

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิด และการเจริญเติบโตของแคลลัสอ่อนสำหรับการผลิตสารทุติยภูมิ

Effect of Plant Growth Regulators on the Grape Callus Induction and Growth for Secondary Metabolite Production

ชุตินา แก้วพิบูลย์*

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210

ณวงศ์ บุญนาค

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Chutima Kaewpiboon

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus
Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93210

Nawong Boonnak

Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University
Songkhla, 90000

บทคัดย่อ

องุ่น (*Vitis vinifera*) เป็นผลไม้ที่มีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีสารทุติยภูมิที่สำคัญกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งมีส่วนในการยับยั้งสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ และยังช่วยลดคอเลสเตอรอล จึงมีส่วนช่วยลดการเกิดโรคหัวใจได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการชักนำให้เกิด และการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนขององุ่น สำหรับการผลิตสารทุติยภูมิ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ขององุ่น โดยการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนขององุ่น ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต N⁶-benzyladenine (BAP) และ naphthaleneacetic acid (NAA) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนขององุ่น และศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่

ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส ซึ่งมีน้ำหนักสดมากที่สุดเท่ากับ 3.70 ± 0.53 กรัม จากนั้นตรวจสอบสารสกัดจากแคลลัสด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) พบสารเรสเวอราทรอลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า EC_{50} เท่ากับ 21.38 ± 2.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : องุ่น; แคลลัส; สารควบคุมการเจริญเติบโต; สารทุติยภูมิ; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Grape (*Vitis vinifera*) is a fruit with antioxidant properties because of polyphenols compounds, the important secondary metabolites. Polyphenols can inhibit the causes of various types of cancer and also reduce cholesterol, reducing the risk of heart disease. Therefore, this research aims to study the effect of plant growth regulators on callus induction and growth for secondary metabolite production by cell culture technique. The effect of growth regulators on the induction and growth of callus from grape explants which cultured on Murashige and Skoog (MS) supplemented with growth regulators as N^6 -benzyladenine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA). From the result, MS supplemented with BAP and NAA at concentrations of 1 and 0.5 mg/L, respectively can induce callus formation. Moreover, the effects of BAP at different concentrations on callus growth at 4 weeks were studied. The MS medium supplemented with BAP at 1.5 mg/L was suitable for grape callus growth which showed the highest of fresh weight, 3.70 ± 0.53 g. Then the callus extract was analysis of compounds through TLC techniques. The result showed that grape callus comprised of resveratrol and exhibited DPPH radical scavenging activity EC_{50} of 21.38 μ g/ml.

Keywords: grape; callus; growth regulator; secondary metabolite; antioxidant activity

1. บทนำ

องุ่น (*Vitis vinifera*) ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [1] และยังช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง และโรคเบาหวาน [2,3] จากข้อมูลการวิจัยพบว่าเปลือกและเมล็ดขององุ่นมีสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิก แต่สารสำคัญดังกล่าวจะมีปริมาณแตกต่างกัน ซึ่งแปรผัน

ตามปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพแวดล้อมของพื้นที่ปลูกและฤดูกาล ดังนั้นจึงใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อผลิตสารสำคัญทดแทนการผลิตสารจากการเพาะปลูกพืชตามธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์พืชมีอินทรีย์สารจำนวนมาก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการสังเคราะห์ต่าง ๆ และสร้างสารสำคัญได้เช่นเดียวกับพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งข้อดีของการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช คือ สามารถผลิตสารอย่างต่อเนื่อง สามารถ

ควบคุมสภาวะแวดล้อมในการผลิต ปราศจากเชื้อก่อโรคพืช และไม่มีปัจจัยการผลิตอันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง อีกทั้งขั้นตอนการสกัด และแยกสารให้บริสุทธิ์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช นั้นง่ายกว่าการสกัดจากชิ้นส่วนพืชอื่น ๆ ในธรรมชาติ [4] ปัจจุบันมีการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชหลายชนิด ได้แก่ องุ่น [5] ฟาทะลายโจร [6] และบัวบก [7] เป็นต้น

การศึกษาที่ผ่านมา พบว่าองุ่นสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและชักนำแคลลัสได้ดี [8] อีกทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงองุ่นสามารถผลิตสารกลุ่มฟีนอลิก โดยเฉพาะสารเรสเวอราทรอล (resveratrol) [9] ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในพืช มีหน้าที่ป้องกันพืชไม่ให้เกิดโรค มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงมาก การผลิตสารทุติยภูมิในพืชจะมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ โดยปัจจัยภายนอกและภายในเซลล์ เช่น ชนิด แหล่งของชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน รวมถึงสภาวะที่เพาะเลี้ยงเซลล์แล้วแต่ส่งผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิของเซลล์พืชในหลอดทดลอง จากงานวิจัยของ Cetin และคณะ [10] พบว่าการชักนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงองุ่นสร้างสารเรสเวอราทรอล โดยการเพาะเลี้ยงพืชในอาหาร B5 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA และ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินส่งผลต่อการเกิดและการเจริญเติบโตของแคลลัสองุ่น [11] นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตยังมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เพาะเลี้ยงองุ่น [12]

