บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DBG4980009
ชื่อโครงการ: การผลิตสารทุติยภูมิของเซลล์เพาะเลี้ยงและรากเพาะเลี้ยงกวาวเครือขาว
นักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. สมภพ ประธานธุรารักษ์ และคณะ
ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
E-mail Address: pyspr@mahidol.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี (กันยายน 2549 - สิงหาคม 2552)

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย และรากเพาะเลี้ยงของกวาวเครือขาว สำหรับการผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์เพื่อใช้ประโยชน์ทางยาและเครื่องสำอาง โดยนำแคลลัสที่กระตุ้นจากเนื้อเยื่อใบ ลำต้น และรากของกวาวเครือขาวพันธุ์ *Pueraria candollei* var. *candollei* และ *P. candollei* var. *mirifica* มาชักนำให้เกิดเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย เซลล์ที่ได้มีการเจริญเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 15-24 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นนำเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยมาสกัดด้วยเมทานอลและวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามวิธีวิเคราะห์ที่ได้กำหนดขึ้น พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อใบ ลำต้น และรากกวาวเครือขาวมีการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ 4 ชนิด คือ daidzein daidzin genistein และ genistin เป็นสารหลัก ซึ่งสารทั้ง 4 ชนิดนี้ในธรรมชาติพบเฉพาะในส่วนรากเท่านั้น ซึ่งอัตราการสร้างสารเหล่านี้ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยสูงกว่าที่พบในเนื้อเยื่อพืชธรรมชาติ เมื่อนำเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้มาเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร พบว่าเซลล์ในถังเพาะเลี้ยงเจริญเติบโต และมีการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ต่ำกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในระบบ flask ซึ่งควรจะต้องมีการพัฒนาระบบในการเพาะเลี้ยงต่อไป

เมื่อนำเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวมาเหนี่ยวนำให้สร้างสารทุติยภูมิ ด้วยสารกระตุ้น (elicitor) ชนิด abiotic (copper sulfate และ methyl jasmonate) และชนิด biotic (yeast extract, chitosan และ laminarin) พบว่าสารกระตุ้นแต่ละชนิดมีผลต่อการเจริญ และการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน โดย methyl jasmonate 2.0 ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มการสะสมไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์ของกวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์สูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า laminarin กระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *mirifica* สร้าง puerarin ได้ ซึ่งไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

การชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงของกวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์ สามารถทำได้โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* ร่วมกับ acetosyringone และพบว่าการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของรากเพาะเลี้ยงที่ได้มีรูปแบบและปริมาณแตกต่างกับที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยและรากเพาะเลี้ยงของกวาวเครือขาว สามารถนำไปใช้ในการผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ เพื่อทดแทนการเก็บจากแหล่งธรรมชาติได้

คำหลัก: กวาวเครือขาว ไอโซฟลาโวนอยด์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

Abstract

Project Code: DBG4980009

Project Title: Secondary metabolites production of cell culture and hairy root culture of *Pueraria candollei*

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Sompop Prathanturarug, *et. al*.
Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy,
Mahidol University

E-mail Address: pyspr@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years (September 2006 – August 2009)

This study is aimed at applying cell suspension and hairy root culture techniques to generate system for isoflavonoid production of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica*. We established cell suspension cultures derived from leaf, stem, and root calli of *P. candollei.* Growth of the cell suspension cultures progressed to the stationary phase within 15-24 days. Methanolic extract of both varieties of *P. candollei* cell suspension cultures were analyzed using validated HPLC protocol. All cell lines derived from leaf, stem, and root explants produced four major isoflavonoids; daidzein, daidzin, genistein, and genistin; whereas these isoflavonoids were only detected in the roots of intact plants. Furthermore, the isoflavonoid contents of cell suspension cultures were higher than those of intact plants. The cell suspension cultures were successfully scaled up to 3-L biological stirrer. However, the growth and isoflavonoid accumulation were lower than those of flask culture.

The effects of various concentrations of abiotic (copper sulfate, methyl jasmonate) and biotic (yeast extract, chitosan, laminarin) elicitors on the cell growth and isoflavonoid accumulation of *P. candollei* cell suspension cultures were further demonstrated. The two plant varieties exhibited different growth responses and varied isoflavonoid accumulation after the addition of elicitors. Methyl jasmonate principally demonstrated an induction effect on the isoflavonoid content in both varieties. Addition of 2.0 μM methyl jasmonate induced the highest isoflavonoid content. Laminarin elicited the *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension culture to produce puerarin, which was not found in the unelicited culture.

Hairy root cultures of both plant varieties were established using *Agrobacterium rhizogenes* with the aid of acetosyringone. The isoflavonoid accumulated in the hairy roots were different from cell suspension culture, both amount and pattern.

From our study, the cell suspension and hairy root cultures of *P. candollei* showed their capability as renewable sources for isoflavonoid production.

Keywords: Elicitor, Isoflavonoids, Leguminosae, Medicinal plant, *Pueraria*