Research Article

Received: March 15, 2019; Accepted: August 5, 2019

ผลของ Phe และ JA ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณสารทุติยภูมิของแคลลัสกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Phe and JA on Growth and Secondary Metabolite Contents of Roselle Callus (*Hibiscus sabdariffa* L.) under Aseptic Conditions

เยาวพา จิระเกียรติกุล*, ปพิชญา ขวานทอง และภาณุมาศ ฤทธิไชย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

อรุณพร อิฐรัตน์

สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Yaowapha Jirakiattikul*, Papichaya Kwanthong and Panumart Rithichai

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

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

Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine,

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

บทคัดย่อ

สารตั้งต้นและสารกระตุ้นสามารถเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพรหลายชนิด การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ phenylalanine (Phe) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและ jasmonic acid (JA) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นต่อปริมาณสารทุติยภูมิในแคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) accession HS005 โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสสีแดงเข้มบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 µM และ BA ความเข้มข้น 4.44 µM ร่วมกับ Phe ความเข้มข้น 50-200 µM หรือ JA ความเข้มข้น 50-150 µM เป็นเวลา 14 วัน พบว่า JA สามารถกระตุ้นการสร้างและสะสมสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ดีกว่า Phe โดยแคลลัสสีแดงเข้มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี JA ความเข้มข้น 100 µM มีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (0.47±0.11mg cyd-3-glu/L) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (55.14±.6.59 mg GAE/g dry extract) และสารฟลาโวนอยด์ (30.74±6.31mg CE/g dry extract) สูง

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** yjirakia@tu.ac.th **doi:** 10.14456/tstj.2020.126

กว่าสิ่งทดลองควบคุม 5.22, 10.36 และ 7.82 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 39.28±4.79 µg/mL

คำสำคัญ : กระเจี๊ยบแดง; แอนโทไซยานิน; ฟีนอลิค; ฟลาโวนอยด์; สารกระตุ้น

Abstract

Precursors and elicitors are able to enhance secondary metabolite contents in several medicinal plant species. The objective of this study was to investigate the effect of phenylalanine (Phe, a precursor) and jasmonic acid (JA, an elicitor) on secondary metabolite contents of Roselle callus (*Hibiscus sabdariffa* L. accession HS005). The dark-red-colored-callus was cultured on MS medium supplemented with 4.52 µM 2,4-D and 4.44 µM BA in combination with 50-200 µM Phe or 50-150 µM JA for 14 days. The result showed that JA was more effective in stimulating the accumulation of flavonoid compounds than Phe. The highest contents of total anthocyanin (0.47±0.11 mg cyd-3-glu/L), total phenolic compounds (55.14±.6.59 mg GAE/g dry extract) and flavonoids (30.74±6.31 mg CE/g dry extract) were obtained in 100 µM JA callus which were 5.22, 10.36 and 7.82 folds higher than the control treatment, respectively. The greatest DPPH radical scavenging activity with EC_{50} of 39.28±4.79 µg/mL also occurred in 100 µM JA.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*; anthocyanin; phenolic; flavonoid; elicitor

1. บทนำ

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) เป็นพืชที่กลีบเลี้ยง (calyx) มีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้แก่ ลดความดันโลหิต ลดไขมันในเส้นเลือด ป้องกันการเกิดนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น เนื่องจากประกอบด้วยสารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) สารฟีนอลิก (phenolic acid) สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สูง [1] อย่างไรก็ตาม พืชชนิดนี้เป็นพืชวันสั้น (short day plant) จึงเป็นข้อจำกัดในการผลิตตามสภาพธรรมชาติ อีกทั้งยังมีความเสี่ยงต่อการถูกเข้าทำลายของศัตรูตามธรรมชาติ [2,3] ทำให้ผลผลิตที่ได้อาจมีปริมาณ และคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอ ปัจจุบันจึงได้ผลิตสารทุติยภูมิจากพืชสมุนไพรในสภาพควบคุมด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากสามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ให้คุณภาพสม่ำเสมอ และใช้เวลาสั้นกว่าการปลูกพืชทั่วไป [4] การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระเจี๊ยบแดงได้มีรายงานแล้ว โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัส [5-7] และแคลลัสสีแดงเข้มที่พัฒนานี้สามารถสร้างและสะสมสารทุติยภูมิได้ เช่น แอนโทไซยานิน [6,7] สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ [7] ซึ่ง Banthorpe [8] รายงานว่าพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับการปลูกในธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์พืชมีข้อมูลทางพันธุกรรม และสามารถควบคุมหน้าที่ต่าง ๆ รวมถึงกระบวนการชีวสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ดังนั้นเซลล์พืชแต่ละเซลล์จึงสามารถเกิดเป็นต้นใหม่ และสามารถ

