

ผลของ jasmonic acid และ yeast extract ต่อปริมาณสารทุติยภูมิ  
ของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill)  
ในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Jasmonic acid and Yeast Extract on Secondary  
Metabolite Contents in Shoot Culture of  
*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill

รัชนิวรรณ จิระพงศ์พัฒนา, เยาวพา จิระเกียรติกุล\* และภาณุมาศ ฤทธิไชย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง ปทุมธานี 12120

ศรียโสภา เรืองหนู และอรุณพร อธิรัตน์

สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง ปทุมธานี 12120

Ratchaneewan Jirapongpattana, Yaowapha Jirakiattikul\* and Panumart Rithichai,

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathumthani 12120

Srisopa Ruangnoo and Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathumthani 12120

บทคัดย่อ

หัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมใช้ส่วนของเหง้าร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ในการรักษาโรคมาเรียม โรคน้ำเหลืองเสีย และเอดส์ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มสารกระตุ้น เช่น jasmonic acid (JA) และ yeast extract (YE) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ JA และ YE ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของหัวข้าวเย็นเมื่อเพาะเลี้ยงยอดในสภาพปลอดเชื้อ จากการทดลองพบว่ายอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติมผงถ่าน 0.01 % BA ความเข้มข้น 2 mg/L, IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/L, น้ำมะพร้าว 20 %, YE ความเข้มข้น 3 และ 4 g/L มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดสูงสุด  $1254.76 \pm 72.06$  และ  $1182.86 \pm 56.45$   $\mu\text{g}$  diosgenin/g dry extract ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าสูงสุดเมื่อยอดพัฒนาบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ

100  $\mu\text{M}$  มีค่าเท่ากับ  $78.21 \pm 3.06$  และ  $80.66 \pm 3.59$  mg GAE/g dry extract ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนามานอาหารที่เติม YE ความเข้มข้น 4 g/l และไม่เติมสารกระตุ้น ส่วนยอดที่พัฒนามานอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100  $\mu\text{M}$  ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ( $\text{EC}_{50}$ ) ดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ  $17.94 \pm 0.46$  และ  $18.98 \pm 0.44$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

**คำสำคัญ :** หัวข้าวเย็น; ชาโปนิน; สารประกอบฟีนอลิก; สารทุติยภูมิ; สารกระตุ้น

## Abstract

Hua-Khao-Yen (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) is a medicinal plant which its rhizome has been used with other medicinal plant species for the treatments of cancers, lymphatic diseases and AIDS. Supplementation of elicitors such as jasmonic acid (JA) and yeast extract (YE) in culture medium has been used to stimulate secondary metabolite contents in plant tissue culture. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of JA and YE concentrations on secondary metabolite contents of Hua-Khao-Yen shoots grown under aseptic conditions. The results showed that the highest total saponin contents of  $1254.76 \pm 72.06$  and  $1182.86 \pm 56.45$   $\mu\text{g}$  diosgenin/g dry extract respectively occurred on MS medium supplemented with 0.01 % activated charcoal, 2 mg/l BA, 0.1 mg/l IAA, 20 % coconut water in combination with 3 and 4 g/l YE. The highest total phenolic contents of  $78.21 \pm 3.06$  and  $80.66 \pm 3.59$  mg GAE/g dry extract were observed when shoots were cultured on medium supplemented with 50 and 100  $\mu\text{M}$  JA respectively which were not significantly different with those culture on medium supplemented with 4 g/l YE or without elicitor. Shoots cultured on medium supplemented with 50 and 100  $\mu\text{M}$  JA were also contained the greatest DPPH radical scavenging activity of  $17.94 \pm 0.46$  and  $18.98 \pm 0.44$   $\mu\text{g/ml}$  respectively.

**Keywords:** *Dioscorea birmanica*; saponin; phenolic compound; secondary metabolite; elicitor

## 1. บทนำ

หัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Dioscoreaceae เป็นไม้เถาเลื้อย มีลำต้นใต้ดิน สะสมอาหารในเหง้า และทุกส่วนมีหนาม พบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยในประเทศไทยพบบริเวณป่าดิบเขาและป่าโปร่ง [1] นิยมใช้ส่วนของเหง้าร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ หรือเป็นส่วนประกอบของยาจีนโบราณ [2] เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคกระษัย โรคน้ำเหลืองเสีย โรคเอดส์

