การขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวมในจิงจูฉ่ายด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Micropropagation and Enhancement of Total Terpenoid Content in *Artemisia lactiflora* Using Tissue Culture Technique

ประกาย อ่อนวิมล[1*] ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์[1] ไพฑูรย์ บุปผาดา[2] วรารัตน์ ศรีประพัฒน์[1] และสุพินญา บุญมานพ[1]

Prakay Onwimol[1*] Phummarin Wanichananan[1] Phaitun Bupphada[2] Wararat Sriprapat[1] and Supinya Boonmanop[1]

Received: October 8, 2021
Revised: October 28, 2021
Accepted: November 17, 2021

Abstract: Plant propagation and medicinal enrichment using tissue culture is the production approach of chemical-free herbs with consistent and large quantities of essential substances for the future pharmaceutical industry. This research aimed to determine the optimal medium for multiplication and enhancing total terpenoid content in white mugwort using the elicitors under aseptic conditions. The appropriate medium for shoots multiplication from nodal segments and shoot tips were also optimized. Tissues of nodal segments and shoot tips were cultured on solid MS medium supplemented with 0, 1, 2, 4, 6 and 12 mg/l of BA for 4 weeks. The results showed that nodal segments cultured on solid MS medium without BA produced an average of 12.2 shoots per nodal segment. Shoot tips had a similar result with an average of 11.6 shoots per shoot tip. For acclimatization, white mugwort with healthy roots and stems were transferred to room temperature for 3, 5, 7 and 10 days. One month after transplantation, the survival rate was 100% in every condition. Then, the 3-month-old plantlets with healthy stems and roots from tissue culture were cultured in a liquid MS medium supplemented with 0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 mM of salicylic acid (the major factor) for 1, 3 and 5 days (the minor factor). The total terpenoid content was analyzed by using a spectrophotometer. The use of 0.1 mM salicylic acid as an elicitor for one day resulted in a total terpenoid content of 23.05 mg/100g, was 1.1 times higher than that of field-grown plants.

Keywords: *Artemisia lactiflora*, Tissue culture, Total terpenoid, 6-Benzylaminopurine, Salicylic acid

บทคัดย่อ: การขยายพันธุ์และการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถผลิตพืชสมุนไพรปลอดสารเคมีที่มีสารสำคัญอย่างสม่ำเสมอและปริมาณมากเพียงพอสำหรับรองรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมยาในอนาคตได้ งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร เลขที่ 85 หมู่ 1 ถ.รังสิต-นครนายก ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110
Biotechnology Research and Development Office 85 Moo 1 Rangsit – Nakhon Nayok Rd., Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani 12110

[2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรอำนาจเจริญ 172 หมู่ 3 ตำบลโนนโพธิ์ อำเภอเมือง จ.อำนาจเจริญ 37000
Amnat Charoen Agricultural Research and Development Center 172 Moo 3 Non Pho, Mueang Amnat Charoen District, Amnat Charoen 37000

*Corresponding author: guy5490@gmail.com

ต่อการเพาะเลี้ยงต้นจิงจูฉ่ายและเพิ่มศักยภาพการผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวม โดยใช้สิ่งกระตุ้นในสภาพปลอดเชื้อ รวมทั้งการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ข้อและยอดจิงจูฉ่ายเกิดยอดจำนวนมาก โดยนำเนื้อเยื่อส่วนข้อและยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 12. 2 ยอด ต่อ 1 ข้อ ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันกับยอด ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 11.6 ยอด ต่อ 1 ยอด การย้ายต้นจิงจูฉ่ายที่มีลักษณะต้นและรากสมบูรณ์ โดยนำมาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องก่อนย้ายออกปลูกเป็นเวลาที่แตกต่างกัน คือ 3, 5, 7 และ 10 วัน พบว่า ต้นจิงจูฉ่ายอายุ 1 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% ในทุกระยะเวลาการปรับสภาพ หลังจากนั้นเมื่อนำต้นจิงจูฉ่ายที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 3 เดือนซึ่งมีต้นและรากสมบูรณ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสิ่งกระตุ้นคือกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ที่มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 mM (ปัจจัยหลัก) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 วัน (ปัจจัยรอง) จึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวม ด้วยเครื่อง Spectrophotometer พบว่า การกระตุ้นด้วย กรดซาลิไซลิก ที่ความเข้มข้น 0.1 mM เป็นเวลานาน 1 วัน มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวม (total terpenoid) มากที่สุด (23.05 mg/100g) คิดเป็น 1.1 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

