ผลของสูตรอาหารและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารฟีนอลิกรวมของว่านน้ำทองในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Medium Types and Culture Periods on Growth, Antioxidant Activity, Total Flavonoid Content and Total Phenolic Content of *In Vitro Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume

ปิยังกูร เรืองมาลัย[1] ดวงพร บุญชัย[2] เบญญา มะโนชัย[1] และ พัชรียา บุญกอแก้ว[1,*]

Piyungul Ruangmalai[1], Duangporn Boonchai[2], Benya Manochai[1] and Patchareeya Boonkorkaew[1,*]

[1] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[2] สวนกล้วยไม้ระพี สาคริก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[1] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

[2] Rapee Sagarik Orchid Garden, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

รับเรื่อง: 24 เมษายน 2566 Received: 24 April 2023

ปรับแก้ไข: 30 พฤษภาคม 2566 Revised: 30 May 2023

รับตีพิมพ์: 2 มิถุนายน 2566 Accepted: 2 June 2023

* Corresponding author: agrpyb@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ความเป็นมาและวัตถุประสงค์: ว่านน้ำทอง (*Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume) เป็นกล้วยไม้ดินที่มีการใช้ประโยชน์เป็นไม้ประดับ และประโยชน์ด้านการแพทย์พื้นบ้านในหลายประเทศ มีสรรพคุณช่วยบรรเทาอาการไอเป็นเลือดที่เกิดจากวัณโรคปอด เบื่ออาหาร ลดการอักเสบ บำรุงปอด ระบบไหลเวียนโลหิต และระบบประสาท ทำให้ในสภาพธรรมชาติมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วและใกล้สูญพันธุ์ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวมของว่านน้ำทองในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีดำเนินการวิจัย: วางแผนการทดลองแบบ 3 × 3 แฟกทอเรียลในแผนแบบการทดลองสุ่มสมบูรณ์ โดยปัจจัยแรก คือ ชนิดของสูตรอาหาร (Murashige and Skoog (MS), half-strength Murashige and Skoog (½ MS) และ Vacin and Went (VW)) และปัจจัยที่สอง คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (2, 3 และ 4 เดือน) โดยนำต้นในสภาพปลอดเชื้อมาตัดเป็นข้อยาว 1–1.2 เซนติเมตร เพื่อชักนำให้เกิดต้นใหม่

ผลการวิจัย: อาหารสูตร VW ทำให้ต้นเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงนาน 4 เดือน ($P < 0.01$) โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 0.68 กรัม ความยาวต้น 4.36 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 0.44 เซนติเมตร จำนวนใบ 1.85 ใบ ความกว้างใบ 0.64 เซนติเมตร และมีการเกิดราก 88.32 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารสูตร MS ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (70.22 EC_{50} g_{FW}/L) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (0.10 mg_{QE}/g_{FW}) และปริมาณสารฟีนอลิกรวม (0.82 mg_{GAE}/g_{FW}) สูงที่สุด ($P < 0.01$) การเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน ให้ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารฟีนอลิกรวม เช่นเดียวกับว่านน้ำทองที่ปลูกในสภาพธรรมชาติอายุ 2 ปี

สรุป: ผลการศึกษาข้างต้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และการเพิ่มจำนวนเพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ว่านน้ำทองในสภาพธรรมชาติ

คำสำคัญ: กล้วยไม้ว่านน้ำทอง, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฟลาโวนอยด์

ABSTRACT

Background and Objectives: The jewel orchid (*Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume) is a terrestrial orchid used as an ornamental plant. It has traditional medicinal properties in many countries and is used to alleviate symptoms of pulmonary tuberculosis, loss of appetite, decrease inflammation, nourish lungs, regulate body fluids, and treat neurasthenia. In its natural habitat, *L. discolor* declines rapidly and becomes endangered. This study aimed to determine a suitable medium and culture period for growth, antioxidant activity, total flavonoid contents, and total phenolic contents of *L. discolor in vitro* culture.

Methodology: The experimental design was 3 × 3 factorial in completely randomized design. The first factor was culture media (Murashige and Skoog (MS), half-strength Murashige and Skoog (½MS), and Vacin and Went (VW)), and the second factor was culture periods (2, 3, and 4 months). The plantlets were cut into 1–1.2 cm internode lengths and cultured on media.

Main Results: Plantlets cultured on VW medium for 4 months ($P < 0.01$) provided the best growth, which had fresh weight 0.68 g, shoot length 4.36 cm, shoot diameter 0.44 cm, leaf number 1.85 leaves, leaf width 0.64 cm, and root formation 88.32%. On the other hand, MS medium induced the highest ($P < 0.01$) antioxidant activity (70.22 EC_{50} g_{FW}/L), total flavonoid content (0.10 mg_{QE}/g_{FW}), and total phenolic contents (0.82 mg_{GAE}/g_{FW}). The *in vitro* plantlets for 3 months provided antioxidant activity, total flavonoid, and phenolic contents nearby with *L. discolor* grown in nature (2-year-old).

Conclusions: These study can be applied for medical uses and multiplication for jewel orchid germplasm conservation in nature.

