



ความสัมพันธ์ของกายวิภาคศาสตร์บางประการของพรอมมิ
(*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ
Correlation Investigation of Some Anatomical Characters
and Main Bioactive Compounds of Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.)

ชัยชาญ มณีรัตน์รุ่งโรจน์¹, ชนพิชา ศรีวันทา², เนริสา คุณประทุม¹ และ วรศิริกุลญา ธารธิมา^{2*}

Chaichan Maneerattanarongroj¹, Chonpicha Sriwantha², Narisa Kunpratun and Worasitikulya Taratima^{2*}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, ประเทศไทย

²สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ประเทศไทย

¹Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand

Received : 3 March 2023

Revised : 20 August 2023

Accepted : 26 August 2023

บทคัดย่อ

พรอมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) เป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญเนื่องจากมีสารซาโปนินในกลุ่มบาโคไซด์ พรอมมิ มีสรรพคุณทางยาช่วยในการบำรุงสมองและเสริมความจำ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์เชิงตัวเลขของลำต้นและใบของพรอมมิเพื่อวิเคราะห์ร่วมกับปริมาณสารบาโคไซด์บางชนิด ทำการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของพรอมมิโดยการตัดตามขวางลำต้นและใบด้วยมือเปล่า (Free hand section) เลือกศึกษาลำต้นที่ตำแหน่งที่ 3, 9 และ 15 เซนติเมตรจากปลายยอด และศึกษาเนื้อเยื่อชั้นผิวของใบด้วยวิธีการลอกผิว (Peeling technique) โดยใช้ใบที่บริเวณข้อที่ 2-3 จากปลายยอด วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะกายวิภาคของลำต้นและใบโดยรวม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นพรอมมิที่ตำแหน่ง 9 เซนติเมตรจากปลายยอด ร่วมกับปริมาณ Bacoside A3 (BacA3), Bacopaside II (BacII) Bacopaside X (BacX), Bacopasaponin C (BacC) และ Total bacoside (TBA) ผลการศึกษาพบว่าความหนาของคอร์เทกซ์ในลำต้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นและใบเป็นส่วนใหญ่ ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นพรอมมิที่ตำแหน่ง 9 เซนติเมตรจากปลายยอด และปริมาณ BacA3, BacII, BacX, BacC และ TBA พบว่าลักษณะกายวิภาคของลำต้นบางลักษณะมีความสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณสารออกฤทธิ์เหล่านี้ได้แก่ ความหนาของเนื้อเยื่อชั้นผิว ความหนาของเอนโดเดอริมิส ความหนาของผนังเซลล์ เวสเซล เส้นผ่านศูนย์กลางของไส้ไม้ด้านกว้างและยาว ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินปริมาณสารออกฤทธิ์ดังกล่าวในเบื้องต้นจากลำต้นร่วมกับลักษณะอื่นได้

คำสำคัญ : กายวิภาคของลำต้น ; กายวิภาคของใบ ; บาโคไซด์ ; พรอมมิ



Abstract

Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) is an important medicinal plant with active principle of saponins as bacoside group. Brahmi contains therapeutic qualities that can assist to energize the mind and improve memory. Aim of this study is to determine the stem and leaf numerical anatomy of Brahmi with correlation analysis between some anatomical characteristics and bacosides content. Stem and leaf anatomy were studied by transverse section using free hand technique. The leaves and stems were selected at 3, 9 and 15 cm from the shoot apex. Leaves at the 2nd-3rd node position from shoot apex were selected for leaf epidermal investigation using the peeling technique. Correlation between all stem and leaf anatomical traits was calculated. Stem anatomical characters of the 9 cm from apex position was correlation analyzed with bacoside content, including Bacoside A3 (BacA3), Bacopaside II (BacII) Bacopaside X (BacX), Bacopasaponin C (BacC) and Total bacoside (TBA). The results showed that the cortex thickness of stem was mostly positively correlated with other stem and leaf anatomical characteristics. Correlation analysis between the 9 cm position of stem anatomy with bacoside contents revealed that some anatomical characters were positively correlated with bacoside content, including epidermal thickness, endodermal thickness, vessel's cell wall thickness, pith diameter both width and length side. The data obtained in this study can be applied in preliminary estimation of the active compounds from Brahmi stems.

Keywords : bacoside ; Brahmi ; leaf anatomy; stem anatomy

บทนำ

พรมมิ หรือ *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. เป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญของวงศ์ Plantaginaceae เป็นพืชล้มลุกที่อยู่ในเขตร้อนที่มักเติบโตริมฝั่งแม่น้ำและทะเลสาบ พบในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนทั่วโลก ซึ่งรวมถึงอินเดีย ศรีลังกา เนปาล ใต้หวัน จีน ปากีสถาน และเวียดนาม (Anju *et al.*, 2017; Sanyal *et al.*, 2022) เป็นพืชล้มลุกอายุปีเดียวที่มีลำต้นเรียวยาว มีลักษณะทอดเลื้อย และสามารถปรับตัวให้เติบโตได้ทั้งบนบกและใต้น้ำ (Sudhakaran, 2020) พรมมิได้รับการพิสูจน์ว่ามีความสำคัญในเชิงพฤกษศาสตร์ (botany) พาณิชย (commerce) เภสัชศาสตร์ชาติพันธุ์ (ethnopharmacology) พฤษเคมี (phytochemical) เภสัชวิทยา (pharmacology) และพิษวิทยา (toxicology) (Tamboli *et al.*, 2018) พรมมิถูกนำมาใช้ในระบบยาแผนโบราณเพื่อกระตุ้นความจำ เนื่องจากมีสารซาโปนินที่มีลักษณะเฉพาะเรียกว่า บาโคไซด์ (bacosides) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการประสานการทำงานของเส้นประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Murthy *et al.*, 2006) ทำให้มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ด้านการอักเสบ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย (Nemetchek *et al.*, 2017; Martínez-García *et al.*, 2023)

