Research Article

Received: April 30, 2020; Accepted: September 17, 2020

ผลของ Methyl Jasmonate และ Salicylic Acid ต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสกะเพราแดง

Effects of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on Antioxidant Contents in Callus Cultures of Holy Basil Purple Type

ณัฐนรี ไพสิฐสกุลนาท, เยาวพา จิระเกียรติกุล* และภาณุมาศ ฤทธิไชย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Nutnaree Phaisitsakulnat, Yaowapha Jirakiattikul* and Panumart Rithichai

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับการใช้สารกระตุ้น เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการผลิตและเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ methyl jasmonate (MeJA) และ salicylic acid (SA) ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสกะเพราแดง (*Ocimum santum*) โดยนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ความเข้มข้น 2.26 µM ร่วมกับ MeJA และ SA ความเข้มข้น 0-150 µM เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design มี 7 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ พบว่าแคลลัสที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 100 และ 150 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด 144.76±8.19 และ 134.56±13.10 mg GAE/g dry extract หรือ 2.92 และ 2.71 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (49.65±1.88 mg GAE/g dry extract) มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 215.77±23.50 และ 221.72±9.75 mg CE/g dry extract หรือ 2.71 และ 2.78 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (79.67±3.88 mg CE/g dry extract) รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} 9.06±0.45 และ 9.33±0.65 µg/mL ดีกว่าสิ่งทดลองควบคุม (20.72±2.06 µg/mL) ดังนั้น MeJA ความเข้มข้น 100 และ 150 µM ส่งผลให้แคลลัสกะเพราแดงผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ภายใน 2 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงแคลลัส; กะเพราแดง; สารกระตุ้น; สารต้านอนุมูลอิสระ

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

Abstract

In vitro callus culture with elicitation is one of the most popular methods to enhance antioxidant contents. This study aimed to investigate the effects of methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) at various concentrations on total phenolic and flavonoid contents, and antioxidant activity in callus cultures of holy basil purple type (*Ocimum santum*). Callus was cultured on MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 2.26 µM 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) combined with MeJA and SA at the concentrations of 0-150 µM for two weeks. The experiment was arranged in a completely randomized design with seven treatments and three replications. Total phenolic contents of 144.76±8.19 and 134.56±13.10 mg GAE/g dry extract or 2.92 and 2.71 times of the control (49.65±1.88 mg GAE/g dry extract) were obtained from 100 and 150 µM MeJA calli. Flavonoid contents of 215.77±23.50 and 221.72±9.75 mg CE/g dry extract were also gained from 100 and 150 µM MeJA calli or 2.71 and 2.78 times of the control (79.67±3.88 mg CE/g dry extract). In addition, DPPH radical scavenging activities of 100 and 150 µM MeJA calli (EC_{50} = 9.06±0.45 and 9.33±0.65 µg/mL) were greater than that of the control (EC_{50} = 20.72±2.06 µg/mL). Therefore, 100 and 150 µM MeJA could enhance antioxidant contents of holy basil purple type callus after cultured for two weeks.

Keywords: callus culture; holy basil purple type; elicitor; antioxidant content

1. บทนำ

กะเพราแดง (*Ocimum sanctum* L. หรือ *O. tenuiflorum* Linn.) มีชื่อสามัญ คือ Holy basil จัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae เป็นพืชที่มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว [1] นิยมนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรค เช่น แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ คลื่นไส้อาเจียน นอกจากนี้กะเพราแดงยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านเชื้อจุลชีพ ต้านมะเร็ง รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง [2] เนื่องจากใบกะเพราแดงมีสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายชนิด เช่น สารในกลุ่มของอัลคาลอยด์ (alkaloid) สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สารประกอบฟีนอลิค (phenolic) แทนนิน (tannin) ซาโปนิน (saponin) น้ำมันหอมระเหย (essential oil) [3] ประโยชน์ของกะเพราแดงดังที่กล่าวมาข้างต้น รวมทั้งเป็นพืชที่มีสารทุติยภูมิหลากหลายชนิด จึงทำให้กะเพราแดงเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมการผลิตยา แต่การเพาะปลูกในสภาพธรรมชาติต้องอาศัยพื้นที่ ใช้ระยะเวลา ต้องดูแลรักษาต้นให้ปลอดจากโรคและแมลง รวมถึงต้องเก็บเกี่ยวผลผลิตในระยะที่เหมาะสม ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้อาจส่งผลต่อปริมาณสารที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการ และไม่มีคุณภาพในเชิงการค้า [4] จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

การเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้เพื่อผลิตสารทุติยภูมิทดแทนการผลิตสารจากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ มีข้อดี คือ สามารถผลิตแคลลัสและสารทุติยภูมิได้อย่างต่อเนื่อง สารที่ผลิตได้มีคุณภาพ และไม่ขึ้นกับปัจจัยทางสภาพภูมิประเทศหรือสภาพแวดล้อม

ภายนอก เนื่องจากมีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ [4] มีรายงานปริมาณสารทุติยภูมิของแคลลัสกะเพราแดงแล้วโดย Lardee (2018) [5] แต่ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ดังนั้นการผลิตสารทุติยภูมิได้โดยใช้ระยะเวลาที่สั้นลง ผลิตได้รวดเร็ว และได้ปริมาณมากจึงเป็นอีกการทดลองที่น่าสนใจเพื่อให้มีปริมาณเพียงพอกับความต้องการที่มากขึ้น ปัจจุบันมีวิธีการทำให้ปริมาณสารทุติยภูมิเพิ่มมากขึ้นด้วยการเติมสารกระตุ้นในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด และช่วยลดระยะเวลาในการผลิต [6] โดยสารกระตุ้นที่นิยมใช้ ได้แก่ methyl jasmonate (MeJA) และ salicylic acid (SA) สารดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณจากเซลล์ที่ได้รับความเครียดต่าง ๆ เช่น การเข้าบุกรุกของจุลินทรีย์ แมลง หรือความเครียดจากสภาพแวดล้อมภายนอก ทำให้พืชเกิดการตอบสนอง และสังเคราะห์สารทุติยภูมิของพืชเพิ่มขึ้น ได้แก่ ฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ เทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น [7] การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิด้วยการเติมสารกระตุ้นในสภาพปลอดเชื้อมีรายงานในพืชวงศ์ Lamiaceae และพืชชนิดอื่น ๆ แล้ว เช่น แคลลัสของ *Lepechinia caulescens* ที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 50 µM สามารถเพิ่มปริมาณสาร ursolic acid และ oleanolic acid 5.6 และ 4.7 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม [8] แคลลัสของโหระพา (*O. basilicum*) ที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 200 µM นาน 48 ชั่วโมง สามารถสร้างสาร betulinic acid มากกว่าแคลลัสที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น [9] นอกจากนี้ hairy root ของกวาวเครือขาว (*Pueraria candollei*) ที่ได้รับ SA ความเข้มข้น 100 µM นาน 3 วัน สามารถเพิ่มปริมาณสาร isoflavonoid 20±1 mg/g DW ซึ่งมากกว่าสิ่งทดลองควบคุม [10] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของ MeJA และ SA ต่อการเจริญเติบโต และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสกะเพราแดง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ MeJA และ SA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสกะเพราแดง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

นำแคลลัสกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 µM เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ มาตัดแบ่งให้มีขนาด 0.5×0.5 cm แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม MeJA และ SA ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 µM โดยมีอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวเป็นสิ่งทดลองควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design มี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวนแคลลัสมากพอที่ให้น้ำหนักแห้งอย่างน้อย 1 g บันทึกน้ำหนักสดของแคลลัสก่อน และหลังเพาะเลี้ยง คำนวณค่า growth index (GI) ตามรายงานของ Abeda และคณะ [11] จากสมการ GI = น้ำหนักสดหลังการเพาะเลี้ยง ÷ น้ำหนักสดก่อนการเพาะเลี้ยง

นำแคลลัสกะเพราแดงไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วนำตัวอย่างแห้งมาสกัดด้วย ethanol อัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร สกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 3 วัน จากนั้นนำมากรองและระเหยที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง นำสารสกัดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Folin และ Ciocalteu [12] นำสารสกัดละลายด้วย absolute ethanol ให้มีความ

เข้มข้น 1 mg/mL sonicate สารละลายนาน 1 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 µL สารละลาย 2M Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 100 µL และสารละลาย 7.5 % Na_2CO_3 ปริมาตร 80 µL ลงใน 96 well-microplate วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดโดยมีหน่วยเป็น mg GAE/g dry extract เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid

2.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Zhu และคณะ [13] เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/mL นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 µL ผสมกับสารละลาย 5 % $NaNO_2$ ปริมาตร 75 µL ให้เข้ากันเป็นเวลานาน 6 นาที แล้วเติมสารละลาย 10 % $AlCl_3$ ปริมาตร 150 µL วางทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาตร 500 µL และน้ำกลั่นปริมาตร 275 µL ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ปิเปตสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีหน่วยเป็น mg CE/g dry extract เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน catechin

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Yamasaki และคณะ [14] นำสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/mL ไป sonicate นาน 1 นาที นำสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 µL ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL วางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาค่า EC_{50} ของสารละลายตัวอย่าง ใช้ BHT เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์มาตรฐาน (positive control)

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลอง CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD (honestly significant difference) test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3. ผลและวิจารณ์ผล

3.1 การเจริญเติบโตของแคลลัส

การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 µM ร่วมกับ MeJA และ SA ความเข้มข้น 0, 50, 100 และ 150 µM นาน 2 สัปดาห์ พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (รูปที่ 1) โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 50 µM มีค่า GI สูงสุด (7.12±0.32) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 100 µM และ MeJA ความเข้มข้น 50 µM ที่มีค่า GI 6.27±0.62 และ 6.14±0.18 ตามลำดับ แต่มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุมที่มีค่า GI 5.81±0.98 (รูปที่ 2) ส่วนสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้การเจริญเติบโตของแคลลัสลดลง โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 150 µM มีค่า GI น้อยที่สุด (3.34±0.34) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่า GI ของแคลลัสที่ได้รับ SA ความเข้มข้น 150 µM ที่มีค่า 4.06±0.95 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า MeJA และ SA ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสกะเพราแดง โดย MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นต่ำ (50 µM) ส่งผลบวกต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสกะเพราแดง ทั้งนี้เนื่องจากสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิด นี้เป็นสารกระตุ้น

ในกลุ่มของฮอร์โมนพืช [4,15] มีบทบาทที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต และกระบวนการพัฒนาที่หลากหลายของพืช [16] อย่างไรก็ตาม การใช้ MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นสูง (150 µM) ส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นดังกล่าวไปมีผลต่อการดูดน้ำและธาตุอาหารของแคลลัส ซึ่ง Namedo [17] ได้รายงานว่าการใช้สารกระตุ้นทำให้เกิดกระบวนการที่ซับซ้อนขึ้นภายในเซลล์พืช และการตอบสนองต่อสารกระตุ้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดของพืช ความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่ใช้ ระยะเวลาในการได้รับสาร รวมถึงระยะการเจริญเติบโตของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงต้องใช้สารกระตุ้นที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมกับชิ้นส่วน และชนิดของพืชนั้น ๆ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของพืชหลายชนิดที่พบว่า MeJA และ SA ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเมื่อได้รับในความเข้มข้นที่เหมาะสม เช่น แคลลัสของแครอท (*Daucus carota*) มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นมากกว่าสิ่งทดลองควบคุมเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L และ SA ความเข้มข้น 200 µM นาน 21 วัน [18] และเซลล์แขวนลอยของกะเพรามีน้ำหนักแห้งมากกว่าสิ่งทดลองควบคุมเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 mg/L และ MeJA ความเข้มข้น 100 M นาน 18 วัน [19]