คำสำคัญ: จิงจูฉ่าย, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, สารเทอร์พีนอยด์รวม, 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน, ซาลิไซลิก แอซิด

คำนำ

จิงจูฉ่าย (white mugwort) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artemisia lactiflora* มีถิ่นกำเนิดมาจากภาคตะวันออกเฉียงใต้ของจีน คือ มณฑลกุ้ยโจว สำหรับประเทศไทยนิยมปลูกในจังหวัดทางภาคเหนือ เช่น เชียงราย เชียงใหม่ จิงจูฉ่าย มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบหลายชนิด เช่น (E)-13- farnesene, nerolidol, และ zingiberene โดยพบกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) มากที่สุด (Jing *et al*., 2011) พืชชนิดนี้มีสรรพคุณช่วยปรับสมดุลความดันเลือดในร่างกายและช่วยขับลมในกระเพาะอาหารได้ดี ลำต้นสดมีปริมาณโซเดียมต่ำ ผู้เป็นโรคไตจึงรับประทานได้ (Bown, 1995) อีกทั้งมีวิตามินและเกลือแร่ ต่างๆ อาทิธาตุเหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส และมีวิตามินซีสูง จากรายงานพบว่าปริมาณวิตามินซีในจิงจูฉ่ายมากกว่าในมะนาวถึง 58 เท่า นอกจากนี้ยังมีวิตามินเอ วิตามินอี เป็นต้น ซึ่งการรับประทานใบสดจะได้ผลดีกว่าการนำไปปรุงอาหารโดยผ่านกระบวนการให้ความร้อน (Worarakkulwong and Wongsawadwech, 2012) สำหรับประเทศไทย นิยมนำมารับประทานสด โดยใส่ในต้มเลือดหมู และนำไปทำผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ชาหรือผงยาแคปซูล ทำให้ในปัจจุบันเริ่มมีการปลูกจิงจูฉ่ายเป็นการค้ามากยิ่งขึ้น เนื่องจากเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพและมีสรรพคุณทางยาที่สำคัญ อย่างไรก็ตามเกษตรกรมักปลูกสมุนไพรชนิดนี้โดยใช้สารเคมีเพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณมาก ทำให้เกิดการตกค้างหรือมีสารเคมีปนเปื้อนในธรรมชาติ นอกจากนี้การปลูกในสภาพธรรมชาติยังไม่สามารถควบคุมปริมาณสารสำคัญให้ได้ตามเกณฑ์มาตรฐานขององค์การอุตสาหกรรมยา ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีการวิจัยและปรับปรุงวิธีการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรที่ปลอดสารเคมีที่มีสารสำคัญอย่างสม่ำเสมอและมีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาผลิตในระดับในอุตสาหกรรมยาได้ และการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกลุ่มเทอร์พีนอยด์รวมของสมุนไพรจิงจูฉ่ายในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นแหล่งข้อมูลทางการผลิตเพื่อการค้าและใช้ประโยชน์ในด้านการวิจัย รวมทั้งผู้ที่มีความสนใจผลิตสมุนไพรชนิดนี้ในด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมเนื้อเยื่อและฟอกฆ่าเชื้อจิงจูฉ่าย

นำต้นจิงจูฉ่ายอายุ 6 เดือน ตัดยอดออกมาจากกระถางเพาะเลี้ยง ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง

ตัดใบส่วนเกินออกและนำไปล้างทำความสะอาดเอาเศษดินที่ติดมาออกด้วยน้ำยาล้างจาน 1 ครั้ง ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 20% ที่เติม Tween 20 1-2 หยด นาน 15 นาที พอครบตามเวลาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ซับด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อซับน้ำส่วนเกินออก หลังจากนั้นนำยอดที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog,1962) ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น (Phytagel) 3 กรัม/ลิตร โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นจิงจูฉ่ายต่อไป

