

ผลของสารไคโตซานและเมทิลจัสโมเนตต่อการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานีน
แอมโมเนีย ไลเอส และการผลิตสารประกอบฟีนอลิกในหนอนตายหยาก
ในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Chitosan and Methyl Jasmonate on Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL)
Gene Expression and Phenolic Compound Production
in *In Vitro* Plantlets of *Stemona collinsae* Craib.

สุภาพร ภััสสร* สุชาดา สูดแสง และ คชาภรณ์ ทองดอนยอด
Supaporn Passorn*, Suchada Sudsaeng and Khachapon Thongdonyod

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จ. พะเยา 56000
Department of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

*Corresponding author: Email: ppapon@hotmail.com

(Received: 8 March 2019; Accepted: 15 August 2019)

Abstract: The effect of chitosan and methyl jasmonate on the induction of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and phenolic compound content in *Stemona collinsae* Craib. was conducted in this study. *In vitro* *S. collinsae* plantlets were stimulated for one and two weeks with various concentrations of elicitors. The observation found that PAL gene expression in root and shoot part of *S. collinsae* plantlets responded to elicitors depending on the concentration of stimulants, stimulation period and stage of plant growth. The shoot part of the 12 month-old *S. collinsae* plantlets stimulated with 100 mg/l chitosan showed the highest expression of PAL which was 3.93 fold higher than those determined in control and root part of stimulated plant. In addition, amount of total phenolic compound was 73.01 mg GAE/100g fresh weight which was 1.2 fold compared with the control. The 0.3 μ M methyl jasmonate stimulation for one week increased the PAL gene expression at the highest level in the root part by 8.66 times, resulting an increase of the total phenolic content at 88.37 mg gallic acid per 100 g fresh weight which was 1.2 times higher than control. Comparing the effect of stimulation on stage of growth between 6 month-old and 12 month-old *S. collinsae* plantlets by adding 100 mg/l chitosan and 0.3 μ M methyl jasmonate for one week, it was found that the amount of phenolic compounds obtained from all conditions were not significant different ($P > 0.05$) when compared to control.

Keywords: Phenylalanine ammonia lyase, phenolic compound, elicitors, *Stemona collinsae*

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Phenylalanine ammonia lyase (PAL) และปริมาณสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิกในหนอนตายหยาก *Stemona collinsae* Craib. โดยนำต้นหนอนตายหยากที่เพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อมากระตุ้นด้วยสารกระตุ้นไคโตซานและเมทิลจัสโมเนท ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่า การแสดงออกของยีน PAL ของต้นหนอนตายหยากตอบสนองต่อการกระตุ้นต่างกันทั้งส่วนรากและต้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นสารกระตุ้นระยะเวลาและอายุของต้นหนอนตายหยากที่ใช้ในการทดลอง โดยส่วนของต้นหนอนตายหยากอายุ 12 เดือน มีระดับการแสดงออกของยีน PAL สูงที่สุดและมากกว่าระดับการแสดงออกของยีนที่ตรวจพบในต้นควบคุมและส่วนของราก 3.93 เท่า เมื่อกระตุ้นด้วยไคโตซาน ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 73.01 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.2 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่การกระตุ้นด้วยเมทิลจัสโมเนท ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน PAL ในส่วนของรากได้สูงสุด 8.66 เท่า และพบปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมด 88.37 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.2 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม สำหรับการศึกษาผลของอายุการเจริญของหนอนตายหยากเปรียบเทียบระหว่าง 6 กับ 12 เดือน ที่กระตุ้นด้วยไคโตซานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เมทิลจัสโมเนท ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกกลับไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