สร้างสารทุติยภูมิเหมือนกับต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารทุติยภูมิที่ได้จากแคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงโดยเฉพาะสารแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากรายงานของ Jirakiattikul และคณะ [7] น้อยกว่าปริมาณที่สกัดได้จากกลีบเลี้ยงของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ [9]

ปัจจุบันมีการศึกษานำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ร่วมกับวิธีการอื่น ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของพืช เช่น การเติมสารตั้งต้น (precursor) การเติมสารกระตุ้น (elicitor) การตรึงเซลล์ (immobilization) การซึมผ่าน (permeabilization) การดัดแปลงพันธุกรรม (genetic modification) และการควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิในวิถีชีวสังเคราะห์ของพืช (biosynthesis pathway) [4,10] โดยการเติมสารตั้งต้นและสารกระตุ้นเป็นวิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิด สารตั้งต้นที่นิยมใช้ในการเพิ่มสารทุติยภูมิโดยเฉพาะสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ phenylalanine (Phe) ซึ่งมีการศึกษาเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิดแล้ว เช่น เซลล์แขวนลอยขององุ่น (*Vitis vinifera*) [11] แคลลัสของแครอท (*Daucus carota* L.) [12] แคลลัสจากชิ้นส่วนใบของ *Hydrocotyle bonariensis* [13] ส่วนการใช้สารกระตุ้นมีรายงานการใช้ jasmonic acid (JA) ในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิดแล้ว เช่น แคลลัสของกุหลาบ (*Rosa hybrida* L.) [14] เซลล์แขวนลอยของ *Mentha* × *piperita* [15] เซลล์แขวนลอยของ *Artemisia absinthium* L. [16] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีศึกษาการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของแคลลัสกระเจี๊ยบแดงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อด้วย Phe และ JA ซึ่งความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิด เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองของพืชเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ Phe และ JA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของแคลลัสกระเจี๊ยบแดง

2. อุปกรณ์วิธีการ

นำแคลลัสสีแดงเข้ม (รูปที่ 1) ที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงที่มีกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม accession HS005 มาย้ายเลี้ยงทุก ๆ 30 วัน บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 µM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4.44 µM เมื่อได้แคลลัสในจำนวนที่มากเพียงพอแล้ว เพาะเลี้ยงแคลลัสสีแดงเข้มนี้บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 µM และ BA ความเข้มข้น 4.44 µM ร่วมกับ Phe ความเข้มข้น 50-200 µM หรือ JA ความเข้มข้น 50-150 µM เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุมที่ไม่เติม Phe และ JA โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2 ºC วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 7 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 20 ขวด แต่ละขวดมีแคลลัส 1 ชิ้น บันทึกน้ำหนักสดของแคลลัสก่อนและหลังเพาะเลี้ยง คำนวณค่า growth index (GI) ตามรายงานของ Abeda และคณะ [6] โดยคำนวณจาก GI = น้ำหนักสดหลังการเพาะเลี้ยง ÷ น้ำหนักสดก่อนการเพาะเลี้ยง