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าพรมมิมีสรรพคุณในการบำรุงสมอง ช่วยเสริมความจำ ป้องกันเซลล์ประสาท ด้านการซึมเศร้า และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีองค์ประกอบ secondary metabolites หลายกลุ่ม ได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloid) ไกลโคไซด์ (glycoside) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และซาโปนิน (saponin) จากการที่พรมมิเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณมากทำให้เป็นที่ต้องการทางการแพทย์ (Autajamsriporn *et al.*, 2018) บาโคไซด์เป็นกลุ่มของสารประกอบไกลโคไซด์ของ jujubogenin หรือ pseudojujubogenin ประกอบด้วยสารสำคัญ 12 ชนิด ซึ่งชนิดที่สำคัญคือ bacosides A3, bacopaside II, bacopaside I, bacopaside X, bacopasaponin C, bacopaside N2 และส่วนประกอบย่อยคือ bacopasaponin F, bacopasaponin E, bacopaside N1 bacopaside III, bacopaside IV และ bacopaside V นอกจากนี้ยังพบสารฟลาโวนอยด์ทั่วไป 2 ชนิด คือ luteolin และ apigenin ใน *B. monnieri* ด้วย (Lal & Baraik, 2019)

จากรายงานพบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ เช่น ชนิดของพืช ระยะการเจริญเติบโตสภาพแวดล้อมของภูมิภาค สายพันธุ์ ระยะเวลาต่าง ๆ ของพืช (ยอด ลำต้น ใบ และราก) (Naik & Al-Khayri, 2016) สำหรับส่วนยอดของพรมมิพบสาร saponin สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับลำต้น และราก (Phrompittayarat *et al.*, 2011) ในขณะที่ใบของพรมมิพบสาร bacoside A (22%) มากกว่าส่วนลำต้น (18%) (Gubbannavar *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าพรมมิที่มีอายุ 1-4 เดือน จะมีการสะสมสาร saponin ในรอบปีสูงสุดในช่วงฤดูร้อน (Phrompittayarat *et al.*, 2011) จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสกุลพรมมิอีกชนิดคือ *Bacopa floribunda* (R.Br.) Wettst. พบปริมาณของ bacoside A ในใบ 26% และในลำต้น 27% ซึ่งมากกว่า bacoside A ที่พบในใบ และลำต้นของ *B. monnieri* ที่พบในปริมาณ 22% และ 18% ตามลำดับ (Gubbannavar *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาหรือประเมินลักษณะต่างๆ ของพรมมิที่สัมพันธ์กับปริมาณสารออกฤทธิ์ในกลุ่มบาโคไซด์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์หรือปรับปรุงระบบการปลูกในอนาคต ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์เชิงตัวเลขของ



ลำต้นและใบของพรมมิเพื่อวิเคราะห์ร่วมกับปริมาณสารกลุ่มบาโคไซด์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการประเมินประสิทธิภาพการปลูกเพื่อใช้ในการผลิตพรมมิเพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิเคราะห์สาร Bacoside A ด้วยเทคนิค HPLC

นำยอดพรมมิแห้งที่ผ่านการอบด้วยตู้อบลมร้อน (45 องศาเซลเซียส) ปริมาณ 0.1 กรัม มาบดและสกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนใสปริมาณ 250 ไมโครลิตร มาปรับปริมาตรเป็น 1000 ไมโครลิตร และกรองด้วย nylon syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์สาร Bacoside A ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งปริมาณสารที่ฉีดคือ 10 ไมโครลิตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ 0.2% Phosphoric acid : Acetonitrile (65:35) ตรวจวัดสัญญาณด้วยยูวี ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร (Phrompittayarat *et al.*, 2011)

การศึกษาทางกายวิภาคศาสตร์

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของใบและลำต้นพรมมิอายุ 6 สัปดาห์ ที่ปลูกในกระถางดินเผาที่มีวัสดุปลูก คือ ดิน ททรายและแกลบดำ และมีน้ำขังจากหน้าดินประมาณ 2-3 เซนติเมตร โดยการตัดตามขวางด้วยวิธี Free hand section เลือกศึกษาใบและลำต้นที่ตำแหน่งที่ 3, 9 และ 15 เซนติเมตรจากปลายยอด จำนวน 5 กิ่ง ศึกษาลักษณะกายวิภาคของใบโดยการตัดตามขวางใบที่บริเวณเส้นกลางใบ แผ่นใบ และขอบใบ รวมทั้งศึกษาเนื้อเยื่อชั้นผิวใบทั้งด้านไกลแกน (abaxial epidermis) และด้านใกล้แกน (adaxial epidermis) ด้วยวิธีการลอกผิว (Peeling technique) เพื่อศึกษาความหนาแน่นและลักษณะของปากใบ โดยใช้ใบที่ตำแหน่งบริเวณข้อที่ 2-3 จากปลายยอด จำนวน 5 ใบ

ทำการย้อมตัวอย่างใบและลำต้นที่ได้จากการตัดตามขวางด้วยสีซาฟรานิน โอ 1% (Safranin O) ที่ละลายในเอธิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 2 นาที ส่วนผิวใบย้อมด้วยสีเดียวกันเป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที หลังจากนั้นจัดทำตัวอย่างที่ย้อมสีเสร็จแล้วเป็นสไลด์ถาวรโดยการดึงน้ำออกจากตัวอย่างพืชด้วยสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 10%, 25%, 50%, 75%, 95% และ 100% ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที และทำให้เนื้อเยื่อหดใสโดยการแช่ในสารละลาย 100% Alcohol : Xylene ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที และแช่ใน 100% Xylene เวลา 45 วินาทีก่อนทำการฝังสไลด์โดย DePeX (Taratima *et al.*, 2019) ตรวจสอบตัวอย่างพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ (Olympus CH 30) Zeiss 540214000004 โดยใช้โปรแกรม MB2004 configuration AxioVision program ทำการวัดค่าต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม ImageJ บันทึกลักษณะทางกายวิภาคทั้งหมด 32 ลักษณะ โดยแบ่งเป็นกายวิภาคของลำต้น 13 ลักษณะ และกายวิภาคของใบ 19 ลักษณะ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บันทึกข้อมูลอย่างน้อย 5 ซ้ำในแต่ละบริเวณที่ศึกษา ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียว (One-Way Analysis of variance; One-Way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูล โดยวิธี Duncan's multiple range test, (DMRT) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation) ของลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นกับปริมาณสาร