Keywords: *Ludisia discolor*, tissue culture, antioxidant, flavonoid

บทนำ

ว่านน้ำทอง (*Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume) เป็นกล้วยไม้ดินที่มีเอกลักษณ์โดดเด่น โดยเฉพาะแผ่นใบที่มีลวดลายแปลกตาและสวยงามคล้ายกับอัญมณี (Jewel orchid) มีถิ่นกำเนิดในจีนตอนใต้และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย เวียดนาม ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย และพม่า (Shiau *et al*., 2005; Plants of the World Online, 2017) ลักษณะลำต้นทอดยาวตามพื้นดินยาวประมาณ 10–20 เซนติเมตร ในสภาพธรรมชาติพบบริเวณพื้นที่ร่มเงาและชื้น เป็นกล้วยไม้อายุหลายปี เจริญเติบโตช้า ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ซึ่งจากเมล็ดเป็นต้นสมบูรณ์ใช้เวลา 2–3 ปี (Hawkes, 1970; Shiau *et al*., 2005) มีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นไม้ประดับและประโยชน์ทางการแพทย์พื้นบ้านในหลายประเทศ เช่น จีน และไทย แพทย์แผนจีน (Traditional Chinese Medicine) ใช้ว่านน้ำทองเพื่อบรรเทาอาการไอเป็นเลือดที่เกิดจากวัณโรคปอด เบื่ออาหาร ช่วยลดการอักเสบ บำรุงปอด ระบบไหลเวียนโลหิต และระบบประสาท (Teoh, 2016) แพทย์พื้นบ้านของไทยใช้ลำต้นหรือหัวใต้ดิน (Rhizomes) แก้พิษจากแมลงกัดต่อย (Daduang and Uawonggul, 2008; Boonkorkaew *et al*., 2022) ทางภาคใต้ ใช้เป็นยาฝาดสมาน/สมานแผล และยาคุมธาตุ ช่วยย่อยอาหาร รักษาอาการท้องเสีย รักษาโรคบิด มูกเลือด และท้องอืดเฟ้อ (Boonkorkaew *et al*., 2022) นอกจากนี้ ที่ประเทศสิงคโปร์และมาเลเซีย มีการวางจำหน่ายในรูปสมุนไพรสดที่ร้านจำหน่ายยาสมุนไพรอีกด้วย (Teoh, 2016) ทั้งนี้ Wu *et al*. (2020) รายงานว่า ว่านน้ำทองมีกลุ่มสารหลายชนิด เช่น lactone glycoside flavonoids และ polysaccharides เช่นเดียวกับกล้วยไม้ดินสกุล *Anoectochilus* ซึ่งเป็น “King of Medicines” ของประเทศจีน ทำให้มีความต้องการใช้เพื่อประโยชน์เชิงการแพทย์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่จะนำต้นในสภาพธรรมชาติออกไปใช้ ส่งผลให้ในธรรมชาติมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วและมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (Poobathy *et al*., 2019; Liu *et al*., 2021) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นว่านน้ำทองให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาที่สั้นกว่าที่เติบโตในสภาพธรรมชาติ หรือการปลูกเลี้ยงในโรงเรือน รวมทั้งยังใช้ในการผลิตพืชเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อีกด้วย

การศึกษาเกี่ยวกับสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงว่านน้ำทองในสภาพปลอดเชื้อนั้นมีรายงานแตกต่างกัน เช่น Li *et al*. (2016) ทดลองใช้อาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ½MS และ ½ Hyponex สำหรับเพาะเมล็ดว่านน้ำทอง พบว่าอาหารสูตร ½ Hyponex เหมาะสำหรับการงอกมากที่สุด ส่วนสูตร MS ทำให้เมล็ดงอกน้อยที่สุด ในขณะที่ Poobathy *et al*. (2019) รายงานว่า ชิ้นส่วนข้อ (Nodal segment) หลังจากผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ เจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร ½MS ดัดแปลง (Shiau *et al*., 2005) ที่เติม activated charcoal 0.2 เปอร์เซ็นต์ กล้วยบด 8 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ thidiazuron 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบกับอาหารสูตร Knudson C (Knudson, 1946) สูตร Knudson C ดัดแปลง (Chou and Chang, 2004) และสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม tryptone 3 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (Chou and Chang, 2004) ส่วน Liu *et al*. (2021) รายงานว่า การใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ $CuSO_4$ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ AgCl 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ตาข้างจากส่วนของลำต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดเกิดต้นใหม่ดีที่สุด มีค่าเฉลี่ย 61.67, 83.67, 80.95 และ 87.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นรายงานในต่างประเทศ สำหรับการศึกษาในประเทศไทย Thanomchit (1998) รายงานว่า อาหารสูตร Vacin

and Went (1949) (VW) ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว และน้ำตาล 20 หรือ 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำและเพิ่มจำนวน protocorms like bodies (PLBs) จากชิ้นส่วนยอดและส่วนของลำต้นได้ ทั้งนี้ เมื่อต้องการทำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ ควรเติมน้ำมะพร้าว มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร และถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารสูตรดังกล่าวด้วย จะเห็นได้ว่าจากรายงานที่ผ่านมาการใช้สูตรอาหารส่วนใหญ่มีการดัดแปลง โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือวัตถุดิบจากธรรมชาติ ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าสูตรพื้นฐานทั่วไป

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นว่านน้ำทองในสภาพปลอดเชื้อนั้นยังไม่พบรายงาน แต่มีการศึกษาในกล้วยไม้ดินสกุล *Anoectochilus* พบว่า สูตรอาหาร ระยะการเจริญเติบโต และระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญอย่างมาก เช่น Du *et al.* (2008) เปรียบเทียบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Anoectochilus formosanus* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและจากการนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำต้นอ่อนมาเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 เดือน จากนั้น เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อการยืดยาวของต้นและชักนำให้ออกราก พบว่า ทุกระยะของการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อมีสารสำคัญชนิดต่าง ๆ (10 ชนิด) ไม่แตกต่างจากต้นในสภาพธรรมชาติ แต่มีปริมาณสารแตกต่างกัน ส่วน Wang *et al*. (2022) รายงานว่า kinsenoside ซึ่งเป็นสารสำคัญใน *Anoectochilus roxburghii* ที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน ในระยะเพิ่มจำนวน PLBs มีปริมาณสูงที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะลดลงเรื่อย ๆ เท่ากับสัปดาห์เริ่มต้น เช่นเดียวกับ astragalin ซึ่งเป็น flavonoids ชนิดหนึ่ง มีการสะสมในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของสูตรอาหารโดยเน้นการใช้สูตรพื้นฐานที่ไม่มีการดัดแปลง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟลาโวนอยด์ และปริมาณฟีนอลิกของว่านน้ำทองในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นและเป็นแนวทางสำหรับผลิตต้นว่านน้ำทองเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ต่อไป อีกทั้งยังเป็นการช่วยลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในสภาพธรรมชาติ

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืชทดลอง

ใช้ว่านน้ำทอง (*Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume) ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง โดยเติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร และ Gellan gum 2.5 กรัมต่อลิตร เลือกลำต้นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3–0.5 เซนติเมตร ตัดเป็นข้อความยาว 1–1.2 เซนติเมตร (Nodal segment) เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง

การศึกษาสูตรอาหาร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และการวางแผนการทดลอง

นำชิ้นส่วนข้อเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง โดยใช้สูตรอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร ได้แก่ 1) สูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) 2) สูตร ½MS ทั้ง 2 สูตร เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร Gellan gum 2.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.2 และ 3) สูตร Vacin and Went (1949) (VW) ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร Gellan gum 2.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.6 และใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน คือ 2, 3 และ 4 เดือน วางแผนการทดลองแบบ 3 × 3 แฟกทอเรียลในแผนแบบการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in completely

randomized design) รวม 9 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 12 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด (5 ชิ้นต่อขวด) วางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool day light ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 25 ± 2 องศาเซลเซียส ณ สวนกล้วยไม้ระพี สาคริก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หลังจากครบ 2, 3 และ 4 เดือน บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารฟีนอลิกรวม วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม R studio เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละปัจจัยโดยใช้วิธี Least Significant Difference และปัจจัยร่วมโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์

