วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารสำคัญในพญายอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Effect of elicitor substances on bioactive compound content of Phaya Yo (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau) culture *in vitro*

สุลักษณ์ แจ่มจำรัส[1]*, มณฑา วงศ์มณีโรจน์[1], รัตนา เอการัมย์[1], สมนึก พรมแดง[1], ศิริพรรณ สุขขัง[1], พรทิพย์ แสงศิลป์[1] และ รงรอง หอมหวล[1]

Surak Jamjumrus[1]*, Monthar Wongmaneeroj[1], Rattana Agarum[1], Somnuk Promdang[1], Siriphan Sukkhaeng[1], Porntip Sangsil[1] and Rongrong Homhual[1]

[1] ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140
[1] Central Laboratory and Greenhouse Complex, Research and Service Center, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

บทคัดย่อ: พญายอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau.) เป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจ และมีความสำคัญทางการแพทย์ การผลิตยาที่ใช้สมุนไพรจำเป็นต้องใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพ ปราศจากการปนเปื้อน สารสำคัญมีปริมาณคงที่ และสม่ำเสมอ การศึกษานี้จึงได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อกระตุ้นสารสำคัญในเนื้อเยื่อพญายอพันธุ์ดงบังโดยเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับสารสกัดยีสต์ (YE) ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 ก./ล. เปรียบเทียบกับสารเมทิลจัสโมเนท (MeJA) ความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์พบว่า ชิ้นส่วนข้อของพญายอพันธุ์ดงบังที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิครวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณสาร 22.69 mg GAE/g DW (4.08 เท่าของตัวอย่างใบที่ได้จากกระถาง) และ 32.29 mg TroloxE/g DW (6.90 เท่าของตัวอย่างใบที่ได้จากกระถาง) ตามลำดับ สำหรับสารไฟโตสเตอรอลพบว่า สารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารไฟโตสเตอรอล โดยพบปริมาณสารลูพิออลสูงสุด 1.46 mg/g DW ในสูตรอาหารที่เติมสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

คำสำคัญ: พญายอ; สารสกัดยีสต์; เมทิลจัสโมเนท; สารสำคัญ; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ABSTRACT: Phaya Yo (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau.) is a fascinating and significant medicinal plant raw ingredients that are of high quality, uncontaminated, consistent in quantity, and predictable are required for the manufacturing of herbal medicines. The objective of this study is to modify *in vitro* plant culture techniques and stimulate bioactive compounds of Phaya Yo "Dong Bang" (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau). Nodal explants of Phaya Yo were cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L TDZ and 0.1 mg/L NAA in combination with yeast extract (YE) at concentrations of 0.5, 1.0, 1.5, and 2 g/L and compared with methyl jasmonate (MeJA) at concentrations of 10, 20, 30, and 40 µM. It was found that nodal explants were cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L TDZ and 0.1 mg/L NAA in combination with 40 µM methyl jasmonate gave the greatest total phenolic content and radical scavenging activity DPPH with an amount of 22.69 mg GAE/g DW (4.08-fold of plant leaf sample from in the pot) and 32.29 mg TroloxE/g DW (6.90-fold of plant leaf sample from in the pot), respectively. For phytosterols, it was found that both types of stimulants do not affect increasing the amount of phytosterols. The highest amount of lupeol was 1.46 mg/g DW in the medium supplemented with methyl jasmonate (MeJA) at concentrations of 10 µM.

* Corresponding author: rdisrj@ku.ac.th

Received: date; December 12, 2023 Revised: date; June 13, 2024

Accepted: date; July 8, 2024 Published: date; September 24, 2024

Keywords: Phaya Yo; yeast extract; methyl jasmonate; active substances; tissue culture

บทนำ

พญายอหรือเสลดพังพอนตัวเมีย (*Clinacanthus nutans*) เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae (Nik Abd Rahman et al., 2019) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน และเขตกึ่งร้อนของประเทศในแถบเอเชีย ได้แก่ แอฟริกา บราซิล อินโดนีเซีย มาเลเซีย (Alam et al., 2016) และในประเทศไทยมักพบขึ้นตามป่าเบญจพรรณหรือปลูกตามบ้านทั่วทุกภาคของประเทศ ใบของพญายอมีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคทางผิวหนัง แผลไฟไหม้ หรือแผลที่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น โรคเริม และงูสวัด (Chiangchin et al., 2021) ช่วยลดสารไนตริกออกไซด์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบจากสาเหตุการติดเชื้อ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่ม *Staphylococcus* spp. และ *Bacillus* spp. ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคทางผิวหนัง และอาหารเป็นพิษ ใบ และรากมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กลุ่มฟีนอลิค (phenolic) สเตอรอยด์ (steroids) และมีฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical: DPPH) (Alam et al., 2016) ซึ่งสารพฤกษเคมีสำคัญที่พบในพญายอ ได้แก่ แคมพ์เฟอรอล (kaempferol), คาเทชิน (catechin), เควอซิทิน (quercetin) และลูพิออล (lupeol) (Phua et al., 2018) ปัจจุบันพญายอจึงได้ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้นเพื่อใช้รักษาโรคผิวหนัง รักษาอาการแมลงกัดต่อย แก้อักเสบ และแก้แพ้ อย่างไรก็ตามปัญหาของการปลูกพืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทยคือ วัตถุดิบที่ได้ขาดคุณภาพ มีการปนเปื้อนของเชื้อราและสารเคมี และสารออกฤทธิ์สำคัญที่สกัดได้มีปริมาณไม่สม่ำเสมอ จากปัญหาดังกล่าวการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับกระตุ้นหรือสร้างสารสำคัญ (bioactive compound) หรือสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในเนื้อเยื่อพญายอ โดยการใช้สารกระตุ้น (elicitor) ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract; YE) หรือสารเมทิลจัสโมเนท (methyl jasmonate; MeJA)