ออกฤทธิ์ที่สำคัญซึ่งกลุ่มวิจัยได้รายงานไปก่อนหน้านี้แล้ว (Maneepley *et al.*, 2018) ด้วยโปรแกรม SPSS วัดดัชนีความหนาแน่นของปากใบตามสมการที่ 1 ซึ่งดัดแปลงจาก Ceulemans *et al.* (1995)

$$\text{ดัชนีปากใบ (Stomatal index)} = \frac{\text{จำนวนปากใบต่อตารางมิลลิเมตร}}{(\text{จำนวนปากใบต่อตารางมิลลิเมตร} + \text{จำนวนเนื้อเยื่อผิวทั้งหมดต่อตารางมิลลิเมตร})} \times 100 \quad (1)$$

ผลการวิจัย

กายวิภาคของลำต้น

จากการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ลำต้นของพรมมิ พบว่าลำต้นมีรูปร่างที่ค่อนข้างเกือบวงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.08-2.21 มิลลิเมตร ซึ่งลำต้นบริเวณที่อยู่ใกล้โคนต้นมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณใกล้ยอด (Figure 1) ด้านนอกสุดของลำต้นคือเนื้อเยื่อชั้นผิวที่มีชั้นเดียวถูกปกคลุมด้วยคิวทิเคิลชั้นบาง ๆ มีขนาดของเซลล์ไม่เท่ากัน ซึ่งมีรูปร่างเป็นเซลล์หลายเหลี่ยมที่เรียงตัวกันแน่น ถัดเข้าไปคือคอร์เทกซ์ เป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อมากที่สุด ประกอบด้วยเซลล์แองเจคิมาที่มีรูปร่างแตกต่างกัน เช่น กลม หรือหลายเหลี่ยม โดยโครงสร้างของแองเจคิมามีลักษณะเป็นแบบคล้ายรังผึ้ง (honey-comb like) ช่องอากาศมีจำนวนมากและขนาดแตกต่างกัน มักพบเม็ดแป้งที่บริเวณใกล้ผนังเซลล์แองเจคิมา ถัดเข้าไปคือเอ็นโดเดอริสมีสมีชั้นเดียว ล้อมรอบมัดท่อลำเลียงที่ประกอบด้วยโฟลเอ็มและไซเล็ม ลักษณะของมัดท่อลำเลียงเป็นแบบ continuous vascular ring ซึ่งประกอบด้วยโฟลเอ็มบริเวณแคบ ๆ ที่ด้านนอก และไซเล็มที่อยู่ด้านในติดกับไส้ไม้ (pith) (Figure 1)

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นที่ตำแหน่ง 3, 9 และ 15 เซนติเมตรจากปลายยอดมีรูปแบบเดียวกัน แต่มีขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับ ซึ่งลักษณะทางกายวิภาคส่วนใหญ่ของลำต้นที่ตำแหน่ง 15 เซนติเมตรจากปลายยอดมีขนาดใหญ่ที่สุด ยกเว้นเส้นผ่านศูนย์กลางของพืธ (ด้านกว้าง) (pith diameter) และความหนาของโฟลเอ็ม (phloem thickness) ที่พบว่า ลำต้นที่ตำแหน่ง 9 เซนติเมตรจากปลายยอดมีขนาดใหญ่มากที่สุด (Table 1)

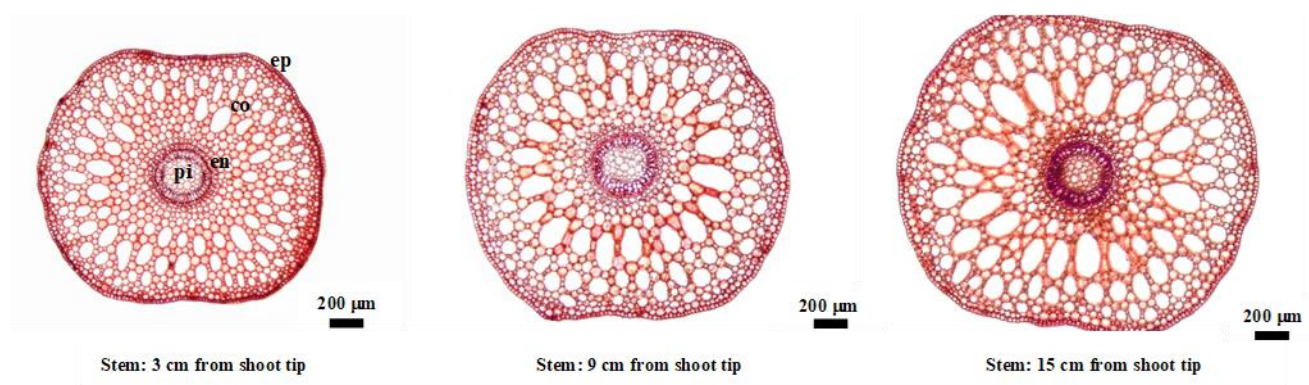


Figure 1 Stem anatomy of the 3, 9 and 15 cm from the shoot apex. (ep = epidermis, co = cortex, pi = pith)

Table 1 Anatomical traits of Brahmi stem at different location.