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง นำแคลลัสในทุกสิ่งทดลองไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze drier จากนั้นนำตัวอย่างแห้งมาสกัดด้วย 95 % ethanol อัตราส่วน 1 : 3 โดยปริมาตร เป็นเวลา 15 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง และนำตัวอย่างแห้งส่วนที่เหลือมาสกัดด้วย 95 % ethanol อีก 2 ครั้ง จากนั้นระเหยสารสกัดทั้งหมดให้แห้งด้วยเครื่อง

vacuum drier (รุ่น VD53, WTB binder) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH-differential ดัดแปลงจากวิธีของ Lee และคณะ [17] สารประกอบฟินอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Folin และ Ciocalteu [18] และสารฟลาโวนอยด์ ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhu และคณะ [19] และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีการของ Yamasaki และคณะ [20] ตามรายละเอียดที่อธิบายใน Jirakiattikul และคณะ [7]

นำข้อมูลในแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามวิธีการ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % ด้วยโปรแกรม SAS

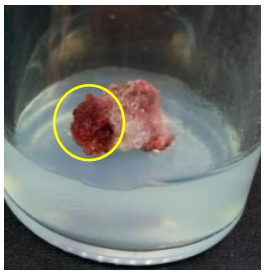

Figure 1 Dark-red-colored-callus of Roselle accession HS005 grown on MS medium supplemented with 4. 52 µM 2,4-D and 4.44 µM BA.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การเจริญเติบโตของแคลลัส

พบว่าค่า GI ของแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (รูปที่ 2) โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 150 µM มีค่า GI น้อยที่สุด (4.11±1.41) ขณะที่สิ่งทดลองควบคุมมีค่า GI สูงสุด (6.29±1.86) แสดงให้เห็นว่า Phe และ JA มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสกระเจี๊ยบแดง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Yu และคณะ [21] ซึ่งพบว่ารากโสมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม JA ทุกความเข้มข้นมีน้ำหนักสดและแห้งน้อยกว่าสิ่งทดลองควบคุม และ Qu และคณะ ที่รายงานว่า MeJA มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์ลดลงโดยมีค่าเป็น 0.7 เท่าของน้ำหนักแห้งของสิ่งทดลองควบคุม ขณะที่พืชบางชนิดให้ผลในทางส่งเสริมการเจริญเติบโตดังรายงานของ Bekheet และคณะ [22] ที่พบว่าการเติม JA ความเข้มข้น 25-100 µM ส่งผลให้น้ำหนักสดของแคลลัส globe artichoke และ milk thistle สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม หรือรายงานของ Roy และ Mukhopadhyay [23] ที่เพาะเลี้ยงยอด *Mentha arvensis* บนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 0.5-15.0 mg/l พบว่ายอดมีน้ำหนักสดมากกว่าสิ่งทดลองควบคุมหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 75 วัน อย่างไรก็ตาม สารตั้งต้นหรือสารกระตุ้นอาจไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยขององุ่นตามรายงานของ Saw [24] และ Zhang และคณะ [25] ดังนั้นการตอบสนองของพืชต่อสารตั้งต้น และสารกระตุ้นที่แตกต่างกันนี้ อาจเนื่องจากความแตกต่างของพืชที่ใช้ในการทดลอง สายพันธุ์ สูตรอาหารในการเพาะเลี้ยง รวมถึงความเข้มข้นของ Phe หรือ JA ที่ใช้ในการศึกษา

3.2 ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด

ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง (รูปที่ 3A) โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100 µM มีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงสุด (0.50±0.10 และ 0.47±0.11

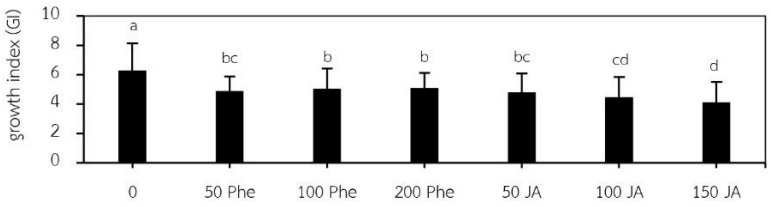

Figure 2 Growth index (GI) of dark- red- color- callus of Roselle cultured on MS medium supplemented with 4.52 µM 2,4-D, 4.44 µM BA and Phe or JA at different concentrations for 14 days.

