สถาบันวิทยบริการ

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

สำนักหอสมุด

การถ่ายยีนในมะยม โดย *Agrobacterium* sp. เพื่อสะสมสาร Phyllanthusol A

(*Agrobacterium* sp. Mediated Transformation of *Phyllanthus acidus* Skeel: *in vitro* Accumulation of Phyllanthusol A)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 10 ก.พ. 2553
เลขทะเบียน 1.A91530606 C.3
เลขเรียกหนังสือ QK
725
ด๓๙
๒๕๕๓

ผศ.ดร.ดวงพร เปรมจิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-961000 ต่อ 2736 โทรสาร 055-962904
E-mail: duangpornp@nu.ac.th

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2550 และ งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยใหม่ที่ไม่มีการศึกษาที่อื่นมาก่อนผู้วิจัยมีโอกาสฟังบรรยายเรื่องการศึกษาสารสกัดธรรมชาติจากพืชโดย ดร. ประสาท กิตตคุปต์ จาก BIOTEC ได้รับความรู้ว่ามะยมมีสารที่ออกฤทธิ์ cytotoxic จึงมีความสนใจนำมาทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยจุดประสงค์การขยายขอบเขตงานวิจัยในแง่บูรณาการความรู้ จึงได้รับอนุเคราะห์สารมาตรฐาน Phyllanthusol A จากรากมะยม โดย ดร.ประสาททำให้สามารถเริ่มต้นทำการศึกษา ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอบคุณผู้ร่วมวิจัย รศ.ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต และ ผศ.ดร. อนุพันธุ์ กงบังเกิด จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ช่วยแนะนำการถ่ายยีน (Transformation) ช่วยระดมความเห็นในการแก้ปัญหาระหว่างการวิจัย ตลอดจนนิสิตปริญญาตรีและผู้ช่วยวิจัย จากภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม น.ส. พรรนิดา สิงห์ทอง และ น.ส. สุนิสา อ่อนตา

บทคัดย่อ

การศึกษาหาศักยภาพในการผลิตสาร Phyllanthusol A โดยเซลล์เพาะเลี้ยงมะยมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ทำการวิจัยนี้มีสามรูปแบบได้แก่ 1) แคลลัส 2) เซลล์แขวนลอย 3) Hairy root , Crown Gall Tumor ชักนำด้วย *Agrobacterium* sp. คาดหวังว่ารูปแบบของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงชนิดนี้จะสร้างผลผลิตสาร Phyllanthusol A ในระดับสูงกว่าแคลลัส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแคลลัสที่มีออกซินและไซโทไคนินที่เหมาะสม (MS +NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) + BA(0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) กระตุ้นให้แคลลัสสังเคราะห์สารดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในรูปแบบแขวนลอย และเนื้อเยื่อ Gall ที่ผ่านการ transformation โดย *Agrobacterium* sp. โดยแคลลัสมีปริมาณสาร Phyllanthusol A 20.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนเซลล์แขวนลอยมีสาร 0.595 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ Crown Gall Tumor ที่เกิดจากเชื้อ TISTR 1099 มีปริมาณสาร 0.039 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่รูปแบบที่ใช้เวลาการเพาะเลี้ยงน้อยที่สุดสามารถลดเวลาลงเป็นครึ่งหนึ่งของแคลลัสและมีการหลั่งสารสู่อาหารคือรูปแบบแขวนลอยซึ่งใช้เวลาเพาะเลี้ยงเพียง 20 วัน

Abstract

Three types of tissue cultures, calluses, cell suspension cultures, hairy root or crown gall tumors, derived from petioles of *Phyllanthus acidus* Skeel were established to investigate potential of *in vitro* production of cytotoxic compound, Phyllanthusol A. *Agrobacterium* sp. was used as means to transform the petioles. We expected that the high yield of Phyllanthusol A should be detected in hairy roots or crown gall tumors. Results revealed that calli grown in MS medium supplemented with auxin and cytokinin in suitable combination and concentration provided the Phyllanthusol A in the highest concentration when compared to those of cell suspension cultures and crown gall tumor. MS medium supplemented with NAA (2 mg/l) and BA (0.5 mg/l) accumulated Phyllanthusol A 20.23 (mg/g DW). Cell suspension cultures grown in MS medium in the presence of NAA (2 mg/l) produced Phyllanthusol A in amount of 0.595(mg/g DW). The crown gall obtained from TISTR 1099 gave the lowest Phyllanthusol A (0.039 mg/g DW). The cell suspension cultures produced Phyllanthusol A and accumulated both in tissues and releasing to medium. Time course of growth of the cell suspension cultures was 20 days which was only half time course of growth of callus cultures.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 การทบทวนวรรณกรรม/ สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	3
1.5 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework) ของโครงการ	6
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	
การวิจัยที่ 1 การศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อการผลิตสาร Phyllanthusol Aในการเพาะเลี้ยงแคลลัส	10
การวิจัยที่ 2 การศึกษาการผลิตสาร Phyllanthusol A ในรูปของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย	12
การวิจัยที่ 3 การชักนำ Hairy root โดย *Agrobacterium* sp.	14
บทที่ 3 ผลการทดลอง	
3.1 การศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อการผลิตสาร Phyllanthusol Aในการเพาะเลี้ยงแคลลัส	17
3.2 การศึกษาการผลิตสาร Phyllanthusol A ในรูปของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย	28
3.3 การชักนำ Hairy root โดย *Agrobacterium* sp.	39

บทที่ 4 อภิปรายผลการทดลอง

4.1 การศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อการผลิตสาร Phyllanthusol A ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส 43

4.2 การศึกษาการผลิตสาร Phyllanthusol A ในรูปของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย 44

4.3 การชักนำ Hairy root โดย *Agrobacterium sp.* 47

สรุปผลการทดลอง 47

เอกสารอ้างอิง 48

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1. แสดงเชื้อ *Agrobacterium* sp. จำนวน 6 สปีชีส์จาก MIRCEN	15
3.1.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของก้านใบอ่อนมะยมที่เพาะเลี้ยง ในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Kinetin และ 2, 4-D ในความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์	20
3.1.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของก้านใบอ่อนมะยมที่เพาะเลี้ยง ในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA และ BA ในความเข้มข้น ต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์	21
3.1.1 ผลของ NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆในการสะสม Phyllanthusol A ของแคลลัสที่พัฒนาจากก้านอ่อนมะยม ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 42 วัน.	26
3.1.2 ผลของ2,4-D และ kinetinที่ความเข้มข้นต่างๆในการสะสม Phyllanthusol A ของแคลลัสที่พัฒนาจากก้านอ่อนมะยม ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 42 วัน.	26
3.2.1 แสดงน้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอยมะยมที่เก็บข้อมูลทุกๆ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2 วันในระยะเวลา 20 วัน	32
3.2.2 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมะยมที่เก็บข้อมูลทุกๆ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2 วันในระยะเวลา 20 วัน	32
3.2.3 ปริมาณน้ำ (water content (%)) ในเซลล์แขวนลอยมะยม	33
3.2.4 แสดงปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมะยมที่เก็บตัวอย่างทุกๆ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 วันในระหว่างเวลา 4 สัปดาห์	36
3.2.5 ปริมาณน้ำ (water content (%)) ในแคลลัสมะยมที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 2 สูตร คือ MS+ 2, 4-D และ MS+NAA	36
1 แสดงปริมาณสาร Phyllanthusol A ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยมะยม และในอาหารเพาะเลี้ยง	38
3.3.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การ transformation จากก้านอ่อนมะยมในอาหาร MS	41

ไม่เติมฮอร์โมนในเวลาเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์
3.3.2 ปริมาณสาร Phyllanthusol A ในเนื้อเยื่อ Gall ที่พัฒนามาจากก้านอ่อนมะยม 42
transformed ด้วย TISTR1099 (*Agrobacterium radiobacter*),
และ TISTR1405 (*Agrobacterium rhizogenes*)

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของ Phyllanthusol A และ B	9
3.1.1 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ Kinetin และ 2, 4-D ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสของมะยม ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ (ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย n=3, ± SE, p<0.5)	23
3.1.2. ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสของมะยม ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ (ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย n=3, ± SE, p<0.5)	24
3.1.3 HPLC Chromatogram ของ Phyllanthusol A ในแคลลัสมะยม (A) Phyllanthusol A มาตรฐาน (B)	27
3.2.1 ลักษณะแคลลัสมะยมที่ย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน	29
3.2.2 ลักษณะเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน กลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงเกาะกันหลวมๆมีบางส่วนพัฒนาเป็นราก	29
3.2.3 ลักษณะเซลล์หลังการเพาะเลี้ยง 20 วัน กลุ่มเซลล์สีน้ำตาลแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อสีครีม	30
3.2.5 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยมะยมในรูปของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อฟลาสก์) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2-20 วัน และเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D หรือ NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร)	34
3.2.6 รูปแบบการเจริญเติบโตโดยแสดงเป็นน้ำหนักสดของแคลลัสมะยม ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลาระยะเวลา 28 วัน	35
3.2.7 รูปแบบการเจริญเติบโตของแคลลัสมะยมโดยแสดงเป็นน้ำหนักแห้งของแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 28 วัน	35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะยม (*Phyllanthus acidus* Skeel) เป็นพืชในวงศ์ Euphobiaceae [1] จากข้อมูลภูมิปัญญาพื้นบ้านมีการใช้ยอดหรือใบสดมะยมมาต้มน้ำเป็นยาแก้ไข้ รากมะยมใช้แก้โรคผิวหนัง[2] และเป็นยาปรับสุขภาพให้คืนสภาวะปกติให้กับคนที่ติดแอลกอฮอล์ สารจากรากมะยมช่วยลดอาการอยากแอลกอฮอล์ได้ดี นอกจากนั้นแล้วในปี พ.ศ.2543 ประสาท กิตตะคุปต์และคณะรายงานว่าสารสกัดจากรากมะยมมีสารกลุ่ม Norbissabolane glycosides คือ Phyllanthusol A และ Phyllanthusol B และพบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ cytotoxicity ต่อ เซลล์ BC และเซลล์ KB[3] สารอื่นๆ ที่พบในมะยมคือ Tritepenoids และ อนุพันธ์[4] เนื่องจาก Phyllanthusol A และ Phyllanthusol B ในรากมะยมเป็นสารมีฤทธิ์ cytotoxicity จึงน่าจะมีศักยภาพเป็นสารต้านมะเร็งหรือเป็นสารกำจัดศัตรูพืชได้เมื่อได้รับการพัฒนาอย่างเพียงพอ แต่การใช้พืชเป็นแหล่งสารสำคัญนั้นมีข้อจำกัดหลายประการเช่น ปริมาณสารไม่สม่ำเสมอขึ้นกับพื้นที่ที่ใช้เพาะปลูกหรือฤดูกาลและพืชยังเป็นแหล่งทรัพยากรที่ใช้แล้วหมดไป นอกจากนั้นพืชที่เป็นแหล่งของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพก็จะมีแนวโน้มสูญพันธุ์ตามความต้องการที่สูงขึ้น ข้อจำกัดเหล่านี้สามารถหาทางออกได้โดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาแก้ไขโดยการนำชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงในระบบ *in vitro* ซึ่งสามารถสร้างสภาพให้พืชสร้างและสะสมสารสำคัญ

โดยการให้องค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสม และสามารถขยายขนาดในการผลิตแบบ mass production ใน bioreactor เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม[5-6] รายงานการศึกษามะยมในเมืองไทยพบว่าเป็นไม้มงคล เป็นยาพื้นบ้านแต่ไม่พบการศึกษาทางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์มาก่อนเลย จึงริเริ่มนำเอาชิ้นส่วนของมะยมมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตรต่างๆ พบว่ามีการสะสมสาร Phyllanthusol A ในปริมาณต่ำกว่าที่สะสมในส่วนของราก[7] แต่อย่างไรก็ตามในการตรวจพบสาร Phyllanthusol A ในแคลลัสนั้นถือว่าประสบผลสำเร็จในเบื้องต้นเนื่องจากยังมีวิธีปรับปรุงผลผลิตให้สูงขึ้นได้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามรูปแบบได้แก่ 1) แคลลัส 2) เซลล์แขวนลอย ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ และในการศึกษานี้พยายามจะพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* sp. หลายๆ สายพันธุ์เพื่อให้ได้ 3) Hairy root ซึ่งเป็นรูปแบบของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่คาดว่าให้ผลผลิตสาร Phyllanthusol A ในระดับสูงกว่าแคลลัส หรือศึกษาการสะสมสารใน Crown Gall Tumor ที่มีลักษณะคล้ายกับแคลลัส

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อค้นหาสภาวะที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์มะยมให้ผลิต Phyllanthusol A ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบ *in vitro* รวมทั้งการชักนำ Hairy roots หรือเนื้อเยื่อ Gall โดย *Agrobacterium* sp. หลายสายพันธุ์

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ชักนำแคลลัสของมะยมเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่มีฮอร์โมนทั้งออกซินและไซโทไคนินศึกษารูปแบบการเจริญเติบโต ของแคลลัส และเซลล์แขวนลอย นำเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน ก้านอ่อนและแคลลัสมาเป็นชิ้นส่วนในการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* sp. ศึกษาสภาวะเหมาะสมของการชักนำ Hairy root หรือ Crown Gall Tumor ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร Phyllanthusol A โดย HPLC

1.4 การทบทวนวรรณกรรม/ สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

มะยมมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Phyllanthus acidus* Skeel (U.S. Dept. Agric. Bur.1909) มีชื่อพ้องได้แก่ *Phyllanthus acidissimus* (Blanco) Muell. Arg. (1863) *Phyllanthus distichus* (L.) Muell. Arg. (1866) *Cicca acida*(L.) Merr. (1917) ชื่อพื้นเมืองแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศอังกฤษเรียกว่า Otaheite gooseberry, Malay gooseberry ฝรั่งเศส เรียกกันทั่วไปว่า Ceremai, crème แต่ในบริเวณสุลาเวสีตอนใต้เรียกว่า caramele ประเทศมาเลเซียเรียกว่า Chermai, Chermala, kemangur ประเทศฟิลิปปินส์ ภาษาตากาลอกเรียกว่า iba ภาษาไบซายะ เรียกว่า bangking ภาษาอิโลคาโนเรียกว่า karmay ประเทศพม่า เรียกว่า thinbozihpyoo ประเทศกัมพูชา เรียกว่า kantuet, kantouot srok ประทศลาว เรียกว่า nhom baanz, mak nhom, nhom ban ประเทศเวียดนาม เรียกว่า ch[uf]m

มะยมกระจายตัวอยู่ในแถบชายหาดทางตอนตะวันออกเฉียงเหนือของบราซิล และคาดว่ามะยมน่าจะเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศบราซิล แต่ในปัจจุบันมีการปลูกเป็นไม้ผลในประเทศในทวีปเอเชียที่ตั้งอยู่ในเขตร้อน ตั้งแต่ประเทศอินเดีย มาเลเซีย โปลีนีเซีย และเกาะฮาวายแต่ไม่พบที่เกาะปาปัวนิวกินี

การใช้ประโยชน์ส่วนต่างๆของมะยม เช่น กาว (latex) ใช้เป็นยาอาเจียนและยาถ่าย ในอินโดนีเซียนำเอาเปลือกไม้มะยมมาเคี่ยวบนไฟร้อนๆด้วยน้ำมันมะพร้าวพอกลงบนฝ่ามือหรือฝ่าเท้าที่มีรอยแตก คนในเกาะชวานำรากมะยมมาทำเป็นยานัตถ์ เพื่อรักษาอาการหอบหืด ที่เกาะบอร์เนียวใช้รากรักษาน้ำกัดเท้า แม้ว่ารากมะยมจะมีพิษอ่อนๆ คนมาเลย์นำรากมะยมมาต้มกับน้ำให้เดือดแล้วสูดไอน้ำลดอาการปวดหัวและไอ ในประเทศฟิลิปปินส์ ใช้ใบมาต้มรักษาอัมพาต เปลือกต้มน้ำรักษาอาการเสลดจากถุงลมโป่งพอง ในพม่ากินผลมะยมเป็นยาระบาย อินเดียกินผลเช่นกันเพื่อเป็นเครื่องดื่มบำรุงตับและเพิ่มเลือด สารสกัดจากรากมะยมเคยมีรายงานการใช้เป็นยาพิษ ในอินโดนีเซียใช้ผลปรุงในอาหารหลายชนิด ประเทศฟิลิปปินส์ใช้ส่วนของผลมาทำเครื่องดื่มเย็นๆ และหมักเป็นน้ำส้มสายชู ประเทศมาเลเซียนำผลมาทำเป็นน้ำมะยมเข้มข้น และแช่อิ่ม หรือนำไปรวมกับผลไม้อื่นเพื่อทำแยม หรือใช้ใบอ่อนมาเป็นผักในประเทศไทย อินเดียและอินโดนีเซีย เนื้อไม้มะยมมีความแข็ง เหนียว ทนทาน ส่วนเปลือกในอินเดียใช้เป็นสารแทนนิน[8)]

