

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารพลัมบาจิน จาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง ด้วยกรดซาลิไซลิกและกรดเบนโซอิก

The Enhancement of Plumbagin Production Efficiency from Hairy Root of *Plumbago indica* L. by Salicylic Acid and Benzoic Acid

ศศิวิมล จันทรสุธเทพ¹ สอนธิชัย จันทร์เปรม^{1,2} และเสริมศิริ จันทร์เปรม^{1,3*}
Sasiwimol Chansuthetep,¹ Sontichai Chanprame^{1,2} and Semsiri Chanprame^{1,2*}

บทคัดย่อ

เจตมูลเพลิงแดงเป็นพืชสมุนไพร ซึ่งมีรากเป็นแหล่งสะสมของสารพลัมบาจิน (plumbagin) สารนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด การเพาะเลี้ยง hairy root เจตมูลเพลิงแดงนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตสารพลัมบาจินจาก hairy root เจตมูลเพลิงแดง ด้วยการใช้สิ่งกระตุ้น โดยเติมกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) และกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 10-40 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารเหลว ½ Murashige and Skoog (MS) ที่เพาะเลี้ยง hairy root อายุ 15 วัน ผลการศึกษา พบว่ากรดซาลิไซลิกความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตสารพลัมบาจินจาก hairy root และการปลดปล่อยสารพลัมบาจินออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงมากที่สุด หลังการกระตุ้น 1 วัน (93.64 มิลลิกรัมต่อลิตร; 4.4 เท่าของชุดควบคุม) ส่วนกรดเบนโซอิกสามารถกระตุ้นการผลิตสารพลัมบาจินได้เล็กน้อยและไม่พบการปลดปล่อยสารพลัมบาจินออกสู่อาหารเพาะเลี้ยง โดยพบสารพลัมบาจินสูงสุดเพียง 41.78 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.4 เท่าของชุดควบคุม) ในวันที่ 7 ของการกระตุ้น

คำสำคัญ: เจตมูลเพลิงแดง พลัมบาจิน กรดซาลิไซลิก กรดเบนโซอิก

Abstract

Plumbago indica L. is a medicinal plant which the roots are the main source of plumbagin. Such plumbagin possesses the anticancer, antibacterial and antifungal activities. This cultivation of *P. indica* hairy root, therefore, aimed to enhance plumbagin production of *P. indica* hairy root using elicitors. Salicylic acid and benzoic acid with final concentration of 10-40 mM were added into the ½ MS liquid medium which 15-day-old hairy roots were cultured in. The results reveal that salicylic acid with the final concentration of 20 mM was the most promising elicitor for stimulating the plumbagin production from hairy root and the release of plumbagin into the medium on the first day-after-elicitation (93.64 mg/l; 4.4 times more than control). While using of benzoic acid, it slightly stimulated the plumbagin production and no plumbagin released into the medium. The highest plumbagin accumulated in hairy roots was 41.78 mg/l (1.4 times over the control) on the 7th day-after-elicitation.

Keywords: *Plumbago indica* L., hairy root, plumbagin, salicylic acid, benzoic acid

¹ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

²ภาควิชาพืชไร่นา และ ³ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

*Corresponding author: semsiri.c@ku.ac.th

คำนำ

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ประโยชน์แพร่หลายในประเทศอินเดียและไทย สารสำคัญในรากเจตมูลเพลิงแดงคือสารพลัมบาจิน (plumbagin) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด (Liu *et al.*, 2017) ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (Pradeepa *et al.*, 2014) เชื้อแบคทีเรีย (Nair *et al.*, 2016) และเชื้อรา (Hassan *et al.*, 2016) ที่เป็นสาเหตุของโรคในคนและพืชได้

การเพาะเลี้ยงราก hairy root ของพืชสมุนไพรเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิ ราก hairy root คือ รากพิเศษที่เกิดขึ้นบนเนื้อเยื่อพืชเนื่องจากการเข้าสู่อวัยวะของเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* (Georgiev *et al.*, 2007) รากชนิดนี้สามารถเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ใช้ทดแทนพืชที่ปลูกในธรรมชาติได้ โดยสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้มากและสามารถควบคุมปริมาณการผลิตให้เป็นไปตามที่ต้องการได้ สำหรับเจตมูลเพลิงแดงนั้นห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ใช้เชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ชักนำราก hairy root และพบว่าสามารถสกัดสารพลัมบาจินจาก hairy root ได้มากกว่ารากปกติที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tatreerod *et al.*, 2003) เซลล์เพาะเลี้ยงและแคลลัส (Chuntaratin, 2006)