ข้อมูลการเจริญเติบโต

บันทึกการเจริญเติบโตของว่านน้ำทองหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2, 3 และ 4 เดือน ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด น้ำหนักสด (กรัม) จำนวนยอด ความยาวยอด (เซนติเมตร) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางยอด (เซนติเมตร) วัดส่วนที่ใหญ่ที่สุด เปอร์เซ็นต์การเกิดใบ ความกว้างและความยาวใบ (เซนติเมตร) โดยวัดจากใบที่ขยายขนาดเต็มที่ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก (เซนติเมตร)

การเตรียมสารสกัดจากว่านน้ำทอง

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดดัดแปลงวิธีจาก Ingkasupart *et al*. (2015) โดยนำว่านน้ำทองทั้งต้น (ราก ลำต้น และใบ) ซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2, 3 และ 4 เดือน มาบดให้ละเอียดในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้น เติมตัวทำละลายเมทานอล อัตราส่วนตัวถูกละลายต่อตัวทำละลาย 2:5 (w/v) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองตะกอนด้วยกระดาษ Whatman No.1 นำสารสกัด (เฉพาะส่วนใส) ไปใช้ในการทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยทดสอบทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity assay ดัดแปลงจากวิธีของ Re *et al*. (1999) เตรียมโดยใช้ 2,2'-azinobis-(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เจือจางด้วยน้ำ deionized water นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 735 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.02 นาโนเมตร จากนั้น นำสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 735 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (SPECTRO star Nano, Germany) และคำนวณ %ABTS radical scavenging activity) ดังสมการ

$$\%\text{ABTS radical scavenging activity} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุม} - \text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}} \times 100$$

เมื่อ ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุม คือ ค่าดูดกลืนแสง Blank (เมทานอล) + ABTS solution (Positive control) และค่าดูดกลืนแสงของชุดตัวอย่าง คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดที่นำมาทดสอบ

จากนั้นสร้างกราฟ %ABTS radical scavenging activity ต่อความเข้มข้นของสารละลายเพื่อหาค่า half maximal effective concentration (EC_{50}) โดยแทนค่า y = 50 ในสมการเส้นตรง

เพื่อหาค่า x ซึ่งเป็นค่าแสดงความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้ค่า %ABTS radical scavenging activity ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ และรายงานผลค่า EC_{50} ในหน่วย กรัมของน้ำหนักสดต่อลิตร (g_{FW}/L)

การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content)

ทดสอบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดด้วยวิธี aluminum chloride ($AlCl_3$) colorimetric method ดัดแปลงจาก Athipornchai and Jullapo (2018) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน โดยนำสารสกัดปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ aluminum chloride (w/v) ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/visible spectrophotometer (รุ่น T80, PG Instruments, China) ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซิติน ($y = 9.725x + 0.056$; $R^2 = 0.996$) ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสด (mg_{QE}/g_{FW})

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

ทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-ciocalteu method ดัดแปลงจาก Müller *et al*. (2010) นำสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-ciocalteu reagent 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) 7.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (SPECTRO star Nano, Germany) ที่ความยาวคลื่น 740 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ($y = 5.0827x + 0.0688$; $R^2 = 0.999$) ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสด (mg_{GAE}/g_{FW})

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเจริญเติบโต

สูตรอาหารและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงไม่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ($P > 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.8–100 เปอร์เซ็นต์ แต่สูตรอาหารมีผลต่อความสามารถของการเกิดเป็นยอดใหม่อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) โดยมีค่าสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS (87.6 เปอร์เซ็นต์) และ ½MS (83.2 เปอร์เซ็นต์) ส่วนสูตร VW มีค่าน้อยที่สุด (72.2 เปอร์เซ็นต์) สำหรับระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนั้นไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารและระยะเวลาการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่า มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้งเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและความสามารถของการเกิดเป็นยอดใหม่ (Table 1) สอดคล้องกับ Poobathy *et al.* (2019) ซึ่งรายงานว่า สูตรอาหารไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อ (Nodal segments) ของว่านน้ำทองหลังจากฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่าง ๆ แต่ทำให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตแตกต่างกัน

Table 1 Effects of medium types and culture periods (2, 3 and 4 months) on survival rate and shoot formation of *in vitro Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume

Factor	Survival rate (%)	Shoot formation (%)
Medium type (A)		
MS	99.4 ± 0.02	87.6 ± 0.14[a]
½MS	99.4 ± 0.02	83.2 ± 0.15[a]
VW	100.0 ± 0.00	72.2 ± 0.18[b]
Culture period (B)		
2	100.0 ± 0.00	78.2 ± 0.16
3	100.0 ± 0.00	81.6 ± 0.16
4	98.8 ± 0.38	83.2 ± 0.16
A	ns	**
B	ns	ns
A × B	ns	ns
CV (%)	2.73	23.37

Means in each column followed by different letters are significantly different by Least Significant Difference. ** Significant difference at P < 0.01, ns = not significant, MS = Murashige and Skoog, ½MS = half-strength Murashige and Skoog, VW = Vacin and Went, CV = coefficient of variation.

เมื่อติดตามจำนวนยอดที่เกิดขึ้นใน Table 2 พบว่า สูตรอาหาร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และอิทธิพลร่วมระหว่างสองปัจจัยดังกล่าวไม่ส่งผลต่อจำนวนยอด (P > 0.05) โดยมีค่าเฉลี่ย 0.83–0.93 ยอด ซึ่งต่างจากรายงานของ Liu *et al*. (2021) ที่พบว่า การใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับการเติม BA หรือ NAA หรือ $CuSO_4$ หรือ AgCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถเพิ่มปริมาณยอดของว่านน้ำทองได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเติม BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ $CuSO_4$ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ AgCl 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อเกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.45, 2.13, 1.73 และ 1.73 ยอด ตามลำดับ ทั้งนี้ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าอาหารทั้ง 3 สูตร ซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือสารอื่น ๆ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นที่มีตาติดอยู่เกิดเป็นยอดใหม่ได้ แต่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพียง 1 ยอดเท่านั้น ดังนั้น หากต้องการให้มีจำนวนยอดเพิ่มขึ้นจึงควรเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในสูตรอาหารด้วย