ผลของ 6-Benzylaminopurine (BA) ต่อการชักนำให้เกิดยอด

นำต้นจูฉ่ายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้ออายุ 3 เดือน มาตัดแยกออกเป็น 2 ส่วน โดยแยกเป็นส่วนข้อ และยอด นำไปศึกษาผลของ BA ต่อการชักนำให้เกิดยอด โดยนำข้อและยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาล 30 กรัม/ลิตร ผงวุ้น (Phytagel) 3 กรัม/ลิตร ในสภาพแสง 55 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน (โดยนับยอดที่มีความยาวตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรขึ้นไป) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 15 ซ้ำ (1 ซ้ำคือ 1 ขวดเพาะเลี้ยง) นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การนำต้นจิงจูฉ่ายออกปลูกในโรงเรือน

นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นจิงจูฉ่ายที่มีระบบรากสมบูรณ์มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับคลายฝาขวดไว้ ศึกษาระยะเวลาในการปรับสภาพที่แตกต่างกันคือ 3, 5, 7 และ 10 วัน นำต้นออกจากขวดล้างทำความสะอาดวุ้นที่ติดกับรากออกให้หมด และพักไว้ หลังจากนั้นย้ายปลูกลงกระถางโดยใช้ดินผสมสำเร็จรูปพร้อมปลูก (ราชาดินปลูก) เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนต้นจิงจูฉ่ายที่รอดชีวิตและมีลักษณะต้นแข็งแรงสมบูรณ์

ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับกรดซาลิไซลิกต่อการเพิ่มปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวมในต้นจิงจูฉ่าย

นำต้นจิงจูฉ่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีรากสมบูรณ์อายุ 3 เดือน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 30 กรัม/ลิตร แล้วเติมสิ่งกระตุ้นคือ กรดซาลิไซลิก ซึ่งกรองผ่านแผ่นกรองชนิด PTFE ขนาดช่อง 0.20 ไมโครเมตร ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ absolute ethanol และน้ำ deionized ละลายกรดซาลิไซลิก เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยจัดสิ่งทดลองแบบ factorial ที่มี 2 ปัจจัย (6x3 factorial in CRD) จำนวน 4 ซ้ำ (1 ซ้ำคือ 1 ขวดเพาะเลี้ยง) นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำต้นจิงจูฉ่ายไปตรวจวัดปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวมด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเปรียบเทียบกับต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

วิธีการตรวจวัดปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวมเริ่มจากนำตัวอย่างต้นจิงจูฉ่าย (ผ่านการกระตุ้นไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิก และปลูกในสภาพธรรมชาติ) มาอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง บดให้ละเอียด เก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและสะอาด หลังจากนั้นนำไปสกัดสารเทอร์พีนอยด์รวม โดยใช้ตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายบดแห้ง 2 กรัม สกัดด้วย methanol 10 มิลลิลิตร โดยใช้วิธี ultrasonic extraction เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลายแล้วสกัดซ้ำด้วย methanol 10 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ละลายกลับด้วย methanol 15 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง spectrophotometer เทียบกับสาร ursolic acid

มาตรฐาน (Sigma: catalog number U6753 > 90%) ซึ่งละลายด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวมในสารสกัดจิงจูฉ่ายตามวิธีการของ Chang *et al*. (2012)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของ 6-Benzylaminopurine (BA) ต่อการชักนำให้เกิดยอด