3.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี MeJA และ SA ทุกความเข้มข้น มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (รูปที่ 3A) โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคน้อยที่สุด (49.65±1.88 mg GAE/g dry extract) ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุด (144.76±8.19 mg GAE/g dry extract หรือ 2.92 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 150 µM ที่มีค่า 134.56 ± 13.10 mg GAE/g dry extract หรือ 2.71 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม นอกจากนี้แคลลัสที่พัฒนาบน

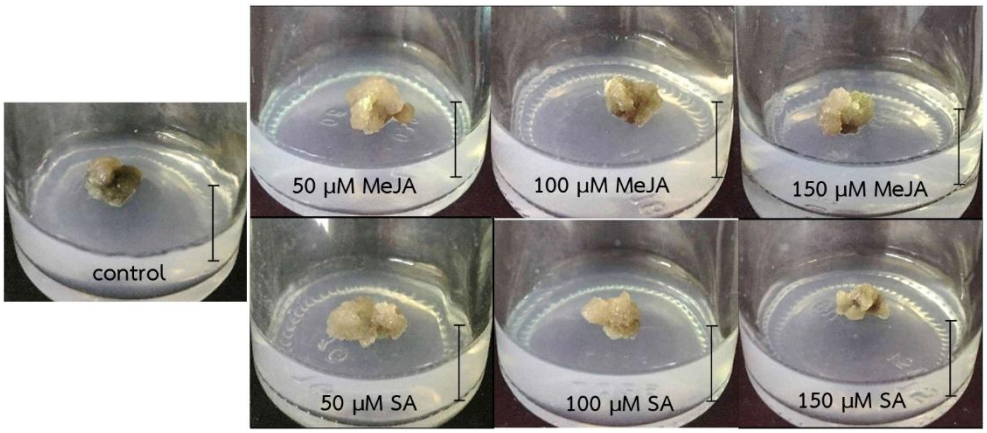

Figure 1 Callus of holy basil purple type cultured on MS medium supplemented with 2.26 µM 2,4-D combined with 0 – 150 µM MeJA and SA for two weeks. (Scale bar = 1 cm)

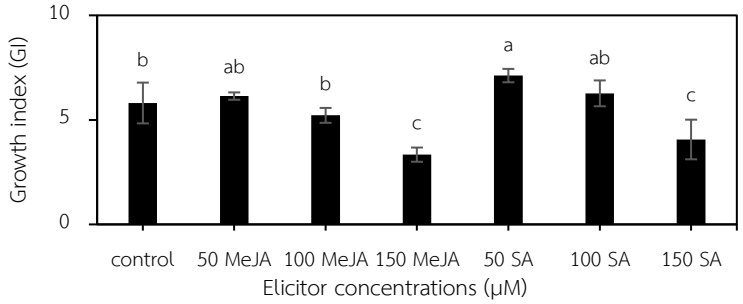

Figure 2 Growth index (GI) of callus cultured on MS medium supplemented with 2.26 µM 2,4-D combined with 0 – 150 µM MeJA and SA for two weeks.