Characters	size ($\bar{X} \pm SD$)		
	Position from the shoot apex (cm)		
	3	9	15
Epidermal thickness (μm)	33.28±0.88 ^a	36.24±1.90 ^a	40.99±4.99 ^a
Cortex thickness (μm)	635.19±71.89 ^b	902.18±11.52 ^a	906.98±42.50 ^a
Vertical pith diameter (μm)	183.86±47.84 ^b	260.55±20.66 ^a	257.14±21.11 ^a
Horizontal pith diameter (μm)	209.49±49.49 ^b	291.40±16.13 ^a	303.36±7.71 ^a
Endodermis thickness (μm)	29.62±3.40 ^a	30.15±0.71 ^a	35.70±9.03 ^a
Vascular tissue thickness (μm)	66.83±7.20 ^b	89.55±5.41 ^a	98.60±9.87 ^a
Xylem thickness (μm)	34.05±4.73 ^b	51.36±0.86 ^a	59.27±5.13 ^a
Phloem thickness (μm)	19.79±2.43 ^b	27.37±2.20 ^a	22.43±2.21 ^{ab}
Vessel's cell wall thickness (μm)	1.93±0.20 ^a	2.43±0.21 ^a	2.61±0.12 ^a
Total cell surface area (mm^2)	2.58±0.78 ^b	4.37±0.12 ^a	4.73±0.86 ^a
Airspace area (mm^2)	0.54±0.08 ^a	0.99±0.21 ^a	1.22±0.29 ^a
Vertical stem diameter (mm)	1.71±0.23 ^a	2.22±0.21 ^a	2.32±0.30 ^a
Horizontal stem diameter (mm)	1.75±0.29 ^a	2.41±0.08 ^a	2.46±0.21 ^a

Mean±SE values followed by different superscripts in the same row are significantly different according to ANOVA and Duncan's Multiple Range Test ($p < 0.05$).

กายวิภาคของใบ

จากการตัดตามขวางแผ่นใบ พบว่าที่แผ่นใบมีความหนาประมาณ 388.70 ± 31.66 ไมโครเมตร เส้นกลางใบมีความหนาประมาณ 460.52 ± 5.49 ไมโครเมตร (Table 2) ซึ่งด้านนอกสุดคือเนื้อเยื่อชั้นผิวมีรูปร่างหลายเหลี่ยม ขนาดของเซลล์ไม่เท่ากัน ปกคลุมด้วยคิวทิเคิล โดยเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านใกล้แกน (adaxial epidermis) มีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านไกลแกน (abaxial epidermis) (Figure 2A) ถัดมาเป็นเนื้อเยื่อมีไซฟิลล์ที่ไม่สามารถแยกเป็นแพลลิสมาไซฟิลล์และสปองจีมีไซฟิลล์ได้อย่างชัดเจน และพบเมดัลแบงกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อมีไซฟิลล์ ในส่วนของมัดท่อลำเลียงเป็นแบบ collateral vascular bundle (Figure 2B)

จากการลอกผิวใบที่บริเวณด้านไกลแกน พบเนื้อเยื่อชั้นผิว ปากใบ (Figure 2C) และต่อมไทรโคม (Figure 2D) โดยเนื้อเยื่อชั้นผิวมีรูปร่างคล้ายจิ๊กซอว์ (jigsaw-like shaped) ผนังเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวเว้าตื้น (sinuous cell wall) ใบพบปากใบทั้งด้านบนและด้านล่าง (amphistomatic leaf) ปากใบส่วนใหญ่เป็นแบบอะนอมอไซติก (Anomocytic: พบเฉพาะเซลล์คุม

ไม่พบเซลล์ข้างเซลล์คุม) (Figure 2C) และอาจพบแบบอะนิโซไซติก (Anisocytic: มีเซลล์ข้างเซลล์คุมขนาดไม่เท่ากัน) ได้ ปากใบมีขนาดกว้างประมาณ 10.02 ± 0.29 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 18.37 ± 1.05 ไมโครเมตร มีความหนาแน่นต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตรประมาณ 69.60 ± 8.21 ชิ้น ส่วนไฮโครมเป็นแบบต่อม (glandular trichome) ประกอบไปด้วย 8 เซลล์ (Figure 2D) มีความหนาแน่นประมาณ 6.80 ± 0.60 ชิ้นต่อ 1 ตารางมิลลิเมตร (Table 2)

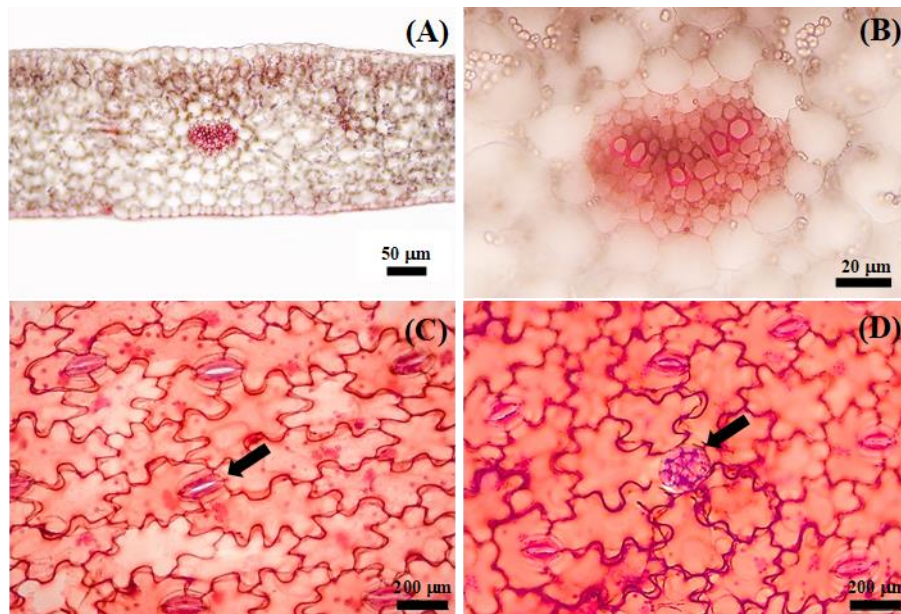


Figure 2 Brahmi leaf anatomy displaying transverse section (A), vascular tissue (B), epidermis with stomata (arrow) and glandular trichome (arrow) (D).