จากการชักนำให้เกิดกลุ่มยอด (Multiple shoots) โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อ และยอดของจิงจูฉ่ายที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ยอดและข้อเริ่มเกิดยอดขนาดเล็กเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ และยอดพัฒนาจนเห็นได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 4 โดยชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 12.2 ยอด ต่อ 1 ข้อ ส่วนสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดจากข้อคือ สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 0.3 ยอด สำหรับยอดให้ผลไปในทางเดียวกัน คือ ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 11.6 ยอดต่อ 1 ยอด ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ายอดตายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงทำให้ไม่มียอดเกิดขึ้น (Table 1, Figure 1) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของยงศักดิ์และอัญชลี (2557) ที่พบว่าอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนการเกิดยอดของต้นพรมมิเฉลี่ย 8.0 ยอด แต่จำนวนการเกิดยอดเฉลี่ยลดลงเหลือ 1.5 ยอด เมื่อเติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร จากรายงานที่กล่าวมานี้พบแนวโน้มเดียวกันคือ BA ความเข้มข้นต่ำชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าการใช้ความเข้มข้นสูงในพืชทั้งสองชนิด เนื่องจากการใช้ BA ความเข้มข้นสูงเกินไปส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อพืช สำหรับต้นจิงจูฉ่ายการนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตก็เพียงพอต่อการเกิดยอดกลุ่มเพราะอาหารสูตร MS มีวิตามินและแร่ธาตุครบถ้วน ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพิ่ม สำหรับยอดที่ได้จากการชักนำโดยใช้ BA ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร มีลักษณะยอดสั้นและจำนวนยอดน้อย แต่หลังจากตัดยอดแล้วย้ายลงอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BA พบว่า มีการเจริญเติบโตและออกรากได้ปกติ

Table 1 Number of new shoots derived from *Artemisia lactiflora* nodal segments and shoot tips after being cultured for 4 weeks on solid MS medium supplemented with 0, 1, 2, 4, 6, and 12 mg/l BA under 55 μmol/m^2/s of light intensity for 16 hours/day at 25±2 °C and subcultured every 2 weeks.

Concentration of BA (mg/l)	Number of new shoots derived from	
	Nodal segment	Shoot tip
0	12.2^{a}	11.6^{a}
1	5.3^{b}	4.5^{b}
2	2.8^{c}	2.0^{c}
4	2.7^{cd}	1.5^{cd}
6	1.7^{d}	1.0^{d}
12	0.3^{e}	0^{e}
C.V. (%)	32.26	33.79
Pr > F	<.0001	<.0001

** Means in the same column followed by the same alphabet are not significantly different (P≤0.01), analyzed by DMRT.

Agricultural Science and Management J. 5 (1) : 5-12 (2022)

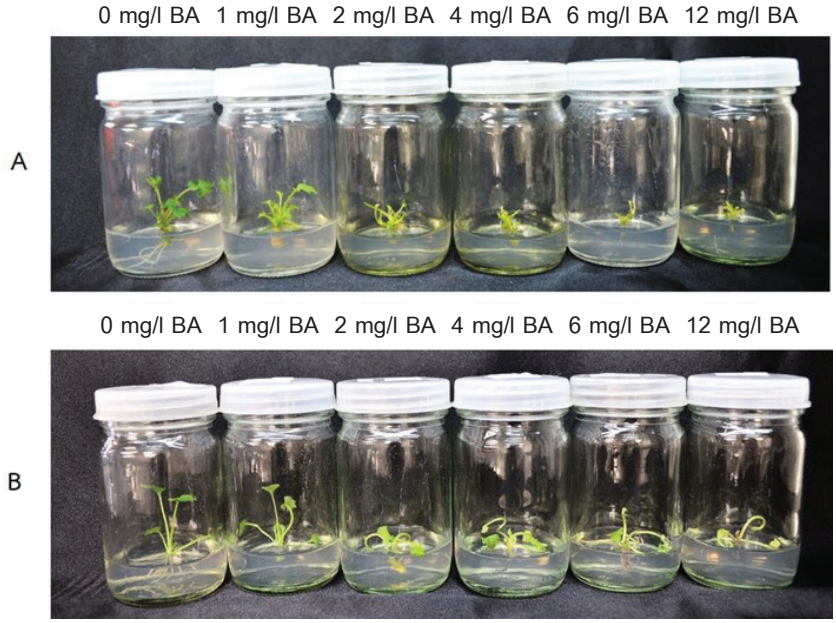

Figure 1 Morphology of new shoots derived from *Artemisia lactiflora* nodal segment (A) and shoot tip (B) after being cultured for 4 weeks on solid MS medium supplemented with 0, 1, 2, 4, 6, and 12 mg/l BA under 55 µmol/m^2/s of light intensity for 16 hours/day at 25±2 °C and subcultured every 2 weeks.

