รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเหนี่ยวนำยอดเพาะเลี้ยงจากต้นกระท่อมในหลอดทดลอง เพื่อศึกษาชีวสังเคราะห์ของมิตรากัยนีน

Induction of *in vitro* shoot culture of *Mitragyna speciosa* for mitragynine biosynthetic study

โดย

ผศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเภททั่วไป ประจำปี 2552

มีนาคม 2554

สัญญาเลขที่ PHA520146S

โครงการ: การเหนี่ยวนำยอดเพาะเลี้ยงจากกระท่อมในหลอดทดลองเพื่อการศึกษาชีวสังเคราะห์ของมิตรากัยนีน

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีเป้าหมายสร้างพืชต้นแบบเพื่อศึกษาชีวสังเคราะห์ของมิตรากัยนีน โดยใช้ต้นกระท่อมที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วย *Agrobacterium rhizogenes* เพื่อเพิ่มจำนวนต้นกระท่อม จึงได้ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง โดยพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เพิ่มจำนวนยอดได้ดีที่สุดคือ McCown Woody Plant medium (WPM) ที่เสริมด้วย 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) น้ำตาล, 0.8% (น้ำหนักต่อปริมาตร) สารก่อเจล, 2 มิลลิกรัม/ลิตร ไทไดอะซูรอน (TDZ) และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เบนซิลอะดีนีน (BA) เลี้ยงในสภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยให้จำนวนยอด 9.58 ± 0.63 ยอดต่อชิ้น มีความสูงเฉลี่ย 0.48 ± 0.06 เซนติเมตร ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงที่เหนี่ยวนำให้เกิดรากดีที่สุดคือ WPM ที่เสริมด้วย 5 มิลลิกรัม/ลิตร กรดบิวทัยริก (IBA) เมื่อย้ายพืชจากสภาวะเพาะเลี้ยงสู่ดินธรรมชาติ พบว่ามีอัตรารอดประมาณ 60% สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณมิตรากัยนีน ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบ HPLC ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ และพบว่าการเตรียมสารสกัดจากต้นกระท่อมจำเป็นต้องผ่าน ไดอะอิออน HP-20 ก่อนนำมาแยกบนคอลัมภ์ HPLC ด้วยวิธีการวิเคราะห์นี้ มิตรากัยนีนจะถูกชะที่เวลา 9.6 นาที เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารมิตรากัยนีนจากต้นที่ได้จากการขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง (อายุ 5 เดือน) พบว่ามีปริมาณ 0.175 ± 0.007 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

นำต้นกระท่อมที่ได้จากการขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง มาเหนี่ยวนำเพื่อให้เกิดยอดเพาะเลี้ยง อาศัยอาหารเพาะเลี้ยงที่เพิ่มปริมาณยอดได้ดีดังกล่าวข้างต้น ภายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดยอด บนอาหารแข็งนาน 2 สัปดาห์ ย้ายยอดเพาะเลี้ยงสู่อาหารเหลว จากนั้นศึกษาคุณลักษณะของยอดเพาะเลี้ยงที่ได้ โดยสร้างกราฟการเจริญเติบโตและกราฟการสร้างมิตรากัยนีน ผลการทดอลงพบว่ารอบการเจริญเติบโตของยอดเพาะเลี้ยงกระท่อมมีช่วงเวลานาน 30 วัน และมีการสร้างมิตรากัยนีนได้สูงสุดในวันที่ 14 ของการเจริญเติบโต มีปริมาณมิตรากัยนีน 0.101 ± 0.011 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