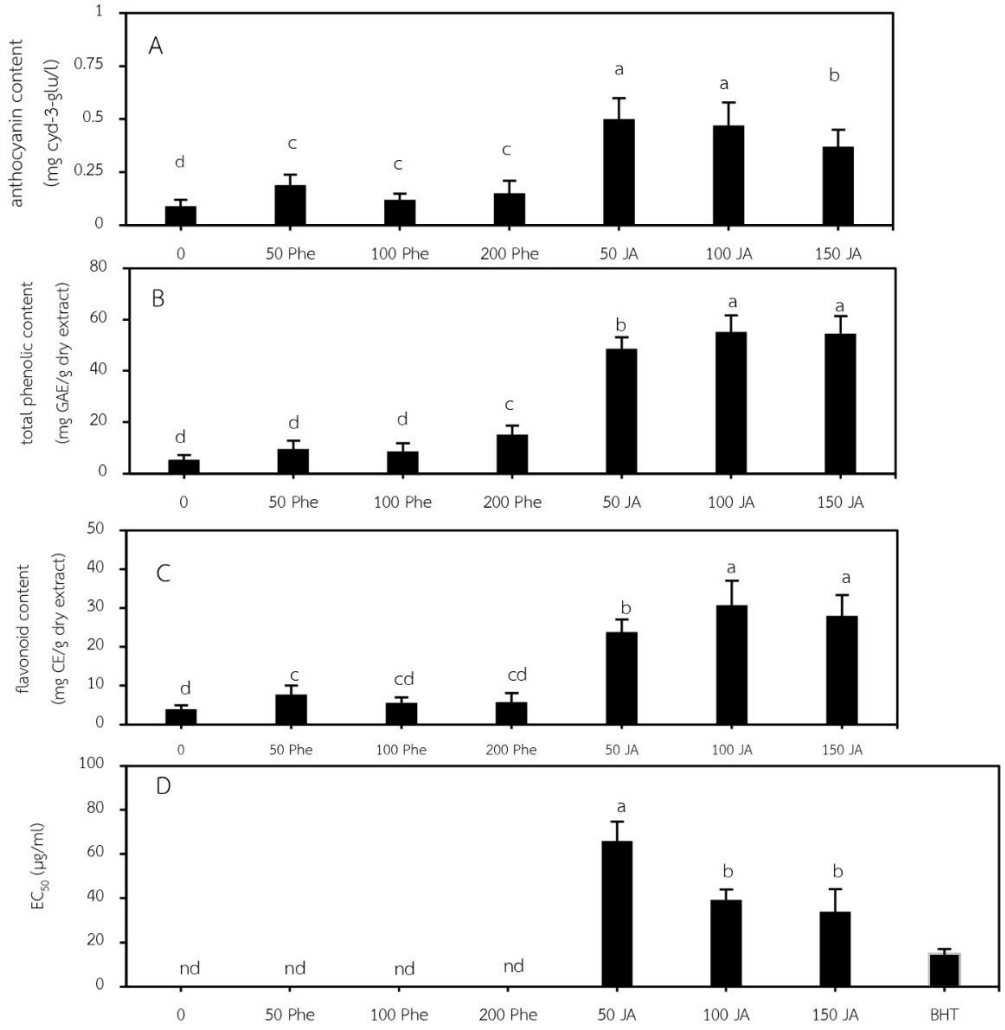

Figure 3 (A) anthocyanin content (B) total phenolic content (C) flavonoid content and (D) DPPH radical scavenging activity of dark-red-colored-callus of Roselle accession HS005 cultured on MS medium supplemented with 4.52 µM 2,4-D, 4.44 µM BA and Phe or JA at different concentrations for 14 days. (nd = not detected)

