

การสร้างสารกลุ่มซูดอจูบูจินิกินจากแคลลัสเพาะเลี้ยงพรมมิ

Production of Pseudojubogenin from Callus Cultures of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.

ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ¹, วราภรณ์ ภูตะสุน¹, วฐู พรหมพิทยารัตน์², กรกนก อิงคินันท์³, ฮิโรยูกิ ทานากะ⁴

Sirilak Kamonwannasit¹, Waraporn Putalun¹, Watoo Phrompittayarat², Kornkanok Ingkaninan³, Hiroyuki Tanaka⁴

¹สำนักวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ อ.เมืองพิษณุโลก จ. พิษณุโลก 65000

³ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก 65000

⁴Department of Medicinal Plant Breeding, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

Received: 27 February, 2007

Accepted: 11 May, 2007

Abstract

Bacopa monnieri (L.) Wettst. (Scrophulariaceae), widely distributed in Asia, Australia and America. This plant has traditionally been used in India as an important constituent of Ayurveda to treat disorders such as epilepsy, insanity, cardiogenic and neurosis. *B. monnieri* was studied *in vitro* using leaf and stem as explants on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different of auxins and cytokinins. After four weeks cultured, 100% of callus formation was obtained from medium supplemented with 2,4-D 1 mg/l and kinetin 1 mg/l. Callus induced from stem as explants cultured in medium supplemented with kinetin 1 mg/l and 2,4-D 0.5 mg/l contained the highest level of pseudojubogenin (9.29±1.62 mg/g dry wt). Callus cultured in medium supplemented with kinetin 0.5 mg/l and 2, 4-D 1 mg/l was obtained the highest fresh weight increase (362±165 mg/flask).

Keywords: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst., pseudojubogenin, callus

บทคัดย่อ

พรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) เป็นพืชในวงศ์ Scrophulariaceae มีแหล่งกระจายพันธุ์อยู่ในแถบเอเชีย ออสเตรเลีย และ อเมริกา ในทางอายุรเวทของอินเดียได้นำพรมมิมาใช้รักษาอาการของโรคชัก อาการผิดปกติทางสมอง บำรุงหัวใจ และ โรคทางระบบประสาท จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของพรมมิ โดยใช้ส่วนของใบและต้น ซึ่งเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต auxins และ cytokinins ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันชักนำให้เกิดแคลลัส หลังจากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนต้นจากสูตรอาหารที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัสที่ 100% จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซูดอจูบูจินิกินในแคลลัส พบว่าแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนของต้น ในสูตรอาหารที่มี kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสารกลุ่มซูดอจูบูจินิกินสูงสุดคือ 9.29±1.62 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และจากการศึกษาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของ แคลลัสจากการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัส จากสูตรอาหารที่มี kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 362±165 มิลลิกรัมต่อขวด

คำสำคัญ: พรมมิ ซูดอจูบูจินิกิน แคลลัส

บทนำ

ปัจจุบันโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทและความทรงจำ เป็นสาเหตุทำลายคุณภาพชีวิตของประชากรสูงอายุ ยาหรือสมุนไพรที่จะสามารถนำมารักษาหรือบรรเทาอาการโรคที่เกิดจากความเสื่อมนี้ จึงมีความสำคัญทั้งทางด้านสุขภาพและเศรษฐกิจ พรมมีเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อบำรุงสมอง บำรุงความจำ อีกทั้งยังเป็นพืชที่สามารถเพาะปลูกได้ในประเทศไทยและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเสริมอาหาร พรมมีมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. จัดอยู่ในวงศ์ Scrophulariaceae พรมมีใช้เป็นยาสมุนไพรในตำราอายุรเวทของอินเดียสำหรับช่วยเพิ่มความจำ โดยใช้ส่วนเหนือพื้นดิน มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพรมมี โดยมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความจำ ด้านการซึมเศร้า ด้านอนุมูลอิสระ (Rosso et al., 2005) พรมมีมีสารกลุ่มซาโปนินเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ bacopaside I, II, III, IV, bacoside A1, A2, A3 และ bacopasaponin A-G (Chakravarty et al., 2001; 2003; Garai et al., 1996a; 1996b; Hou et al., 2002; Sivaramakrishna et al., 2005) โดยสารกลุ่มซาโปนินเป็นกลุ่มที่ออกฤทธิ์เพิ่มความทรงจำซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ชูโคจูโบจินิน ได้แก่ bacopaside I และ จูโบจินิน ได้แก่ bacoside A3 เป็นต้น