การนำต้นจิงจูฉ่ายออกปลูกในโรงเรือน

การย้ายต้นจิงจูฉ่ายที่มีลักษณะต้นและรากสมบูรณ์ โดยนำต้นจิงจูฉ่ายมาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาที่แตกต่างกัน คือ 3, 5, 7 และ 10 วัน จึงนำออกปลูกในโรงเรือน พบว่า ต้นจิงจูฉ่ายมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% หลังออกปลูกนาน 1 เดือนในทุกระยะเวลาการปรับสภาพ (Figure 2A) และสามารถตั้งตัวได้ดี มีการแตกกอเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นลักษณะต้นแข็งแรงสมบูรณ์ภายใน 6 เดือน Figure 2B

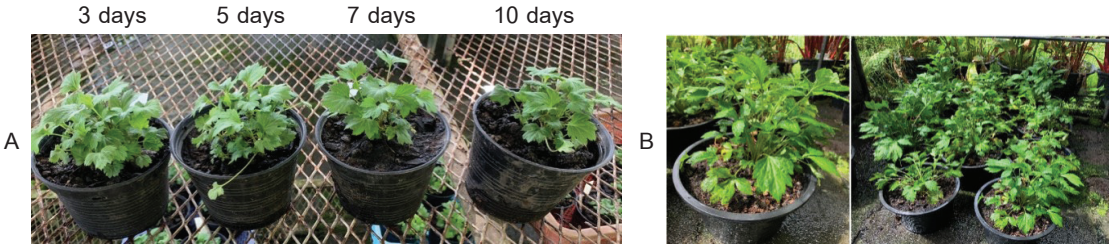

Figure 2 Morphology of *Artemisia lactiflora* plantlets after being transplanted into greenhouse for 1 month (A) and 6 months (B).

ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับกรดซาลิไซลิกต่อการเพิ่มปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวมในต้นจิงจูฉ่าย

หลังจากนำตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายไปวิเคราะห์ปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวมโดยใช้สารมาตรฐาน ursolic acid ด้วยเครื่อง Spectrophotometer พบว่า ความเข้มข้นของ กรดซาลิไซลิก (ปัจจัยหลัก) และระยะเวลาที่ได้รับกรดซาลิไซลิก (ปัจจัยรอง) ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวม แต่อิทธิพลหลักจากทั้ง 2 ปัจจัยต่างมีผลต่อปริมาณสารเทอร์พีนอยด์

รวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้ต้นจิงจูฉ่ายผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมเพิ่มสูงขึ้นกว่าต้นจิงจูฉ่ายที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ส่วนกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ต้นจิงจูฉ่ายผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมต่ำกว่าต้นจิงจูฉ่ายที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แต่กรดซาลิไซลิกทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นให้ต้นจิงจูฉ่ายผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมสูงกว่าต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ (Figure 3)

สำหรับระยะเวลาในการได้รับกรดซาลิไซลิกเป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 วัน หลังจากนำไปตรวจสอบปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวม พบว่า การกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลานาน 1 วัน ต้นจิงจูฉ่ายมีการผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมในปริมาณสูงกว่าต้นจิงจูฉ่ายที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แต่หลังจากนั้นจะเริ่มลดลงหลังจากกระตุ้นนาน 3 และ 5 วัน ส่วนการกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ นั้น ทำให้ต้นจิงจูฉ่ายมีการผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมในปริมาณที่ต่ำลงหลังจากกระตุ้นนาน 1 วัน และมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากกระตุ้นนาน 3 วัน หลังจากนั้นจะเริ่มลดต่ำลงมาอีกครั้งหลังจากกระตุ้นนาน 5 วัน (Figure 3) สำหรับตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ สามารถผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมได้ปริมาณต่ำที่สุด เมื่อพิจารณาในภาพรวมการกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมได้มากที่สุด เท่ากับ 23.05 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 1.1 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ เมื่อกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลานาน 1 วัน