คำสำคัญ: ฟีนอลอะลานีน แอมโมเนีย ไลเอส สารประกอบฟีนอลิก สารกระตุ้น หนอนตายหยาก

คำนำ

ความนิยมใช้สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคมีมาอย่างต่อเนื่อง โดยรายงานจากองค์การอนามัยโลกกล่าวว่าร้อยละ 80 ของประชากรโลกใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคเบื้องต้น (Raskin *et al.*, 2002) การผลิตสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพรทั่วไปพบว่ามีปริมาณต่ำกว่าร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง ขึ้นอยู่ชนิดของพืชและระยะการเจริญ จึงทำให้เกิดงานวิจัยพัฒนาการใช้สารกระตุ้น (elicitors) ในพืชสมุนไพรเพื่อช่วยในการแก้ปัญหาการผลิตสารทุติยภูมิที่มีความสำคัญในทางการแพทย์ (Singh and Dwivedi, 2018) สารกระตุ้นที่ใช้เพิ่มการสร้างสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยแหล่งที่มาของสารกระตุ้น ประกอบด้วย abiotic elicitor เป็นสารกระตุ้นที่ได้จากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น กลิ่นของโลหะหนัก รวมถึงสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิ รังสี กลุ่มที่สอง คือ biotic elicitor เป็นสารกระตุ้นที่ได้จากสิ่งมีชีวิต เชลล์จุลินทรีย์ หรือ สารสกัดจากเซลล์สิ่งมีชีวิต รวมไปถึงสารกลุ่มฮอร์โมนพืช ตัวอย่างเช่น ไคโตซาน และ เมทิลจัสโมเนท มักจะได้รับความนิยมเนื่องจากมีความปลอดภัยและสลายตัวได้ในธรรมชาติ และสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างทุติยภูมิเพิ่มขึ้นในพืชสมุนไพรหลากหลาย

ชนิด (Shakya, *et al.*, 2017; Thakur *et al.*, 2019) หนอนตายหยากเป็นสมุนไพรไทยอีกชนิดหนึ่งนำมาใช้ประโยชน์ทั้งด้านการเกษตรและการแพทย์ (Akanitapichat *et al.*, 2005) ดังเช่น สารประกอบฟีนอลิก stemanthrene B และ C เป็นสารอนุพันธ์ของ stilbenoid ที่สกัดจากหนอนตายหยาก พบว่ามีคุณสมบัติด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และอาการโรคหอบหืด (antiasthmatic) เนื่องจากสามารถยับยั้งการสร้าง leukotriene เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกลไกที่ทำให้เกิดการอักเสบ ปวดบวมของโรคต่าง ๆ (Adams *et al.*, 2005)

สารทุติยภูมิในกลุ่ม phenolic compound มีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค รวมไปถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และโรคมะเร็งต่าง ๆ ในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้นใช้กระบวนการสังเคราะห์ที่เรียกว่า phenylpropanoid biosynthesis โดยมีเอนไซม์หลัก คือ phenylalanine ammonia lyase (PAL) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญและมีบทบาทเป็นตัวกำหนดความเร็วในการเร่งปฏิกิริยา (rate limiting step) เป็นกระบวนการสำคัญ ที่ก่อให้เกิดการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในพืชมากมาย เช่น flavonol, flavone, flavonone, catechin, anthocyanin, isoflavonoid dihydroflavonol และ stilbenoid (Roupe *et al.*, 2006)

จากรายงานของ Chang *et al.* (2009) โดยเพิ่มการแสดงออกของยีน (overexpression) ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต chlorogenic acid (CGA) และ rutin ในต้นยาสูบ 2 ชนิด คือ ยีน *PAL2* จากพืช *Arabidopsis thaliana* และ hydroxycinnamoyl-CoA quinate: hydroxycinnamoyl transferase (*NtHQT*) จากต้นยาสูบเอง ทำให้ transgenic plant สามารถสร้างสาร CGA และ rutin เพิ่มขึ้นสองถึงห้าเท่าเทียบกับ wild type นอกจากนี้พืชเมื่อถูกเชื้อโรคเข้าทำลายหรือได้รับการกระตุ้นจากสารเคมีบางชนิดทำให้พืชสร้างสารทุติยภูมิซึ่งมีคุณสมบัติต้านทานเชื้อโรคเหล่านั้น โดยมีผลเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ PAL ส่งผลให้พืชมีการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้นด้วย ตัวอย่างเช่น การใช้เมทิลจัสโมเนตซึ่งเป็นสารสื่อสัญญาณ (signal transduction) เกิดขึ้นในขณะที่ยีนอยู่ในสภาวะความเครียดทำให้เกิดการกระตุ้นระบบการป้องกันตัวเอง ดังรายงานผลของเมทิลจัสโมเนตที่มีต่อผักกาดหอมเรดโอ๊คปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ที่ความเข้มข้น 0, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ในช่วงอายุ 20, 30 และ 40 วัน พบว่า ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์สามารถชักนำการผลิตสารแอนโทไซยานินได้สูงที่สุดเท่ากับ 10.7 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด (Khitka, 2014) นอกจากนี้ยังพบรายงานการผลิตสารทุติยภูมิกลุ่มอัลคาลอยด์ในหนอนตายหยากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *S. curtisii* Hook. f. โดยเลี้ยงในสภาวะไฮโดรโปนิคส์ที่เติมไคโตซาน ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำให้มีการผลิตสารอัลคาลอยด์ oxypotostemonine, stemocurtisine และ stemocurtisinol เพิ่มขึ้นในปริมาณที่แตกต่างกันคิดเป็น 1.9, 2.0 และ 1.5 เท่า ตามลำดับเทียบกับชุดควบคุม (Palee *et al.*, 2016) นอกจากนี้รากของหนอนตายหยากชนิดนี้ยังสามารถถูกกระตุ้นให้สร้างสารอัลคาลอยด์เพิ่มขึ้นได้โดยใช้สาร Paclobutrazol เช่นกัน (Montri and Saenphakdi, 2014)