จากการวิเคราะห์สัณฐานสัมพันธ์ของลักษณะกายวิภาคของลำต้นและใบโดยรวมทั้งหมด 13 ลักษณะ พบว่าความหนาของคอร์เทกซ์ (Cortex) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับลักษณะต่าง ๆ เป็นส่วนใหญ่ เช่น พื้นที่หน้าตัดของเซลล์ทั้งหมด (SA-TT) พื้นที่ช่องว่างระหว่างเซลล์ (SA-A) และความหนาของเนื้อเยื่อเอนโดเดอริส (Endo) แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความหนาของแผ่นใบ (LT) ความหนาของมีโซฟิลล์บริเวณเส้นกลางใบ (MMT) และความหนาของชั้นมีโซฟิลล์บริเวณแผ่นใบ (LMT) หากพิจารณาความสัมพันธ์ของความหนาของแผ่นใบ (LT) กับลักษณะอื่นๆ พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความหนาของชั้นมีโซฟิลล์บริเวณแผ่นใบ (LMT) และความหนาของเนื้อเยื่อลำเลียงในแนวอน (VTH) ความหนาของผนังเซลล์เวสเซล (Ve-CW), SA-TT และ MMT แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ ความหนาแน่นของปากใบ (STD) และความหนาแน่นของต่อมไฮโครม (TRD) ซึ่งความหนาแน่นของปากใบ (STD) มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความหนาแน่นของต่อมไฮโครม (TRD) (Figure 3)



Table 2 Assessment of anatomical features of Brahmi leaf

Characters	Size ($\bar{X} \pm SD$)
Midrib (μm)	
Midrib thickness	460.52 \pm 5.49
Adaxial epidermis thickness	40.42 \pm 6.45
Abaxial epidermis thickness	40.53 \pm 2.69
Mesophyll thickness	389.83 \pm 9.42
Vertical vascular tissue thickness	86.20 \pm 19.36
Horizontal vascular tissue thickness	131.63 \pm 6.26
Vessel cell wall thickness	2.21 \pm 0.06
Lamina (μm)	
Lamina thickness	388.70 \pm 31.66
Adaxial epidermis thickness	30.38 \pm 2.93
Abaxial epidermis thickness	27.40 \pm 0.99
Mesophyll thickness	346.24 \pm 20.77
Leaf margin (μm)	
Adaxial epidermis thickness	28.01 \pm 2.97
Abaxial epidermis thickness	25.20 \pm 1.01
Mesophyll thickness	289.07 \pm 35.18
Stomata (μm)	
Stomatal width	10.02 \pm 0.29
Stomatal length	18.37 \pm 1.05
Stomatal density (mm^2)	69.60 \pm 8.21
Glandular trichome density (mm^2)	6.80 \pm 0.60
Stomatal Index	13.04 \pm 1.62

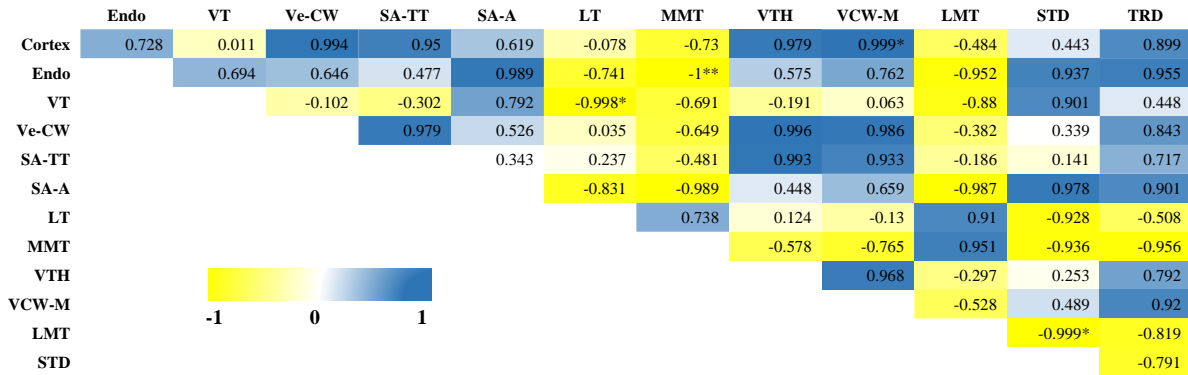


Figure 3 Estimates of phenotypic correlation coefficients between 13 traits of stem and leaf anatomy

* Significant difference at $P < 0.05$; ** Significant difference at $P < 0.001$

(Cortex-cortex thickness; Endo- endodermis thickness; VT- vascular tissue thickness;

Ve-CW- vessel cell wall thickness; SA-TT-cell surface area (cross-sectional area of all cells);

SA-A- surface area (airspace area); LT- lamina thickness; MMT- midrib mesophyll thickness;

VTH- vascular tissue- horizontal length; VCW-M- vessel cell wall thickness- (midrib); LMT- lamina mesophyll thickness; STD-stomata density; TRD- trichomes density)

หลังจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นพรมมีที่ตำแหน่ง 9 เซนติเมตรจากปลายยอด และปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ 4 ชนิดที่กลุ่มวิจัยได้รายงานไปก่อนหน้านี้แล้ว (Maneeply *et al.*, 2018) ได้แก่ BacA3, BacII, BacX, BacC และ TBA พบว่าลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นหลายลักษณะมีความสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในพรมมี อย่างไรก็ตามพบลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นบางลักษณะที่มีความสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ เช่น ความหนาของเนื้อเยื่อชั้นผิว (Epi) ความหนาของเอนโดเดอริส (Endo) ความหนาของผนังเซลล์เวสเซล (Ve-CW) เส้นผ่านศูนย์กลางของไส้ไม้ในแนวตั้ง (Pith-V) และแนวอน (Pith-H) เป็นต้น (Figure 4)

