



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลิตสารทุติยภูมิของเซลล์เพาะเลี้ยง  
และรากเพาะเลี้ยงกวางเครือขาว

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. สมภพ ประธานธูรรักษ์ และคณะ  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

31 สิงหาคม 2552

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# โครงการผลิตสารทุติยภูมิของเซลล์เพาะเลี้ยง และรากเพาะเลี้ยงกวางเครือขาว

### คณะผู้วิจัย

|                                         |                                                           |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| รองศาสตราจารย์ ดร. สมภพ ประธานธูรารักษ์ | ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์<br>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| รองศาสตราจารย์ ดร. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ | ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย<br>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล   |
| อาจารย์ ดร. ยุพิน จินตภากร              | ภาควิชาพฤกษศาสตร์<br>คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| รองศาสตราจารย์ พร้อมจิต ศรีลัมพ์        | ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์<br>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| นางสาว ศิรินทรา กอแสงเรือง              | ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์<br>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| นาย พณิช บุญสนองชีพ                     | ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์<br>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายธนาพล บริบูรณ์เกษตร สำหรับงานเทคนิคในห้องปฏิบัติการ

## บทคัดย่อ

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

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

เมื่อนำเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวางเครือขาวมาเหนี่ยวนำให้สร้างสารทุติยภูมิ ด้วยสารกระตุ้น (elicitor) ชนิด abiotic (copper sulfate และ methyl jasmonate) และชนิด biotic (yeast extract, chitosan และ laminarin) พบว่าสารกระตุ้นแต่ละชนิดมีผลต่อการเจริญ และการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวางเครือขาวทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน โดย methyl jasmonate 2.0 ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มการสะสมไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์ของกวางเครือขาวทั้งสองพันธุ์สูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่า laminarin กระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวางเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *mirifica* สร้าง puerarin ได้ ซึ่งไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวางเครือขาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

การชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงของกวางเครือขาวทั้งสองพันธุ์ สามารถทำได้โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* ร่วมกับ acetosyringone และพบว่าการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของรากเพาะเลี้ยงที่ได้มีรูปแบบและปริมาณแตกต่างกับที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยและรากเพาะเลี้ยงของกวางเครือขาวสามารถนำไปใช้ในการผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ เพื่อทดแทนการเก็บจากแหล่งธรรมชาติได้

คำหลัก: กวางเครือขาว 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  $\mu$ M 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*

# สารบัญ

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| กิตติกรรมประกาศ                                                                                                           | ii  |
| บทคัดย่อภาษาไทย                                                                                                           | iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ                                                                                                        | iv  |
| สารบัญ                                                                                                                    | v   |
| สารบัญตาราง                                                                                                               | vi  |
| สารบัญรูป                                                                                                                 | vii |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย                                                                                 | xi  |
| บทที่ 1 บทนำ                                                                                                              | 1   |
| บทที่ 2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัส<br>และการศึกษาการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกาวาเครือขาว | 5   |
| บทที่ 3 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย<br>กาวาเครือขาวโดย HPLC                       | 17  |
| บทที่ 4 การศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกาวาเครือขาว<br>ในถังเพาะเลี้ยง                                 | 38  |
| บทที่ 5 การศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกาวาเครือขาว                                                   | 44  |
| บทที่ 6 การชักนำรากขนเพาะเลี้ยงของกาวาเครือขาวและการสร้างสาร<br>กลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์                                       | 63  |
| บทที่ 7 บทสรุปและข้อเสนอแนะ                                                                                               | 81  |
| เอกสารอ้างอิง                                                                                                             | 84  |
| ภาคผนวก                                                                                                                   |     |
| ผลผลิตจากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.                                                                                 | 89  |
| ผลงานตีพิมพ์                                                                                                              | 90  |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                             | หน้า |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | ผลของ BA และ 2,4-D ต่อการสร้างแคลลัสจากใบกาวาวเครือขาว                                                                                                                      | 9    |
| 2        | ผลของ BA และ 2,4-D ต่อการสร้างแคลลัสจากลำต้นกาวาวเครือขาว                                                                                                                   | 10   |
| 3        | ผลของ BA และ 2,4-D ต่อการสร้างแคลลัสจากรากกาวาวเครือขาว                                                                                                                     | 11   |
| 4        | พื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ                                                                                                                       | 23   |
| 5        | % recovery ของการวิเคราะห์สารตัวอย่าง                                                                                                                                       | 26   |
| 6        | Repeatability และ reproducibility ของการวิเคราะห์                                                                                                                           | 27   |
| 7        | ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในหัวกาวาวเครือขาว                                                                                                                              | 36   |
| 8        | ชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้น (elicitor) ที่ใช้ในการวิจัย                                                                                                                 | 45   |
| 9        | ดัชนีการเจริญเติบโต (Growth indices) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i> (PM) และ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> (PC) กลุ่มควบคุม | 47   |
| 10       | ค่าเฉลี่ยการสะสมสาร puerarin ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i> หลังจากถูกกระตุ้นด้วย laminarin (LAM)                                        | 62   |
| 11       | การตอบสนองต่อสภาวะการชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงของกาวาวเครือขาว                                                                                                              | 66   |
| 12       | สภาวะการชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงโดยใช้ <i>A. rhizogenes</i>                                                                                                                | 70   |

# สารบัญรูป

| รูปที่ |                                                                                                                                                                                                | หน้า |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | ระดับการสร้างแคลลัสที่ใช้ในการอ่านผลการทดลอง                                                                                                                                                   | 6    |
| 2      | เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี BA 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ | 12   |
| 3      | เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i> ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี BA 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์  | 12   |
| 4      | รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i>                                                                                                 | 14   |
| 5      | รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อ <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>                                                                                                  | 16   |
| 6      | HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน puerarin, daidzin, genistin, daidzein, genistein และ coumestrol                                                                                                | 21   |
| 7      | UV spectrum และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) ของสารมาตรฐาน puerarin, daidzin, genistin, daidzein, genistein และ coumestrol                                                        | 22   |
| 8      | ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 6 ชนิด                                                                                                                     | 24   |
| 9      | ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i>                                                                                | 32   |
| 10     | ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อของ <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>                                                                                 | 34   |
| 11     | HPLC chromatogram ของตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i>                                                                         | 35   |
| 12     | เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ <i>P. candollei</i> ที่เลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร                                                                                        | 40   |
| 13     | รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อรากของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i>                                                                                           | 41   |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ |                                                                                                                                                                                | หน้า |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 14     | รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อรากของ <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>                                                                            | 41   |
| 15     | ปริมาณและรูปแบบการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ จากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> ที่เลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร | 42   |
| 16     | ปริมาณและรูปแบบการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ จากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i> ที่เลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร  | 42   |
| 17     | การเจริญเติบโตและดัชนีการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว                                                                                                   | 47   |
| 18     | HPLC chromatograms ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวกลุ่มควบคุม อายุ 24 วัน                                                                                             | 48   |
| 19     | แสดงผลของสารกระตุ้นในความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว                                                                                | 50   |
| 20     | สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวหลังถูกกระตุ้นด้วย copper sulfate ที่ความเข้มข้นต่างๆ                                                                  | 52   |
| 21     | Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย copper sulfate ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว                                              | 52   |
| 22     | สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว หลังถูกกระตุ้นด้วย methyl jasmonate ที่ความเข้มข้นต่างๆ                                                               | 54   |
| 23     | Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย methyl jasmonate ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว                                            | 54   |
| 24     | Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย yeast extract ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว                                               | 55   |
| 25     | สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว หลังถูกกระตุ้นด้วย yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ                                                                  | 56   |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ |                                                                                                                                                                           | หน้า |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 26     | สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว หลังถูกกระตุ้นด้วย chitosan ที่ความเข้มข้นต่างๆ                                                                  | 58   |
| 27     | Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย chitosan ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว                                               | 58   |
| 28     | การสะสมของ coumestrol ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i> เมื่อถูกกระตุ้นด้วย MeJA, chitosan และ LAM ที่ความเข้มข้นต่างๆ                 | 59   |
| 29     | สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว หลังถูกกระตุ้นด้วย laminarin ที่ความเข้มข้นต่างๆ                                                                 | 61   |
| 30     | Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย laminarin ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว                                              | 61   |
| 31     | กวาวเครือขาว <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS                                                                                            | 68   |
| 32     | กวาวเครือขาว <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS                                                                                             | 69   |
| 33     | ผลของการตรวจสอบยีน <i>rolB</i> ในรากเพาะเลี้ยงของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> และ <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i> ด้วยวิธี PCR                     | 71   |
| 34     | ผลของการตรวจสอบยีน <i>rolC</i> ในรากเพาะเลี้ยงของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> และ <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i> ด้วยวิธี PCR                     | 72   |
| 35     | รากเพาะเลี้ยงของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> และ <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>                                                                   | 73   |
| 36     | HPLC chromatogram ของตัวอย่างรากเพาะเลี้ยงของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> , <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i> และสารมาตรฐาน                          | 75   |
| 37     | ปริมาณและรูปแบบการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในรากเพาะเลี้ยงของกวาวเครือขาว 2 พันธุ์                                                                                     | 76   |
| 38     | น้ำหนักสดเฉลี่ยของรากเพาะเลี้ยงกวาวเครือขาว ( <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> ) เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน และภายใต้สภาวะมืด | 78   |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ |                                                                                                                                                                             | หน้า |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 39     | น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของรากพะยะเลี้ยงกวาวเครือขาว ( <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> ) เมื่อพะยะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน และภายใต้สภาวะมืด | 78   |
| 40     | ลักษณะของรากพะยะเลี้ยงกวาวเครือขาว ( <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> ) เมื่อพะยะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน                              | 79   |
| 41     | ลักษณะของรากพะยะเลี้ยงกวาวเครือขาว ( <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> ) เมื่อพะยะเลี้ยงภายใต้สภาวะมืด                                                              | 79   |
| 42     | การสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในรากพะยะเลี้ยงของ <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> ที่พะยะเลี้ยงในสภาวะมีแสงและในสภาวะมืด                                           | 80   |

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

|                     |                                                            |
|---------------------|------------------------------------------------------------|
| °C                  | degree Celsius                                             |
| $\lambda_{\max}$    | maximum wavelength                                         |
| ACN                 | acetonitrile                                               |
| AOAC                | Association of Official Agricultural Chemists              |
| AS                  | acetosyringone                                             |
| ATCC                | American type culture collection                           |
| BA                  | 6- benzylaminopurine                                       |
| B5                  | Gamborg's B5 medium                                        |
| bp                  | base pair                                                  |
| CHI                 | chitosan                                                   |
| CuSO <sub>4</sub>   | copper sulfate                                             |
| 2, 4- D             | 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid                           |
| $E\ m^{-2}\ s^{-1}$ | Einsteins per square meter per second                      |
| HPLC                | high performance liquid chromatography                     |
| hr                  | hour                                                       |
| i.d.                | internal diameter                                          |
| LAM                 | laminarin                                                  |
| MCF-7               | Michigan Cancer Foundation – 7 (a breast cancer cell line) |
| MeJA                | methyl jasmonate                                           |
| min                 | minute (s)                                                 |
| MS                  | Murashige and Skoog medium                                 |
| PCR                 | polymerase chain reaction                                  |
| pH                  | level of acidity or basicity                               |
| $R^2$               | correlation coefficient                                    |
| YE                  | Yeast extract                                              |

# บทที่ 1

## บทนำ

กวาวเครือขาวเป็นพืชเฉพาะถิ่นที่พบในประเทศไทย โดยแต่เดิมเข้าใจว่าเป็นพืชที่มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Butea superba* Roxb. (วงศ์ Leguminosae) จนกระทั่งปี พ.ศ. 2495 Suvatabandhu และ Airy Shaw ได้รายงานว่ากวาวเครือขาวชนิดที่พบใหม่ของโลกเป็นพืชในสกุล *Pueraria* อยู่ในวงศ์ Leguminosae เช่นกัน และกำหนดชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvat.<sup>1</sup> ต่อมา ชาลิต นิยมธรรม ได้เปรียบเทียบลักษณะของกวาวเครือขาวกับพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันได้เสนอว่า กวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvat.) ควรเป็นพันธุ์ (variety) หนึ่งของ *Pueraria candollei* Graham ex Benth. และได้กำหนดชื่อพฤกษศาสตร์ใหม่คือ *Pueraria candollei* Graham ex Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvat.) Niyomdham<sup>2</sup> จากงานวิจัยของสมภพ ประธานธุรรักษ์ และคณะ พบว่า สมุนไพรกวาวเครือขาวที่ใช้ในประเทศไทยมาจากพืชทั้ง 2 พันธุ์ คือ *Pueraria candollei* Graham ex Benth. var. *candollei* และ *Pueraria candollei* Graham ex Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvat.) Niyomdham<sup>3</sup>

จากตำรายาห้วกวาวเครือของหลวงอนุสารสุนทร กวาวเครือจัดเป็นยาอายุวัฒนะของทั้งผู้หญิงและผู้ชาย ใช้ผสมน้ำผึ้งในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปั่นกินวันละ 1 เม็ด ขนาดเท่าเม็ดพริกไทย โดยระบุว่าคนหนุ่มสาวไม่ควรรับประทาน<sup>4</sup> สารออกฤทธิ์ที่สำคัญในห้วกวาวเครือขาวเป็นสารกลุ่มไฟโตเอสโตรเจน แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความแรงในการออกฤทธิ์ คือ

1. ไฟโตเอสโตรเจนความแรงต่ำ มีฤทธิ์อ่อนกว่าฮอร์โมนเพศหญิง estradiol มาก ๆ เช่น genistein<sup>5,6</sup> genistin<sup>7</sup> daidzein<sup>5</sup> daidzin<sup>5,7</sup> และ coumestrol<sup>5,6</sup> ไฟโตเอสโตรเจนกลุ่มนี้เป็นสารชนิดเดียวกับที่พบในถั่วเหลือง

2. ไฟโตเอสโตรเจนความแรงสูง มีฤทธิ์แรงใกล้เคียงกับ estradiol ได้แก่ miroestrol<sup>8,9</sup> และ deoxymiroestrol<sup>10</sup>

Kashemsanta และคณะ รายงานว่า miroestrol มีฤทธิ์ estrogenic activity คิดเป็น 1.3 เท่าของ estradiol ในหนูถีบจักร<sup>9</sup> และการทดลองโดยใช้ intra-vaginal assay ในหนูถีบจักร พบว่า miroestrol มีฤทธิ์ เป็น 0.7 เท่าของ estradiol และเมื่อใช้ vaginal cornification test ในหนูขาวพบว่า miroestrol มีความแรงเป็น 0.25 เท่า ของ estradiol<sup>11</sup> Chansakaow และคณะ พบสารใหม่จากหัวกวาวเครือขาวที่มีสูตรโครงสร้าง ใกล้เคียงกับ miroestrol ซึ่งมีฤทธิ์ estrogenic activity แรงกว่า miroestrol ประมาณ 10 เท่า โดยการทดลอง กระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ในหลอดทดลอง<sup>10</sup> นอกจากนี้ยังรายงาน ว่า kwakhurin มีฤทธิ์ estrogenic activity ระดับปานกลาง<sup>12</sup>

ไฟโตเอสโตรเจนความแรงต่ำที่ได้รับจากการบริโภคถั่วเหลืองและผักผลไม้ที่มีเส้นใย ได้รับการพิสูจน์ ในระดับหนึ่งว่า มีประโยชน์ต่อการลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งต่อมลูกหมาก และโรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงลดอาการเนื่องจากภาวะหมดประจำเดือน<sup>13</sup> ข้อสรุปดังกล่าวคงจะนำมาใช้ กับกวาวเครือขาวไม่ได้ เนื่องจากผงหรือสารสกัดกวาวเครือขาวแสดงฤทธิ์ของฮอร์โมนเพศหญิงอย่างเด่นชัด มาก<sup>14</sup> ซึ่งจะไม่พบผลเหล่านี้ในการใช้ไฟโตเอสโตรเจนจากถั่วเหลือง ดังนั้นผลทางเภสัชวิทยาในภาพรวมของ กวาวเครือขาวจึงคาดได้ว่าน่าจะเป็นผลของ miroestrol, deoxymiroestrol หรือสารอื่น ๆ ที่ออกฤทธิ์เป็น full agonist ต่อ estrogen receptor

การศึกษาทางพิษวิทยา พบว่ากวาวเครือขาวเมื่อให้ในปริมาณสูงพบว่าทำให้สัตว์ทดลองตายได้ ในนก กระทาบวาลดภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิดฝีหนองขึ้นตามตัว กระตุกเปราะและหักง่าย ในหนูทดลองพบว่าจำนวนเม็ด เลือดแดงลดลง เซลล์ตับเล็กลง ขนาดและน้ำหนักของต่อมหมวกไตเพิ่มขึ้น และมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์<sup>14</sup> ทรงพล ชีวะพัฒน์และคณะ รายงานผลการศึกษาพิษเฉียบพลันของกวาวเครือขาว พบว่าไม่ทำให้เกิดอาการพิษ เฉียบพลันในหนูถีบจักร ส่วนการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังในหนูขาวโดยป้อนผงกวาวเครือขาวแขวนตะกอนในน้ำ ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 90 วัน พบว่าการให้ผงกวาวเครือขาวแก่หนูขาว 10 และ 100 มก./กก./วัน ไม่ทำให้ เกิดความผิดปกติต่อค่าโลหิตวิทยาและค่าทางชีวเคมี รวมทั้งไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพใด ๆ ของอวัยวะภายในที่ บ่งชี้ถึงความเป็นพิษของกวาวเครือขาว แต่กวาวเครือขาวขนาด 1,000 มก./กก./วัน มีผลทำให้หนูเกิดภาวะ โลหิตจางโดยมี % hematocrit จำนวนเม็ดเลือดแดง และปริมาณฮีโมโกลบินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมี นัยสำคัญ<sup>15</sup>