[3] โรคเรื้อรัง โรคผิวหนัง โรคระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบตา หู คอ จมูก ระบบกล้ามเนื้อและกระดูก โรคระบบทางเดินปัสสาวะ [4] โรคโลหิตเป็นพิษ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ระวังปวด ลดไข้ ด้านเซลล์มะเร็งปอด [5,6] และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [7] มีการใช้พืชชนิดนี้ในการรักษามะเร็งในกลุ่มแพทย์พื้นบ้านสูงถึง 52.2 % [4] โดยสารสกัดของหัวข้าวเย็นในชั้นเอทานอล เมื่อแยกสารบริสุทธิ์พบสาร saponin ที่เรียกว่า diosgenin ซึ่งมีฤทธิ์ความเป็น

พืชต่อเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ [7] จากสรรพคุณดังกล่าว ทำให้ความต้องการใช้พืชชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น จึงได้ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มจำนวนยอดตามรายงานของอรูมา [8] นอกจากนี้ยังได้มีรายงานใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผลิตสารทุติยภูมิจากต้นที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อทดแทนการผลิตสารจากการเพาะปลูกในสภาพธรรมชาติของพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น จอกหูหนูยักษ์ (*Salvinia molesta* D.S. Mitchel) และ ผักตบชวา (*Eichornia crassipes* C. Mart. Solms) [9] มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) [10] *Dorystoechas hastate* Boiss. & Heldr. [11] และ *Dioscorea* spp. [12] อรูมา [8] รายงานว่ายอดหัวข้าวเย็นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 8 สัปดาห์มีปริมาณสาร diosgenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D glucopyranoside (DBS1) ซึ่งเป็นสารที่สกัดแยกจาก diosgenin และอยู่ในกลุ่มของซาโปนิน (saponin) เท่ากับ 0.37 % (w/w) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 95.29 mg GAE/g dry extract และ 51.46  $\mu$ g/ml ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเหง้าแม่ที่ปลูกในแปลงที่มีปริมาณ DBS1 3.27 % (w/w) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 259.27 mg GAE/g dry extract และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 11.42  $\mu$ g/ml

การที่พืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้นั้น เนื่องจากเซลล์พืชมีอินทรีย์สาร สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการชีวสังเคราะห์ต่าง ๆ และสร้างสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ การผลิตสารจึงสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง [13,14] อย่างไรก็ตาม กระบวนการผลิตสารทุติยภูมิมักมีปัญหาการให้

ปริมาณสารทุติยภูมิต่ำกว่าพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณมาก การควบคุมอาหารในการเพาะเลี้ยง การควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยง และการเติมสารกระตุ้น ซึ่งการเติมสารกระตุ้นเป็นทางเลือกหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ [15] โดย jasmonic acid (JA) และ yeast extract (YE) เป็นสารกระตุ้นที่นิยมใช้ และประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิโดยเฉพาะสารในกลุ่มซาโปนิน (saponin) ในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) [16] *Bacopa monnieri* L. [17] และ *Panax ginseng* Meyer [18] ซึ่ง JA เป็นสารสำคัญในระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการที่หลากหลายในพืช โดยกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวของพืชจากการทำลายของจุลินทรีย์ แมลงต่าง ๆ รวมถึงความเครียดจากภายนอก ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมในบางขั้นตอนของกระบวนการเกิดสารทุติยภูมิ และ YE เป็นสารกระตุ้นการตอบสนองของพืช โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคในเซลล์พืช รวมไปถึงการสะสมสารทุติยภูมิด้วย [15] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาการใช้ JA และ YE ในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของหัวข้าวเย็น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ JA และ YE ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด (total saponin) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดหัวข้าวเย็นในสภาพปลอดเชื้อ

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

เพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็นในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  °C ให้แสงเป็นเวลา

16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 3,000 lux ด้วยหลอดไฟ fluorescence ชนิด cool white โดยย้ายเลี้ยง (sub-culture) ทุก ๆ 6-8 สัปดาห์ จนกระทั่งมียอดมากเพียงพอสำหรับการทดลอง สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ อาหารสูตร Murashige & Skoog (MS) ที่เติมผงถ่าน 0.01 % BA ความเข้มข้น 2 mg/l IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l น้ำมะพร้าว 20 % น้ำตาล ความเข้มข้น 3 % และวุ้นความเข้มข้น 0.8 % โดยเรียกอาหารสูตรดังกล่าวว่าสูตรอาหารพื้นฐาน ปรับค่า pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8 ด้วย 1 N NaOH และนึ่งกำจัดเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปล่อยให้อาหารเพาะเลี้ยงเย็นก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