สารสกัดจากยีสต์โดยส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นในเซลล์พืช และในระบบของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญสำหรับนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยารักษาโรค (Sørensen and Sondergaard, 2014) เนื่องจากสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน วิตามิน เกลือแร่ และสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนินและยังประกอบด้วยโมเลกุลของบีตา-กลูแคน (β-glucans), แมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ (mannan oligosaccharides) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) (Pathak et al., 2022) ซึ่งโมเลกุลต่างๆ เหล่านี้มีบทบาทเป็นสารกระตุ้นโดยการจับกับตัวรับที่มีความจำเพาะบนผิวเซลล์พืช กระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณที่นำไปสู่การผลิตสารทุติยภูมิของวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid pathway) (Dixon et al., 2002) ที่มีเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) เป็นเอนไซม์หลักสำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตสารประกอบฟีนอลิค มีรายงานถึงการนำสารสกัดจากยีสต์ไปใช้เพื่อเพิ่มการผลิตสารทุติยภูมิในพืชหลากหลายสายพันธุ์ทั้งพืชสมุนไพร ผัก และผลไม้ เช่น Sardar et al. (2023) ใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.20 ก./ล. กระตุ้นให้แคลลัสของพืชสมุนไพรสกุลหญ้าดอกลาย (*Swertia Chirata*) มีการเจริญเติบโต น้ำหนักชีวมวล สารพฤกษเคมี และสารต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้น Putalun et al. (2010) ใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. กระตุ้นการผลิตสารพลัมบาจิน (plumbagin) ในพืชหยาดน้ำค้าง (*Drosera burmanii*) และพบว่า สารสกัดจากยีสต์มีประสิทธิภาพสามารถเพิ่มปริมาณสารพลัมบาจินในรากได้สูงกว่าต้นปกติถึง 3.5 เท่า และสารสกัดจากยีสต์ยังถูกนำมาใช้อย่างประสบความสำเร็จสำหรับเพิ่มการผลิตสารทุติยภูมิอื่นๆ เช่น กรดโรสมารินิก (rosmarinic acid) สารแซนโทน (xanthone) และสารไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) เป็นต้น (Farjaminezhad and Garoosi, 2021) นอกจากนี้หนึ่งในประโยชน์ของการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นสารกระตุ้นคือ มีราคาที่ค่อนข้างถูก และง่ายต่อการนำมาใช้ซึ่งเป็นทางเลือกที่เป็นประโยชน์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อพืชในระบบขนาดใหญ่ อีกทั้งสารสกัดจากยีสต์ยังมีความปลอดภัยสำหรับนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร และผลิตภัณฑ์ทางยา และที่สำคัญไม่มีความเสี่ยงด้านสิ่งแวดล้อม (Złotek and Swieca, 2016)

สารเมทิลจัสโมเนทคือ เมทิลเอสเตอร์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดจัสโมนิก สารเมทิลจัสโมเนทสามารถกระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณจากเซลล์ที่ได้รับความเครียดต่างๆ เช่น การบุกรุกหรือการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค และแมลง การเกิดบาดแผล หรือการได้รับความเครียดจากสภาพแวดล้อมภายนอก โดยการกระตุ้นเอนไซม์บางชนิด เช่น phenylalanine ammonia lyase (PAL), catalase (CAT), stilbene synthase (STS) และ anthocyanin synthase (ANS) ทำให้เกิดการตอบสนอง และสังเคราะห์สารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องในการผลิตสารประกอบฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ในพืช (Portu et al., 2017) ตามการรายงานของ Giri and Zaheer (2016) พบว่า ในระบบของ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสารทุติยภูมิสารเมทิลจัสโมเนทเป็นสารกระตุ้นที่ถูกนำมาใช้มากที่สุด (60%) รองลงมาคือ กรดซาลิไซลิก (15%) และกรดจัสโมนิก (10%) ซึ่งการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิด้วยการเติมสารกระตุ้นเมทิลจัสโมเนทในสภาพปลอดเชื้อมีรายงานในการเพาะเลี้ยงรากพิเศษของพืชสมุนไพรโกฐหัวบัว (*Cnidium officinale*) ต่อการผลิตสารประกอบฟีนอลิคพบว่า รากพิเศษที่ได้รับสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างสารประกอบฟีนอลิคสูงมากกว่า 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (Ho et al., 2020) ชิ้นส่วนข้อของกะเพราแดงที่ได้รับสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ สามารถสร้างสารยูจีนอล (eugenol) สารฟีนอลิค และฟลาโวนอยด์ได้มากกว่า 4.57, 2.94 และ 4.74 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารกระตุ้น (Autaijamsripon et al., 2023) นอกจากนี้ในแคลลัสของว่านธรณีสาร (*Phyllanthus pulcher*) ที่ได้รับสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์สามารถเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด (Danaee et al., 2015) การศึกษาปริมาณสารสำคัญในการทดลองนี้จะทำการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญกลุ่มฟีนอลิค (phenolic content) และกลุ่มสเตอรอล (sterol) ในเนื้อเยื่อ และจากต้นพญายอที่ปลูกตามธรรมชาติโดยใช้เทคนิค spectrophotometer หรือ high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งงานวิจัยที่ได้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างสารสำคัญในเชิงปริมาณ และนำไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วิธีการศึกษา

ชนิด และความเข้มข้นของสารกระตุ้น (elicitor) ในสูตรอาหารต่อการสร้างแคลลัส และการเกิดยอดในพญายอพันธุ์ดงบัง