จากข้อมูลการวิจัยเบื้องต้นที่มีอยู่ในขณะนี้ จะเห็นได้ว่ากวาวเครือขาวเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการ พัฒนาเป็นยาจากสมุนไพรเพื่อเสริมไฟโตเอสโตรเจนให้กับผู้สูงอายุได้ แต่อย่างไรก็ดีปัญหาสำคัญของการนำ กวาวเครือขาวมาใช้ประโยชน์คือ ขาดสารมาตรฐานที่จะใช้ในการควบคุมมาตรฐานที่จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ กวาวเครือขาวที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามปัญหาของกวาวเครือขาวอาจอยู่ที่การที่สารสำคัญใน

กวาวเครือขาวมีหลายชนิดซึ่งบางชนิดอาจเป็นพิษด้วยฤทธิ์ estrogenic activity ที่มีความแรงสูงมากก็เป็นได้ แนวทางการวิจัยอาจต้องมุ่งที่จะผลิตสารสำคัญในรูปสารบริสุทธิ์ปริมาณมากพอเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา

เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) และรากเพาะเลี้ยง (hairy root culture) สามารถใช้เป็นแหล่งในการผลิตสารสำคัญที่ใช้ในทางยาและเครื่องสำอาง การคัดเลือก cell line และอาหารที่เหมาะสมสามารถเพิ่มปริมาณการสร้างสารทุติยภูมิที่ต้องการได้หลายเท่าตัว<sup>16</sup> ซึ่งในกรณีของกวาวเครือขาวมีสารสำคัญเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเมื่อถูกคุกคามด้วยโรคหรือแมลงบางชนิด<sup>17</sup> มีรายงานการวิจัยเพื่อศึกษาการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในแคลลัส (callus) และรากเพาะเลี้ยง (hairy root culture) ของพืชวงศ์ถั่ว (Leguminosae) หลายชนิด ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับกวาวเครือขาว

Bouque *et al.*<sup>18</sup> รายงานว่าสามารถกระตุ้นแคลลัสจากพืชในสกุล *Psoralea* 5 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้ แคลลัสจาก *Psoralea obtusifolia* เป็น line ที่สร้าง daidzein ในปริมาณสูง ได้มีการศึกษาปริมาณ daidzein ในส่วนต่างๆของ *Psoralea cinerea* พบว่าในผลแก่มี daidzein สูงที่สุด แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ daidzein ที่สร้างในแคลลัสและในผลแก่ของพืชทั้ง 5 ชนิดแต่อย่างใด สรุปได้เพียงปริมาณ daidzein จากแคลลัสสูงกว่าที่พบในส่วนผลของพืชจากสภาพธรรมชาติ

Bourgau *et al.*<sup>19</sup> รายงานการกระตุ้นรากเพาะเลี้ยงจากพืชในสกุล *Psoralea* 7 ชนิด ซึ่งรากเพาะเลี้ยงที่กระตุ้นได้มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ในจำนวนนี้รากเพาะเลี้ยงจาก *Psoralea lachnostachys* เป็น line ที่สร้าง daidzein ในปริมาณสูง จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาผลของสารกระตุ้น (elicitor) ต่อการผลิตสารทุติยภูมิ ในการทดลองนี้ใช้ chitosan ซึ่งอาจช่วยให้การหลั่งสารทุติยภูมิออกมาในอาหารมากขึ้น ผลการทดลองพบว่า chitosan แสดงผลต่อการสร้าง daidzein และ coumestrol ไม่มากนัก และมีผลต่อการหลั่งสารทั้งสองออกมาในอาหารเพิ่มขึ้น แต่มีผลอยู่เพียง 29 ชั่วโมงหลังจากเติม chitosan

Lui *et al.*<sup>20</sup> ทำการศึกษาผลของสารกลุ่ม auxins ต่อการเจริญของรากเพาะเลี้ยงและรากปกติของ *Pueraria lobata* โดยในรากปกติ IAA, IBA และ NAA กระตุ้นการสร้างรากแขนง แต่ในรากเพาะเลี้ยงพบว่า IAA ไม่มีผลต่อการสร้างรากแขนง NAA ยับยั้งการสร้างรากแขนง และ IBA กระตุ้นการสร้างรากแขนง ผลการทดลองแสดงว่า auxins น่าจะมีกลไกกระตุ้นการสร้างรากที่แตกต่างกันในรากทั้งสองชนิด

Shi และ Kintzios<sup>21</sup> กระตุ้นรากเพาะเลี้ยงจาก *Pueraria phaseoloides* ซึ่งที่อายุ 10 วัน รากเพาะเลี้ยงสร้าง puerarin ได้ 1.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักรากแห้ง คิดเป็น 1.07 เท่าของ puerarin ที่สร้างจากรากปกติ

ซึ่งเมื่อนำไปเลี้ยงใน bioreactor และเก็บเกี่ยวที่อายุ 3 สัปดาห์ สามารถสร้าง puerarin ได้ 5.57 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักรากแห้ง เทียบได้ประมาณ 200 เท่า ของที่เลี้ยงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร<sup>22</sup>

Matkowski<sup>23</sup> รายงานการกระตุ้นแคลลัสจากส่วนต่างๆของ *Pueraria lobata* ซึ่งแคลลัสที่ได้สร้างไอโซฟลาโวนอยด์ ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยแคลลัสจากรากผลิตไอโซฟลาโวนอยด์ สูงที่สุดรองลงมาได้แก่ แคลลัสจากใบ และลำต้น ตามลำดับ

เห็นได้ว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย (cell suspension culture) และรากเพาะเลี้ยง (hairy root culture) สามารถใช้เป็นแหล่งในการผลิตสารสำคัญที่ใช้ในทางยาและเครื่องสำอาง ซึ่งในกรณีของกาวเครือขาวที่มีสารสำคัญเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่พืชสร้างขึ้นเมื่อถูกคุกคามด้วยโรคหรือแมลงบางชนิด (phytoalexins) การวิจัยจะศึกษารูปแบบของการสร้างสารสำคัญของเซลล์เพาะเลี้ยงและรากเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารกระตุ้น (elicitor) และปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างสารสำคัญดังกล่าว การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม ไอโซฟลาโวนอยด์ ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกาวเครือขาว ศึกษาแบบการเจริญเติบโตและการสร้างสารสำคัญกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกาวเครือขาว ศึกษาผลของสารกระตุ้น ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ การชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยง (hairy root culture) ของกาวเครือขาวและศึกษาการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ จากรากเพาะเลี้ยงของกาวเครือขาว ซึ่งข้อมูลพื้นฐานในการผลิตสารทุติยภูมิของเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) และรากเพาะเลี้ยง (hairy root culture) ของกาวเครือขาว รวมถึงผลการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นชนิดต่างๆ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางยาและเครื่องสำอางต่อไป

## บทที่ 2

### การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัส และการศึกษาการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกาวเครือขาว

---

การวิจัยในบทนี้เป็นการกำหนดวิธีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของกาวเครือขาว 2 พันธุ์ (varieties) ได้แก่ *Pueraria candollei* var. *candollei* และ *P. candollei* var. *mirifica* และทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสของกาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei*) จากเนื้อเยื่อใบ ลำต้น และราก เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้กระตุ้นการสร้างแคลลัสสำหรับการทดลองการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย และได้ศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวเครือขาวทั้ง 2 พันธุ์ที่ได้มาจากแคลลัสของเนื้อเยื่อราก ลำต้น และใบ และหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญกับแต่ละช่วงของระยะการเจริญเติบโตในบทต่อไป

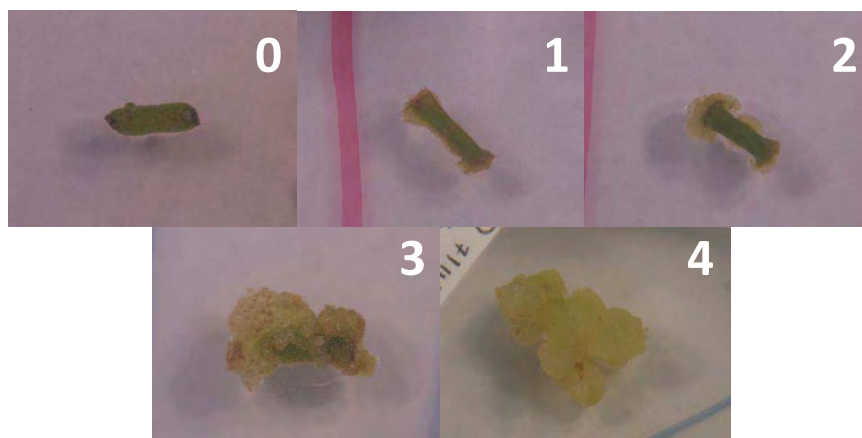
#### วัสดุพืชและระเบียบวิธีวิจัย

ผักของกาวเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *candollei* เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี และผักของกาวเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *mirifica* เก็บจากจังหวัดสระบุรีและลพบุรี โดยได้เก็บดอกและใบเพื่อเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการก่อนหน้านี้<sup>3</sup> โดยตัวอย่างพรรณไม้แห้งได้เก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชของภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การกำหนดวิธีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของกาวเครือขาว โดยทำการแช่เมล็ดกาวเครือขาวในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2% ที่ผสม Tween80<sup>®</sup> นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นตัดเปลือกหุ้มเมล็ดออกบางส่วน และวางเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog medium (MS)<sup>24</sup> ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 3% และ Agargel<sup>®</sup> 0.55% เพาะเลี้ยงนาน 16-20 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสของกาวเครือขาว โดยนำชิ้นส่วนใบ ลำต้น และราก ของกาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei*) ที่ได้จากต้นในสภาพ *in vitro* มาชักนำให้เกิดแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS<sup>24</sup> ที่มีสารควบคุมการเจริญ ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BA; 0, 0.56, 2.22, 4.44 ไมโครโมลาร์) และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; 0,

0.57, 2.26, 4.52 ไมโครโมลาร์) โดยวางเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และอ่านผลโดยกำหนดค่าคะแนน 0, 1, 2, 3, และ 4 ตามปริมาณแคลลัสที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ระดับการสร้างแคลลัสที่ใช้ในการอ่านผลการทดลอง

0 = ไม่สร้างแคลลัส, 1 = เริ่มมีการสร้างกลุ่มของแคลลัสขนาดเล็ก, 2 = กลุ่มของแคลลัสมีขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร และยังไม่เจริญรอบชิ้นส่วนพืชตั้งต้น, 3 = กลุ่มของแคลลัสมีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร และเจริญรอบชิ้นส่วนพืชตั้งต้น, 4 = กลุ่มของแคลลัสเจริญคลุมรอบชิ้นส่วนพืชตั้งต้น

**การศึกษาการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวาเครือขาว** โดยใช้แคลลัสของ *P. candollei* ทั้งสองพันธุ์ ที่กระตุ้นจากชิ้นส่วนใบ ลำต้น และราก โดยนำแคลลัส 0.5 กรัม มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี BA 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ และ sucrose 3 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร วางเลี้ยงบน shaker ที่ 110 rpm วางเลี้ยงที่ 25 °C และให้แสงที่ความเข้มแสง  $37.5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  16 ชั่วโมงต่อวัน

การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย จะเก็บเกี่ยวเซลล์ทุกๆ 3 วัน การเก็บเกี่ยวแต่ละครั้งจะเก็บจำนวน 3 flask นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 วัดการเจริญโดยชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง การเก็บเกี่ยวจะทำจนครบ 24 วัน โดยมีขั้นตอนโดยละเอียดดังต่อไปนี้

1. อบกระดาษกรอง Whatman No.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทิ้งให้เย็นใน desiccators เป็นเวลา 5 นาที ชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง
2. กรองเซลล์จากแต่ละ flask ที่ถูกเก็บมาในแต่ละวัน ผ่านกระดาษกรอง โดยใช้ vacuum pump
3. นำกระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่ไปชั่งน้ำหนัก แล้วหักน้ำหนักกระดาษกรองออกจะได้น้ำหนักสด
4. นำกระดาษกรองและเซลล์ไปอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก เมื่อหักน้ำหนักกระดาษกรองออกจะได้น้ำหนักแห้ง
5. เก็บเซลล์ที่ชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้วไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$

## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่าหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 7.50% และเมล็ดกวางมียัตราการงอก  $70.27 \pm 7.55\%$  ซึ่งต้นกล้ากวางเครือขาวที่ได้จะใช้ในการทดลองในช่วงต่อไป

### การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสของกวางเครือขาว

หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนพืชทั้ง 3 ชนิด (ใบ ลำต้น และราก) มีการสร้างแคลลัสในทุก treatment (ตารางที่ 1-3) ด้วยการตอบสนองที่แตกต่างกัน โดยในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนใบมีการตอบสนองต่อการสร้างแคลลัส 8.33-91.67% ชิ้นส่วนลำต้นมีการตอบสนองต่อการสร้างแคลลัส 33.33-100.00% และชิ้นส่วนรากมีการตอบสนองต่อการสร้างแคลลัส 41.67-83.33% โดยเมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในชิ้นส่วนใบ ลำต้น และราก พบว่ามีการตอบสนองต่อการสร้างแคลลัส 4.17, 16.67, และ 45.83% ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมนพืชในชิ้นส่วนพืชเอง (endogenous plant hormone)

แคลลัสที่ได้มีสีขาวถึงสีเขียวอ่อน ลักษณะฉ่ำน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่ามีเกิด browning ในแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบมากกว่าชิ้นส่วนอื่นๆ (ตารางที่ 1-3)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี two-way ANOVA เพื่อดูผลของชิ้นส่วน (ใบ ลำต้น และราก) และผลของสารควบคุมการเจริญ ต่อ%การตอบสนองต่อการสร้างแคลลัส ระดับการเกิดแคลลัส และ %การเกิด browning พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นมี %การตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสสูงกว่า ชิ้นส่วนใบและราก ( $p = 0.05$ ) ชิ้นส่วนลำต้นและรากมีระดับการเกิดแคลลัสสูงกว่าชิ้นส่วนใบ ( $p = 0.05$ ) และ ชิ้นส่วนใบมี %การเกิด browning สูงกว่าชิ้นส่วนลำต้นและราก ( $p = 0.05$ )

ชิ้นส่วนใบมีระดับการสร้างแคลลัสสูงสุดในชุดการทดลองที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 4.44 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ( $p = 0.05$ , ตารางที่ 1) ชิ้นส่วนลำต้นมีระดับการสร้างแคลลัสสูงสุดในชุดการทดลองที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ( $p = 0.05$ , ตารางที่ 2) และชิ้นส่วนรากมีระดับการสร้างแคลลัสสูงสุดในชุดการทดลองที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ( $p = 0.05$ , ตารางที่ 3)

จากผลการทดลองได้เลือกสูตรอาหาร MS ที่มี BA 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้กระตุ้นการสร้างแคลลัส และสำหรับการทดลองการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง แขนงลอยในการทดลองช่วงต่อไป

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า treatment ที่มีสารควบคุมการเจริญประเภทเดียวคือ cytokinin ได้แก่ BA หรือ auxin ได้แก่ 2,4-D มีระดับการสร้างแคลลัสน้อยกว่า treatment ที่มีสารควบคุมการเจริญทั้ง 2 ประเภท (ตารางที่ 1-3) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่พืชปกติจะสร้างแคลลัสเมื่อเกิดแผล<sup>25</sup> และมี auxin เป็นส่วนหนึ่งในการตอบสนองต่อการเกิดแผล<sup>26</sup> ดังนั้น auxin (2,4-D) จึงมีส่วนช่วยในการสร้าง แคลลัส นอกจากนี้มีรายงานวิจัยพบว่า auxin ช่วยส่งเสริมให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ และ cytokinin

(BA) ช่วยเพิ่ม enzyme activity ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ให้มากขึ้น<sup>27, 28</sup> ดังนั้นการที่มีทั้ง auxin และ cytokinin ในอัตราส่วนที่เหมาะสมในสูตรอาหารจึงมีส่วนช่วยในการแบ่งเซลล์มากขึ้น

ตารางที่ 1 ผลของ BA และ 2,4-D ต่อการสร้างแคลลัสจากใบกาววเครือขาว\*

|    | Treatment (ไมโครโมลาร์) |       | %การตอบสนอง<br>ต่อการสร้าง<br>แคลลัส (S.E.) | ระดับการสร้าง<br>แคลลัส (S.E.) | %การเกิด<br>Browning |
|----|-------------------------|-------|---------------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
|    | BA                      | 2,4-D |                                             |                                |                      |
| 1  | 0                       | 0     | 4.17 (4.17)                                 | 1.00 (0.20)                    | 45.83 (10.39)        |
| 2  | 0.56                    | 0     | 29.17 (9.48)                                | 1.29 (0.24)                    | 8.33 (5.76)          |
| 3  | 2.22                    | 0     | 50.00 (10.43)                               | 1.08 (0.17)                    | 12.50 (6.90)         |
| 4  | 4.44                    | 0     | 8.33 (5.76)                                 | 1.00 (0.20)                    | 37.50 (10.09)        |
| 5  | 0                       | 0.57  | 8.33 (5.76)                                 | 1.00 (0.20)                    | 37.50 (10.09)        |
| 6  | 0.56                    | 0.57  | 79.17 (8.47)                                | 1.58 (0.18)                    | 8.33 (5.76)          |
| 7  | 2.22                    | 0.57  | 87.50 (6.90)                                | 1.71 (0.17)                    | 8.33 (5.76)          |
| 8  | 4.44                    | 0.57  | 83.33 (7.77)                                | 1.85 (0.20)                    | 16.67 (7.77)         |
| 9  | 0                       | 2.26  | 29.17 (9.48)                                | 1.00 (0.18)                    | 45.83 (10.39)        |
| 10 | 0.56                    | 2.26  | 91.67 (5.76)                                | 1.82 (0.14)                    | 8.33 (5.76)          |
| 11 | 2.22                    | 2.26  | 91.67 (5.76)                                | 1.86 (0.15)                    | 8.33 (7.77)          |
| 12 | 4.44                    | 2.26  | 54.17 (10.39)                               | 2.08 (0.33)                    | 33.33 (9.83)         |
| 13 | 0                       | 4.52  | 50.00 (10.43)                               | 1.75 (0.30)                    | 25.00 (9.03)         |
| 14 | 0.56                    | 4.52  | 91.67 (5.76)                                | 1.86 (0.16)                    | 8.33 (5.76)          |
| 15 | 2.22                    | 4.52  | 87.50 (6.90)                                | 1.95 (0.20)                    | 12.50 (6.90)         |
| 16 | 4.44                    | 4.52  | 91.67 (5.76)                                | 2.36 (0.20)                    | 4.17 (4.17)          |

\* บันทึกผลหลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์

ตารางที่ 2 ผลของ BA และ 2,4-D ต่อการสร้างแคลลัสจากลำต้นกวางเครือขาว\*

|    | Treatment (ไมโครโมลาร์) |       | %การตอบสนอง<br>ต่อการสร้าง<br>แคลลัส (S.E.) | ระดับการสร้าง<br>แคลลัส (S.E.) | %การเกิด<br>Browning |
|----|-------------------------|-------|---------------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
|    | BA                      | 2,4-D |                                             |                                |                      |
| 1  | 0                       | 0     | 16.67 (7.77)                                | 1.00 (0.19)                    | 4.17 (4.17)          |
| 2  | 0.56                    | 0     | 33.33 (9.83)                                | 1.75 (0.31)                    | 8.33 (5.76)          |
| 3  | 2.22                    | 0     | 54.17 (10.39)                               | 1.46 (0.25)                    | 8.33 (5.76)          |
| 4  | 4.44                    | 0     | 70.83 (9.48)                                | 1.24 (0.18)                    | 4.17 (4.17)          |
| 5  | 0                       | 0.57  | 83.33 (7.77)                                | 1.55 (0.18)                    | 0                    |
| 6  | 0.56                    | 0.57  | 100.00 (0)                                  | 2.33 (0.10)                    | 0                    |
| 7  | 2.22                    | 0.57  | 100.00 (0)                                  | 2.13 (0.14)                    | 0                    |
| 8  | 4.44                    | 0.57  | 100.00 (0)                                  | 2.29 (0.11)                    | 0                    |
| 9  | 0                       | 2.26  | 83.33 (7.77)                                | 1.85 (0.23)                    | 0                    |
| 10 | 0.56                    | 2.26  | 100.00 (0)                                  | 2.67 (0.16)                    | 0                    |
| 11 | 2.22                    | 2.26  | 95.83 (4.17)                                | 2.43 (0.22)                    | 4.17 (4.17)          |
| 12 | 4.44                    | 2.26  | 91.67 (5.76)                                | 2.23 (0.16)                    | 8.33 (5.76)          |
| 13 | 0                       | 4.52  | 91.67 (5.76)                                | 2.55 (0.26)                    | 4.17 (4.17)          |
| 14 | 0.56                    | 4.52  | 100.00 (0)                                  | 3.04 (0.16)                    | 0                    |
| 15 | 2.22                    | 4.52  | 91.67 (5.76)                                | 2.36 (0.23)                    | 8.33 (5.76)          |
| 16 | 4.44                    | 4.52  | 95.83 (4.17)                                | 2.13 (0.23)                    | 0                    |

\* บันทึกผลหลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์

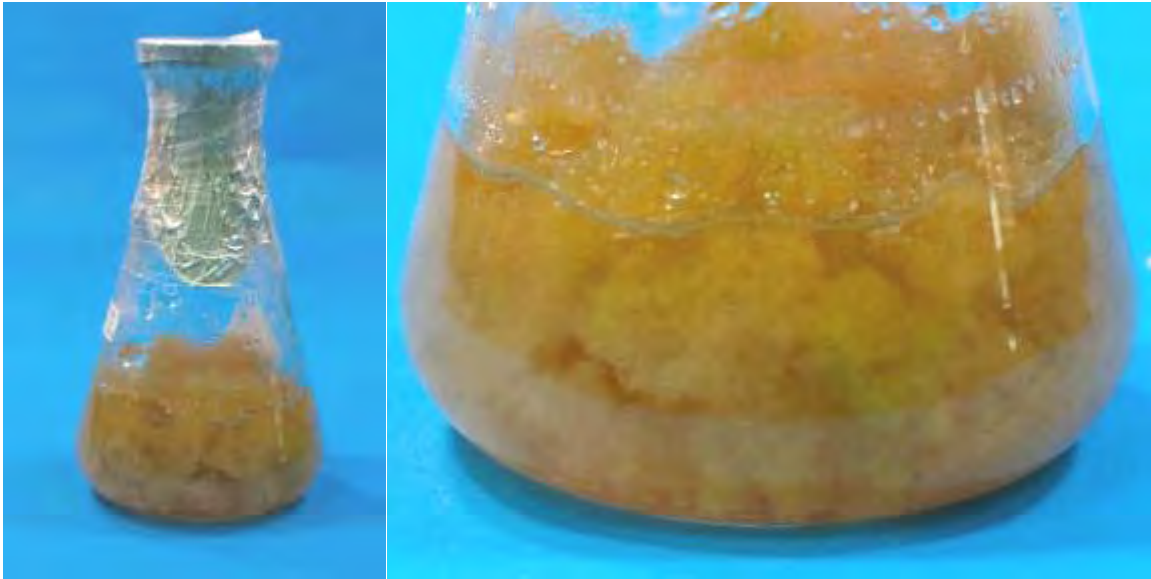
ตารางที่ 3 ผลของ BA และ 2,4-D ต่อการสร้างแคลลัสจากรากกาวเครือขาว\*

|    | Treatment (ไมโครโมลาร์) |       | %การตอบสนอง<br>ต่อการสร้าง<br>แคลลัส (S.E.) | ระดับการสร้าง<br>แคลลัส (S.E.) | %การเกิด<br>Browning |
|----|-------------------------|-------|---------------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
|    | BA                      | 2,4-D |                                             |                                |                      |
| 1  | 0                       | 0     | 45.83 (10.39)                               | 1.00 (0.15)                    | 0                    |
| 2  | 0.56                    | 0     | 54.17 (10.39)                               | 1.08 (0.16)                    | 0                    |
| 3  | 2.22                    | 0     | 50.00 (10.43)                               | 1.58 (0.28)                    | 4.17 (4.17)          |
| 4  | 4.44                    | 0     | 41.67 (10.28)                               | 1.10 (0.19)                    | 4.17 (4.17)          |
| 5  | 0                       | 0.57  | 75.00 (9.03)                                | 2.50 (0.31)                    | 0                    |
| 6  | 0.56                    | 0.57  | 58.33 (10.28)                               | 3.36 (0.49)                    | 0                    |
| 7  | 2.22                    | 0.57  | 41.67 (10.28)                               | 3.20 (0.55)                    | 0                    |
| 8  | 4.44                    | 0.57  | 50.00 (10.43)                               | 2.92 (0.47)                    | 0                    |
| 9  | 0                       | 2.26  | 58.33 (10.28)                               | 2.93 (0.41)                    | 0                    |
| 10 | 0.56                    | 2.26  | 75.00 (9.03)                                | 3.56 (0.41)                    | 0                    |
| 11 | 2.22                    | 2.26  | 62.50 (10.09)                               | 3.33 (0.46)                    | 0                    |
| 12 | 4.44                    | 2.26  | 83.33 (7.77)                                | 3.15 (0.32)                    | 0                    |
| 13 | 0                       | 4.52  | 70.83 (9.48)                                | 3.18 (0.38)                    | 0                    |
| 14 | 0.56                    | 4.52  | 83.33 (7.77)                                | 3.55 (0.32)                    | 0                    |
| 15 | 2.22                    | 4.52  | 75.00 (9.03)                                | 3.22 (0.37)                    | 0                    |
| 16 | 4.44                    | 4.52  | 54.17 (10.39)                               | 3.00 (0.45)                    | 0                    |

\* บันทึกผลหลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์

### การศึกษาการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวเครือขาว

จากการทดลองพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จาก *P. candollei* ทั้งสองพันธุ์ค่อนข้างเกาะกลุ่มกัน และมีสีเขียวอมเหลือง (รูปที่ 2-3)



รูปที่ 2 เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *candollei* ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่มี BA 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



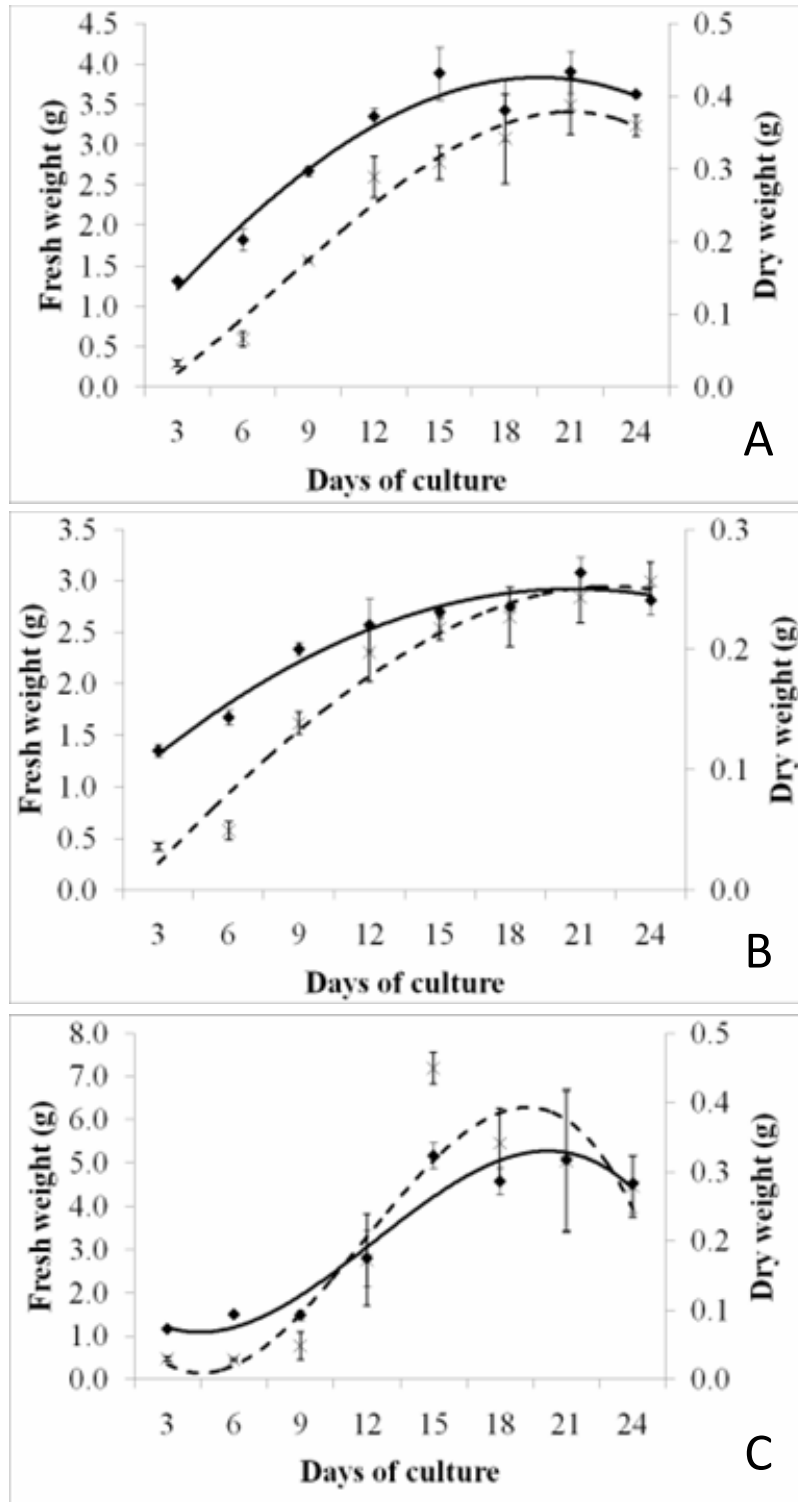
รูปที่ 3 เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *mirifica* ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่มี BA 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

### รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *candollei*

หลังจากวางเลี้ยงได้ 24 วัน พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *candollei* จะมีช่วง lag phase อยู่ประมาณ 3-6 วันก่อนจะเข้าสู่ exponential phase และเจริญต่อไปจนเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 18-24 ของการวางเลี้ยง พบว่ามีการเกิด browning ในเซลล์ที่ได้จากใบ (วันที่ 15) ลำต้น (วันที่ 18) และ ราก (วันที่ 21) และเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากราก เป็นเซลล์ที่มีน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ 449.3 มิลลิกรัม/flask (รูปที่ 4)

เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อใบ (รูปที่ 4A) จะเริ่มเจริญแบบ exponential ตั้งแต่เริ่มวางเลี้ยงได้ 3 วันและจะเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 21 หลังจากเริ่มวางเลี้ยง และพบว่ามีเกิด browning ในวันที่ 15 ของการวางเลี้ยง สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อลำต้น (รูปที่ 4B) จะเริ่มเข้าสู่ exponential phase ตั้งแต่วันที่ 3 ของการวางเลี้ยงและจะเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 21 พบว่ามีเกิด browning ในวันที่ 18 ของการวางเลี้ยง ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากราก (รูปที่ 4C) เริ่มเจริญแบบ exponential ตั้งแต่วันที่ 6 ของการวางเลี้ยงและเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 18 หลังจากเริ่มวางเลี้ยง และมีการเกิด browning ในวันที่ 21 ของการวางเลี้ยง

โดยเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของ growth curve จากน้ำหนักสดและ growth curve จากน้ำหนักแห้ง พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อ *P. candollei* var. *candollei* (A: ใบ, B: ลำต้น, C: ราก); ( — ) น้ำหนักสด และ ( - - - ) น้ำหนักแห้ง

### รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *mirifica*

หลังจากวางเลี้ยงได้ 24 วัน พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *mirifica* จะมีช่วง lag phase อยู่ประมาณ 3-9 วันก่อนจะเข้าสู่ exponential phase และเจริญต่อไปจนเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 21-24 ของการวางเลี้ยง พบว่าไม่มีการเกิด browning ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิดและเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากราก เป็นเซลล์ที่มีน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ 676.0 มิลลิกรัม/flask (รูปที่ 5)

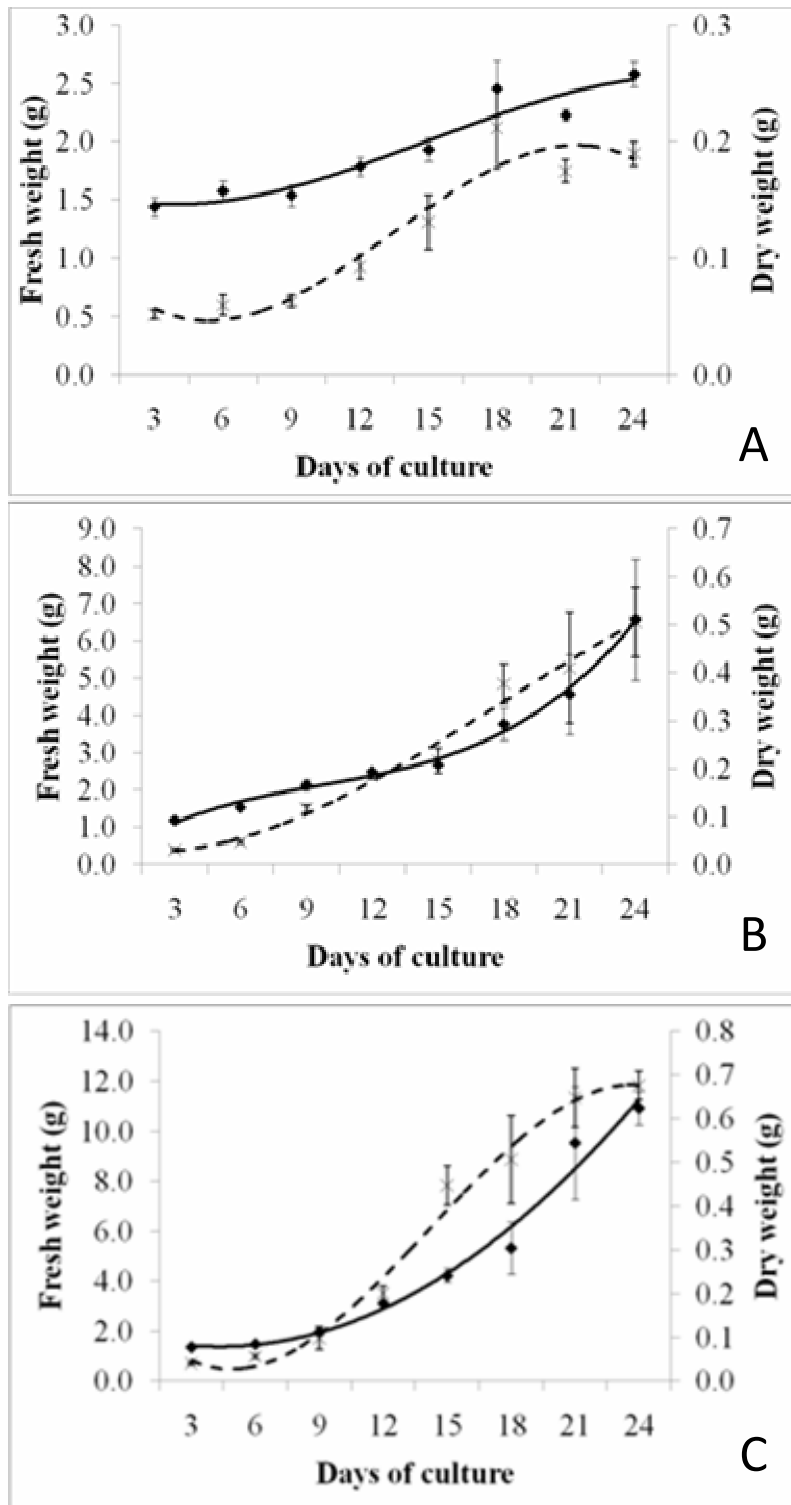
เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อใบ (รูปที่ 5A) จะเริ่มเจริญแบบ exponential ตั้งแต่เริ่มวางเลี้ยงได้ 9 วัน และจะเจริญจนเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 21 หลังจากเริ่มวางเลี้ยง สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อลำต้น (รูปที่ 5B) จะเริ่มเข้าสู่ exponential phase ตั้งแต่วันที่ 6 ของการวางเลี้ยง และเจริญต่อเนื่องไป โดยเมื่อเก็บผลการทดลองที่ 24 วันแล้ว ก็ยังไม่เข้าสู่ stationary phase ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากราก (รูปที่ 5C) เริ่มเจริญแบบ exponential ตั้งแต่วันที่ 9 ของการวางเลี้ยงและเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 24 หลังจากเริ่มวางเลี้ยง

โดยเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของ growth curve จากน้ำหนักสดและ growth curve จากน้ำหนักแห้ง พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกัน (รูปที่ 5)

สำหรับรูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *candollei* และ *P. candollei* var. *mirifica* เมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดกับระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และน้ำหนักแห้งกับระยะเวลาการเพาะเลี้ยง อย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  (รูปที่ 3-6) ยกเว้นความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งกับระยะเวลาการเพาะเลี้ยงของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากรากของ *P. candollei* var. *candollei* ( $p=0.053$ )

เมื่อวิเคราะห์ผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ (*P. candollei* var. *candollei* และ *P. candollei* var. *mirifica*) ส่วนของพืชตั้งต้นที่ใช้ในการกระตุ้นแคลลัส (ใบ ลำต้น และราก) และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 วัน) ต่อน้ำหนักสดและแห้งของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย โดยใช้ three way ANOVA พบว่า ส่วนของพืชตั้งต้นที่ใช้ในการกระตุ้นแคลลัสมีผลต่อน้ำหนักสดของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยอย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.015$ ) และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีผลต่อน้ำหนักสดและแห้งของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยอย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.020$  และ  $0.007$  ตามลำดับ)

ซึ่งทั้งนี้การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ควรทำในช่วงต้นของการเจริญช่วง stationary phase ซึ่งอยู่ระหว่าง 18-24 วัน สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่มีอัตราการเจริญดีที่สุดคือ เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากแคลลัสที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *mirifica* มีอัตราการเจริญสูงสุดโดยดูจาก phytomass ในรูปแบบของน้ำหนักสดและแห้งของเซลล์ที่ได้ ซึ่งต้องดูประกอบกับข้อมูลการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ ในการทดลองช่วงต่อไป



รูปที่ 5 รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อ *P. candollei* var. *mirifica* (A: ใบ, B: ลำต้น, C: ราก); ( — ) น้ำหนักสด และ ( - - - ) น้ำหนักแห้ง

# บทที่ 3

## การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกวางเครือขาวโดย HPLC

ในการตรวจสอบสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์จากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกวางเครือขาวนั้น ในการวิจัยตลอดโครงการทำการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ซึ่งในบทนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และพิสูจน์ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถยอมรับได้ โดยทำ method validation โดยตรวจสอบ precision และ accuracy ของผลการวัด เพื่อให้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่รายงานในการวิจัยนี้มีความน่าเชื่อถือ และได้นำวิธีการวิเคราะห์ที่กำหนดขึ้นมาใช้วิเคราะห์ปริมาณและรูปแบบการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกวางเครือขาวทั้งสองพันธุ์ต่อไป

### ระเบียบวิธีวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกวางเครือขาว

### เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่อง HPLC ของบริษัท Shimadzu
  - ประกอบด้วย Pump : LC-10ADVP
  - Detector : SPD-M10AVP Photo-diode array detector

### สารเคมีและสารมาตรฐาน

#### สารเคมี

- Acetonitrile (HPLC grade) Fisher chemical, USA
- Water (HPLC grade) Fisher chemical, USA
- Methanol (HPLC grade) Fisher chemical, USA
- Methanol (AR grade) J.T. Baker, USA
- Glacial acetic acid Merck, Germany

## สารมาตรฐาน

|              |                     |
|--------------|---------------------|
| - Daidzin    | Fluka chemical, USA |
| - Daidzein   | Sigma chemical, USA |
| - Genistein  | Sigma chemical, USA |
| - Genistin   | Sigma chemical, USA |
| - Coumestrol | Fluka chemical, USA |
| - Puerarin   | Sigma chemical, USA |

## สภาวะของระบบ HPLC ที่ใช้ในการทดลอง

- คอลัมน์: Purospher (Merck) RP-18, 5 ไมครอน (250 x 3 มิลลิเมตร)
- วัฏภาคเคลื่อนที่: Solvent A – 0.2% ของกรดอะซิติกในน้ำ  
Solvent B – อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile)

### Gradient system

ใช้อัตราส่วน 0.2% ของกรดอะซิติกในน้ำ กับอะซีโตไนไตรล์ ในช่วงเวลาที่ 0.01-5 ใช้ 85:15 หลังจากนั้นเพิ่มอัตราส่วนอะซีโตไนไตรล์ เป็น 30 ในช่วงเวลาที่ 5-10 และคงอัตราส่วนนี้ไว้จนถึงเวลาที่ 22 นาที แล้วเพิ่มอัตราส่วนของอะซีโตไนไตรล์จาก 30 เป็น 32 ในช่วงเวลาที่ 22-25 และคงในอัตราส่วนนี้ไว้จนถึงเวลาที่ 30 หลังจากนั้นลดอัตราส่วนของอะซีโตไนไตรล์ลงมาเป็น 15 ภายในเวลาที่ 32 และคงไว้จนถึงเวลาที่ 40

- อัตราการไหล : 0.5 มิลลิลิตร/นาที
- ปริมาตรในการฉีด : 5 ไมโครลิตร
- ความยาวคลื่น : coumestrol 243 นาโนเมตร  
daidzein 248 นาโนเมตร  
daidzin 248 นาโนเมตร  
puerarin 249 นาโนเมตร  
genistin 259 นาโนเมตร  
genistein 259 นาโนเมตร
- เวลาในการวิเคราะห์ : 40 นาที

## การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)<sup>29</sup>

### 1. การศึกษา Linearity

ศึกษา linearity ในช่วงที่ใช้เป็น standard curve ตั้งแต่ 5-160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (5, 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แล้วคำนวณหาความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (correlation coefficient,  $R^2$ ) โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐานคือ เตรียมสารมาตรฐาน coumestrol daidzein daidzin puerarin genistin และ genistein รวมกัน ในความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย โดยทำ serial dilution technique ใส่ใน eppendorf tube ปรับปริมาตรให้เป็น 1,500 ไมโครลิตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด ทำการฉีดสารเพื่อดูค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) นำมาคำนวณค่า  $R^2$  ซึ่งค่าที่ยอมรับได้ควรไม่น้อยกว่า 0.9990

### 2. การศึกษา Range

ศึกษาช่วงระหว่างค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้นหรือปริมาณของสารมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับสารที่วัดได้ โดยเริ่มจากความเข้มข้นของสารมาตรฐานรวมที่เตรียมไว้สูงสุดคือ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จนถึงความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด ทำการฉีดสารเพื่อดูค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) นำมาคำนวณค่า  $R^2$

### 3. การศึกษา Limit of quantitation (LOQ)

ศึกษาปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ตรวจวิเคราะห์แล้วยังอยู่ในช่วงที่มีความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) โดยคำนวณความสูงของกราฟสารมาตรฐานแต่ละตัวเทียบกับ noise (signal to noise ratio) ซึ่งต้องได้ค่าเท่ากับ 10

### 4. การศึกษา Limit of detection (LOD)

ศึกษาปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีที่วิเคราะห์ โดยคำนวณความสูงของกราฟสารมาตรฐานแต่ละตัวเทียบกับ noise (signal to noise ratio) ซึ่งต้องได้ค่าเท่ากับ 3.3

### 5. การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

ศึกษาโดยทำ standard addition technique คือเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่งที่นำมาศึกษา (spiked sample) สารตัวอย่างที่นำมาศึกษาคือสารสกัด methanol ของเซลล์เพาะเลี้ยงแวนดอย *P. candollei* var. *mirifica* ที่เลี้ยงจากส่วนรากเป็นเวลา 21 วัน เติมสารมาตรฐานลงไปในความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการฉีดสารเพื่อดูค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) และคำนวณค่า %recovery ของแต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละตัว โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\% \text{recovery} = \frac{\text{ปริมาณตัวยาใน spiked sample} - \text{ปริมาณตัวยาใน unspiked sample}}{\text{ปริมาณตัวยาที่เติมลงไป}}$$

ค่า %recovery ควรมีค่าในช่วง 90-120%

## 6. การศึกษาความแม่นยำ (Precision)

ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยศึกษาความแม่นยำเมื่อทำการทดลองในวันเดียวกัน (repeatability) โดยดูค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ที่ได้จากความเข้มข้นที่ 5, 40 และ 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการศึกษาซ้ำความเข้มข้นละ 3 ชุด และศึกษาความแม่นยำเมื่อทำการทดลองระหว่างวัน (reproducibility) โดยดูค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ที่ได้จากความเข้มข้นที่ 5, 40 และ 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการศึกษาซ้ำความเข้มข้นละ 3 ชุด เป็นเวลา 3 วัน

ค่าความแม่นยำ ได้จากการคำนวณหา %relative standard deviation (%RSD) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\% \text{RSD} = \left( \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \right) \times 100$$

ค่า %RSD ที่ยอมรับได้ของสารควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 6

## วิธีการเตรียมสารสกัดเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย

นำเซลล์ที่อบแห้งจากการวิจัยในบทที่ 2 มาสกัดโดยวิธี ultrasonic extraction ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที ด้วย methanol (AR grade) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง กรองเอาสารสกัดที่ได้รวมกัน นำมาระเหยแห้งด้วยวิธี rotary evaporation จนแห้งสนิท ซึ่งน้ำหนักหา %yield และนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป

## การวิเคราะห์หาปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์จากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกวางเครือขาว

ชั่งสารสกัด 0.01 กรัมใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol (HPLC grade) เพื่อให้ได้สารละลายเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

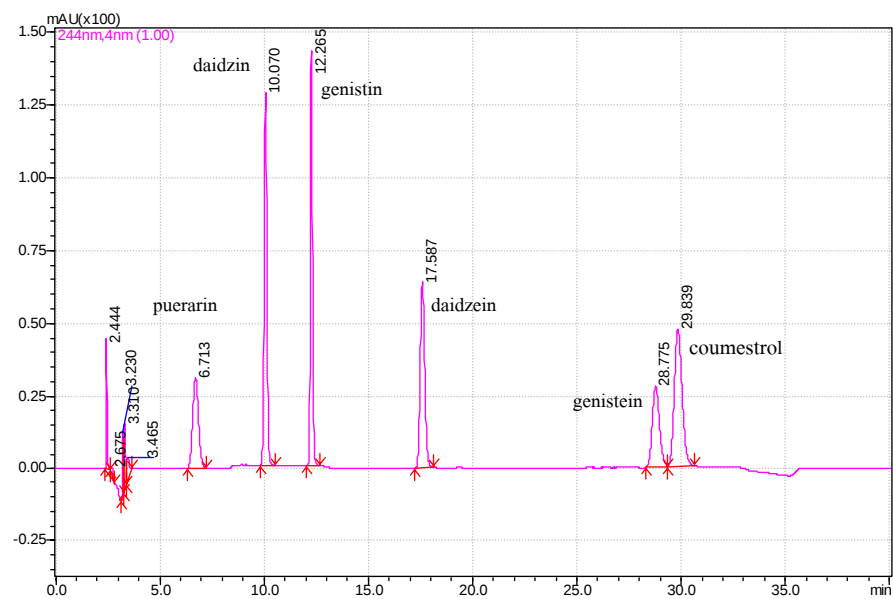
## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

การพัฒนาวีธีวิเคราะห์สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกาวาเครือขาว

### 1. HPLC Chromatogram และ UV spectrum ของสารมาตรฐาน

#### 1.1 ค่า retention time ( $t_R$ )

ค่า retention time ของสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ puerarin daidzin genistin daidzein genistein และ coumestrol เท่ากับ 6.71, 10.07, 12.26, 17.59, 28.76 และ 29.84 นาที ตามลำดับ และมี HPLC chromatogram ดังรูปที่ 6

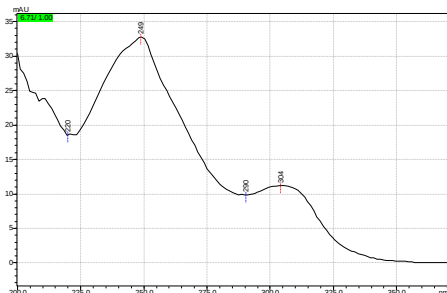


รูปที่ 6 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน puerarin daidzin genistin daidzein genistein และ coumestrol

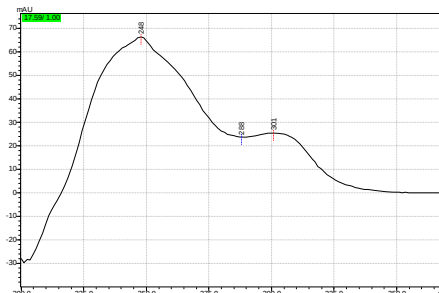
## 1.2 UV spectrum ของสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด

เนื่องจากเครื่องมือ HPLC ที่ใช้ศึกษามีตัวตรวจวัดเป็นชนิด photo-diode array detector เครื่องจะทำการ scan ค่าการดูดกลืนสูงสุดของสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิดเมื่ออยู่ในช่วงภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ศึกษา ซึ่งได้ UV spectrum ดังรูปที่ 7

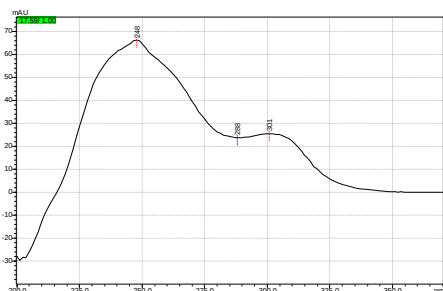
Puerarin ( $\lambda_{\max} = 249, 304$ )



Daidzein ( $\lambda_{\max} = 248, 301$ )



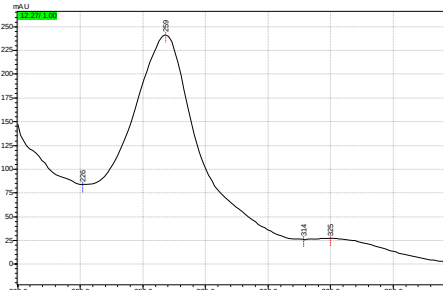
Daidzin ( $\lambda_{\max} = 249$ )



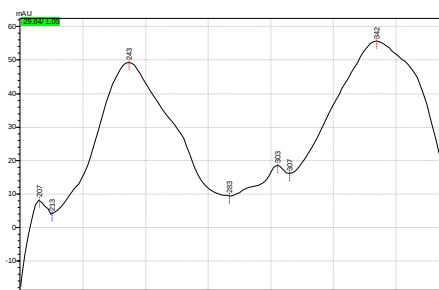
Genistein ( $\lambda_{\max} = 259$ )



Genistin ( $\lambda_{\max} = 259, 325$ )



Coumestrol ( $\lambda_{\max} = 207, 243, 303, 342$ )



รูปที่ 7 UV spectrum และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ( $\lambda_{\max}$ ) ของสารมาตรฐาน puerarin, daidzin, genistin, daidzein, genistein และ coumestrol

## 2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

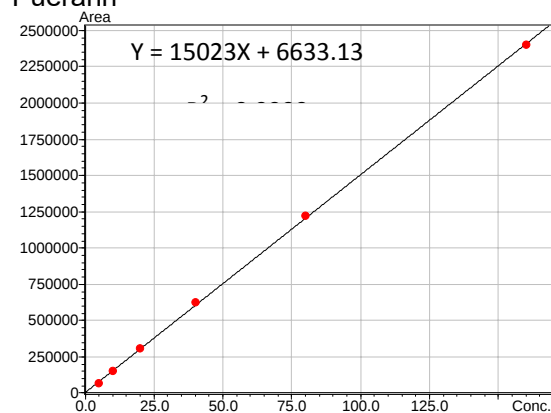
### 1.1 การศึกษา Linearity

จากการศึกษา linearity ในช่วงที่ใช้เป็น standard curve ได้แก่ 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิดดังตารางที่ 4 และได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิดดังรูปที่ 8 และคำนวณค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) รวมถึงสมการความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรม LCMSSolution ของเครื่อง HPLC

