P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj
ปีที่ 30 ฉบับที่ 4 (กรกฎาคม-สิงหาคม 2565) หน้า [49-59]

การเพิ่มจำนวนยอดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของยอดไผ่ซางหม่นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

Shoot Multiplication and Antioxidant Contents of *In Vitro Dendrocalamus Sericeus* Shoots

กนกวรรณ ส่งเสริม, ภาณุมาศ ฤทธิไชย, ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก, เยาวพา จิระเกียรติกุล*
สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี 12120
Kanokwan Songsoem, Panumart Rithichai, Thanpisit Phuangchik,
Yaowapha Jirakiattikul*
Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,
Thammasat University, Pathum Thani 12120
Received 13 December 2021; Received in revised 16 March 2022; Accepted 5 April 2022

บทคัดย่อ

ไผ่ซางหม่น (*Dendrocalamus sericeus*) เป็นไผ่ชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์หลากหลายด้าน และมีความต้องการใช้มากขึ้น จึงจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนยอดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมถึงวิเคราะห์หาปริมาณสารทุติยภูมิของยอดไผ่เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารและสถานะของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอด รวมถึงปริมาณสารทุติยภูมิของยอดไผ่ซางหม่นในสภาพปลอดเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อไผ่ซางหม่น บนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 mg/L ร่วมกับ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0 และ 0.5 mg/L และเพาะเลี้ยงกลุ่มยอด 2 – 3 ยอดในอาหารเหลว และบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 0 8 และ 15% (v/v) นาน 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 8% (v/v) ส่งผลดีต่อการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่ซางหม่น โดยมียอดใหม่ที่พัฒนาสูงสุด 4.67 ± 0.02 ยอด และมีความยาวยอด 2.51 ± 0.35 cm เมื่อนำยอดไผ่ซางหม่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดังกล่าวมาวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับยอดอ่อนและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่า ยอดในสภาพปลอดเชื้อ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (63.80 ± 1.31 mg GAE/g dry extract) สารฟลาโวนอยด์สูงกว่า (32.18 ± 1.95 mg CE/g dry extract) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH EC_{50} = 169.17 ± 11.46 µg/mL และ ABTS EC_{50} เท่ากับ 299.39 ± 68.93 µg/mL) ดีกว่ายอดอ่อนและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

คำสำคัญ: การเพิ่มจำนวนยอด; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ; ไผ่ซางหม่น; สารต้านอนุมูลอิสระ

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** yjirakia@tu.ac.th
doi: 10.14456/tstj.2022.41

Abstract

Dendrocalamus sericeus is one of the bamboo plant species which is very useful for many purposes, and the demand for bamboo products has been increasing. It is necessary to proliferate shoots *in vitro* and determine the application of antioxidant contents in the medicinal and cosmetic industries. Therefore, the objectives of this study were to investigate the suitable medium for shoot multiplication and to determine the antioxidant contents of *in vitro* shoots. Single-node explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0, 1, 2 and 3 mg/L 6-benzyladenine (BA) in combination with 0 and 0.5 mg/L naphthaleneacetic acid (NAA). Then, *in vitro* regenerated shoot clusters of 2 – 3 shoots were cultured in liquid and on solid MS medium supplemented with 2 mg/L BA in combination with 0, 8, and 15% (v/v) coconut water for four weeks in order to proliferate shoots. The highest shoot formation of 4.67 ± 0.02 and shoot length of 2.51 ± 0.35 cm were observed in liquid MS medium supplemented with 2 mg/L BA and 8% (v/v) coconut water. The antioxidant contents and activity of two-week-old *in vitro* regenerated shoots were determined and compared to field-grown shoots and leaves. The results showed higher total phenolic (63.80 ± 1.31 mg GAE/g dry extract) and flavonoid contents (32.18 ± 1.95 mg CE/g dry extract) than field-grown shoots and leaves. In addition, greater DPPH radical scavenging activity (EC_{50} of 169.17 ± 11.46 μg/mL) and ABTS radical cation decolorization activity (EC_{50} of 299.39 ± 68.93 μg/mL) were also observed in two-week-old *in vitro* shoots.