ตัดข้อจากต้นในสภาพปลอดเชื้อของพญายอพันธุ์ดงบังยาวประมาณ 0.5 ซม. ประกอบด้วย ตาข้าง 1 คู่ เลี้ยงในสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. TDZ 0.5 มก./ล. น้ำตาล 30 ก./ล. ตามวิธีการของ รงรอง และคณะ (2564) ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ (YE) 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ก./ล. เปรียบเทียบกับสารเมทิลจัสโมเนท (MeJA) ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ปรับค่า pH ที่ 5.8 เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อให้แสง 16 ชม./วัน ความเข้มแสง 37 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด การเกิดยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 8 ชิ้นส่วนพืชต่อสูตรอาหาร

วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในเนื้อเยื่อกระจุกยอดของพญายอพันธุ์ดงบังที่ผ่านสารกระตุ้นเปรียบเทียบกับใบที่พัฒนาในสภาพธรรมชาติ

1) การเตรียมตัวอย่างแห้ง

นำตัวอย่างใบจากต้นพญายอพันธุ์ดงบังที่ปลูกในกระถางอายุ 3 – 4 เดือนมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 5 – 10 มม. อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียด และกรองผ่านตะแกรงขนาดรู 250 ไมครอนเพื่อเตรียมเป็นตัวอย่างแห้ง นอกจากนี้ นำกระจุกยอดที่ได้จากการเลี้ยงข้อพญายอพันธุ์ดงบังในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.5 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ก./ล. หรือร่วมกับสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 เดือน อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 250 ไมครอนเพื่อเตรียมเป็นตัวอย่างแห้ง

2) การสกัดตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิครวม ปริมาณฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระ

สกัดตัวอย่างโดยดัดแปลงวิธีการของ Mohd-Esa et al. (2010) และ Pourmorad et al. (2006) ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.1 ก. ใส่หลอดทดลองฝาเกลียวปริมาตร 50 มล. เติมตัวสกัดเอทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) นาน 10 วินาที หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องอัลตร้าโซนิค (ultrasonic) นาน 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 15 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำออกจากตู้เย็น และเขย่าผสมสาร นาน 10 วินาที เทสารละลายที่ได้ใส่หลอดเซนติฟิวก์ขนาด 2 มล. และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวก์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เปรียบเทียบกับต้นพญายอพันธุ์ดงบังที่ปลูกในกระถาง และยอดจากสูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต

3) การสกัดตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์สารไฟโตเสตอรอล ได้แก่ สารลูพิออล สารสติกมาสเตอรอล และสารเบต้า-ซิโตสเตอรอล

สกัดตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์สารไฟโตเสตอรอล ได้แก่ สารลูพิออล สารสติกมาสเตอรอล และสารเบต้า-ซิโตสเตอรอล ดัดแปลงจากวิธีการของ Jaber and Jasim (2014) โดยชั่งตัวอย่างแห้งที่บดละเอียด 0.2 ก. ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวปริมาตร 50 มล. เติมสารเมทานอล (AR grade) 10 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร 1 นาที สกัดด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิค 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (ครั้งที่ 1) พักเครื่อง 30 นาที สกัดด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิค 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (ครั้งที่ 2) นำตัวอย่างแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองด้วยเครื่องดูดของเหลว (section pump) ใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 นำส่วนใสที่ระเหยจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ละลายด้วยสารเมทานอล (HPLC grade) ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร 1 มล. กรองด้วยกระดาษกรองชนิดไนลอน 0.2 ไมครอน, 13 มม. (Whatman) ฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC) 20 ไมโครลิตร เพื่อวิเคราะห์ชนิด และปริมาณสารสำคัญในแต่ละตัวอย่าง

4) การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิครวม

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิครวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ดัดแปลงจากวิธีของ Folin and Ciocalteu (1927) และ Mohd-Esa et al. (2010) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลท (96 well plate) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดและอ่านไมโครเพลท (microplate reader) คำนวณปริมาณสารฟีนอลิครวมมีหน่วยเป็น mg GAE/g DW เปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค (ความเข้มข้น 0 – 100 ไมโครกรัม/มล.)

5) การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี $AlCl_3$ colorimetric ดัดแปลงจากวิธีการของ Pourmorad et al. (2006) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ 1 M CH_3CO_2K ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติมเมทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดและอ่านไมโครเพลท คำนวณปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีหน่วยเป็น mg QE/g DW เปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน quercetin (ความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัม/มล.)

6) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี radical scavenging activity (DPPH) ดัดแปลงจากวิธีการของ Sittisart et al. (2020) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลท วางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดและอ่านไมโครเพลท คำนวณหาค่า % DPPH inhibition จากเปอร์เซ็นต์สีม่วงที่หายไป คำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระมีหน่วยเป็น mg Trolox equivalent/g DW เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox (ความเข้มข้น 0 – 50 ไมโครกรัม/มล.)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลอง CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ชนิด และความเข้มข้นของสารกระตุ้น (elicitor) ในสูตรอาหารต่อการสร้างแคลลัส และการเกิดยอดในพญายอพันธุ์ดงบัง

จากการนำข้อของต้นพญายอพันธุ์ดงบังในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารทดลองสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. และ TDZ 0.5 มก./ล. ร่วมกับการเติมสารกระตุ้นจากสารสกัดยีสต์ 0.5, 1, 1.5 และ 2 ก./ล. หรือสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนพบว่า สูตรอาหารที่เติมสารสกัดยีสต์มีการแตกยอดน้อย และให้ต้นเตี้ย **(Figure 1)** โดยให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 93.33-100% เกิดยอดเฉลี่ยอยู่ที่ 2.20-2.33 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 23.33-33.33%