มีรายงานการใช้สิ่งกระตุ้น (elicitor) ร่วมกับการเพาะเลี้ยง hairy root ในการชักนำให้ hairy root ผลิตสารทุติยภูมิได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น โดยเฉพาะสิ่งกระตุ้นที่สามารถกระตุ้นกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชซึ่งรวมทั้งการสร้างสารทุติยภูมิบางชนิดด้วย (Gharechahi *et al.*, 2013) สิ่งกระตุ้นบางชนิดทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณในกระบวนการการตอบสนองของพืชต่อสิ่งเร้าภายนอก เช่น กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในพืช มักนิยมนำมาใช้ในการกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิในพืช โดยมีรายงานว่ากรดซาลิไซลิกสามารถกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิใน hairy root ของพืชหลายชนิด เช่น สาร tanshinone จาก *Salvia miltiorrhiza* (Hao *et al.*, 2015) และ สาร norswertianin จาก *Gentiana dinarica* (KrstićMilošević *et al.*, 2017) เป็นต้น สำหรับกรดเบนโซอิก (benzoic acid) นั้น มีรายงานว่า เป็นสารตั้งต้นของกรดซาลิไซลิก (Meuwly *et al.*, 1995)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้กรดซาลิไซลิกและกรดเบนโซอิก ในการกระตุ้นการผลิตสารพลัมบาจินจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง โดยศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของสิ่งกระตุ้นและระยะเวลาที่ hairy root สัมผัสกับสิ่งกระตุ้น เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิของพืช (Vasconsuelo and Boland, 2007)

วิธีการศึกษา

พืชทดลอง

hairy root เจตมูลเพลิงแดงที่ใช้ในงานวิจัยนี้เกิดจากการกระตุ้นยอดของเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 จากงานวิจัยของ Tatreerod *et al.* (2003) และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องในอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีความเข้มข้นครึ่งเท่า ($\frac{1}{2}$ MS) และเติม sucrose 20 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด (Chuntaratin, 2006)

การศึกษามวลของกรดซาลิไซลิกและกรดเบนโซอิกต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพลัมบาจินของ hairy root เจตมูลเพลิงแดง

เพาะเลี้ยง hairy root เจตมูลเพลิงแดงความหนาแน่น 2.0% (w/v) ในอาหารเหลวสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม sucrose 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 15 วัน

ละลายกรดซาลิไซลิกและกรดเบนโซอิกด้วย absolute ethanol และ deionized water ตามลำดับ จากนั้นกรองผ่านแผ่นกรองชนิด PTFE ขนาดช่อง 0.20 ไมโครเมตร แล้วเติมลงใน hairy root ที่เพาะเลี้ยง ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ โดยในชุดควบคุม (0 มิลลิโมลาร์) เติมห่วงทำละลายของกรดซาลิไซลิกและกรดเบนโซอิก บันทึกน้ำหนักแห้งของรากและวิเคราะห์ปริมาณสารฟัลัมบาจินในรากและในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 หลังการกระตุ้น

การศึกษานี้ทดสอบสิ่งกระตุ้น 2 ชนิด ได้แก่ กรดซาลิไซลิกและกรดเบนโซอิก วางแผนการทดลองแบบ factorial in Completely Randomized Design (CRD) โดยศึกษา 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของสิ่งกระตุ้น 5 ระดับ และระยะเวลาที่ hairy root สัมผัสสิ่งกระตุ้น 4 ระยะเวลา แต่ละสิ่งกระตุ้นมี 20 ชุดทดลอง ชุดทดลองละ 5 พลาสติกวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารฟัลัมบาจิน

การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารฟัลัมบาจินทำตามวิธีการของ Chuntaratin (2006) โดยอบราก hairy root ให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บดให้ละเอียด นำรากหนักประมาณ 0.1 กรัม มาสกัดด้วย methanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 ส่วนสารฟัลัมบาจินที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงนั้นสกัดโดยใช้ ethyl acetate ในกรวยแยก ใช้อัตราส่วนอาหารเพาะเลี้ยง 1 ส่วน ต่อ ethyl acetate 1 ส่วน ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แบบหมุนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนที่ได้จากการสกัด hairy root ด้วย methanol (HPLC grade) และละลายตะกอนที่ได้จากการสกัดอาหารเพาะเลี้ยงด้วย ethyl acetate (HPLC grade) ย้ายสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชา ตั้งทิ้งให้แห้งในตู้ดูดควัน นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วย petroleum ether กรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรอง cellulose acetate ที่มีช่องขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารฟัลัมบาจิน ด้วยวิธี HPLC เทียบกับสารฟัลัมบาจิน มาตรฐาน (Sigma: catalog number P7262 a.i. 98%) ใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax® SB C18 โดยใช้ methanol และ acetic acid 0.4 % ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 เป็นสารละลายตัวพา กำหนดอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตที่ 270 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารฟัลัมบาจินเทียบกับสารมาตรฐานจากสมการ linear regression equation และค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Agilent Chemstation (Agilent Technologies, 2001)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของกรดซาลิไซลิกต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารฟัลัมบาจินของ hairy root เจตมูลเพลิงแดง

ความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิกและระยะเวลาที่ hairy root ได้รับกรดซาลิไซลิกไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อน้ำหนักแห้งสะสมของราก แต่ความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิกมีผลต่อน้ำหนักแห้งสะสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบว่า hairy root มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิก โดย hairy root ที่ได้รับกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักแห้งสะสมมากที่สุดตลอดการทดลองและมีการสะสมน้ำหนักแห้งมากที่สุดในวันที่ 3 หลังการกระตุ้น ซึ่งเมื่อนำมาเทียบต่อการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหาร 1 ลิตร พบว่ารากมีน้ำหนักแห้ง 6.41 กรัมต่อลิตร (Figure 1)