Keywords: Antioxidant; *Dendrocalamus sericeus*; Plant tissue culture; Shoot multiplication

1. บทนำ

ไผ่ซางหม่น (*Dendrocalamus sericeus*) เป็นไผ่พันธุ์พื้นเมืองที่พบมากทางภาคเหนือ มีลำขนาดใหญ่ตรง แข็งแรง ไม่มีหนาม ลำอ่อนมีผงสีขาวคล้ายแป้งปกคลุมตลอดลำ ลำแก่สีเขียวอมเทา เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะสูงประมาณ 10 - 25 m เนื้อไม้หนา สวยงาม จึงเป็นที่ต้องการของตลาด [1] การขยายพันธุ์ไผ่ตามธรรมชาติมีข้อจำกัดมากทั้งทางสภาพแวดล้อมที่เกิดจากธรรมชาติ สัตว์ป่า หรือมนุษย์ [2] รวมทั้งการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น การชำ ตอนกิ่ง ก็ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ต้นจำนวนมาก จากปัญหาดังกล่าว จึงได้มีการศึกษาการขยายพันธุ์ไผ่ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถผลิตต้นพันธุ์พืชได้ในปริมาณมากๆ และใช้ระยะเวลาไม่นาน ต้นที่ได้มีขนาดสม่ำเสมอและปลอดโรค การเพิ่มจำนวนยอดของพืชในสภาพปลอดเชื้อจำเป็นต้องมีอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม [3] ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิดรวมถึงไผ่ด้วย เช่น อาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่ตง (*D. asper*) คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 mg/L [4] หรืออาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่ซาง (*D. strictus*) คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L [5] และอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่หก *(D. hamiltonii)* คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 mg/L [6] ซึ่งจะเห็นได้ว่า อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงไผ่มักเติม BA ร่วมหรือไม่ร่วมกับ NAA อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่ซางหม่นในสภาพปลอดเชื้อ

นอกจากไผ่จะมีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เฟอร์นิเจอร์ อาหาร และก่อสร้างแล้ว ยังมีรายงานถึงปริมาณสารทุติยภูมิที่พบในไผ่ชนิดต่างๆ ที่อาจนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการรักษาโรค หรืออุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหารเสริม เป็นต้น ดังรายงานของ Lv et al. [7] พบว่า ในสารสกัดใบไผ่ *D. oldham* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีสารฟลาโวนอยด์ หรือ Jiao et al. [8] พบสาร tricin (5,7,4′-trihydroxy-3′,5′-dimethoxyflavone) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavone aglycone ในสารสกัดของใบไผ่ *Phyllostachys nigra* var. henonis ส่วน Gong et al. [9] พบว่า สารสกัดจากไผ่มีสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ Karawak et al. [10] พบว่า สารสกัดจากใบแก่ของไผ่ซางหม่น “นวลราชินี” มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าใบกลาง และใบอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และใบมีสารประกอบฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ ได้แก่ isoorientin, orientin, isovitexin และ vitexin โดยพบสาร isoorientin สูงสุด อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดไผ่ซางหม่นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อยังไม่มีรายงานการศึกษา โดยพืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้เหมือนต้นแม่ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์พืชมีข้อมูลทางพันธุกรรมและยังสามารถควบคุมหน้าที่ต่างๆ รวมถึงการสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้ [11] ซึ่งได้มีรายงานแล้วในพืชหลายชนิดเช่น *Dioscorea birmanica* [12], *Salvia miltiorrhiza* [13], *Bacopa monnieri* [14] และ *Boesenbergia rotunda* [15] เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดและวิเคราะห์หาปริมาณสารทุติยภูมิของยอดไผ่ซางหม่นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ โดยปริมาณสารทุติยภูมินั้นจะเปรียบเทียบกับยอดอ่อน และใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นไผ่ซางหม่นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งปริมาณสารทุติยภูมิของยอดไผ่ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้น เพื่อทำการศึกษาเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของยอดไผ่ซางหม่นหรือนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเพิ่มจำนวนยอด

2.1.1 ผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดยอด

ตัดกิ่งอ่อนไผ่ซางหม่นให้ชิ้นส่วนข้อมีความยาวประมาณ 1 cm โดย 1 ข้อมี 1 ตา ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและน้ำให้สะอาด พ่นชิ้นส่วนข้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% ทิ้งไว้ 1 - 2 นาที นำชิ้นส่วนข้อมาฟอกกำจัดเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ (clorox®, sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 10% (v/v) และเติม Tween 20 ประมาณ 1 - 2 หยด ฟอกกำจัดเชื้อนาน 10 นาที แล้วล้างข้อไผ่ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งกำจัดเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 และ 3 mg/L ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L โดยมีอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสิ่งทดลองควบคุม วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CDR) มี 7 สูตรอาหาร แต่ละสูตรอาหารมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 4 ขวด (1 ขวดมี 1 ข้อ) จากนั้นนำไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกจำนวนยอดที่พัฒนาและความยาวยอด (cm)

2.1.2 ผลของสถานะอาหารและความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวต่อการเพิ่มจำนวนยอด

นำยอดไผ่ซางหม่นที่พัฒนาบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L (จากการทดลองที่ 2.1.1) มาตัดแยกเป็นกอ แต่ละกอมี 2 – 3 ยอด นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับเติมน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 8% และ 15% (v/v) วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 สูตรอาหาร แต่ละสูตรอาหารมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 4 ขวด (1 ขวดมี 1 กอ) จากนั้นนำไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

โดยยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลววางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 rpm บันทึกการเกิดยอด (%) จำนวนยอดที่พัฒนา และความยาวยอด (cm)

2.2 ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดไผ่ซางหม่นในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดไผ่ซางหม่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L และน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 8% (จากการทดลองที่ 2.1.2) ไปอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างยอดแห้งสกัดด้วย ethanol ความเข้มข้น 95% ใช้ตัวอย่างแห้งและ ethanol อัตรา 1:3 โดยปริมาตร สกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 3 วัน จากนั้นนำมากรองและระเหยใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 2-3 วัน จนกว่าสารสกัดตัวอย่างจะมีน้ำหนักคงที่ วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS ของยอดไผ่ซางหม่นในสภาพปลอดเชื้อ เปรียบเทียบกับยอดอ่อนที่มีความยาว 15 - 20 cm และใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งใบมีสีเขียวเข้ม และใบกางเต็มที่ วิเคราะห์สารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังนี้

2.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ตามที่ได้อธิบายโดย Autaijamsripon et al. [14] โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1 mg/1 mL ปริมาตร 20 µL เติมสารละลาย 2M Folin- Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร100 µL และสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 80 µL ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (Tecan รุ่น infinite M200PRO) คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (mg GAE/g dry extract) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid

2.2.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric method ตามที่ได้อธิบายโดย Autaijamsripon et al. [14] ปิเปตสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1 mg/1 mL ปริมาตร 500 µL และสารละลาย 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 75 µL ผสมให้เข้ากันนาน 6 นาที เติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 150 µL ทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH และน้ำกลั่นปริมาตร 500 และ 275 µL ตามลำดับ ผสมและตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg CE/g dry extract) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน catechin

2.2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดัดแปลงจากวิธีการของ Yamasaki et al. [16] เตรียมสารสกัด 10 mg ละลายใน absolute ethanol ปริมาตร 1 mL ปิเปตสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเป็น 1,000 500 100 และ 10 µg/mL เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL ลงในสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 µL วางไว้ในที่มืดนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาค่า EC_{50} โดย EC_{50} ที่น้อยแสดงว่าสารสกัดมีความสามารถในสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดี

2.2.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Re et al. [17] เตรียมสารละลาย ABTS reagent โดยละลาย ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) 0.0385 g ใน deionized water ปริมาตร 5 mL และละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate)

0.0066 g ใน deionized water ปริมาตร 5 mL ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 12 - 16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS reagent ด้วย deionized water แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 nm ละลายสารสกัด 10 mg ใน absolute ethanol ปริมาตร 1 mL ปิเปตสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเป็น 1,000 500 100 และ 10 µg/mL ผสมสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 µL ด้วยสารละลาย ABTS reagent ปริมาตร 180 µL วางในที่มืดนาน 6 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาค่า EC_{50}

