Research Article

Received: November 7, 2018; Accepted: November 22, 2018

# ผลของเนื้อเยื่อเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดงเพื่อผลิตสารพลัมบาจิน

# Effects of Explant Tissue and Plant Growth Regulators on Callus Culture of *Plumbago indica* L. for Plumbagin Production

เพชรรัตน์ จันทรทิณ[A] และศศิวิมล จันทร์สุเทพ[A]

*ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน*
*ถนนมาลัยแมน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140*

สนธิชัย จันทร์เปรม[A]

*ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
*วิทยาเขตกำแพงแสน ถนนมาลัยแมน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140*

เสริมศิริ จันทร์เปรม[A]*

*ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
*วิทยาเขตกำแพงแสน ถนนมาลัยแมน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140*

Petcharut Chuntaratin and Sasiwimol Chansuthep

*Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus,*
*Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140*

Sontichai Chanprame

*Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,*
*Kamphaeng Saen Campus, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140*

Sermsiri Chanprame*

*Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,*
*Kamphaeng Saen Campus, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140*

**บทคัดย่อ**

การเพาะเลี้ยงเซลล์และแคลลัสเป็นทางเลือกหนึ่งในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในพืชสมุนไพร เจตมูลเพลิงแดงเป็นพืชสมุนไพรของไทยที่มีรากเป็นแหล่งสะสมของสารพลัมบาจินซึ่งเป็นสารในกลุ่ม

[A]Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** agrsrc@ku.ac.th

naphthoquinone ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและปล้องของเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใช้วิตามินของสูตร B5 และเติม NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.2 หรือ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin หรือ BA ความเข้มข้น 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยรวมพบว่าชิ้นส่วนใบเกิดแคลลัสได้ดีกว่าปล้อง และสูตรอาหารที่เติม BA ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าที่เติม kinetin ซึ่งแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็น friable callus ยกเว้นการใช้ BA ที่ความเข้มข้น 0.2-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กับชิ้นส่วนใบที่ทำให้เกิด compact callus สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพลัมบาจินพบการสะสมของสารพลัมบาจินในแคลลัสจากใบมากกว่าจากปล้อง การใช้ BA ทำให้แคลลัสสะสมสารพลัมบาจินได้มากกว่าการใช้ kinetin แต่พบว่า 2,4-D ที่มีความเข้มข้นสูงมีแนวโน้มยับยั้งการสะสมสารพลัมบาจิน งานวิจัยนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลดีที่สุด คือ เพาะเลี้ยงแผ่นใบบนอาหารสูตร MS-B5 ที่มี NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ได้แคลลัสที่มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูง และมีการสะสมสารพลัมบาจินได้มากที่สุด

**คำสำคัญ :** เจตมูลเพลิงแดง; แคลลัส; สารพลัมบาจิน; สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

## Abstract

The cultivation of cells and callus is an alternative method for production of pharmaceutically important compounds. *Plumbago indica* L. is a medicinal plant of Thailand, which its roots are the main source of plumbagin, a naphthoquinone derivative with various pharmacological properties. The induction of callus from leaf and internode explants on solid MS-B5 medium supplemented with 0.2 mg/L NAA, 0.2 or 0.4 mg/L 2,4-D, and 0.1-0.3 mg/L kinetin or BA showed that leaf explant yielded higher callus formation than internode explant. The BA contained media induced better callus formation than using kinetin. Most of them were friable callus, except that observed from leaf explant on 0.2-0.3 mg/L BA was compact callus. For plumbagin analysis, leaf-derived callus accumulated higher plumbagin than internode-derived callus. The results demonstrated that callus from using BA resulted in higher plumbagin content compared with that from kinetin. However, high concentration of 2,4-D may limit the plumbagin production. In this research, the MS-B5 medium containing 0.2 mg/L NAA, 0.2 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA was the most suitable medium for producing high fresh and dry weight of callus with the best yield of plumbagin.