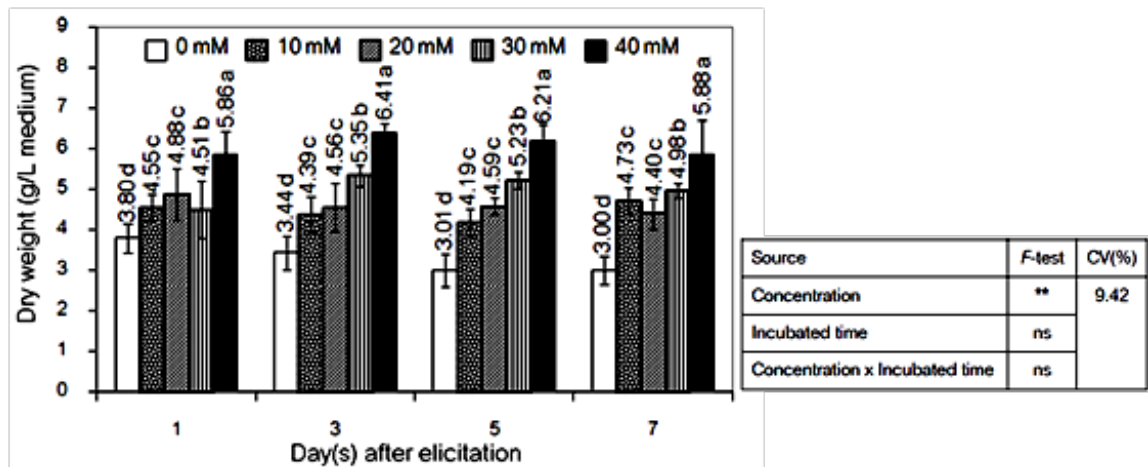


Figure 1 Dry weight of *Plumbago indica* hairy root cultured in half strength Murashige and Skoog medium supplemented with 2% (w/v) sucrose at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ in dark condition and elicited with 0-40 mM salicylic acid for 1-7 day(s). Means followed by the different letter were significantly different according to Duncan's New Multiple Range Test ($p \leq 0.05$). Asterisk

** represent significance at $p = 0.01$. The 'ns' represents non significance.

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการรายงานของ Chung *et al.* (2016) ที่รายงานว่ากรดซาลิไซลิกส่งเสริมการเจริญเติบโตของ hairy root จาก *Momordica charatia* L. โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิกจาก 25-100 ไมโครโมลาร์ ทำให้ hairy root มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้กรดซาลิไซลิกเป็นสิ่งกระตุ้นอาจยับยั้งหรือไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ hairy root เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตใน *Panax ginseng* (Jeong *et al.*, 2005) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 0.01-10 มิลลิโมลาร์ หรือไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตใน *Scutellaria baicalensis* เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1-100 มิลลิโมลาร์ (Hwang, 2006) ดังนั้นในการนำกรดซาลิไซลิกมาใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการผลิตสารทุติยภูมิจากเซลล์พืชจึงควรมีการศึกษาถึงผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด เพื่อสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิกให้เหมาะสมกับชนิดของพืช

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารฟัลมาบินด้วย HPLC พบว่าสารละลายฟัลมาบินมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่สกัดจาก hairy root และอาหารเพาะเลี้ยงปรากฏ peak ของสารฟัลมาบิน ที่ retention time ประมาณ 15 นาที (Figure 2) ผลการคำนวณปริมาณสารฟัลมาบินจากสมการ linear regression ที่มีค่า correlation coefficient 0.9997 พบว่าความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิกและระยะเวลาที่ hairy root สัมผัสกรดซาลิไซลิกไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณสารฟัลมาบินรวม ซึ่งเป็นผลรวมของปริมาณสารฟัลมาบินที่วิเคราะห์ได้จาก hairy root (Figure 3A) รวมทั้งที่ปลดปล่อยออกมาสู่อาหารเพาะเลี้ยง (Figure 3B) แต่ทั้ง 2 ปัจจัยต่างมีผลต่อปริมาณสารฟัลมาบินรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 10-40 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้ hairy root ผลิตสารฟัลมาบินรวมเพิ่มสูงขึ้นกว่าที่ไม่ได้รับการกระตุ้นในทุกระยะเวลาหลังจากกระตุ้น (Figure 3C) โดยพบการผลิตสารฟัลมาบินมากที่สุดในการใช้ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในวันแรกของการกระตุ้น ซึ่งผลิตได้ 93.64 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 4.4 เท่าของชุดควบคุม ทั้งนี้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้ hairy root มีการผลิตสารฟัลมาบินมากกว่า 85 มิลลิกรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลา 7 วัน ส่วนกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 20-40 มิลลิโมลาร์นั้นสามารถกระตุ้นให้ hairy root ผลิตสารฟัลมาบินรวมได้ในปริมาณสูงหลังจากการกระตุ้น 1 วัน แต่จากนั้นการผลิตสารฟัลมาบินลดลงชั่วคราวในวันที่ 3 ของการกระตุ้น และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 5 และ 7 ซึ่งในภาพรวมสามารถผลิตสารฟัลมาบินได้น้อยกว่าการกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