การใช้กรดซาลิไซลิกเป็นสิ่งกระตุ้นนั้นมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการผลิตสารสำคัญของพืชหลายชนิดและมีแนวโน้มว่า กรดซาลิไซลิกความเข้มข้นต่ำมีประสิทธิภาพให้การกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิได้มากกว่าความเข้มข้นสูง เช่น Jeong and Park (2005) ได้กระตุ้นการสร้างสาร saponin ใน hairy root ของโสม (*Panax ginseng*) โดยใช้ กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิก จาก 0.1 ถึง 0.5 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้ hairy root สร้างสาร saponin เพิ่มมากขึ้น แต่ประสิทธิภาพการสร้างสาร saponin ลดลงเมื่อใช้กรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ และในการกระตุ้นสาร plumbagin ในเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ ซึ่งรายงานโดย ศศิวิมล (2553) ให้ผลสอดคล้องกันคือ ความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิก 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงสร้างสาร plumbagin ได้เพิ่มมากขึ้น แต่ประสิทธิภาพการสร้างสาร plumbagin ลดลงเมื่อใช้ กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ จากรายงานที่กล่าวมานี้ แม้จะพบแนวโน้มเดียวกันคือความเข้มข้นต่ำกระตุ้นได้ดีและความเข้มข้นสูงให้ผลตรงข้าม แต่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมก็ต่างกันออกไปตามชนิดพืชและชนิดสิ่งกระตุ้น

นอกจากความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิกจะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสร้างสารสำคัญในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงแล้ว ระยะเวลาที่เนื้อเยื่อได้สัมผัสกับกรดซาลิไซลิกก็ส่งผลต่อการสร้างสารสำคัญเช่นกัน โดย Malarz *et al*. (2007) ได้ศึกษาการกระตุ้นการผลิตสาร crepidiaside B, สาร 8-deoxylactucin และสาร sonchuside A ในเนื้อเยื่อรากของ *Cichorium intybus* โดยใช้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และตรวจสอบการผลิตสารทุติยภูมิทั้ง 3 ชนิด ภายหลังจากการกระตุ้น 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าในเนื้อเยื่อรากมีการผลิตสาร crepidiaside B และสาร 8-deoxylactucin เพิ่มขึ้นเป็นลำดับจนถึงชั่วโมงที่ 96 และมีการผลิตสาร 8-deoxylactucin สูงกว่าในเนื้อเยื่อรากที่ไม่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงที่ 120 ส่วนสาร sonchuside A มีการผลิตสูงกว่าเนื้อเยื่อรากที่ไม่ได้รับการกระตุ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 – 72 แต่กลับมีการผลิตต่ำกว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96

จากผลการทดลองในการใช้กรดซาลิไซลิกกระตุ้นการผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมทั้งการรายงานของ Malarz *et al*. (2007) เป็นสิ่งยืนยันว่าระยะเวลาที่

เนื้อเยื่อได้สัมผัสกับสิ่งกระตุ้นมีผลอย่างมากต่อผลผลิตสารสำคัญที่สกัดได้หลังจากกระตุ้น ดังนั้นในการใช้สิ่งกระตุ้นชนิดต่างๆ นอกจากที่จะศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการกระตุ้นแล้ว ควรศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการได้รับสิ่งกระตุ้นสำหรับการสกัดสารสำคัญหลังจากการกระตุ้นด้วย เพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณมากที่สุดและคุ้มค่ากับการลงทุนในแต่ละครั้งที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าแม้ว่าต้นจิงจูฉ่ายจะไม่ได้รับสิ่งกระตุ้นแต่ถ้านำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อก็ยังให้สารสำคัญสูงกว่าที่นำไปปลูกในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี