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อนำมาใช้ในการขยายพันธุ์และการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพร ทั้งนี้เนื่องจากคุณค่าการเป็นยาสมุนไพรของพรมมีที่สามารถนำมาใช้ในด้านบำรุงความจำและเป็นที่ต้องการของตลาด จึงได้นำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาศึกษาถึงความเหมาะสมของสูตรอาหารสังเคราะห์ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและหาปริมาณสารสำคัญที่พบ ได้มีรายงานการศึกษาพืชสมุนไพรพรมมีในแง่ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์และเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (Binita et al., 2005; Rahman et al., 2002; Shrivastava et al., 1999) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงปริมาณสารสำคัญในกลุ่มชูโคจูโบจินินที่พบในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพรมมีในอาหารเพาะเลี้ยงสังเคราะห์ที่มีการเปลี่ยนแปลงสารควบคุม

การเจริญเติบโตเพื่อให้เกิดแคลลัสรวมทั้งทำการตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญ กลุ่มชูโคจูโบจินินจากแคลลัสด้วยวิธีอีไลซา (Enzyme-Linked immunosorbant assay, ELISA) โดยใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนอล ซึ่งสามารถตรวจวัดหาปริมาณสารซาโปนิน กลุ่มชูโคจูโบจินินรวมจากต้นพรมมีได้

วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องอ่านไมโครเพลตชนิดมัลติโหมด (Microplate reader) ของบริษัท Bio-Rad รุ่น 550 ได้ถูกนำมาใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินกลุ่มชูโคจูโบจินินในแคลลัสเพาะเลี้ยงที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างสารสกัดและผ่านขั้นตอนการจับกับสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนอลเรียบร้อยแล้ว

สารเคมี

สารมาตรฐาน bacopaside I ChromaDex, USA BA และ Kinetin จาก Sigma, USA 2, 4-D จาก Fluka, Switzerland ABTS จาก Wako, Japan POD antirabbit IgG จาก Teknika-Cappel, USA และ เมทานอล จาก Merck, USA สารเคมีและตัวทำละลายอื่นๆ ที่ใช้เป็นชนิดที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ (AR grade) ทั้งหมด

วิธีการทดลอง

1. ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชพรมมี

นำชิ้นส่วนต้นและใบของพรมมีที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 20 นาที และแช่ใน เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร และทำการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige & Skoog (MS) ที่มีชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ทำการปรับความเป็นกรดและด่างให้ได้ 5.5 เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตรและวัน 9 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสและความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

และเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการเลี้ยง 4 ชิ้นส่วนต่อขวด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนของแคลลัสที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก

และนำไปทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อนำไปสกัดและตรวจหาปริมาณสารสำคัญกลุ่มชูโดจูโบจีนินต่อไป

ตารางที่ 1 สารควบคุมการเจริญเติบโตของแคลลัส

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	BA	2,4-D	kinetin
B0.5D1	0.5	1	-
B1D1	1	1	-
B1D0.5	1	0.5	-
K0.5D1	-	1	0.5
K1D1	-	1	1
K1D0.5	-	0.5	1

2. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสารสกัด

วิธีการเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากแคลลัสของพรมมิเพื่อตรวจหาปริมาณสารสำคัญกลุ่มชูโดจูโบจีนินแสดงดังแผนผังในรูปที่ 1 โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการชั่งและแยกสกัดสามครั้ง



รูปที่ 1 แผนผังการทำตัวอย่างสารสกัด

3. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มชูโดจูโบจีนิน

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มชูโดจูโบจีนินด้วยวิธีอิลูซาโดยใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนอล (Phrompittayarat et al., 2007) ตามรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณดังนี้

3.1 เตรียมสารละลาย bacopaside I-HSA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายด้วย carbonate buffer pH 9.6 ลงใน 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย 0.02% Tween ใน phosphate buffer saline (T-PBS) 3 ครั้ง

3.2 เตรียมหางนมผง (skim milk) ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffer saline (PBS) หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง

3.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของ bacopaside I ที่ทำการเจือจางในเมทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 50 ไมโครลิตร หรือเติมสารสกัดตัวอย่างที่ทำการเจือจางในเมทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 50 ไมโครลิตร ร่วมกับเติมแอนติบอดีตัวที่ 1 โพลีโคลนอลของ bacopaside I ที่ละลายด้วย T-PBS หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า 30 วินาที บ่มที่

37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง

3.4 เติมนานติบอดีตัวที่ 2, POD anti-rabbit IgG ละลายใน T-PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง

3.5 เติมนสารตั้งต้น (ABTS 0.3 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร, H_2O_2 0.03 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน citrate buffer 0.1 โมลาร์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่

37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

3.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่าน ไมโครเพลตชนิดมัลติโหนดที่ค่าความถี่ 405 นาโนเมตร

3.7 นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดมา หาความเข้มข้นของปริมาณสารกลุ่มซูโดจูโบจีนิน โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสาร มาตรฐาน โดยคำนวณจากการทำกราฟของสาร มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 2 ผลของการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและต้นของต้นพรมมิที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่รวม กับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังจากเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยทำการเลี้ยง 20 ชิ้นต่อสูตรอาหาร

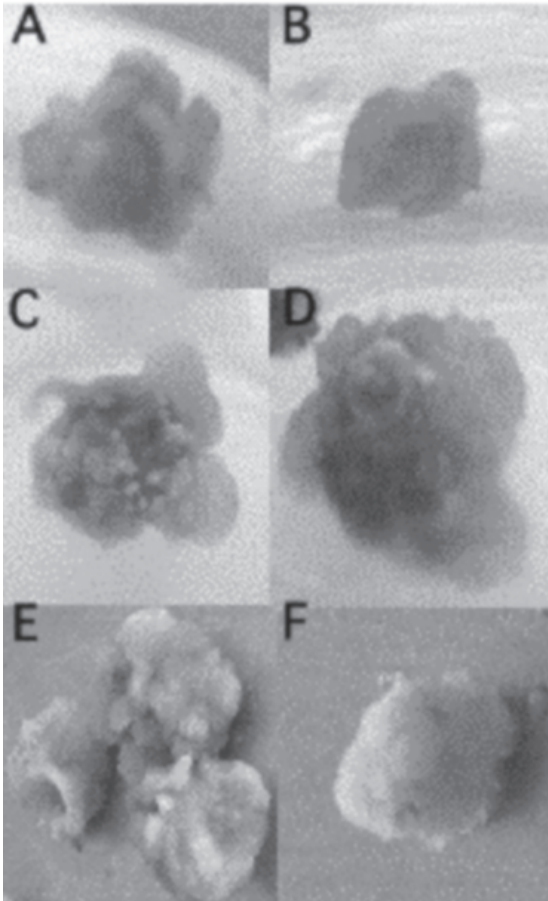
สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)			เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิด	
BA	kinetin	2,4-D	ชิ้นส่วนของต้น	ชิ้นส่วนของใบ
-	1	1	100.0	90.9
-	1	0.5	71.4	55.0
-	0.5	1	90.0	76.1
1	-	0.5	85.0	95.1
1	-	1	77.7	75.0
0.5	-	1	90.9	38.0

ผลการทดลอง

1. ผลของการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วน ของใบและต้น

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA, kinetin และ 2,4-D ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส แสดงดัง ตารางที่ 2 เมื่อนำชิ้นส่วนของต้นและชิ้นส่วนของใบ พรมมิมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีผลต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนของต้นและใบพรมมิ มีความสามารถในการเกิดเป็นแคลลัสได้ จากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนของใบที่ทำการ เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ที่ระดับ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ระดับ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการชักนำ การเกิดเป็นแคลลัส 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนของต้นและใบของพรมมิที่นำมาเลี้ยงใน อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม kinetin ร่วมกับ

2,4-D พบว่า ชิ้นส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารที่มี kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถ ชักนำการเกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยลักษณะ ของแคลลัสที่เกิดแสดงดังรูปที่ 2 ดังนั้นจากผลการ ทดลอง เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสาร ควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน พบว่าชิ้นส่วน ของต้นมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้ดีจาก kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผล ต่อการชักนำการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว จึงเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรมมิเพื่อชักนำ ให้เกิดแคลลัส

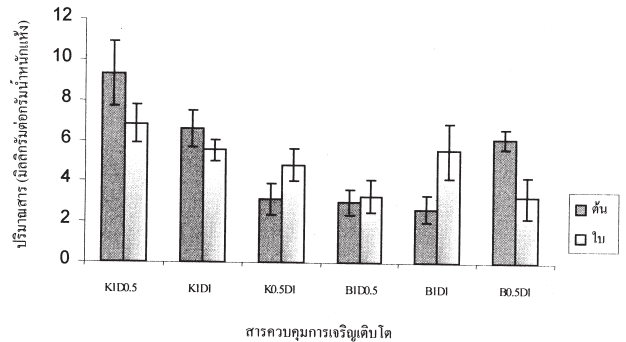


รูปที่ 2 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ

A: K1D1 (ต้น) ; B: K1D1 (ใบ) ; C: K1D0.5 (ต้น); D: K1D0.5 (ใบ) ; E: K0.5D1 (ต้น) ; F: B1D0.5 (ใบ)