mg cyd-3-glu/L หรือ 5.56 และ 5.22 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม ตามลำดับ) ขณะที่สิ่งทดลองควบคุมและแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 50-200 µM มีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดน้อย (มีค่า 0.09±0.03 ถึง 0.19±0.05 mg cyd-3-glu/L) แสดงให้เห็นว่า JA ซึ่งเป็นสารกระตุ้นสามารถกระตุ้นการสร้างและสะสมสารแอนโทไซยานินของแคลลัสกระเจี๊ยบแดงดีกว่า Phe ซึ่งเป็นสารตั้งต้น โดย Anusha และคณะ [27] กล่าวไว้ว่าการที่ JA สามารถกระตุ้นหรือเพิ่มการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเนื่องจาก JA มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของกิจกรรมของเอนไซม์สำคัญในกระบวนการ phenylpropanoid ส่งผลให้เนื้อเยื่อหรือเซลล์มีการผลิตสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Qu และคณะ [11] ที่รายงานว่าการเติม MeJA ความเข้มข้น 50 mg/L (สารกระตุ้น) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวน ลอยองุ่น ส่งผลให้เซลล์มีผลผลิตสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin yield) สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 1.7 เท่า ขณะที่การเติม Phe ความเข้มข้น 5 mg/L มีผลผลิตสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 0.7 เท่า การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ JA สูงขึ้นเป็น 150 µM ปริมาณสารแอนโทไซยานินลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.37±0.08 mg cyd-3-glu/L) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของ JA ที่สูงเกินไปจนส่งผลต่อการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Fang และคณะ [26] ที่พบว่าการใช้ MeJA ความเข้มข้น 0.5 µM สามารถกระตุ้นการสะสมสารแอนโทไซยานินในเซลล์ *Vaccinium pahalae* ได้สูงสุด ขณะที่การใช้ MeJA ความเข้มข้นสูง 5-50 µM ส่งผลทำให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดในพืชลดลง และเมื่อใช้ MeJA ความเข้มข้น 500 µM มีปริมาณสารแอนโทไซยานินลดลงจนต่ำกว่าปริมาณในสิ่งทดลองควบคุม อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดของแคลลัสกระเจี๊ยบแดงในการศึกษาครั้งนี้มีค่าต่ำกว่าปริมาณดังกล่าวของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง accession HS005 ที่เจริญเติบโตในแปลงปลูก โดยมีปริมาณสารแอนโทไซยานิน 1.08±0.26 mg cyd-3-glu/L [9] แต่หากพิจารณาระยะเวลาในการผลิต การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มี JA ความเข้มข้น 50 µM ใช้เวลาเพียง 14 วัน ก็ชักนำให้แคลลัสสร้างสารแอนโทไซยานินได้สูง 0.50±0.10 mg cyd-3-glu/L ขณะที่การปลูกในแปลงต้องใช้เวลาประมาณ 100-120 วัน [9]

3.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

แคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 100 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด (55.14±.6.59 mg GAE/g dry extract หรือ 10.36 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม) (รูปที่ 3B) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 150 µM (54.54±6.80 mg GAE/g dry extract หรือ 10.25 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม) ส่วนสิ่งทดลองควบคุมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยสุด (5.32±1.93 mg GAE/g dry extract) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวของแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 50 และ 100 µM (9.61±3.29 และ 8.58±3.22 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า JA ส่งผลดีต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่า Phe เช่นเดียวกับปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับพืชหลายชนิดที่พบว่า JA กระตุ้นการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้เมื่อเพาะเลี้ยงพืชในสภาพปลอดเชื้อ เช่น

A. absinthium [16] *Celastrus paniculatus* [27] *Ocimum basilicum* [28] ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (48.65±4.49 ถึง 55.14±.6.59 mg GAE/g dry extract) ของแคลลัสกระเจี๊ยบแดงจากการใช้สารกระตุ้น JA ก็ยังน้อยกว่าปริมาณสารดังกล่าวในกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง accession HS005 ที่เจริญเติบโตในแปลงปลูก (76.07 ±6.25 mg GAE/g dry extract) [9]

