

ระยะเวลาเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของไคโตซานต่อปริมาณ
Dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea*
Pierre ex Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ
Culture Periods and Concentrations of Chitosan on
Dioscorealide B Content of *In Vitro* Khao-Yen-Tai
(*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) Shoots

เยาวพา จิระเกียรติกุล*, อรุมา สองศรี และภาณุมาศ ฤทธิไชย

ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อิฐรัตน์

ภาควิชาแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Yaowapha Jirakiattikul*, Onouma Songsri and Panumart Rithichai

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

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

Srisopa Ruangnoo and Arunporn Itharat

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

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

บทคัดย่อ

Dioscorealide B เป็นสารสำคัญที่สกัดได้จากข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการรักษาโรคเมรังและเอตส์ ความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้สารกระตุ้นมีบทบาทสำคัญต่อการกระตุ้นและสะสมสารสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นในการศึกษารังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และปริมาณ dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ โดยเพาะเลี้ยงข้อของข้าวเย็นใต้บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับไคโตซานที่ความเข้มข้น 0, 50 และ 100 mg/l เป็นเวลานาน 4, 6 และ 8 สัปดาห์ พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไคโตซานและระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง ไคโตซานที่ความ

*ผู้รับผิดชอบบทความ : yjirakia@tu.ac.th

เข้มข้น 50 และ 100 mg/l ทำให้น้ำหนักสดและแห้งของยอดที่พัฒนาลดลง แต่ไม่มีผลต่อปริมาณ dioscorealide B อย่างมีนัยสำคัญ ยอดข้าวเย็นใต้มีปริมาณ dioscorealide B สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ [1.72 % (w/w)] เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์

คำสำคัญ : ข้าวเย็นใต้; dioscorealide B; ไคโตซาน; ระยะเวลาเพาะเลี้ยง; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Abstract

Dioscorealide B is the secondary metabolite isolated from Khao-Yen-Tai (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill), a medicinal plant, which used to treat cancer and AIDs. Concentrations and culture periods of elicitors play the important roles for stimulation and accumulation the secondary metabolites in plant tissue culture. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of culture periods and concentrations of chitosan on *in vitro* shoot growth and dioscorealide B content of Khao-Yen-Tai. Single nodal segments of Khao-Yen-Tai were cultured on MS medium supplemented with 2 mg/l BA in combination with 0, 50 and 100 mg/l chitosan for 4, 6 and 8 weeks. The results indicated that there was no interaction between chitosan concentrations and culture periods. The fresh and dry weight of shoots decreased when shoots were elicited with 50 and 100 mg/l chitosan but dioscorealide B content was not significantly different among chitosan concentrations. The highest dioscorealide B content of 1.72 % (w/w) occurred after cultured for 8 weeks.

Keywords: *Dioscorea membranacea*; dioscorealide B; chitosan; culture period; plant tissue culture

1. บทนำ

ข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) อยู่ในวงศ์ Dioscoreaceae [1] มีสารสำคัญ คือ dioscorealide B [2] พืชชนิดนี้เป็นสมุนไพรจำพวกไม้เลื้อย สะสมอาหารในเหง้า มีสรรพคุณในการรักษาโรคมะเร็ง [3] และเอดส์ [4] จากสรรพคุณดังกล่าวทำให้ข้าวเย็นใต้เป็นพืชสมุนไพรที่มีความต้องการใช้มากขึ้น ได้มีรายงานการเพิ่มจำนวนต้นข้าวเย็นใต้ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมถึงวิเคราะห์หาปริมาณสาร dioscorealide B จากต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 8 สัปดาห์ พบว่ามีปริมาณสารเฉลี่ย 1.37 % (w/w) [5] ซึ่งปริมาณสารที่

ได้นี้น้อยกว่าในเหง้าแก่ที่ใช้ปลูกหรือเหง้าใหม่อายุ 15 เดือน ที่มีปริมาณสาร dioscorealide B 4 และ 2.7 % (w/w) ตามลำดับ [6] อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารสำคัญของพืชสมุนไพรหลายชนิด โดยเติมสารกระตุ้นลงในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งสารกระตุ้นที่นิยมใช้เพื่อเพิ่มสารสำคัญ ได้แก่ methyl jasmonate, jasmonic acid, salicylic acid และไคโตซาน (chitosan) เป็นต้น [7]

ไคโตซานเป็นไบโอโพลิเมอร์ที่พบได้จากธรรมชาติ โดยเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่เอซิทิล ของไคติน สามารถพบได้ใน