การติดตามการเจริญเติบโตด้านอื่น ๆ พบว่า สูตรอาหารมีผลทำให้น้ำหนักสดและการเจริญเติบโตของใบและรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P < 0.01) ส่วนความยาวและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยอาหารสูตร VW ทำให้ต้นมีน้ำหนักสดสูงที่สุด เฉลี่ย 0.51 กรัม ในขณะที่จำนวนใบและขนาดใบมีค่าสูงที่สุดในอาหารสูตร ½MS และ VW จากการสังเกต พบว่า ใบจะเริ่มเกิดขึ้นในช่วงเดือนที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้น ใบจะขยายขนาดให้เห็นได้ชัดเจนเมื่อเข้าสู่ช่วงเดือนที่ 4 โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตร ½MS และสูตร VW ส่วนสูตร MS ใบเกิดขึ้นน้อยมากและมีขนาดเล็กกว่า (Figures 1G–1I) สำหรับเปอร์เซ็นต์การเกิดรากและจำนวนราก พบว่า เกิดได้ดีและมีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS และ ½MS (Table 2) สอดคล้องกับ

Juras *et al.* (2019) ที่รายงานว่า การเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ *Catteleya xanthina* โดยใช้อาหารสูตรต่างกัน (Knudson C, VW, MS และ ½MS) ส่งผลต่อต้นอ่อนที่ได้ลักษณะการเจริญเติบโตทั้งลำต้นและรากที่แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาปัจจัยเรื่องระยะเวลาการเพาะเลี้ยง พบว่า มีผลต่อการเจริญเติบโตของว่านน้ำทองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยเมื่อเลี้ยงนาน 4 เดือน ส่งผลให้มีน้ำหนักสด จำนวนใบ ความกว้างและความยาวใบ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนและความยาวรากสูงที่สุด (Table 2; Figure 1)

สำหรับอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารและระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (Table 3) พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร VW นาน 4 เดือน ทำให้ว่านน้ำทองมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ทั้งน้ำหนักสด (0.68 กรัม) ความยาวต้น (4.36 เซนติเมตร) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (0.44 เซนติเมตร) จำนวนใบ (1.85 ใบ) ความกว้างใบ (0.64 เซนติเมตร) และการเกิดราก (88.32 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ การเลี้ยงด้วยอาหารสูตร ½MS นาน 4 เดือน (Figure 1) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากอาหารสูตร VW มีปริมาณและความเข้มข้นของธาตุอาหารเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของต้นว่านน้ำทอง อีกทั้งเป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ และสอดคล้องกับรายงานของ Li *et al*. (2016) และ Poobathy *et al.* (2019) ซึ่งรายงานว่า อาหารสูตร ½MS และ ½MS ดัดแปลง มีผลทำให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกและอัตราการเจริญเติบโตของว่านน้ำทองสูงกว่าสูตรอาหาร MS และ MS ดัดแปลง

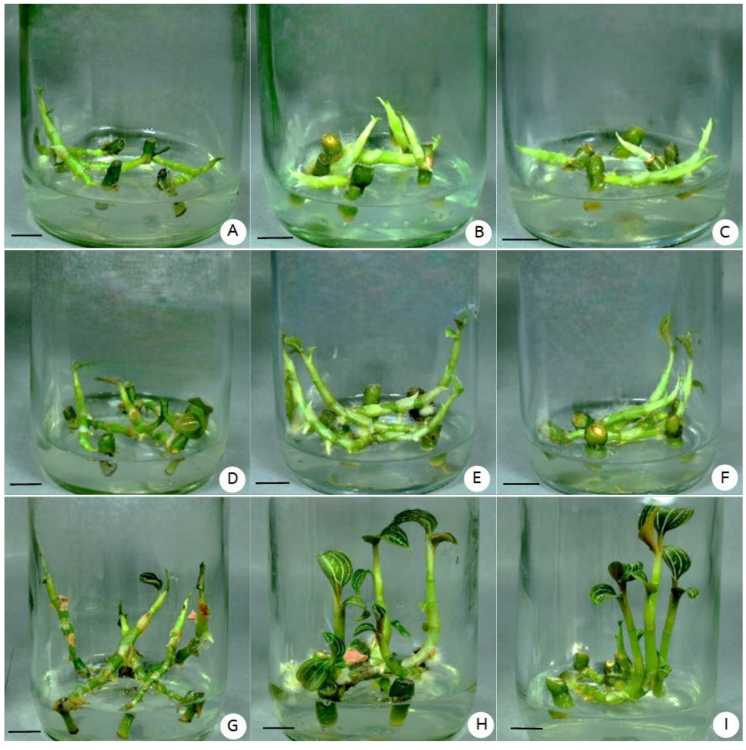

Figure 1 Effects of medium types and culture periods of *in vitro Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume: (A, D, G) nodal segment in MS medium, (B, E, H) nodal segment in ½ MS medium, (C, F, I) nodal segment in VW medium, (A, B, C) nodal segment after 2 months cultured, (D, E, F) nodal segment after 3 months cultured, (G, H, I) nodal segment after 4 months cultured. Scale bar = 1 cm.

Table 2 Effects of medium types and culture periods (2, 3 and 4 months) on growth parameters of *in vitro Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume

Factor	Fresh weight (g)	Shoot			Leaf			Root		
		Number	Length (cm)	Diameter (cm)	Number	Width (cm)	Length (cm)	Formation (%)	Number	Length (cm)
Medium (A)										
MS	0.34 ± 0.01^{b}	0.90 ± 0.04	3.24 ± 0.15	0.26 ± 0.00	0.23 ± 0.06^{b}	0.21 ± 0.04^{b}	0.29 ± 0.04^{b}	85.56 ± 0.13^{a}	3.05 ± 0.15^{a}	0.27 ± 0.01^{b}
½MS	0.35 ± 0.02^{b}	0.87 ± 0.03	3.05 ± 0.16	0.28 ± 0.02	0.69 ± 0.13^{a}	0.40 ± 0.05^{a}	0.59 ± 0.05^{a}	80.00 ± 0.16^{a}	2.57 ± 0.20^{a}	0.37 ± 0.01^{a}
VW	0.51 ± 0.03^{a}	0.87 ± 0.05	2.96 ± 0.21	0.31 ± 0.01	0.77 ± 0.15^{a}	0.39 ± 0.05^{a}	0.48 ± 0.05^{a}	62.22 ± 0.26^{b}	1.71 ± 0.25^{b}	0.27 ± 0.02^{b}
Culture period (B)										
2	0.28 ± 0.01^{c}	0.83 ± 0.04	1.95 ± 0.07^{c}	0.24 ± 0.00^{b}	0.07 ± 0.00^{b}	0.10 ± 0.03^{c}	0.12 ± 0.03^{c}	63.34 ± 0.24^{b}	1.50 ± 0.24^{c}	0.25 ± 0.02^{b}
3	0.40 ± 0.01^{b}	0.89 ± 0.04	3.10 ± 0.08^{b}	0.25 ± 0.00^{b}	0.34 ± 0.00^{b}	0.37 ± 0.05^{b}	0.48 ± 0.05^{b}	76.11 ± 0.17^{ab}	2.57 ± 0.17^{b}	0.33 ± 0.01^{a}
4	0.53 ± 0.03^{a}	0.93 ± 0.05	4.20 ± 0.11^{a}	0.35 ± 0.02^{a}	1.28 ± 0.15^{a}	0.53 ± 0.04^{a}	0.76 ± 0.04^{a}	88.34 ± 0.15^{a}	3.24 ± 0.15^{a}	0.32 ± 0.02^{a}
A	**	ns	ns	ns	**	**	**	**	**	**
B	**	ns	**	**	**	**	**	**	**	**
A x B	*	ns	*	**	*	*	*	**	ns	**
CV (%)	30.18	27.66	34.20	33.19	82.81	82.81	89.58	32.40	53.97	32.05