3.4 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

แคลลัสสีแดงเข้มที่ได้รับ JA ความเข้มข้น 100-150 µM มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด (30.74±6.31 และ 27.94±5.42 mg CE/g dry extract ตามลำดับ หรือ 7.82 และ 7.11 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม ตามลำดับ) (รูปที่ 3C) ส่วนแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารสูตรที่เติม Phe ความเข้มข้น 50-200 µM และสิ่งทดลองควบคุมมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดน้อย (5.81±2.31 ถึง 7.68±2.39 mg CE/g dry extract) แสดงให้เห็นว่า JA สามารถกระตุ้นการสร้างและสะสมสารฟลาโวนอยด์ได้ดีกว่า Phe ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสอดคล้องกับการทดลองใน *A. absinthium* ที่พบว่า JA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mg/L สามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยสร้างและสะสมสารฟลาโวนอยด์ได้สูงสุด [16] อย่างไรก็ตาม ในพืชบางชนิดก็พบว่า Phe สามารถเพิ่มปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ดังรายงานของ Masoumian และคณะ [13] ที่พบว่าแคลลัสของ *H. bonariensis* ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 3 mg/L สามารถส่งเสริมให้แคลลัสผลิตสารฟลาโวนอยด์สูงสุด ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 23 % แต่หาก Phe ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 5 mg/L ส่งผลให้แคลลัสมีการผลิตสารฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด และในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของแคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงจากการกระตุ้นด้วย JA เป็นเวลา 14 วัน มีปริมาณสูงกว่ากลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงที่เจริญเติบโตในแปลงปลูกอย่างชัดเจน โดยกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง accession HS005 มีปริมาณสารดังกล่าว 8.21±0.72 mg CE/g dry extract [9] หรือสูงกว่า 3.74 เท่า โดยใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพียง 14 วัน

3.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

แคลลัสสีแดงเข้มที่ได้รับ JA ความเข้มข้น 100-150 µM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 39.28±4.79 และ 33.82±10.32 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่า EC_{50} ของแคลลัสที่ได้รับ JA ความเข้มข้น 50 µM มีค่า EC_{50} เท่ากับ 66.15±18.50 µg/mL (รูปที่ 3D) ส่วนสิ่งทดลองควบคุมและแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี Phe มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำมากจนไม่สามารถตรวจสอบค่า การที่แคลลัสที่ได้รับ JA ทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีนั้น อาจเนื่องจาก JA มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างและสะสมสารแอนโทไซยานินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ *A. absinthium* [16] และ *O. basilicum* [28] ที่พบว่า JA กระตุ้นให้เซลล์และเนื้อเยื่อของพืชเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น อย่างไรก็ตาม กลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง accession HS005 ตามรายงานของ Sriboonthai [9] มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 27.04±5.06 µg/mL) ดีกว่าฤทธิ์ที่พบในแคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี JA

ผลการทดลองครั้งนี้เห็นได้ว่าสารแอนโทไซยานินทั้งหมดมีปริมาณสูงสุดเมื่อแคลลัสได้รับ JA

ความเข้มข้น 50-100 µM ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด เมื่อแคลลัสได้รับ JA ความเข้มข้น 100-150 µM ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า JA ความเข้มข้น 100 µM สามารถกระตุ้นให้แคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดง accession HS005 ผลิตสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เพิ่มสูงขึ้น โดยมีระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดยังน้อยกว่าปริมาณสารจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้อาจเนื่องจากระยะเวลาในการกระตุ้นยังไม่เหมาะสม โดย Vasconsuelo และ Boland [29] กล่าวว่าระยะเวลาของการให้สารกระตุ้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการกระตุ้นเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ ดังนั้นจึงควรศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการรับ JA เพื่อกระตุ้นให้แคลลัสกระเจี๊ยบแดง accession Hs005 สร้างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ให้สูงขึ้นต่อไป

4. สรุป

JA ความเข้มข้น 100 µM สามารถกระตุ้นให้แคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดง accession HS005 มีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (0.47±0.11mg cyd-3-glu/L) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (55.14±6.59 mg GAE/g dry extract) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (30.74±6.31mg CE/g dry extract) สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 5.22 10.36 และ 7.82 เท่า ตามลำดับ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด (EC_{50} = 39.28±4.79 µg/ml)

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

6. References

[1] Ali, B.H., Wabel, N.A. and Blunden, G., 2005, Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review, Phytother. Res. 19: 369-375.

[2] Morton, J.F., 1987, Fruits of Warm Climate, Florida Flair Books, Miami, 505 p.

[3] Babatunde, F.E. and Mofoke, A.L.E., 2006, Performance of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as influenced by irrigation schedules, Pak. J. Nutr. 5: 363-367.