นำยอดหัวข้าวเย็น ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน นาน 6 สัปดาห์ มาตัดเป็นท่อน ๆ แต่ละท่อน ยาวประมาณ 1 cm นำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100 และ 150  $\mu$ M หรือ YE ความเข้มข้น 2, 3 และ 4 g/l เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) มี 7 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลอง มี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวนยอดมากพอที่จะให้น้ำหนักแห้ง 2 g เมื่อครบกำหนดระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้น ชั่งน้ำหนักสดยอดที่พัฒนา จากนั้นนำยอดมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งยอด รสจัดตัวอย่างแห้งตามวิธีของ Jaiarree [7] ด้วย ethanol ความเข้มข้น 95 % โดยใช้อัตราส่วนพืช ต่อ ethanol 1 : 3 โดยปริมาตร สกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งสกัดนาน 3 วัน แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 ขนาด 11  $\mu$ m นำสารสกัดที่ได้มาระเหยใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลานาน 2-3 วัน จนกว่าสารสกัดตัวอย่างแห้งหรือมี

น้ำหนักคงที่ นำสารสกัดดังกล่าวมาหาปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยวิธีการดังนี้

ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีของ Hiai [19] ละลายสารสกัด 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute methanol ปริมาตร 2 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที เตรียมสารละลาย 8 % (w/v) vanillin ที่ละลายด้วย absolute ethanol และ 72 % sulfuric acid ( $H_2SO_4$ ) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.25 ml Vanillin reagent (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ปริมาตร 0.25 ml และ 72 %  $H_2SO_4$  ปริมาตร 2.5 ml ลงในหลอดทดลอง นำไปวางใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 544 nm ใช้ diosgenin เป็นสารมาตรฐาน

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีของ Folin และ Ciocalteu [20] โดยละลายสารสกัด 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายปริมาตร 20  $\mu$ l ใส่ในหลุม 96-well plate readers เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 100  $\mu$ l และเติมสารละลาย 7.5 % w/v  $Na_2CO_3$  ปริมาตร 80  $\mu$ l ทำซ้ำ 4 หลุม microplate จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้ absolute ethanol ปริมาตร 20  $\mu$ l ร่วมกับ Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 100  $\mu$ l และ 7.5 % w/v  $Na_2CO_3$  ปริมาตร 80  $\mu$ l เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารตัวอย่างเป็น mg ของ gallic

acid equivalents (GAE) ต่อสารสกัดชั้น ethanol 1 g (mg GAE/g dry extract)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีของ Yamazaki และคณะ (1994) ซึ่งอ้างโดย Jaiarree และคณะ [7] นำสารสกัด มาละลายด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol อัตราส่วน 1 mg/ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200, 100, 50 และ 25  $\mu\text{g/ml}$  นำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ใส่ลงในหลุม 96-well plate และเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ทำซ้ำ 3 หลุม microplate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  และเติม absolute ethanol ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง ใช้ absolute ethanol ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ร่วมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  เป็น control คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH จากสมการ % inhibition =  $(\text{OD control} - \text{OD sample}) / (\text{OD control}) \times 100$  เมื่อ OD control = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ OD sample = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหา  $\text{EC}_{50}$  (ค่าความสามารถของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ที่ 50 %)

### 3. ผลการทดลองและวิจารณ์

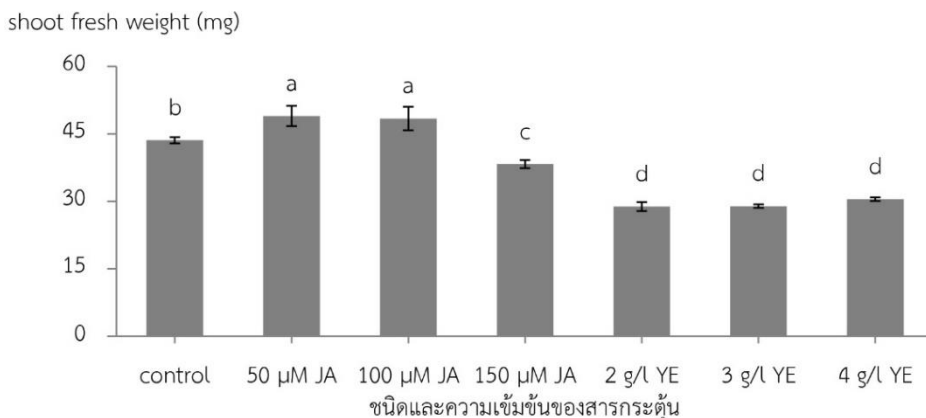
#### 3.1 น้ำหนักสดและแห้งของยอด

จากการทดลองแล้ว พบว่ายอดหัวข้าวเย็นที่พัฒนามาจากสารกระตุ้นพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 100 และ 150  $\mu\text{M}$  และ YE ความเข้มข้น 2, 3 และ 4