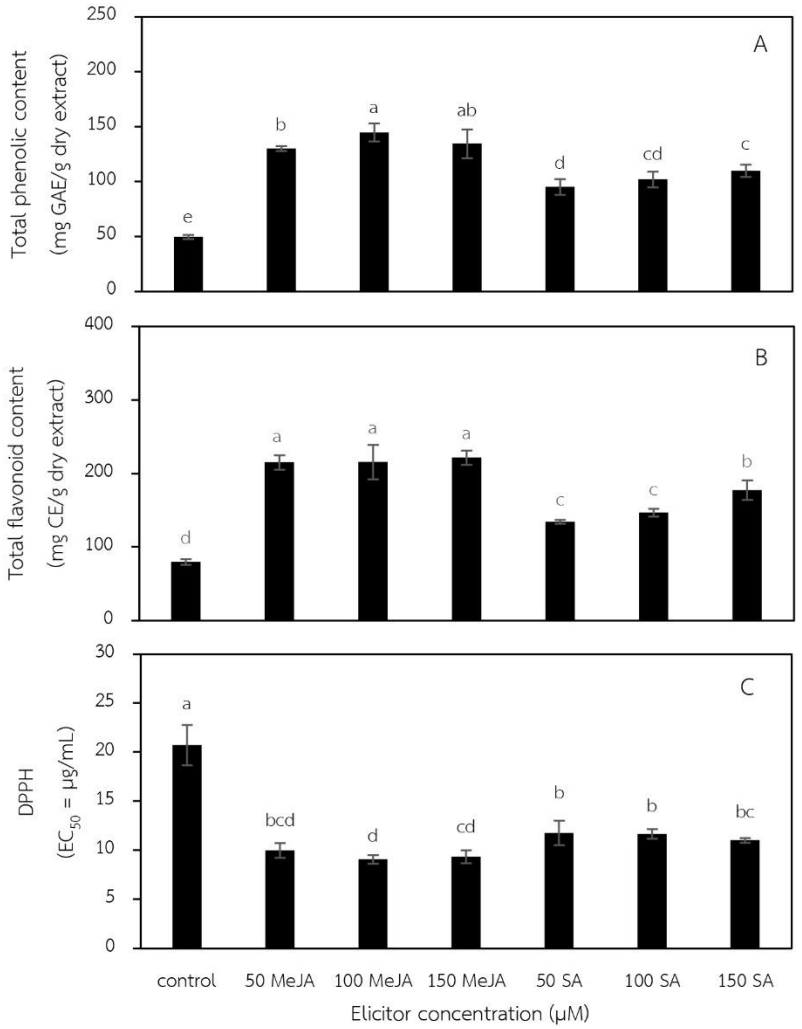

Figure 3 (A) total phenolic content, (B) total flavonoid content, and (C) DPPH radical scavenging activities of callus cultured on MS medium supplemented with 2.26 µM 2,4-D combined with 0-150 µM MeJA and SA for two weeks.

อาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 50-150 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด 95.09±7.24 ถึง 109.97±5.58 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.92-2.22 เท่า ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแคลลัสกะเพรามีการตอบสนองต่อ MeJA ในการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดได้ดีกว่า SA เนื่องจากความจำเพาะเจาะจงของสารกระตุ้นในพืชดังที่ Putalun [4] ได้กล่าวไว้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้น ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจงของสารกระตุ้น ความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้น รวมถึงสภาวะในการเพาะเลี้ยง ระยะการเจริญเติบโตของพืช อาหารเพาะเลี้ยง และแสง MeJA เป็นตัวควบคุมที่สำคัญในระดับเซลล์ที่สามารถกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจากการเข้าทำลายของจุลชีพ แมลงและความเครียดจากสภาพแวดล้อมภายนอก โดยจะส่งสัญญาณจากเซลล์ของพืชที่ได้รับความเครียดไปยังเซลล์ที่มี MeJA สะสมอยู่ ทำให้พืชเกิดการตอบสนองต่อการกระตุ้นจากความเครียดนั้น ๆ ส่งผลให้พืชเกิดการสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น [20] นอกจากนี้ MeJA ยังเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ที่เป็นเอนไซม์ตัวแรกของกระบวนการ shikimic acid pathway [21] ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของพืชหลายกลุ่ม ได้แก่ ฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ เทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น [7] ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Jalalpour และคณะ [22] ที่พบว่าเซลล์แขวนลอยของ *Taxus baccata* สามารถสร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดได้สูงสุด (3.56 g/100 g DW) ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 2.94 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B5 ที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM ร่วมกับ squalestatin ความเข้มข้น 1 µM นาน 1 สัปดาห์ และ Giri และคณะ [23] พบว่าแคลลัสของ *Habenaria edgeworthii* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้น 10 µM นาน 28 วัน สร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดได้ 14.70 mg/g DW ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม (10.17 mg/g DW)