พบว่ารากมะยมมีความเป็นพิษเนื่องจากมีสาร Norbissabolane glycosides 2 ชนิด คือ คือ Phyllanthusol A (ภาพที่ 1) และ Phyllanthusol B[3)] และพบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์

cytotoxicity ซึ่งสารเหล่านี้อาจจะมีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นยารักษามะเร็งได้ เนื่องจากเทคโนโลยีชีวภาพนั้นสามารถช่วยให้เราผลิตเซลล์หรือกลุ่มเนื้อเยื่อที่สามารถสะสมสารสำคัญและออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นเดียวกับที่พืชสร้าง

Agrobacterium sp. คือแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผลทำให้เกิดปุ่มปมหรือก้อนเนื้อตรงจุดเหล่านั้น (crown gall tumor) เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียส่งถ่ายยีนที่อยู่ใน Ti plasmid เข้าเซลล์พืช ก้อนเนื้อนี้สามารถเจริญเติบโตได้อย่างไม่จำกัดในอาหารที่ปราศจากฮอร์โมนแม้ว่าจะมีการกำจัดแบคทีเรียออกไปแล้วก็ตามและเนื้อเยื่อจะสร้างสารพวก opine จากคุณสมบัติดังที่กล่าวมาจึงมีการนำ *Agrobacterium* sp มาเป็น vector สำหรับงานการถ่ายยีนเข้าพืชดังตัวอย่าง เช่น ข้าวโพด โดยใช้แคลลัส embryo และ protoplast[8] hairy root ของ *Beta vulgaris*, *Carthamus tinctorius*, *Cichorium intybus*, *Cucumis sativus*, *Eclipta alba*, *Hyoscyamus muticus*, *Rauwolfia serpentine*, *Tagetes patula* และ *Withania somnifera* มีน้ำหนักสดมากกว่ารากธรรมดาประมาณ 100 เท่า[9] พบว่าการสะสมสาร xanthin และสาร cyanin ใน hairy root ของ *Beta vulgaris* L. สูงขึ้นกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงรูปแบบอื่น[10] เช่นเดียวกันมีรายงานการสะสมสาร withanolide ปริมาณสูงใน hairy root ของ *Withania somnifera* [11] นอกจากนี้ยังมีการผลิตสารสำคัญในรูปแบบ hairy root อีกหลายกลุ่ม ที่มีความสำคัญและผลิตระดับอุตสาหกรรมเช่น shikonin[12]

1.5 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework) ของโครงการ

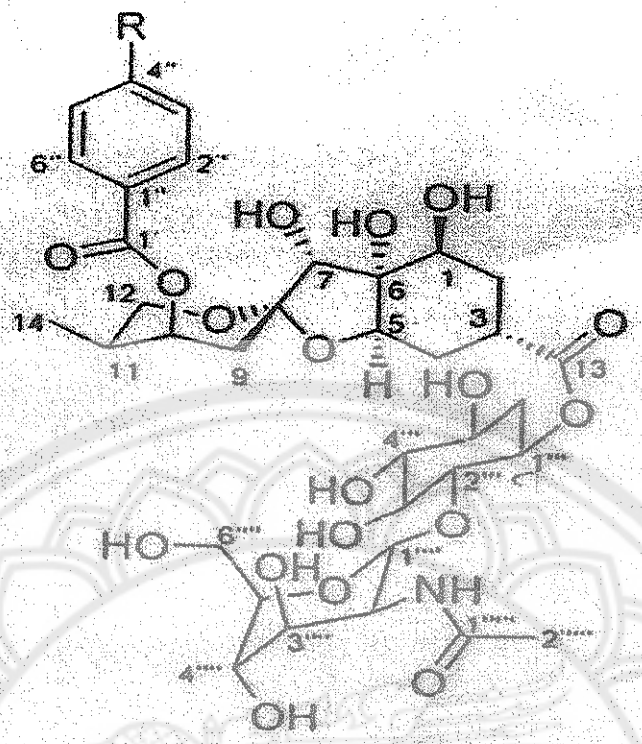
เป็นที่ทราบกันดีกว่าพืชเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของอาหารมนุษย์ และเป็นแหล่งยารักษาโรค ยาฆ่าแมลง และสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหาร สารธรรมชาติที่สกัดได้จากสิ่งมีชีวิตนั้นมาจากพืชมากกว่า 80 % ประมาณการว่ามีสารจำนวนประมาณ 30,000 สาร ที่รู้จักโครงสร้างแล้ว และคาดว่าจำนวนสารที่ได้จากพืชนั้นมากกว่าสารสกัดจากจุลินทรีย์ถึง 4 เท่า มีสารหลายชนิดที่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ และไม่พบการสร้างสารเหล่านั้นในจุลินทรีย์หรือสัตว์ ดังนั้นแหล่งหลักของสารต่างๆยังคงเป็นพืช จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องแสวงหาเทคโนโลยีมาผลิตสารที่มนุษย์จำเป็นต้องใช้ในการดำรงชีวิต เทคโนโลยีชีวภาพช่วยให้เพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ หรือ สิ่งมีชีวิตทั้งหน่วยในสภาพ *in vitro* ได้ และสามารถควบคุมให้เซลล์เพาะลี้ยงเหล่านั้นสังเคราะห์สารที่ต้องการ[13] การเพาะเลี้ยงเซลล์ของพืชในระบบ *in vitro* จะให้ประชากรของเซลล์ที่มีความแตกต่างกันในแง่ของขนาด ปริมาณดีเอ็นเอ และรวมทั้งเมแทบอลิสมและจากคุณสมบัตินี้อาจจะพบว่ามีสารทุติยภูมิบางอย่างสามารถผลิตได้น้อยลง หรือไม่ผลิตเลย หรือผลิตสูงขึ้นได้[14] การผลิตสารทุติยภูมิจากเซลล์เพาะเลี้ยงของพืชและให้ผลผลิตสูงเพียงพอที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้แก่ การผลิต shikonin จาก *Lithospermum erythrorhizon* [15-16]

ในปัจจุบันสารที่สามารถผลิตได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงในรูปแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอยมีหลายกลุ่มด้วยกันได้แก่สารในกลุ่ม Phenylpropanoids, alkaloids, terpenoids, quinines และ steroids[11-12] จากการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่กล่าวมานั้นมี

กรณีที่ประสบผลสำเร็จอย่างยิ่งและผลิตในระดับอุตสาหกรรมคือ shikonin ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ *L. erythrorhizon* นอกจากนั้นสามารถผลิต berberine จาก *Coptis japonica* และ sanquinarine จาก *Papaver somniferum* และความพยายามผลิตยารักษามะเร็งโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Catharanthus roseus* เพื่อผลิต vincristine และ vinblastine[17] การผลิต taxol และอนุพันธุ์ จากเซลล์เพาะเลี้ยงของพืชในตระกูล *Taxus* sp. [18] การผลิต Podophyllotoxin เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ Etopophos, Etoposide และ Teniposide จากพืชตระกูล *Podophyllum* sp[19] . *Linum* sp[20]. และ *Juniperus* sp.[21]

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบแคลลัสและเซลล์แขวนลอยในพืชบางชนิดจะสะสมสารสำคัญต่ำกว่าในต้นพืช เช่น เซลล์แขวนลอยของ *Juniperus chinensis* ให้สาร podophyllotoxin ต่ำกว่าในใบ[21] แต่พบว่า hairy root ของ *Solanum aviculare* Forst สะสมสาร Solasodine มากกว่าในรูปแคลลัส และเซลล์แขวนลอย[22] นอกจากนั้นรายงานการใช้ hairy root เป็นแหล่งสารทุติยภูมิที่มีศักยภาพเป็นยารักษาโรคอีกหลายชนิดเช่น โสม(*Panax ginseng*) [23] เนื่องจากสาร Phyllanthusol A สะสมในส่วนของรากจึงน่าจะมีการชักนำ hairy root ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อในรูปแบบที่คาดว่ามีการสร้างสารดังกล่าว เครื่องมือในการทำให้เกิด hairy root นั้นคือ *Agrobacterium* sp. เนื่องจากมี T-DNA ที่อยู่ใน Ri, Ti plasmid สามารถเข้ารวมกับจีโนมของพืชที่ถูกรุกรานได้และมีผลทำให้พืชมีสรีระแตกต่างไปจากปกติ และ เป็นสาเหตุของการเกิด hairy root หรือ Crown gall tumor ในสภาพที่ไม่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต[24] ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว

Agrobacterium sp. จึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญยิ่งในงานทางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช มีการนำ *Agrobacterium* sp มาชักนำ hairy root ในพืชหลายๆ ชนิดเพื่อให้ผลิตสารทุติยภูมิที่ต้องการและเพิ่มผลผลิตมวลชีวภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง (cell biomass) ประสบผลสำเร็จ[25] เช่นผลิตสาร alkaloid จาก *Atropa belladonna* [8] ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาทำการวิจัยเพื่อศึกษาศักยภาพของการผลิตสาร Phyllanthusol A ในเซลล์เพาะเลี้ยงสามรูปแบบคือการเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย และการชักนำ Hairy root ของมะยมโดย *Agrobacterium* sp.



1, Phyllanthusol A, R = OH
2. Phyllanthusol B, R = H

ภาพที่ 1 โครงสร้างของ Phyllanthusol A และ B

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะยมเพื่อผลิตสาร Phyllanthusol A แบ่งการวิจัยออกเป็น 3 ส่วนหลักดังนี้

การวิจัยที่ 1 การศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อการผลิตสาร Phyllanthusol A ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

การวิจัยที่ 2 การศึกษาการผลิตสาร Phyllanthusol A ในรูปของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

การวิจัยที่ 3 การชักนำ Hairy root โดย *Agrobacterium* sp.

การวิจัยที่ 1 การศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อการผลิตสาร Phyllanthusol A ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

วิธีการศึกษา

1.1 ชักนำแคลลัส (Induction of Callus Cultures)

1.1.1. ทำความสะอาดพื้นผิว (Surface sterilization)

นำชิ้นส่วนก้านใบมะยมอ่อนๆ (petiole) มาแยกเอาส่วนใบออก แล้วทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำยาล้างจานและฟอกด้วยน้ำประปาจนหมดฟอง แช่ใน

แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่คลอรอกซ์ที่มีส่วนผสม sodium hypochlorite 5% เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาทีในตู้ Laminar Flow

1.1.2. การย้ายเนื้อเยื่อลงเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (Transfer explants to medium)

หยิบชิ้นเนื้อเยื่อก้านอ่อนมาซับน้ำส่วนเกินบนกระดาษกรอง นำปากคีบ(Forceps) ใบมีด (Scalpel) ลนไฟฆ่าเชื้อ พอเย็นลงแล้วนำมาจับและตัดเนื้อเยื่อก้านอ่อนให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีฮอร์โมน 2, 4-D (2.4-dichlorophenoxy acetic acid) , NAA (a-naphthaleneacetic acid), BA (benzyladenine) และ kinetin (6-furfurylaminopurine) ปริมาณในความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.5, 1, 2 มิลลิกรัม/ลิตร) แล้วนำไปบ่มในห้องที่มีอุณหภูมิ 24 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง 1,500-2,000 ลักซ์ และทำการ sub-cultured ทุกๆ เดือนลงบนอาหาร MS สูตรเดิม นำแคลลัสใน sub-cultured ครั้งที่ 3 มาทำการศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อการผลิตสาร Phyllanthusol A โดยย้ายแคลลัสสดน้ำหนัก 0.5 กรัมลงเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีฮอร์โมนจำนวน 32 สูตร

1.2.การวัดการเจริญเติบโตของแคลลัสของมะยม (Measurement of growth of callus culture)

การเจริญเติบโตวัดจากตัวแปรสองค่าคือ กรัมน้ำหนักสด (Fresh weight) และกรัมน้ำหนักแห้ง (Dry weight) ของแคลลัส โดยเก็บแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน มาชั่งน้ำหนักสดหลังจากนั้นทำแห้งด้วย Lyophilizer (Flexi-Dry ™) ผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองสามซ้ำ

1.3.การสกัดสารจากแคลลัส (Extraction of callus culture)

นำแคลลัสที่ผ่านการทำแห้งน้ำหนัก 500 มิลลิกรัมจากทั้ง 32 สูตร มาบดให้เป็นผงละเอียดแล้วสกัดด้วยเมทานอล 24 ชั่วโมง แล้วระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Evaporator นำสารสกัดเมทานอลที่แห้งแล้วมาละลายด้วยเมทานอลปริมาณน้อยๆ ก่อนนำไปวิเคราะห์

การวิจัยที่ 2 การศึกษาการผลิตสาร Phyllanthusol A ในรูปของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

2.1. การเตรียมตัวอย่างพืช อาหารเพาะเลี้ยง และ สภาพการเพาะเลี้ยง

ชักนำแคลลัสจนกระทั่งได้ปริมาณมากเพียงพอ เลือกแคลลัสจากก้านใบอ่อนมะยมที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA หรือ 2, 4-D ในความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์ ชั่งแคลลัส 10 กรัม ย้ายลงเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA หรือ 2, 4-D ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (Innova™ 4340) ที่ 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 24±1 องศาเซลเซียส

เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์เพื่อใช้เป็นเซลล์หัวเชื้อ นำเซลล์แขวนลอยมากรองด้วยที่กรองเซลล์ขนาด 60 mesh (Sigma) สังเกตพบเซลล์เพาะเลี้ยงมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนเซลล์คล้ายพวงองุ่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร รวมทั้งเซลล์เดี่ยว ชั่งเซลล์ 1 กรัมย้ายลงอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 30 ฟลาสก์ต่อการทดลอง แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่สภาพ 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 24±1 องศาเซลเซียส

กำหนดเรียกชื่อเซลล์ไลน์ดังนี้

เซลล์ที่เกิดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS + NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) แล้วย้ายลงอาหารเหลวสูตร MS + NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีชื่อเรียกเป็น เซลล์ไลน์ NUNA 1 และย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS + 2, 4-D (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีชื่อเรียกเป็น เซลล์ไลน์ NUNA 2

เซลล์ที่เกิดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS +2, 4-D (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) แล้วย้ายลงอาหารเหลวสูตร MS + NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีชื่อเรียกเป็น เซลล์ไลน์ NUD1 และย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS + 2, 4-D (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีชื่อเรียกเป็น เซลล์ไลน์ NUD 2

2.2. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย

การเจริญเติบโตวัดจากตัวแปรสองค่าคือ กรัมน้ำหนักสด (Gram fresh weight) และ กรัมน้ำหนักแห้ง (gram dry weight) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยต่อฟลาสก์ โดยเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เลี้ยงได้ระยะเวลา 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 วัน มาชั่ง

น้ำหนักสดหลังจากนั้นทำแห้งด้วย Lyophilizer (Flexi-Dry ™) ผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองสามซ้ำ

2.3. การวัด pH ของอาหาร และสังเกตเม็ดสีของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

สังเกตการเปลี่ยนแปลงของ pH โดยการวัดด้วย pH มีเตอร์ (Metrom 713) และการเปลี่ยนแปลงเม็ดสีของเซลล์เพาะเลี้ยง

การวิจัยที่ 3 การชักนำ Hairy root โดย *Agrobacterium* sp.