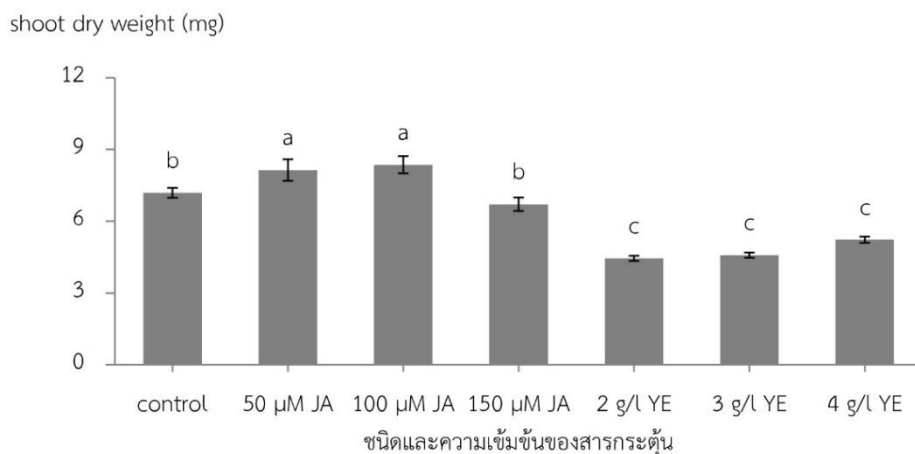
g/l เปรียบเทียบกับยอดที่พัฒนามาจากสารกระตุ้นพื้นฐานที่ไม่เติมสารกระตุ้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งของยอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (รูปที่ 1 และ 2) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100  $\mu\text{M}$  มีน้ำหนักสดและแห้งยอดสูงสุดเท่ากับ  $48.43 \pm 1.62$  และ  $49.01 \pm 2.25$  mg และ  $8.14 \pm 0.45$  และ  $8.36 \pm 0.36$  mg ตามลำดับ ซึ่งมีน้ำหนักสดและแห้งยอดมากกว่าสิ่งทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่น้ำหนักสดและแห้งของยอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้นสูงขึ้น (150  $\mu\text{M}$ ) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่สูงไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของยอดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Yu และคณะ [21] ที่รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงรากพิเศษของ *P. ginseng* ด้วยอาหารที่มี JA ความเข้มข้น 0-10 mg/l น้ำหนักสด และแห้งของรากลดลงเมื่อความเข้มข้นของ JA เพิ่มขึ้น โดยน้ำหนักสดและแห้งมีค่าน้อยเมื่อเติม JA ความเข้มข้น 10 mg/l ( $4.67 \pm 0.09$  และ  $0.41 \pm 0.01$  g ตามลำดับ) ในขณะที่รากของสิ่งทดลองควบคุมมีน้ำหนักสดและแห้งเท่ากับ  $16.15 \pm 0.03$  และ  $1.47 \pm 0.07$  g ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE ทุกความเข้มข้น พบว่ายอดของหัวข้าวเย็นมีน้ำหนักสดและแห้งน้อยกว่าสิ่งทดลองควบคุมและยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า YE ส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของยอดหัวข้าวเย็น โดย YE อาจมีผลต่อการดูดและการสะสมน้ำในเซลล์ของพืช Chong และคณะ [22] และ Yu และคณะ [21] กล่าวว่าหากที่น้ำหนักยอดหรือเซลล์ลดลงอาจเนื่องมาจากสารกระตุ้นบางชนิดมีผลทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมสารประกอบปฐมภูมิลดลง ในขณะที่กระบวนการเมตาบอลิซึมของสารทุติยภูมิเกิดการ

เปลี่ยนแปลงกะทันหัน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Salvia miltiorrhiza* Bunge ที่กระตุ้นด้วย YE ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น

เวลา 16 วัน พบว่า YE ทุกความเข้มข้นทำให้น้ำหนักเซลล์แขวนลอยลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม [23]



รูปที่ 1 น้ำหนักสดของยอดหัวข้าวเย็นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 2 น้ำหนักแห้งของยอดหัวข้าวเย็นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์

### 3.2 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด

ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดสูงสุดเมื่อยอดพัฒนามบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE ความเข้มข้น 3 และ 4 g/L มีค่าเท่ากับ  $1254.76 \pm 72.06$  และ  $1182.86 \pm 56.45$  μg diosgenin/g dry extract ตามลำดับ ซึ่ง