การศึกษาการใช้สารกระตุ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างสารออกฤทธิ์ของหนอนตายหยากยังคงมีไม่มากนักและมุ่งสนใจในกลุ่มของสารอัลคาลอยด์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาเพื่อเพิ่มแนวทางพัฒนาศักยภาพการใช้ประโยชน์สมุนไพรหนอนตายหยากจากการผลิตสารออกฤทธิ์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก โดยศึกษา

เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PAL* และปริมาณการผลิตสารออกฤทธิ์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิกในต้นหนอนตายหยาก *S. collinsae* ที่สภาวะการกระตุ้นด้วยไคโตซานและเมทิลจัสโมเนต โดยผลที่ได้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานระดับอนุพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างสารประกอบฟีนอลิกต่าง ๆ ในหนอนตายหยากต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการเตรียมต้นหนอนตายหยากสภาพปลอดเชื้อ

การชักนำให้เกิดเป็นต้นหนอนตายหยากที่สมบูรณ์ โดยตัดชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยากที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มีความยาวประมาณ 2.0 เซนติเมตร ย้ายชิ้นส่วนของข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ naphthalene acetic acid (NAA) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน แสงจันทร์ทั้งเป็นต้นสมบูรณ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การกระตุ้นหนอนตายหยากด้วยไคโตซานและเมทิลจัสโมเนต

ในเบื้องต้นทดสอบผลของความเข้มข้นไคโตซานและเมทิลจัสโมเนต ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในต้นหนอนตาย หยากสภาพปลอดเชื้อ โดยนำต้นที่มีอายุ 12 เดือน ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS ที่เติมสารกระตุ้น (Figure 1) ดังนี้ ไคโตซาน ที่ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เมทิลจัสโมเนต ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ โดยทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ เมื่อครบตามระยะเวลานำหนอนตายหยากที่ถูกกระตุ้นล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้น้ำออกอย่างรวดเร็วด้วยไนโตรเจนเหลวและบดตัวอย่างให้ละเอียด เพื่อใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอและวัดปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด

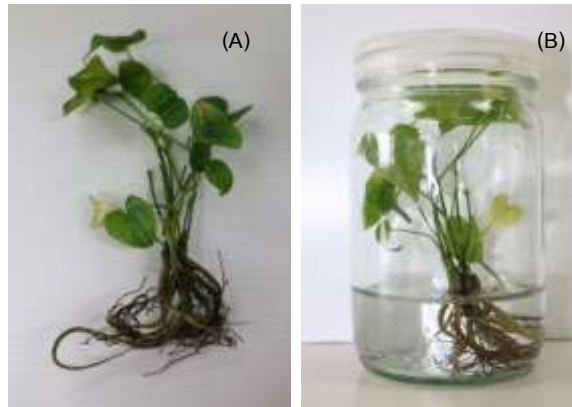


Figure 1. The *in vitro* 12 month-old *Stemona collinsae* Craib. plantlet (A) and plantlet in 1/2 MS supplemented with elicitors (B)

ลำดับต่อมาทดสอบเปรียบเทียบอายุการเจริญของต้นหนอนตายหายากสภาพปลอดเชื้อต่อการใช้สารกระตุ้น โดยใช้ต้นหนอนตายหายากที่มีอายุ 6 และ 12 เดือน โดยสภาวะการกระตุ้นที่เลือกใช้จากความเข้มข้นของสารและระยะเวลาการกระตุ้นที่สามารถทำได้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในปริมาณสูงกว่าในชุดควบคุมจากผลการทดลองเบื้องต้น

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน PAL ด้วยวิธี Real-time PCR