(Table 1) ในขณะที่สูตรอาหารที่เติมสารเมทิลจัสโมเนทมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดอยู่ที่ 84.09-95.45% เกิดยอดเฉลี่ย 1.33-4.88 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 43.18-68.18% **(Table 1)** นอกจากนี้ยังพบว่า สารเมทิลจัสโมเนทที่ความเข้มข้นมากกว่า 20 ไมโครโมลาร์ส่งผลให้ความสูง และการแตกกอของชิ้นส่วนข้อลดลง โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ยอดมีลักษณะเตี้ย และจำนวนยอดลดลง **(Figure 1)** จากผลการทดลองสูตรอาหารที่เติมสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ให้ผลการเกิดยอดดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมสารสกัดยีสต์โดยให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 95.45% เกิดยอดเฉลี่ย 4.88 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 68.18% แต่ถึงอย่างไรผลการเกิดยอด และการเกิดแคลลัสที่ได้ยังคงน้อยกว่าการทดลองชุดควบคุมในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. และ TDZ 0.5 มก./ล. ที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 100% มีการแตกกอเกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.23 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และเกิดแคลลัสสีเขียวอมเหลืองบริเวณฐานของชิ้นส่วนข้อโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ 100%

การใช้สารกระตุ้นจากยีสต์ (0.5-2 ก./ล.) และสารเมทิลจัสโมเนท (20-40 ไมโครโมลาร์) กับพญายอพันธุ์ดงบังมีผลทำให้การเจริญเติบโตของยอด และการเกิดแคลลัสลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Nhan and Loc (2018) พบว่า การใช้สารกระตุ้นจากสารสกัดยีสต์และสารเมทิลจัสโมเนทในอาหารเขย่าเลี้ยงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์พืชปลาไหลเผือกใหญ่ โดยเซลล์ที่ได้จากการเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 20-250 มก./ล. มีน้ำหนักสด (13.96-17.08 ก./ขวดปริมาตร) และน้ำหนักแห้ง (0.41-0.51 ก./ขวดปริมาตร) ลดลงเล็กน้อย ส่วนเซลล์ที่เขย่าเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสารเมทิลจัสโมเนทมีการเจริญเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของเมทิลจัสโมเนทเพิ่มขึ้น โดยที่เมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีน้ำหนักสด 0.76 ก./ขวดปริมาตร ซึ่งลดลงมากกว่า 15 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสดในการทดลองชุดควบคุมเซลล์มีน้ำหนักสด 17.43 ก./ขวดปริมาตร จากรายงานของ Zaman et al. (2022) ศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ในแคลลัสของโหระพาสีม่วงพบว่า การใช้สารสกัดจากยีสต์ส่งผลให้แคลลัสมีน้ำหนักชีวมวลเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 100 มก./ล. ช่วยเพิ่มน้ำหนักชีวมวลของแคลลัสได้สูงที่สุด มีน้ำหนักสดของแคลลัส 216.28 ก./ล. น้ำหนักแห้ง 15.49 ก./ล. ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นถึง 1.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์) มีน้ำหนักสดของแคลลัส 167.14 ก./ล. และน้ำหนักแห้ง 10.25 ก./ล. แต่หลังจากเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ที่ 200 และ 400 มก./ล. ส่งผลให้การเกิดยอด และน้ำหนักชีวมวลของแคลลัสมีแนวโน้มลดลง ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนภายในตัวพืชเองที่พืชสร้างขึ้นมา (Chavan et al., 2015) ที่ส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช

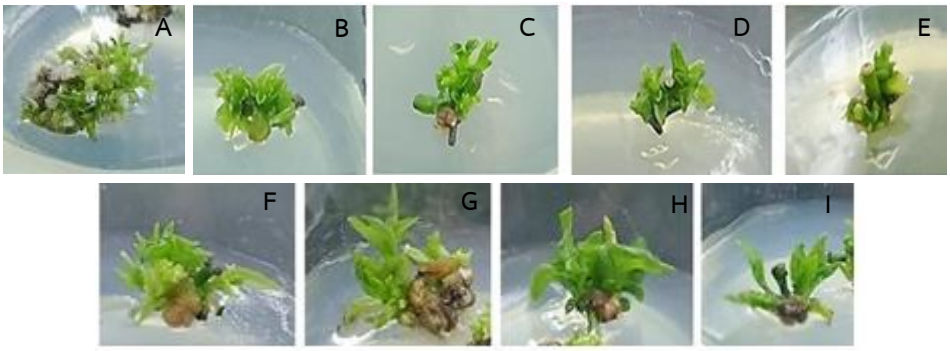

Figure 1 Multiple shoot and callus initiation derived from node culture of Phaya Yo (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau.) cv. “Dongbang” cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L TDZ combined with Yeast extract (YE) at concentrations 0 (A), 0.5 (B), 1 (C), 1.5 (D), and 2 g/L (E) and Methyl jasmonate (MeJA) at concentrations 10 (F), 20 (G), 30 (H), and 40 µM (I) for 2 months.

Table 1 Multiple shoot and callus initiation derived from node culture of Phaya Yo (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau.) cv. "Dongbang" cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L TDZ combined with Yeast extract (YE) at concentrations 0, 0.5, 1, 1.5, and 2 g/L and Methyl jasmonate (MeJA) at concentrations 10, 20, 30, and 40 µM for 2 months

Treatment	% explants producing shoots	Average no. of shoots[1]	% explants producing callus
0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ	100	5.23 ±0.15[a]	100
0.5 g/L YE	100	2.33 ±0.12[c]	33.33
1 g/L YE	93.33	2.33 ±0.15[c]	30.00
1.5 g/L YE	93.33	2.30 ±0.20[c]	26.67
2 g/L YE	93.33	2.20 ±0.20[c]	23.33
10 µM MeJA	95.45	4.88 ±0.43[a]	68.18
20 µM MeJA	88.64	3.92 ±0.31[b]	61.36
30 µM MeJA	88.64	2.34 ±0.19[c]	61.36
40 µM MeJA	84.09	1.33 ±0.14[d]	43.18
F-test (P < 0.05)	-	*	-
CV	-	7.74	-