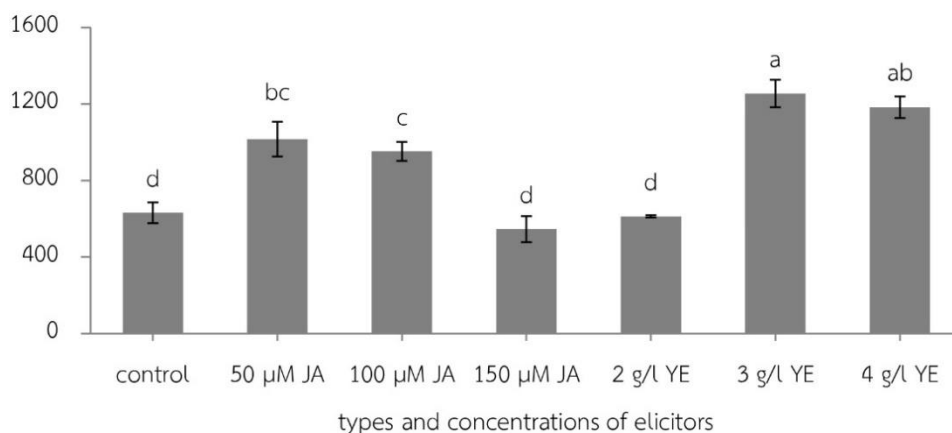
มีค่าสูงกว่าปริมาณซาโปนินทั้งหมดของสิ่งทดลองควบคุมเท่ากับ 1.99 และ 1.87 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 3) แต่ยอดที่พัฒนามบนอาหารสูตรพื้นฐานที่มี YE ความเข้มข้น 2 g/L มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดลดลงเท่ากับ  $612.38 \pm 6.25$  μg diosgenin/g dry extract

ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณซาโปนินทั้งหมดที่ได้จากยอดของสิ่งทดลองควบคุม และยอดที่พัฒนามบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 150  $\mu\text{M}$  ( $631.43 \pm 54.29$  และ  $545.71 \pm 67.99$   $\mu\text{g}$  diosgenin/g dry extract ตามลำดับ) ส่วนยอดที่พัฒนามบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100  $\mu\text{M}$  พบว่า ปริมาณซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณซาโปนินทั้งหมดของสิ่งทดลองควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ  $1016.19 \pm 90.72$  และ  $952.38 \pm 49.33$   $\mu\text{g}$  diosgenin/g dry extract ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าปริมาณซาโปนินทั้งหมดของสิ่งทดลองควบคุม 1.61 และ 1.51 เท่า จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า YE มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ยอดของหัวข้าวเย็นสร้างปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดได้ดีกว่า JA โดย YE ที่ความเข้มข้น 3 และ 4 g/l มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองนี้สนับสนุน วรภรณ์ [15] ที่กล่าวไว้ว่าสารกระตุ้นแต่ละชนิดจะมีผลทำให้การสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น การตอบสนองของพืชจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารกระตุ้น โดยประสิทธิภาพของสารกระตุ้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่ใช้ โดยมีพืชหลายชนิดที่รายงานว่ายสามารถกระตุ้นให้เซลล์หรือชิ้นส่วนพืชในสภาพปลอดเชื้อสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นได้ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Panax ginseng* ในอาหารที่เติม YE ความเข้มข้น 0.5-3 g/l เป็นเวลา 0, 5, 10 และ 15 วัน พบว่าเซลล์มีปริมาณซาโปนินสูงกว่าในสิ่งทดลองควบคุม และสูงสุดเมื่อเติม YE ความเข้มข้น 3 g/l ซึ่งสูงถึง 20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม แต่การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5-15 วัน [18] หรือใน Kamonwannasit และคณะ [17] ศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดของ *B. monnieri* และ กระตุ้นด้วย YE ความเข้มข้น 2 mg/ml พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสาร pseudo-

jujubogenin glycosides เท่ากับ  $40.05 \pm 2.37$  mg/g น้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ส่วน Hasanloo และคณะ [4] เพาะเลี้ยงเซลล์รากขนของ *Silybum marianum* L. พบว่า สามารถเพิ่มการสะสมสาร silymarin ได้สูงสุด เท่ากับ 0.476 mg/g น้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม หลังจากกระตุ้นด้วย YE ความเข้มข้น 2.5 mg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง การที่ YE สามารถกระตุ้นให้เซลล์หรือชิ้นส่วนพืชสร้างและสะสมสารทุติยภูมิได้มากขึ้นนั้น อาจเนื่องจาก YE จะกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานเพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากโรคพืช ความต้านทานของพืชนี้เกิดจากการเหนี่ยวนำให้สร้างสารบางชนิด โดยโมเลกุลของพืชที่ทำหน้าที่เป็นตัวตอบสนองการกระตุ้น (PRR, pattern recognition receptor) สามารถตรวจจับโมเลกุลจากเชื้อสาเหตุโรคพืช (PAMP, pathogen-associated molecular pattern) เช่น โปรตีนแฟลกเจลลิน (flagellin) องค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (lipopolysaccharide) หรือองค์ประกอบของผนังเซลล์รา (chitin) [25] ทำให้เกิดการตอบสนองในแบบต่างๆ ทั้งการป้องกันพืชและการกำจัดเชื้อสาเหตุ โดยพืชจะสังเคราะห์สารบางชนิดให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นและเพียงพอที่จะกำจัดเชื้อสาเหตุได้ [26] เช่น สังเคราะห์สารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) ที่เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก เทอร์ปีนอยด์ และอาลิฟาติกส์ที่มีสมบัติเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ [27] ดังนั้นจากการทดลองนี้ YE ความเข้มข้น 3 และ 4 g/l สามารถกระตุ้นให้ยอดหัวข้าวเย็นมีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดสูงขึ้นได้