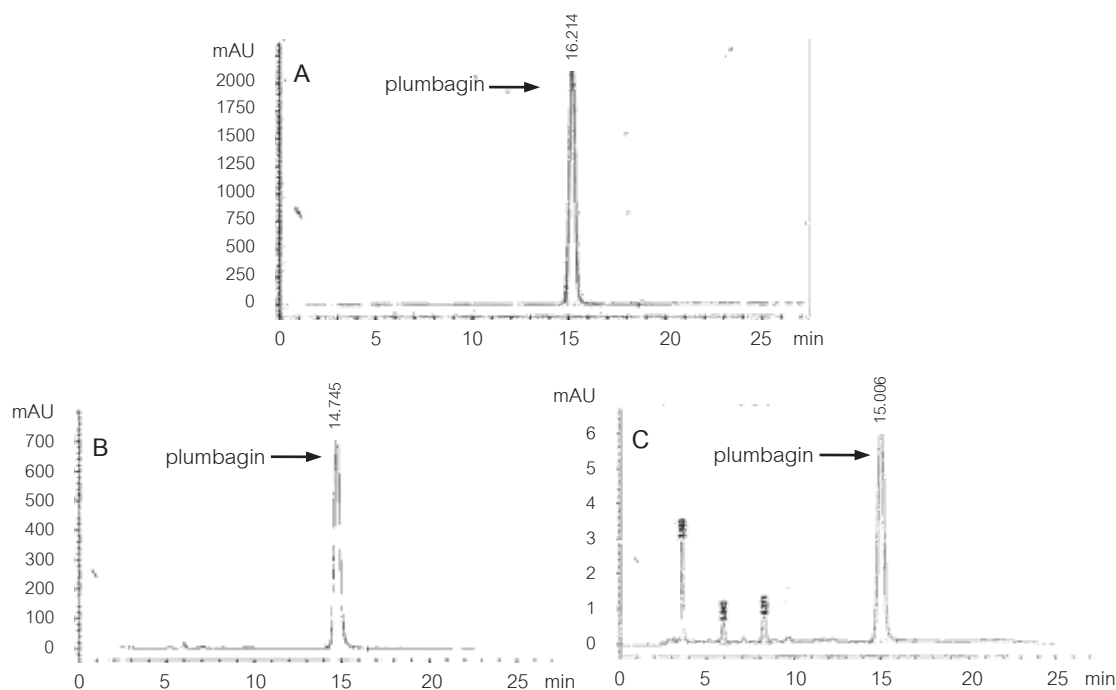


Figure 2 Chromatogram of 1,000 mg/l standard plumbagin (Sigma: catalog number P7262) (A), the extract of *P. indica* hairy root (B) and the extract of used culture medium (C) after the elicitation by salicylic acid which exhibited the peaks of plumbagin presented at 15 min.

การใช้กรดซาลิไซลิกเป็นสิ่งกระตุ้น มีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิใน hairy root ของพืชหลายชนิด และมีแนวโน้มว่าการใช้ที่ความเข้มข้นต่ำมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิได้มากกว่าความเข้มข้นสูง เช่น Hwang (2006) ได้กระตุ้นการสร้างสาร baicalin ใน hairy root ของ *Scutellaria baicatisensis* พบว่าหลังการกระตุ้น 6 สัปดาห์ hairy root ผลิตสาร baicalin เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิกจาก 1 ถึง 10 มิลลิโมลาร์ แต่ประสิทธิภาพการกระตุ้นกลับลดลงเมื่อใช้กรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ส่วน Jeong *et al.* (2005) รายงานการกระตุ้นการสร้างสาร saponin ใน hairy root ของโสม (*Panax ginseng*) ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิกในช่วง 0.1-0.5 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้ hairy root สร้างสาร saponin เพิ่มมากขึ้น แต่ประสิทธิภาพการสร้างสารลดลงเมื่อใช้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์

นอกจากความเข้มข้นแล้ว ระยะเวลาที่เนื้อเยื่อได้สัมผัสกับกรดซาลิไซลิกเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งในงานวิจัยนี้พบการผลิตสารฟลัมบาจินสูงในวันที่ 1 หลังการกระตุ้น จากนั้นลดลงในวันที่ 3 แล้วเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 5 และ 7 นอกจากนี้ Malarz *et al.* (2007) ได้รายงานว่า การใช้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ใน hairy root ของ *Cichorium intybus* ทำให้มีการผลิตสาร sonchuside A สูงกว่าที่ไม่ได้รับการกระตุ้นในวันที่ 2 และ 3 หลังการกระตุ้น แต่กลับมีการผลิตต่ำกว่าในวันที่ 4 และ 5 จากผลการใช้กรดซาลิไซลิกกระตุ้นการผลิตสารฟลัมบาจิน จาก hairy root เจตมูลเพลิงแดง และการรายงานของ Malarz *et al.* (2007) นั้นยืนยันว่าระยะเวลาที่เนื้อเยื่อได้สัมผัสกับสิ่งกระตุ้นมีผลอย่างมากต่อผลผลิตสารทุติยภูมิ ดังนั้นในการเลือกใช้สิ่งกระตุ้นนอกจากต้องทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว ยังควรทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารทุติยภูมิหลังจากการกระตุ้นด้วย