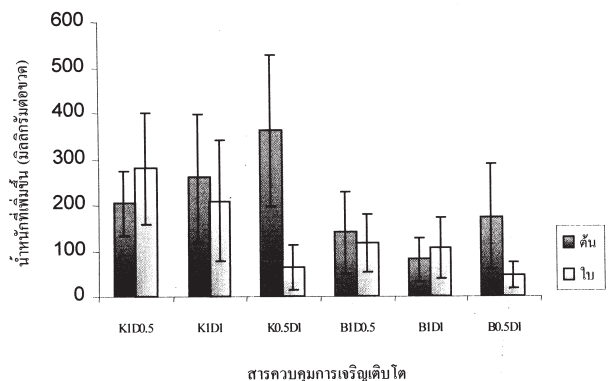
2. ปริมาณสารกลุ่มชูโดจูโบจีนินจากแคลลัส

จากการศึกษาผลของปริมาณสารกลุ่มชูโดจูโบจีนินและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของพรมมิบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันหลังจากทำการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์พบว่าปริมาณสารกลุ่มชูโดจูโบจีนินจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสพรมมิที่พบปริมาณสารสูงสุดได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนลำต้นในอาหารสังเคราะห์สูตรที่เติม kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีปริมาณสาร 9.29 ± 1.62 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ปริมาณสารกลุ่มชูโดจูโบจีนินจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ

และจากการศึกษาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสจากการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกันนั้นพบว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนลำต้นในสูตรอาหารที่มี kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 362 ± 165 มิลลิกรัมต่อชวด (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของแคลลัสจากการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรอาหารสูตรต่างๆ

วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาผลของ BA ร่วมกับ 2,4-D และ kinetin ร่วมกับ 2,4-D ในการชักนำให้เกิดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนของต้นมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการเจริญเติบโตได้ดีกว่าชิ้นส่วนของใบโดยส่วนของต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดเป็นแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้มีสีเขียวและฟู (รูปที่ 2A) เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ได้จากส่วนใบในสูตรที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้มีสีเหลืองปนเขียวและมีลักษณะเกาะกันแน่น (รูปที่ 2F) พบว่าเกิดแคลลัสได้ 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนของต้นมีลักษณะการเกิดเป็นแคลลัสได้ดี และแคลลัสที่เกิดจะเกิดขึ้นตรงบริเวณรอยตัดหรือบนผิวของใบ (บุญยืน, 2540) ทั้งนี้เนื่องจาก BA และ kinetin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนิน โดยสารกลุ่มนี้มีผลต่อการแบ่งเซลล์จากชิ้นส่วนของต้นและใบซึ่งเป็นส่วนของเนื้อเยื่อเจริญและมีผลในการกระตุ้นการเจริญของก้อนแคลลัสให้เติบโตขึ้นมาได้ (พีรเดช, 2529) ส่วน 2,4-D เป็นกลุ่มของออกซินซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีโมเลกุลเล็กสามารถแทรกซึมในใบได้ดี และมีคุณสมบัติทำลายคลอโรฟิลล์ของใบ ในขณะที่ BA เป็นสารกลุ่มไซโตไคนินที่มีคุณสมบัติในการชะลอการตายของใบ ดังนั้นเมื่อใบได้รับ 2,4-D เพียงอย่างเดียว 2,4-D จะทำลายคลอโรฟิลล์ของใบแต่เมื่อใบได้รับ 2,4-D ร่วมกับ BA BA จะมีผลทำให้การสลายตัวของคลอโรฟิลล์ลดลง และเมื่อใบได้รับสัดส่วนของ BA สูงเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ ทำให้สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้เพราะ BA และ 2,4-D ที่เติมลงในอาหารมีผลต่ออัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินภายในใบ ทำให้เกิดแคลลัสขึ้น (สัมฤทธิ์, 2544) และจากการทดลองได้พบว่า 2,4-D มีการตอบสนองต่อ kinetin ได้ดีกว่า BA จึงกล่าวได้ว่า อัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินที่ไม่เหมาะสมจะทำให้การเจริญเติบโตของ

เนื้อเยื่อไม่ดีเท่าที่ควร (สัมพันธ์, 2526) และอัตราส่วนที่พอเหมาะระหว่างออกซินต่อไซโตไคนินของเนื้อเยื่อแต่ละชนิดจะมีการตอบสนองแตกต่างกันออกไป