[1]Means within a column followed by the same letter are not significantly different (ns, P > 0.05) according to Duncan's multiple range test, * significantly different (P < 0.05)

ปริมาณสารฟีนอลิครวม ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ชิ้นส่วนข้อของพญายอพันธุ์ดงบังที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 ก./ล. เลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน และตรวจสอบสารสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ ปริมาณสารฟีนอลิครวม ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า การเติมสารสกัดจากยีสต์ส่งผลให้เนื้อเยื่อของพญายอมีการสร้างสารฟีนอลิครวม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มมากขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองตัวอย่างใบจากต้นในกระถาง โดยเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 0.5 ก./ล. มีปริมาณสารฟีนอลิครวมมากที่สุด 15.97 mg GAE/g DW และในสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 1 ก./ล. มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด 25.81 mg TroloxE/g DW **(Table 2)** สำหรับสารฟลาโวนอยด์พบว่า การเติมสารสกัดจากยีสต์ส่งผลให้เนื้อเยื่อมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ลดลงเหลือเพียง 3.10 mg QE/g DW เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างใบจากต้นในกระถางที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงถึง 14.20 mg QE/g DW **(Table 2)**

สำหรับข้อที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนพบว่า ปริมาณสารฟีนอลิครวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีปริมาณเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างใบจากต้นในกระถาง โดยพบมีปริมาณสารฟีนอลิครวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด 22.69 mg GAE/g DW และ 32.29 mg TroloxE/g DW ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ สำหรับปริมาณสารฟลาโวนอยด์พบมีปริมาณเพียง 4.50 mg QE/g DW เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ **(Table 2)** จากผลการทดลองการเติมสารสกัดจากยีสต์ และสารเมทิลจัสโมเนทลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการกระตุ้นชิ้นส่วนข้อให้มีการสร้างสารฟีนอลิครวม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น แต่ไม่ส่งผลต่อการสร้าง

สารฟลาโวนอยด์ โดยสูตรอาหารทดลองที่เติมสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ให้ปริมาณการสร้างสารฟีนอลิครวม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดอื่นๆ

Table 2 Content of active substances in multiple shoots and callus of Phaya Yo (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau.) cv. "Dongbang" cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L TDZ combined with Yeast extract (YE) at concentrations 0, 0.5, 1, 1.5, and 2 g/L and Methyl jasmonate (MeJA) at concentrations 10, 20, 30, and 40 µM for 2 months

Treatment	Active substances		
	Total phenolic content[1] (mg GAE/g DW)	Flavonoid content[1] (mg QE/g DW)	Radical scavenging activity[1] (mg TroloxE/g DW)
Plant leaf from the pot	5.56 ±0.34^{d}	14.20 ±0.39^{a}	4.68 ±0.77^{e}
MS (free hormone)	6.81 ±0.61^{d}	9.05 ±0.33^{b}	6.77 ±1.26^{e}
0.1 NAA+0.5 TDZ	14.22 ±0.96^{c}	2.70 ±0.19^{d}	21.58 ±3.20^{cd}
0.1 NAA+0.5 TDZ+0.5 g/L YE	15.97 ±0.10^{c}	3.09 ±0.24^{d}	21.18 ±4.24^{cd}
0.1 NAA+0.5 TDZ+1 g/L YE	15.47 ±0.71^{c}	2.93 ±0.14^{d}	25.81 ±2.51^{bc}
0.1 NAA+0.5 TDZ+1.5 g/L YE	14.74 ±0.47^{c}	3.10 ±0.22^{d}	20.26 ±2.21^{d}
0.1 NAA+0.5 TDZ+2 g/L YE	14.39 ±0.40^{c}	3.01 ±0.17^{d}	20.84 ±1.79^{cd}
0.1 NAA+0.5 TDZ+10 µM MeJA	19.80 ±1.24^{b}	4.10 ±0.30^{c}	29.53 ±2.11^{ab}
0.1 NAA+0.5 TDZ+20 µM MeJA	20.04 ±1.79^{b}	4.50 ±0.22^{c}	29.33 ±2.60^{ab}
0.1 NAA+0.5 TDZ+30 µM MeJA	18.82 ±1.31^{b}	4.40 ±0.23^{c}	29.39 ±4.18^{ab}
0.1 NAA+0.5 TDZ+40 µM MeJA	22.69 ±0.61^{a}	4.26 ±0.22^{c}	32.29 ±3.37^{a}
F-test (P < 0.05)	*	*	*
CV	6.26	5.00	12.64

[1]Means within a column followed by the same letter are not significantly different (ns, P > 0.05) according to Duncan's multiple range test, * significantly different (P < 0.05)

ปริมาณสารฟีนอลิครวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Zaman et al. (2022) ที่ศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการสร้างสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ในแคลลัสของโหระพาสีม่วงพบว่าสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 100 มก./ล. ให้ปริมาณสารฟีนอลิครวม 14.98 mg GAE/g DW และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 93.5% สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองในสูตรอาหารอื่นๆ การเติมสารกระตุ้นที่สกัดจากยีสต์ และสารเมทิลจัสโมเนทมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างสารปริมาณสารฟีนอลิครวมให้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้น เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Chavan et al. (2021) ที่ศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการสร้างชีวมวล สารโพลีฟีนอล และสารต้านอนุมูลอิสระในแคลลัสของต้นกำแพงเจ็ดชั้นพบว่าสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์กระตุ้นให้แคลลัสมีการสร้างสารฟีนอลิครวมสูงที่สุด 61.54 ± 0.34 mg GAE/g DW และสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 200 มก./ล. ให้ปริมาณสารฟีนอลิครวมสูงที่สุด 51.96 ± 2.20 mg GAE/g DW เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นให้ปริมาณสารฟีนอลิครวม 48.63 ± 1.80 mg GAE/g DW ตามการรายงานของ Sarkate et al. (2017) สารสกัดจากยีสต์สามารถเพิ่มกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยผ่านการกระตุ้นการส่งสัญญาณในวิถีที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารฟีนอลิค เนื่องจากสารสกัดยีสต์ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนิน สารเหล่านี้จะทำหน้าที่ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงสารสกัดจากยีสต์

ยังเป็นแหล่งของกรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุ ซึ่งสารอาหารเหล่านี้สามารถเข้าไปช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนในวิถีที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้สารประกอบจำพวกกรดอะมิโน โมเลกุลเปปไทด์ และนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่สารสกัดจากยีสต์ยังสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ และอนุมูลปฏิกิริยาของออกซิเจนที่ทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน และทำให้เซลล์เสียหาย ดังนั้นเมื่อมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ลงไปในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงจึงทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการผลิตสารประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารฟีนอลิค แอนโทไซยานิน และฟลาโวนอยด์ และส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่เพิ่มสูงขึ้น (Akçay and Avcı, 2020) ส่วนสารเมทิลจัสโมเนทเป็นสารควบคุมที่สำคัญในระดับเซลล์ที่สามารถกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค และแมลง และความเครียดจากสภาพแวดล้อมภายนอกโดยการส่งสัญญาณจากเซลล์พืชที่ได้รับความเครียดไปยังเซลล์ที่มีสารเมทิลจัสโมเนทสะสมอยู่ ทำให้พืชเกิดการตอบสนองต่อความเครียด และส่งผลให้พืชเกิดการสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น (Cheong and Do Choi, 2003) อีกทั้งสารเมทิลจัสโมเนทยังเป็นสารกระตุ้นที่ทำให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) เอนไซม์ตัวแรกในวิถีของฟีนิลโพรพานอยด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของพืชหลายชนิดได้แก่ ฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น (Wang et al., 2015) แต่ในทางกลับกันการเติมสารกระตุ้นทั้งสารสกัดจากยีสต์ และสารเมทิลจัสโมเนทส่งผลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มลดลง เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Al-Khayri and Naik (2020) ที่พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ลดลงของการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอินทผาลัมหลังได้รับสารกระตุ้น ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อสำหรับพืชสมุนไพรในแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสารกระตุ้นสำหรับการผลิตสารประกอบฟีนอลิคที่แตกต่างกัน (Khan et al., 2019)

การสร้างสารไฟโตเสตอรอล (Phytosterol)

ยอด และแคลลัสที่ได้จากสูตรอาหารที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ และสารเมทิลจัสโมเนทมีการสร้างสารในกลุ่มไฟโตเสตอรอลได้แก่ ลูพิออลเพิ่มมากกว่าใบจากต้นในกระถาง โดยยอดและแคลลัสที่ได้จากสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์พบปริมาณสารอยู่ระหว่าง 0.43-1.02 mg/g DW และในสูตรอาหารที่เติมสารเมทิลจัสโมเนทพบปริมาณสารอยู่ระหว่าง 0.26-1.46 mg/g DW ปริมาณสารลูพิออล พบสูงสุดในสูตรอาหารที่เติมสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (1.46 mg/g DW) นอกจากนี้การเติมสารสกัดจากยีสต์ และสารเมทิลจัสโมเนทเพิ่มขึ้นยังส่งผลให้ปริมาณของสารลูพิออลมีแนวโน้มลดลง แต่ไม่พบการกระตุ้นปริมาณสารสติกมาสเตอรอล และสารเบต้า-ซิโตสเตอรอล **(Table 3)**

การเติมสารกระตุ้นทั้งสารสกัดจากยีสต์ และสารเมทิลจัสโมเนทกระตุ้นให้ยอด และแคลลัสสร้างสารลูพิออลที่สูงกว่าตัวอย่างใบที่ได้จากต้นในกระถาง (0.05 mg/g DW) โดยสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.5 ก./ ล. ให้ปริมาณสารลูพิออล 1.02 mg/g DW และสารเมทิลจัสโมเนทที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ให้ปริมาณสารลูพิออล 1.46 mg/g DW ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าการกระตุ้นด้วยสารสกัดจากยีสต์ แต่ถึงอย่างไรสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงอย่างเดียวยังให้ปริมาณสารลูพิออลที่สูงกว่าสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ และสารเมทิลจัสโมเนท ทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Chippy et al. (2022) ที่ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารลูพิออลโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ในพญายอสภาพปลอดเชื้อพบว่า ยอดที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 400 มก./ ล. ให้ปริมาณสารลูพิออลสูงถึง 975.50 นาโนกรัม สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ แต่น้อยกว่าสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงอย่างเดียวซึ่งให้สารลูพิออล 1,067 นาโนกรัม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน (BA หรือ TDZ) ที่เติมลงไปในสูตรอาหารทำหน้าที่เป็นสารช่วยกระตุ้นให้ยอด และแคลลัสมีการผลิตสารลูพิออล (Chippy et al., 2022; Liu et al., 2007) สำหรับสารสติกมาสเตอรอล และสารเบต้า-ซิโตสเตอรอล การเติมสารกระตุ้นสารสกัดจากยีสต์ในความเข้มข้นดังกล่าวอาจยังไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นสารทั้ง 2 ชนิดได้มากพอเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และต้นปกติ นอกจากนี้การเติมสารเมทิลจัสโมเนทอาจไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นการสร้างสารสติกมาสเตอรอล และสารเบต้า-ซิโตสเตอรอลในพญายอ อีกทั้งหากมีการใช้สารเมทิลจัสโมเนทในความเข้มข้นที่สูงกว่า 40 ไมโครโมลาร์ อาจทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพญายอตายได้ตามการรายงานของ Chippy et al. (2022) สารสกัดจากยีสต์ และสารเมทิลจัสโมเนทต่างเป็นสารกระตุ้นที่ทำให้พืชเกิดการสร้างสารทุติยภูมินำไปสู่การผลิตสารสำคัญต่างๆ ที่รวมไปถึงสารไฟโตเสตอรอลในพืช แต่ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอีกหลายปัจจัยที่มีต่อการกระตุ้นที่จำเป็นต้องมีความจำเพาะได้แก่ ความเข้มข้นของสารกระตุ้น และระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้น สภาพในการเพาะเลี้ยง ระยะการเจริญเติบโตของพืช อาหารเพาะเลี้ยง และแสง (Cardoso et al., 2019)