เปลือกกุ้ง กระดองปู แกนหมึก แมลง ผงเซลล์ของเชื้อรา และสาหร่ายบางชนิด [8] มีการนำโคโตซานมาใช้กับงานวิจัยทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชรวมทั้งเป็นสารกระตุ้น (elicitor) ให้พืชสร้างและสะสมสารสำคัญ เช่น Furmanowa และคณะ [9] ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Taxus cuspidate* โดยใช้โคโตซานเพื่อกระตุ้นให้สะสมสาร taxane พบว่าโคโตซานความเข้มข้น 20 mg/l สามารถกระตุ้นให้แคลลัสของ *T. cuspidate* สะสมสารสูงขึ้นจาก 89 เป็น 139 µg/g นอกจากนี้ Putalum และคณะ [10] ศึกษาการผลิตสาร artemisinin จากรากฝอยของ *Artemisia annua* โดยเพาะเลี้ยงรากฝอยอายุ 21 วัน ในอาหารที่มีโคโตซานความเข้มข้น 0, 50, 100 และ 150 mg/l เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 2, 4 และ 6 วัน พบว่ารากฝอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม โคโตซานความเข้มข้น 150 mg/l เป็นเวลา 6 วัน สามารถเพิ่มปริมาณ artemisinin ได้ 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม อย่างไรก็ตาม วราภรณ์ [7] ได้กล่าวไว้ว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้สารกระตุ้นนั้นเป็นสิ่งที่จำเป็นในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช ซึ่งการศึกษาถึงปัจจัยดังกล่าวยังไม่มีรายงานในการกระตุ้นให้สร้างสารสำคัญของยอดข้าวเย็นใต้ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมโคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณ dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ในสภาพปลอดเชื้อ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

นำยอดข้าวเย็นใต้ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l มา

ตัดเป็นท่อนสั้น ๆ แต่ละท่อนมี 1 ข้อ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับโคโตซาน (น้ำหนักโมเลกุล 80-100 kDa) ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน วางแผนการทดลองแบบ 3x3 factorial in CRD มี 2 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 1 คือ ความเข้มข้นของโคโตซาน 3 ระดับที่ 0, 50 และ 100 mg/l ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมโคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ในแต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 10 ขวด แต่ละขวดมี 5 ข้อ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 °C ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 3,000 lux ด้วยหลอดไฟ fluorescence ชนิด cool white ทำการบันทึกผลการทดลอง ดังนี้

2.1 การเจริญเติบโตของยอดที่พัฒนา : การเกิดยอด (%) จำนวนยอด น้ำหนักสด และแห้งของยอด

2.2 ปริมาณสารสกัด (% yield) โดยอบยอดข้าวเย็นใต้ของแต่ละสิ่งทดลองให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง และสกัดด้วย chloroform 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 3 วัน อัตราส่วนเนื้อเยื่อพืชแห้ง : คลอโรฟอร์ม 1 : 3 โดยปริมาตร กรองและนำไประเหยให้แห้งในตู้อบแห้ง (hot air oven) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดได้จากสูตร % yield = (น้ำหนักสารสกัด ÷ น้ำหนักเริ่มต้นที่ใช้หมัก) × 100

2.3 ปริมาณ dioscorealide B ใช้วิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Sukkarn and Itharat [2] โดยเติม acetonitrile 1 ml ลงในสารสกัดของข้าวเย็นใต้ 10 mg จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.22 µm วิเคราะห์หาปริมาณ dioscorealide B ด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) ยี่ห้อ ThermoSeparationProduct (TSP)

รุ่น Autosampler โดยใช้ detector รุ่น Spectro Monitor 4100 (LDC Analytical, USA) วิเคราะห์ข้อมูลด้วย TSP PC1000 software (TSP, USA) ใช้ column ชนิด Luna C₁₈ ความยาว 250 x 4.6 mm I.D., 10 µm (Phenomenex, USA) พร้อมกับ guard column ใช้ระบบ gradient ในอัตราส่วน 70-55 % (A) ที่เวลา 0-10 นาที 55 % (A) ที่เวลา 5 นาที 55-30 % (A) ที่เวลา 15 นาที 30 % (A) ที่เวลา 5 นาที 30-70 % (A) ที่เวลา 2 นาที และ 70 % (A) ที่เวลา 8 นาที (ใช้เวลา 45 นาที/ตัวอย่าง) โดยมี mobile phase คือ น้ำ (A) และ acetonitrile (B) มีอัตราส่วนการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 1 mL/min และฉีดสารเข้าป้อนปริมาตร 10 µL โดยใช้ความยาวคลื่น 270 nm คำนวณพื้นที่ใต้กราฟ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ 3x3 factorial in CRD มี 3 ซ้ำเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม SAS