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

[5] Sié, R.S., Charles, G., Sakhanokho, H.F., Toueix, Y., Djè, Y., Sangaré, A. and Branchard, M., 2010, Protocols for callus and somatic embryo initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): Influence of explant type, sugar, and plant growth regulators, Aust. J. Crop Sci. 4: 98-105.

[6] 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.

[7] Jirakiattikul, Y., Kwanthong, P., Rithichai, P. and Itharat, A., 2019. Effects of callus color and culture period on secondary metabolite contents of roselle callus, Thai Sci. Technol. J. 27: 461-471. (in Thai)

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

[9] Sriboonthai, C., 2016, Mophological Cha racterization and Secondary Metabolites of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), Master Thesis, Thammasat University, Pathum Thani, 111 p.

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

[11] Qu, J., Zhang, W. and Yu, X., 2011, A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*, Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 107: 261-269.

[12] Arafa, N.M., Ibrahim, M.M. and Aly, U.I., 2015, Evaluation of total phenolic contents and antioxidant activity of carrot callus extracts as affected by phenylalanine precursor, Plant Tiss. Cult. Biotech. 25: 207-221.

[13] Masoumian, M., Arbakariya, A., Syahida, A. and Maziah, M., 2011, Effect of precursors on flavonoid production by *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues, Afr. J. Biotechnol. 10: 6021-6029.

[14] Ram, M., Prasad, K.V., Singh, S.K., Hada, B.S. and Kumar S., 2013, Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L, Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 113: 459-467.

[15] Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszewska, T. Stochmal, A. and Oleszek, W., 2011, The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha* × *piperita* cell suspension cultures, Plant Cell Tiss. Organ Cult. 108: 73-81.

[16] Ali, M., Abbasi. B.H. and Ali, G.S., 2014, Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L., Plant Cell Tiss. Organ Cult. 120: 1099-1106.

[17] Lee, J., Durst, R.W. and Wrolstad, R.E., 2005, Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study, J. AOAC Int. 88: 1269-1278.

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

[19] 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.

[20] Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y. Miyamoto, T. and Sato, T. , 1994, Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol feeding, Enzyme Microb. Tech. 36: 133-138.

[21] Yu, K.W. , Gao, W. , Hahn, E.J. and Paek, K. Y. , 2002, Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer, Biochem. Eng. J. 11: 211-215.

[22] Bekheet, S.A., Mohamed, K.E., Sanaa. A.A. and Manal, A.H., 2014, Callus production of globe artichoke and milk thistle: *in vitro* hypolipidemic and antioxidant activity, World J. Pharm. Res. 3: 1-17.

[23] Roy, D. and Mukhopadhyay, S. , 2012, Enhanced rosmarinic acid production in cultured plants of two species of *Mentha*, Indian J. Exp. Biol. 50: 817-825.

[24] Saw, N. M. M. T. , Riedel, H. , Kütük, O. , Ravichandran, K. and Smetanska, I., 2010, Effect of elicitors and precursors on the synthesis of anthocyanin in grape *Vitis vinifera* cell cultures, Energy Rec. J. 1: 189-192.

[25] Zhang, W. , Curtin, C. , Kikuchi, M. and Franco, C. , 2002, Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis inifera* suspension cultures, Plant Sci. 162: 459-468.

[26] Fang, Y. , Smith, M. A. L. and Pepin, M. F. , 1999, Effect of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin producing cell culture of ohelo (*Vaccinium pahalae*), *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plan. 35: 106-113.

[27] Anusha, T.S., Joseph, M.V. and Elyas, K.K., 2016, Callus induction and elicitation of total phenolics in callus cell suspension culture of *Celastrus paniculatus* – willd, an endangered medicinal plant in India, Pharmacogn. J. 8: 471-475.

[28] Malekpoor, F., Salim, A. and Pirbalouti, A. G. , 2016, Effect of jasmonic acid on total phenolic content and antioxidant activity of extract from the green and purple landraces of sweet basil, Acta Pol. Pharm. 73: 1229-1234.

[29] Vasconsuelo, A. and Boland, R. , 2007, Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants, Plant Sci. 172: 861-875.