รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ

(ไทย) การเพิ่มการสร้างสารไดเทอร์ปีนในแคลลัสเปล้าน้อยด้วยการเติมสารตั้งต้นและสารกระตุ้น

(English) Enhancing production of diterpenes in *Croton stellatopilosus* callus culture by addition of precursors and elicitors

รหัสโครงการ PHA550336S

คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์

Contents

	Page
Title page	1
Contents	2
List of figures	3
List of tables	5
Acknowledgements	6
บทคัดย่อ	7
Abstract	8
Introduction	9
Objective	9
Literature review	10
Materials and methods	19
1. Plant materials	19
2. Chemicals	19
3. Instrumentation	19
4. Solutions	20
5. Nutrient media	20
6. Induction of callus culture	20
7. Induction of green callus culture	22
8. Time course study of *C. stellatopilosus* callus culture	22
9. Addition of precursors	22
10. Treatment of elicitors	22
11. Quantification of geranylgeraniol (GGOH) content	22
12. Statistical analysis	22
Results	23
1. Establishment of callus and green callus cultures	23
2. Establishment of growth curve	23
3. Screening of diterpenes production in callus culture	25
4. Effect of addition of precursors on GGOH production	39
5. Effect of addition of elicitors on GGOH production	32
Discussion	35
References	38
Proceeding from the international conference CDD2012	

List of Figures

Figure		Page
1	Chemical structure of diterpenes and diterpenes derivatives in *Croton stellatopilosus*.	12
2	Bar graph of plaunotol in plaunoi leaves determined by TLC densitometric method and GC method	14
3	Two possible biosynthetic pathways of IPP based on the well-known mevalonate pathway (A) and the newly found non-mevalonate pathway (B)	16
4	Biosynthesis pathway of plaunotol	18
5	Initiation of callus culture from *C. stellatopilosus* leaf explant and induction of green callus culture.	24
6	The growth curve of *C. stellatopilosus* green callus culture. A-B: plots of fresh weight and growth index from fresh weight; C-D plots of dry weight and growth index from dry weight.	24
7	Screening of diterpenes (geranylgeraniol-GGOH and plaunotol) by TLC visualized with anisaldehyde/H_2SO_4 reagent. I & II indicate GGOH and plaunotol. III shows TLC pattern of *n*-hexane extract of *C. stellatopilosus* callus culture.	25
8	GC-FID chromatograms of mixed authentics (phytol, GGOH, campesterol, stigmasterol, betasitosterol) and *n*-hexane extract of *C. stellatopilosus* callus culture, treated with/without methyl jasmonate.	26
9	Calibration curve of geranylgeraniol and phytosterols.	26
10	Contents of diterpenes (phytol, GGOH, phytosterols) after stimulation with different concentration of methyl jasmonate and 24 h of exposure.	27
11	Contents of diterpenes (phytol, GGOH, phytosterols) after stimulation with 100 μM methyl jasmonate and different time exposure.	28
12	GC-FID chromatograms of *n*-hexane extract of green callus culture maintained on MS medium supplemented with 2 mg/L NAA and 2 mg/L BA, 1% sucrose and 0.8% gellan gum.	29
13	GC-FID chromatograms of feedings the green callus culture with mevalonic acid lactone at concentrations of 0, 25 and 50 mg/mL.	30
14	GGOH content accumulated in callus culture after feeding with sodium acetate (NA)	31
15	GGOH content accumulated in callus culture after feeding with sodium pyruvate (NP)	31
16	GGOH content accumulated in callus culture after feeding with mevalonic acid lactone (MVA)	32
17	GGOH productions in green callus cultures elicited with methyl jasmonate (MJ)	33

18	GGOH productions in green callus cultures elicited with acetylsalicylic acid (ASA)	33
19	GGOH productions in green callus cultures elicited with yeast extract (YE).	34
20	Plaunotol is storage in stack of chloroplast as oil globules	36
21	Transmission electron microscope shows the absence of mature chloroplast in green callus (left) and suspension culture (right) of *C. stellatopilosus*	36

List of Tables

Table		Page
1	Composition and preparation of MS agar (Murashige and Skoog, 1962)	21
2	Contents of diterpenes in *C. stellatopilosus* callus culture, treated with methyl jasmonate.	27
3	Contents of diterpenes in *C. stellatopilosus* callus culture, treated with methyl jasmonate and different time of exposure.	28

Acknowledgements

This research work was supported by the Prince of Songkla University (PSU) grant (grant No. PHA550336S, FY2012) and the International Foundation for Sciences (IFS; grant no. F/4093-2). I would like to thank Miss Piyawan Sangchuay and Dr.Damrong Kongduang for their effort and doing an excellent work. I would also thank to Ms. Wijittra Kaewnam for her technical assistance. All facilities were kindly provided from the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Pharmaceutical Laboratory Service Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences and the Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University.