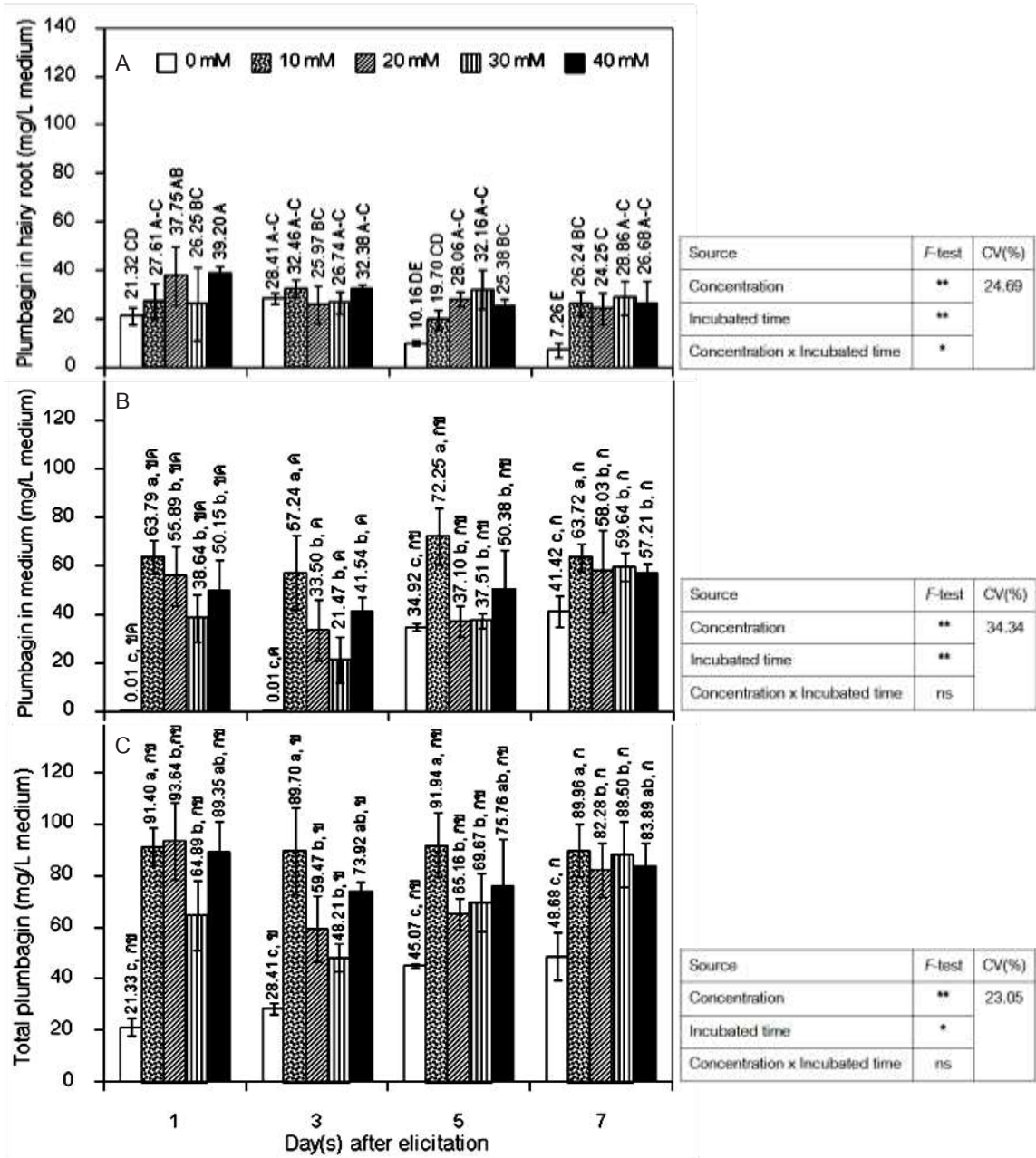


Figure 3 The plumbagin content in *Plumbago indica* hairy root (A), culture medium (B) and the total plumbagin (C) followed the elicitation by 0-40 mM salicylic acid for 1-7 day(s). The hairy roots were cultures in half strength Murashige and Skoog medium supplemented with 2% (w/v) sucrose, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in a dark condition. Means followed by the different letter in each data set (A-E: interaction of concentration and incubated time, a-c: concentration, n-a: incubated time) were significantly different according to Duncan's New Multiple Range Test ($p \leq 0.05$). Asterisks * and ** represent significance at $p = 0.05$ and $p = 0.01$, respectively. The 'ns' represents non significance.

จากงานวิจัยนี้ยังพบว่ากรดซาลิไซลิกทุกความเข้มข้นกระตุ้นให้มีการปล่อยสารฟลัมบาจินออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงในทุกระยะเวลา (Figure 3B) โดยอาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนจากสีขาวใสเป็นสีเหลืองใสภายหลังจากเติมกรดซาลิไซลิก อย่างไรก็ตามพบว่า hairy root ที่ไม่ได้รับกรดซาลิไซลิกมีการปล่อยสารฟลัมบาจิน ออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงปริมาณเล็กน้อยในวันที่ 5 และ 7 หลังการกระตุ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลของ absolute ethanol ที่ใช้เป็นตัวทำละลายกรดซาลิไซลิก และเติมให้กับชุดควบคุมดังกล่าว ซึ่ง absolute ethanol นั้นมีรายงานว่าเมื่อใช้ร่วมกับเซลล์ของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สามารถกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิในกลุ่ม sesquiterpene จาก hairy root ของ *Hyoscyamus muticus* ได้ (Mehmetoglu and Curtis, 1997) แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้พบว่า hairy root เจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับกรดซาลิไซลิกทุกความเข้มข้นผลิตสารฟลัมบาจินได้มากกว่า hairy root ของชุดควบคุมที่ได้รับ absolute ethanol ในทุกระยะเวลาหลังการกระตุ้น ซึ่งยืนยันว่ากรดซาลิไซลิกนั้นสามารถกระตุ้นการผลิตสารฟลัมบาจินจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงได้

ความสามารถในการกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิของกรดซาลิไซลิก ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม phenolic compound ที่พืชสร้างขึ้นตามธรรมชาตินั้น อาจเนื่องมาจากการกระตุ้นของกรดซาลิไซลิกเป็นตัวส่งสัญญาณ (signaling molecule) ที่สำคัญตัวหนึ่งใน signal transduction pathway ซึ่งไปชักนำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตัวของพืชแสดงออก (Schenk *et al.*, 2000) รวมถึงการชักนำยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิบางกลุ่มที่พืชสร้างขึ้นเมื่อถูกเชื้อโรคทำลาย เช่น polyphenole, alkaloid, quinone, terpenoid และ polypeptide (Ding *et al.*, 2004) เป็นต้น

ผลของกรดเบนโซอิกต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารฟลัมบาจินของ hairy root เจตมูลเพลิงแดง

ความเข้มข้นของกรดเบนโซอิกและระยะเวลาที่ hairy root สัมผัสกรดเบนโซอิกไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อน้ำหนักแห้งสะสม แต่ระยะเวลาที่ hairy root สัมผัสกรดเบนโซอิกมีผลต่อน้ำหนักแห้งสะสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 4A) จากการทดลองพบว่ากรดเบนโซอิกมีแนวโน้มยับยั้งการเจริญเติบโตของ hairy root โดยพบว่า hairy root ที่ได้รับกรดเบนโซอิกมีน้ำหนักแห้งสะสมน้อยกว่า hairy root ที่ไม่ได้รับกรดเบนโซอิกระหว่างวันที่ 1-5 หลังการกระตุ้น แต่ในวันที่ 7 ของการกระตุ้น พบการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งสะสมเล็กน้อย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการใช้สิ่งกระตุ้นอื่นๆ เพื่อกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่งมักทำให้เนื้อเยื่อชะลอการเจริญเติบโต (Hwang, 2006) เช่น การกระตุ้นการผลิตสาร scopolamine และสาร hyoscyamine จาก hairy root ของ *Brugmansia candida* ซึ่งพบว่า hairy root ที่กระตุ้นด้วย CaCl_2 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักสดลดลงต่ำกว่าชุดควบคุม 50% และ hairy root ที่กระตุ้นด้วย CdCl_2 ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักสดลดลงต่ำกว่าชุดควบคุม 40% (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000) เป็นต้น ในกรณีที่สิ่งกระตุ้นมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเป็นอย่างมากจนส่งผลให้ปริมาณสารทุติยภูมิที่ผลิตได้ลดต่ำลงนั้น ในการใช้สิ่งกระตุ้นควรใช้เมื่อเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะปลายของ exponential หรือระยะ stationary ซึ่งเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ซึ่งสิ่งกระตุ้นจะไม่ส่งผลมากนักต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ (Buitelaar and Tramper, 1992)

สำหรับการผลิตสารฟลัมบาจินนั้น ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ hairy root สัมผัสกรดเบนโซอิกมีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณสารฟลัมบาจินรวม ซึ่งเป็นผลรวมของปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ใน hairy root รวมกับที่ปล่อยออกมาสู่อาหารเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้กรดเบนโซอิกสามารถกระตุ้นการผลิตสารฟลัมบาจินใน hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงได้เล็กน้อยเท่านั้น และไม่พบการปล่อยสารฟลัมบาจินออกสู่อาหารเพาะเลี้ยง โดยพบการกระตุ้นชั่วคราวในวันที่ 1 และ 7 หลังการกระตุ้น (Figure 4B) ซึ่งหลังจากกระตุ้นแล้ว 1 วัน พบการสะสมสารฟลัมบาจินมากที่สุดใน hairy root ที่ได้รับกรดเบนโซอิกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ (38.60 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 1.9 เท่าของชุดควบคุม) จากนั้นจึงลดต่ำลงในวันที่ 3-5 ซึ่งต่ำกว่า hairy root ที่ไม่มีการกระตุ้น และเพิ่มมากขึ้นอีกครั้งในวันที่ 7 ซึ่งพบการสะสมสารฟลัมบาจินมากที่สุดใน hairy root ที่ได้รับกรดเบนโซอิกความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยตรวจพบสารฟลัมบาจิน 41.78 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 1.4 เท่าของ hairy root ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

ถึงแม้กรดเบนโซอิกจะเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของกรดซาลิไซลิก ซึ่งทำให้คาดการณ์ได้ว่าการเพิ่มปริมาณกรดเบนโซอิกให้มากขึ้นนั้น น่าจะทำให้กรดซาลิไซลิกเพิ่มมากขึ้น และส่งผลให้ hairy root ผลิตสารทุติยภูมิได้มากขึ้น แต่การทดลองนี้กลับพบว่าการใช้กรดเบนโซอิกความเข้มข้น 10-40 มิลลิโมลาร์ นั้นสามารถกระตุ้น ให้ hairy root เจตมูลเพลิงแดงสร้างสารฟลัมบาจินเพิ่มขึ้นได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งนี้ Chong *et al.* (2001) พบว่าในใบที่ปลอดโรคและเซลล์แขวนลอยของยาสูบมี benzoyl-glucose อยู่ในปริมาณเล็กน้อย แต่ไม่พบ free benzoic acid และเมื่อปลูกเชื้อ *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) ให้กับใบที่ปลอดโรคหรือเซลล์แขวนลอยของยาสูบ พบว่ามีการผลิตและสะสม benzoyl-glucose ขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ free benzoic acid มีการผลิตเพิ่มเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้เมื่อให้ diphenylene iodonium ซึ่งเป็นสารยับยั้งขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการการสร้างกรดซาลิไซลิกแก่เซลล์แขวนลอยที่ผ่านการกระตุ้นด้วยเชื้อ TMV พบว่าเซลล์แขวนลอยนั้นไม่มีการสร้างกรดซาลิไซลิก แต่กลับมีการสะสม benzoyl-glucose เป็นจำนวนมากแทน จึงสรุปว่ากรดเบนโซอิกที่อยู่ในรูปของ conjugated benzoic acid เช่น benzoyl-glucose นั้น พืชใช้เป็นสารตั้งต้นของกรดซาลิไซลิก ไม่ใช่กรดเบนโซอิกที่อยู่ในรูปอิสระ (free benzoic acid) ซึ่งช่วยอธิบายผลงานวิจัยที่กระตุ้นสารฟลัมบาจินในงานวิจัยนี้ที่ใช้กรดเบนโซอิกในรูป free benzoic acid แล้วให้ผลการกระตุ้นไม่ได้

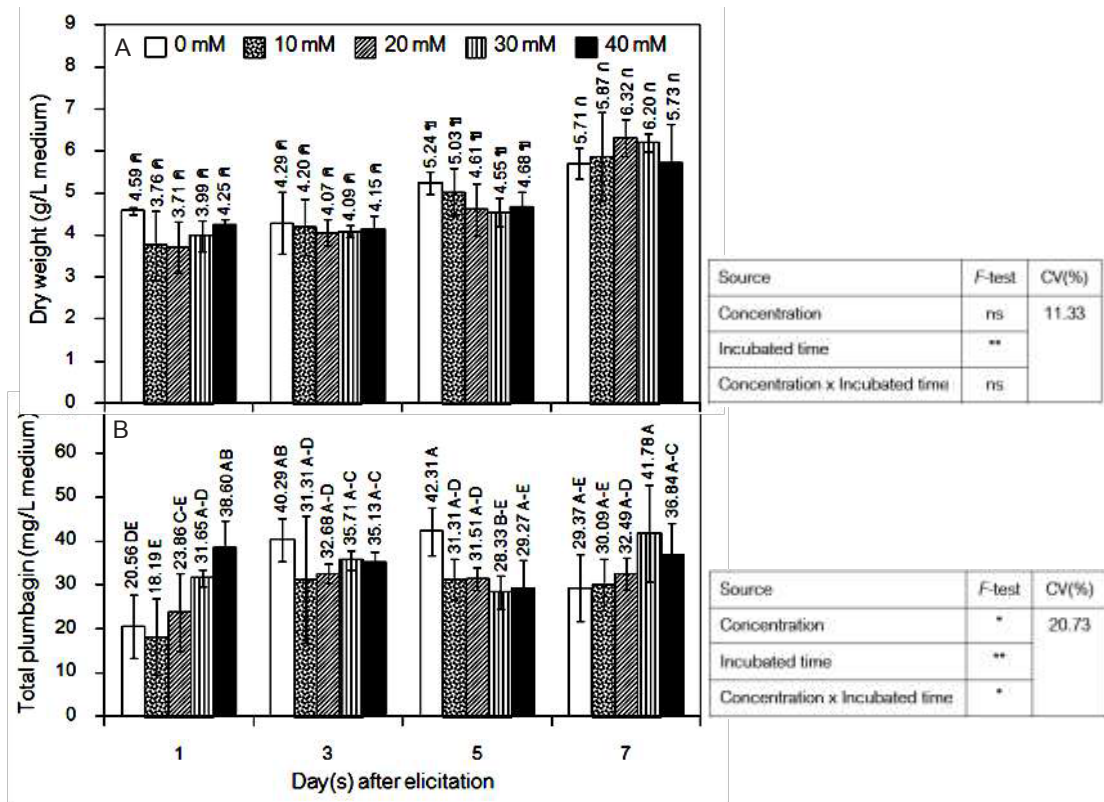


Figure 4 Dry weight (A) and total plumbagin (B) of *Plumbago indica* hairy root cultured in half strength Murashige and Skoog medium supplemented with 2% (w/v) sucrose at 25±2oC in a dark condition and elicited with 0-40 mM benzoic acid for 1-7 day(s). Means followed by the different letter in each data set (A-E: interaction of concentration and incubated time, ก-ด: incubated time) were significantly different according to Duncan's New Multiple Range Test ($p \leq 0.05$). Asterisks * and ** represent significance at $p = 0.05$ and $p = 0.01$, respectively. The 'ns' represents non significance.