3.3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

แคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่มี MeJA และ SA ทุกความเข้มข้นมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (รูปที่ 3B) โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่มีสารกระตุ้นมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 79.67±3.88 mg CE/g dry extract ขณะที่แคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 150 µM มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 221.72±9.75 mg CE/g dry extract หรือสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 2.78 เท่า ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 50 และ 100 µM ที่มีค่า 215.13±9.67 และ 215.77±23.50 mg CE/g dry extract หรือสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 2.70 และ 2.71 เท่า ตามลำดับ ส่วนแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 50-150 µM มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 134.18±2.64 ถึง 177.35±13.29 mg CE/g dry extract หรือสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.68-2.23 เท่า ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแคลลัสกะเพราแดงตอบสนองต่อ MeJA ต่อการสร้างและสะสมสารฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Jalalpour และคณะ [22] ที่พบว่าเซลล์แขวนลอยของ *T. baccata* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM ร่วมกับ squalestatin ความเข้มข้น 1 µM นาน 1 สัปดาห์ สร้างสารฟลาโวนอยด์ได้สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมถึง 23.6 เท่า และการเพาะเลี้ยงรากพิเศษ (adventitious root) ของ *Eleutherococcus koreanum* ในอาหารที่เติม MeJA

ความเข้มข้น 50 และ 100 µmol/L นาน 1 สัปดาห์ ส่งผลให้รากพิเศษสร้างสารฟลาโวนอยด์ได้สูงสุด (9.95 และ 10.00 mg/g DW) ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม (7.42 mg/g DW) [24]

3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

แคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} 9.06±0.45 µg/mL (รูปที่ 3C) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 50 และ 150 µM (EC_{50} 9.98±0.74 และ 9.33±0.65 µg/mL ตามลำดับ) ส่วนแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 50-150 µM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า EC_{50} 11.01±0.25 ถึง 11.76±1.26 µg/mL และแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยมีค่า EC_{50} 20.72±2.06 µg/mL ผลการทดลองจะเห็นว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม MeJA มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดี ทั้งนี้เนื่องจากแคลลัสกะเพราที่ได้รับ MeJA นี้มีการสร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์สูง ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิด นี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารประกอบฟีนอลิคมีความสามารถในการให้อิเล็คตรอนของไฮโดรเจน จึงมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ [25] ส่วนสารฟลาโวนอยด์จะถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระทำให้มีความเสถียรมากขึ้น และกลายเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เกิดปฏิกิริยา [26] ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Manivannan และคณะ [27] ที่พบว่าเซลล์แขวนลอยของ *Scrophularia kakudensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 200 µM นาน 2 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดเพียง 23.6 % และการเพาะเลี้ยง hairy root ของมะแว้งเครือ (*Solanum trilobatum* L.) ในอาหารสูตรที่เติม MeJA ความเข้มข้น 4 µM นาน 2 สัปดาห์ พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด 83.3 % เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (31 %) [28]

3.5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของแคลลัสกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA และ SA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารฟลาโวนอยด์ (r = 0.954) แต่สารทั้งสองมีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r = -0.914 และ -0.854 ตามลำดับ) (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าเมื่อแคลลัสกะเพราแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องผลการทดลองข้างต้น และรายงานของ Danaee และคณะ [29] ที่พบว่าเมื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้แคลลัสของ *Phyllanthus pulcher* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย และรายงานของ Yi และคณะ [30] ที่พบว่า hairy root ของ *Lactuca indica* L. มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น เนื่องจากมีการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น

ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าการเติม MeJA ความเข้มข้น 100 และ 150 µM สามารถกระตุ้นให้แคลลัสกะเพราแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าสิ่งทดลองอื่น ๆ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ในแง่ของการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงการค้า ควรใช้ MeJA ที่ความเข้มข้น 100 µM