Juraithip Wungsintaweekul

February 2014

บทคัดย่อ

ชีวสังเคราะห์หน่วยไอโซปรีนของสารไดเทอร์ปีนในพืชชั้นสูงสามารถสร้างได้จาก 2 วิถี ได้แก่ ชีวสังเคราะห์แบบเมวาโลเนท และชีวสังเคราะห์แบบดีออกซีไซลูโลสฟอสเฟต โดยวิถีชีวสังเคราะห์ทั้งสองแบบจะมีอัตราส่วนการสร้างหน่วยไอโซปรีนแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืชและชนิดของเนื้อเยื่อ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงจากใบเปล้าน้อย ประเมินการสร้างสารไดเทอร์ปีน (ได้แก่ เปลาโนทอลและเจรานิล-เจรานิออล (GGOH)) และเพิ่มการสร้างสารไดเทอร์ปีนในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง โดยใช้เทคนิคการป้อนสารตั้งต้น (โซเดียมอะซีเตท โซเดียมไพรูเวท และกรดเมวาโลนิก แลคโตน) ผลการทดลองพบว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วย GC เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเปล้าน้อยไม่สร้างเปลาโนทอล แต่สร้าง GGOH และการเติมสารตั้งต้น โซเดียมอะซีเตท โซเดียมไพรูเวท และกรดเมวาโลนิก แลคโตน มีผลเพิ่มปริมาณการสร้าง GGOH ประมาณ 2.1 เท่า (0.61 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง), 1.8 เท่า (0.52 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และ 2.4 เท่า (0.70 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณ GGOH 0.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และการเติมสารกระตุ้น (เมทิลแจสโมเนท กรดอะเซติลซาลิไซลิก และสารสกัดยีสต์) ผลการทดลองพบว่าเมื่อกระตุ้นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงด้วยเมทิลแจสโมเนท (ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 24 ชั่วโมง) เพิ่มปริมาณการสร้าง GGOH ได้ประมาณ 4.9 เท่า (0.35 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในขณะที่กลุ่มควบคุมสร้างได้เพียง 0.07 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงยังตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยกรดอะเซติลซาลิไซลิก (ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 วัน) และสารสกัดยีสต์ (ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร นาน 4 วัน) มีปริมาณการสร้าง GGOH 0.34 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 1.37 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

Abstract

In higher plants, diterpenes are hypothetically biosynthesized from isoprene units obtained from two distinct pathways: the mevalonate (MVA) and the deoxyxylulose phosphate (DXP) pathways. The metabolic partitioning of both pathways in plant species is dependent upon the type of culture. The aim of this study was to establish the *Croton stellatopilosus* callus culture and to evaluate for diterpenes (plaunotol and geranylgeraniol) production. To improve the production of diterpenes, addition of precursors including sodium acetate, sodium pyruvate and mevalonic acid lactone were fed to the callus culture. Gas chromatography (GC) analysis suggested that none of plaunotol but considerable amount of GGOG was detected in *C. stellatopilosus* callus culture. Addition of sodium acetate, sodium pyruvate and mevalonic acid lactone resulted in maximum enhancement of GGOH productivity by 2.1 times (0.61 mg/g DW), 1.8 times (0.52 mg/g DW) and 2.4 times (0.70 mg/g DW), respectively when compared with the control culture (0.29 mg/g DW). Elicitors including methyl jasmonate, acetylsalicylic acid and yeast extract were treated. Elicited *C. stellatopilosus* callus culture with methyl jasmonate at 30 mg/L for 24 h resulted the enhancing GGOH production by the factor of 4.9 (0.35 mg/g DW) to control culture (0.07 mg/g DW). Cells were also responded to acetylsalicylic acid (20 mg/L; 2 days) and yeast extract (0.25 g/mL; 4 days) and produced the GGOH contents of 0.34 mg/g DW and 1.37 mg/g DW, respectively.