นำยอดเพาะเลี้ยงที่ได้มาเป็นพืชต้นแบบการศึกษาชีวสังเคราะห์ของมิตรากัยนีน โดยศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนสองชนิดได้แก่ ทริปโตฟานดีคาร์บอกซีเลส (*tdc*) และ สตริ๊กโตซิดีน ซินเทส (*sss*) เมื่อกระตุ้นยอดเพาะเลี้ยงด้วยสารกระตุ้นสองชนิดได้แก่ เมทิล แจสโมเนท (MJ) และสารสกัดยีสต์ (YE) โดยทดลองหาความเข้มข้นและช่วงเวลากระตุ้นที่เหมาะสมของ MJ และ YE สำหรับสารกระตุ้นชนิด MJ พบว่าที่ความเข้มข้น 10 μM กระตุ้นการสร้างมิตรากัยนีนสูงสุด สูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 3.4 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้น 10 μM กระตุ้นนาน 24 ชั่วโมง มีผลกระตุ้นการสร้างมิตรากัยนีนสูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 3.9 เท่า และกระตุ้นการแสดงออกของยีน *tdc* และ *sss* ให้มีการแสดงออกได้สูงสุด สำหรับสารกระตุ้นชนิด YE พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กระตุ้นการสร้างมิตรากัยนีนได้สูงสุด เมื่อกระตุ้นนาน 12 ชั่วโมง มีผลให้การสร้างมิตรากัยนีนสูงกว่ากลุ่มควบคุม 1.3 เท่า และสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดได้สูงสุด จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าพืชต้นแบบชนิดยอดเพาะเลี้ยง มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาชีวสังเคราะห์ของมิตรากัยนีน ในสภาวะควบคุมและสภาวะกระตุ้นด้วยวิธีอิลิซิเตชั่น

สัญญาเลขที่ PHA520146S

Title: Induction of *in vitro* shoot culture of *Mitragyna speciosa* for mitragynine biosynthetic study

---

ABSTRACT

This study aimed to establish a model plant for mitragynine biosynthesis. Plant materials used in this study was from the regenerated plantlet of *Agrobacterium rhizogenes*-infected *Mitragyna speciosa*. To produce a number of plantlet, protocol of micropropagation has been performed. Shoot initiation and proliferation was succeeded by excising an axillary bud and place on the McCown Woody Plant medium (WPM) supplemented with 2% (w/v) sucrose, 0.8% (w/v) plant agar, 2 mg/L thidiazuron (TDZ) and 1 mg/L benzyladenine (BA) under conditions of 25°C, light 16 h/day, resulting number of shoot of 9.58 ± 0.63 shoots per explant with average length of 0.48 ± 0.06 cm. The rooting medium was WPM supplemented with 5 mg/L indolebutyric acid (IBA). After acclimatization, the survival rate of *M. speciosa* was about 60%. In this study, we established and validated the HPLC method for mitragynine content quantification. Pretreatment the crude extract with diaion HP-20 could afford the extract for HPLC analysis. Under separation condition, mitragynine was eluted at 9.6 min. Under this condition, the mitragynine of the 5-month old regenerated plant was 0.175 ± 0.007 mg/g DW.

Shoot culture was established by cutting an axillary bud and placed on the shoot multiplication medium. After 2 weeks of shoot initiation, cluster of shoots (about 5 shoots per explants) was transferred to the WPM liquid medium with similar supplement. Construction of growth and production curve suggested that the shoot culture grew within 30 days of growth cycle and produced the mitragynine at maximal amount of 0.101± 0.011 mg/g DW after 14th day of culture.

This model plant was used for mitragynine biosynthetic study. The transcription profiles of the tryptophan decarboxylase (*tdc*) and strictosidine synthase (*sss*) were monitored after elicited the shoot culture with methyl jasmonate (MJ) and yeast extract (YE). For MJ elicitation, at 10 μM MJ could enhance mitragynine production 3.4 times higher than control. In addition, at 10 μM MJ exposed for 24 h increased mitragynine content 3.9-fold higher than control and up-regulated the *tdc* ans *sss* genes. For elicited shoot culture with YE, the concentration was 0.1 mg/mL and exposed for 12 h increased the mitragynine content 1.3-fold higher than control and stimulated the *tdc* ans *sss* genes. From this study, we succeed to establish a model plant for the biosynthetic study of TIA in *M. speciosa* under control condition and ready to use for manipulated condition such as elicitation.