3.1. วิธีการการชักนำ Hairy root (Hairy root induction method)

3.3.1. การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อ (explants)

เก็บตัวอย่างมะยมที่อยู่ในบริเวณมหาวิทยาลัยนเรศวร ชิ้นส่วนที่นำมาใช้ในการชักนำ Hairy root คือ ก้านใบอ่อน และแคลลัส เตรียมจากแคลลัส sub-cultured ครั้งที่ 2 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน 2, 4-D (2 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.2. การเตรียมเชื้อ *Agrobacterium* sp. (Preparation of *Agrobacterium* sp.)

ได้รับเชื้อจำนวน 6 สปีชีส์ ดังตาราง 2.1 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN) นำ *Agrobacterium* sp. ทุกสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB (Luria-Bertani medium) นำไปเขย่าบน Gyratory shaker ที่ 180 -200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 1100 รอบ/นาที เก็บเชื้อที่ตกตะกอนเป็นแผ่นอยู่ก้นหลอด

ตารางที่ 2.1. แสดงเชื้อ *Agrobacterium* sp. จำนวน 6 สปีชีส์จาก MIRCEN

ตัวอย่างที่	รหัส	Species
1	TISTR 507	*Agrobacterium tumefaciens*
2	TISTR 509	*Agrobacterium rhizogenes*
3	TISTR 510	*Agrobacterium rhizogenes*
4	TISTR 511	*Agrobacterium rhizogenes*
5	TISTR 1450	*Agrobacterium rhizogenes*
6	TISTR 1099	*Agrobacterium radiobacter*

3.3. วิธีการ Transformation ชิ้นเนื้อเยื่อโดย *Agrobacterium* sp.

นำเชื้อที่ปั่นได้จากข้อ 3.2 วัดความหนาแน่นเซลล์ที่ A 600 = 1 มา resuspened ด้วยอาหาร MS ชนิดเหลวที่มีซูโครส 3 % และเติม acetosyringone (50 มิลลิโมล) ใช้เข็มเขี่ยเนื้อเยื่อก้านอ่อนและแคลลัสให้เป็นแผลแล้วจุ่มลงใน suspension ของ *Agrobacterium* sp. ซับเชื้อที่มากเกินพอออกโดยการวางบนกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อ นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการ infect ด้วยเชื้อแล้วลงเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่ปราศจากฮอร์โมนเพื่อ co-cultivation เป็นระยะ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อลงบนอาหาร MS ที่เติม carbenicillin (500 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ cefotaxime (200 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อฆ่าเชื้อที่ยังหลงเหลืออยู่บนเนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยง ย้ายเนื้อเยื่อลงเพาะเลี้ยงในอาหาร

สูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนสังเกตผลเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ใช้เนื้อเยื่อก้านใบอ่อน หรือแคลลัสจุ่มในอาหาร LB ที่ไม่มีเชื้อเป็นการทดลองชุดควบคุม

3.4. การวัดปริมาณสาร Phyllanthusol A ในเซลล์เพาะเลี้ยงทุกรูปแบบ

นำเซลล์หรืออาหารที่ผ่านการทำแห้งแบบ Freeze-dry มาสกัดด้วยเมทานอล วิเคราะห์ปริมาณสาร Phyllanthusol A โดยดัดแปลงจาก Vongvanich et al., 2000 เครื่อง HPLC (Agilent 1100) โดยใช้คอลัมน์ชนิด reversed-phase column (C18 Supelco ODS Hypersil 5μm, 4x250 mm) ที่ UV 254 นาโนเมตร ใช้ระบบ isocratic elution โดยมีเฟสเคลื่อนที่คือ MeOH/ H_2O (50:50 v/v) ตั้ง flow rate ที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และ oven temperature ที่ 40 องศาเซลเซียส ปริมาตรสารสกัดเมทานอลที่ใช้ฉีดครั้งละ 20 ไมโครลิตร การตรวจสาร Phyllanthusol A ในเซลล์เพาะเลี้ยงทำโดยการเปรียบเทียบกับ retention time ของสารมาตรฐาน (Phyllanthusol A สกัดบริสุทธิ์จากส่วนรากของมะยม) ค่าปริมาณสารแสดงเป็นค่าเฉลี่ยสามซ้ำ ใช้ ANOVA วิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 5%

บทที่ 3

ผลการทดลอง

เนื่องจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงมะยมที่ทำการศึกษานั้นมี 3 รูปแบบ คือ แคลลัส เซลล์แขวนลอย และ Hairy root หรือ Gall ผลการทดลองจะแยกอธิบายเป็นสามส่วนตามชนิดของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง

3.1 การศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อการผลิตสาร Phyllanthusol Aในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

3.1.1. การชักนำแคลลัสของมะยม (Establishment of Callus Cultures of *P. acidus*) ชิ้นเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงให้เป็นแคลลัสคือก้านใบอ่อน และเนื้อเยื่อใบ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะยมในการศึกษานี้เลือกใช้อาหารสูตร MS และฮอร์โมนออกซินสองชนิดคือ 2, 4-D และ NAA ส่วนไซโทไคนินสองชนิดที่นำมาใช้ได้แก่ kinetin และ BA เนื่องจากมีรายงานความสำเร็จของการชักนำแคลลัสและต้นสมบูรณ์ของพืชในวงศ์ *Phyllanthus* [26-28] มาก่อนจากนักวิจัยอื่นๆ หลายท่าน

ชิ้นเนื้อเยื่อมะยมที่ใช้ในการศึกษานี้คือก้านใบอ่อนสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดี ลักษณะของแคลลัสมะยมมีสีเบจ สีเขียวแกมเหลือง เกาะกันหลวมๆ แคลลัสถูกชักนำให้เกิดขึ้นบริเวณรอยตัดของชิ้นเนื้อเยื่อในระหว่างระยะเวลาการ incubate ที่มากกว่า 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นเนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแคลลัสในเปอร์เซ็นต์ที่สูงขึ้นในสัปดาห์หลังๆ ยกเว้นการทดลองควบคุมที่แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ต่ำลงในระยะเวลาสัปดาห์ที่ 5 และ 6

ชิ้นก้านใบอ่อนจะพัฒนาไปเป็นแคลลัส 0-95 % ในระยะเวลา 14 วันทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสัดส่วนของฮอร์โมน (ตารางที่ 3.1.1) เมื่อพิจารณาในกรณีผลของฮอร์โมนเดี่ยว ในอาหารที่มี 2, 4-D ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำแคลลัสได้ 100 % ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ ส่วน kinetin เดี่ยวมีผลต่อชิ้นเนื้อเยื่อก้านใบอ่อนคือชักนำให้เกิดแคลลัสช้ากว่า โดยเริ่มมีแคลลัสในสัปดาห์ที่ 3 โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสอยู่ระหว่าง 17-42 % จากผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ kinetin สูงขึ้นมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 6 คือ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำแคลลัสได้ 73 %

เมื่อเติมฮอร์โมนร่วมกันระหว่าง 2, 4-D และ kinetin พบว่าอาหารที่มี2, 4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำงานร่วมกับ kinetin 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นสามารถชักนำแคลลัสได้ดีใช้เวลาเพาะเลี้ยงเพียง 14 วัน และ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงถึง 100 % ในสัปดาห์ที่ 3 และคงที่จนกระทั่งครบเวลา 6 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้น 2, 4-D สูงขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำลงและช้าเมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงไปถึงสัปดาห์ที่ 4 ชิ้นเนื้อเยื่อจึงมีการพัฒนาเป็นแคลลัส

ผลของ NAA และ BA ต่อการชักนำการเกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนมะยม (แสดงในตารางที่ 3.1.2) อาหารที่มี NAA เดี่ยวๆ ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำแคลลัสได้ และที่ความเข้มข้นสูง (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 58 % ในระยะเวลา 14 วัน แต่ความเข้มข้นอื่นๆ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดแคลลัสในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ในเปอร์เซ็นต์ 11, 41, 71 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นสูง 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100 % ในสัปดาห์ที่ 4

ซึ่งเร็วกว่าความเข้มข้นอื่นๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ 2, 4-D เดี่ยวแล้ว 2, 4-D มีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสในระยะเวลาสั้นกว่าและเปอร์เซ็นต์สูงกว่า NAA เมื่อผลของ BA เดี่ยว พบว่ามีการเกิดแคลลัสในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำมาก 0- 33 % ในสัปดาห์ที่สอง ในความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงสุดคือ 50% เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์

ผลการทำงานร่วมกันระหว่าง NAA และ BA ในการชักนำแคลลัส พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรของ NAA และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของ BA ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัส 100 % ตั้งแต่การเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์และคงที่ตลอดจนกระทั่งครบ 6 สัปดาห์ ส่วนคู่ความเข้มข้นอื่นๆ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำ

พิจารณาผลของฮอร์โมนเดี่ยวทั้ง 2, 4-D และ NAA ชักนำให้เกิดแคลลัสในเปอร์เซ็นที่สูงกว่า kinetin หรือ BA ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการพัฒนาชิ้นเนื้อเยื่อก้านใบมะยมไปเป็นแคลลัสนั้นขึ้นกับฮอร์โมนออกซินมากกว่าไซโทไคนิน ส่วนคู่ฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสคือ 2, 4-D และ kinetin

แคลลัสที่ชักนำได้ในขั้นนี้นำไปใช้ศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อน้ำหนักแห้ง และ ปริมาณสาร Phyllanthusol A ดังจะได้กล่าวต่อไป

ตารางที่ 3.1.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของก้านใบอ่อนมะยมที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Kinetin และ 2, 4-D ในความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์

Kinetin (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Callus percentage (%)				
		Week2	Week3	Week4	Week5	Week6
0	0	0	17	17	6	6
0.5	0	0	32	68	63	63
1.0	0	0	42	58	42	42
2.0	0	0	32	69	69	73
0	0.5	95	100	100	100	100
0.5	0.5	95	100	100	100	100
1.0	0.5	93	100	100	100	100
2.0	0.5	94	100	100	100	100
0	1.0	69	100	100	100	100
0.5	1.0	60	95	95	95	95
1.0	1.0	90	100	100	100	100
2.0	1.0	63	89	94	95	95
0	2.0	44	100	100	100	94
0.5	2.0	67	83	100	100	100
1.0	2.0	84	89	90	100	100
2.0	2.0	28	94	94	100	100

ตารางที่ 3.1.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของก้านใบอ่อนมะยมที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA และ BA ในความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์

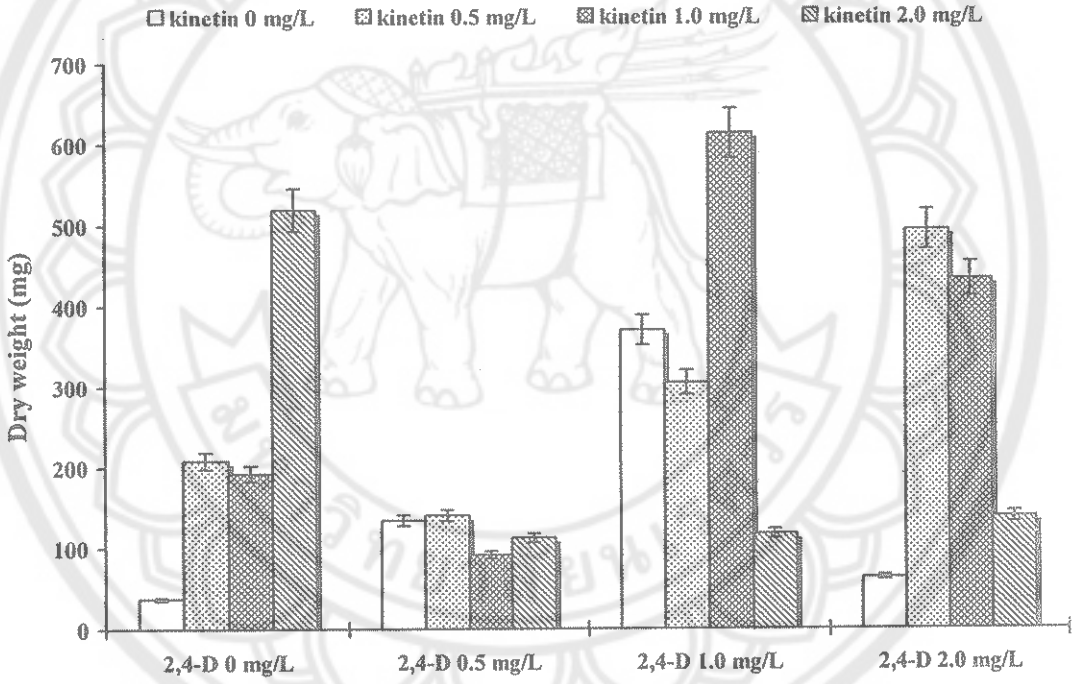
NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Callus percentage (%)				
		Week2	Week3	Week4	Week5	Week6
0	0	0	11	33	11	11
0.5	0	0	41	53	76	59
1.0	0	0	71	75	100	94
2.0	0	58	89	100	100	100
0	0.5	0	15	25	30	21
0.5	0.5	44	53	88	67	67
1.0	0.5	65	79	79	74	69
2.0	0.5	87	93	93	93	93
0	1.0	5	5	5	5	11
0.5	1.0	0	0	0	0	0
1.0	1.0	18	46	80	73	78
2.0	1.0	67	69	69	60	67
0	2.0	33	40	50	50	43
0.5	2.0	0	44	44	44	66
1.0	2.0	81	80	100	100	100
2.0	2.0	79	95	95	90	90

3.1.2. ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ Kinetin , 2, 4-D, BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสของมะยม

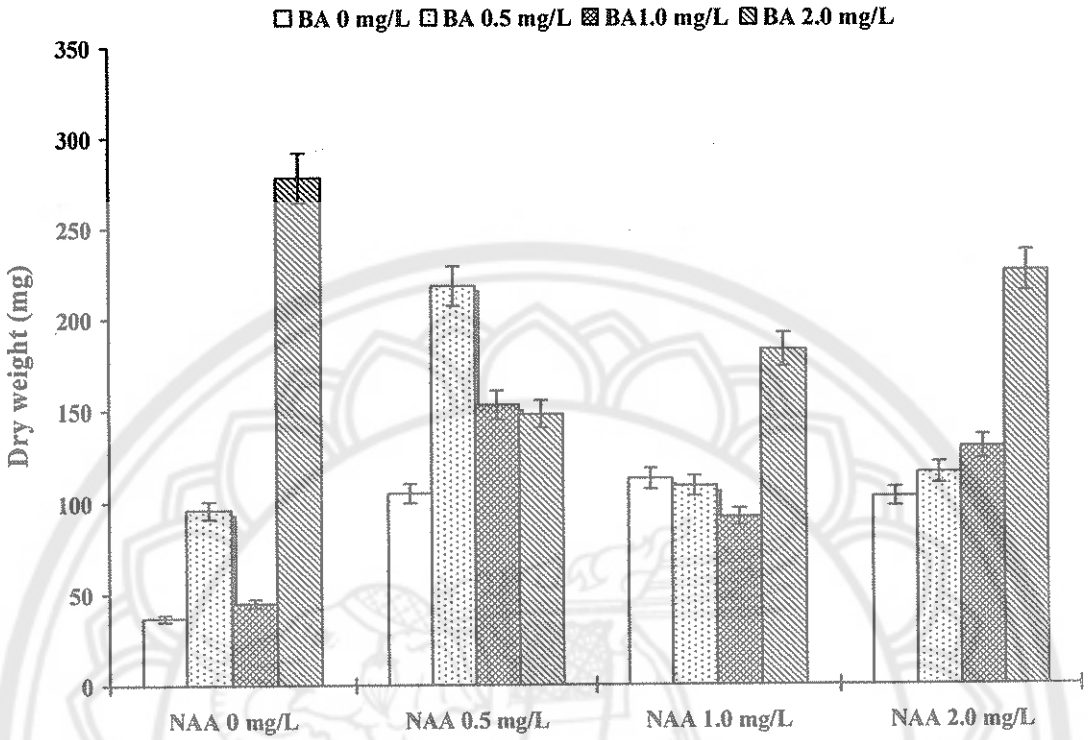
เป็นที่ทราบกันดีว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชีวมวล (Cell biomass) และปริมาณสารสำคัญนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักคือชนิดของฮอร์โมนที่นำมาใช้งานเนื่องจากมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิสมของพืช ในการศึกษานี้จึงออกแบบให้มีคู่ฮอร์โมนจำนวน 32 ทรีตเมนต์ เพื่อค้นหาคู่ฮอร์โมนและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตมวลชีวภาพ และผลิตสาร Phyllanthusol A แคลลัสของมะยมที่ชักนำและเพาะเลี้ยงทั้ง 32 สูตร จากขั้นตอนที่ 3.1.1 เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 6 สัปดาห์ นำมาทำแห้งด้วย Lyophilizer แล้วนำมาบดจนเป็นผงละเอียดแล้วชั่งน้ำหนักแต่ละตัวอย่าง พบว่าจากค่าน้ำหนักแห้งที่แสดงใน ภาพที่ 3.1.1 จะเห็นได้ว่า kinetin เดี่ยวที่ความเข้มข้นสูง (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้น้ำหนักแห้งสูงสุดในกลุ่ม (500 มิลลิกรัม) ซึ่งใกล้เคียงกับทรีตเมนต์ที่มี 0.5 kinetin มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ 2, 4-D ความเข้มข้นต่ำทุกความเข้มข้นแม้จะเติม kinetin ในอาหารด้วยก็ยังคงให้ชีวมวลต่ำ (100-150 มิลลิกรัม) ในกรณีฮอร์โมนเดี่ยวที่ความเข้มข้น 2, 4-D สูงขึ้นให้น้ำหนักแห้งลดลงและต่ำที่สุดที่ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทรีตเมนต์ที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรของ 2, 4-D ร่วมกับ kinetin (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักแห้งที่ได้เท่ากับ 613 มิลลิกรัม