นำต้นหนอนตายหายากที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไคโตซานและเมทิลจัสโมเนท มาสกัด total RNA แยกจากส่วนรากและต้น โดยใช้ TRIzol reagent (Invitrogen, USA) และตรวจสอบปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วจึงนำ total RNA ปริมาณ 3 ไมโครกรัม มาใช้สร้าง first-strand cDNA (reverse transcription, RT) โดยใช้ M-MLV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA) ร่วมกับ Oligo (dT) primer และนำ first-strand cDNA ที่ได้ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-Time PCR โดยใช้เครื่อง Mini Opticon Real-time System (Bio-Rad, USA) ด้วย Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix ในปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ก่อนหน้านี้ 1 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ forward primer และ reverse primer ที่ออกแบบโดยอาศัยข้อมูลดังแสดงใน Table 1

โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และใช้ยีน Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GADPH*) เป็นยีนอ้างอิง การวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Delta delta Ct โดยคำนวณสัดส่วนการแสดงออกของยีนจากสมการดังนี้คือ $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดในต้นหนอนตายหายาก

การสกัดสารตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดดัดแปลงจากวิธีของ Kim *et al.* (2003) โดยนำตัวอย่างต้นหนอนตายหายากที่ผ่านการกระตุ้นมาบดจนละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำตัวอย่าง 2 กรัม เติมสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง homogenizer นาน 2 นาที แล้วนำไปปั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แยกกากตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออกและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไปด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method โดยทำการดูดสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารฟอลิน-ซีเคาตูรีเอเจนท์ 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 6 นาที แล้วจึงเติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น จำนวน

Table 1. Primers used for *PAL* gene expression analysis by Real-Time PCR

Gene (Accession no.)	Primer sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Product size (bp)
<i>PAL</i> (MK490962)	F: CTg CAT gCT TCC ACT TCT TTg R: gAC AAC ggT gAC AAg gAg AA	68.88 68.25	107
<i>GAPDH</i> (MK490963)	F: ggC ATT gTT gAg ggT TTg ATg R: ggT gCT gCT Agg AAT gAT gT	68.88 68.25	129

1 มิลลิลิตร ที่ไว้ 90 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ในช่วงความเข้มข้น 20-100 ส่วนต่อล้าน รายงานค่าในหน่วยมิลลิกรัมแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำการตรวจ 3 ซ้ำต่อ 1 กลุ่มตัวอย่าง และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าสถิติและค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Statistical Package for the Social Science for Windows (SPSS)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของไคโตซานที่มีต่อการแสดงออกของยีน *PAL* และ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหนอนตายหยาก

ต้นหนอนตายหยากที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไคโตซาน แยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของราก และส่วนของต้นใบ ที่มีใบ นำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PAL* ด้วยเครื่อง Real-time PCR ดังแสดงใน Figure 2 จากการศึกษพบว่า การแสดงออกของยีนในรากเพิ่มขึ้นในสภาวะการกระตุ้นด้วยไคโตซานความเข้มข้น 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร การแสดงออกของยีน *PAL* ในรากสูงสุด 7.96 เท่า เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไคโตซานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับ

ชุดควบคุม แตกต่างจากการกระตุ้นที่เกิดจากไคโตซาน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบมีการแสดงออกของยีน *PAL* ในต้นสูง 3.93 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และสูงกว่าในส่วนของการ นอกจากนี้พบว่าแนวโน้มการแสดงออกของยีน *PAL* ในใบและต้นเพิ่มสูงขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยไคโตซาน ที่ความเข้มข้นสูงและระยะเวลาเพิ่มขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของยีน *PAL* ในรากจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนโดยเริ่มต้นการกระตุ้นที่ความเข้มข้นของไคโตซานในระดับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูงสุด ที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงที่ระดับ 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในหนอนตายหยากที่กระตุ้นด้วยไคโตซาน ในสัปดาห์ที่ 1 พบว่า การกระตุ้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 25 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงคือ 73.72 และ 73.90 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ โดยมีปริมาณสูงขึ้นจากชุดควบคุมคิดเป็น 1.2 เท่า และการกระตุ้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 2 ยังคงมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าการกระตุ้นจากระดับความเข้มข้นอื่น โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง 73.01 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด

จากการทดลองกระตุ้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ ที่มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงขึ้นจากชุดควบคุมคิดเป็น 1.2 เท่า อย่างไรก็ตามในสภาวะนี้ไม่พบว่ามีปริมาณการแสดงออกของยีน *PAL* ในรากเพิ่มขึ้น แต่พบการแสดงออกในใบและลำต้นสูงขึ้น 3.93 เท่า ในสัปดาห์ที่ 2 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เหตุที่ไม่พบการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PAL* ในราก อาจเนื่องมาจากระยะเวลา