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่สนใจศึกษาผลจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารทุติยภูมิยังมีไม่มาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการ

ชักนำ และการเจริญเติบโตของแคลลัสองุ่น เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการเพาะเลี้ยงเซลล์องุ่น

2. อุปกรณ์ และวิธีการ

นำชิ้นส่วนใบและก้านใบขององุ่นจากยอดเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตัดแยกแคลลัสที่เกิดขึ้น ย้ายลงอาหารสูตร MS เติม BAP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส ดังนี้

2.1 ผลของ BAP ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสของแคลลัส

ตัดแยกแคลลัสที่เกิดขึ้นจากส่วนของใบเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสพร้อมกับชั่งน้ำหนักสดที่ในแต่ละระดับความเข้มข้นของอาหาร และเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแคลลัส

2.2 การสกัดสารจากแคลลัสองุ่น

ชั่งน้ำหนักแคลลัสจากใบองุ่นอายุ 4 สัปดาห์ จากสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต 0.5 กรัมน้ำหนักสด แล้วนำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นบดให้ละเอียด และแช่สกัดสกัดด้วยสารละลายเมทานอลต่อน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ เมื่อได้สารสกัดหยาบจากแคลลัสส่วนใบขององุ่น ตรวจสอบชนิดของสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ 50 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตนต่อเฮกเซน และสังเกตตำแหน่งของสารโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากนั้นนำไปหาค่า rate of flow (R_f) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของสาร แสดงระยะทางที่สารเคลื่อนตัวไปต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปได้ แล้วเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging

วิเคราะห์ด้วยวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) [13] โดยเริ่มจากการเตรียมสารสกัดจากแคลลัสความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน DMSO จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเอทานอล (10, 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และนำสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ข้ำ ทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ใน 96-well plate โดยปิเปตสารสกัดหยาบทุกความเข้มข้นใส่ลงในหลุมของ 96-well plate ปริมาตรหลุมละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงคำนวณหาร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH radical scavenging) ดังสมการที่ 1 คือ DPPH radical scavenging (%) = $[(A_0 - A_s) \div A_0] \times 100$ เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH และ A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง โดยเขียนกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลงได้

ร้อยละ 50 (EC_{50})

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม SPSS

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบและก้านขององุ่น บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ความระดับเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปเกิดเป็นแคลลัสทั้งที่ใบและก้าน โดยมีลักษณะของแคลลัสดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบและก้านใบขององุ่นในสูตรอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ความระดับเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ชิ้นส่วนพืช	ลักษณะแคลลัส	
ใบ	แคลลัสมีลักษณะร่วนฟู มีสีเขียวอมเหลือง	
ก้าน	แคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น มีสีเขียวอมน้ำตาลแดง	

ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากใบองุ่น มีลักษณะเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ ซึ่งเรียกแคลลัสลักษณะนี้ว่า ร่วนฟู (friable callus) และสีของแคลลัสมีสีเขียวอมเหลือง ส่วนแคลลัสจากก้านองุ่นมีลักษณะเซลล์เกาะกันแน่นซึ่งเรียกแคลลัสลักษณะนี้ว่า เกาะกันแน่น (compact callus) และสีของแคลลัสมีสีเขียวปนสีน้ำตาลแดง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Seung-Heui และ Seon-Kyo [14] ที่ทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนต่าง ๆ ขององุ่นให้เกิดแคลลัส พบว่าสูตรอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมที่สุด

3.1 ผลของ BAP ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส

การทดลองศึกษาผลของ BAP ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสจากใบองุ่น โดยย้ายแคลลัสจากใบองุ่นที่เกิดขึ้นจากการชักนำบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสสามารถเจริญเติบโตแม้ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS จะมีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP เพียงชนิดเดียว โดยที่ความเข้มข้น BAP ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีการเจริญเติบโตดีที่สุด รองลงมา คือ ที่ความเข้มข้น BAP ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2) แต่จะพบว่าปริมาณความเข้มข้นของ BAP ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BAP เป็นกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งมีบทบาท

สำคัญในการควบคุมการขยายตัวและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืช นอกจากนั้นยังควบคุมกระบวนการที่สำคัญต่าง ๆ ในการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืช โดยที่อัตราส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินจะมีผลต่อการพัฒนาของแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Khan และคณะ [15] ซึ่งศึกษาปริมาณไซโทไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสขององุ่น พบว่าเมื่อปริมาณของ BAP เพิ่มขึ้นจะลดการเกิดและการเจริญเติบโตของแคลลัสลง ดังนั้นปริมาณที่เหมาะสมจะมีผลต่อการเกิดและการเจริญเติบโตของแคลลัสองุ่น ทั้งนี้เนื่องจาก BAP ช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการเจริญเติบโตของพืช

3.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากแคลลัสองุ่น

ผลการทดลองการสกัดสารทุติยภูมิจากแคลลัสที่เกิดจากใบองุ่น ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากใบองุ่นเท่ากับ 0.52 กรัม ได้น้ำหนักสารสกัดของแคลลัสจากใบองุ่นเท่ากับ 0.007 กรัม และคำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (% extraction yield) ได้เท่ากับ 1.34 เปอร์เซ็นต์

3.2.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และโครงสร้างของสารทุติยภูมิจากแคลลัสองุ่น (thin layer chromatography, TLC)

ผลการศึกษาสารสกัดจากแคลลัสองุ่น และตรวจสอบสารที่สกัดได้ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง โดยหลักการ คือ ละลายของสารในตัวทำละลายและการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ ซึ่งสารที่ต้องการนำมาแยกโดยวิธีนี้จะมีสมบัติการละลายในตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน และเมื่อวัฏระยะการเคลื่อนที่ของตัวดูดซับ และคำนวณหา R_f พบว่าสารสกัดจากแคลลัสจากใบองุ่น และสารเรสเวอรอลมาตรฐานมี

ระยะการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 1) ซึ่งในสารทุติยภูมิจากแคลลัสอ่อนที่เพาะเลี้ยงพบสารเรสเวอราทรอลประกอบอยู่ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับหลาย ๆ งานวิจัยของ Hosseini และคณะ [9] ซึ่งศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิของการเพาะเลี้ยงขนราก (hairy root) ขององุ่น พบการผลิตสารทุติยภูมิกลุ่มสติลบิน (stilbene) ชนิดเรสเวอราทรอลในเซลล์เพาะเลี้ยงองุ่น นอกจากนี้มีงานวิจัยที่สนใจเพิ่มปริมาณของสารเรสเวอราทรอล

จากเซลล์เพาะเลี้ยงองุ่นโดยการกระตุ้น (elicitation) ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น วิธีการใช้สารจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic) เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต [16] โลหะหนัก [17] และวิธีการใช้สารจากสิ่งมีชีวิต (biotic) ได้แก่ สารเมทิลจามาเนต (methyl jamonate) [18] กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) และเบต้า-กลูแคน (β -glucan) [9] เป็นต้น

ตารางที่ 2 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากใบขององุ่นในสูตรอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ระดับความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

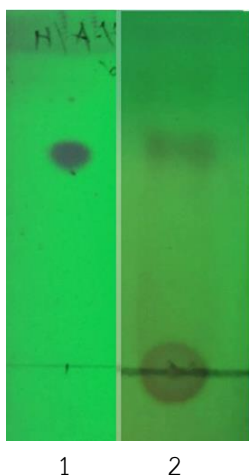
ความเข้มข้นของ BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ลักษณะแคลลัส	น้ำหนักสด (กรัม)
1	แคลลัสมีลักษณะเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ มีสีครีม	 1.2 ± 0.3^a
1.5	แคลลัสมีลักษณะเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ มีสีครีมบางส่วนมีสีเขียว	 3.7 ± 0.53^b
2	แคลลัสมีลักษณะเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ มีสีเขียว สีน้ำตาลแดง และบางส่วนมีสีครีม	 2.9 ± 0.87^c

3.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแคลลัสองุ่น

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากแคลลัสองุ่น มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 21.38 ± 2.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสองุ่น พบว่าเมื่อสกัดและแยกสารจากแคลลัสองุ่นให้บริสุทธิ์จะได้สารทรานส์เรสเวอราทรอล ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่า EC_{50} เท่ากับ 16.89 ± 5.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [20] ดังนั้นเมื่อเทียบกับสารสกัดจากแคลลัสองุ่นที่ได้จากการทดลองมีประสิทธิภาพกำจัดอนุมูลอิสระได้ต่ำกว่า

งานวิจัยข้างต้น ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดแคลลัสจากการทดลองยังคงเป็นสารสกัดหยาบ ดังนั้นหากทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอาจทำให้มีประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลอิสระดีขึ้น



สาร	ค่าเฉพาะตัวของสาร (Rf)
สารเรสเวอราทรอลมาตรฐาน	0.58
สารสกัดจากแคลลัส	0.60

รูปที่ 1 ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารบนโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยที่เลนที่ 1 เป็นสารมาตรฐาน และเลนที่ 2 เป็นสารสกัดแยกจากแคลลัสอ่อน