3. ผลการวิจัย

จากการวิจัยพบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงต่อการเกิดยอด จำนวนยอด น้ำหนักสดและแห้งของยอด ปริมาณสารสกัด และปริมาณ dioscorealide B (ตารางที่ 1) โดยเมื่อเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารที่มีโคโคซานความเข้มข้น 0, 50 และ 100 mg/L มีการเกิดยอด 100 % และจำนวนยอด 1.1-1.2 ยอด ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนระยะเวลาการเพาะเลี้ยง พบว่าการเกิดยอด (100 %) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีจำนวนยอดสูงสุด 1.2 ยอดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ (ตารางที่ 1)

น้ำหนักสดและแห้งของยอด พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อยอดพัฒนาบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมโคโคซานความเข้มข้นต่าง ๆ โดยน้ำหนักสดและแห้งของยอดสูงสุด 912.22 mg และ 114.76 mg ตามลำดับ เมื่อยอดพัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมโคโคซาน ส่วนการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 8 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งของยอดสูงสุด 9.66.67 mg และ 128.33 mg ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งของยอดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 4 และ 6 สัปดาห์ (ตารางที่ 1)

ปริมาณสารสกัด พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อยอดพัฒนาบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมโคโคซานความเข้มข้นต่างกันและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่างกัน ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติมโคโคซาน มีปริมาณสารสกัดสูงสุด เท่ากับ 5.69 % ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีโคโคซานความเข้มข้น 50 และ 100 mg/L มีปริมาณสารสกัด 3.30 และ 2.68 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 และ 8 สัปดาห์ มีปริมาณสารสกัดสูงสุด 4.80 และ 4.66 % ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารสกัดน้อยที่สุด 2.21 % (ตารางที่ 1)

จากการวิจัยพบว่าปริมาณสาร dioscorealide B (0.80-0.88 %) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอาหารเพาะเลี้ยงที่มีโคโคซานความเข้มข้น 0-100 mg/L ส่วนระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณสาร dioscorealide B อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ มีปริมาณสาร dioscorealide B สูงสุด 1.72 % (w/w) และน้อยที่สุด 0.23 % (w/w) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโต ปริมาณสารสกัด (% yield) และปริมาณสาร dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0-100 mg/l เป็นระยะเวลา 4-8 สัปดาห์

สิ่งทดลอง	การเกิดยอด (%)	จำนวนยอด	น้ำหนักสด (mg)	น้ำหนักแห้ง (mg)	% yield	dioscorealide B (% : w/w)
ความเข้มข้น (C : mg/l)						
0	100	1.2	912.22 ^{1/a}	114.76 ^a	5.69 ^a	0.87
50	100	1.1	786.67 ^b	92.82 ^b	3.30 ^b	0.80
100	100	1.2	818.89 ^b	105.10 ^a	2.68 ^b	0.88
ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (T : สัปดาห์)						
4	100	1.1 ^b	716.67 ^c	73.24 ^c	2.21 ^b	0.23 ^c
6	100	1.2 ^a	834.44 ^b	106.70 ^b	4.80 ^a	0.61 ^b
8	100	1.1 ^b	966.67 ^a	128.33 ^a	4.66 ^a	1.72 ^a
C	ns	ns	*	*	*	ns
T	ns	*	**	**	*	**
C x T	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	0	5.3	6.03	5.44	38.81	7.31

^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

*มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ns = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. วิจัย

จากการศึกษาผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณ dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไคโตซาน และระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของยอดที่พัฒนาและปริมาณ dioscorealide B โดยไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างกันไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และจำนวนยอด แสดงให้เห็นว่าไคโตซานความเข้มข้น 50

และ 100 mg/l ไม่มีผลต่อการพัฒนาของยอดข้าวเย็นใต้ ซึ่งสอดคล้องกับ เยาวพา และคณะ [11] ที่รายงานว่าการเติมไคโตซานน้ำหนักโมเลกุล 80-100 kDa และ 200-230 kDa ความเข้มข้น 25-100 mg/l ลงในอาหารเพาะเลี้ยงข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) นาน 4 สัปดาห์ พบว่ายอดสามารถพัฒนาได้เป็นปกติเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีไคโตซานร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/l แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ อย่างไรก็ตาม จากการวิจัยนี้พบว่ายอดที่พัฒนามบนอาหารที่มีไคโตซานความ