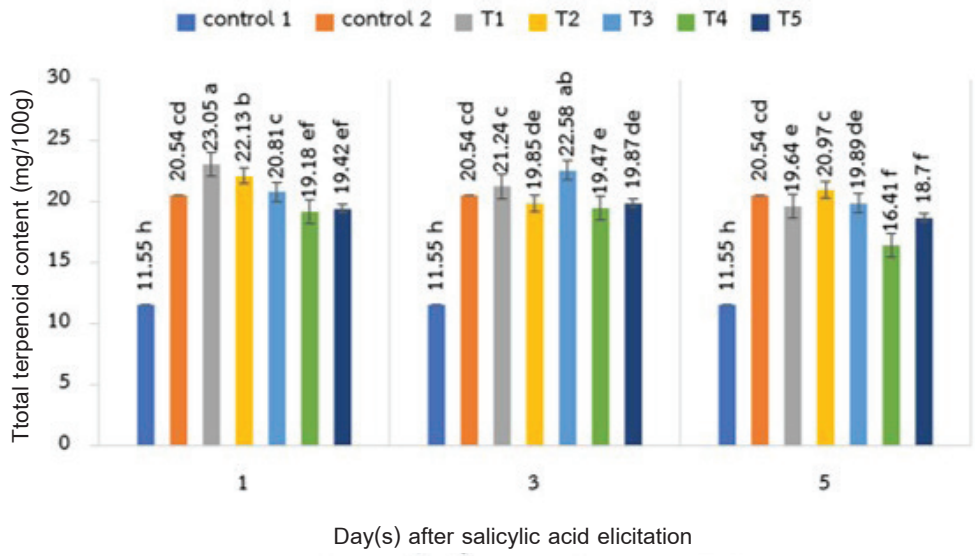

Figure 3 The total terpenoid content of *Artemisia lactiflora* after being cultured in liquid MS medium supplemented with 0 (control 2), 0.1 (T1), 0.5 (T2), 1 (T3), 3 (T4) and 5 (T5) mM salicylic acid for 1, 3, and 5 days using field-grown plants as the control 1. Values are means±standard deviations. Values in the same latter are not significantly different ($p<0.05$)

สรุป

อาหารที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อและยอดจิงจูฉ่ายคือ สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 12. 2 ยอดต่อ 1 ข้อ และ 11.6 ยอดต่อ 1 ยอด ย้ายต้นจิงจูฉ่ายที่มีลักษณะต้นและรากสมบูรณ์ที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มาปรับสภาพเป็นเวลา 3 วัน จึงนำออกปลูกในโรงเรือนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% และสามารถตั้งตัวได้ดีมีการแตกกอและเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นภายใน 6 เดือน กรดซาลิไซลิกมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมจากต้นจิงจูฉ่าย โดยพบการผลิตสาร เทอร์พีนอยด์รวมมากที่สุด เท่ากับ 23.05 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 1.1 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ เมื่อกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลานาน 1 วัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริม ววน. ทะเบียนวิจัยกรมวิชาการเกษตร 03-10-59-03-00-00-06-63

เอกสารอ้างอิง

ยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ และอัญชลี จาละ. 2557. อิทธิพลของ BA และ NAA ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดต้นพรมมิโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. Thai Journal of Science and Technology 3 (1): 7–14.

ศศิวิมล จันทร์สุเทพ. 2553. การผลิตสาร plumbagin จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* Linn.) ในฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กทม. 114 หน้า

Bown, D. 1995. Encyclopaedia of Herbs and Their Uses. Dorling Kindersley, London. 424 p.

Chang, C.L., C. S. Lin and G. H. Lai. 2012. Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities and neuroprotection of five medicinal plant extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2012, Article ID 984295, 8 pages.

Jeong, G.T., and D.H. Park. 2005. Comparative evaluation of modified bioreactors for enhancement of growth and secondary metabolite biosynthesis using *Panax ginseng* hairy roots. Biotechnology and Bioprocess Engineering 10: 528-534.

Jing, Z. W., Z. S. Ying and Y. Y. Yi. 2011. Analysis of chemical components of volatile oil from *Artemisia lactiflora* Wall in north Guizhou province of China. Medicinal Plant 2 (6): 59 -61.

Malarz, J., A. Stojakowska and W. Kisiel. 2007. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Chichorium intybus*. Acta Physiologia Plantarum 29: 127-132.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473 – 479.

Worarakkulwong, T. and S. Wongsawadwech. 2012. Antiproliferation and antioxidation activities of *Artemisia vulgaris* var. *indica*. BS Thesis, Mahidol University, Bangkok. (in Thai)