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การเพิ่มจำนวนยอด

3.1.1 ผลของ BA และ NAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอด

จากการเพาะเลี้ยงข้อไผ่ซางหม่นที่ปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 mg/L ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 และ 0.5 mg/L เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรมีการพัฒนาของตาข้างไปเป็นยอดได้ 100% แสดงให้เห็นว่าตาข้างของไผ่ซางหม่นมีศักยภาพในการเจริญและพัฒนาไปเป็นยอดได้ ซึ่งมีรายงานการพัฒนาของตาข้างไปเป็นยอดของไผ่หลายชนิดเมื่อนำชิ้นส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ไผ่หก (*D. Hamiltonii*) [18] ไผ่เป๊าะ (*D. giganteus*) [19] และ *Bambusa vulgaris* [20] เป็นต้น จำนวนยอดที่พัฒนาจากข้อของไผ่ซางหม่นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (Figure 1 A) โดยข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L มีจำนวนยอดที่พัฒนาสูงสุด เท่ากับ 3.31 ± 0.85 ยอด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และ BA ความเข้มข้น 3 mg/L ในขณะที่ข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีจำนวนยอดที่พัฒนาน้อยที่สุด เท่ากับ 1.38 ± 0.14 ยอด ส่วนความยาวยอด พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตร โดยมีความยาวยอด 2.33 ± 0.24 ถึง 3.66 ± 1.01 cm (Figure 1 B) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติม BA และ NAA ส่งผลดีต่อการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่ซางหม่น ทั้งนี้เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินที่มีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและตาข้าง ส่วน NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่นิยมใช้ร่วมกับไซโทไคนินในการเพิ่มจำนวนยอด โดยมักเติมในความเข้มข้นที่น้อยกว่าไซโทไคนินเพื่อเพิ่มจำนวนยอด [3] อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า การเติม NAA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงให้ผลไม่แตกต่างจากการไม่เติม ดังนั้นในการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L เหมาะสมต่อการชักนำให้ตาข้างของไผ่ซางหม่นพัฒนาไปเป็นยอดได้ดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่หก [6] และไผ่ตง (*D. asper*) [4] ที่ใช้ BA เพียงอย่างเดียวในการชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอดที่ความเข้มข้น 2.5 mg/L และ 5 mg/L ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จำนวนยอดที่พัฒนายังไม่มากนัก รวมทั้งเมื่อย้ายยอดไผ่ซางหม่นไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนยอด พบอาการ browning มีสารสีดำใน

อาหารเพาะเลี้ยงบริเวณรอบๆ ชิ้นส่วนยอด ทำให้ยอดเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงสถานะของอาหารและน้ำมะพร้าวต่อการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่ซางหม่นในการทดลองต่อไป

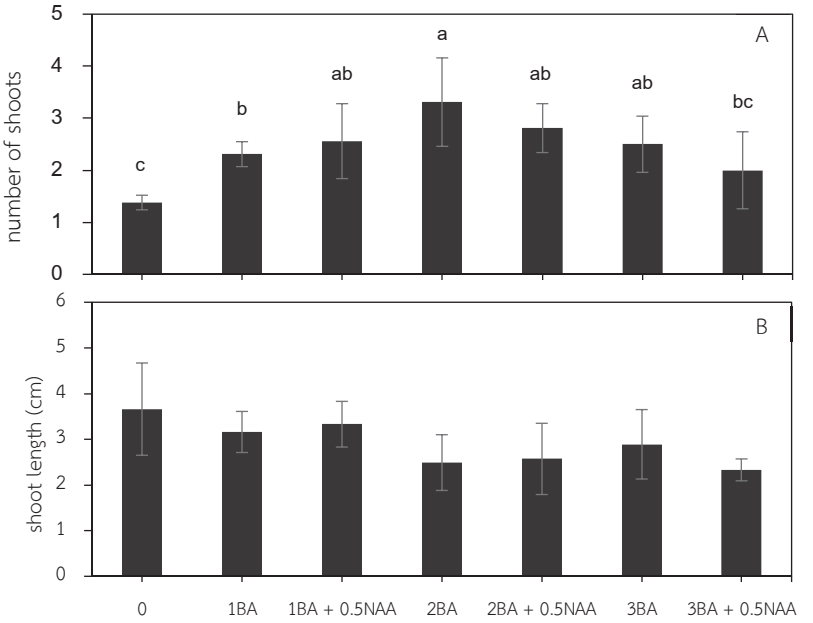

Figure 1 A) Number of shoots and B) shoot length (cm) of *D. sericeus* after single-node explants were cultured for 4 weeks on MS medium supplemented with 0, 1, 2 and 3 mg/L BA in combination with 0 and 0.5 mg/L NAA