เข้มข้น 50-100 mg/l มีน้ำหนัสดและแห้งน้อยกว่า ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่มีไคโตซาน ทั้งนี้อาจเนื่องจากไคโตซานเป็นสารกระตุ้นชนิดหนึ่งที่มีสมบัติ ทำให้พืชเกิดความเครียด [7] การสะสมน้ำหนัสดและแห้งจึงอาจลดลงได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Coste และคณะ [12] ที่ใช้ Jasmonic acid (JA) เป็น สารกระตุ้นกับ *Hypericum hirsutum* และ *H. maculatum* พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี JA ความเข้มข้นสูง (250 และ 500 μM) มีน้ำหนักแห้ง ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ไม่เติม) หรือเติม JA ความเข้มข้นต่ำ (100 μM) เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง พบว่ามีผลต่อน้ำหนัสดและแห้ง ของยอดที่พัฒนา โดยที่น้ำหนัสดและแห้งของยอดที่ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 8 สัปดาห์ สูงกว่า 6 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาใน การเพาะเลี้ยงที่นานกว่าย่อมทำให้มีการสะสมน้ำหนัสดและแห้งมากตามไปด้วย สอดคล้องกับการทดลอง ของ Nge และคณะ [13] ที่ทำการศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium phalaenopsis*) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 0, 3 และ 6 สัปดาห์ ในอาหารเหลว พบว่ากล้วยไม้มีการเจริญเติบโตของ protocorm-like bodies (PLB) เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง คือ สะสมน้ำหนัสดของ PLB สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็น เวลา 6 สัปดาห์

ปริมาณสารสกัดของยอดข้าวเย็นใต้ที่ได้เป็นไปในทางเดียวกันกับน้ำหนัสดและแห้งของยอด คือ มีปริมาณสารสกัดสูงสุดเมื่อยอดพัฒนาบนอาหารที่ไม่มีเติมไคโตซาน และเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 6 และ 8 สัปดาห์ ส่วนปริมาณสาร dioscorealide B สูงสุด 1.72 % (w/w) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 8 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสร้างสารสำคัญของข้าวเย็นใต้ โดย วราภรณ์

[7] ได้กล่าวไว้ว่าการผลิตสารสำคัญจากชิ้นส่วนพืชหรืออวัยวะพืชค่อนข้างใช้ระยะเวลานานในการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้สารสำคัญที่เพียงพอกับความต้องการ ซึ่งปริมาณสารที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับ รายงานของ เยาวพา และอรุณพร [5] ที่พบว่าต้นข้าวเย็นใต้ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้ออายุ 8 สัปดาห์ มีปริมาณสาร dioscorealide B 1.37 % (w/w) จากการที่ไคโตซานความเข้มข้น 50 และ 100 mg/l ไม่มี ผลต่อการเพิ่มปริมาณสาร dioscorealide B อาจเนื่องจากความจำเพาะเจาะจงของสารกระตุ้นในการตอบสนองของพืช โดย วราภรณ์ [7] ได้กล่าวไว้ว่าประสิทธิภาพของการกระตุ้นเพื่อให้เกิดการผลิตสารสำคัญขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงและความเข้มข้นของสารกระตุ้น ซึ่งการตอบสนองของพืชต่อความเข้มข้นของสารกระตุ้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ความเข้มข้นของสารกระตุ้นจะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นในพืชชนิดหนึ่ง แต่เมื่อนำไปใช้กับพืชอีกชนิดหนึ่งอาจไม่เกิดการตอบสนองเลยก็เป็นได้ นอกจากนี้อาจขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับสารกระตุ้นและกลไกในการสร้างสารที่สารกระตุ้นทำให้เกิดขึ้น เช่น การผลิตสาร artemisinin จากรากฝอยของ *A. annua* อายุ 21 วัน โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไคโตซานความเข้มข้น 0, 50, 100 และ 150 mg/l เป็นเวลา 2, 4 และ 6 วัน พบว่ารากฝอยที่เพาะเลี้ยงในไคโตซานความเข้มข้น 150 mg/l เป็นเวลา 6 วัน มีปริมาณ artemisinin เพิ่มขึ้น 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่มีเติมไคโตซาน ซึ่งปริมาณสารสำคัญเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไคโตซานและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง [10] อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของพืชต่อสารกระตุ้นยังมีปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง [14] และแสง [15] เป็นต้น ดังนั้นประสิทธิภาพของสารกระตุ้นต่อการเพิ่มสารสำคัญ จึงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เนื่องจาก