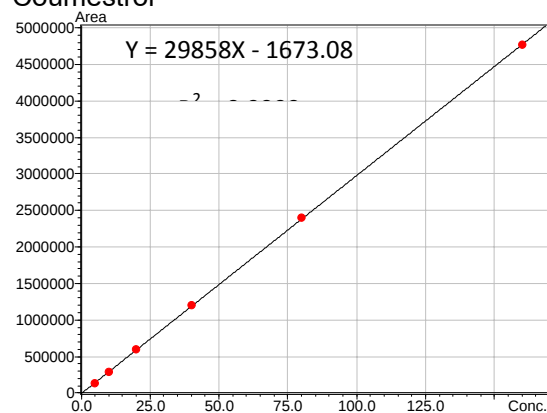
ตารางที่ 4 พื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้นของ<br>สารมาตรฐาน<br>(ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร) | ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) |         |          |          |           |            |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|---------|----------|----------|-----------|------------|
|                                                           | puerarin                      | daidzin | genistin | Daidzein | genistein | coumestrol |
| 5                                                         | 67988                         | 151036  | 219187   | 115965   | 122459    | 136512     |
| 10                                                        | 151654                        | 306791  | 445435   | 237457   | 263583    | 293326     |
| 20                                                        | 307189                        | 612674  | 888798   | 477375   | 537638    | 597162     |
| 40                                                        | 624939                        | 1209585 | 1745502  | 943375   | 1068126   | 1196785    |
| 80                                                        | 1218662                       | 2390680 | 3445777  | 1872308  | 2133443   | 2391441    |
| 160                                                       | 2401625                       | 4694864 | 6732235  | 3706375  | 4217156   | 4760783    |

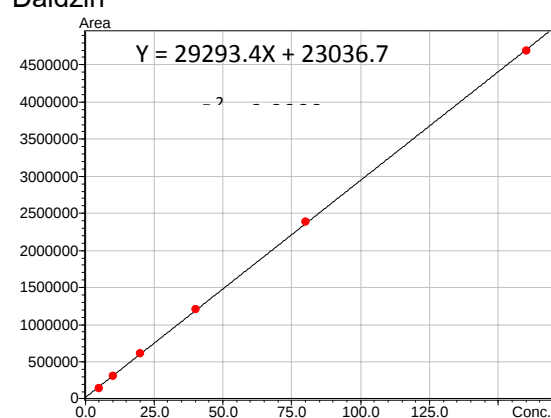
Puerarin



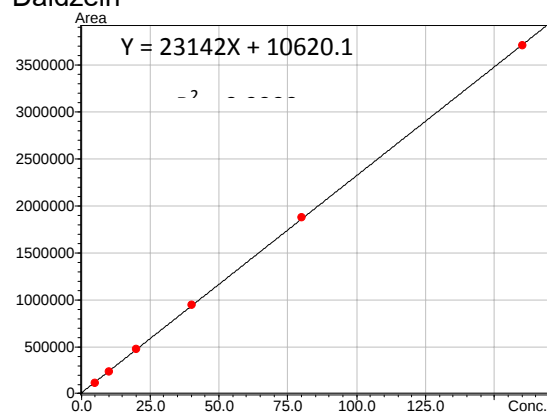
Coumestrol



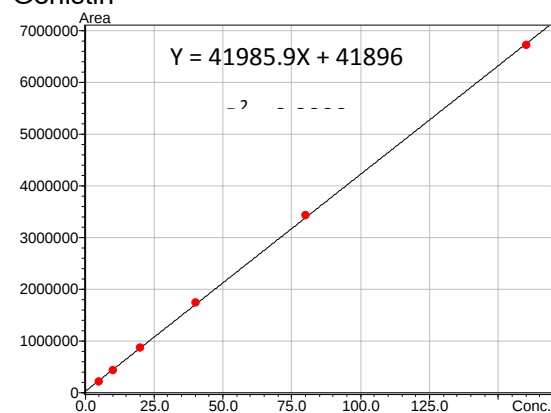
Daidzin



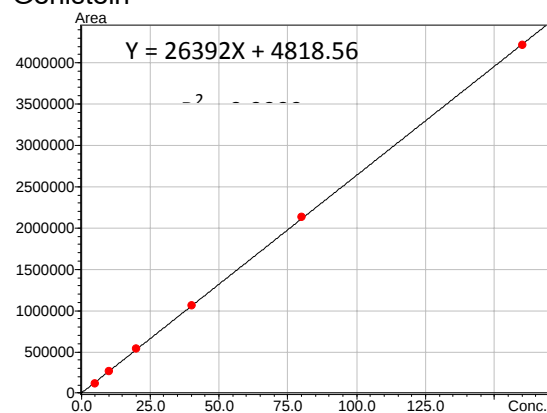
Daidzein



Genistin



Genistein



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 6 ชนิด

## 1.2 การศึกษา Limit of quantitation (LOQ)

จากการคำนวณหาค่า LOQ ของวิธีวิเคราะห์ที่ทำการศึกษากับโปรแกรม LCMSsolution ของเครื่อง HPLC พบว่าค่า LOQ ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดได้ค่าดังนี้

|            |                            |
|------------|----------------------------|
| Coumestrol | = 2.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Daidzein   | = 2.81 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Puerarin   | = 4.33 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Daidzin    | = 2.21 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Genistin   | = 1.42 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Genistein  | = 2.26 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |

## 1.3 การศึกษา Limit of detection (LOD)

จากการคำนวณหาค่า LOD ของวิธีวิเคราะห์ที่ทำการศึกษากับโปรแกรม LCMSsolution ของเครื่อง HPLC พบว่าค่า LOD ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดได้ค่าดังนี้

|            |                            |
|------------|----------------------------|
| Coumestrol | = 0.70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Daidzein   | = 0.93 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Puerarin   | = 1.43 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Daidzin    | = 0.73 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Genistin   | = 0.46 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |
| Genistein  | = 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร |

## 1.4 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

การศึกษาคความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยการหาค่า %recovery ของสารตัวอย่าง คือสารสกัด methanol ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย *P. candollei* var. *mirifica* ที่เลี้ยงจากส่วนรากเป็นเวลา 21 วัน ได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 %recovery ของการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

| 10 ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร | ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) |                 |            | %recovery |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------|------------|-----------|
|                            | spiked sample                 | Unspiked sample | สารมาตรฐาน |           |
| Puerarin                   | 3919912                       | 3778943         | 156863.1   | 93.84     |
| Daidzin                    | 744777.3                      | 453018          | 280646     | 103.96    |
| Daidzein                   | 638305.7                      | 427318          | 215792     | 97.77     |
| Genistin                   | 549172.7                      | 140669          | 402978     | 101.37    |
| Genistein                  | 394856.0                      | 148854          | 236453     | 104.04    |
| Coumestrol                 | 1927922.7                     | 1712828.5       | 199707.1   | 106.81    |

| 20 ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร | ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) |                 |            | %recovery |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------|------------|-----------|
|                            | spiked sample                 | Unspiked sample | สารมาตรฐาน |           |
| Puerarin                   | 4107012                       | 3778943         | 307093     | 109.19    |
| Daidzin                    | 1037587.0                     | 453018          | 571991     | 102.20    |
| Daidzein                   | 866224.3                      | 427318          | 444169     | 98.82     |
| Genistin                   | 992171.7                      | 140669          | 825265     | 103.18    |
| Genistein                  | 670594.7                      | 148854          | 500495     | 104.24    |
| Coumestrol                 | 2051660.7                     | 1712828.5       | 291764.3   | 115.47    |

| 40 ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร | ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) |                 |            | %recovery |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------|------------|-----------|
|                            | spiked sample                 | Unspiked sample | สารมาตรฐาน |           |
| Puerarin                   | 4419636.7                     | 3778943         | 607553     | 106.62    |
| Daidzin                    | 1552856                       | 453018          | 1117727    | 98.40     |
| Daidzein                   | 1260928                       | 427318          | 875851     | 95.18     |
| Genistin                   | 1783889                       | 140669          | 1621231    | 101.36    |
| Genistein                  | 1152294                       | 148854          | 991991     | 101.15    |
| Coumestrol                 | 2221580                       | 1712828.5       | 463152.4   | 109.45    |

1.5 การศึกษาความแม่นยำ (Precision)

ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยคำนวณหา % relative standard deviation (%RSD) ได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 Repeatability และ reproducibility ของการวิเคราะห์

Puerarin

| ความ<br>เข้มข้น<br>(ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร) | Repeatability  |          |             |                |          |             |                |          |             | Reproducibility     |          |             |
|----------------------------------------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|---------------------|----------|-------------|
|                                              | วันที่ 1 (n=3) |          |             | วันที่ 2 (n=3) |          |             | วันที่ 3 (n=3) |          |             | ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 วัน |          | %RSD        |
|                                              | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$           | SD       |             |
| 5                                            | 68625.33       | 1996.25  | <b>2.91</b> | 70196.33       | 2036.73  | <b>2.90</b> | 75373.00       | 1374.70  | <b>1.82</b> | 71,398              | 3443.166 | <b>4.82</b> |
| 40                                           | 624939.33      | 3176.03  | <b>0.51</b> | 625764.50      | 2402.04  | <b>0.38</b> | 627708.33      | 6693.91  | <b>1.07</b> | 625,840             | 4124.222 | <b>0.66</b> |
| 160                                          | 2462287.6      | 69337.58 | <b>2.82</b> | 2435914.3      | 17832.34 | <b>0.73</b> | 2492120.0      | 24567.29 | <b>0.99</b> | 2,463,441           | 45004.29 | <b>1.83</b> |

Daidzin

| ความ<br>เข้มข้น<br>(ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร) | Repeatability  |           |             |                |          |             |                |          |             | Reproducibility     |          |             |
|----------------------------------------------|----------------|-----------|-------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|---------------------|----------|-------------|
|                                              | วันที่ 1 (n=3) |           |             | วันที่ 2 (n=3) |          |             | วันที่ 3 (n=3) |          |             | ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 วัน |          | %RSD        |
|                                              | $\bar{X}$      | SD        | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$           | SD       |             |
| 5                                            | 152183         | 1333.49   | <b>0.88</b> | 154769         | 360.84   | <b>0.23</b> | 157381.67      | 2219.37  | <b>1.41</b> | 154,778             | 2603.06  | <b>1.68</b> |
| 40                                           | 1209585        | 2773.80   | <b>0.23</b> | 1227178        | 6311.25  | <b>0.51</b> | 1210725.6      | 9303.45  | <b>0.77</b> | 1,215,830           | 10305.80 | <b>0.85</b> |
| 160                                          | 4793851        | 109468.14 | <b>2.28</b> | 4754543        | 16712.72 | <b>0.35</b> | 4822331.6      | 49239.89 | <b>1.02</b> | 4,790,242           | 67384.91 | <b>1.41</b> |

ตารางที่ 6 Repeatability และ reproducibility ของการวิเคราะห์ (ต่อ)

Genistin

| ความ<br>เข้มข้น<br><br>(ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร) | Repeatability  |           |             |                |          |             |                |          |             | Reproducibility     |          |             |
|--------------------------------------------------|----------------|-----------|-------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|---------------------|----------|-------------|
|                                                  | วันที่ 1 (n=3) |           |             | วันที่ 2 (n=3) |          |             | วันที่ 3 (n=3) |          |             | ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 วัน |          | %RSD        |
|                                                  | $\bar{X}$      | SD        | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$           | SD       |             |
| 5                                                | 220720.3       | 3724.00   | <b>1.69</b> | 223766         | 2257.42  | <b>1.01</b> | 224863         | 1949.48  | <b>0.87</b> | 223,116             | 3024.28  | <b>1.36</b> |
| 40                                               | 1745502        | 2719.70   | <b>0.16</b> | 1770427        | 8891.76  | <b>0.50</b> | 1744323        | 14117.21 | <b>0.81</b> | 1,753,418           | 15311.66 | <b>0.87</b> |
| 160                                              | 6855889        | 128970.46 | <b>1.88</b> | 6790572        | 33439.34 | <b>0.49</b> | 6889449        | 58040.59 | <b>0.84</b> | 6,845,303           | 84712.60 | <b>1.24</b> |

Daidzein

| ความ<br>เข้มข้น<br><br>(ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร) | Repeatability  |          |             |                |          |             |                |          |             | Reproducibility     |          |             |
|--------------------------------------------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|---------------------|----------|-------------|
|                                                  | วันที่ 1 (n=3) |          |             | วันที่ 2 (n=3) |          |             | วันที่ 3 (n=3) |          |             | ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 วัน |          | %RSD        |
|                                                  | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$           | SD       |             |
| 5                                                | 116531.67      | 1622.68  | <b>1.39</b> | 119633.33      | 1417.37  | <b>1.18</b> | 119175.00      | 709.14   | <b>0.60</b> | 118,447             | 1840.77  | <b>1.55</b> |
| 40                                               | 945884.25      | 4259.01  | <b>0.45</b> | 955450.00      | 6272.04  | <b>0.66</b> | 941844.67      | 9565.40  | <b>1.02</b> | 946,663             | 7931.33  | <b>0.84</b> |
| 160                                              | 3781641.6      | 84423.69 | <b>2.23</b> | 3742476.6      | 28195.10 | <b>0.75</b> | 3794600.0      | 35588.17 | <b>0.94</b> | 3,772,906           | 53381.10 | <b>1.41</b> |

ตารางที่ 6 Repeatability และ reproducibility ของการวิเคราะห์ (ต่อ)

Genistein

| ความ<br>เข้มข้น<br><br>(ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร) | Repeatability  |          |             |                |          |             |                |          |             | Reproducibility     |          |             |
|--------------------------------------------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|---------------------|----------|-------------|
|                                                  | วันที่ 1 (n=3) |          |             | วันที่ 2 (n=3) |          |             | วันที่ 3 (n=3) |          |             | ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 วัน |          | %RSD        |
|                                                  | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$           | SD       |             |
| 5                                                | 123863.33      | 2782.01  | <b>2.25</b> | 124488.00      | 2864.01  | <b>2.30</b> | 125882.67      | 1268.72  | <b>1.01</b> | 124,745             | 2278.06  | <b>1.83</b> |
| 40                                               | 1068125.6      | 2309.33  | <b>0.22</b> | 1082564.3      | 5503.99  | <b>0.51</b> | 1066539.6      | 9213.56  | <b>0.86</b> | 1,072,410           | 9412.85  | <b>0.88</b> |
| 160                                              | 4298074.0      | 86440.48 | <b>2.01</b> | 4274740.3      | 46092.20 | <b>1.08</b> | 4306488.6      | 39888.31 | <b>0.93</b> | 4,293,101           | 54770.28 | <b>1.28</b> |

Coumestrol

| ความ<br>เข้มข้น<br><br>(ไมโครกรัม/<br>มิลลิลิตร) | Repeatability  |          |             |                |          |             |                |          |             | Reproducibility     |          |             |
|--------------------------------------------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|---------------------|----------|-------------|
|                                                  | วันที่ 1 (n=3) |          |             | วันที่ 2 (n=3) |          |             | วันที่ 3 (n=3) |          |             | ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 วัน |          | %RSD        |
|                                                  | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$      | SD       | %RSD        | $\bar{X}$           | SD       |             |
| 5                                                | 137853.33      | 3123.22  | <b>2.27</b> | 141570.67      | 190.68   | <b>0.13</b> | 142325.00      | 3159.37  | <b>2.22</b> | 140,583             | 3039.91  | <b>2.16</b> |
| 40                                               | 1199275.6      | 3239.99  | <b>0.27</b> | 1215414.6      | 6828.79  | <b>0.56</b> | 1193384.6      | 10597.98 | <b>0.89</b> | 1,202,692           | 11828.92 | <b>0.98</b> |
| 160                                              | 4842708.3      | 72085.41 | <b>1.49</b> | 4837215.3      | 45390.41 | <b>0.94</b> | 4875576.6      | 43145.33 | <b>0.88</b> | 4,851,833           | 51012.65 | <b>1.05</b> |

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิด พบว่าได้ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานในช่วง 5 – 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และได้ค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) ไม่น้อยกว่า 0.9990 ในการศึกษาค่า limit of quantitation (LOQ) หรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ตรวจวิเคราะห์แล้วยังอยู่ในช่วงที่มีความถูกต้อง ได้ค่าของสาร coumestrol, daidzein, puerarin, daidzin, genistin และ genistein เท่ากับ 2.13, 2.81, 4.33, 2.21, 1.42 และ 2.26 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับค่า limit of detection (LOD) หรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีที่วิเคราะห์ ได้ค่าของสาร coumestrol daidzein puerarin daidzin genistin และ genistein เท่ากับ 0.70, 0.93, 1.43, 0.73, 0.46 และ 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในการศึกษาความถูกต้อง (accuracy) พบว่าได้ค่า % recovery ของสาร coumestrol, daidzein, puerarin, daidzin, genistin และ genistein ในช่วง 90-120% และในการศึกษาความแม่นยำ (precision) โดยหาค่า %RSD ของสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ทั้งค่า repeatability และ reproducibility พบว่าได้ค่าไม่เกิน 6<sup>30, 31</sup>

## การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวาเครือขาว

จากการศึกษาปริมาณสารในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์จากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวาเครือขาวซึ่งได้จากส่วนใบ ลำต้น และราก ของกาวาเครือขาว 2 พันธุ์ คือ *P. candollei* var. *candollei* และ *P. candollei* var. *mirifica* ที่เลี้ยงและเก็บเซลล์ทุกๆ 3 วัน คือวันที่ 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ของการวางเลี้ยงตามลำดับ ได้ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10 พบว่าในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* ทั้งสองพันธุ์ มีสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด 4 ชนิด คือ daidzein genistein daidzin และ genistin (รูปที่ 9 และ 10) โดยไม่พบว่ามีสาร puerarin และ coumestrol