3.1.2 ผลของสถานะอาหารและความเข้มข้นน้ำมะพร้าวต่อการเพิ่มจำนวนยอด

จากการเพาะเลี้ยงกลุ่มยอดไผ่ซางหม่น 2 – 3 ยอดต่อกลุ่มในอาหารเหลว และบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมหรือไม่ร่วมกับน้ำมะพร้าว 8% และ 15% (v/v) นาน 4 สัปดาห์ พบว่ามีการพัฒนาของยอดใหม่บนอาหารทุกสูตร โดยการเกิดยอดใหม่ของไผ่ซางหม่นที่เพาะเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอยู่ในช่วง 50.00± 20.41% ถึง 81.25± 23.94% (Figure 2 A) ส่วนจำนวนยอดใหม่ที่พัฒนา พบว่า กลุ่มยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับน้ำมะพร้าว 8% มีจำนวนยอดใหม่ที่พัฒนาสูงสุด เท่ากับ 4.67 ± 0.02 ยอด ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15% (4.00 ± 0.82 และ 4.17 ± 0.63 ยอด ตามลำดับ) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนยอดใหม่ที่พัฒนาบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมหรือไม่ร่วมกับน้ำมะพร้าวทุกความเข้มข้น โดยมีจำนวนยอดใหม่ที่พัฒนา เท่ากับ 2.38 ± 0.85 ถึง 2.75 ± 1.52 (Figure 2 B) จากการวัดความยาวของยอดที่พัฒนา พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงกลุ่มยอดบนอาหารทุกสูตร โดยมีความยาวยอด 2.10 ± 0.36 ถึง 2.55 ± 0.40 cm

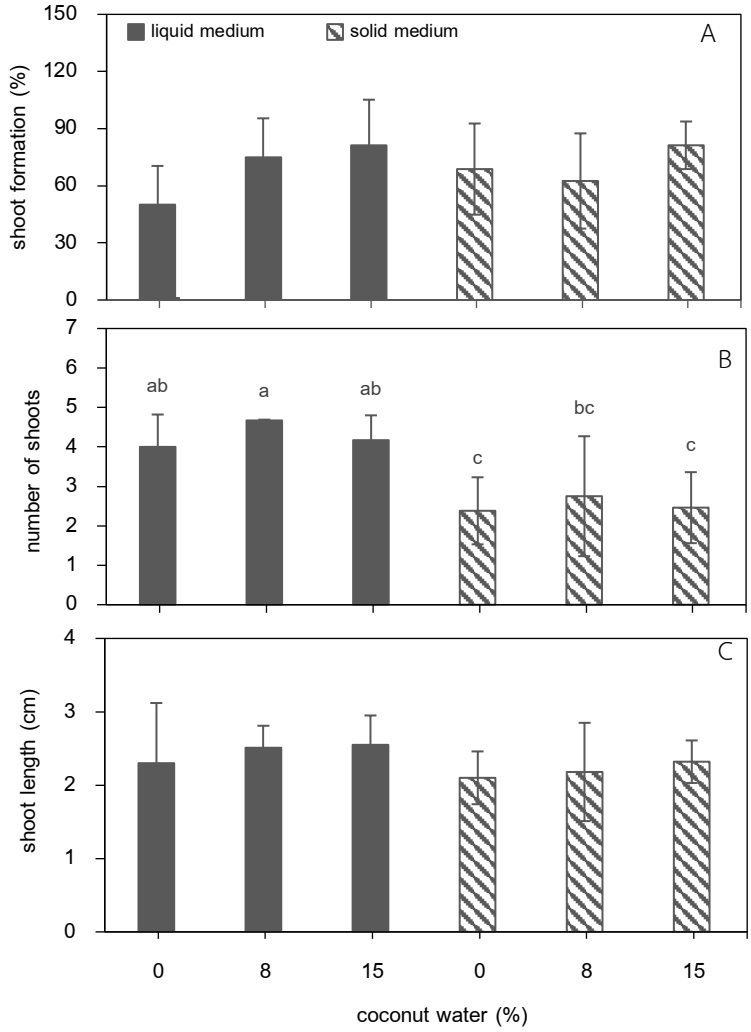

Figure 2 A) Shoot formation (%); B) number of shoots and C) shoot length (cm) of *D. sericeus* after shoot cluster were cultured for 4 weeks in liquid or solid MS medium supplemented with 2 mg/L BA in combination with or without 8% and 15% (v/v) coconut water.