กระบวนการส่งสัญญาณและกลไกการตอบสนองที่หลากหลายของสารกระตุ้น ซึ่งสารที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารสำคัญในพืชชนิดหนึ่ง อาจไม่สามารถทำให้เกิดผลใด ๆ ต่อพืชอีกชนิดก็เป็นได้ ในทางกลับกันพืชต่างชนิดกัน อาจตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยสารกระตุ้นชนิดเดียวกันได้ [16]

จากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าปริมาณ dioscorealide B เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น คือ 8 สัปดาห์ โดยไม่จำเป็นต้องเติมไคโตซาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงและ/หรือการใช้สารกระตุ้นชนิดอื่น เพื่อเพิ่มปริมาณสาร dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นได้ในสภาพปลอดเชื้อต่อไป

5. สรุป

5.1 ไคโตซานที่ความเข้มข้น 50 และ 100 mg/l มีผลทำให้น้ำหนักสดและแห้งของยอดที่พัฒนาลดลง แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นได้

5.2 การเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลานาน 8 สัปดาห์ มีผลทำให้น้ำหนักสดและแห้งของยอดที่พัฒนาเพิ่มขึ้นและปริมาณสาร dioscorealide B สูงสุด 1.72 % (w/w)

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

7. รายการอ้างอิง

[1] Wilkin, P. and Thapayai, C., 2009, Dioscoreaceae, Flora of Thailand 10: 1-140.

[2] Sukkarn, B. and Itharat, A., 2009, Development of the HPLC quantitative analysis of dioscorealide B from *Dioscorea membranacea* Pierre, Thammasat Med. J. 9: 156-163.

[3] อาทิมา แซ่ตั้ง, อรุณพร อิฐรัตน์, ชวบูลย์ เดชสุขุม, ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล, นิวัติ แก้วประดับ และปราณี รัตนสุวรรณ, 2548, การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสมุนไพรไทยที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง, ว.สงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 27: 469-478.

[4] Tewtrakul, S., Itharat, A. and Rattanasuwan, P., 2006, Anti HIV-1 protease and HIV-1 integrase activities of Thai medicinal plants known as Hua-Khao-Yen, J. Ethnopharmacol. 105: 312-315.

[5] เยาวพา จิระเกียรติกุล และอรุณพร อิฐรัตน์, 2555, การขยายพันธุ์หัวข้าวเย็นในสภาพปลอดเชื้อและปริมาณสารสำคัญในเนื้อเยื่อ, รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์, สำนักคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2553, กรุงเทพฯ, 70 น.

[6] Rithichai, P., Itharat, A., Jirakiattikul, Y. and Ruangnoo, S., 2013, Growth of *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill and dioscorealide B content at different harvest times, Pharmacology online 1: 225-229.

[7] วราภรณ์ ภูตะลุน, 2551, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร : แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด, ขอนแก่น, 120 น.

[8] Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere, J., 2004, Chitosan:

- Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables, *Food Microbiol.* 21: 703-714.
- [9] Furmanowa, M., Oldzka, H., Sykowska-Baranek, K., Jozefowicz, J. and Gieracka, S., 2000, Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidate* and *Taxus x media* by some elicitors and precursors, *Biotechnol. Lett.* 22: 1449-1452.
- [10] Putalum, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H. and Shoyama, Y., 2007, Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L., *Biotechnol. Lett.* 29: 1143-1146.
- [11] เยาวพา จิระเกียรติกุล, ภาณุมาศ ฤทธิไชย, กรรณิการ์ เจษฎาการุณ และอรุณพร อธิรัตน์, 2556, ผลของโคโตซานต่อการเพิ่มจำนวนยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 21: 11-18.
- [12] Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C. and Coldea, G., 2011, Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*, *Plant Cell Tiss. Org.* 106: 279-288.
- [13] Nge, K.L., New, N., Chandkrachang, S. and Stevens, W.F., 2006, Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture, *Plant Sci.* 170: 1185-1190.
- [14] Walker, T.S., Bais, H.P. and Vivanco, J.M., 2002, Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L., *Phytochemistry* 60: 289-293.
- [15] Vasconsuelo, A.A., Giuletti, A.M., Picotto, G., Rodriguez, T. and Boland, R., 2003, Involvement of the PLC/PKC pathway in chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctoru* L., cell cultures, *Plant Sci.* 165: 429-436.
- [16] Vasconsuelo, A.A. and Boland, R., 2007, Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants, *Plant Sci.* 172: 861-875.