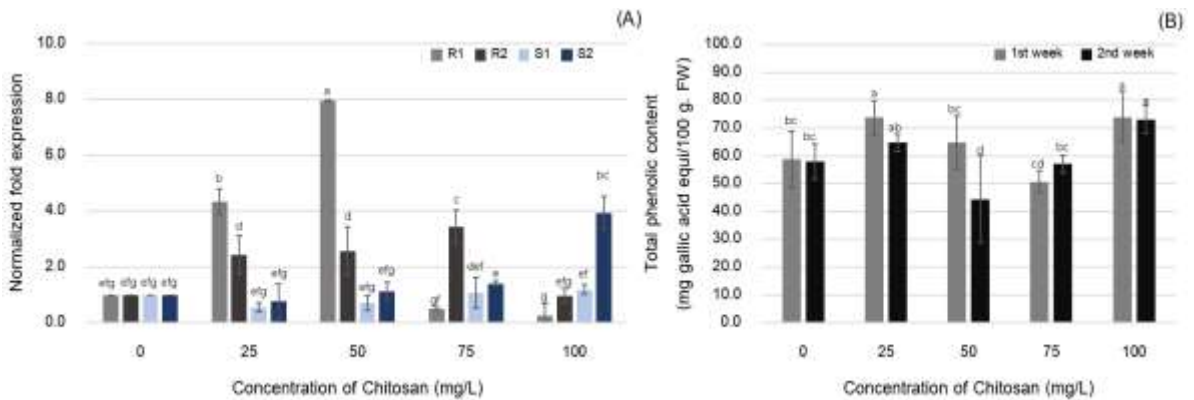


Figure 2. Effects of chitosan dosage on the expression of *PAL* gene in 12 month-old *Stemona collinsae* Craib. plantlet for 1- and 2-week treatment (A) and total phenolic contents (B). R1 and R2 indicate the *PAL* gene expression from root part at 1 and 2 weeks. S1 and S2 indicate expression level from shoot part at 1 and 2 weeks. (Different letters on the bar indicate the significant difference at $P < 0.05$)

ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนนั้นผ่านช่วงเวลาที่รากหนอนตายหายากถูกกระตุ้นสร้าง mRNA ของยีน *PAL* ไปแล้ว ดังเช่นรายงานการศึกษาของ Kamalipourazad *et al.* (2016) โดยเติมสารไคโตซานที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แขวนลอย *Scrophulara striata* Boiss. เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในสภาวะปกติ และติดตามการแสดงออกของยีนต่อเนื่องในวันที่ 3, 5 และ 7 พบว่า การแสดงออกของยีน *PAL* ในพืชชนิดนี้มีปริมาณสูงสุดในวันที่ 5 และลดลงในวันที่ 7 สอดคล้องกับการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ *PAL* เช่นกัน อีกทั้งยีน *PAL* ที่พบในพืชเป็นกลุ่มของยีนที่ทำงานร่วมกัน (multi-gene family) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกันแต่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับช่วงระยะการเจริญและการพัฒนาของพืช การปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับสิ่งแวดล้อมในการศึกษาครั้งนี้ ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PAL* ในหนอนตายหายากเพียงชนิดเดียวทำให้ยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีนกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกได้มากนัก ดังเช่นที่พบในรายงานการศึกษายีน *PAL* ในพืช *Arabidopsis* ประกอบด้วยยีน 4 ชนิด โดยระบุว่ายีน *AtPAL1* และ *AtPAL2* ทำหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Zhang and Liu, 2015)

ผลของเมทิลจัสโมเนทที่มีต่อการแสดงออกของยีน *PAL* และ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหนอนตายหายาก

จากการเพาะเลี้ยงต้นหนอนตายหายากอายุ 12 เดือน ในสารกระตุ้นเมทิลจัสโมเนท พบว่า การแสดงออกของยีน *PAL* ในรากเพิ่มสูงขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ มีการแสดงออกเพิ่ม 8.66 เท่า ในสัปดาห์ที่ 1 และ 7.55 เท่า ในสัปดาห์ที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยการแสดงออกยีน *PAL* เพิ่มขึ้นในรากมากกว่าในใบและลำต้น (Figure 3) เมื่อเปรียบเทียบกับทั้ง 2 สัปดาห์ ในสภาวะการเติมสารเมทิลจัสโมเนทที่ระดับความเข้มข้นอื่นนั้น การแสดงออกของยีน *PAL* มีความใกล้เคียงกับชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในต้นหนอนตายหายากที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทิลจัสโมเนทที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ต้นหนอนตายหายากที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทิลจัสโมเนท ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 88.37 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด โดยคิดเป็น 1.2 เท่า เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