จากการทดลอง พบว่า อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 8% และ 15% ส่งผลดีต่อการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่ซางหม่น เนื่องจากมีจำนวนยอดใหม่ที่พัฒนามากกว่าอาหารแข็งที่เติม BA และน้ำมะพร้าวทุกความเข้มข้น อย่างไรก็ตาม และจากการสังเกตการเจริญเติบโตของยอดไผ่ซางหม่นในอาหารเหลว พบว่า กลุ่มยอดที่เพาะเลี้ยงในน้ำมะพร้าวความเข้นข้น 8% และ 15% นั้น แข็งแรงกว่ากลุ่มยอดไผ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว เนื่องจากน้ำมะพร้าวเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินที่ได้จากธรรมชาติมี zeatin โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มนี้ส่งเสริมและกระตุ้นการแบ่งเซลล์ส่งผลให้เนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตได้ดีมากขึ้น [21]

น้ำมะพร้าวยังมีองค์ประกอบของกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก วิตามิน น้ำตาล และน้ำตาลแอลกอฮอล์ ซึ่งล้วนส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ และการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตได้ดีของพืชเพาะเลี้ยง [22] เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่จะใช้ จึงควรใช้น้ำมะพร้าวที่ความเข้มข้น 8% เนื่องจากใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าแต่ให้ผลไม่แตกต่างกัน

จากการทดลอง ยังพบว่า สถานะของอาหารมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่ซางหม่น โดยกลุ่มยอดไผ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนยอดได้ดีกว่าอาหารแข็ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาหารเหลวเป็นอาหารที่ไม่มีวุ้นต้องวางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว ทำให้มีการระบายและหมุนเวียนอากาศภายในอาหารมากกว่าอาหาร ดังนั้น จากการศึกษานี้ จึงควรใช้อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 8% ในการชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอดไผ่ซางหม่น ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่รวกตามรายงานของ Dongmanee [23] ที่เพาะเลี้ยงกลุ่มยอดไผ่รวกในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 20% (v/v) ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 10 mg/L และ kinetin ความเข้มข้น 0.5 mg/L นาน 8 สัปดาห์ สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้มากที่สุด 36.1 ยอด และการเพิ่มจำนวนยอดของไผ่เป๊าะในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 8% ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 6 mg/L และ kinetin ความเข้มข้น 0.1 mg/L โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนยอด 1.8 เท่า ทุกๆ 13 วัน [24]

3.2 ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดไผ่ซางหม่นในสภาพปลอดเชื้อ

3.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง โดยยอดไผ่ซางหม่นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูงสุด เท่ากับ 63.80 ± 1.31 mg GAE/g dry extract ในขณะที่ยอดอ่อนและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด เท่ากับ 48.27 ± 2.36 และ 50.38 ± 4.98 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ (Figure 3 A)

3.2.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

ยอดไผ่ซางหม่นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด เท่ากับ 32.18 ± 1.95 mg CE/g dry extract ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดอ่อน และใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติมีค่า เท่ากับ 7.63 ± 1.88 และ 11.52 ± 2.07 mg CE/g dry extract ตามลำดับ (Figure 3 B) ซึ่งปริมาณสารฟลาโวนอยด์เป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

3.2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง โดยยอดไผ่ซางหม่นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 78.87 ± 7.56 μg/mL รองลงมาคือ ใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า EC_{50} เท่ากับ 115.48 ± 3.62 ในขณะที่ยอดอ่อนจากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำสุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 169.17 ± 11.46 μg/mL (Figure 3 C)

3.2.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของยอดไผ่ซางหม่นในสภาพปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับยอดอ่อนและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (Figure 3 C) โดยยอดไผ่ซางหม่นในสภาพปลอดเชื้อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 299.39 ± 68.93 μg/mL ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 365.13± 11.07 μg/mL ในขณะที่ยอดอ่อนในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีฤทธิ์น้อยที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1172.56 ± 64.48 μg/mL