Table 3 Content of phytosterol in multiple shoots and callus of Phaya Yo (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau.) cv. "Dongbang" cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L TDZ combined with Yeast extract (YE) at concentrations 0, 0.5, 1, 1.5, and 2 g/L and Methyl jasmonate (MeJA) at concentrations 10, 20, 30, and 40 µM for 2 months

Treatment	Phytosterol (mg/g DW)		
	Lupeol[1]	Stigmasterol[1]	Beta-sitosterol[1]
Plant leaf from the pot	0.05 ±0.01^{i}	0.68 ±0.08^{a}	1.34 ±0.01^{a}
MS (free hormone)	0.19 ±0.01^{h}	0.42 ±0.00^{b}	0.86 ±0.06^{b}
0.1 NAA+0.5 TDZ	1.66 ±0.03^{a}	0.19 ±0.00^{e}	0.54 ±0.03^{de}
0.1 NAA+0.5 TDZ+0.5 g/L YE	1.02 ±0.03^{c}	0.26 ±0.00^{d}	0.52 ±0.00^{ef}
0.1 NAA+0.5 TDZ+1 g/L YE	0.91 ±0.08^{d}	0.32 ±0.02^{c}	0.59 ±0.04^{d}
0.1 NAA+0.5 TDZ+1.5 g/L YE	0.52 ±0.01^{f}	0.44 ±0.00^{b}	0.86 ±0.01^{b}
0.1 NAA+0.5 TDZ+2 g/L YE	0.43 ±0.01^{g}	0.46 ±0.02^{b}	0.76 ±0.02^{c}
0.1 NAA+0.5 TDZ+10 µM MeJA	1.46 ±0.06^{b}	0.20 ±0.00^{de}	0.48 ±0.01^{f}
0.1 NAA+0.5 TDZ+20 µM MeJA	0.71 ±0.01^{e}	0.22 ±0.01^{de}	0.52 ±0.01^{ef}
0.1 NAA+0.5 TDZ+30 µM MeJA	0.37 ±0.01^{g}	0.18 ±0.01^{e}	0.53 ±0.01^{def}
0.1 NAA+0.5 TDZ+40 µM MeJA	0.26 ±0.03^{h}	0.23 ±0.01^{de}	0.55 ±0.01^{de}
F-test (P < 0.05)	*	*	*
CV	5.31	7.79	3.89

[1]Means within a column followed by the same letter are not significantly different (ns, P > 0.05) according to Duncan's multiple range test, * significantly different (P < 0.05)

สรุป

สารกระตุ้นมีผลต่อการชักนำการสร้างสารสำคัญในพญายอพันธุ์ดงบังซึ่งขึ้นอยู่กับการเลือกชนิด และความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่เหมาะสม และพันธุ์พืชเองเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องในการสร้างสารสำคัญ การเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของพญายอพันธุ์ดงบังในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับสารกระตุ้นเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิครวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสภาพปลอดเชื้อได้ดีที่สุด สำหรับสารไฟโตสเตอรอลมีเพียงสารลูพิออลเท่านั้นที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าตัวอย่างใบที่ได้จากต้นในกระถาง เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับสารเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณหน่วยบริหารและจัดการทุนด้านการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันของประเทศ (บพข.) ประจำปี 2563 ที่สนับสนุนทุนในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

รงรอง หอมหวล, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, สุลักษณ์ แจ่มจำรัส และรัตนา เอการัมย์. 2564. การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตพืชสมุนไพรพญายอด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ. 4: 66–76.

Akçay, F. A., and A. Avcı. 2020. Effects of process conditions and yeast extract on the synthesis of selenium nanoparticles by a novel indigenous isolate *Bacillus* sp. EKT1 and characterization of nanoparticles. Archives of Microbiology. 202(8): 2233-2243.

Alam, A., S. Ferdosh, K. Ghafoor, A. Hakim, A. S. Juraimi, A. Khatib, and Z. I. Sarker. 2016. *Clinacanthus nutans*: A review of the medicinal uses, pharmacology and phytochemistry. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 9(4): 402–409.

Al-Khayri, J. M., and P. M. Naik. 2020. Elicitor-Induced production of biomass and pharmaceutical phenolic compounds in cell suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Molecules. 25(20): 4669.

Autaijamsripon, J., Y. Jirakiattikul, P. Rithichai, and A. Itharat. 2023. Effect of phenylalanine and methyl jasmonate on secondary metabolite production by shoot cultures of holy basil, purple type (*Ocimum sanctum* L.). Science and Technology Asia. 28(1): 229-239.

Cardoso, J. C., M. E. B. D. Oliveira, and F. D. C. Cardoso. 2019. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. Horticultura Brasileira. 37(2): 124-132.

Chavan, J. J., D. M. Ghadage, A. S. Bhoite, and S. D. Umdale. 2015. Micropropagation, molecular profiling, and RP-HPLC determination of mangiferin across various regeneration stages of Saptarangi (*Salacia chinensis* L.). Industrial Crops and Products. 76: 1123–1132.