### 3.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC<sub>50</sub>)

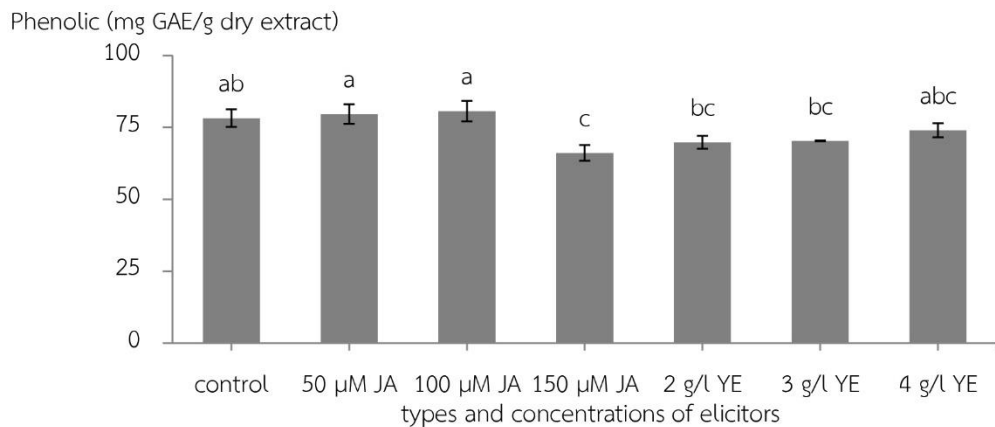
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเมื่อยอดพัฒนามบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100  $\mu\text{M}$  โดยมีค่าเท่ากับ  $79.64 \pm 3.42$



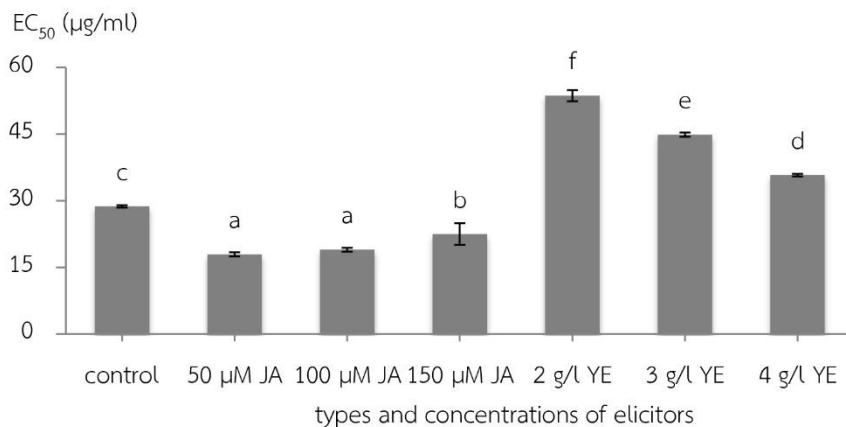
**รูปที่ 3** ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 µM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์

และ  $80.66 \pm 3.59$  mg GAE/g dry extract ตามลำดับ (รูปที่ 4) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่พัฒนามบนอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมสารกระตุ้น และอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE ความเข้มข้น 4 g/L ( $78.21 \pm 3.06$  และ  $74.01 \pm 2.43$  mg GAE/g dry extract ตามลำดับ) แต่ยอดที่พัฒนามบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 150 µM พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงและน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณดังกล่าวของสิ่งทดลองควบคุม จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า JA ความเข้มข้นสูงส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่ามีฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อยอดพัฒนามบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม JA ความเข้มข้น 50 และ 100 µM โดยมีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ  $17.94 \pm 0.46$  และ  $18.98 \pm 0.44$  µg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 5) ซึ่งให้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่า  $EC_{50}$  ของยอดที่พัฒนามบนอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมสารกระตุ้น และเติม JA ความเข้มข้น 150 µM และ YE ทุกความเข้มข้น จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า JA ความเข้มข้น 50 และ 100 µM สามารถกระตุ้นยอดหัวข้าวเย็นที่พัฒนา