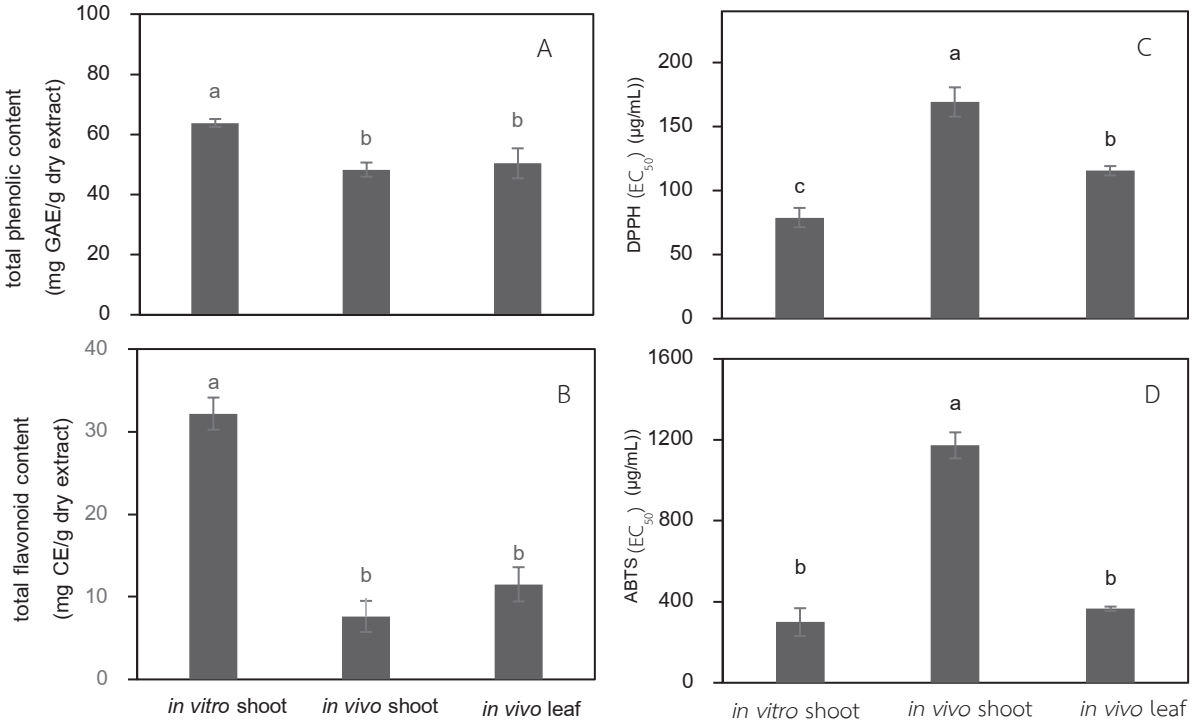

Figure 3 A) Total phenolic content, B) total flavonoid content, C) DPPH radical scavenging activity (EC_{50}) and D) ABTS radical scavenging activity of *D. sericeus in vitro* shoot compared with *in vivo* shoot and leaf.

ยอดไผ่ซางหม่นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อสามารถสร้างและสะสมสารทุติยภูมิได้เหมือนต้นแม่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์พืชมีข้อมูลทางพันธุกรรมไม่แตกต่างกับต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ และยังสามารถควบคุมหน้าที่ต่างๆ รวมถึงการสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้ [11] ซึ่งผลการทดลองพบว่ายอดไผ่ซางหม่นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงกว่ายอดอ่อนและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ สอดคล้องกับพืชบางชนิดที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ในปริมาณที่สูงกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ เช่น สาร peroxidase ในมะรุม (*Moringa oleifera Lam*) [25] สาร rosmarinic acid และ salvianolic acid B ใน *Salvia miltiorrhiza* [26] เป็นต้น การผลิตสารทุติยภูมิจากพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนี้ มีข้อดีกว่าการผลิตจากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ เช่น รอบเวลาในผลิตสารทุติยภูมิสั้นลง นอกจากนี้ ปริมาณสาร และคุณภาพที่ได้สม่ำเสมอ ไม่เปลี่ยนแปลงตามสภาพภูมิอากาศ และภูมิประเทศ [11; 27] ดังนั้นยอดไผ่ซางหม่นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้จึงเป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพสามารถนำมาใช้สกัดสารทุติยภูมิเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมยา อาหารเสริม และเครื่องสำอางได้

4. สรุป

ในการเพิ่มจำนวนยอด ควรเพาะเลี้ยงกลุ่มยอดไผ่ซางหม่นลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับน้ำมะพร้าว 8% (v/v) และยอดไผ่ซางหม่นในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบ

ฟีนอลิคทั้งหมด (63.80 ± 1.31 mg GAE/g dry extract) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (32.18 ± 1.95 mg CE/g dry extract) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 78.87 ± 7.56 μg/mL) และ ABTS (EC_{50} เท่ากับ 299.39 ± 68.93 μg/mL) ดีกว่ายอดอ่อนและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ

5. References

[1] Phungchik, T., 2010, Study of bamboo collection and production technology of Bambusa nana for sustainable agriculture: Bamboo collection, Journal of Forest Management (Thailand) 4: 60-73. (in Thai)

[2] Austin, R., Dana, L. and Koichiro, U., 1983, Bamboo, Weatherhill, New York. 215 p.

[3] Kaveeta, R., 1998, Plant Tissue Culture: Principles and Techniques, 2nd edition, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 219 p. (in Thai)

[4] Prutpongse, P. and Gavinlertvatana, P., 1992, *In vitro* micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo, HortScience 27: 453-454.