Means in each column followed by a different letter are significantly different by Least Significant Difference. * Significant difference at $P < 0.05$. ** Significant difference at $P < 0.01$. ns = not significant, MS = Murashige and Skoog, ½MS = half-strength Murashige and Skoog, VW = Vacin and Went, CV = coefficient of variation.

ส.ว.ท.

Table 3 Interaction effect between medium types and culture periods (2, 3 and 4 months) on growth parameters of *in vitro* *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume

Medium type	Culture period (months)	Fresh weight (g)	Shoot		Leaf		Root	
			Length (cm)	Diameter (cm)	Number	Width (cm)	Formation (%)	Length (cm)
MS	2	0.23 ± 0.01^{f}	2.17 ± 0.07^{cde}	0.24 ± 0.01^{c}	0.08 ± 0.04^{b}	0.12 ± 0.06^{cd}	80.00 ± 0.25^{ab}	0.24 ± 0.02^{d}
	3	0.36 ± 0.01^{cde}	3.44 ± 0.10^{ab}	0.26 ± 0.01^{c}	0.10 ± 0.05^{b}	0.18 ± 0.08^{cd}	88.32 ± 0.15^{a}	0.33 ± 0.01^{bc}
	4	0.44 ± 0.03^{bcd}	4.11 ± 0.19^{a}	0.27 ± 0.01^{c}	0.52 ± 0.15^{b}	0.33 ± 0.07^{bc}	88.32 ± 0.29^{a}	0.25 ± 0.01^{cd}
½MS	2	0.27 ± 0.01^{ef}	1.99 ± 0.70^{de}	0.25 ± 0.01^{c}	0.12 ± 0.07^{b}	0.14 ± 0.07^{cd}	73.32 ± 0.33^{ab}	0.28 ± 0.01^{cd}
	3	0.34 ± 0.01^{de}	3.03 ± 0.15^{bc}	0.24 ± 0.01^{c}	0.47 ± 0.12^{b}	0.44 ± 0.09^{ab}	78.32 ± 0.26^{ab}	0.39 ± 0.02^{ab}
	4	0.46 ± 0.01^{bc}	4.12 ± 0.15^{a}	0.35 ± 0.06^{b}	1.48 ± 0.22^{a}	0.63 ± 0.03^{a}	88.32 ± 0.23^{a}	0.42 ± 0.02^{a}
VW	2	0.35 ± 0.02^{de}	1.68 ± 0.17^{e}	0.25 ± 0.01^{c}	0.02 ± 0.02^{b}	0.05 ± 0.05^{d}	36.66 ± 0.38^{c}	0.25 ± 0.04^{cd}
	3	0.49 ± 0.02^{b}	2.82 ± 0.13^{bcd}	0.25 ± 0.01^{c}	0.45 ± 0.10^{b}	0.50 ± 0.07^{ab}	61.66 ± 0.34^{b}	0.28 ± 0.02^{cd}
	4	0.68 ± 0.05^{a}	4.36 ± 0.22^{a}	0.44 ± 0.02^{a}	1.85 ± 0.23^{a}	0.64 ± 0.04^{a}	88.32 ± 0.29^{a}	0.27 ± 0.02^{cd}
F-test		*	*	**	**	*	**	**
CV (%)		30.18	34.20	33.19	81.66	82.81	32.40	32.05

Means in each column followed by different letters are significantly different by Duncan's new multiple range test. * Significant difference at $P < 0.05$. ** Significant difference at $P < 0.01$. MS = Murashige and Skoog, ½MS = half-strength Murashige and Skoog, VW = Vacin and Went, CV = coefficient of variation.

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงผลเป็นค่าความเข้มข้นที่ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง (EC_{50}) เมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัย (Table 4) พบว่า สูตรอาหารมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของว่านน้ำทองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยต้นในอาหารสูตร MS มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุด (70.22 EC_{50} g_{FW}/L) รองลงมาคือสูตร VW (112.34 EC_{50} g_{FW}/L) และสูตร ½MS (118.52 EC_{50} g_{FW}/L) ตามลำดับ ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาปัจจัยเรื่องระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 หรือ 4 เดือน มีผลให้ต้นว่านน้ำทองมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเพียง 2 เดือน อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาใน PLBs ของ *Anoectochilus roxburghii* ที่รายงานว่า ปริมาณ kinsenoside ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน จะมีค่าสูงที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะลดลงเรื่อย ๆ เท่ากับสัปดาห์เริ่มต้น และในพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ เช่น พรมมิ ข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) และหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ที่รายงานว่า ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Boonyuen, 2014; Jirapongpattana *et al*., 2016; Autaijamsripon *et al*., 2017) ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะเป็นพืชคนละชนิดกัน รวมทั้งระยะการเจริญเติบโตที่นำไปใช้ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันด้วย

เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า การใช้อาหารสูตร MS ที่มีปริมาณและความเข้มข้นของธาตุอาหารที่สูง มีผลให้ต้นว่านน้ำทองมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุดในทุกระยะเวลาการเลี้ยง (64.45–81.09 EC_{50} g_{FW}/L) รองลงมา คือ สูตร ½MS และ VW เมื่อใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 3 หรือ 4 เดือน ส่วนสูตร ½MS เลี้ยงนาน 2 เดือน มีค่าน้อยที่สุด (151.01 EC_{50} g_{FW}/L) ดังแสดงใน Figure 2A สอดคล้องกับการศึกษาใน *Anoectochilus* ซึ่งรายงานว่า สูตรอาหาร ระยะการเจริญเติบโต และระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญ (Du *et al*., 2008; Wang *et al*., 2022) ทั้งนี้ สังเกตเห็นว่าว่านน้ำทองที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ½MS และ VW นาน 3–4 เดือน มีใบที่เห็นชัดเจน (Figures 1H–1I) ซึ่งภายในใบมีรงควัตถุที่สำคัญ คือ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ (Chaneva *et al*., 2022) โดยแคโรทีนอยด์เป็นกลุ่มสารสีซึ่งมีเฉดตั้งแต่เหลืองไปจนถึงสีแดง มีบทบาทสำคัญในด้านการต้านอนุมูลอิสระและป้องกันความเสียหายอันเกิดจากการได้รับแสงมากเกินไป (Trisonthi, 2017) ดังนั้น จึงส่งผลให้ว่านน้ำทองที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½MS และ VW ที่อายุ 3–4 เดือน มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่าที่อายุ 2 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 2A)

ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่า สูตรอาหารมีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของว่านน้ำทองอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) โดยต้นที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (0.10 mg_{QE}/g_{FW}) ในขณะที่สูตร VW และ ½MS มีค่าน้อยกว่า (0.07–0.08 mg_{QE}/g_{FW}) สำหรับระยะเวลาการเพาะเลี้ยง พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมีค่าสูงที่สุดในเดือนที่ 3 เท่ากับ 0.10 mg_{QE}/g_{FW} และมีค่าน้อยที่สุดในเดือนที่ 4 เท่ากับ 0.06 mg_{QE}/g_{FW} ($P < 0.01$) (Table 4) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารและระยะเวลาการเพาะเลี้ยง พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS นาน 3 เดือน มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด รองลงมาคือ สูตร ½MS นาน 3 เดือน ส่วนสูตร VW เพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน มีค่าน้อยที่สุด (Figure 2B) สอดคล้องกับ Cui *et al*. (2015) รายงานว่า โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrodium candidum* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS มีปริมาณ polysaccharide ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณ

ฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอื่น ๆ ได้แก่ B5 (Gamborg *et al*., 1968), KC (Knudson, 1946), VW (Vacin and Went, 1946), White (White, 1963), SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) และ N6 (Chu, 1978) และในพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ เช่น มะระขี้นก *Momordica charantia* L. (Agarwal and Kamal, 2007) และเชสต์เบอร์รี่ *Vitex agnus* castus L. (Skrzypczak-Pietraszek *et al*., 2018) ซึ่งพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในแคลลัสหรือยอดอ่อนขึ้นอยู่กับระยะเวลาเพาะเลี้ยงและระยะในการพัฒนาของพืช (Stage of plant development) ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากแต่ละระยะการเจริญเติบโตของพืช มีกระบวนการเมแทบอลิซึมและกระบวนการทางสรีรวิทยาที่ต่างกัน ส่งผลให้สารตั้งต้นและเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เปลี่ยนแปลงไปด้วย (Skrzypczak-Pietraszek *et al*., 2018; Feduraev *et al*., 2020)

Table 4 Effects of medium types and culture periods (2, 3 and 4 months) on antioxidant activity, total flavonoid content and total phenolic content of *in vitro Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) Blume

Factor	EC_{50} (g_{FW}/L)	Total flavonoid content (mg_{QE}/g_{FW})	Total phenolic content (mg_{GAE}/g_{FW})
Medium type (A)			
MS	70.22 ± 2.74^{a}	0.10 ± 0.01^{a}	0.82 ± 0.03^{a}
½MS	118.52 ± 8.34^{c}	0.08 ± 0.01^{b}	0.74 ± 0.03^{b}
VW	112.34 ± 5.26^{b}	0.07 ± 0.01^{b}	0.52 ± 0.03^{c}
Culture periods (B)			
2	121.38 ± 10.75^{B}	0.08 ± 0.00^{B}	0.60 ± 0.05^{C}
3	88.83 ± 6.10^{A}	0.10 ± 0.01^{A}	0.69 ± 0.03^{B}
4	90.86 ± 6.44^{A}	0.06 ± 0.00^{C}	0.80 ± 0.05^{A}
A	**	**	**
B	**	**	**
A × B	**	**	**
CV (%)	5.19	13.73	3.52

Means in each column followed by different letters are significantly different by Least Significant Difference. ** Significant difference at $P < 0.01$. EC_{50} = half maximal effective concentration, MS = Murashige and Skoog, ½MS = half-strength Murashige and Skoog, VW = Vacin and Went, CV = coefficient of variation.