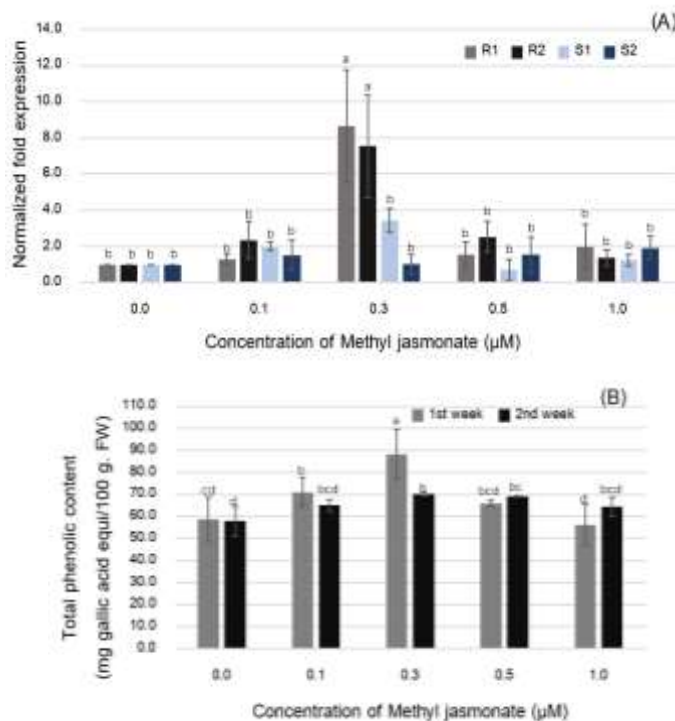


Figure 3. Effects of methyl jasmonate dosage on the expression of PAL gene in 12 month-old *Stemona collinsae* Craib. plantlet for 1- and 2-week treatment (A) and total phenolic contents (B). R1 and R2 indicate the PAL gene expression from root part at 1 and 2 weeks. S1 and S2 indicate expression level from shoot part at 1 and 2 weeks. (Different letters on the bar indicate the significant difference at $P < 0.05$)

จากผลการทดลองสภาวะการกระตุ้นด้วยเมทิลจัสโมเนต มีเพียงระดับความเข้มข้นที่ 0.3 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นแสดงออกของยีน PAL ที่เพิ่มขึ้นได้ แต่ยังไม่ส่งผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากระดับการกระตุ้นอื่นมากนัก พบเช่นเดียวกับการทดลองในพืชสมุนไพรของ Jirapongpattana *et al.* (2017) โดยเพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็น *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill บนอาหารที่เติม jasmonic acid (JA) ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ความสัมพันธ์ระหว่างอายุการเจริญที่เหมาะสมของต้นหนอนตายหยากต่อสภาวะการกระตุ้น

ผลการเปรียบเทียบของสารกระตุ้นไคโตซานและเมทิลจัสโมเนต ในต้นหนอนตายหยากอายุการเจริญ 6 และ 12 เดือน (Figure 4) เลือกระดับความเข้มข้นของสารกระตุ้นจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่าระดับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงใน Figure 2B และ Figure 3B โดยใส่สารไคโตซาน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร และเมทิลจัสโมเนต ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า ไคโตซานไม่สามารถกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกยีน PAL ในรากหนอนตายหยากอายุ 6 และ 12 เดือน แตกต่างจากผลของเมทิลจัสโมเนตกระตุ้นการแสดงออกของยีนในรากอายุ 12 เดือน เพิ่มสูงกว่าในรากของต้นหนอนตายหยากอายุ 6 เดือน (Figure 4A) ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณ

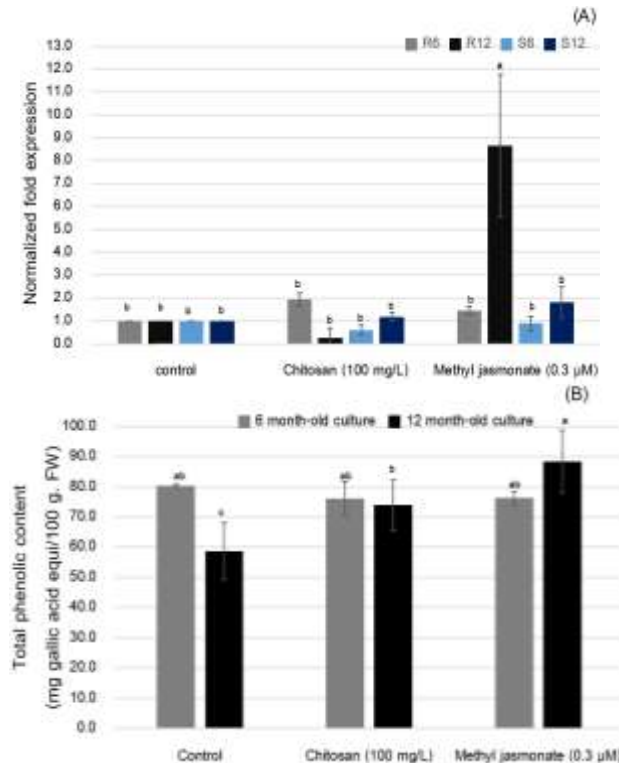


Figure 4. Effects of 100 mg/l chitosan and 0.3 μM methyl jasmonate on the expression of *PAL* gene in 6 and 12 month-old *Stemonia collinsae* Craib. plantlet for 1 week period (A) and total phenolic contents (B). R6 and R12 indicate the *PAL* gene expression from root part of 6 and 12 month-old. S6 and S12 indicate expression from shoot part of 6 and 12 month-old. (Different letters on the bar indicate the significant difference at $P < 0.05$)

สารประกอบฟีนอลิกแสดงให้เห็นว่าสภาวะการกระตุ้นนี้ยังไม่สามารถทำให้หนอนตายหยากสร้างสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกได้ในปริมาณที่แตกต่างจากชุดควบคุมในช่วงอายุ 6 เดือน แต่จะให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเฉพาะในอายุ 12 เดือน (Figure 4B) จากการทดลองใช้สารกระตุ้นในหนอนตายหยากครั้งนี้ผลกระทบที่เกิดขึ้นอาจเกี่ยวข้องกับการเจริญของต้นหนอนตายหยาก นอกเหนือจากผลกระทบต่อการกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ

การเลือกความเข้มข้นของสารกระตุ้นเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของพืช เนื่องจากการตอบสนองของพืชมีความเกี่ยวข้องกับการกลไกการทำงานของภายในเซลล์หลากหลายระบบ โดยมีรายงานการใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้นสูงมากเกินไปจะทำให้รากพืชหยุดชะงักการเจริญเติบโต พบได้ในพืช *Arabidopsis* มะเขือเทศ และ

ข้าวบาร์เลย์ กลไกเกิดจากการสะสมของฮอร์โมนออกซินในราก โดยเฉพาะในกลุ่ม indole acetic acid (IAA) และกลุ่ม gibberellic acid รวมทั้งกลุ่มฮอร์โมนที่ถูกกระตุ้นด้วยความเครียดด้วยกรด jasmonic (JA) และ salicylic (SA) (Lopez-Moya *et al.*, 2019) และยังมีรายงานว่า การสะสมสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นของไคโตซานเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานเพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากโรคพืช โดยมีโมเลกุลของพืชที่ทำหน้าที่เป็นตัวตอบสนองการกระตุ้น (PRR, pattern recognition receptor) สามารถตรวจจับไคโตซานซึ่งโครงสร้างเหมือนกับผนังเซลล์ของราสาเหตุโรคพืช (MAMP, microbe-associated molecular pattern) ทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ เช่น การเพิ่มขึ้นของไฮโดรเจนและแคลเซียมไอออน การกระตุ้นวิถีไมโทเจนแอกทีเวเตดโปรตีนไคเนส (MAP-Kinase) ส่งผลต่อไปถึงการ

แสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารฟิโตอะเล็กซินเพิ่มขึ้น จึงทำให้พืชสังเคราะห์สารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) ที่เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก เทอร์ปีโนอยด์ และอัลคาลอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ก่อโรค (Iriti and Faoro, 2009; Xing *et al.*, 2015) ส่วนกลไกการทำงานของเมทิลจัสโมเนตนั้นไม่เพียงแต่เป็นสารที่ส่งสัญญาณทำให้เกิดการสร้างฟิโตอะเล็กซินชนิดต่าง ๆ เมื่อเกิดสภาวะเครียดทั้งจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต ยังทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนควบคุมการเจริญของพืชในระยต่าง ๆ ดังนั้นกลไกจึงมีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับการทำงานของกลุ่มยีนหลายกลุ่ม และสามารถกระตุ้นการทำงานของ transcription factor (TF) ที่หลากหลายแตกต่างกันในกระบวนการสร้างสารฟิโตอะเล็กซินแต่ละชนิด เช่น การควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินใน *A. thaliana* เกี่ยวกับการทำงานของโปรตีน Jasmonate ZIM-domain (JAZ) ร่วม กับ WD-repeat/bHLH/MYB complexes (Wasternack and Strnad, 2019)