ภาพที่ 3.1.2 แสดงผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสของมะยม ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ BA เดี่ยวที่ ความเข้มข้นสูงให้น้ำหนักแห้ง 278 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นน้ำหนักสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ของ

ฮอร์โมนคู่นี้ ระหว่างไซโทไคนินสองชนิดที่ใช้คือ kinetin และ BA นั้น kinetin ส่งเสริมการผลิตชีวมวลมากกว่า นอกจากนั้นระหว่างออกซิน 2,4-D และ NAA สังเกตพบว่าที่ NAA ทุกความเข้มข้นให้ชีวมวลในปริมาณต่ำเท่าๆกัน (100 มิลลิกรัม) แต่ 2,4 D นั้นให้น้ำหนักแห้งดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรของ 2,4-D (400 มิลลิกรัม) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาโดยรวมจะพบว่าคู่ฮอร์โมน 2, 4-D และ kinetin ให้ผลการผลิตชีวมวลเหนือกว่าคู่ของ BAและ NAA และปริมาณชีวมวลเมื่อเทียบกับการทดลองเปรียบเทียบแล้วพบว่าสูงกว่าถึง 16.5 เท่า



ภาพที่ 3.1.1 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ Kinetin และ 2, 4-D ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสของมะยม ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ (ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย n=3, ± SE, $p<0.5$)



ภาพที่ 3.1.2. ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสของมะยม ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ (ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย n=3, ± SE, $p<0.5$)

ว. QK
725
ด2115
2552

สำนักหอสมุด
i.4915306 c.3
10 ก.พ. 2553

3.1.3. ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ Kinetin, 2, 4-D, BA และ NAA ต่อการผลิตสาร Phyllanthusol A ของแคลลัสของมะยม

ในการศึกษานี้เลือกใช้ HPLC เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบและวิเคราะห์ปริมาณสาร Phyllanthusol A โดยเปรียบเทียบกับ retention time ของสารมาตรฐาน (ภาพที่ 3.1.3) ผลของฮอร์โมนต่อการผลิตสาร Phyllanthusol A แสดงไว้ในตารางที่ 3.1.1 และ 3.1.2 พบว่าเนื้อเยื่อแคลลัสของมะยมมีการผลิตสารในปริมาณ 0-20.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เนื้อเยื่อที่เจริญจากอาหารปราศจากฮอร์โมนสะสมสารในปริมาณต่ำ อยู่ในช่วงระหว่าง 0.016-0.071 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ผลของออกซินสองชนิด 2,4-D และ NAA พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน NAA ทุกความเข้มข้นกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงให้สังเคราะห์สาร Phyllanthusol A และปริมาณสารเพิ่มเป็นไปในทิศทางเดียวกับความเข้มข้นฮอร์โมน ในทางตรงกันข้าม 2,4-D มีผลให้ผลิตสารน้อยกว่าจนกระทั่งบางทรีตเมนต์ไม่สามารถตรวจพบสาร Phyllanthusol A ส่วนไซโทไคนิน กรณีของ kinetin มีผลต่อการกระตุ้นการผลิตสารน้อยมากจนกระทั่งถึงขั้นยับยั้งการผลิต ส่วน BA ให้ผลผลิตสารในปริมาณ 0.71, 0.27, 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งดีกว่า kinetin เพียงเล็กน้อย ในจำนวน 32 ทรีตเมนต์ อาหารที่มี NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BA (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลผลิตสาร 20.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เป็นที่น่าสังเกตว่าทรีตเมนต์ที่ส่งเสริมการผลิตชีวมวลจะไม่สนับสนุนการผลิตสาร Phyllanthusol A ซึ่งอาหารที่มี NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BA

(0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ปริมาณชีวมวลเพียง 100 มิลลิกรัมเท่านั้นในเวลาเพาะเลี้ยง 42 วัน

ตารางที่ 3.1.1 ผลของ NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆในการสะสม Phyllanthusol A ของแคลลัสที่พัฒนาจากก้านอ่อนมะยม ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 42 วัน.

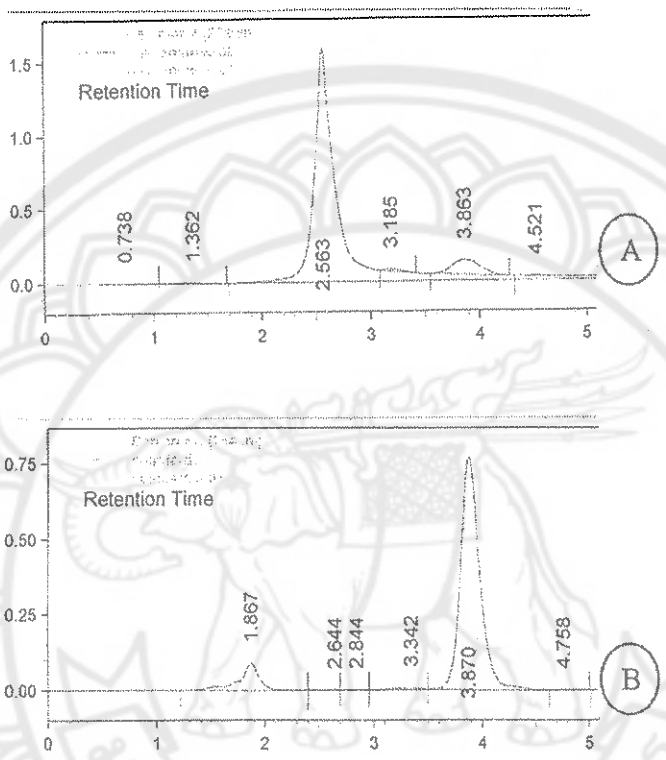
NAA (mg/l)	BA (mg/l)	Phyllanthusol A (mg/g DW)	NAA (mg/l)	BA (mg/l)	Phyllanthusol A (mg/g DW)
0	0	0.071^{d}	0	1.0	0.27^{d}
0.5	0	0.98^{d}	0.5	1.0	1.74^{d}
1.0	0	10.29^{c}	1.0	1.0	0.27^{d}
2.0	0	12.73^{b}	2.0	1.0	0.37^{d}
0	0.5	0.71^{d}	0	2.0	0.250^{d}
0.5	0.5	0.23^{d}	0.5	2.0	0.991^{d}
1.0	0.5	0.283^{d}	1.0	2.0	0.16^{d}
2.0	0.5	20.23^{a}	2.0	2.0	1.36^{d}

Means in the same column with different letter(s) differ significantly according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3.1.2 ผลของ2,4-D และ kinetinที่ความเข้มข้นต่างๆในการสะสม Phyllanthusol A ของแคลลัสที่พัฒนาจากก้านอ่อนมะยม ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 42 วัน.

2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)	Phyllanthusol A (mg/g DW)	2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)	Phyllanthusol A (mg/g DW)
0	0	0.016^{e}	0	1.0	ND
0.5	0	0.85^{bc}	0.5	1.0	0.15^{de}
1.0	0	0.720^{bcd}	1.0	1.0	ND
2.0	0	0.26^{cde}	2.0	1.0	1.14^{b}
0	0.5	0.80^{bc}	0	2.0	0.121^{de}
0.5	0.5	0.26^{cde}	0.5	2.0	1.12^{b}
1.0	0.5	0.29^{cde}	**1.0**	**2.0**	$\mathbf{10.22^{a}}$
2.0	0.5	ND	2.0	2.0	0.12^{de}

Means in the same column with different letters differ significantly according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$)



ภาพที่ 3.1.3 HPLC Chromatogram ของ Phyllanthusol A ในแคลลัสมะยม (A) Phyllanthusol A มาตรฐาน (B)

3.2 การศึกษาการผลิตสาร Phyllanthusol A ในรูปของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

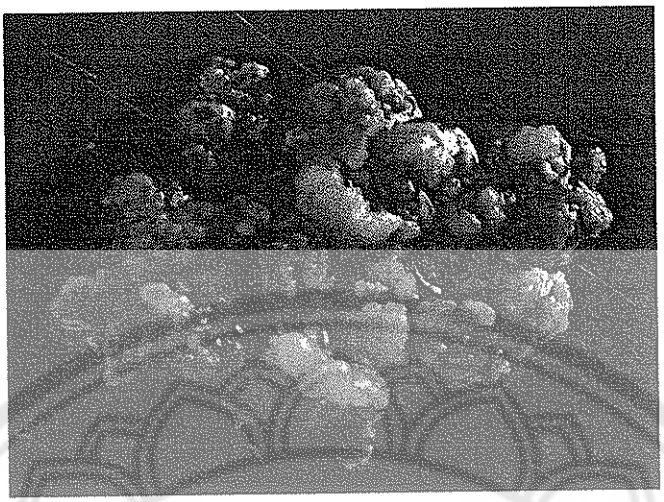
โดยทฤษฎีการนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นการทำให้กลุ่มเซลล์ในเนื้อเยื่อแคลลัสกระจายตัวออกจากกันและทำให้ในประชากรเซลล์นั้นมีจำนวนเซลล์เดี่ยวเพิ่มมากขึ้นและทำให้เซลล์แขวนลอยเป็นเนื้อเดียว (Uniformity) อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงจริงๆ นั้นเซลล์แขวนลอยจะยังคงมีกลุ่มเซลล์ที่เกาะตัวกันเจือปนอยู่บ้างในระดับที่ยอมรับได้ (fine suspension) เซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยเป็นรูปแบบที่สามารถใช้ในการขยายขนาดการผลิตสารทุติยภูมิจากเซลล์พืชเพาะเลี้ยงได้ดีกว่าแคลลัส [29] (Robert D Hall) ในการศึกษานี้มุ่งศึกษาถึงผลของฮอร์โมนเดี่ยวคือ 2, 4-D และ NAA ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของมะยม โดยเก็บข้อมูลรูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยง รวมทั้งการผลิตสาร

3.2.1 การชักนำและลักษณะของเซลล์แขวนลอยมะยม

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D และ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรอายุ 45 วัน มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ที่เกาะกันอย่างเหนียวแน่นสีเขียวอ่อนเมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันโดยบ่มในตู้มีความเร็วรอบการเขย่าที่ 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 24±1 องศาเซลเซียส พบว่ากลุ่มเซลล์เปลี่ยนสีไปเป็นสีครีมทำการเปลี่ยนอาหารและกรองเซลล์จนได้เซลล์แขวนลอยที่ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 3.2.1-3.2.3) ทดลองเพาะเลี้ยงต่อเนื่องในระยะเวลา 30 วัน พบว่าหลังจาก 20 วัน เซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม จึงเลือกระยะเวลาในการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตโดยมีระยะเวลาเพาะเลี้ยง 20 วัน

ภาพที่ 3.2.1 ลักษณะแคลลัสมะยมที่ย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน

ภาพที่ 3.2.2 ลักษณะเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน กลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงเกาะกันหลวมๆมีบางส่วนพัฒนาเป็นราก



ภาพที่ 3.2.3 ลักษณะเซลล์หลังการเพาะเลี้ยง 20 วัน กลุ่มเซลล์สีน้ำตาลแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อสีครีม

3.2.2 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยมะยม

ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยเซลล์ไลน์ NUNA 1 และ 2 มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะกันหลวมๆ ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์สีครีมและสีน้ำตาลในขณะที่เซลล์ไลน์ NUD 1 และ 2 ให้กลุ่มเซลล์สีครีมและน้ำตาลจางๆ อาหารเพาะเลี้ยงมีสีน้ำตาลเข้มมากขึ้นตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่นานขึ้นและหลังจาก 20 วันเซลล์ตายเกิดขึ้นจำนวนมาก การเจริญเติบโตวัดจากตัวแปรสองค่าคือ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยต่อฟลาสก์ โดยเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 วัน ค่า pH เริ่มต้นที่ 5.8 ในทุกระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวเซลล์วัดซ้ำพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH

ตารางที่ 3.2.1 และ 3.2.2 แสดงค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมะยมในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 20 วัน น้ำหนักสดเริ่มต้นที่ 1 กรัม เซลล์ไลน์ NUNA 1 ให้น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นในปริมาณเกือบสองเท่าคือ 1.93 กรัม ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 20 วัน และเป็นปริมาณเซลล์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกเซลล์ไลน์ที่นำมาศึกษา และเซลล์ไลน์ NUD 1 ให้น้ำหนักสดต่ำสุด 1.23 กรัม (ภาพที่ 3.2.5) น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมะยม ของเซลล์ไลน์ NUNA 1 ที่เวลาเพาะเลี้ยง 18 วันให้น้ำหนักแห้งสูงสุด 0.187 กรัม และ 0.178 กรัม จาก NUD2 (ภาพที่ 3.2.5) อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งประมาณ 1.8 เท่าของน้ำหนักเซลล์เริ่มต้น

จากข้อมูลในตารางที่ 3.2.3 แสดงปริมาณน้ำ (water content (%)) ในเซลล์แขวนลอยมะยมสังเกตได้ว่าเซลล์แขวนลอยของเซลล์ไลน์ NUNA1 และ NUNA2 มีปริมาณน้ำเป็นองค์ประกอบ 88.25-93.3 % มีน้ำหนักแห้งหรือชีวมวลของเซลล์แขวนลอย 9.25-10.32 % เซลล์ไลน์ NUD1 และ NUD2 ซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบ 86.4-94.6 % และให้ชีวมวลเพียง 7.87 - 8.71 %

เนื่องจากเซลล์แขวนลอยถูกชักนำจากแคลลัสต้นตอที่เลี้ยงในอาหาร MS สูตรที่เติม NAA หรือ 2, 4-D เดี่ยว ในความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในการทดลอง ดังนั้นจึงทำการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของแคลลัสทั้งในรูปน้ำหนักสดและแห้งไว้ด้วยดังแสดงในภาพที่ 3.2.6 และ 3.2.7 ผลปรากฏว่าน้ำหนักสดแคลลัสที่เจริญบนอาหารสูตร MS + 2, 4-D ในเวลาการเพาะเลี้ยง 28 วันสามารถวัดน้ำหนักสดได้ 2.03 กรัม ซึ่งเป็น 3 เท่า ของน้ำหนักแคลลัสที่ใช้เริ่มต้นการทดลอง (ต่อหน้า 37)

ตารางที่ 3.2.1 แสดงน้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอยมะยมที่เก็บข้อมูลทุกๆ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2 วันในระยะเวลา 20 วัน