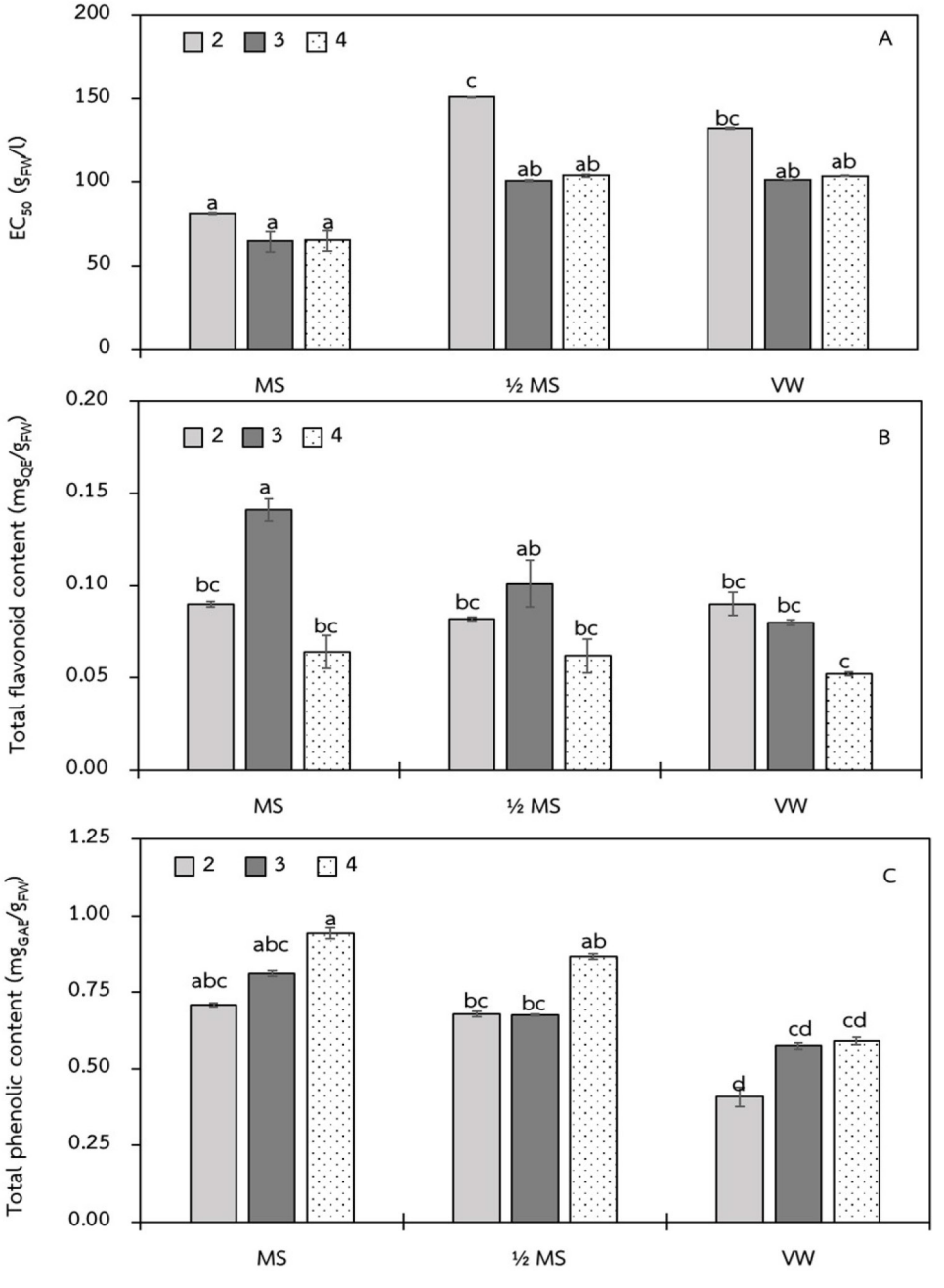

Figure 2 Interaction effect between medium types and culture periods (2, 3, and 4 months) on antioxidant activity (A), total flavonoid content (B) and total phenolic content (C) of *in vitro Ludisia discolor*. The different lowercase letters on the bar indicated a statistically significant difference according to Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่า สูตรอาหาร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และอิทธิพลร่วมระหว่างสองปัจจัยข้างต้นมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกรวมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) โดยการใช้อาหารสูตร MS และเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน ทำให้ว่านน้ำทองมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.94 mg_{GAE}/g_{FW} ในขณะที่อาหารสูตร VW มีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุดในทุกระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (0.40–0.59 mg_{GAE}/g_{FW}) ดังแสดงใน Table 4 และ Figure 2C ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในกล้วยไม้ *Dendrodium candidum* ที่รายงานว่า การใช้อาหารสูตร MS ทำให้โปรโตคอร์มมีปริมาณ polysaccharide ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่น ๆ (Cui *et al*., 2015)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์โดยภาพรวมระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของว่านน้ำทองที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ระยะเวลาต่างกัน พบว่า มีการตอบสนองไปในทิศทางเดียวกัน และมีค่าสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 3–4 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Maisuthisakul *et al.* (2007) ที่พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอล ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในพืชพื้นเมืองของไทย 26 ชนิด มีความสัมพันธ์กัน เนื่องจากฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลซึ่งอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีคุณสมบัติในการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Nachaikong *et al*., 2014) ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อกับต้นที่เลี้ยงในโรงเรือนพรางแสง อายุ 2 ปี ตรวจพบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวมเช่นเดียวกัน (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 61.92 EC_{50} g_{FW}/L ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 0.20 mg_{QE}/g_{FW} และปริมาณฟีนอลิกรวม 0.98 mg_{GAE}/g_{FW}, ไม่แสดงผลในงานวิจัย) ดังนั้น การเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งสำหรับการผลิตต้นว่านน้ำทองเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เนื่องจากใช้ระยะเวลาสั้นกว่าในธรรมชาติและมีข้อดี คือ สามารถควบคุมปริมาณและคุณภาพของสารสำคัญได้ รวมทั้งปลอดภัยจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วย สำหรับการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนนั้น การเลี้ยงด้วยอาหารสูตร VW หรือ ½MS ทำให้ต้นว่านน้ำทองมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ทั้งนี้ อาจมีการประยุกต์นำทั้งสองวิธีการมาใช้ร่วมกัน โดยเลี้ยงต้นว่านน้ำทองด้วยอาหารสูตร VW หรือ ½MS เพื่อชักนำการเจริญเติบโต หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตว่านน้ำทองเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์อย่างเต็มประสิทธิภาพ

สรุป

การนำต้นว่านน้ำทองในสภาพปลอดเชื้อมาตัดเป็นข้อเพื่อชักนำให้เกิดต้นใหม่ในอาหารกึ่งแข็งสูตร VW และเลี้ยงนาน 4 เดือน ทำให้ต้นมีการเจริญเติบโตดีที่สุด มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 0.68 กรัม ความยาวต้น 4.36 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 0.44 เซนติเมตร จำนวนใบ 1.85 ใบ ความกว้างใบ 0.64 เซนติเมตร และมีการเกิดราก 88.32 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ทำให้ต้นว่านน้ำทองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (70.22 EC_{50} g_{FW}/L) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (0.10 mg_{QE}/g_{FW}) และปริมาณสารฟีนอลิกรวม (0.82 mg_{GAE}/g_{FW}) สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

Agarwal, M. and R. Kamal. 2007. Studies on flavonoid production using *in vitro* cultures of *Momordica charantia* L. Indian J. Biotechnol. 6: 277–279.

Athipornchai, A. and N. Jullapo. 2018. Tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of orchid (*Dendrobium* spp.). S. Afr. J. Bot. 119: 188–192. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.003.

Autaijamsripon, J., Y. Jirakiattikul and P. Rithichai. 2017. Effect of culture periods on secondary metabolite contents and antioxidant activity of *in vitro Bacopa monnieri* shoots. TSTJ. 25(3): 443–452. (in Thai)

Boonkorkaew, P., P. Triboun, S. Kengtong and R. Suchato. 2022. Medicinal Plant Information for Elderly Health Treatment According to the National List of Essential Medicines (NLEM). Final Report. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. (in Thai)

Boonyuen, T. 2014. Effect of Jasmonic Acid and Salicylic Acid on Dioscorealide B in Shoot Culture of *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill. MS Thesis, Thammasat University, Pathum Thani. (in Thai)

Chaneva, G., A. Tomov, M. Paunov, V. Hristova, V. Ganeva, N. Mihaylova, S. Anev, N. Krumov, Z. Yordanova, B. Tsenov, V. Vassileva, G. Bonchev and M. Zhiponova. 2022. Jewel orchid's biology and physiological response to aquaponic water as a potential fertilizer. Plants (Basel). 11(22): 3181. https://doi.org/10.3390/plants11223181.