สรุป

จากการศึกษาการใช้สารกระตุ้นไคโตซานและเมทิลจัสโมเนต เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PAL* และส่งผลให้เกิดการสร้างสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในหนอนตายหยากนั้น ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารกระตุ้นทั้งสองชนิดสามารถทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *PAL* เพิ่มขึ้น แต่ยังคงไม่ส่งผลให้เกิดปริมาณการเพิ่มของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกสูงมากนักโดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเพียง 1.2 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมในการคัดเลือกระยะเวลาการกระตุ้นและระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง เพื่อการวิเคราะห์หลังการกระตุ้นให้ละเอียดมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปี 2558 (สัญญาเลขที่ R020058209018) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Adams, M., T. Pacher, H. Greger and R. Bauer. 2005. Inhibition of leukotriene biosynthesis by stilbenoids from *Stemona* species. *Journal of Natural Products* 68(1): 83-85.
- Akanitapichat, P., P. Tongngok, A. Wangmaneerat and B. Sripanidkulchai. 2005. Antiviral and anticancer activities of *Stemona collinsae*. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 29(3-4): 125-136. (in Thai)
- Chang, J., J. Luo and G. He. 2009. Regulation of polyphenols accumulation by combined overexpression/silencing key enzymes of phenylpropanoid pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 41(2): 123-130.
- Iriti, M and F. Faoro. 2009. Chitosan as a MAMP, searching for PRR. *Plant Signaling and Behavior* 4(1): 66-68.
- Jirapongpattana, R., Y. Jirakiattikul and P. Rithichai. 2017. Effects of jasmonic acid and yeast extract on secondary metabolite contents in shoot culture of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. *Thai Journal of Science and Technology* 25(3): 485-496. (in Thai)
- Kamalipourazad, M., M. Sharifi, H.Z. Maivan, M. Behmanesh and N.A. Chashmi. 2016. Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 107: 374-384.
- Khitka, B. 2014. Influence of methyl jasmonate on antioxidant activity and nutritional value of Red oak lettuce in hydroponics farming system. *Khon Kaen Agricultural Journal* 42(Supplement 1): 652-657. (in Thai)

- Kim, D.O., S.W. Jeong and C.Y. Lee. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 81(3): 321-326.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time qualitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Lopez-Moya, F., M. Suarez-Fernandez and L.V. Lopez-Llorca. 2019. Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20(2): 332, doi: 10.3390/ijms20020332.
- Montri, N. and S. Saenphakdi. 2014. Effect of paclobutrazol on growth and development and total stemona alkaloids accumulation in root of *Stemona curtisii* Hook. F. *in vitro*. Khon Kaen Agricultural Journal. 42(Supplement 1): 602-608. (in Thai)
- Palee, J., S. Dheeranupattana, S. Wangkam, S.G. Pyne and A.T. Ung. 2016. Effects of chitosan and salicylic acid on *Stemona* alkaloid production in hydroponic culture of *Stemona curtisii* Hook. f. Chiang Mai Journal of Science 43(5): 1070-1076.
- Roupe, K.A., C.M. Remsberg, J.A. Yanez and N.M. Davies. 2006. Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Current Clinical Pharmacology* 1(1): 81-101.
- Raskin, I., D.M. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Illic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D.A. Moreno, C. Ripoll, N. Yakoby, J.M. O'Neal, T. Cornwell, I. Pastor and B. Fridlender. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* 20(12): 522-531.
- Shakya, A., G. Marslin, K. Siram, L. Beerhues and G. Franklin. 2017. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 71: 70-82.
- Singh, A. and P. Dwivedi. 2018. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7(1): 750-757.
- Thakur, M., S. Bhattachary, P.K. Khosla and S. Puri. 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 12: 1-12.
- Wasternack, C. and M. Strnad. 2019. Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites - pathway, transcription factors and applied aspects - A brief review. *New Biotechnology* 48: 1-11.
- Xing, K., X. Zhu, X. Peng and S. Qin. 2015. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 35: 569-589.
- Zhang, X. and C.J. Liu. 2015. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Molecular Plant* 8(1): 17-27.