เนื่องจากใช้สารกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่ำ แต่สามารถกระตุ้นให้แคลลัสกะเพราแดงสร้างสารได้เทียบเท่าการเติมสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นสูง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารกระตุ้นนาน 5 สัปดาห์ รายงานโดย Lardee [5] มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด 142.40±5.81 mg GAE/g dry extract มีสารฟลาโวนอยด์ 177.11±11.61 mg CE/g dry extract และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} 9.59±0.39 µg/mL ซึ่งปริมาณสารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้ใกล้เคียงกันกับปริมาณสารดังกล่าวของแคลลัสกะเพราแดงจากการทดลองนี้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี MeJA ความเข้มข้น 100 µM นาน 2 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าการเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM สามารถส่งผลให้แคลลัสกะเพราแดงผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้เร็วขึ้นภายใน 2 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง

4. สรุป

การเติม SA และ MeJA ความเข้มข้น 50 µM ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลบวกต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสกะเพราแดง โดยมีค่า GI 7.12±0.32 และ 6.14±0.18 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับสิ่งทดลองควบคุม (5.81±0.98) อย่างไรก็ตาม อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 µM และ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสกะเพราแดง โดยมีปริมาณประกอบฟีนอลิคทั้งหมด 144.76±8.19 mg GAE/g dry extract และสารฟลาโวนอยด์ 215.77±23.50 CE/g dry extract ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 2.92 และ 2.71 เท่า ตามลำดับ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} 9.06±0.45 µg/mL ดีกว่าสิ่งทดลองควบคุม (20.72±2.06 µg/mL)

5. References

[1] Singh, D. and Chaudhuri, P.K., 2018, A review on phytochemical and pharmaco logical properties of holy basil (Ocimum sanctum L.), Ind. Crops Prod. 118: 367-382.

[2] Singh, S., Majumdar, D.K. and Rehan, H.M.S., 1996, Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of Ocimum sanctum (holy basil) and its possible mechanism of action, J. Ethnopharmacol. 54: 19-26.

[3] Siva, M., Shanmugam, K.R., Shanmugam, B., Venkata, S.G., Ravi, S., Sathyavelu, R.K. and Mallikarjuna, K., 2016, Ocimum sanctum: A review on the pharmaco logical properties, Int. J. Basic Clin. Pharmacol. 5: 558-565.

Table 1 Correlation coefficients (r) between total phenolic content, total flavonoid content and DPPH radical scavenging activity

	Total flavonoid content	DPPH
Total phenolic content	0.954**	-0.914**
Total flavonoid content		-0.854**

**Correlation is significant at the 0.01 level.

[4] Putalun, W., 2008, Medicinal Plant Tissue Culture: Study Guidelines for Production of Secondary Metabolites, Department of Pharmacognosy and Toxicology, faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 120 p. (in Thai)

[5] Lardee, N., 2018, Effect of Different Culture Periods on Secondary Metabolite Contents of *Ocimum sanctum* L. (Holy Basil Purple Type) Callus, Special Problem, Thammasat University, Pathum Thani, 29 p. (in Thai)

[6] Bunrathep, S., 2006, Production of secondary metabolites by plant tissue cultures and biological technology, Thai J. Health Res. 20: 185-195. (in Thai)

[7] Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2005, Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, Biotechnol. Adv. 23: 283-333.

[8] Martínez, V.M.V., Estrada- Soto, S.E., Arellano- García, J.J., Rivera- Leyva, J.C., Castillo- España, P., Flores, A.F., Cardoso-Taketa, A.T. and Perea- Arango, I., 2017, Methyl jasmonate and salicylic acid enhanced the production of ursolic and oleanolic acid in callus cultures of *Lepechinia Caulescens*, Phcog. Mag. 13: 886-889.

[9] Pandey, H., Pandey, P., Singh, S., Gupta, R. and Banerjee, S., 2015, Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation, Protoplasma. 252: 647-655.

