฟีนอลิคทั้งหมด (339.6±0.4 mg/gm gallic acid) ของแคลลัส *Physalis peruviana* ที่พัฒนาจากชิ้นส่วนใบมีปริมาณสูงกว่าผลที่ได้จากต้นที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ (76.14±0.6 mg/gm rutin และ 98.6±0.2 mg/gm gallic acid ตามลำดับ) เช่นเดียวกับ Shilpashree และ Ravishankar [21] ที่รายงานว่ายอด *Hypericum mysorense* ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงกว่ายอด และรากที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าปริมาณสารทุติยภูมิของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 4-6 สัปดาห์ และยอดรางจืดในสภาพปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีค่าสูงกว่าใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ ดังนั้นแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นที่สุด และแคลลัสมีการเจริญเติบโตที่ดี ซึ่งแคลลัสรางจืดที่ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้นี้จะเป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ต่อไป

4. สรุปผลการทดลอง

4.1 ชิ้นส่วนใบของรางจืดพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5-1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ BA 0.5 mg/L

4.2 แคลลัสรางจืดที่เพาะเลี้ยงนาน 4, 5 และ 6 สัปดาห์ และยอดรางจืดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (64.41±1.29 ถึง 67.29±3.17 mg GAE/g dry extract) สารฟลาโวนอยด์ (44.38±11.61 ถึง 54.60±9.22 mg catechin/g dry extract) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} 15.93±1.33 ถึง 18.99±0.86 µg/mL) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีค่าสูงกว่า และฤทธิ์ดีกว่าใบรางจืดที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