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบว่าปริมาณสารกลุ่มชูโดจูโบจีนินจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของต้นในอาหารที่มี kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสูงสุด โดยมีปริมาณสารชูโดจูโบจีนิน 9.29 ± 1.62 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rahman และคณะ (Rahman et al., 2002) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยพรมมิ พบว่ามีปริมาณสาร bacoside A 10.5 ± 0.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง และ bacoside B 3.7 ± 0.4 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นพืชที่ได้จากธรรมชาติ พบว่าต้นพรมมิที่ได้จากธรรมชาติอายุ 4 เดือนมีปริมาณสารกลุ่มชูโดจูโบจีนิน 16.75 ± 3.14 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แม้ว่าปริมาณสารที่พบในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีปริมาณต่ำกว่าที่พบจากต้นพืชในธรรมชาติ ทั้งนี้ส่วนนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแคลลัสใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่า เพียง 4 สัปดาห์ จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้กล่าวได้ว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นพรมมิมิศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิกลุ่มซาโปนินได้ การเพาะเลี้ยงแคลลัสอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นแหล่งของเซลล์พืชในการศึกษาผลของปัจจัยอื่น ๆ ในการเพาะเลี้ยงหรือผลของสารกระตุ้น (elicitor) ชนิดต่างๆ ต่อการเพิ่มการสร้างสารทุติยภูมิกลุ่มซาโปนินรวมทั้งการศึกษาถึงวิถีชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มดังกล่าวในพืชชนิดนี้ต่อไป นอกจากนี้ในการวิจัยครั้งนี้ยังพบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ทุกระดับความเข้มข้นสามารถทำให้แคลลัสที่ได้เกิดการเจริญเติบโตได้ดีจึงเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและมีการสร้างสารกลุ่มชูโดจูโบจีนินได้ดีกว่าสูตรอาหารที่เติม BA ร่วมกับ kinetin โดยน้ำหนักของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin จะแปรผันกับปริมาณการผลิตสารทุติยภูมิในแคลลัส

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2540. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ขอนแก่น: คลังนาวิทยา. หน้า 30
- พีรเดช ทองอำไพ. 2529. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพืชสวนคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 15
- สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2544. สรีรวิทยาการพัฒนารากพืช. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนาวิทยา. หน้า 304-305
- สัมพันธ์ คัมภีรานนท์. 2526. สรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 249
- Binita BC, Ashok MD, Yogesh TJ. 2005. *Bacopa monnieri* (L.) Pennell: A rapid, efficient and cost effective micropropagation. *Plant Tissue Cult & Biotech* 15(2): 167-175.
- Chakravarty KA, Sakar T, Masuda K, et al. 2001. Bacopaside I and II: two pseudojubilogenin glycosides from *Bacopa monnieri*. *Phytochemistry* 58: 553-556.
- Chakravarty KA, Garai S, Masida KN, et al. 2003. Bacopasides III-V: Triterpenoid glycosides from *Bacopa monnieri*. *Chem Pharm Bull* 51(2): 215-217.
- Garai S, Mahato BS, Ohtani K, et al. 1996a. Dammarane type triterpenoid saponins from *Bacopa monnieri*. *Phytochemistry* 42(3): 815-820.
- Garai S, Mahato BS, Ohtani K, et al. 1996b. Bacopasaponin D-A pseudojubilogenin glycoside from *Bacopa monnieri*. *Phytochemistry* 43 (2): 447-449.
- Hou CC, Lin SJ, Cheng JT, et al. 2002. Bacopaside III, bacopasaponin G and bacopasides A, B and C from *Bacopa monnieri*. *J Nat Prod* 65 (12): 1759-1763.
- Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, et al. 2007. An enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Anal Chim Acta* 584(1): 1-6.
- Rahman LU, Verma PC, Singh D, et al. 2002. Bacopaside production by suspension cultures of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Biotech Lett* 24 (17): 1427-1429.
- Rosso A and Borrelli F. 2005. *Bacopa monnieri*, a reputed nootropic plant: an overview. *Phytomedicine* 12 (4): 305-317.
- Shrivastava N and Rajani M. 1999. Multiple shoot regeneration and tissue culture studies on *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Plant Cell Rep* 18: 919-923.
- Sivaramakrishna C, Rao CV, Trimurtulu G, et al. 2005. Triterpenoid glycoside from *Bacopa monnieri*. *Phytochemistry* 66: 2719-2728.