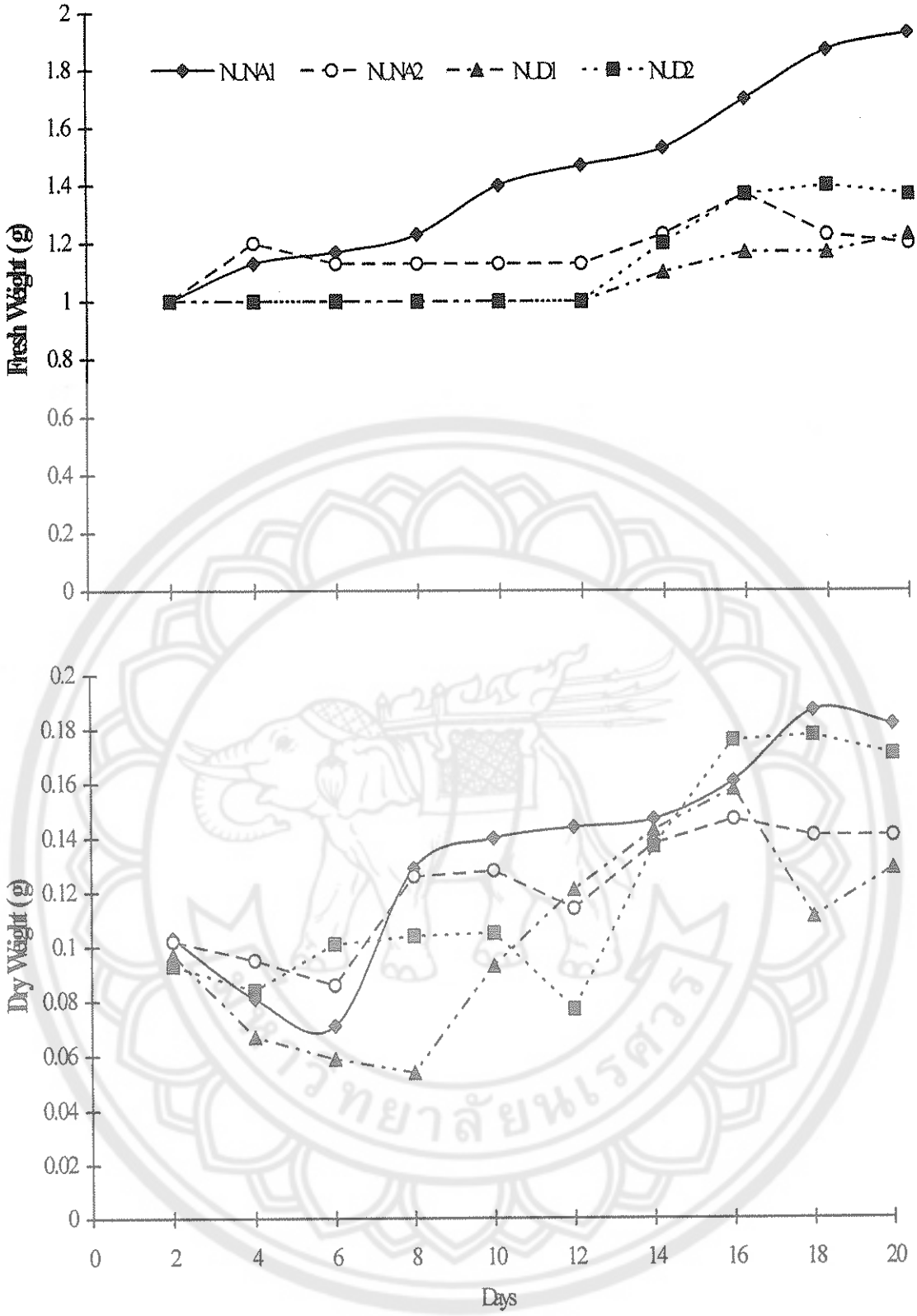
Fresh weight (g)									
2 days	**4 days**	**6 days**	**8 days**	**10 days**	**12 days**	**14 days**	**16 days**	**18 days**	**20 days**
NUNA1 1	1.13	1.17	1.23	1.4	1.47	1.53	1.7	1.87	1.93
NUNA2 1	1.2	1.13	1.13	1.13	1.13	1.23	1.37	1.23	1.2
NUD1 1	1	1	1	1	1	1.1	1.17	1.17	1.23
NUD2 1	1	1	1	1	1	1.2	1.37	1.4	1.37

ตารางที่ 3.2.2 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมะยมที่เก็บข้อมูลทุกๆ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2 วันในระยะเวลา 20 วัน

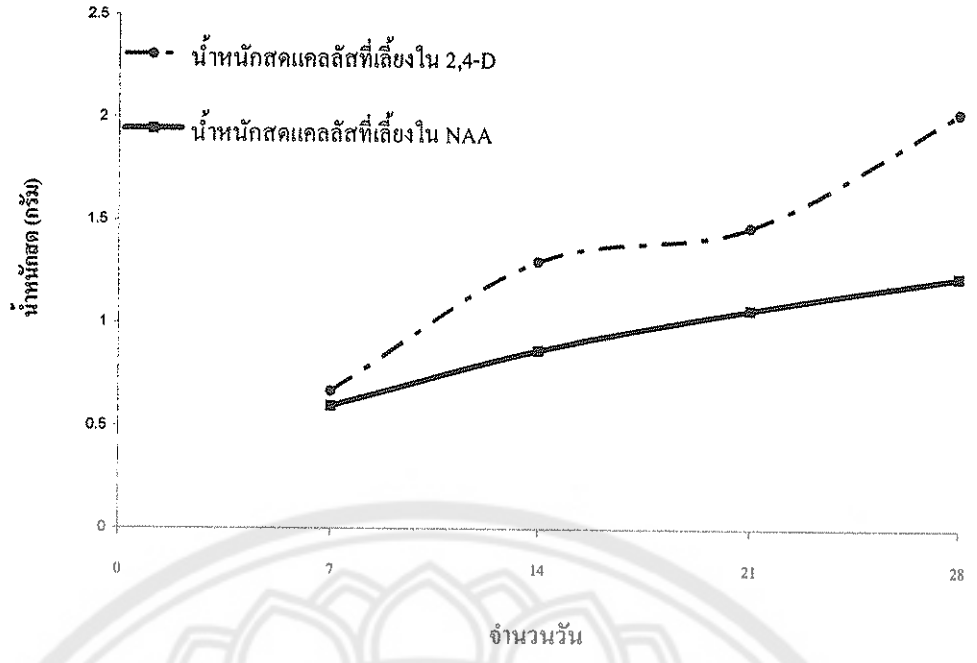
Dry weight (g)									
2 days	**4 days**	**6 days**	**8 days**	**10 days**	**12 days**	**14 days**	**16 days**	**18 days**	**20 days**
NUNA1 0.103	0.081	0.071	0.129	0.14	0.144	0.147	0.161	0.187	0.182
NUNA2 0.102	0.095	0.086	0.126	0.128	0.114	0.138	0.147	0.141	0.141
NUD1 0.097	0.067	0.059	0.054	0.093	0.121	0.143	0.158	0.111	0.129
NUD2 0.093	0.084	0.101	0.104	0.105	0.077	0.137	0.176	0.178	0.171

ตารางที่ 3.2.3 ปริมาณน้ำ (water content (%)) ในเซลล์แขวนลอยมะยม

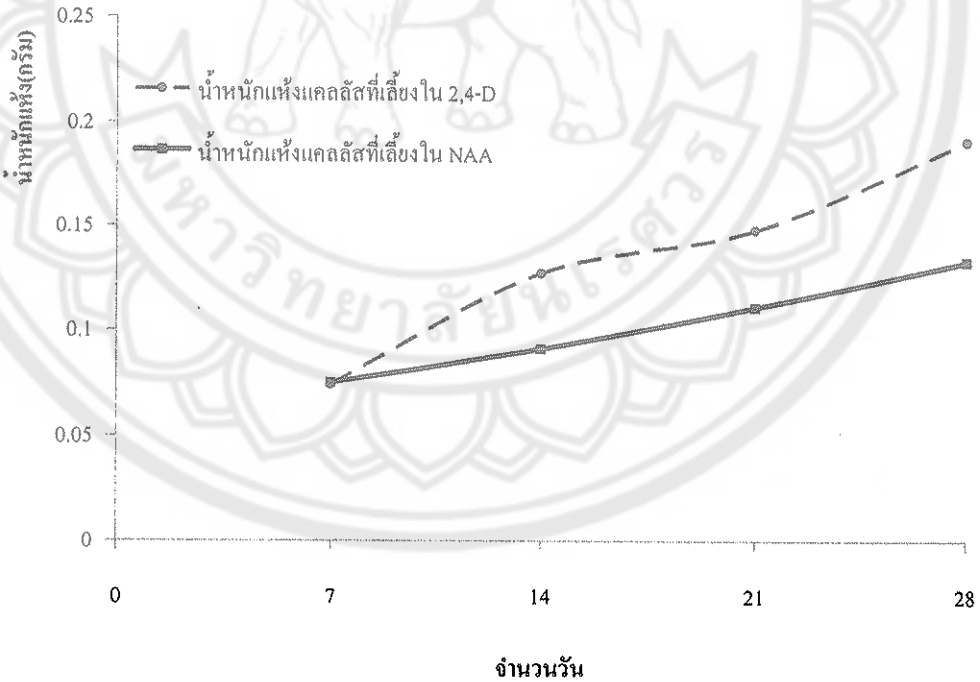
Water content (%)										
2 days	**4 days**	**6 days**	**8 days**	**10 days**	**12 days**	**14 days**	**16 days**	**18 days**	**20 days**	**Dry biomass (%)**
NUNA1										
89.7	92.8	93.9	89.5	90	90.2	90.39	90.5	90	90.5	**9.25**
NUNA2										
89.8	92	92.38	88.84	88.67	89.9	89.2	89.27	88.5	88.25	**10.32**
NUD1										
90.3	93.3	94	94.6	90.7	87.9	95.7	86.4	90.5	89.5	**8.71**
NUD2										
90.7	91.1	89.9	89.6	89.5	92.3	88.58	87.15	87.28	87.5	**7.87**



ภาพที่ 3.2.5 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยมะยมในรูปของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อฟลาสก์) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2-20 วันและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D หรือ NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร)



ภาพที่ 3.2.6 รูปแบบการเจริญเติบโตโดยแสดงเป็นน้ำหนักสดของแคลลัสมะยมที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลาระยะเวลา 28 วัน



ภาพที่ 3.2.7 รูปแบบการเจริญเติบโตของแคลลัสมะยมโดยแสดงเป็นน้ำหนักแห้งของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 28 วัน

ตารางที่ 3.2.4 แสดงปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมะยมที่เก็บตัวอย่างทุกๆระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 วันในระหว่างเวลา 4 สัปดาห์

Cell biomass (g)	**7 days**	**14 days**	**21 days**	**28 days**
Fresh weight				
MS+ 2,4-D	0.67	1.3	1.47	2.03
MS+NAA	0.6	0.87	1.07	1.23
Dry weight				
MS+ 2,4-D	0.074	0.127	0.148	0.191
MS+NAA	0.075	0.091	0.111	0.133

ตารางที่ 3.2.5 ปริมาณน้ำ (water content (%)) ในแคลลัสมะยมที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 2 สูตรคือ MS+ 2, 4-D และ MS+NAA

สูตรอาหาร	7 days	14 days	21 days	28 days	Dry Cell biomass (%)
MS+ 2,4-D	88.96	90.3	90	94	**10**
MS+NAA	87.5	89.6	89.7	89.2	**11**

ส่วนแคลลัสในอาหารสูตร MS+NAA เมื่อเพาะเลี้ยง 28 วัน มีน้ำหนักสด 1.23 กรัมซึ่งน้ำหนักเพิ่มขึ้นประมาณ 1.46 เท่าของน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น

ในกรณีแคลลัสของสูตรอาหาร MS+ 2,4-D ให้น้ำหนัก 0.191 กรัมในวันเพาะเลี้ยงที่ 28 จากน้ำหนักแคลลัสแห้งเริ่มต้น 0.05 กรัม ดังนั้นคิดเป็น 2.82 เท่า และสูตร MS+NAA สร้างผลผลิตชีวมวลเป็นน้ำหนักแห้ง 0.133 กรัม คิดเป็น 2.66 เท่า และเมื่อพิจารณาในตารางที่ 3.2.5 แสดงปริมาณน้ำ (water content (%)) ในแคลลัสมะยมพบว่ามีปริมาณ 10 และ 11 % ตามลำดับ ชีวมวลของแคลลัสนั้นมีแนวโน้มผลิตได้สูงในอาหาร MS+ 2,4-D และปริมาณน้ำต่ำกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในสูตร MS+NAA

3.2.3 การสะสมสาร Phyllanthusol A ในเซลล์แขวนลอยมะยม

ตรวจสาร Phyllanthusol A ในสารสกัดเมทานอลจากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยและจากอาหาร ทำการเก็บตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงอายุ 7, 14 และ21 วัน มาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานในที่นี้ใช้สาร Phyllanthusol A ที่สกัดจากรากมะยมและผ่านการแยกจนบริสุทธิ์ จากผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 1 พบว่าเซลล์แขวนลอยมะยมทุกเซลล์ไลน์มีการสะสมสารในเซลล์ เช่น เซลล์ไลน์ NUNA1, NUD1 และ NUD2 พบสาร Phyllanthusol A ในเซลล์ในปริมาณ 0.595, 0.203 และ 0.102 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับที่เวลาการเพาะเลี้ยง 7 วัน ส่วนเซลล์ไลน์ NUNA2 สะสมสารในเซลล์ในปริมาณ 0.079 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา

14 วัน เมื่อตรวจสารในอาหารเพาะเลี้ยงพบว่ามีเพียงเซลล์ไลน์เดียวเท่านั้นที่หลั่งสารจากเซลล์สู่อาหารคือ NUNA2 โดยมีปริมาณสาร 0.012 และ 0.004 มิลลิกรัมในปริมาตรอาหารจำนวน 10 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 7 วัน และ 14 วัน ตามลำดับ เมื่อรวมปริมาณสารทั้งหมดที่ผลิตจากเซลล์ไลน์นี้เท่ากับ 0.095 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบทุกเซลล์ไลน์ เซลล์ไลน์ NUNA1 ให้ปริมาณสารสูงสุดคือ 0.595 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสาร Phyllanthusol A ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยมะยมและในอาหารเพาะเลี้ยง

Cell lines	Phyllanthusol A (mg/g DW) (cells)			Phyllanthusol A (mg/10ml) (medium)		
	7 Days	14 days	21 days	7 days	14 days	21 days
NUNA1	0.595	0	0	0	0	0
NUNA2	0	0.079	0	0.012	0.004	0
NUD1	0.203	0	0	0	0	0
NUD2	0.102	0	0	0	0	0
Callus cultures MS+2,4-D (control)	Phyllanthusol A content = 0.26 mg/g DW					
Callus cultures MS+NAA (control)	Phyllanthusol A content =12.73 mg/g DW					

3.3. การชักนำ Hairy root โดย *Agrobacterium* sp.