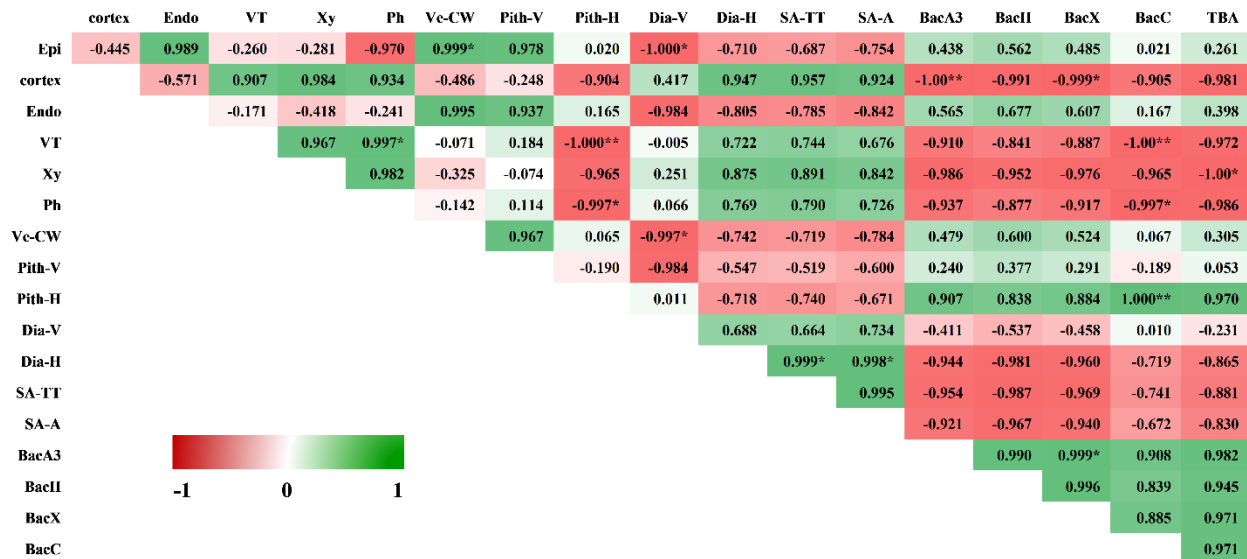


Figure 4 Heat maps describing the phenotypic correlation coefficient approximation of anatomical features of the 9 cm from the shoot apex stem and main bioactive compounds of Brahmi, including BacA3, BacII, BacX, BacC and TBA. * Significant difference at $P < 0.05$; ** Significant difference at $P < 0.001$

(*Epi*-epidermal thickness; *Cortex*-cortex thickness; *Endo*- endodermis thickness; *VT*- vascular tissue thickness; *Xy*- xylem thickness; *Ph*- phloem thickness; *Vc-CW*- vessel cell wall thickness; *Pith-V*- pith vertical length; *Pith-H*- pith horizontal length; *Dia-V*; stem diameter (vertical length); *Dia-H*; stem diameter (horizontal length); *SA-AA*- cell surface area (Total cell surface area); *SA-A*- surface area (airspace area); *LT*- lamina thickness; *MMT*- midrib mesophyll thickness; *VTH*- vascular tissue horizontal; *VCW-M*- vessel cell wall thickness- (midrib); *LMT*- lamina mesophyll thickness; *STD*- stomata density; *TRD*- trichomes density)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ตามปกติแล้วสามารถพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในทุกส่วนของพรมมิ ซึ่งการศึกษากายวิภาคเปรียบเทียบของลำต้นที่ตำแหน่ง 3, 9 และ 15 เซนติเมตร สามารถนำมาใช้อธิบายร่วมกับข้อมูลทางพิษเคมีได้ โดยจากการศึกษาของ Phrompittayarat et al. (2011) กล่าวว่า ปริมาณซาโปนินทั้งหมดในยอดพรมมิมีมากกว่า 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับลำต้นส่วนล่าง และราก ในการศึกษารั้งนี้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์การเจริญโดยรวมของลำต้นและใบพบว่า ถึงแม้ลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นส่วนใหญ่ เช่น ความหนาของคอร์เทกซ์ ความหนาของเอ็นโดเดอริส รวมทั้งขนาดของเนื้อเยื่อลำเลียงจะมี

ความสัมพันธ์ในเชิงลบกับความหนาของแผ่นใบ แต่พื้นที่หน้าตัดของเซลล์ทั้งหมดของลำต้นมีความสัมพันธ์กับความหนาของแผ่นใบในเชิงบวก ซึ่งความหนาของแผ่นใบบ่งบอกถึงความหนาของชั้นมีซิฟิลล์ของใบนั่นเอง

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายวิภาคของบางประการของลำต้นที่ตำแหน่ง 9 เซนติเมตรจากยอด พบว่ามีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้แก่ ความหนาของเนื้อเยื่อชั้นผิว ความหนาของเอนโดเดอริส ความหนาของผนังเซลล์เวสเซล เส้นผ่านศูนย์กลางของไส้ไม้ในแนวตั้งและแนวนอน ซึ่งหากพิจารณาถึงบริเวณที่คาดว่าจะมีการสะสมของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในปริมาณมากแล้ว คาดว่าจะเป็นบริเวณคอร์เทกซ์ และไส้ไม้ (pith) เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีเซลล์พาราไคมาในปริมาณมาก สอดคล้องกับรายงานของ Talukdar (2014) ที่พบว่าสามารถสกัด Bacoside ได้ดีจากแคลลัสซึ่งเป็นกลุ่มของเนื้อเยื่อพาราไคมาของพรมมิ และยังมีความสอดคล้องกับชีววิถีการสังเคราะห์สารบาโคไซด์ที่สังเคราะห์จาก Mevalonate (MVA) และ methyl-Derythritol-4-phosphate (MEP) pathway เกิดบริเวณไซโตพลาซึมของเนื้อเยื่อถาวรที่มีชีวิตได้แก่ พาราไคมาและแองไคมา (Vishwakarma *et al.*, 2015)