สร้างสารประกอบฟีนอลิก และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Rungruang และคณะ [28] ที่กระตุ้นเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองด้วยเมทิลจัสโมเนท (MeJA) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นในกลุ่มเดียวกันกับ JA ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 µM พบว่า MeJA ความเข้มข้น 50 µM สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด เท่ากับ  $81.16$  mg GAE/100gDW และ  $86.11$  µg TE/100 gDW ตามลำดับ โดยทุกความเข้มข้นยับยั้งการเจริญเติบโต แต่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกภายในเซลล์สูงกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้ของ Jirakiattikul และคณะ [16] ได้เพาะเลี้ยงยอดของ *D. membranacea* ซึ่งเป็นพืชในสกุล (genus) และหมู่ (section) เดียวกันกับหัวข้าวเย็นที่ศึกษาในครั้งนี้นบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 100, 250, 500 µM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม



รูปที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็น เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 µM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 5ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC<sub>50</sub>) ของยอดหัวข้าวเย็น เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 50, 100, 150 µM และ YE ความเข้มข้น 2, 3, 4 g/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการทดลองยังพบว่า การเติม YE ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็นที่พัฒนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดน้อยลงกว่าในสิ่งทดลองควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องจาก YE ไม่มีผลต่อการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Lim และคณะ [29] ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Orthosiphon stamineus* Benth. โดยใช้สารกระตุ้นทั้งหมด 5 ชนิด คือ NaCl, sucrose, casein hydrolysate, YE และ chitosan

พบว่า NaCl, casein hydrolysate และ YE ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้ นอกจากนี้ Hasanloo และคณะ [24] เพาะเลี้ยงเซลล์รากขนของ milk thistle บนอาหารสูตร MS ที่เติม YE ความเข้มข้น 2.5 mg/50 ml เป็นเวลา 72-120 ชั่วโมง พบว่าค่า IC<sub>50</sub> ของสิ่งทดลองควบคุมดีกว่าในสูตรอาหารที่เติม YE ทั้งนี้การตอบสนองของพืชจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นรวมถึงระยะเวลาในการได้รับสารด้วย [15] ดังนั้นจากการ

ทดลองนี้จึงกล่าวได้ว่า YE สามารถกระตุ้นสารทุติยภูมิในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ซาโปนินได้ ส่วน JA สามารถกระตุ้นการสร้างสารในกลุ่มฟีนอลิก แต่เนื่องจากสารซาโปนินทั้งหมดเป็นสารทุติยภูมิที่สำคัญของหัวข้าวเย็น จึงควรให้ยอดพัฒนามาอาหารสูตรพื้นฐานที่เติม YE ความเข้มข้น 3 g/l ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ยอดสร้างและสะสมสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นได้

#### 4. สรุปผล

4.1 ยอดหัวข้าวเย็นที่พัฒนามาอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม YE ความเข้มข้น 3 g/l มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ  $1254.76 \pm 72.06$   $\mu\text{g}$  diosgenin/g dry extract ซึ่งมากกว่าปริมาณสารดังกล่าวของสิ่งทดลองควบคุม 2 เท่า

4.2 ยอดที่พัฒนามาอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม JA ความเข้มข้น 50-100  $\mu\text{M}$  มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด ( $78.21 \pm 3.06$  ถึง  $80.66 \pm 3.59$  mg GAE/g dry extract) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของสิ่งทดลองควบคุม

4.3 ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี JA ความเข้มข้น 50-100  $\mu\text{M}$  มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับสิ่งทดลองอื่น ( $18.98 \pm 0.44$  ถึง  $17.94 \pm 0.46$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