จากการศึกษาทั้งในแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของมะยมจะเห็นได้ว่าการสะสมสาร Phyllanthusol A ยังคงมีปริมาณน้อย การทำการชักนำ Hairy root โดย *Agrobacterium* sp. จึงเป็นหัวข้อที่น่าสนใจศึกษาอีกเรื่องหนึ่ง เนื่องจากในสภาพปกติสาร Phyllanthusol A นั้นสะสมในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ในส่วนของรากจากต้นมะยมแก่ การทดลองในขั้นนี้จึงมุ่งหมายที่จะศึกษาหาวิธีการ transformation เนื้อเยื่อมะยมเพื่อชักนำ Hairy root อย่างไรก็ตามเชื้อ *Agrobacterium* sp.ที่นำมาใช้งานนั้นมีทั้งสองกลุ่มคือกลุ่ม *A. rhizogenes* ที่มีผลชักนำ Hairy root และ *A. tumefaciens* ชักนำเนื้อเยื่อปุ่มปม (Gall) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

3.3.1 ผลของเชื้อ *Agrobacterium* sp ที่มีต่อการ transformation ของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงมะยม

นำเชื้อ *Agrobacterium* sp จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ TISTR507, TISTR509, TISTR510, TISTR511, TISTR1405 และ TISTR1099 ใช้เป็นเครื่องมือในการ transformation พบว่าเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ได้แก่ 1) ก้านอ่อน 2) แคลลัส 3) ใบ โดยใช้เวลา Co-cultivation 48 ชั่วโมง ผลการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อไปเป็นปุ่มปม (gall) ในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากย้ายลงในอาหารที่มีสารแอนติไบโอติก carbenicillin (500 mg/L) โดยเชื้อ TISTR1099 (*Agrobacterium radiobacter*) ให้เปอร์เซ็นต์การชักนำ Gall จากก้านอ่อน 73.3 % ซึ่งเร็วที่สุด ส่วนเชื้ออื่นๆ พบเนื้อเยื่อ Gall ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเหลือ

เปอร์เซ็นต์ของการ transformation ดังตารางที่ 3.3.1 โดยเชื้อ TISTR1099 (*Agrobacterium radiobacter*) แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด Gall สูงสุดคือ 20 % แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในระยะยาวยังมีปัญหาการปนเปื้อนเชื้อ และยังไม่มีการชักนำ Hairy roots ของก้านมะยม หรือใบ หรือแคลลัส เก็บ Gall ที่เกิดจากการ Transformation ด้วย TISTR1099 และ TISTR1405 (*Agrobacterium rhizogenes*) วิเคราะห์ปริมาณสาร Phyllanthusol Aพบว่า Gall ทั้งสองสายพันธุ์ ให้สารน้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม

2, 4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Gall (TISTR1099) ให้สาร 0.039 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วน Gall (TISTR1405) ไม่พบการสะสมสาร

ตารางที่ 3.3.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การ transformation จากก้านอ่อนมะยมในอาหาร MS ไม่เติมฮอร์โมนในเวลาเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

BACTERIAL STRAINS	PERCENTAGES OF PETIOLES FORMING GALL
TISTR507	13
TISTR509	16.7
TISTR510	6.7
TISTR511	6.7
TISTR1405	10
TISTR1099	20

ตารางที่ 3.3.2 ปริมาณสาร Phyllanthusol A ในเนื้อเยื่อ Gall ที่พัฒนามาจากก้านอ่อนมะยม transformed ด้วย TISTR1099 (*Agrobacterium radiobacter*), และ TISTR1405 (*Agrobacterium rhizogenes*)

Bacterial strains	**Phyllanthusol A (mg/g DW)**
Callus cultures	
(MS + 2,4-D 2 mg/L)	0.160
TISTR1405	0
TISTR1099	0.039

บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

4.1. การศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อการผลิตสาร Phyllanthusol A ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ออกซินและไซโทไคนินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สำคัญในการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชไปเป็นอวัยวะต่างๆ จากการศึกษาพบว่าเมื่อออกซินทำงานร่วมไซโทไคนินจะกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตแคลลัส เซลล์แขวนลอย และ ควบคุมการพัฒนาไปเป็นอวัยวะของเนื้อเยื่อพืชเพาะเลี้ยง ออกซินมีผลในระดับเซลล์คือเร่งการแบ่งเซลล์ (Cell division) การยืดยาวของเซลล์ ทั้งนี้ออกซินไปเร่งเซลล์เจริญให้เกิดการแบ่งเซลล์แล้วเปลี่ยนไปเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อหลวมๆหรือ เปลี่ยนเป็นอวัยวะได้ [30] (Edwin) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ 2, 4-D, NAA, BA, kinetin โดยจัดความเข้มข้นต่างๆ 32 ทรีตเมนต์ เพื่อสังเกตผลของทั้งฮอร์โมนเดี่ยวและการทำงานร่วมกันของคู่ฮอร์โมนต่อชีวมวลและสาร Phyllanthusol A จากแคลลัสมะยมดังได้กล่าวผลในรายละเอียดแล้วในบทที่ 3 และพบว่าฮอร์โมนเหล่านี้ก็มีผลให้แคลลัสของพืชหลายชนิดสะสมสารทุติยภูมิต่างๆ กันออกไปเช่น แคลลัสของ *Nandina domestica* เพาะเลี้ยงในอาหาร MS+ 2, 4-D (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ kinetin (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผลิตอัลคาลอยด์ (alkaloids) [31] แคลลัสของ *Panax ginseng* เพาะเลี้ยงในอาหาร MS + 2, 4-D (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผลิตซาโปนิน (saponins) และซาโปจินิน (sapogenins) แคลลัสของ *Papaver bracteatum* เพาะเลี้ยงในอาหาร MS + 2, 4-D (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผลิตเทบาอีน (Thebaine) [32]

แคลลัสของ *Papaver somniferum* L. เพาะเลี้ยงในอาหาร MS + kinetin (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผลิตอัลคาลอยด์ [33] แคลลัสของ *Citrus sp.* เพาะเลี้ยงในอาหาร MS + 2, 4-D (0.66 มิลลิกรัมต่อลิตร) + kinetin (1.32มิลลิกรัมต่อลิตร) นาริงจิง (naringin) ลิโมนีน (limonine) [34]

4.2 การศึกษาการผลิตสาร Phyllanthusol A ในรูปของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยมะยมแสดงให้เห็นว่ามีระยะของรอบการเจริญเติบโตสั้นกว่าการเจริญของแคลลัส ซึ่งระยะการเจริญใช้เวลาเพียง 20 วัน แต่การเจริญของแคลลัสระยะการเก็บข้อมูล 28 วัน เซลล์ยังคงแสดงการเจริญในอัตราสูง แต่จากการสังเกตรอบการเพาะเลี้ยงของแคลลัสนั้นเนื้อเยื่อจะเริ่มเป็นสีน้ำตาลหลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้ว 60 วัน นอกจากนั้นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงรูปแบบแคลลัสให้ชีวมวลในรูปน้ำหนักแห้งดีในอาหารสูตร MS + 2, 4-D (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่ในทางตรงกันข้ามเซลล์แขวนลอยกลับให้น้ำหนักแห้งดีกว่าในอาหาร MS + NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร)

รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยมะยมปกติจะต้องผ่านระยะการเจริญเติบโตในระยะต่างๆ ได้แก่ แลคเฟส (lag phase) เอกโพเนนเชียลเฟส (exponential phase) ลิเนียร์เฟส (linear phase) และ สเตชันนารีเฟส (stationary phase) จากผลของน้ำหนักเซลล์แห้งในรูปที่ 5 นั้นชี้ให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละเซลล์ไลน์มีระยะแลคเฟสซึ่งเป็นระยะที่เซลล์เจริญอย่างช้าๆ แตกต่างกันไป เซลล์ไลน์ NUD2 มีระยะแลคเฟสสั้นที่สุดคือ 4 วัน เซลล์ไลน์ NUD1, NUNA1 มีระยะเวลาแลคเฟส 6 วัน และ NUNA2 ใช้เวลาในระยะแลคเฟส 8 วัน ต่อจากระยะแลคเฟสเซลล์เข้าสู่ระยะเอกโพเนนเชียลเฟส

ใช้เวลาสั้นๆ ในระยะนี้คือประมาณ 2 วันจากนั้นเซลล์เข้าระยะเจริญช่วงลิเนียร์เฟส โดยพบว่า NUNA1 เข้าระยะนี้ที่ช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงระหว่าง 8-18 วัน NUD1 เข้าระยะลิเนียร์ที่ 10-16 วัน และหลัง 17 วันทุกเซลล์ไลน์เข้าระยะสเตชันนารีเฟส ในระยะแรกจะพบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงในช่วง 4, 6, 8 วันทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการใช้เซลล์เริ่มต้นในปริมาณน้อยทำให้เซลล์แขวนลอยที่ได้มีปริมาณความหนาแน่นเซลล์ต่ำจึงเกิดการลดลงของน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงแลคเฟสแต่เมื่อผ่านไประยะหนึ่งเซลล์ก็เจริญเติบโตได้ในที่สุด [29] เป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์ไลน์ที่เริ่มต้นเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ตลอดรอบการเพาะเลี้ยงคือเซลล์ไลน์ NUNA1 และ เซลล์ไลน์ NUD1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ตลอดรอบการเพาะเลี้ยงเช่นกันให้ปริมาณเซลล์แห้งซึ่งเป็นชีวมวลในระบบนี้สูงกว่าเซลล์ไลน์ NUNA2 และ NUD2 ที่มีการย้ายลงอาหารที่สลับชนิดฮอร์โมนกับสูตรอาหารที่ใช้เป็นสูตรเริ่มต้นดังนั้นฮอร์โมนที่แตกต่างกันนี้จึงมีผลทำให้การผลิตชีวมวลน้อยลง เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของมะยมมีรอบการเจริญยาวนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรอบการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยของแพงพวยซึ่งใช้เวลาจากแลคเฟสไปถึงสเตชันนารีเฟสเพียง 8 วัน [35] (Zhao et al., 2001)

เมื่อพิจารณาปริมาณสารในเซลล์เพาะเลี้ยงมะยมแบบแขวนลอยเซลล์ไลน์ที่เจริญในอาหารที่มีฮอร์โมนออกซินชนิด NAA สามารถผลิตสาร Phyllanthusol A ได้มากกว่าเซลล์ไลน์ที่เจริญในอาหารที่มี 2, 4-D ประมาณ 2.4 เท่า ผลเช่นนี้เกิดขึ้นในทิศทางเดียวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ของพืชหลายชนิดเช่นการเพาะเลี้ยง *Podophyllum peltatum*,

Juniperus chinensis เพื่อผลิต podophyllotoxin [36-37] (Kadkade, 1971 ; Premjet et al., 1999) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์มะยมให้มีการผลิตสารนั้นขึ้นกับเซลล์ไลน์ที่นำมาเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นอย่างยิ่ง ทั้งนี้ในการตรวจสารหลายๆ ครั้งที่ต่างรอบการเพาะเลี้ยงมีบางครั้งตรวจไม่พบสาร Phyllanthusol A อาจเนื่องมาจากกลุ่มเซลล์นั้นประกอบด้วยเซลล์หลายเซลล์ที่มีพันธุกรรมที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (heterogeneous of cell lines) ในขณะที่เซลล์มีการสร้างสาร Phyllanthusol A สังเกตพบว่าทั้งอาหารและเซลล์เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคาดว่ามีการสะสมสารอื่นๆ เช่น ฟีนอลิกร่วมด้วยทำให้เป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เนื่องจากสารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ความรู้นี้ยืนยันได้เป็นอย่างดีถึงคุณค่าของมะยมซึ่งเป็นทรัพยากรพืชที่หาได้ง่ายในประเทศไทยและพืชชนิดนี้ยังมีศักยภาพไม่ห่างไกลที่จะพัฒนาไปผลิตสารสำคัญที่มีมูลค่าสูง

รอบการเจริญเติบโตของเซลล์มะยมเพาะเลี้ยงมีระยะเวลา 20 วัน และควรจะมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 14 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์อยู่ในระยะการเจริญแบบลิเนียร์ จะทำให้ระยะแลคเฟสของเซลล์รอบต่อไปสั้นลง การผลิตสาร Phyllanthusol A ส่วนใหญ่มีการผลิตและสะสมที่เซลล์ นอกจากนั้นฮอร์โมนที่เหมาะสมคือ NAA ในความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาแสดงว่าเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยมีศักยภาพต่อการผลิตสาร Phyllanthusol A ในระดับห้องปฏิบัติการ

4.3. การชักนำ Hairy root โดย *Agrobacterium* sp.

การศึกษานี้ยังมีอุปสรรคในกรณีของเชื้อ *Agrobacterium* sp. เจริญเติบโตช้า และวิธีการ transformation ยังไม่สามารถแก้ไขปัญหา contaminate ได้ และ ต้องตรวจสอบว่าเชื้อนั้นมี Ti, Ri พลาสมิดหรือไม่

สรุปผลการทดลอง

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS มีออกซินและไซโทไคนินที่เหมาะสม (MS +NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) + BA(0.5มิลลิกรัมต่อลิตร) กระตุ้นให้แคลลัสสังเคราะห์สารดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในรูปแบบแขวนลอย และเนื้อเยื่อ Gall ที่ผ่านการ transformation โดย *Agrobacterium* sp. โดยแคลลัสมีปริมาณสาร Phyllanthusol A 20.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนเซลล์แขวนลอยมีสาร 0.595 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ Gall วัดปริมาณสารได้ 0.039 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่รูปแบบที่ใช้เวลาการเพาะเลี้ยงน้อยที่สุดสามารถลดเวลาลงเป็นครึ่งหนึ่งของแคลลัสและมีการหลั่งสารสู่อาหารคือรูปแบบแขวนลอยซึ่งใช้เวลาเพาะเลี้ยงเพียง 20 วัน การศึกษาขั้นต่อไปควรเน้นที่การปรับปรุงผลผลิตโดยการเติมสารอินทรีย์ หรือ อิลิซิเตอร์

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์ (2544) ชื่อพรรไม้แห่งประเทศไทย ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้
2. Lemmens R HMJ (1999) PROSEA: Medicinal and Poisonous Plants 1. Backhuys Publishers, Leiden
3. Vongvanich N, P. Kittakoop, J. Kramyu, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth (2000) Phyllanthusols A and B, Cytotoxic Norbisabolane Glycosides from *Phyllanthus acidus* Skeels. J. Org. Chem. 65: 5420-5423.
4. Sengupta P, and Mukhopadhyay J (1966) terpenoids and related compounds-VII: Triterpenoids of *Phyllanthus acidus* Skeels. Phytochemistry. 5 (3): 531-534.
5. Holden MA, Holden PR, and Yeoman MM (1988) Manipulating Secondary Metabolism in Culture: Variation in the secondary metabolism of Cultured Plant Cells. Cambridge University Press, Cambridge. 15-29.
6. Rao RS, and Ravishankkar GA (2002) Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances. 20: 101-153.
7. ดวงพร เปรมจิต (2548) รายงานการวิจัย เรื่อง การผลิตสาร Phyllanthusol A จากเซลล์เพาะเลี้ยงมะยม
8. Pollard JW, and Walker JM (1990) Methods in Molecular Biology 6; Plant Cell and Tissue culture. Humana Press, Clifton.
9. Toivonen L (1993) Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. Biotechnol Prog. 9:12–20
10. Srivastava PS (1998) Plant tissue culture and molecular biology. Narosa Publishing house.
11. Alfermann AW, and Petersen M (1995) Natural products formation by plant cell biotechnology. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 43: 199 - 205.
12. DiCosmo F, and Misawa M (1995) Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. Biotechnol. Adv., 13: 425–453

13. Fujita Y, Takahashi S, and Yamada Y (1985) Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives through protoplast of *Lithospermum erythrorhizon*. *Agric Biol Chem.* 49: 1755-1759.

14. Fujita Y (1988) Industrial production of shikonin and berberine. Applications of Plant Cell and Tissue culture; Ciba Foundation Symposium 137. John Wiley & Sons, New York.

15. Ravishankar GA, and Venkataraman LV (1999) Role of plant cell culture in food biotechnology: current trends, limitations and future prospects. In: Prakash J, Pierik RLM, editors. Plant biotechnology: commercial prospects and problems. New Delhi: Oxford IBH Press. 255-74.

16. Dornenburg H, Knorr D (1997) Production of the phenolic flavour compounds with cultured cells and tissues of *Vanilla planifoolia* species. Food Biotechnol.10:75-92.

17. Zhao J, Zhu WH, and Hu Q (2001) Enhanced catharantine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. Enzyme and Microbial Technology. 28:673-681.

18. Fett-Neto, A.G., Melanson, S.J., Sakata, K., & Dicosmo, F. (1993). Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. Bio/Technology. 11:732-734.

19. Kadkade PG (1982) Growth and podophyllotoxin production in callus tissues of Podophyllum peltatum. Plant Science Letters. 25: 107–115.

20. Broomhead AJ, and Dewick PM (1990) Aryltetralin lignans from Linum fluvum and Linum capitatum. Phytochemistry. 29:3828-3844.

21. Premjit D, Itoh K, and Tachibana S (2001) Production of Podophyllotoxin in Juniperus Chinensis cell suspension cultures treated with biogenetic precursors and chito-oligosaccharides. In: abstract of the 51st Annual Meeting of the Japan Wood Research Society, Tokyo.