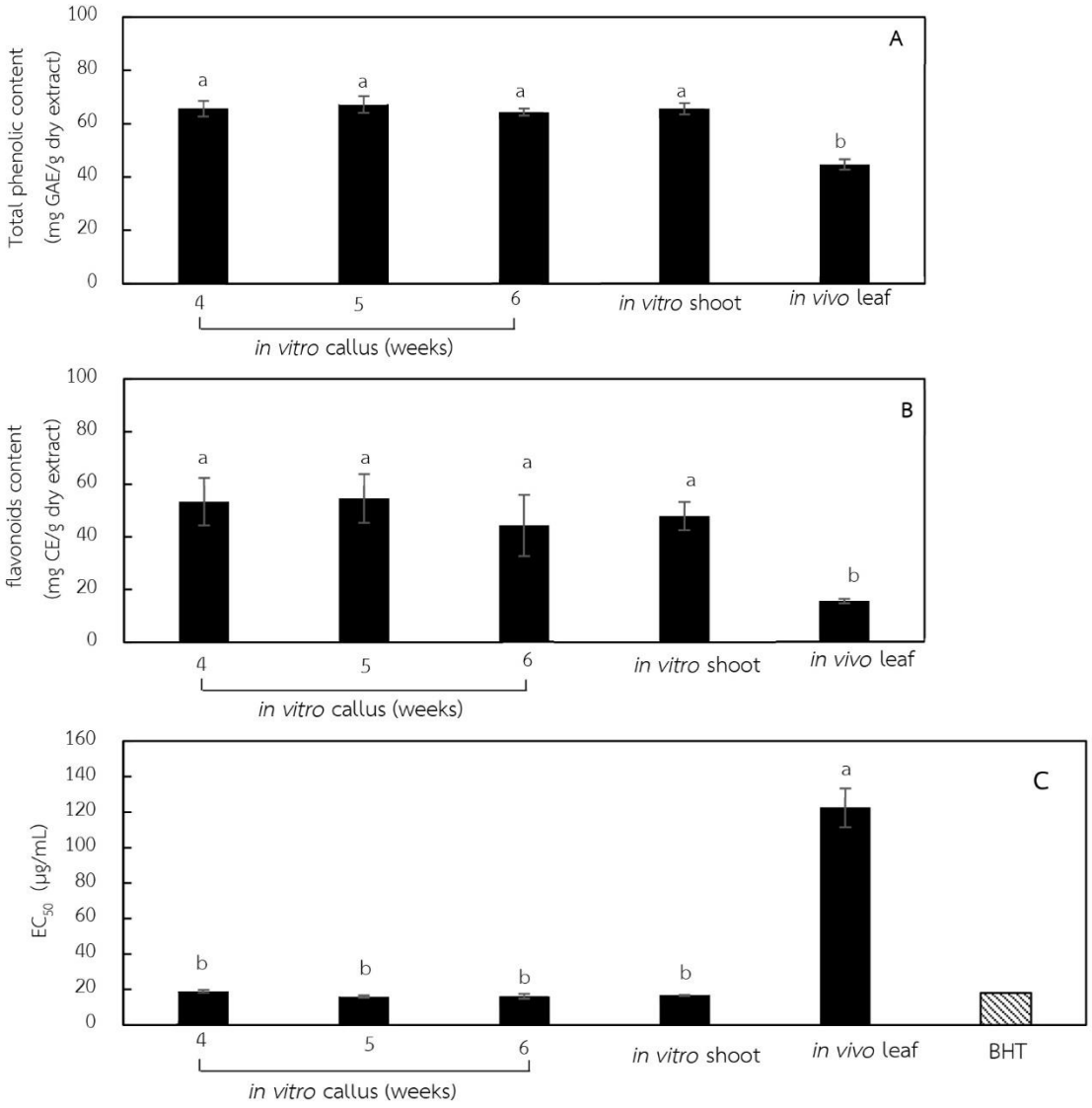

Figure 4 (A) total phenolic content, (B) flavonoid content, and (C) DPPH radical scavenging activity of *T. laurifolia* callus cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA for 4, 5 and 6 weeks (*in vitro* callus) compared to those of *in vitro* shoot and *in vivo* leaf. BHT = positive control.

5. References

[1] Chan, E.W.C., Eng, S.Y., Tan, Y.P. and Wong, Z.C., 2011, Phytochemistry and pharmacological properties of *Thunbergia laurifolia*: A review, Phcog. J. 3: 1-6.

[2] Thongsaard, W. and Marsden, C.A., 2002, A herbal medicine used in the treatment of addiction mimics the action of amphetamine on *in vitro* rats trial dopamine release, Neurosci. Lett. 329: 129-132.

[3] Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G. and Ningsanond, S., 2008, Antioxidant activity and cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) extracts, Asian J. Food Ag-Ind. 1: 116-28.

[4] Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Patchaika, S. and Songserm, K., 2018, *In vitro* propagation of *Thunbergia laurifolia* Lindl., Songklanakarin J. Plant Sci. 5: 18-24. (in Thai)

[5] Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A., 2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, Biotechnol. Adv. 20: 101-153.

[6] Phillips, G.C. and Garda, M., 2019, Plant tissue culture media and practices: An overview, *In vitro* Cell. Develop. Biol. Plant 55: 242-257.

[7] Kumar, M. and Nandi, S., 2014, Analysis of organogenic callus from internode explants of *Asteracantha longifolia* Nees, J. Genet. Eng. Biotechnol. 13: 31-37.

[8] Yaacob, J., Taha, R., Jaafar, N., Hasni, Z., Elias, H. and Mohamed, N., 2013, Callus induction, plant regeneration and somaclonal variation in *in vivo* and *in vitro* grown white shrimp plant (*Justicia betonica* Linn.), Aust. J. Crop Sci. 7: 281-288.

[9] Banthorpe, B.V., 1994, Secondary metabolism in plant tissue culture: Scope and limitations, Nat. Prod. Rep. 11: 303-328.

[10] Boonyuen, T., Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Ruangnoo, S. and Itharat, A., 2014, Dioscorealide B content of *in vitro* Khao-Yen-Tai (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) shoots at different culture periods, Khon Kaen Agric. J. 42(Suppl. 3): 306-310. (in Thai)

[11] Chen, H. and Chen, F., 2000, Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tansshinone- producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture, Proc. Biochem. 35: 837-840.

[12] De, D. and De, B., 2005, Elicitation of diosgenin production in *Dioscorea floribunda* by ethylene-generating agent, Fitoterapia 76: 153-156.

[13] Jirapongpattana, R., Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Ruangnoo, S. and Itharat, A., 2016, Secondary metabolite contents of *in vitro* Hua- Khao- Yen (*Dioscorea*

birmanica Prain & Burkill) shoots at different culture periods, Thai Sci. Technol. J. 24(1): 40-48. (in Thai)

[14] Jaiarree, N., 2010, Biological Activities of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill Extract and Its Active Ingredients, Doctoral Disseration, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani.

[15] Folin, O. and Ciocalteu, V., 1927, On tyrosine and tryptophan determination in proteins, J. Bio. Chem. 27: 627-650.

[16] Zhu. H., Wang. Y., Liu, Y., Xia, Y. and Tang, T., 2010, Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectro photometry with comparative study on different extraction technologies, Food Anal. Methods 3: 90-97.

[17] Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T., 1994, Electrochemical method for estimating the antioxidantive effect of methanol extracts of crude drugs, Chem. Pharm. Bull. 42: 1663-1665.

[18] Autaijamsripon, J., Jirakiattikul, Y., Rithichai, P. and Itharat, A., 2017, Effect of culture periods on secondary metabolite contents and antioxidant activity of *in vitro Bacopa monnieri* shoots, Thai Sci. Technol. J. 25(3): 443-452. (in Thai)

[19] Razdan, M.K., 2002, Introduction to Plant Tissue Culture, 2nd Ed., Science Publishers, Enfield. 375 p.

[20] Lashin, I. I. and Elhaw, M. H., 2016, Evaluation of secondary metabolites in callus and tissue of *Physalis peruviana*, IJMB 6: 10-17.

[21] Shilpashree, H. P. and Ravishankar, R., 2009, *In vitro* plant regeneration and accumulation of flavonoids in *Hypericum mysorense*, Int. J. Integr. Biol. 8: 43-49.