**Keywords:** *Plumbago indica*; callus; plumbagin; plant growth regulator

## 1. บทนำ

การผลิตและสะสมสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในพืชสมุนไพร ทำให้มีความต้องการพืชสมุนไพรเพิ่มมากขึ้นในอุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืช

สมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่มและมีรากเป็นแหล่งสะสมของสารพลัมบาจิน (plumbagin) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่ม naphthoquinone ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ต้านแบคทีเรียและรา และกระตุ้นการบีบตัวของมดลูก [1]

การนำสารพลัมบาจินจากต้นเจตมูลเพลิงแดงมาพัฒนาเป็นส่วนประกอบของยารักษาโรคทำได้ยาก เนื่องจากต้นเจตมูลเพลงแดงใช้เวลาหลายปีในการสร้างรากที่สะสมสารพลัมบาจิน ดังนั้นการผลิตสารพลัมบาจินจากการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งสำหรับการเพิ่มแหล่งผลิตสารพลัมบาจิน โดย Komaraiah และคณะ [2] รายงานการผลิตสารพลัมบาจินในแคลลัส (callus) และเซลล์เพาะเลี้ยง (cell suspension) ของพืชในสกุล *Plumbago* แต่การผลิตสารทุติยภูมิด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ยังมีอุปสรรคหลายประการ ได้แก่ เซลล์เจริญเติบโตช้า ได้ปริมาณสารทุติยภูมิน้อยและไม่สม่ำเสมอ เป็นต้น สำหรับการผลิตสารพลัมบาจินนั้นมีรายงานว่าพบการสะสมสารพลัมบาจินในเซลล์อยู่ในระดับต่ำ [3] วิธีการที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีหลายวิธี เช่น การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและสิ่งกระตุ้นกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ (elicitor) เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง หรือการเลือกเพาะเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ ของพืชอย่างจำเพาะ เช่น ราก [4]

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและปล้องของเจตมูลเพลิงแดง โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน (auxin) ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BA) และ kinetin เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการสะสมสารพลัมบาจินในแคลลัส ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารพลัมบาจินจากแคลลัสต่อไป

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

การศึกษาผลของ 2,4-D และไซโตไคนิน 2 ชนิด ได้แก่ BA และ kinetin ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพลัมบาจินของแคลลัสเจตมูลเพลิงแดง ได้นำชิ้นส่วนใบและปล้องของเจตมูลเพลิงแดงจากต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่ใช้ธาตุอาหารของสูตร Murashige และ Skoog (MS) [5] และวิตามินของสูตร Gamborg (B5) [6] ที่เติม naphthaleneacetic acid (NAA) 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม 2,4-D 0.2-0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA หรือ kinetin 0-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาพที่ได้รับแสง 28 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกน้ำหนักสดของแคลลัส จากนั้นทำแคลลัสให้แห้งโดยใช้ความเย็นที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้งแล้ววิเคราะห์ปริมาณสารพลัมบาจินด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละทรีตเมนท์มี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวดทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

### 2.2 การสกัดและวิเคราะห์สารพลัมบาจิน

การสกัดสารพลัมบาจิน ทำโดยบดแคลลัสแห้งน้ำหนัก 200 มิลลิกรัม ให้ละเอียด แล้วเติมเมทานอล ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า 6 ชั่วโมง ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที กรองแยกสารสกัด

เมทานอลด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 แล้วระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

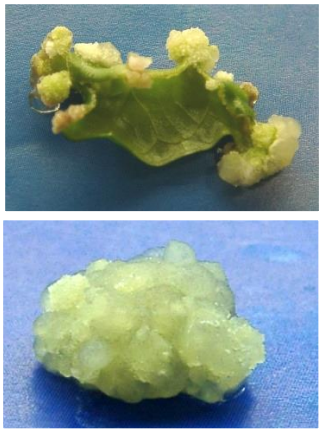
การวิเคราะห์ปริมาณสารพลัมบาจินทำโดยละลายตะกอนด้วย petroleum ether ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณสารพลัมบาจินด้วยเครื่อง HPLC รุ่น Agilent 1100 series ของบริษัท Agilent Technologies (USA) เปรียบเทียบกับสารพลัมบาจินมาตรฐาน (Sigma, USA: Catalog No. 481-42-5) โดยใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax® SB-C18 (กว้าง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร และบรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร) ที่มีเมทานอลและกรดแอซิติก ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 เป็นสารละลายตัวพา และมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณที่ใช้วิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร ใช้ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารพลัมบาจินที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Agilent chemstation (Agilent Technologies, USA) มาคำนวณหาปริมาณสารพลัมบาจินจากสมการ linear regression ที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (x) และพื้นที่ใต้พีคของสารพลัมบาจิน (y)