22. Kittipongpatana N, Hock RS, and Porter JR. (1998) Production of Solasodine by Hairy Root Cultures of *Solanum aviculare* Forst. Plant Cell Tissue and Organ Cultures. 11: 113-143.

23. Kawaguchi K, Hirotani M, Yoshikawa T, and Furuya T (1990) Biotransformation of digitoxigenin in ginseng hairy root cultures. Phytochemicals. 29: 837-43.

24. Clinton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse Delbart F, and Tempe J (1982) Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into genomes of the host plants root cells. Nature. 295:432-434

25. Zambryski P, Tempe J, and Schell J (1989)Transfer and function of T-DNA genes from agrobacterium Ti and Ri plasmids in plants. Cell. 56:193–201

26. Catapan, E., M.F. Otuki and A.M. Viana, 2001. *In vitro* Culture of *Phyllanthus stipulatus* Fitoterapia. 73: 32-39.(Euphorbiaceae). Revta brasil. Bot. 24(1): 25-34.

27. Catapan, E., L. Marcio, B. Silva, F.N. Moreno and A.M. Viana, 2002. Micropropagation, Callus and Root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70: 301-309.

28. Liang, O.P. and C.H. Lai, 2006. *In vitro* Plant regeneration, Flowering and Fruiting of *Phyllanthus niruri* L (Euphorbiaceae). Intl. J. Bot., 2(4): 409-414.

29. Robert D Hall (1991). The initial and maintenance of plant cell suspension cultures. Plant Tissue Culture Manual A3; 1-21. Netherlands: Kluwer Academic Publish.)

30. Edwin FG, Michel AH, and Geert JK (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition, Springer, Netherlands.

31. Ikuta A, and H. Itokawa. (1988) Alkaloids of tissue cultures of *Nandina domestica*. Phytochemistry. 27(7): 2143-2145.

32. Furuya, T., H. Kojima, K. Syono, T. Ishi, K. Uotani, and M. Nishio. (1973) Isolation of saponin and sapogenins from callus tissue of *Panax ginseng*. Chem. Pharm. Bull. 21: 98-101.

33. Furuya, T., A. Ikuta, and K. Syono. (1972) Alkaloids from callus cultures of *Papaver somniferum*. Phytochemistry 11: 3041-3044

34. Barthe, G.A., P.S. Jourdan, C.A. McIntosh, and R.L. Mansell. (1987) Naringin and limonin production in callus cultures and regenerated shoots from *Citrus* sp. J. Plant Physiol. 127:55-65.

35. Zhao, J., Zhu, W.H., and Hu, Q. (2001). Enhanced catharantine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 673-681.

36. Kadkade, P.G. (1971). Formation of Podophyllotoxins by *Podophyllum peltatum* Tissue Cultures. *Naturwissenschaften*, *68*, 481-482.

37. Premjet, D., Miyata, M., Itoh, K., and Tachibana, S. (1999, June). *Production of Biologically Active Substances by Callus cultures of Byakushin* (*Juniperus chinensis* L.). Paper presented at the International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Yokohama.

Output ที่ได้จากโครงการ

-ผลิตนิสิตระดับปริญญาตรีจำนวน 2 คน

-ผู้ช่วยวิจัยระดับ จำนวน 2 คน

- นำเสนอผลงาน Oral presentation ในการประชุมวิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 4 "Production of Phyllanthusol A by Cell Suspension Cultures of *Phyllanthus acidus* Skeel" 28-29 July 2008, In Abstracts of 4th Research Conference 2008, pp. 142.

- ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานในวารสารต่างประเทศ 1 เรื่อง "Effect of Auxin and Cytokinin on Phyllanthusol A Production by Callus Cultures of Phyllanthus acidus Skeels" *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5(2): 258-263, 2009.

- ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานในวารสารในประเทศ 1 เรื่อง "Production of Phyllanthusol A by Cell Suspension Cultures of *Phyllanthus acidus* Skeel" วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร (*In press*)

ภาคผนวก

American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 5 (2): 258-263, 2009
ISSN 1818-6769
© IDOSI Publications, 2009

Effect of Auxin and Cytokinin on Phyllanthusol A Production by Callus Cultures of *Phyllanthus acidus* Skeels

[1]Premjet Duangporn and [2]Premjet Siripong

[1]Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture,
Natural Resources and Environment, Naresuan University, Muang, Phitsanulok, 65000 Thailand
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Muang, Phitsanulok, 65000 Thailand

Abstract: Callus cultures of *Phyllanthus acidus* Skeels were established to verify whether they produce Phyllanthusol A as the intact plant does. Different growth regulator combinations were applied to MS medium to influence the level of production of Phyllanthusol A. The effects of various combinations of auxin and cytokinin on the growth and accumulation of Phyllanthusol A were investigated. MS medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) 1 mg l^{-1} and 6-furfurylaminopurine (kinetin) 1 mg l^{-1} was used to support the growth of callus cultures and the maximum amount of dry biomass (613 mg) was produced after 42 days of culture. High Performance Liquid Chromatographic analysis of methanol extracts from callus cultures of *P. acidus* revealed that the cultures produced Phyllanthusol A. The concentrations of the growth regulators á-naphthaleneacetic acid (NAA) and benzyladenine (BA) played a critical role in the production of Phyllanthusol A. The callus cultures accumulated 20 mg/g.dry weight of Phyllanthusol A in MS medium supplemented with NAA (2 mgl^{-1}) and BA (0.5 mgl^{-1}).

Key words: *Phyllanthus acidus* Skeels • Phyllanthusol A • Callus cultures • Growth regulators

INTRODUCTION

Plants belonging to genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) produce useful secondary metabolites such as alkaloids, tannins, flavonoids, lignans, phenolics and terpenes [1]. Extractives from *Phyllanthus* have shown antinociceptive action in mice [2]. *P. acidus* Skeels belongs to genus *Phyllanthus* and has several vernacular names depending on the country in which it is found, e.g., Philippines: iba, Indonesia: cerme, Malaysia: chermai and Thailand: ma yom. It has been cultivated as a fruit tree in tropical Asia. The fruit of *P. acidus* is very acidic and is similar to lemon or grapefruit in that it contains 40 mg/100 g ascorbic acid. Several parts of *P. acidus* have been used in folk medicine. The latex from *P. acidus* is credited with emetic and purgative activity [3]. Furthermore, extracts from *P. acidus* have long been used for the treatment of diseases such as hypertension and respiratory ailments [4]. Rats fed with extracts from *P. acidus* showed a hepatoprotective effect against acute liver damage induced by carbon tetrachloride [5]. In addition, methanolic extracts of *P. acidus* possess strong antibacterial activity *in vitro* [6]. The root bark contains saponins, gallic acid and tannins and root extracts have long been used in the rehabilitation program for alcoholics in Thailand. Vongvanich *et al.* [7] isolated Phyllanthusol A from the root of *P. acidus*. Phyllanthusol A (Fig. 1) has been proposed as a possible antitumor

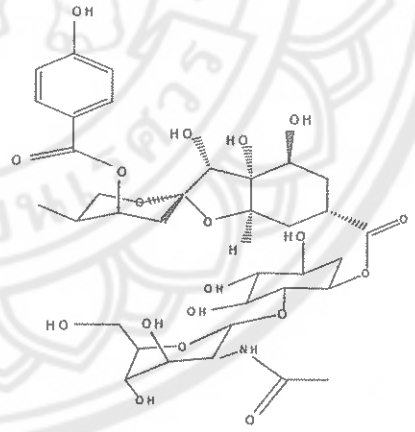


Fig. 1: Phyllanthusol A

Corresponding Author: Dr. Premjet Duangporn, Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Muang, Phitsanulok, 65000 Thailand

agent [8]. As the development of resistance by tumor cells to chemotherapeutic agents is a major problem in cancer treatment, there is great effort to counter this resistance by finding compounds with novel cytotoxic mechanisms [9]. Phyllanthusol A has attracted considerable attention, as it exhibits cytotoxicity against BC and KB cell lines *in vitro*. This is the first investigation that has focused on callus cultures as an alternative production source of the antitumor agent, Phyllanthusol A. Plant cell and tissue culture have been suggested as a feasible technology for the production of many plant secondary metabolites. For example, ginsenoside from *Panax gingseng*, rosmarinic acid from *Coleus blumei*, shikonin from *Lithospermum erythrohizon*, diosgenin from *Dioscorea*, ubiquinone-10 from *Nicotiana tabacum*, berberin from *Coptis japonica* and podophyllotoxin from *Juniperus chinensis* accumulated at much higher levels in cultured cells than in intact plants [10-12]. The aim of this study is to develop conditions for callus cultures of *P. acidus* by the manipulation of different combinations of plant growth regulators, with the aim of inducing Phyllanthusol A production.

MATERIALS AND METHODS

Establishment of Callus Cultures: Plant materials were collected in Phitsanulok province. Young leaves and stems were surface sterilized in commercial sodium hypochlorite solution (5% active chlorine) for 20 min and then rinsed 3 times with sterile distilled water. Explants of ca. 1 cm. were excised and individually transferred into 4-ounce glasses containing 20 ml of Murashige and Skoog (MS, 1962) culture medium, with 3 % (w/v) sucrose and differing combinations of NAA, 2, 4-D, BA and kinetin. To test the effect of growth regulators, 32 treatments with factorial combinations of four levels of NAA, kinetin, NAA and BA (0, 0.5, 1 and 2 mgl^{-1}) were designed. The pH value of the cultured medium was adjusted to 5.8 prior to autoclaving (121 °C, 15 min) and the medium was solidified with 8 g/l agar. The culture conditions were maintained at 25 ± 1 °C with a 16-hour photoperiod under a photon flux of 1,500-2,000 lux, provided by fluorescent lamps. The explants were cultured for 42 days and each treatment was repeated 3 times.

Growth Measurement: Growth measurement was measured as the dry weight (DW) of callus cultures grown for 42 days by harvesting the biomass, followed by lyophilization.

Extraction and Determination of Phyllanthusol A: The extraction and analysis of Phyllanthusol A was modified from Vongvanich et al. (2000). Each of the 32 lyophilized extracts from treated tissue samples (0.5 g) was ground to a powder, followed by extraction with methanol for 24 h. The extracts were then concentrated under vacuum and re-dissolved in a small amount of the same solvent before separation using HPLC. The Phyllanthusol A content of each sample was determined using HPLC performed on a reversed-phase column (C18 Supelco ODS Hypersil 5 µm, 4 x 250mm) in an Agilent 1100 liquid chromatograph with a diode array (UV detection at 254 nm) by isocratic elution with MeOH/ H_2O (50:50 v/v) as a mobile phase. The flow rate was set at 0.5 ml/min and the oven temperature was set to 40°C. The injection volume was 20µl. The methanolic extract of Phyllanthusol A was identified by comparing its retention time with that of a reference sample of Phyllanthusol A. Statistical analyses were performed with ANOVA. The Duncan multiple range test (DMRT) was used to compare means, with a significant level of 5%. Data presented in tables correspond to the mean values of three replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of Callus Cultures of *P. acidus*: Callus cultures were initiated from young stems and leaves of *P. acidus* obtained from a natural tree source in Phitsanulok province. Growth regulators 2, 4-D, NAA, BA and kinetin are frequently used to induce callus tissues in many plant species [13].They were selected for initiation of callus cultures of *P. acidus*. Furthermore, MS medium supplemented with NAA, BA and kinetin were utilized by previous researchers for *in vitro* cultures of several *Phyllanthus* species [14-16]. The overall response to plant regulators in stem segments was superior, while leaf explants resulted in poor callus induction. Friable greenish-yellow or beige callus was successfully induced from wound sites in the young stem explants at a culture time in the range of 5-10 days. Callus cultures were subcultured every 30 days. The callus cultures of the third sub-culture were used to investigate the effect of 32 different combinations of growth regulators on growth and Phyllanthusol A production. All combinations of growth regulators induced callus growth without an organogenesis response over 42 days of cultivation.

Effect of Growth Regulators on Callus Cultures Growth: The production of secondary metabolites in callus cultures is controlled by environmental factors and by

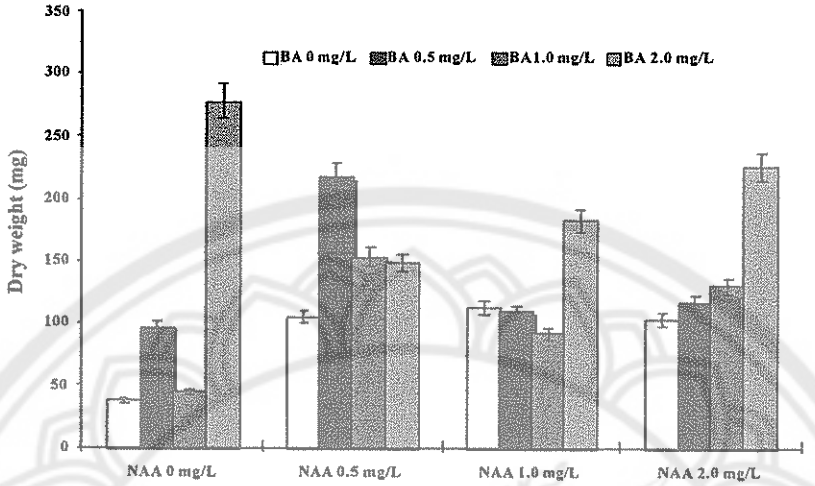


Fig. 2: The Effect of Different Combinations of NAA And BA on the Growth of Callus Cultures of *P. acidus* After 42 Days of Culture. (Values represent the mean n = 3, ± SE, P< 0.5)

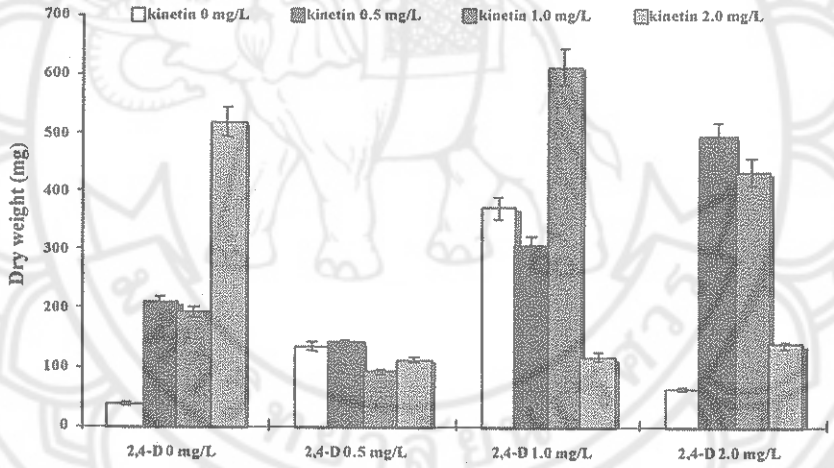


Fig. 3: The Effect of Different Combinations of 2,4-D and Kinetin on the Growth of Callus Cultures of *P. acidus* after 42 Days of Culture. (Values represent the mean n = 3, ± SE, P< 0.5)

plant material. These factors are medium component, pH, temperature, etc. Plant growth regulator such as auxins and cytokinin has shown the remarkable affects on growth and differentiation and thus metabolism of cultured cells [17, 18,]. In order to obtain callus biomass and phyllanthusol A in high concentration, therefore, experiments were carried out varying of growth regulators of the medium. The effects of various concentrations of auxins (2, 4-D, NAA) and cytokinins (kinetin, BA) on the growth of callus cultures derived from stem segment explants are presented in Figs. 2 and 3. Four concentrations of NAA, 2, 4-D, BA and kinetin (0, 0.5, 1, 2 mg l^{-1}) were varied in 32 combinations. All treatments were established with a fresh weight of 0.5 g of callus cultures. The stem-derived calluses showed a steady growth with a maximum up to 42 days and decreased by the 60th day. Calluses contained water content approximately 90% of fresh weight. Fig. 2 shows that increasing level of BA resulted in a high cell dry biomass (278 mg). In contrast, NAA in all concentrations had less effect in enhancing cell biomass. Combination of BA and NAA at equal concentrations ratio seemed to increase cell dry weight, but still lower than that of 2 mg l^{-1} BA alone. Fig.3 illustrates the dry mass of callus cultures grown in MS medium with different concentrations of 2, 4-D and kinetin. Calluses cultured in medium without growth