[5] Chanlhanuraksa, S., 1991, Bamboo tissue culture: Effect of 2, 4-D, NAA and BAP on callus and shoot formation, Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.

[6] Godbole, S., Sood, A., Thakur, R., Sharma, M., and Ahuja, P. S., 2002, Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arm. Ex Munro., Curr. Sci. 83: 885-889.

[7] Lv, Z., Dong, J. and Zhang, B., 2011, Rapid identification and detection of flavonoid compounds from bamboo leaves by LC-(ESI)-IT-TOF/MS, Bioresources 7: 1405-1418.

[8] Jiao, J., Zhang, Y., Liu, C., Liu, J., Wu, X. and Zhang, Y., 2007, Separation and purification of tricin from an antioxidant product derived from bamboo leaves, J. Agric. Food Chem. 55: 10086–10092.

[9] Gong, J., Huang, J., Xiao, G., Chen, F., Lee, B., Ge, Q., You, Y., Liu, S., and Zhang, Y., 2016, Antioxidant capacities of fractions of bamboo shaving extract and their antioxidant components, Molecules 21: 996-1008.

[10] Karawak, P., Thepsithar, C., Sengsai, S., Maksup, S., 2019, Determination of flavone C-glycosides in bamboo leaf extract of Pai Sang Mon "Nuan Rajinee" using TLC and HPLC techniques, Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University 6: 84-94. (in Thai)

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

[12] Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Songsri, O., Ruangnoo, S., Itharat, A., 2016, *In vitro* propagation and bioactive compound accumulation in regenerated shoots of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, Acta Physio. Plant 38:249

[13] Wu, C. F., Karioti, A., Rohr, D., Bilia, A. R. and Efferth, T., 2016, Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lympho-

blastic leukemia cell, Food Chem. 201: 292-297.

[14] Autaijamsripon, J., Jirakiattikul, Y. Rithichai, P. and Itharat, A., 2017, Effect of culture periods on secondary metabolite contents and antioxidant activity of *in vitro Bacopa monnieri* shoots. Thai Sci. Technol. J. 25: 443-452. (in Thai)

[15] Yusuf, N. A., Rahim, N. S. M., Azhar, S. Z. A., Ghani, K. A., Sommano, S. and Khalid. N., 2018, Adventitious root cultures of *Boesenbergia rotunda* as a source of pinostrobin, Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Techno. 8: 337-383.

[16] Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T., 1994, Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs, Chem. Pharmaceut. Bull. 42: 1663-1665.

[17] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., 1999, antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Rad. Biol. Med. 26: 1231-1237.

[18] Kapruwan, S., Kaur, M. and Bakshi, M., 2014, Effect of growth regulators on the in vitro multiplication of *Dendrocalamus Hamiltonii,* Int. J. Eng. Res. Appl. 4: 83-86.

[19] Ramanayake, S. M. S. D. and Yakandawala, K., 1997, Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explant of field growth culms, Plant Sci. 129: 213-223.

[20] Kaladhar, D. S. V. G. K., Tiwari, P. and Duppala, S. K., 2017, A rapid *in vitro* micropropagation of Bambusa vulgaris using inter- node explant, Int. J. Life. Sci. Scienti. Res. 3: 1052-1054.

[21] Neumann, K. H., Kumar, A. and Imani, J., 2009, Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology: Basics and Application, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, 325 p.

[22] Molnár, Z., Virág, E. and Ördög, V., 2011, Natural substances in tissue culture media of higher plants, Acta Biol. Szeged. 55: 123-127.

[23] Dongmanee, A., 2006, Micropropagation of Pai Ruak (*Thyrsostachys siamensis*), M.Sc. Thesis, Silpakorn University, Nakhorn Pathom.

[24] Ramanayake, S. M. S. D. and Yakandawala, K., 1997, Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explant of field growth culms, Plant Sci. 129: 213-223.

[25] Shank, L. P., Riyathong, T., Lee, V. S. and Dheeranupattana, S., 2013, Peroxidase activity in native and callus culture of *Moringa oleifera* Lam., Journal of Medicinal and Bioengineering. 2: 163-167.

[26] Wu, C. F., Karioti, A., Rohr, D., Bilia, A. R. and Efferth, T., 2016, Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cell, Food Chem. 201: 292-297.

[27] Matkowski, A., 2008, Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – a review, Biotechnol. Adv. 26: 548-560.