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

### 3.1 การชักนำและการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและปล้องของเจตมูลเพลิงแดง

การทดลองเบื้องต้น (ข้อมูลไม่ได้แสดง) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือมี NAA หรือ BA เพียงชนิดเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส แต่การเพาะเลี้ยงใบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงชนิดเดียว หรือที่มี BA และ NAA ร่วมด้วยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ อย่างไรก็ตาม แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่น (compact callus) มีปริมาณน้อยและเจริญเติบโตช้า ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ปรับปรุงจากงานวิจัยเดิม โดยชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและปล้องด้วยอาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่มี NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม 2,4-D 0.2-0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA หรือ kinetin 0-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบพบการเกิดแคลลัสตรงบริเวณรอยตัด (รูปที่ 1A) หลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7-10 วัน การใช้ชิ้นส่วนปล้องพบว่าเกิด friable callus ปกคลุมทั้งชิ้นส่วนปล้องเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ (รูปที่ 1B) โดยในช่วงแรกแคลลัสมีสีเขียวแล้วเปลี่ยนเป็นสีเทาเข้มหลังจากเพาะเลี้ยง 3-4 สัปดาห์



(A) leaf

(B) internode

**Figure 1** Compact callus induced from leaf (A) and friable callus induced from internode (B) of *Plumbago indica* L. on solid MS-B5 medium supplemented with 0.2 mg/L NAA, 0.2 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L BA.

สำหรับการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบพบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตดีกว่าการใช้

ชิ้นส่วนปล้อง (รูปที่ 2 และ 3) โดยแคลลัสที่ชักนำได้แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ compact callus และ friable callus โดยพบการเกิด friable callus เมื่อชักนำด้วยอาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่เติม NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ทุกความเข้มข้น ร่วมกับ kinetin ทุกความเข้มข้น หรือ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าแคลลัสมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแคลลัสที่ได้มีบางส่วนเป็น compact callus

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องพบว่าแคลลัสจากทุกสูตรอาหารมีลักษณะเป็น friable callus โดยมีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเมื่อชักนำแคลลัสด้วยอาหารที่เติม NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องพบว่าแคลลัสจากทุกสูตรอาหารมีลักษณะเป็น friable callus โดยมีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเมื่อชักนำแคลลัสด้วยอาหารที่เติม NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

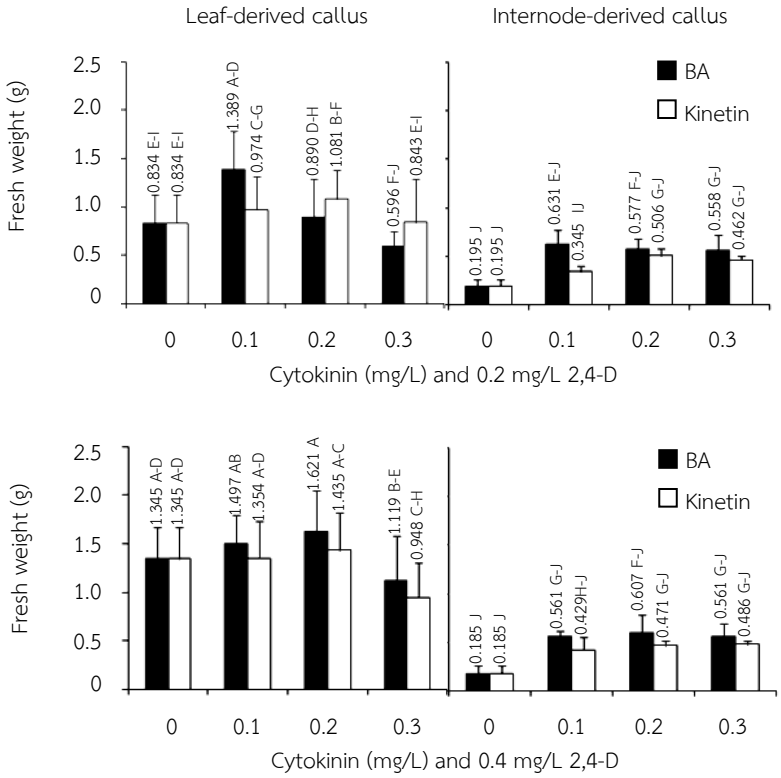



**Figure 2** Fresh weight of callus induced from leaf and internode of *Plumbago indica* L. on solid MS-B5 medium supplemented with 0.2 mg/L NAA, 0.2-0.4 mg/L 2,4-D and BA or kinetin at 0-0.3 mg/L for 4 weeks under a photoperiod of 16 h light/8 h dark (28 μmol/$m^2$/s) at 25±2 °C. Means followed by the same letter(s) are not significantly different at the 5 % probability level according to Duncan's new multiple range test.