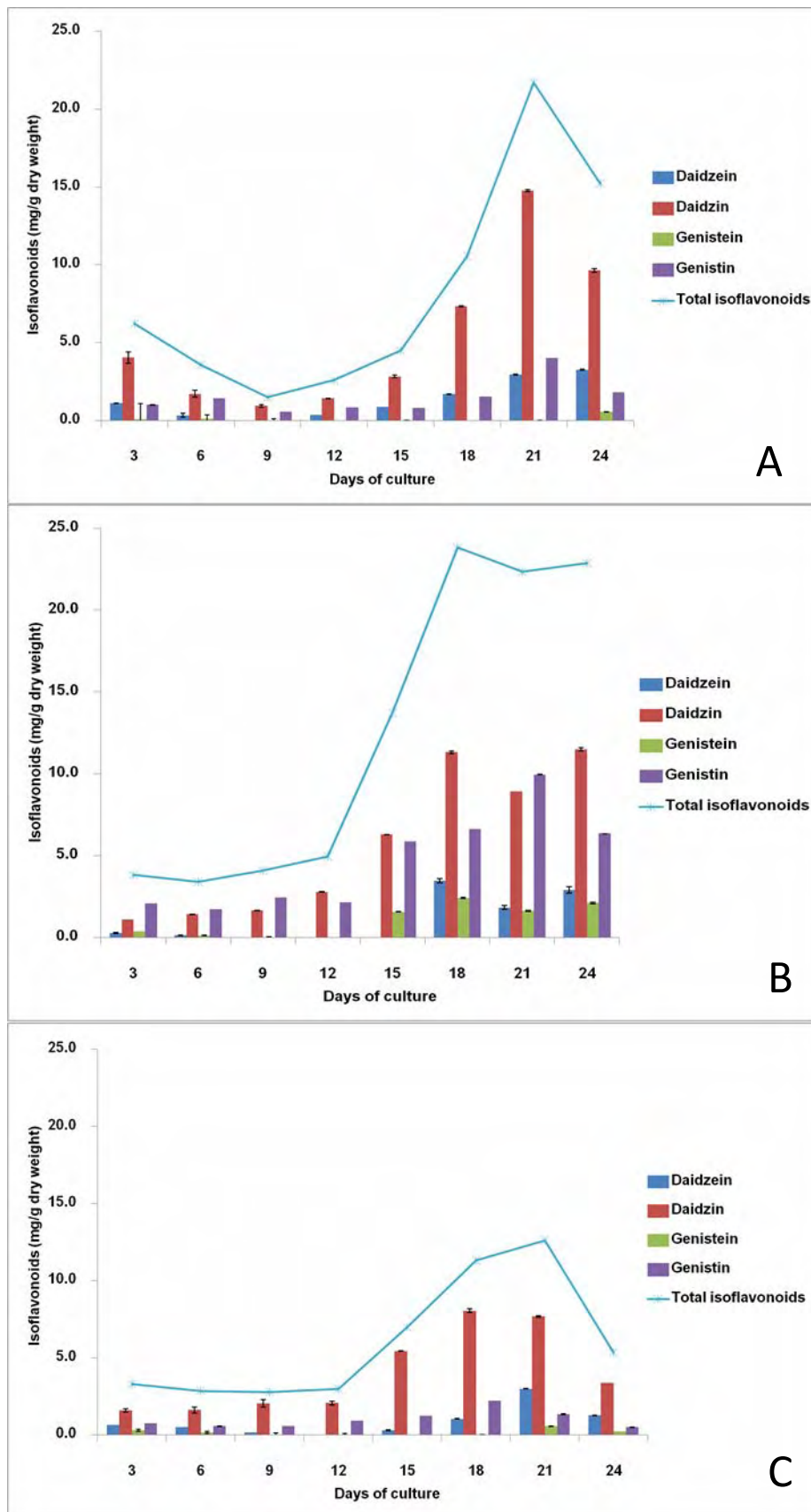
## ปริมาณและรูปแบบการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *candollei*

พบว่าปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์รวมในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อใบ เริ่มเพิ่มขึ้นในวันที่ 15 ของการวางเลี้ยง ซึ่งน่าจะเกิดว่าตรงกับวันที่เกิดการ browning และจะเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 21 ของการวางเลี้ยง (รูปที่ 9A)

ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์รวมในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อลำต้น เริ่มเพิ่มขึ้นในวันที่ 15 ของการวางเลี้ยง และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 18 ของการวางเลี้ยง ทั้งนี้วันที่เริ่มมีการเพิ่มของสารตรงกับวันที่เกิด browning และในระหว่างที่เซลล์เจริญเติบโตอยู่ในช่วง exponential phase (วันที่ 3-12 ของการวางเลี้ยง) พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์รวม (รูปที่ 9B: กราฟเส้น)

สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อราก พบว่าปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์รวมเริ่มเพิ่มขึ้นในวันที่ 15 และสูงที่สุดในวันที่ 21 และนอกจากนี้ยังพบว่าในช่วงที่เซลล์กำลังเจริญอยู่ในช่วง lag phase และ exponential phase (วันที่ 3-12 ของการวางเลี้ยง) จะไม่เกิดการสร้างและสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (รูปที่ 9C: กราฟแท่ง)

จากเซลล์ทั้ง 3 ชนิด (ใบ ลำต้น และราก) เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากส่วนลำต้นของ *P. candollei* var. *candollei* มีปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดคือ 23.82 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง



รูปที่ 9 ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อของ *P. candollei* var. *candollei* (A: ใบ, B: ลำต้น, C: ราก)

## ปริมาณและรูปแบบการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ

### *P. candollei* var. *mirifica*

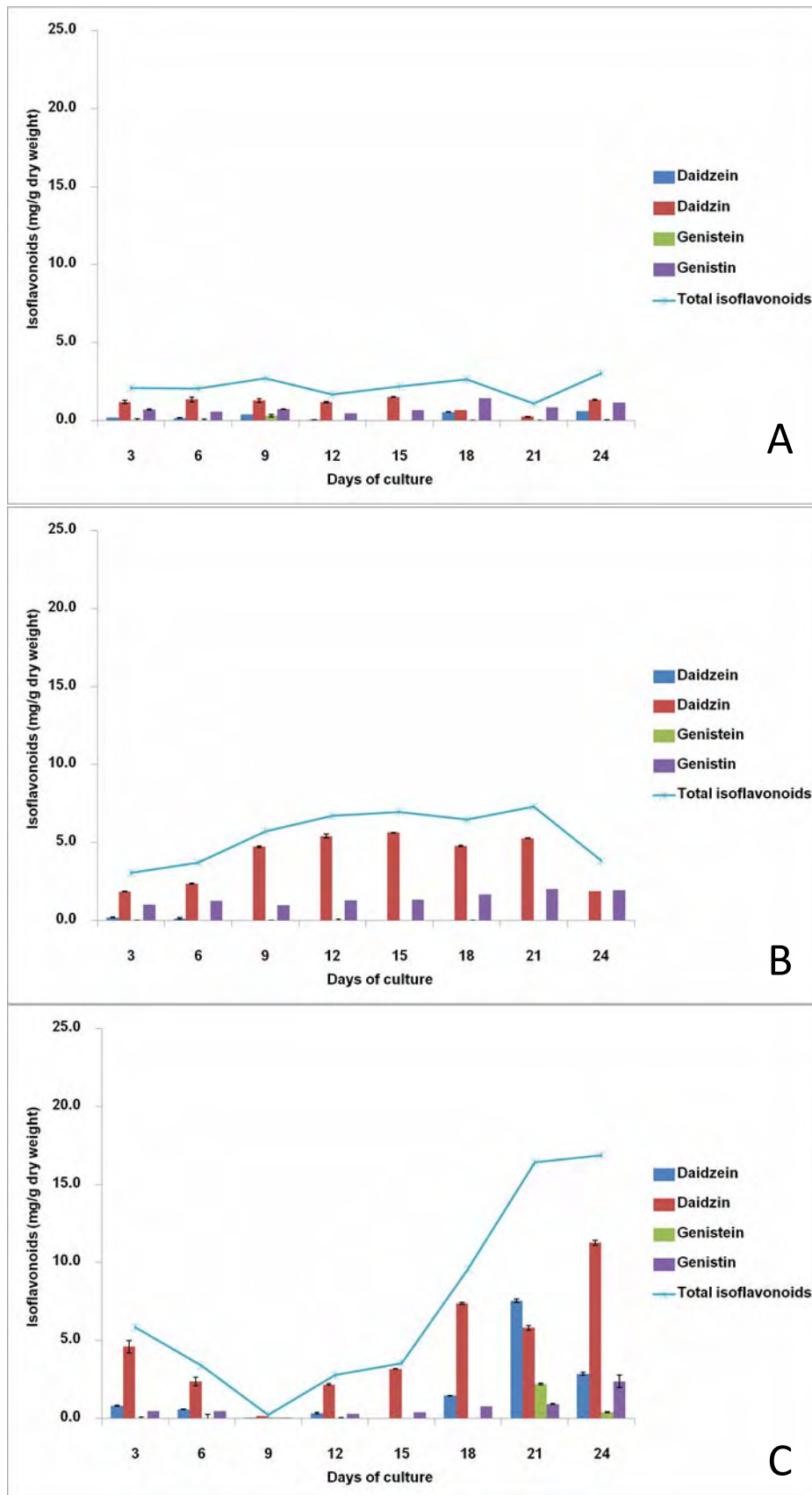
พบว่าปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์รวมในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อใบ ก่อนช่วงคงที่ตลอดการวางเลี้ยง (รูปที่ 10A: กราฟเส้น)

ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อลำต้น พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์รวมเพียงเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 6 และสูงที่สุดในวันที่ 21 (รูปที่ 10B: กราฟเส้น)

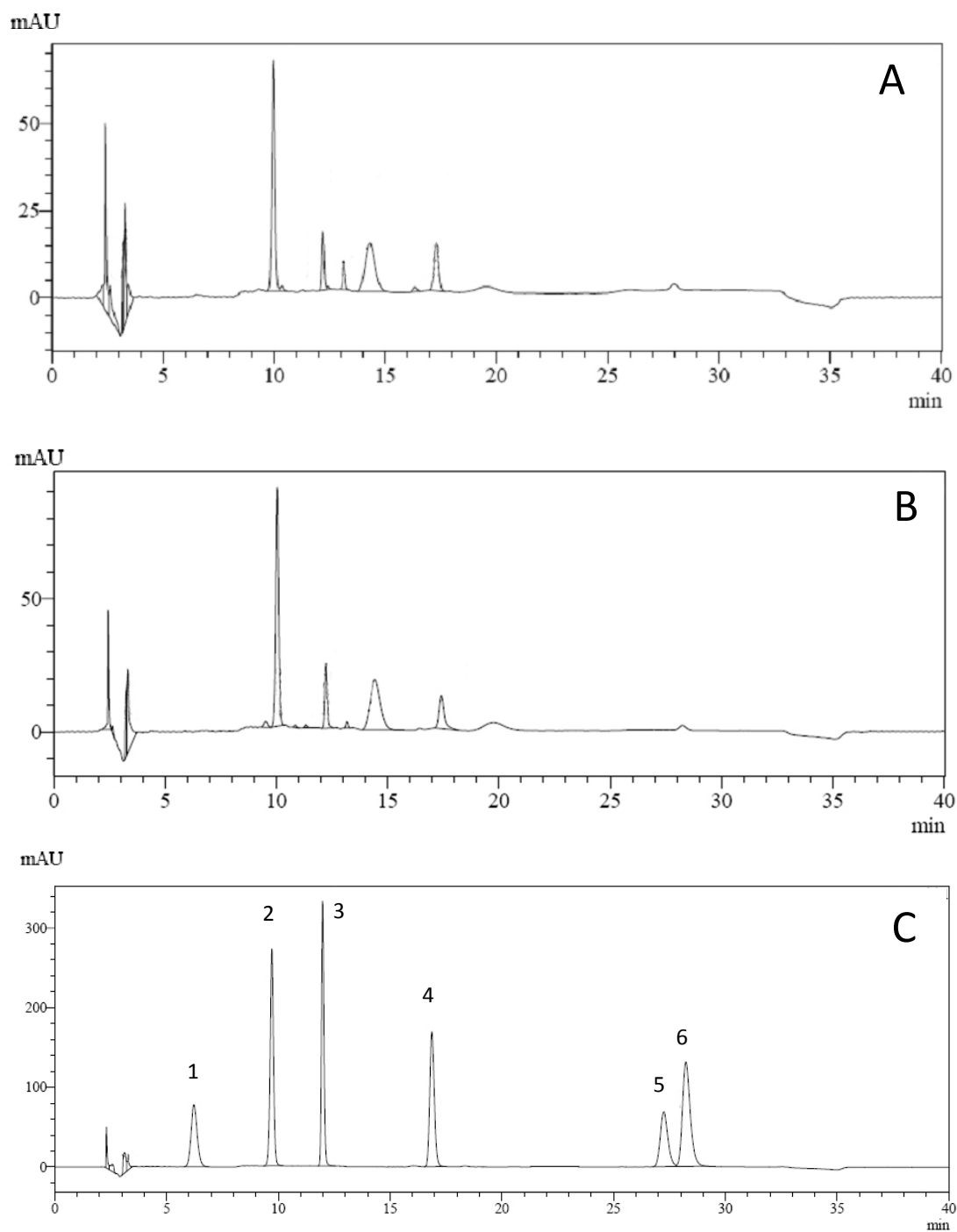
และในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากพบว่า ปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์รวมเพิ่มขึ้นในวันที่ 12 ของการวางเลี้ยง และสูงสุดในวันที่ 24 (รูปที่ 10C: กราฟเส้น)

จากเซลล์ทั้ง 3 ชนิด (ใบ ลำต้น และราก) เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากส่วนรากของ *P. candollei* var. *mirifica* มีปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดคือ 16.87 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง

รูปที่ 11 แสดง chromatogram ของตัวอย่างที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์เทียบกับสารมาตรฐาน



รูปที่ 10 ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อของ *P. candollei* var. *mirifica* (A: ใบ, B: ลำต้น, C: ราก)



รูปที่ 11 HPLC chromatogram ของเซลล์เพาะเลี้ยงแวนดอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *candollei* (A) *P. candollei* var. *mirifica* (B) และสารมาตรฐาน (C) โดย 1: puerarin 2: daidzin 3: genistin 4: daidzein 5: genistein และ 6: coumestrol

เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากกวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์ มีการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ 4 ชนิด โดยสารหลักเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (daidzin และ genistin) ส่วนสารไอโซฟลาโวนอยด์ที่ไม่มีน้ำตาล (daidzein และ genistein) จะมีปริมาณน้อยในช่วงแรกของการวางเลี้ยงและจะมีการสะสมมากขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาในการวางเลี้ยง โดยรูปแบบการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยมีลักษณะคล้ายกับในรากกวาวเครือขาวในธรรมชาติ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในรากกวาวเครือขาว

| พันธุ์                                    | ปริมาณสารเฉลี่ย $\pm$ S.E. (มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง) |                 |                 |                  |                  |            |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------|
|                                           | Daidzein                                                | Daidzin         | Genistein       | Genistin         | Puerarin         | Coumestrol |
| <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> | 0.30 $\pm$ 0.09                                         | 0.46 $\pm$ 0.30 | 0.06 $\pm$ 0.01 | 0.16 $\pm$ 0.02  | 11.66 $\pm$ 1.94 | ND*        |
| <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>  | 0.16 $\pm$ 0.06                                         | 0.23 $\pm$ 0.09 | ND              | 0.06 $\pm$ 0.004 | 5.52 $\pm$ 1.29  | ND         |

\* ND = Not determined

ทั้งนี้การที่พบแต่ daidzein daidzin genistein และ genistin ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย อาจเนื่องมาจาก daidzein และ genistein เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นในช่วงต้นของ phenylpropanoid pathway จึงมีการสะสมของสารเพียง 4 ชนิดข้างต้นในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย<sup>32, 33</sup> ในขณะที่สาร coumestrol และ puerarin ซึ่งมีการพบในส่วนหัวของ *P. candollei* var. *mirifica*<sup>5, 34</sup> แต่ไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ยีนซึ่งสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในชีวสังเคราะห์ของสารทั้งสองชนิดไม่แสดงออกในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย แต่ยีนดังกล่าวอาจแสดงออกในเนื้อเยื่อของพืชที่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะแล้ว (differentiation)<sup>25, 35, 36</sup> นอกจากนี้ระยะเวลาในการวางเลี้ยงอาจส่งผลต่อการสะสมสารด้วย<sup>37</sup> เนื่องจากชีวสังเคราะห์ของสารดังกล่าวอยู่ในช่วงท้ายของกระบวนการชีวสังเคราะห์<sup>38, 39</sup>

เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่กระตุ้นจากรากของ *P. candollei* var. *mirifica* แสดงแนวโน้มในการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ระยะเวลาการวางเลี้ยง 24 วัน (น้ำหนักแห้ง 676.0 มิลลิกรัม/flask) ในขณะที่อัตราการผลิต daidzein และ genistein สูงสุด พบที่ระยะเวลาการวางเลี้ยง 21 วัน ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากรากของ *P. candollei* var. *mirifica* (7.53 และ 2.19 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) ขณะที่ปริมาณของ daidzin และ genistin สูงสุด พบในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากใบของ *P. candollei* var. *candollei* ที่ระยะเวลาการวางเลี้ยง 21 วัน (14.75 และ 4.03 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ)

เมื่อวิเคราะห์ผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ (*P. candollei* var. *candollei* และ *P. candollei* var. *mirifica*) ส่วนของพืชตั้งต้นที่ใช้ในการกระตุ้นแคลลัส (ราก ลำต้น และใบ) และระยะเวลาการวางเลี้ยง (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 วัน) ต่อ % yield ของสารสกัด และการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์

ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย โดยใช้ three way ANOVA พบว่า มีเพียงปัจจัยของพันธุ์และระยะเวลาการวางเลี้ยงที่มีผลต่อ %yield ของสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.008$  และ  $<0.001$  ตามลำดับ)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวเครือขาวที่วางเลี้ยงเป็นระยะเวลาสั้นๆ เพียง 24 วัน มีการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (daidzin และ genistin) มากกว่าในหัวของกาวเครือขาวในธรรมชาติ ดังนั้นเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จึงสามารถนำไปใช้ในการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่มีราคาค่อนข้างสูงได้

ซึ่งจากข้อมูลที่ได้รวมทั้งข้อมูลการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย จะนำไปใช้เป็นข้อมูลในการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในขนาดใหญ่ขึ้นต่อไป

## บทที่ 4

### การศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย

#### รากขาวเครือขาวในถังเพาะเลี้ยง

การวิจัยในบทนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญ และการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* ทั้งสองพันธุ์ ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

#### ระเบียบวิธีวิจัย

ในการทดลองนี้จะใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* ที่เลี้ยงอยู่ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยนำเซลล์ดังกล่าวปริมาณ 30 กรัมมาเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยง (Wheaton science products, USA) ซึ่งมีอาหารเหลวสูตร MS<sup>24</sup> และมีสารควบคุมการเจริญ BA 0.56 ไมโครโมลาร์ กับ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ และ sucrose 3 % ปริมาตร 3 ลิตร กวนผสมที่ 60 รอบ/นาที่ วางเลี้ยงที่ 25 °C และให้แสงที่ความเข้มแสง 37.5  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  16 ชั่วโมงต่อวัน

ทำการวัดการเจริญทุกๆ 3 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้ววัดการเจริญโดยชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

เมื่อเลี้ยงจนเซลล์จนกระทั่งเซลล์เกิดการ browning แล้วจะทำการเก็บเซลล์ทั้งหมดและวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เพื่อนำไปเปรียบเทียบผลผลิตชีวมวล (biomass) กับการเลี้ยงใน flask

จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บมาสกัดด้วย methanol และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีที่ได้กำหนดขึ้นในบทที่ 3 โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 6 ชนิดคือ coumestrol puerarin daidzein daidzin genistein และ genistin

#### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *candollei* ที่เลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร มีลักษณะเหมือนกันกับใน flask คือ มีสีเขียวอมเหลือง และจับกลุ่มเป็นก้อนเล็กๆ (aggregate) มากกว่าที่จะกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว (รูปที่ 12) โดยการเจริญของเซลล์จะอยู่ในช่วง lag phase เป็นเวลา 6 วัน ก่อนที่จะเจริญแบบ exponential และเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 18 ของการเลี้ยง (รูปที่ 13)

หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 วัน พบว่าเซลล์มีการเกิด browning จึงทำการเก็บเซลล์ที่เลี้ยงไว้ทั้งหมด และพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้มีน้ำหนักสดต่อปริมาตรอาหาร 36.46 กรัม/ลิตร ซึ่งน้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน flask (90.64 กรัม/ลิตร) 2.5 เท่า

สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *mirifica* พบว่ามีลักษณะเหมือนเซลล์ที่เลี้ยงใน flask คือมีสีเขียวอมเหลือง และจับกลุ่มกัน การเจริญของเซลล์อยู่ใน lag phase ประมาณ 30 วัน และจะเจริญแบบ exponential จนครบ 48 วัน

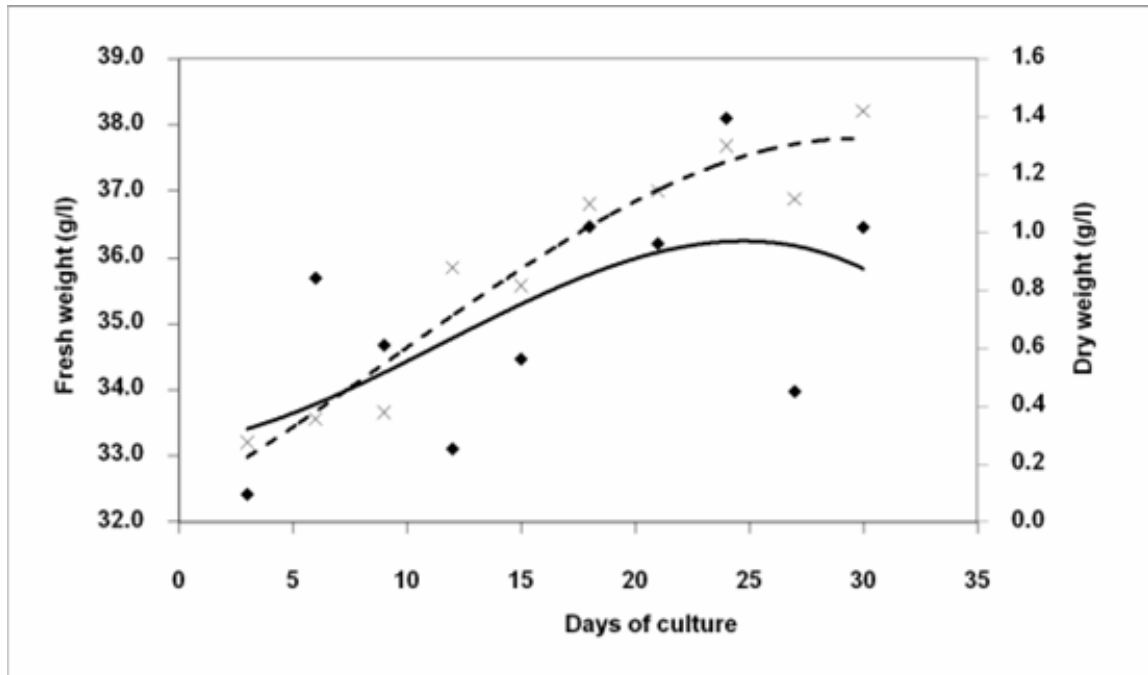
หลังจากผ่านการเลี้ยงได้ 48 วัน พบว่าเซลล์มีสีคล้ำขึ้น ได้ทำการเก็บเซลล์ที่เลี้ยงไว้ทั้งหมดและพบว่าค่าน้ำหนักสดของชีวมวลที่ได้เมื่อเทียบกับปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยง (52.45 กรัม/ลิตร) น้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน flask (218.5 กรัม/ลิตร) 4.2 เท่า

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *candollei* ด้วยวิธี HPLC แล้วพบว่า ปริมาณสารค่อยๆเพิ่มขึ้นจากวันที่ 9 ถึงวันที่ 24 ของการเลี้ยง และในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยงมีอัตราการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ มากที่สุดคือ 4.80 มิลลิกรัม/กรัม ของน้ำหนักเซลล์แห้ง รูปแบบการสร้างสารมีลักษณะคล้ายคลึงกันกับการเลี้ยงใน flask คือมีสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (daidzin และ genistin) เป็นสารหลัก (รูปที่ 15) แต่ไม่พบ daidzein genistein puerarin และ coumetrol

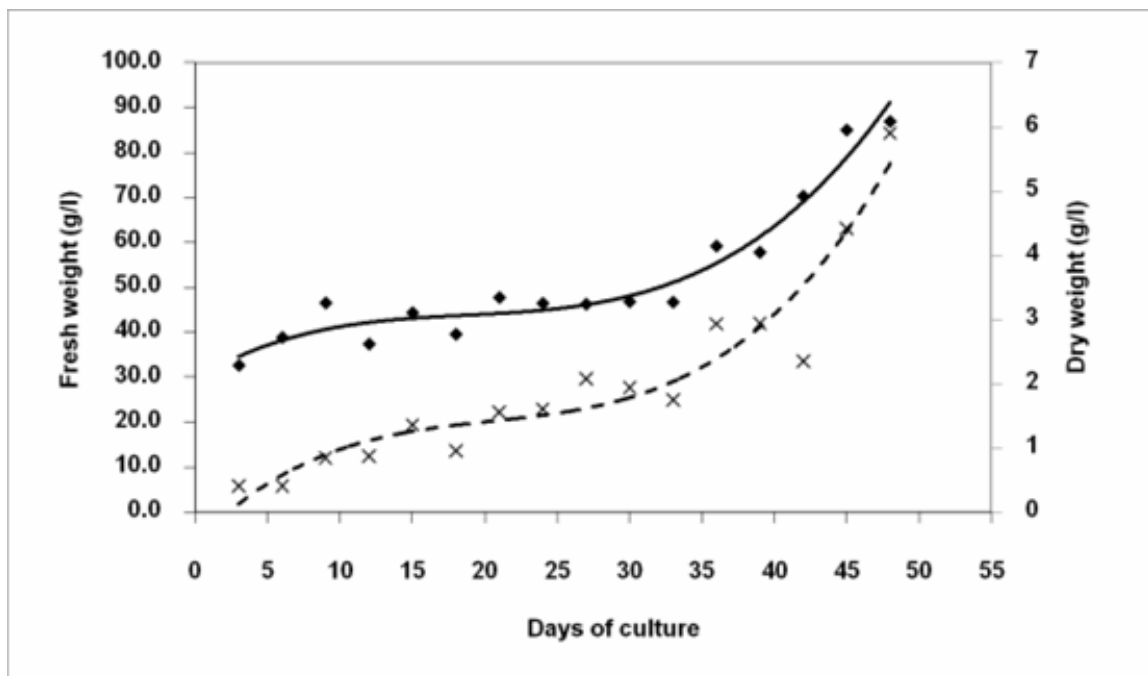
สำหรับ *P. candollei* var. *mirifica* พบว่าปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงที่สุดในวันที่ 45 ของการเลี้ยง (4.36 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง) โดยมีสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์เป็นสารหลักเช่นเดียวกับเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *candollei* แต่ในวันที่ 42-48 ของการเลี้ยงมีการพบ daidzein ด้วย (รูปที่ 16)



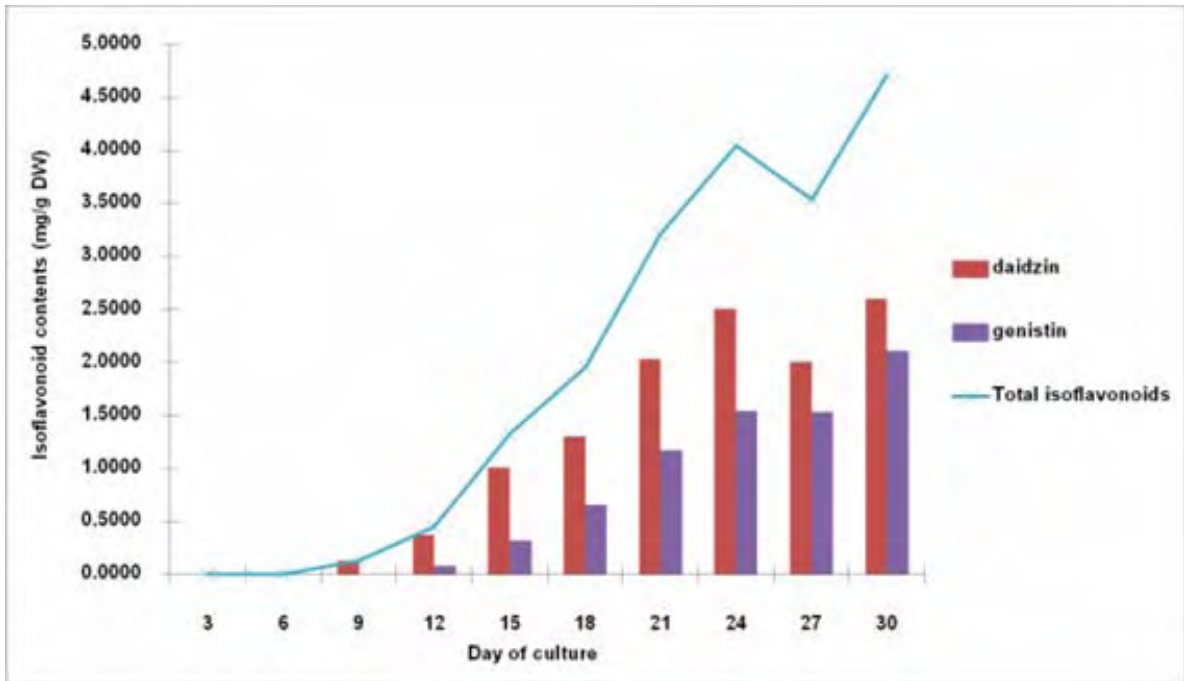
รูปที่ 12 เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* ที่เลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร



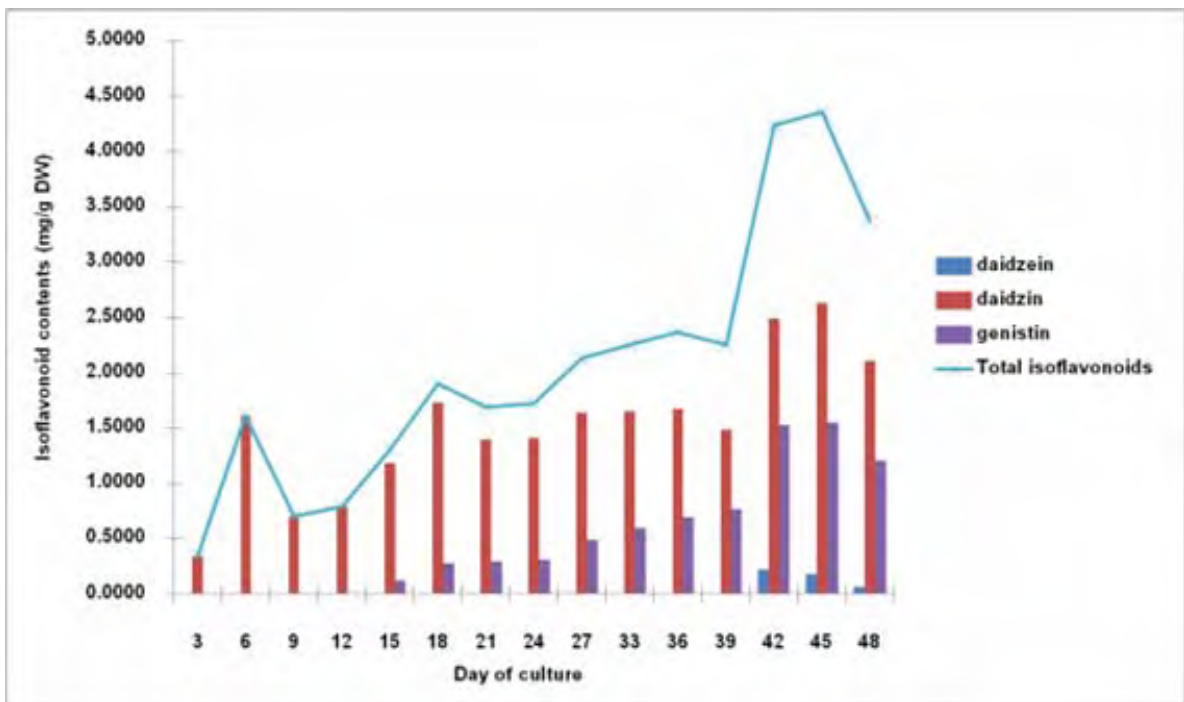
รูปที่ 13 รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *candollei*; ( — ) น้ำหนักสด และ ( - - - ) น้ำหนักแห้ง



รูปที่ 14 รูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *mirifica*; ( — ) น้ำหนักสด และ ( - - - ) น้ำหนักแห้ง



รูปที่ 15 ปริมาณและรูปแบบการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ จากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *candollei* ที่เลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร



รูปที่ 16 ปริมาณและรูปแบบการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ จากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากเนื้อเยื่อรากของ *P. candollei* var. *mirifica* ที่เลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร

จะเห็นได้ว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* ทั้งสองพันธุ์ที่นำมาเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร เจริญได้ไม่ดีเท่ากับเซลล์ที่เลี้ยงใน flask รวมไปถึงปริมาณและรูปแบบของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ก็ยังแตกต่างกับเซลล์ที่เลี้ยงใน flask ด้วย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากวิธีการกวนผสมในถังเพาะเลี้ยงซึ่งแตกต่างกับใน flask กล่าวคือเซลล์ที่อยู่ในถังเพาะเลี้ยง จะถูกกวนผสมด้วยใบพัด (stirrer blade) ซึ่งมีแรงเฉือน (shear force) มากกว่าใน flask ทำให้เซลล์เกิด stress มากขึ้นด้วย<sup>40, 41</sup> ทั้งนี้เซลล์พืชจะทนต่อ shear force ได้น้อยกว่าจุลชีพ<sup>42</sup> ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชในถังเพาะเลี้ยงจึงต้องมีระบบกวนผสมที่สามารถกวนผสมได้อย่างทั่วถึง แต่ไม่ก่อให้เกิด shear force มากเกินไป ปัญหาเหล่านี้อาจแก้ไขได้โดยเปลี่ยนชนิดของใบพัดที่ใช้กวนผสม<sup>40, 42, 43</sup>

นอกจากนี้การเติมอากาศให้กับเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในถังเพาะเลี้ยง ยังมีส่วนสำคัญต่อการเจริญและการสร้างสำคัญในพืชอีกด้วย<sup>44, 45</sup> ดังนั้นในถังเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมอากาศอาจทำให้การเจริญและการสร้างสารสำคัญน้อยลงด้วย