[10] Udomsuk, L., Jarukamjorn, K., Tanaka, H. and Putalun, W., 2011, Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation, Biotechnol. Lett. 33: 369-374.

[11] Abeda, H.Z., Kouassi, M.K., Yapo, K.D., Koffi, E., Sie, R.S., Kone, M. and Kouakou, H.T., 2014, Production and enhancement of anthocyanin in callus line of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), Int. J. Rec. Biotech. 2: 45-56.

[12] Folin, O. and Ciocalteu, V., 1927, On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, J. Biol. Chem. 73: 627-650.

[13] 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.

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

[15] Naik, P.M. and Al-Khayri, J.M., 2016, Abiotic and Biotic Elicitors-Role in Secondary Metabolites Production Through *In vitro* Culture of Medicinal Plants, pp. 247-277, In Shanker, A. and Shanker, C. (Eds.),

Abiotic and Biotic Stress in Plants, Intech, London.

[16] Bari, R. and Jones, J.D.G., 2009, Role of plant hormones in plant defence responses, Plant Mol. Biol. 69: 473-488.

[17] Namedo, A.G., 2007, Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review, Pharmacogn. Rev. 1: 69-79.

[18] Sudha, G. and Ravishankar, G.A., 2003, Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and the involvement of methyl jasmonate and salicylic acid, Acta Physiol. Plant. 25: 249-256.

[19] Hakkim, F.L., Kalyani, S., Essa, M., Girija, S. and Song, H., 2011, Production of rosmarinic in *Ocimum sanctum* cell cultures by the influence of sucrose, phenylalanine, yeast extract, and methyl jasmonate, Int. J. Biol. Med. Res. 2: 1070-1074.

[20] Cheong, J.J. and Choi, Y.D., 2003, Methyl jasmonate as a vital substance in plants, Trends Genet. 19: 409-413.

[21] Wang, J., Qian, J., Yao, L. and Lu, Y., 2015, Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*, Bioresour. Bioprocess 2: 1-9.

[22] Jalalpour, Z., Shabani, L., Afghani, L., Sharifi-Tehrani, M. and Amini, S.A., 2014, Stimulatory effect of methyl jasmonate and squalestatin on phenolic metabolism through induction of LOX activity in cell suspension culture of yew, Turk. J. Biol. 38: 76-82.

[23] Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I.D., Nandi, S.K., Rawal, R.S. and Pande, V., 2012, *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: Arare Himalay an medicinal orchid, Ind. Crops Prod. 39: 1-6.

[24] Lee, E.J., Park, S.Y. and Paek, K.Y., 2015, Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 120: 1-10.

[25] Minatel, I.O., Borges, C.V., Ferreira, M.I., Gomez, H.A.G., Chen, C.Y.O. and Lima, G.P.P., 2017, Phenolic Compounds: Func tional Properties, Impact of Processing and Bioavailability, pp. 1- 24, In Soto-Hernández, M. (Ed.), Phenolic Compounds Biological Activity, IntechOpen, Ltd., London.

[26] Korkina, L.G. and Afanas'ev, I.B., 1996, Antioxidant and chelating properties of flavonoids, Adv. Pharmacol. 38: 151-163.

[27] Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y.G. and Jeong, B.R., 2016, Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of

secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch, Int. J. Mol. Sci. 17: 1-13.

[28] Shilpha, J., Satish, L., Kavikkuil, M., Largia, M.J.V. and Ramesh, M., 2015, Methyl jasmonate elicits the solasodine production and anti- oxidant activity in hairy root cultures of *Solanum trilobatum* L. Ind. Crops Prod. 71: 54-64.

[29] Danaee, M., Farzinebrahimi, R., Kadir, M.A., Sinniah, U.R., Mohamad, R. and Taha, R.M., 2015, Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*, Braz. J. Bot. 38: 265-272.

[30] Yi, T.G., Park, Y., Park, J.E. and Park, N.I., 2019, Enhancement of phenolic compounds and antioxidative activities by the combination of culture medium and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Lactuca indica* L, Nat. Prod. Commun. 14(7): 9 p.