#### 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2557

#### 6. รายการอ้างอิง

- [1] Wilkin, P. and Thapayai, C., 2009, Dioscoreaceae, pp. 1-140, In Santisuk, T. and Larsen, K. (Eds.), Flora of Thailand 10, Prachachon, Bangkok.
- [2] Attele, A.S., Wu, J.A. and Yuan, C.S., 1999, Ginseng pharmacology: Multiple constituents and multiple actions, Biochem. Pharmacol. 58: 1685-1963.
- [3] Itharat, A., Jaiarree, N. and Kumapava, K., 2010, Cytotoxic saponin against lung cancer cell from *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, J. Med. Assoc. Thai. 93: 192-197.
- [4] Itharat, A., Supavita, T., Jusanit, P., Singchagchai, P., Subchareon, P., Deevisad, G., 1999, Survey of medicinal plants and local folk wisdom in Southern Thailand: Case study at Talebun National Park, Res. Rep. PSU. 82: 98-115.
- [5] อาทิมา แซ่ตั้ง, อรุณพร อิฐรัตน์, ขวัญลย์ เดชสุขุม, นัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล, นิวัติ แก้วประดับ และปราณี รัตนสุวรรณ, 2548, การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสมุนไพรไทยที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง, ว.สงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 27: 469-478.
- [6] วันทนา เจริญมงคล, อรุณพร อิฐรัตน์ และพิศิษฐ์ บัวแก้ว, 2550, ตรวจหาฤทธิ์แก้อักเสบระงับปวดและลดไข้ของสารสกัดจากเหง้าหัวข้าวเย็นในหนูทดลอง, ว.สงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 29: 49-57.
- [7] Jaiarree, N., Itharat, A., Kumapava, K., 2010, Cytotoxic saponin against lung cancer cell from *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, J. Med. Assoc. Thai. 93: 97-192.
- [8] อรอุมา สองศรี, 2556, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain &

- Burkill) และการสะสมสารทุติยภูมิ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี, 94 น.
- [9] Chantiratikul, P., Meechai, P. and Nakbanchote, W., 2009, Antioxidant activities and phenolic contents of extracts from *Salvinia molesta* and *Eichornia crassipes*, Res. J. Biol. Sci. 4: 1113-1117.
- [10] Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Luo, W., Yang, B. and Jiang, Y., 2008, Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China, J. Food Compos. Anal. 21: 219-228.
- [11] Karagozler, A.A., Erdag, B., Emek, Y.C. and Uygun, D.A., 2008, Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, Food Chem. 111: 400-407.
- [12] Bhandari, M.R. and Kawabata, J., 2003, Organic acid, phenolic content and antioxidant activity of wild yam (*Dioscorea* spp.) tubers of Nepal, Food Chem. 88: 163-168.
- [13] Buitelaar, R.M. and Tramper, J., 1992, Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review, J. Biotechnol. 23: 111-141.
- [14] Banthorpe, B. V., 1994, Secondary metabolism in plant tissue culture: Scope and limitations, Nat. Prod. Rep. 11: 303-328.
- [15] วราภรณ์ ภูตะลุน, 2551, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด, ขอนแก่น, 120 น.
- [16] Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Boonyeon, T., Ruangnoo, S. and Itharat, A., 2016, Effect of elicitors on bioactive compound accumulation in shoot culture of *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill, 9th Joint Natural Product Conference 2016, Copenhagen, Denmark.
- [17] Kamonwannasit, S., Phrompittayarat, W., Ingkaninan, K., Tanaka, H. and Putalun, W., 2008, Improvement of pseudojubenin glycosides production from regenerated *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and enhanced yield by elicitors, Z. Naturforsch. 63: 879-883.
- [18] Lu, M.B., Wong, H.L. and Teng, W.L., 2001, Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*, Plant Cell Rep. 20: 674-677.
- [19] Hiai, S., Oura, H. and Nakajima, T., 1976, Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid, Plant. Med. 29: 116-122.
- [20] Folin, O. and Ciocalteu, V., 1927, On tyrosine and tryptophan determination in proteins, J. Biol. Chem. 27: 627-650.
- [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] Chong, T.M., Abdullah, M.A., Lai, O. ., Aini, F.M.N., and Lajis, N.H., 2005, Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture, *Process Biochem.* 40: 3397-3405.
- [23] Chen, H. and Chen, F., 2000, Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture, *Process Biochem.* 35: 837-840.
- [24] Hasanloo, T., Khavari-Nejad, R.A., Majidi, E. and Ardakani, M.S., 2009, Flavonolignan production in cell suspension culture of *Silybum marianum*, *Pharma biol* 46: 876-882.
- [25] Thomma, B.P.H.J., Nurnberger, T. and Joosten, M.H.A.J., 2011, Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy, *Plant Cell* 23: 4-15.
- [26] Lucas, J.B., 1998, *Plant Pathology and Plant Pathogens*, Blackwell Science, Oxford, 288 p.
- [27] Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L., 2000, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, ASPP press, Rockville, 1280 p.
- [28] Rungruang, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N. and Matta, F.B., 2015, The accumulation of total phenolic content and antioxidant activity in suspension culture of *Glycine max* by methyl jasmonate, *Agric. Sci. J.* 46: 3. 81-84.
- [29] Lim, F.L., Yam, M.F., Asmawi, M.Z. and Chan, L.K., 2013, Elicitation of *Orthosiphon stamineus* of cell suspension culture for enhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity, *Ind. Crop. Prod.* 50: 436-442.