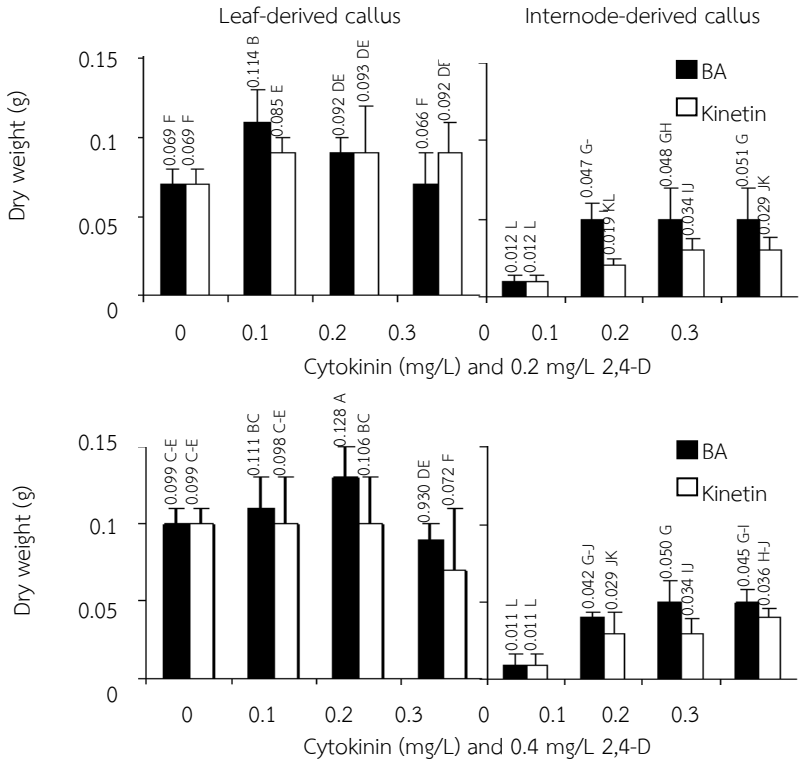



**Figure 3** Dry weight of callus induced from leaf and internode of *Plumbago indica* L. on solid MS-B5 medium supplemented with 0.2 mg/L NAA, 0.2-0.4 mg/L 2,4-D and BA or kinetin at 0-0.3 mg/L for 4 weeks under a photoperiod of 16 h light/8 h dark (28 μmol/m$^2$/s) at 25±2 °C. Means followed by the same letter(s) are not significantly different at the 5 % probability level according to Duncan's new multiple range test.

**3.2 การผลิตสารพลัมบาจินจากแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดง**

เมื่อนำแคลลัสมาวิเคราะห์ปริมาณสารพลัมบาจินด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสารละลายตัวอย่างที่สกัดจากแคลลัสปรากฏพีคที่มี retention time ที่ประมาณ 13 นาที (รูปที่ 4A) ซึ่งใกล้เคียงกับพีคของสารละลายพลัมบาจินมาตรฐาน (รูปที่ 4B) นำพื้นที่ใต้พีคของสารละลายตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณสารพลัมบาจินจากสมการ linear regression (y = 23.79x + 0.77) ที่มีค่า $R^2$ เท่ากับ 0.99993 ที่สร้างจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (x; 0.001-10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และพื้นที่ใต้พีค (y) ของสารละลายพลัมบาจินมาตรฐาน (รูปที่ 4C)

ผลการทดลองพบว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากใบมีปริมาณสารพลัมบาจินสูงกว่าแคลลัสที่ได้จากส่วนปล้องอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 5) แสดงให้เห็นว่าชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาชักนำแคลลัสนั้นมีผลอย่างมากต่อปริมาณสารทุติยภูมิที่ผลิตในแคลลัส ซึ่งจากรายงานการศึกษาใน *Dioscorea doryophora* พบว่าแคลลัสที่ชักนำจากรากผลิตสาร diosgenin ได้สูงสุด รองลงมาคือ แคลลัสที่ชักนำจากใบ เมล็ด ข้อ และปล้อง ตามลำดับ [7]