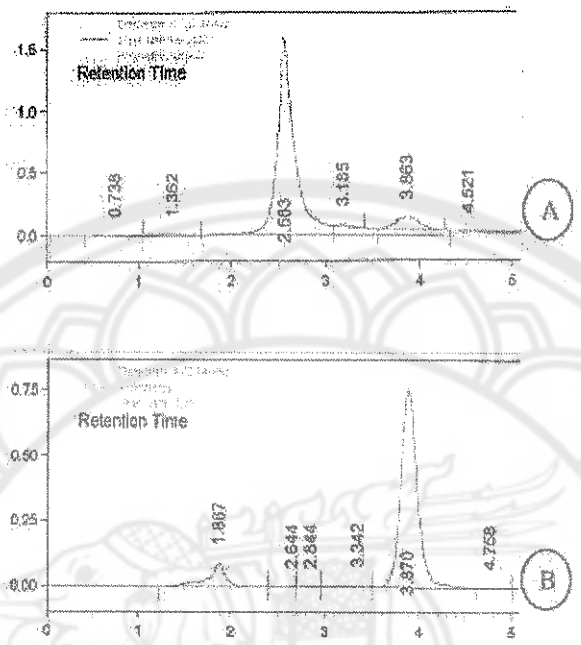


Fig. 4: HPLC Chromatogram of Phyllanthusol A in Callus Cultures Derived from the Stem of *P. acidus* (A) and Authentic Phyllanthusol A (B)

Table 1: The Effect of Different Concentrations of NAA and BA on Phyllanthusol A Accumulation of *P. acidus* Callus derived from stem cultured on MS Medium for 42 Days

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	Phyllanthusol A (mg/g DW)	NAA (mg/l)	BA (mg/l)	Phyllanthusol A (mg/g DW)
0	0	0.071^{d}	0	1	0.27^{d}
0.5	0	0.98^{d}	0.5	1	1.74^{d}
1	0	10.29^{c}	1	1	0.27^{d}
2	0	12.73^{b}	2	1	0.37
0	0.5	0.71^{d}	0	2	0.250^{d}
0.5	0.5	0.23^{d}	0.5	2	0.991^{d}
1	0.5	0.283^{d}	1	2	0.16^{d}
2	0.5	20.23^{a}	2	2	1.36^{d}

Means in the same column with different letter(s) differ significantly according to Duncan's multiple range test (P <0.05)

Table 2: The Effect of Different Concentrations of 2,4-D and Kinetin on Phyllanthusol A Accumulation in *P. acidus* Callus derived from stem cultured on MS Medium for 42 Days

2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)	Phyllanthusol A (mg/g DW)	2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Phyllanthusol A (mg/g DW)
0	0	0.016^{e}	0	1	ND
0.5	0	0.85b^{e}	0.5	1	0.15^{de}
1	0	0.720^{bcd}	1	1	ND
2	0	0.26^{cde}	2	1	1.14^{b}
0	0.5	0.80^{bc}	0	2	0.121^{de}
0.5	0.5	0.26^{cde}	0.5	2	1.12^{b}
1	0.5	0.29^{cde}	1	2	10.22^{a}
2	0.5	ND	2	2	0.12^{de}

Means in the same column with different letters differ significantly according to Duncan's multiple range test (P <0.05)

regulator showed the least dry biomass (37 mg). The maximum dry weight (613 mg) was observed for cultures containing 2, 4-D (1 mg l^{-1}) and kinetin (1 mg l^{-1}) and it was 16.5 times the weight of the control. The interaction of 2, 4-D and kinetin had a significant effect on cell dry weight. Among single growth regulators, kinetin alone increased cell biomass at the higher concentration (2 mg l^{-1}). These results demonstrated that, of the two cytokinins, BA and kinetin, 2 mg l^{-1}kinetin supported growth of callus and provided higher biomass than that of the BA. However, of the two auxins, 2, 4-D had more effect on growth of callus when compared to the NAA.

The Effect of Growth Regulators on Phyllanthusol A Production: HPLC analysis was used to detect the presence of Phyllanthusol A. The peak corresponding to Phyllanthusol A was identified by comparison with the elution time of the corresponding standard material and by an increase in the corresponding peak area when the reference standard was added to the sample (Fig. 4). Data presented in Tables 1 and 2 demonstrate the effects of growth regulators on the content of Phyllanthusol A. It was found that 2,4-D, kinetin, NAA and BA have a significant effect on Phyllanthusol A production in callus cultures of *P. acidus*. The accumulation of Phyllanthusol

A was observed for each of the combinations of NAA and BA as well as 2, 4 D and kinetin. Phyllanthusol A contents were varied from 0 to 20.23 mg g^{-1}DW. Callus grown in MS medium without growth regulator produced Phyllanthusol A in amount of 0.016-0.071 mg g^{-1}DW. Among single growth regulators, increasing in level of NAA stimulated accumulation of Phyllanthusol A while 2, 4-D performed contrast results. The callus gave very low response in product accumulation to BA and kinetin. Though the combinations NAA and BA were less effective than combinations of 2, 4 D and kinetin in promoting callus growth, they caused a marked increase in Phyllanthusol A production. The greatest Phyllanthusol A production (20.23 mg g^{-1}DW) resulted from the presence of 2 mg $l^{-1}$of NAA and 0.5 mg $l^{-1}$of BA, as compared to other combinations. We did not detect Phyllanthusol A in callus cultures grown on medium with the combination of growth regulators that produced the maximum dry weight. Taniguchi *et al.* [19] reported that addition of NAA (10 μM), BA (10 μM) to LS medium could enhance the production of triterpenes in callus cultures of *Eriobotrya japonica.* In addition, the shoot culture of *Mentha arvensis* produced terpenoid when the cultures were grown on MS medium supplemented BA (5 mgl^{-1}), NAA (0.5 mgl^{-1}) [20]. Similar observations have been reported for callus cultures of *Eucommia ulmoides.* Callus cultures of *E. ulmoides* showed high levels of accumulation of pinoresinol di-o-$^{\beta}$ glucoside when 3 mg l^{-1} of NAA and 4 mg l^{-1} of BA were added to the growth medium [21].

In conclusion, this is the first report on the establishment of callus cultures of *P. acidus* in order to produce Phyllanthusol A by varying the level of growth regulators. The amount of Phyllanthusol A in callus derived from stem (20.23 mg g^{-1}DW) is higher than that in root (10 mg g^{-1} DW).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National Research Council of Thailand for financial support in fiscal year 2007. We also thank Dr. Prasart Kittakoop of Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, for providing us with a reference sample of Phyllanthusol A.

REFERENCES

1. Unander, D.W., 1996. *Phyllanthus* species: *In Vitro* Culture and Production of Secondary Metabolites. In Biotechnology in Agriculture and Forestry (Y.P.S. Bajaj, ed.), Springer-Verlag, Berlin, 37: 304-318.
2. Catapan, E., M.F. Otuki, A.M. Viana, R.A. Yunes, L.F. Bresciani, J. Ferreira, A.R. Santos, J.B. Calixto and V. Cechinel-Filho, 2000. Pharmacological Activity and Chemical Composition of Callus Cultures Extracts from Selected Species of *Phyllanthus.* Pharmazie., 55(12): 945-946.
3. Lemmens, R.H., M.J. Bunyapraphatsara and N. Padua de L.S., 1999. Plant Resources of South-East Asia No 12(1) Medicinal and Poisonous Plants 1. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia., pp: 386-387.
4. Sousa, M., J. Ousingsawat, R. Seitz, S. Puntheeranurak, A. Regalado, A. Schmidt, T. Grego, C. Jansakul, M.D. Amaral, R. Schreiber and K.K. Karl, 2007. An Extract From the Medicinal Plant *Phyllanthus acidus* and Its Isolated Compounds Induce Airway Secretion: A Potential Treatment for Cystric Fibrosis. Mol. Pharmacol., 7(1): 366-376.
5. Lee, C., Y. Peng, W.H. Cheng, H.Y. Cheng, F.N.M.T. Lai and T.H. Chiu, 2006. Hepatoprotective Effect of *Phyllanthus* in Taiwan on Acute Liver Damage Induced by Carbon Tetrachloride. Am. J. Chin. Med., 30(3): 471-482.
6. Melendez, P.A. and V.A. Capriles, 2006. Antibacterial Properties of Tropical Plants from Puerto Rico. Phytomedicine., 13(4): 272-6.
7. Vongvanich, N., P. Kittakoop, J. Kramyu, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth, 2000. Phyllanthusols A and B, Cytotoxic Norbisabolane Glycosides from *Phyllanthus acidus* Skeels. J. Org. Chem., 65: 5420-5423.
8. Mahidol, C., H. Prawat, V. Prachyawarakorn and S. Ruchirawat, 2002. Investigation of Some Bioactive Thai Medicinal Plants. Phytochemistry Reviews., 1: 278-297.
9. Lindholm, P., 2005. Cytotoxic Compounds of Plant Origin Biological and Chemical Diversity, M.S. Thesis, Uppsala University, Sweden.
10. Misawa, M., M. Hayashi and S. Takayama, 1985. Accumulation of Antineoplastic Agents by Plant Tissue Cultures. In: Neumann K. H., Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp: 235-246.

11. Smith, M., 2002. An *In Vitro* Approach to Investigate Medicinal Chemical Synthesis by Three Herbal Plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 70: 105-111.
12. Premjet, D., K. Itoh and S. Tachibana, 2002. Stimulation of the Production of Podophyllotoxin by Biogenetic Precursors and Elicitor in *Juniperus Chinensis* Stem-Derived Callus Cultures, Pak. J. Biol. Sci., 5(3): 131-316.
13. Misawa M., 1994. Plant Tissue Culture: An Alternative for Production of Useful Metabolites (FAO Agricultural Services Bulletin), Bio International Inc, Toronto, Canada. pp: 18-19.
14. Catapan, E., M.F. Otuki and A.M. Viana, 2001. *In vitro* Culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). Revta brasil. Bot., 24(1): 25-34.
15. Catapan, E., L. Marcio, B. Silva, F.N. Moreno and A.M. Viana, 2002. Micropropagation, Callus and Root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70: 301-309.
16. Liang, O.P. and C.H. Lai, 2006. *In vitro* Plant regeneration, Flowering and Fruiting of *Phyllanthus niruri* L (Euphorbiaceae). Intl. J. Bot., 2(4): 409-414.
17. Zenk, M.H., H. El-Shagi, H. Arens, J. Stockigt, E.W. Weiler and B. Deus, 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, in Plant Tissue Culture and Cyts Biotechnological Application (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H., ed.) Springer-Verlag, Berlin, pp: 27-43.
18. Brown, T.J., 1990. The Initiation and Mentainance of Callus Cultures, in Methods in Molecular Biology, vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture (Jeffrey, W.P. and John, M.W., ed.) The Humana Press, New Jersey, pp: 57-63.
19. Taniguchi, S., Y. Imayoshi, E. Kobayashi, Y. Takamatsu, H. Ito, T. Hatano, H. Sakagami, H. Tokuda, H. Nishino, D. Sugita, S. Shimura and T. Yoshida. 2002. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. Phytochem., 59: 315-323.
20. Phatak, S.V. and M.R. Heble, 2002. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. Fitoterapia., 73: 32-39.
21. Gray, E.C., 2003. Establishment of Callus Culture and Measurement of Seasonal Changes in Secondary Compound Production in *Eucommia ulmoides* Oliver, M.S. Thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, USA.

Naresuan Research Conference

Naresuan Research Conference

Naresuan Research Conference

นเรศวร ครั้งที่ 4

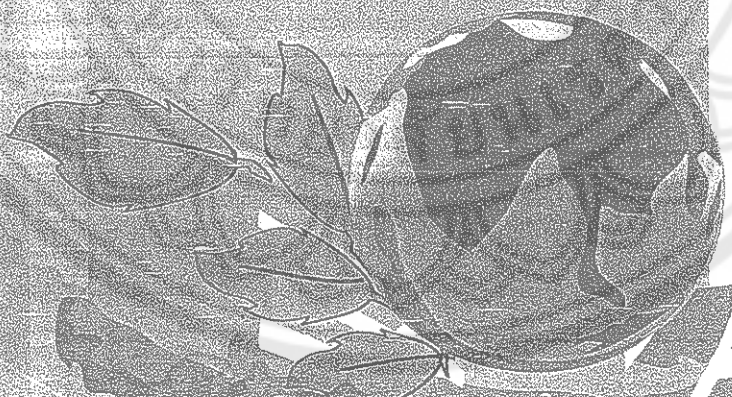
Naresuan Research Conference

Research

"นเรศวรวิจัย" ครั้งที่ 4

: การบริหารงานของการวิจัย

Abstracts of 4th Naresuan Research Conference



Hold to Heal the World

28-29 กรกฎาคม 2551

Abstracts

Conference 2008

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ห้องที่ 5 ลำดับที่ 2/11 เวลา 13.20-13.35 น.

การผลิตสาร Phyllanthusol A โดยเซลล์เพาะเลี้ยงมะยมแบบแขวนลอย

พรนิดา สิงห์ทอง[a] , ศิริพงษ์ เปรมจิต[a] และ ดวงพร เปรมจิต[b,*]

Production of Phyllanthusol A by Cell Suspension Cultures of *Phyllanthus acidus* Skeel

Pannida Singthong[a], Siripong Premjet[a] and Duangporn Premjet[b,*]

[a]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
[b]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
[a]Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000
[b]Department of Agricultural science, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, 65000
* Corresponding author. E-mail : duangpomp@nu.ac.th (D. Premjet)

บทคัดย่อ

สาร Phyllanthusol A เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenoid ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง สกัดจากรากของมะยม (*Phyllanthus acidus* Skeel) การศึกษานี้สนใจศึกษาศักยภาพของการผลิตสาร Phyllanthusol A ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะยมแบบแขวนลอย โดยย้ายแคลลัสในปริมาณเซลล์สด 10 เปอร์เซ็นต์ ลงเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA หรือ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างๆ เลือกเซลล์ไลน์ที่สังเคราะห์สาร คือ NUNA 1,2 และ NUD 1,2 มาเพาะเลี้ยงในฟาสก์เป็นระยะ 20 วัน เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตทั้งในรูปน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง วิเคราะห์ปริมาณสารทั้งภายในเซลล์และอาหารพบว่าเซลล์ไลน์ NUNA1 ให้ทั้งน้ำหนักเซลล์สดและเซลล์แห้งมากที่สุด คือ 1.93 กรัม และ 0.187 กรัม ตามลำดับ ส่วนการสะสมสารพบว่าเซลล์ไลน์ทั้งหมดมีการสะสมสารทั้งในเซลล์ และมีบางเซลล์ไลน์หลั่งสารสู่อาหาร ฮอร์โมน NAA มีผลส่งเสริมการสะสมสาร Phyllanthusol A ส่วน 2,4-D นั้นให้สารปริมาณต่ำ เซลล์ไลน์ NUNA1 มีการสะสมสารมากที่สุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงคือ 0.595 มิลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

คำสำคัญ : Cell suspension culture *Phyllanthus acidus* Skeel Phyllanthusol A

Abstract

Phyllanthusol A was classified in sesquiterpenoid. It was isolated from root of *Phyllanthus acidus* Skeel and possess cytotoxic activity. Cell suspension cultures of *P. acidus* was viewed as potential alternative to whole plant extraction as a source of the cytotoxic agent Phyllanthusol A. To establish cell suspension fresh callus in amount of 10 percent was transferred into MS liquid medium containing NAA or 2,4-D. Four cell lines, NUNA1, 2 and NUD 1, 2 which have ability to produce Phyllanthusol A were used. Cell suspension of the cell lines were grown for 20 days in shake flasks containing MS medium. Throughout the growth cycle, fresh and dry weight accumulation, phyllanthusol A yield on dry weight basis, phyllanthusol A in medium were examined. The highest fresh weight and dry weight obtaining from NUNA1 cell line were 1.90 and 0.187 g, respectively. Phyllanthusol A was detected in both cells and medium. NAA had effect on increasing Phyllanthusol A yield, while 2, 4-D showed contrast results. The NUNA1 cell lines produced the maximum Phyllanthusol A (0.595 [illegible] g/ g DW) at 7 days.

Key words : Cell suspension culture *Phyllanthus* [illegible] *us* Skeel Phyllanthusol A