Chavan, J. J., P. R. Kshirsagar, and S. G. Jadhav. 2021. Elicitor-mediated enhancement of biomass, polyphenols, mangiferin production, and antioxidant activities in callus cultures of *Salacia chinensis* L. 3 Biotech. 11: 285.

Cheong, J. J., and Y. Do Choi. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. TRENDS in Genetics. 19(7): 409-413.

Chiangchin, S., S. Thongyim, H. Pundith, T. Kaewkod, A. Inta, Y. Tragoolpua, S. Watthana, S. Rotarayanont, and A. Panya. 2021. Genetic diversity, phytochemical composition, and bioactivity of saba snake grass, (*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau) of Northern Thailand. Health Science and Technology Reviews. 14(3): 63–73.

Chippy, S. L., V. T. Anju Vijay, A. S. Hemanthakumar, P. P. Pillai, and T. S. Preetha. 2022. Enhanced production of lupeol through elicitation in *in vitro* shoot cultures of snake grass (*Clinacanthus nutans*). Notulae Scientia Biologicae. 14(4): 11195.

Danaee, M., R. Farzinebrahimi, M. A. Kadir, U. R. Sinniah, R. Mohamad, and R. Mat Taha. 2015. Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. Brazilian Journal of Botany. 38: 265-272.

Dixon, R. A., L. Achnine, P. Kota, C. J. Liu, M. S. Reddy, and L. Wang. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defense—a genomics perspective. Molecular Plant Pathology. 3(5): 371-390.

Farjaminezhad, R., and G. Garoosi. 2021. Improvement and prediction of secondary metabolites production under yeast extract elicitation of *Azadirachta indica* cell suspension culture using response surface methodology. AMB Express. 11(1): 43.

Folin, O., and V. Ciocalteu. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. Journal of Biological Chemistry. 73: 627–650.

Giri, C.C., and M. Zaheer. 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue, and organ cultures: Recent trends and a sky eye view appraisal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 126: 1–18.

Ho, T. T., H. N. Murthy, and S. Y. Park. 2020. Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. International Journal of Molecular Sciences. 21(3): 716.

Jaber, B. M., and S. F. Jasim. 2014. Phytochemical study of stigmasterol and β-sitosterol in *Viola odorata* plant cultivated in Iraq. Iraqi Journal of Biotechnology. 13(2): 86-94.

Khan, T., C. Hano, and B. H. Abbas. 2019. Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. Industrial Crops and Products. 129: 525–535.

Liu, X., X. Zhang, and J. Sun. 2007. Effects of cytokinins and elicitors on the production of hypericins and hyperforin metabolites in *Hypericum sampsonii* and *Hypericum perforatum*. Plant Growth Regulation. 53: 207–214.

Mohd-Esa, N., F. S. Hern, A. Ismail, and C. L. Yee. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. Food Chemistry. 122: 1055–1060.

Nhan, N. H., and N. H. Loc. 2018. Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of long jack (*Eurycoma longifolia*) by elicitor treatment. Journal of Plant Biotechnology. 45: 340–346.

Nik Abd Rahman, N. M. A., M. Y. Nurliyana, and M. N. F. N. N Afiqah. 2019. Antitumor and antioxidant effects of *Clinacanthus nutans* Lindau in 4T1 tumor-bearing mice. BMC Complementary Medicine and Therapies. 19: 340.

Pathak, A. R., S. R. Patel, A. G. Joshi, N. Shrivastava, G. Sindhav, S. Sharma, and H. Ansari. 2022. Elicitor mediated enhancement of shoot biomass and lupeol production in *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. ex Schult. and *Tylophora indica* (Burm. F.) Merrill using yeast extract and salicylic acid. Natural Product Research. 37: 1767–1773.

Phua, Q. Y., S. Subramaniam, and V. Lim. 2018. The establishment of cell suspension culture of sabah snake grass (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 54: 413–422.

Portu, J., R. López, P. Santamaría, and T. Garde-Cerdán. 2017. Elicitation with methyl jasmonate supported by precursor feeding with phenylalanine: Effect on Garnacha grape phenolic content. Food Chemistry. 237: 416-422.

Pourmorad, F., S. J. Hosseinimehr, and N. Shahabimajd. 2006. Antioxidant activity, phenol, and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 5(11): 1142–1145.

Sardar, T., M. Maqbool, M. Ishtiaq, M. W. Mazhar, M. A. El-Sheikh, R. Casini, E. A. Mahmoud, and H. O. Elansary. 2023. Synergistic influence of yeast extract and calcium oxide nanoparticles on the synthesis of bioactive antioxidants and metabolites in *Swertia chirata in vitro* callus cultures. Molecules. 28(12): 4607.

Sarkate, A., S. Banerjee, J. I. Mir, P. Roy, and D. Sircar. 2017. Antioxidant and cytotoxic activity of bioactive phenolic metabolites isolated from the yeast-extract treated cell culture of apple. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. 130: 641-649.

Sittisart, P., B. Dunkhunthod, and C. Chuea-nongthon. 2020. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanolic extract from *Hoya kerrii* Craib. Chiang Mai Journal of Science. 47(5): 912–925.

Sørensen, J. L., and T. E. Sondergaard. 2014. The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology. 170: 55-60.

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

Zaman, G., U. Farooq, and M. N. Bajwa. 2022. Effects of yeast extract on the production of phenylpropanoid metabolites in callus culture of purple basil (*Ocimum basilicum* L. var purpurascens) and their *in-vitro* evaluation for antioxidant potential. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. 150: 543–553.

Złotek, U., and M. Swieca. 2016. Elicitation effect of Saccharomyces cerevisiae yeast extract on main health-promoting compounds and antioxidant and anti-inflammatory potential of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture. 96(7): 2565-2572.