สำหรับความหนาของผนังเซลล์เวสเซลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีความหนาเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของลำต้น อย่างไรก็ตาม ขนาดของผนังเซลล์เวสเซลอาจมีความหนาเพิ่มขึ้นหากพืชเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม ซึ่งเกิดจากการปรับตัวของพืชเพื่อตอบสนองต่อความเครียดบางประการ ไม่ว่าจะเป็นความเครียดทางกายภาพ หรือความเครียดทางชีวภาพ เช่น การบุกรุกของแบคทีเรีย ไวรัส หรือ เชื้อราก่อโรค เป็นต้น (Raviv & Lieth, 2008; Panstruga *et al.*, 2009) พบรายงานความสัมพันธ์ของการเจริญของพืชภายใต้สภาวะเครียดต่อการสังเคราะห์สารต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ เมื่อพืชเผชิญกับภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น ความเครียดเค็มหรือเครียดเกลือ พืชจะปรับตัวโดยการสะสมสารประกอบหลักของผนังเซลล์มากขึ้น ไม่ว่าจะเป็น เซลลูโลส, เพคติน, เฮมิเซลลูโลส, ลิกนิน และซูเบอร์ริน เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำและลดการขนส่งไอออนส่วนเกินเข้าเซลล์ จึงส่งผลให้ผนังเซลล์ทุติยภูมิของพืชมีความหนาเพิ่มขึ้น (Dabravolski *et al.*, 2023) นอกจากนี้ การปรับตัวของพืชภายใต้สภาวะเครียดอีกหนึ่งประการคือการสร้างสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิเพื่อลดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อพืช (Isah, 2019; Rahman *et al.*, 2023) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้เป็นการปลูกในสภาวะปกติ พืชไม่ได้เกิดภาวะเครียดทางกายภาพ และพบว่าความหนาของผนังเซลล์เวสเซลมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณสารบาโคไซด์ ซึ่งการเพิ่มความหนาของผนังเซลล์เวสเซล และการเพิ่มปริมาณสารบาโคไซด์น่าจะเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญตามปกติ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญกับขนาดของมดเนื้อเยื่อลำเลียงทั้งไซเล็มและโฟลเอ็มในการศึกษานี้พบว่ามีความสัมพันธ์ในเชิงลบ บ่งบอกว่าขนาดของมดเนื้อเยื่อลำเลียงไม่ส่งผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์เหล่านั้น เช่นเดียวกับรายงานของ Almusawi *et al.* (2017) ที่พบว่าขนาดและจำนวนของมดเนื้อเยื่อลำเลียงไม่ส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนของลำต้นพรมมิที่เจริญภายใต้สภาวะเครียดเค็ม อย่างไรก็ตาม การประเมินปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญโดยใช้ลักษณะทางกายวิภาคนี้อาจต้องคำนึงถึงลักษณะการปลูก รวมทั้งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมร่วมด้วย เช่นการปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิกส์ อาจให้ผลการศึกษาที่แตกต่างจากการปลูกในดินได้ เช่นเดียวกันกับรายงานของกลุ่มวิจัยก่อนหน้า (Maneeply *et al.*, 2018) ที่พบว่า การปลูกพรมมิด้วยระบบไฮโดรโปนิกส์แบบ DFT (Deep Flow Technique) เป็นระบบที่มีการเจริญเติบโตของพรมมิมากที่สุดเนื่องจากส่งผลให้พรมมิ มีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง จำนวนยอด



จำนวนใบ พื้นที่ใบสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม ในการปลูกพรมมิเพื่อเพิ่มการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ไม่ว่าจะปลูกด้วยระบบใด ควรมีช่วงที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดบางประการ เช่น ความเครียดเค็ม หรือเครียดแล้ง แต่ควรศึกษาระยะเวลา หรือเงื่อนไขที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสร้างสารออกฤทธิ์ เพื่อไม่ให้กระทบต่อการเจริญโดยตรง

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นพรมมิที่ตำแหน่ง 9 เซนติเมตรจากปลายยอด และปริมาณ BacA3, BacX, BacC และ TBA พบลักษณะกายวิภาคของลำต้นบางลักษณะที่มีความสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณสารออกฤทธิ์เหล่านี้ได้แก่ ความหนาของเนื้อเยื่อชั้นผิว ความหนาของเอนโดเดอริมิส ความหนาของผนังเซลล์เวสเซลล์เส้นผ่านศูนย์กลางของไส้ไม้ทั้งด้านกว้างและยาว สามารถใช้ลักษณะทางกายวิภาคเหล่านี้ประเมินปริมาณสารออกฤทธิ์ดังกล่าวได้ในเบื้องต้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากยังขาดข้อมูลเปรียบเทียบในเชิงลึกเกี่ยวกับการปลูกในระบบต่างๆ หรือการปลูกภายใต้เงื่อนไขต่างๆ ดังนั้นกลุ่มวิจัยจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อใช้ระบุเกณฑ์ต่างๆ ให้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรัตนนคร งบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 รหัสโครงการ R2565E049 ขอขอบคุณภาคีวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรัตนนคร และสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์สำหรับการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- Almusawi, A.H.A., Al-Aradi, H.J., & Hammadi, K.J. (2017). The impact of salinity stress on morphological and anatomical aspect of water hyssop *Bacopa monnieri* (L.) Wettst grown *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, 16(15), 801-807. (DOI: 10.5897/AJB2016.15699)
- Anju, V., Naresh, C. & Avinash, P. (2017). Anatomical markers and phytochemical study of different plant parts of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *International Journal of Life Sciences*, 5(3), 379-386.
- Autajamsripon, J., Jirakiattikul, Y., & Rithichai, P. 2018. Effect of Culture Periods on Secondary Metabolite Contents and Antioxidant Activity of *In Vitro Bacopa monnieri* Shoots. *Thai Science and Technology Journal*, 25(3), 443-452. (in Thai)