4. สรุป

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดและการเจริญเติบโตของแคลลัสอ่อนเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของอ่อนในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีสัดส่วนกลุ่มไซโทไคนินสูงกว่าออกซิน โดยใช้ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ที่ความ

ระดับเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าแคลลัสที่ได้จากใบขององุ่นมีลักษณะร่วนฟูเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโต โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า BAP เพียงชนิดเดียวสามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตแคลลัสดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าในแคลลัสขององุ่นมีการสะสมสารเรสเวอราทรอล ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิกลุ่มโพลีฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนรายวิชาโครงการวิจัยสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ประจำปีงบประมาณ 2560 และขอขอบคุณข้อมูลสนับสนุนบางส่วนจาก คุณมะลิวัลย์ สำฤทธิ์

6. รายการอ้างอิง

- [1] Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J. and Li, H.B., 2010, Biological activities of polyphenols from grapes, *Int. J. Mol. Sci.* 11: 622-646.
- [2] God, J.M., Tate, P. and Larcom, L.L., 2007, Anticancer effects of four varieties of muscadine grape, *J. Med. Food* 10: 54-59.
- [3] Shanmuganayagam, D., Warner, T.F., Krueger, C.G., Reed, J.D. and Folts, J.D., 2007, Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits, *Atherosclerosis* 190: 135-142.
- [4] Dias, M.I., Sousa, M.J., Alves, R.C. and Ferreira, I.C.F.R., 2016, Exploring plant

- tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review, *Indust. Crops Prod.* 82: 9-22.
- [5] Saw, N., Riedel, H., Cai, Z., Kütük, O. and Smetanska, I., 2012, Stimulation of anthocyanin synthesis in grape (*Vitis vinifera*) cell cultures by pulsed electric fields and ethephon. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 108: 47-54.
- [6] Marwani, E., Wardhani, K., and Esyanti, R., 2015, Development of hairy root culture of *Andrographis paniculata* for in vitro andrographolide production, *J. Med. Bioeng.* 4: 446-450.
- [7] Loc, N.H. and Nhat, N.T.D., 2013, Production of asiaticoside from centella (*Centella asiatica* L. Urban) cells in bioreactor, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3: 806-810.
- [8] Kaewpiboon, C. and Lohasupthawee, P., 2004, Effect of plant growth regulators to the differentiation and development of grape callus, King Mongkut's institute of Technology Ladkrabang, Bangkok.
- [9] Hosseini, S.M., Bahramnejad, B., Douleti Baneh, H., Emamifar, A. and Goodwin, P.H., 2017, Hairy root culture optimization and resveratrol production from *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 67.
- [10] Cetin, E.S., 2014, Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis vinifera* L. Okuzgozu callus cultures, *Biol. Res.* 47: 37.
- [11] Köse, C. and Güleriyüz, M., 2006, Effects of auxins and cytokinins on graft union of grapevine (*Vitis vinifera*), *New Zealand J. Crop Hort. Sci.* 34: 145-150.
- [12] Shirani Bidabadi, S., Afazel, M. and Sabbatini, P., 2018, Iranian grapevine rootstocks and hormonal effects on graft union, growth and antioxidant responses of Asgari seedless grape, *Hort. Plant J.* 4: 16-23.
- [13] Kaewpiboon, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Puwaprisirisan, P., Svasti, J. and Assavalapsakul, W., 2012, Studies of the *in vitro* cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants, *BMC Complement Altern. Med.* 12: 127.
- [14] Seung-Heui Kim, S.K.K., 2002, Effects of auxins and cytokinins on callus induction from leaf blade, petiole and stem segment of *in vitro*-grown Sheidan grape shoots, *J. Plant Biotechnol.* 4: 17-21.
- [15] Khan, N., Ahmed, M., Hafiz, I., Abbasi, N., Ejaz, S., Anjum, M., 2015, Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitro shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes, *OENO One* 49: 37-45.
- [16] Keskin, N. and Kunter, B., 2008, Production of *trans*-resveratrol in 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) callus culture

- in response to ultraviolet-C irradiation, *Vitis* 47: 193-196.
- [17] Cai, Z., Kastell, A., Speiser, C. and Smetanska, I., 2013, Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171: 330-340.
- [18] Esna-Ashari, M. and Mahmoodi Pour, A., 2011, Effect of methyl jasmonate on resveratrol production in organs and cell suspension cultures of two Iranian grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars, *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 86: 557-562.
- [19] Vuong, T.V., Franco, C. and Zhang, W., 2014, Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture, *Biotechnol. Rep.* 1-2: 15-21.
- [20] Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A. and Merillon, J.M., 1997, Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests, *Life Sci.* 61: 2103-2110.