Chou, L.C. and D.C.N. Chang. 2004. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and their F_1 hybrids. Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 143–147. https://doi.org/10.7016/BBAS.200404.0143.

Chu, C.C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops, pp. 45–50. *In* Proc. Symposium on Plant Tissue Culture, 25–30 May 1978.

Cui, H.Y., H.N. Murthy, S.H. Moh, Y.Y. Cui and K.Y. Paek. 2015. Establishment of protocorm suspension cultures of *Dendrobium candidum* for the production of bioactive compounds. Hortic. Environ. Biotechnol. 56(1): 114–122. https://doi.org/10.1007/s13580-015-0082-5.

Daduang, S. and N. Uawonggul. 2008. Herbal therapies of snake and insect bites in Thailand, pp. 814–822. *In* R.R. Watson and V.R. Preedy, eds. Botanicals Medicine in Clinical Practice. CAB International, London, UK.

Du, X.M., N. Irino, N. Furusho, J. Hayashi and Y. Shoyama. 2008. Pharmacologically active compounds in the *Anoectochilus* and *Goodyera* species. J. Nat. Med. 62(2): 132–148. https://doi.org/10.1007/s11418-007-0169-0.

Feduraev, P., L. Skrypnik, A. Riabova, A. Pungin, E. Tokupova, P. Maslennikov and G. Chupakhina. 2020. Phenylalanine and tyrosine as exogenous precursors of wheat (*Triticum aestivum* L.) secondary metabolism through PAL-associated pathways. Plants (Basel). 9(4): 476. https://doi.org/10.3390/plants9040476.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50(1): 151–158. https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5.

Hawkes, A.D. 1970. Encyclopedia of Cultivated Orchids: An Illustrated, Descriptive Manual of the Members of the Orchidaceae Currently in Cultivation. Faber and Faber Limited, London, UK.

Ingkasupart, P., B. Manochai, W.T. Song and J.H. Hong. 2015. Antioxidant activities and lutein content of 11 marigold cultivars (*Tagetes* spp.) grown in Thailand. Food Sci. Technol., Campinas. 35(2): 380–385. https://doi.org/10.1590/1678-457X.6663.

Jirapongpattana, R., Y. Jirakiattikul, P. Rithichai, S. Ruangnoo and A. Itharat. 2016. Secondary metabolite contents of *in vitro* Hua-Khao-Yen (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) shoots at different culture periods. TSTJ. 24(1): 40–48. (in Thai)

Juras, M.C.R., J. Jorge, R. Pescador, W.D.M. Ferreira, V. Tamaki and R.M. Suzuki. 2019. *In vitro* culture and acclimatization of *Cattleya xanthina* (Orchidaceae), an endangered orchid of the Brazilian Atlantic Rainforest. Rodriguésia. 70: e01422017. https://doi.org/10.1590/2175-7860201970014.

Knudson, L. 1946. A nutrient for germination of orchid seeds. Am. Orchid Soc. Bull. 15: 214–217.

Li, H., Y. Liu, G. Chen and Z. Yang. 2016. Aseptic seedling and rapid propagation of *Ludisia discolor*. Agric. Sci. Technol. 17(11): 2473–2476.

Liu, Y., X. Li, J. Chen, Y. Xue and Y. Zhu. 2021. Effects of different factors on adventitious bud induction from stem explants of *Ludisia discolor*. E3S Web of Conferences. 245: 03024. https://doi.org/10.1051/e3sconf/202124503024.

Maisuthisakul, P., M. Suttajit and R. Pongsawatmanit. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem. 100(4): 1409–1418. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.032.

Müller, L., S. Gnoyke, A.M. Popken and V. Böhm. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT. 43(6): 992–999. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.004.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15(3): 473–497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Nachaikong, T., A. Wanyawa, K. Kaoian, J. Kongsooknirundorn, S. Supathirasakul, M. Wongnava and N. Bumrungwong. 2014. Antioxidant and iron-chelating activity of some Thai medicinal plants. KKU Sci. J. 42(1): 149-158. (in Thai)

Plants of the World Online. 2017. *Ludisia discolor* (Ker Gawl.) Blume. Available Source: https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:641773–1, December 8, 2021.

Poobathy, R., R. Zakaria, V. Murugaiyah and S. Subramaniam. 2019. Surface sterilization and micropropagation of *Ludisia discolor*. Biocatal. Agric. Biotechnol. 22: 101380. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101380.

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26(9–10): 1231–1237. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledons and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50(1): 199–204. https://doi.org/10.1139/b72-026.

Shiau, Y.J., S.M. Nalawade, C.N. Hsai and H.S. Tsay. 2005. Propagation of *Haemaria discolor* via *in vitro* seed germination. Biol Plant. 49: 341–346. https://doi.org/10.1007/s10535-005-0005-x.

Skrzypczak-Pietraszek, E., K. Piska and J. Pietraszek. 2018. Enhanced production of the pharmaceutically important polyphenolic compounds in *Vitex agnus castus* L. shoot cultures by precursor feeding strategy. Eng. Life Sci. 18(5): 287–297. https://doi.org/10.1002%2Felsc.201800003.

Teoh, E.S. 2016. Medicinal Orchids of Asia. Springer International Publishing, Switzerland. 752 pp.

Thanomchit, K. 1998. Micropropagation of *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Trisonthi, P. 2017. Carotenoids: structure and antioxidant capacity relationship. Food. 47(2): 29–36. (in Thai)

Vacin, E.F. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110(4): 605–613.

Wang, H., X. Chen, X. Yan, Z. Xu, Q. Shao, X. Wu, L. Tou, L. Fang, M. Wei and H. Wang. 2022. Induction, proliferation, regeneration and kinsenoside and flavonoid content analysis of the *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl protocorm-like body. Plants. 11(19): 2465. https://doi.org/10.3390/plants11192465.

White, P.R. 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells. 2nd edition. Ronald Press, New York, USA.

Wu, Y.B., M.C. Peng, C. Zhang, J.G. Wu, B.Z. Ye, J. Yi, J.Z. Wu and C.J. Zheng. 2020. Quantitative determination of multi-class bioactive constituents for quality assessment of ten *Anoectochilus*, four *Goodyera* and one *Ludisia* species in China. Chin. Herb. Med. 12(4): 430–439. https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.07.002.