- Ceulemans, R., Van Praet, L., & Jiang, X.N. (1995). Effect of CO₂ enrichment, leaf position and clone on stomatal index and epidermal cell density in poplar (*Populus*). *New phytologist*, 131, 99-107.
- Dabravolski, S.A. & Isayenkov, S.V. (2023). The regulation of plant cell wall organisation under salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1118313. (DOI: 10.3389/fpls.2023.1118313)
- Gubbannavar, S.J., Chandola, H., Harisha, R.C., & Khanpara, K. (2012). A comparative pharmacognostical and preliminary physico-chemical analysis of stem and leaf of *Bacopa monnieri* (L.) Pennel and *Bacopa floribunda* (R.BR.) Wettst. *International Journal of Pharmacognosy and Pharmaceutical Research*, 4(1), 8-11. (DOI:10.4103/0974-8520.115441)
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(39). (DOI: 10.1186/s40659-019-0246-3)
- Lal, S., & Baraik, B. (2019). Phytochemical and pharmacological profile of *bacopa monnieri* - an ethnomedicinal plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(3), 1001-1013.
- Maneeply, C., Sujipuli, K., & Kunpratun, N. (2018). Growth of Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) by NFT and DFT hydroponic systems and their accumulation of saponin bacosides. *NU. International Journal of Science*, 15(2), 114-124.
- Martínez-García, M., Garduño-Solórzano, G., Lopes, G., Sanchez, B.A., Urbatzka, R., Hentschke, G.S., Campos, J.E. & Vasconcelos, V.M.O. (2023). Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Obesity Potential of Extracts Containing Phenols, Chlorophyll and Carotenoids from Mexican Wild Populations of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Biology*, 2023(12), 620. (DOI: 10.3390/biology12040620)
- Murthy, P.B.S., Raju, V.R., Ramakrisana, T., Chakravarthy, M.S., Kumar, K.V., Kannababu, S., & Subbaraju, G.V. (2006). Estimation of Twelve Bacopa Saponins in *Bacopa monnieri* Extracts and Formulations by High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(6), 907—911.



- Nemetchek, D.M., Stierle, A.A., Stierle, B.D. & Lurie, I.D. 2017. The Ayurvedic plant *Bacopa monnieri* inhibits inflammatory pathways in the brain. *Journal of Ethnopharmacology*, 197, 92-100.
(DOI: 10.1016/j.jep.2016.07.073)
- Naik, P.M., & Al-Khayri, J.M. (2016). Impact of Abiotic Elicitors on *In vitro* Production of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*.
(DOI: 10.15226/2475-4714/1/2/00102)
- Panstruga, R., Parker, J.E.& Schulze-Lefert, P. (2009). Snapshot: plant immune response pathways. *Cell*, 136, 978–U976. (DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.020)
- Phrompittayarat, W., Jetiyanon, K., Wittaya-areekul, S., Putalun, W., Tanaka, H., Khan, I., & Ingkaninan, K. (2011). Influence of seasons, different plant parts, and plant growth stages on saponin quantity and distribution in *Bacopa monnieri*. *Songklanakarinn journal of science and technology*, 33(2), 397-404.
- Rahman, A., Albadrani, M.G., Waraich, A.E., Awan, H.T. Yavaş, İ. & Hussain, S. (2023). *Plant Secondary Metabolites and Abiotic Stress Tolerance: Overview and Implications*. IntechOpen.
(DOI: 10.5772/intechopen.111696)
- Raviv, M., & Lieth, J.H. (2008). 1 - significance of soilless culture in agriculture. *Soilless culture theory and practice*. (DOI: 10.1016/B978-0444452975-6.50003-4)
- Sudhakaran, M.V. (2020). Botanical Pharmacognosy of *Bacopa monnieri* (Linn.) Pennell. *Pharmacognosy Journal*, 12(6), 1559-1572.
- Sanyal, R., Nandi, S., Pandey, S., Chatterjee, U., Mishra, T., Datta, S., Prasanth, D.A., Anand, U., Mane, A.B., Kant, N., Jha, N.K., Jha, S.K., Shekhawat, M.S., Pandey, D.K., & Dey, A. (2022). Biotechnology for propagation and secondary metabolite production in *Bacopa monnieri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 1837–1854.



- Tamboli, F.A., Rangari, V.D., Killedar, S.G., Jadhav, S.U., Ghatage, T.S., & Kore, V.P. (2018). Comparative phytochemical evaluation of natural and micropropagated plants of *Bacopa monnieri* (L.). *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22(1), 66-73. (DOI: 10.12991/mpj.2018.42)
- Talukdar, A. 2014. Biosynthesis of Total Bacosides in the callus culture of *Bacopa monnieri*. L. Pennel from North-east India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(3), 140-145.
- Taratima, W., Ritmaha, T., Jongrunklang, N., Raso, S., & Maneerattanarungroj, P. (2019). Leaf Anatomical Responses to Drought Stress Condition in Hybrid Sugarcane Leaf (*Saccharum officinarum* 'KK3'). *Malaysian Applied Biology Journal*, 48(3), 180-188.
- Vishwakarma, R.K., Patel, K., Sonawane, P., Kumari, U., Singh, S., Abbassi, S., Agrawal, D.C., Tsay, H.-S., & Khan B.M. (2015). Squalene synthase gene from medicinal herb *Bacopa monniera*: molecular characterization, differential expression, comparative modeling, and docking studies. *Plant molecular biology reporter*, 33, 1675-1685.