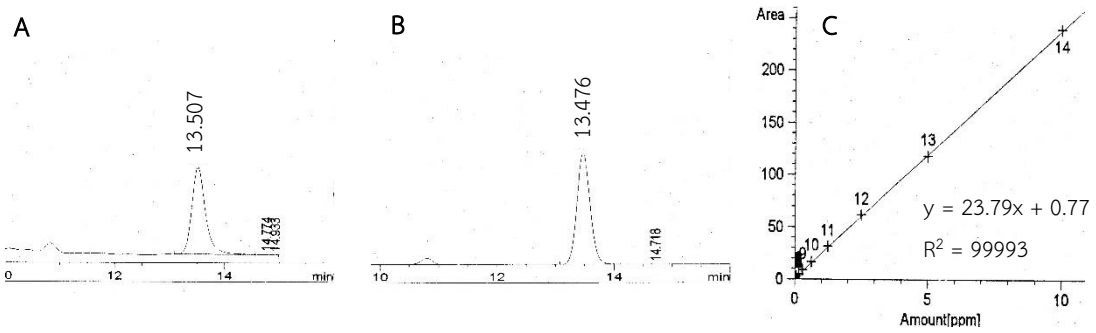



**Figure 4** HPLC chromatograms of a standard plumbagin (Sigma, USA; Catalog No. 481-42-5) (A) and methanolic extract of callus (B). A calibration curve of standard plumbagin was prepared from concentrations of standard plumbagin and peak areas (C).

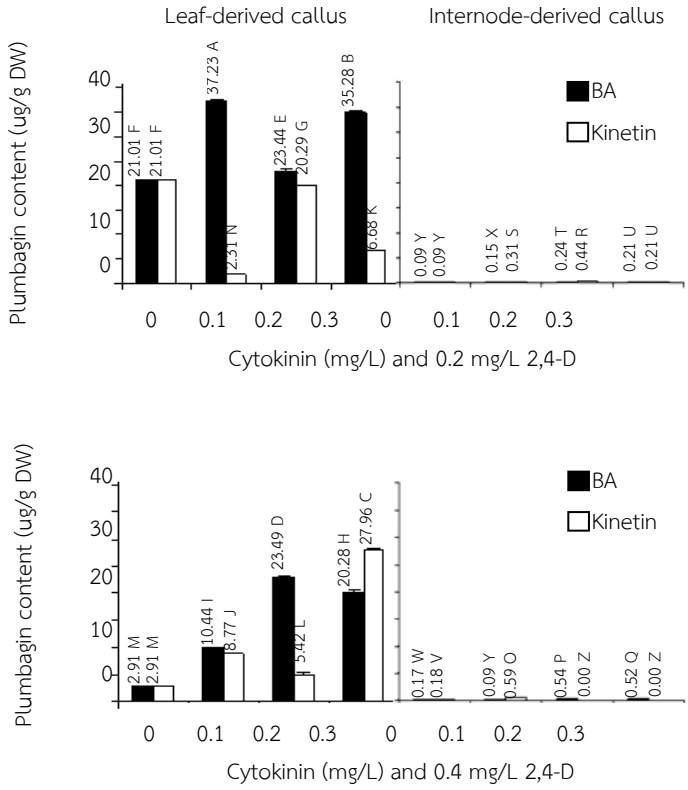



**Figure 5** Plumbagin accumulated in callus induced from leaf and internode of *Plumbago indica* L. on solid MS-B5 medium supplemented with 0.2 mg/L NAA, 0.2-0.4 mg/L 2,4-D and BA or kinetin at 0-0.3 mg/L for 4 weeks under a photoperiod of 16 h light/ 8 h dark (28 μmol/m$^2$/s) at 25±2 °C. Means followed by the same letter(s) are not significantly different at the 5 % probability level according to Duncan's new multiple range test.

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารนั้น พบว่ามีผลต่อการสะสมสารพลัมบาจินด้วยเช่นกัน โดยการเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D จาก 0.2 เป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ปริมาณสารพลัมบาจินในแคลลัสทั้งที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบและปล้องลดลง ทั้งนี้มีรายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตสารทุติยภูมิในพืช โดยชนิดของออกซินและไซโตไคนินหรืออัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านการเจริญเติบโตและการผลิตสารทุติยภูมิในเซลล์เพาะเลี้ยงของพืชหลายชนิด [8] โดย 2,4-D นั้นมีรายงานว่ามีผลทำให้เซลล์ผลิตสารทุติยภูมิบางชนิดได้น้อยลง เช่น ในแคลลัสของ *Populus* sp. และ *Daucus carota* ที่พบว่าเมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่ใช้ 2,4-D แต่ใช้ NAA หรือ indole acetic acid (IAA) ทำให้มีปริมาณสารทุติยภูมิในกลุ่มแอนโทไซยานินเพิ่มมากขึ้นกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D [9]