สรุปผลการศึกษา

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิกทำให้ hairy root เจตมูลเพลิงแดงเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และกรดซาลิไซลิกมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตสารพลัมบาจินจาก hairy root รวมทั้งกระตุ้นการปล่อยสารพลัมบาจินออกสู่อาหารเพาะเลี้ยง โดยพบการผลิตสารพลัมบาจินมากที่สุดในการกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ ภายหลังจากกระตุ้น 1 วัน (93.64 มิลลิกรัมต่อลิตร; 4.4 เท่าของชุดควบคุม) สำหรับการใช้กรดเบนโซอิก พบว่ากรดเบนโซอิกมีแนวโน้มยับยั้งการเจริญเติบโตของ hairy root และกระตุ้นการผลิตสารพลัมบาจินได้เพียงเล็กน้อย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้งานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (โครงการ พสวท.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)

เอกสารอ้างอิง

- Agilent Technologies. 2001. *Agilent Chemstation* (Computer Program). Agilent Technologies, USA.
- Buitelaar, R. and J. Tramper. 1992. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell culture. *J. Biotech.* 23: 111-141.
- Chong, J., M.A. Pierrel, R. Atanassova, D.W. Reichhart, B. Fritig and P. Saindrenan. 2001. Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures: induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiol.* 125: 318-328.
- Chung, I.M., M. Thiruvengadam, K. Rekha and G. Rajakumar. 2016. Elicitation enhanced the production of phenolic compounds and biological activities in hairy root cultures of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 59: e160393.
- Chuntaratin, P. 2006. *Production of Plumbagin by Hairy Root, Callus and Cell Suspension Cultures of Plumbago indica* L. Ph.D. Thesis. Kasetsart University, Thailand. 133p.
- Ding, J., S. Shi, B.H. Jiang, Y.H. Yang, J. Huang, H.G. Shen, K. Xia and J. Jiang. 2004. Effect of methyl jasmonate with indol-3-acetic acid and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 40: 581-585.
- Georgiev, M.I., A.I. Pavlov and T. Bley. 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1175-1185.
- Gharechahi, J., M. Khalili, T. Hasanloo and G.H. Salekdeh. 2013. An integrated proteomic approach to decipher the effect of methyl jasmonate elicitation on the proteome of *Silybum marianum* L. hairy roots. *Plant Physiol. Biochem.* 70: 115-122.
- Hao, X., M. Shi, L. Cui, C. Xu, Y. Zhang and G. Kai. 2015. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 62:24-31.
- Hassan, S.T.S., K. Berchová-Bímová and J. Petráš. 2016. Plumbagin, a plant-derived compound, exhibits antifungal combinatory effect with amphotericin b against *Candida albicans* clinical isolates and anti-hepatitis C virus activity. *Phytother. Res.* 30: 1487-1492.

- Hwang, S.J. 2006. Baicalin production in transformed hairy root clones of *Scutellaria baicalensis*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 11: 105-109.
- Jeong, G.T., D.H. Park, H.W. Ryu, B. Hwang, J.C. Woo, D. Kim and S.W. Kim. 2005. Production of antioxidant compounds by culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer hairy root. *Appl. Biochem. Biotech.* 121: 1147-1157.
- KrstićMilošević, D., T. Janković, B. Uzelac, D. Vinterhalter and B. Vinterhalter. 2017. Effect of elicitors on xanthone accumulation and biomass production in hairy root cultures of *Gentiana dinarica*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 130: 631-640.
- Liu, Y., Y. Cai, C. He, M. Chen and H. Li. 2017. Anticancer properties and pharmaceutical applications of plumbagin: a review. *Am. J. Chin. Med.* 45: 423-441.
- Malarz, J., A. Stojakowska and W. Kisiel. 2007. Effect of methyl jassmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Chichorium intybus*. *Acta Physiol. Plant.* 29: 127-132.
- Mehmetoglu, U. and W.R. Curtis. 1997. Effect of abiotic inducers on sesquiterpene synthesis in hairy root and cell-suspension cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Appl. Biochem. Biotech.* 67: 71-77.
- Meuwly, P., W. Molders, A. Buchala and J.P. Metraux. 1995. Local and systemic biosynthesis of salicylic acid in infected cucumber plants. *Plant Physiol.* 109: 1107-1114.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nair, S.V., G. Baranwal, M. Chatterjee, A. Sachu, A.K. Vasudevan, C. Bose, A. Banerji and R. Biswas. 2016. Antimicrobial activity of plumbagin, a naturally occurring naphthoquinone from *Plumbago rosea*, against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.* 306: 237-248.
- Pitta-Alvarez, S.I., T.C. Spollansky and A.M. Giulietti. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 252-258.
- Pradeepa, V., Sathish-Narayanan, S., Kirubakaran, S.A., Senthil-Nathan, S., 2014. Antimalarial efficacy of dynamic compound of plumbagin chemical constituent from *Plumbago zeylanica* Lin (Plumbaginaceae) against the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 113, 3105–3109.
- Schenk, P.M., K. Kazan, I. Wilson, J.P. Anderson, T. Richmond, S.C. Somerville and J.M. Manners. 2000. Coordinated plant defence responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 11655-11660.
- Tatreerod, S., P. Saralamp and S. Chanprame. 2003. Hairy root induction and culture of *Plumbago indica* L. In *The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare*. Chiang Mai, Thailand. pp. 306.
- Vasconsuelo, A. and R. Boland. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.* 172:861–875.

วันรับบทความ (Received date) : 26 เม.ย. 61

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 4 ต.ค. 61

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 7 พ.ย. 61