นอกจาก 2,4-D แล้วในการทดลองนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของ kinetin และ BA ก็มีผลต่อปริมาณสารพลัมบาจิน ทั้งในแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบและปล้องด้วยเช่นกัน (รูปที่ 5) โดยในแคลลัสจากใบพบว่าการใช้ 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสสะสมสารพลัมบาจินได้มากกว่าการใช้ kinetin ทั้งนี้ในพืชสกุล *Plumbago* มีรายงานความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ BA เป็นองค์ประกอบในอาหาร เช่น Komaraiah และคณะ [2] ใช้อาหารสูตร B5 ที่มี BA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง (*P. indica*) เพื่อผลิตสารพลัมบาจิน และ Lubaina และ Murugan [10] ประสบความสำเร็จในการชักนำ compact callus ที่มาจากชิ้นส่วนใบและลำต้นเจตมูลเพลิงขาว (*P. zeylanica*) โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ kinetin

ทั้งนี้งานวิจัยนี้พบว่าการใช้ BA ตั้งแต่ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้แคลลัสบางส่วนที่มีลักษณะเป็น compact callus ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Lubaina และ Murugan [10] ที่ชักนำ compact callus ที่พัฒนาไปเป็นยอดได้ดีจากชิ้นส่วนใบและลำต้นเจตมูลเพลิงขาว โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.5-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA หรือ kinetin 0.1 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม แม้ว่า compact callus จะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดี แต่แคลลัสชนิดนี้ยากต่อการนำไปใช้ผลิตเป็นเซลล์แขวนลอยสำหรับเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงในอนาคต ส่วนการใช้ kinetin นั้นถึงแม้ว่าจะทำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็น friable callus ซึ่งเหมาะสำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย แต่พบว่า kinetin กลับมีผลทำให้ปริมาณสารพลัมบาจินที่สะสมในแคลลัสน้อยกว่าการใช้ BA รวมทั้งยังมีความแปรปรวนสูงกว่าด้วย

## 4. สรุป

แคลลัสจากชิ้นส่วนใบมีการเจริญเติบโตและการผลิตสารพลัมบาจินได้ดีกว่าการใช้ชิ้นส่วนปล้อง โดยแคลลัสที่ชักนำได้มีทั้งที่เป็น compact callus และ friable callus ขึ้นกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหาร ความเข้มข้นของ 2,4-D kinetin และ BA มีผลต่อปริมาณสารพลัมบาจินทั้งในแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบและปล้อง โดยการเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D จาก 0.2 เป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ปริมาณสารพลัมบาจินในแคลลัสทั้งที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบและปล้องลดลง นอกจากนี้การใช้ 2,4-D ร่วมกับ BA 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสมีการสะสมสารพลัมบาจินได้มากกว่าการใช้ kinetin แต่การใช้ BA ที่ความเข้มข้น 0.2-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ

ชิ้นส่วนใบทำให้เกิด compact callus จากการทดลองนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลดีที่สุด คือ เพาะเลี้ยงแคลลัสจากใบบนอาหารสูตร MS-B5 ที่มี NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงและมีการสะสมสารพลัมบาจินได้มากที่สุด

## 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยงบประมาณสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

## 6. References

[1] Roy, A. and Bharadvaja, N., 2018, Biotech nology approaches for the production of pharmaceutically important compound: Plumbagin, Curr. Pharm. Biotechnol. 19: 372-381.

[2] Komaraiah, P., Kavi Kishor, P.B. and Ramakrishna, S.V., 2001, Production of plumbagin from cell suspension cultures of *Plumbago rosea* L., Biotechnol. Lett. 23: 1269-1272.

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

[4] Murthy, H.N., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2014, Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improve ment and metabolite accumulation, Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 118: 1-16.

[5] Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiol. Plant. 15: 473-479.

[6] Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojimar, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell, Exp. Cell Res. 50: 151-158.

[7] Tsay, H.S. and Agrawal, D.C., 2005, Tissue culture technology of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization, Int. J. Appl. Sci. Eng. 3: 215-223.

[8] Jamwal, K., Bhattacharya, S. and Puri, S., 2018, Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants, J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants 9: 26-38.

[9] Rajendran, L., Ravishankar, G.A., Venkata raman, L.V. and Prathiba, K.R., 1992, Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. as influenced by nutrient stress and osmoticum, Biotechnol. Lett. 14: 707-714.

[10] Lubaina, A.S. and Murugan, K., 2012, Effect of growth regulators in callus induction, plumbagin content and indirect organogenesis of *Plumbago zeylanica*, Int. J. Pharm. Sci. 4: 334-336.