# บทที่ 5

## การศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย

### รากกวาวเครือขาว

สารสำคัญในกวาวเครือขาวเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่พืชสร้างขึ้นเมื่อถูกคุกคามด้วยโรคหรือแมลงบางชนิด (phytoalexins) การวิจัยในบทนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาผลของสารกระตุ้น (elicitors) ซึ่งได้แก่ copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) methyl jasmonate (MeJA) yeast extract (YE) chitosan (CHI) และ laminarin (LAM) ในความเข้มข้นต่างๆ ว่ามีผลต่อการเจริญเติบโต และการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกวาวเครือขาวเพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ในการผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ต่อไป

#### ระเบียบวิธีวิจัย

นำเมล็ดกวาวเครือขาวของทั้งสองพันธุ์มาแช่ใน Funguran<sup>®</sup> ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 2% เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 รอบ นำเมล็ดมาเพาะในอาหารสูตร MS ที่มี น้ำตาลซูโครส 3% และ Agargel<sup>®</sup> 0.55% โดยวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $25 \pm 3^\circ \text{C}$  ในสภาพแสง ( $37.5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 16 ชั่วโมง และมีด 8 ชั่วโมง

หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย โดยนำส่วนของรากมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ได้คัดเลือกสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดจากผลการวิจัยในบทที่ 2 มาเลี้ยงในอาหารแข็งเพื่อให้เกิดแคลลัส คือมี 6-benzylaminopurine (BA) 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 4.52 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้นนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารเร่งการเจริญเติบโตสูตรเดียวกัน ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้คือเซลล์ที่จะนำมาศึกษาต่อไป

ชั่งน้ำหนักเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย 500 มิลลิกรัม ลงใน flask ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยมีอายุ 6 วัน หลังจากย้ายเลี้ยงนำมาเติมสารกระตุ้นที่ศึกษาได้แก่ copper (II) sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), methyl jasmonate (MeJA), yeast extract (YE) granulated, chitosan (CHI) from crab shell (minimum 85% deacetylated) และ laminarin (LAM) from *Laminaria digitata* โดยตารางที่ 8 แสดงความเข้มข้นของสารกระตุ้นแต่ละชนิดที่ศึกษา ซึ่งหลังจากที่เติมสารกระตุ้นแต่ละชนิดและแต่ละความเข้มข้นลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยแล้ว ทำการเก็บผลทุก 3 วันเป็นเวลา 21 วัน คือเซลล์มีอายุครบ 27 วัน

ตารางที่ 8 ชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้น (elicitor) ที่ใช้ในการวิจัย

| สารกระตุ้น                          | หน่วย               | ระดับความเข้มข้น |        |       |
|-------------------------------------|---------------------|------------------|--------|-------|
|                                     |                     | E1               | E2     | E3    |
| Abiotic elicitors                   |                     |                  |        |       |
| Copper sulfate (CuSO <sub>4</sub> ) | มิลลิกรัม/ลิตร      | 0.125*           | 0.625* | 1.25* |
| Methyl jasmonate (MeJA)             | ไมโครโมลาร์         | 0.5              | 1.0    | 2.0   |
| Biotic elicitors                    |                     |                  |        |       |
| Yeast extract (YE)                  | มิลลิกรัม/ลิตร      | 0.5              | 1.0    | 2.0   |
| Chitosan (CH)                       | มิลลิกรัม/ลิตร      | 1.0              | 10     | 50    |
| Laminarin (LAM)                     | มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 0.05             | 0.1    | 0.2   |

\* ความเข้มข้นเทียบเท่ากับปริมาณ copper sulfate เท่ากับ 5, 25 และ 50 เท่าในอาหารเหลวสูตร MS

สารละลาย CuSO<sub>4</sub>, YE และ LAM เตรียมโดยการละลายด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวด เชื้อ จึงใช้น้ำในปริมาณที่เท่ากันเป็นกลุ่มควบคุมของสารกระตุ้นเหล่านี้ สำหรับ chitosan ทำการละลายด้วยกรดอะซิติก 1% ส่วน MeJA ใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลายและปรับปริมาตร ดังนั้นสำหรับกลุ่มควบคุมของ chitosan และ MeJA จะใช้กรดอะซิติก 1% และ absolute ethanol ในปริมาตรเดียวกันตามลำดับ

อาหารที่ใช้ศึกษาถูกปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 5.8 ก่อนทำการหนึ่งขวดเชื้อ ซึ่งสารละลายของสารกระตุ้นทุกชนิดรวมถึงสารละลายกรดอะซิติก 1% ถูกหนึ่งขวดเชื้อก่อนทำการศึกษา ยกเว้นสารละลายของ MeJA และ absolute ethanol ที่ถูกทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.20 ไมครอนก่อนทำการศึกษา

เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ถูกเติมสารกระตุ้นรวมถึงเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกลุ่มควบคุมจะถูกเก็บตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง ทุกๆ 3 วัน โดยเริ่มเก็บตัวอย่างเมื่อเซลล์มีอายุ 9 วันและจะเก็บจนเซลล์มีอายุ 27 วัน (วันที่ 9, 12, 15, 18, 21, 24 และ 27) โดยการศึกษาผลการเจริญเติบโตจะเก็บน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีในบทที่ 2 หลังจากนั้นน้ำหนักแห้ง (dry weight) ที่วัดได้มาศึกษาดัชนีการเจริญเติบโต (growth index) ตามสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโต} = \frac{(\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} - \text{น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น})}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น}}$$

๖ ๖ ๘ ๖ ๖

สำหรับการศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ โดยนำเซลล์ทุกตัวอย่างที่อบแห้งหลังจากการศึกษาการเจริญเติบโตมาสกัดโดยวิธี ultrasonic extraction ที่อุณหภูมิ 40°C เป็น

เวลา 30 นาที ด้วย methanol (AR grade) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง กรองเอาสารสกัดที่ได้รวมกัน นำมาระเหยแห้งด้วยวิธี rotary evaporation จนแห้งสนิท ซึ่งน้ำหนักหาปริมาณสารสกัดที่ได้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% yield) และนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ในบทที่ 3

หลังจากทำการศึกษ ปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ในแต่ละตัวอย่างแล้ว นำมาเปรียบเทียบผลการกระตุ้นของสารกระตุ้นแต่ละตัวโดยการคำนวณค่าดัชนีการเหนี่ยวนำการสร้างสาร (isoflavonoid induction index; II index) โดยใช้ค่าปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์รวม (total isoflavonoid) ของเซลล์ที่เติมสารกระตุ้น กับค่าปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์รวมของกลุ่มควบคุม ตามสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{ดัชนีการเหนี่ยวนำ} = \frac{(\text{Total isoflavonoid}_{\text{elictor}} - \text{Total isoflavonoid}_{\text{control}})}{\text{Total isoflavonoid}_{\text{control}}}$$

การศึกษานี้ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด นำมาคำนวณค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA และ Duncan ที่ค่า  $p\text{-value} < 0.05$

### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษ ผลของสารกระตุ้นต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกาวเครือขาวนี้แบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ การเจริญเติบโตและการสะสมของสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกาวเครือขาวกลุ่มควบคุม การศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย และการศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย

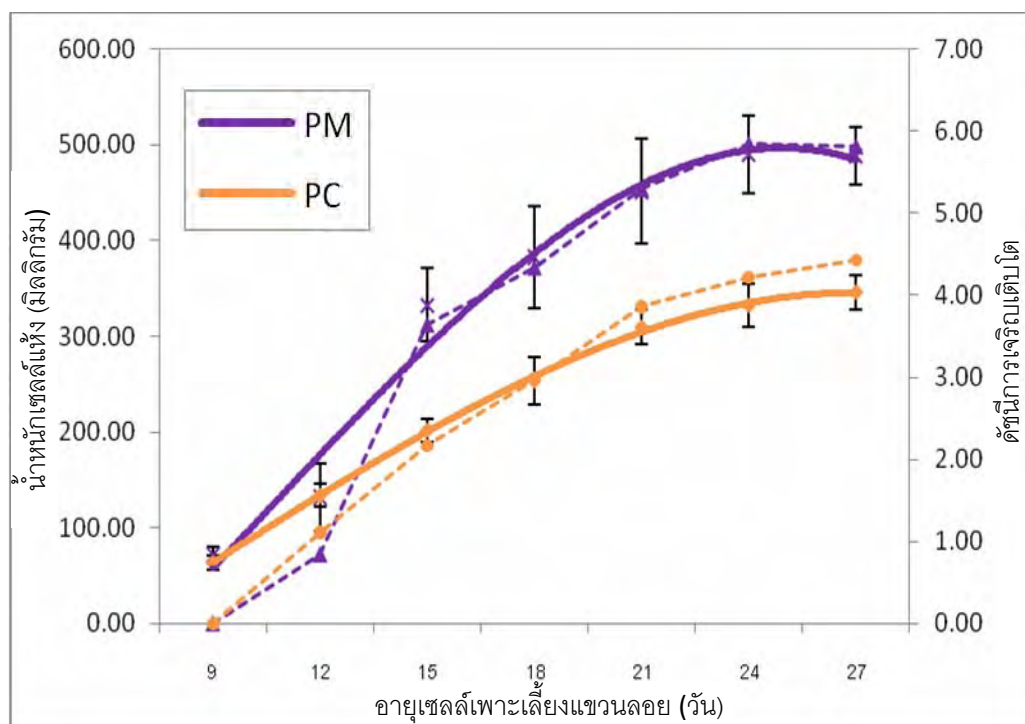
### การเจริญเติบโตและการสะสมของสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกาวเครือขาวกลุ่มควบคุม

จากกราฟแสดงการเจริญเติบโต (growth pattern) ของเซลล์กลุ่มควบคุม (รูปที่ 17) พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *mirifica* (PM) มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า *P. candollei* var. *candollei* (PC) เท่ากับ 1.5 เท่า โดยเซลล์ PM ที่มีอายุ 24 วัน ซึ่งอยู่ในช่วงระยะที่เซลล์เติบโตคงที่หรือ stationary phase ของเซลล์ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 490.27 มิลลิกรัม/flask ส่วนเซลล์ PC ให้เซลล์ที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเมื่อเซลล์มีอายุ 27 วัน เท่ากับ 345.99 มิลลิกรัม/flask เมื่อพิจารณาค่าดัชนีการเจริญเติบโต (ตารางที่ 9) พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองพันธุ์เข้าสู่ stationary phase ของการเจริญเติบโตในวันที่ 24 (รูปที่ 17)

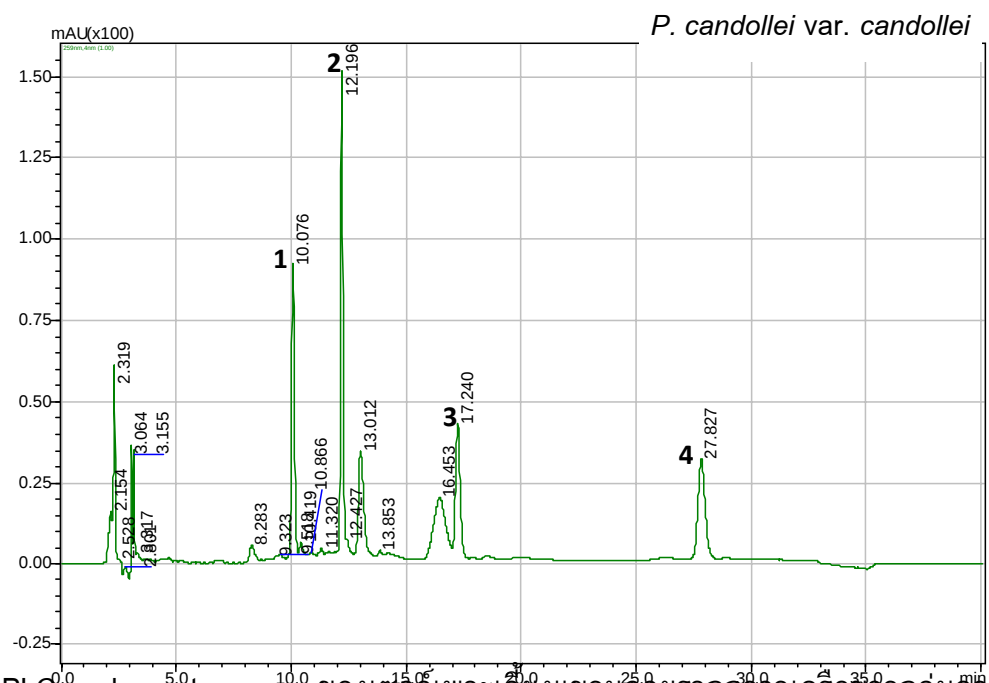
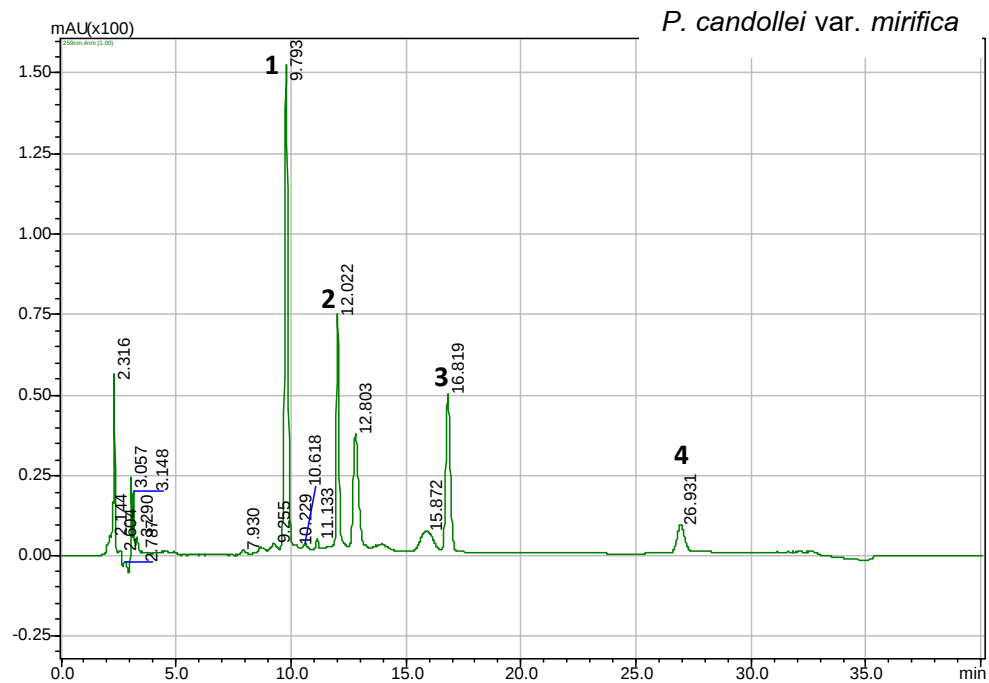
สำหรับการสะสมของสารไอโซฟลาโวนอยด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว พบว่าทั้งสองพันธุ์มีไกลโคไซด์ daidzin และ genistin เป็นองค์ประกอบหลัก ดังแสดงใน HPLC chromatogram ของเซลล์กลุ่มควบคุมอายุ 24 วัน (รูปที่ 18) โดยปริมาณการสะสมเฉลี่ยของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์รวม ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย PM และ PC ในวันที่ 27 ของอายุเซลล์เท่ากับ 21.67 และ 19.58 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เซลล์ PM มีอัตราส่วนของสารอะไกลโคนต่อไกลโคไซด์ คือ daidzin: daidzein เท่ากับ 16:9 และ genistin: genistein เท่ากับ 3:1 ส่วนเซลล์ PC มีอัตราส่วนของสารอะไกลโคนต่อไกลโคไซด์ คือ daidzin: daidzein เท่ากับ 3:1 และ genistin: genistein เท่ากับ 7:1 ซึ่งอัตราส่วนนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับรายงานในบทที่ 3

ตารางที่ 9 ดัชนีการเจริญเติบโต (Growth indices) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย *P. candollei* var. *mirifica* (PM) และ *P. candollei* var. *candollei* (PC) กลุ่มควบคุม

|    | อายุของเซลล์ (วัน) |      |      |      |      |      |      |
|----|--------------------|------|------|------|------|------|------|
|    | 9                  | 12   | 15   | 18   | 21   | 24   | 27   |
| PM | 0.00               | 0.84 | 3.64 | 4.33 | 5.30 | 5.84 | 5.81 |
| PC | 0.00               | 1.11 | 2.17 | 2.98 | 3.86 | 4.22 | 4.43 |



**รูปที่ 17** การเจริญเติบโต\* และดัชนีการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากแก้วเครือขาว  
 \* แสดงโดยค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งของเซลล์ควบคุมจากการทดลอง; เส้นทึบ: แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง  
 ; เส้นประ: แสดงดัชนีการเจริญเติบโต



**รูปที่ 18** HPLC chromatogram ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากแก้วเครือขาวกลุ่มควบคุม อายุ 24 วัน; (1) daidzin, (2) genistin, (3) daidzein, (4) genistein

## การศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว

เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวถูกเติมสารกระตุ้น พบว่าสารกระตุ้นแต่ละชนิดแสดงผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว ดังนี้

CuSO<sub>4</sub>, MeJA และ YE ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา ไม่มีผลหรือมีผลเล็กน้อยต่อการเจริญเติบโตของเซลล์กวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์ โดย CuSO<sub>4</sub> ซึ่งเป็นองค์ประกอบในธาตุอาหารรอง (micro-nutrient) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีผลต่อเซลล์เล็กน้อย โดย CuSO<sub>4</sub> ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง PM และ PC ในวันที่ 21 ของอายุเซลล์

YE แสดงผลต่อการเจริญเติบโตในทั้ง PM และ PC โดยเฉพาะ YE ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 24 ของอายุเซลล์ ในขณะที่ YE ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่แสดงผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองพันธุ์

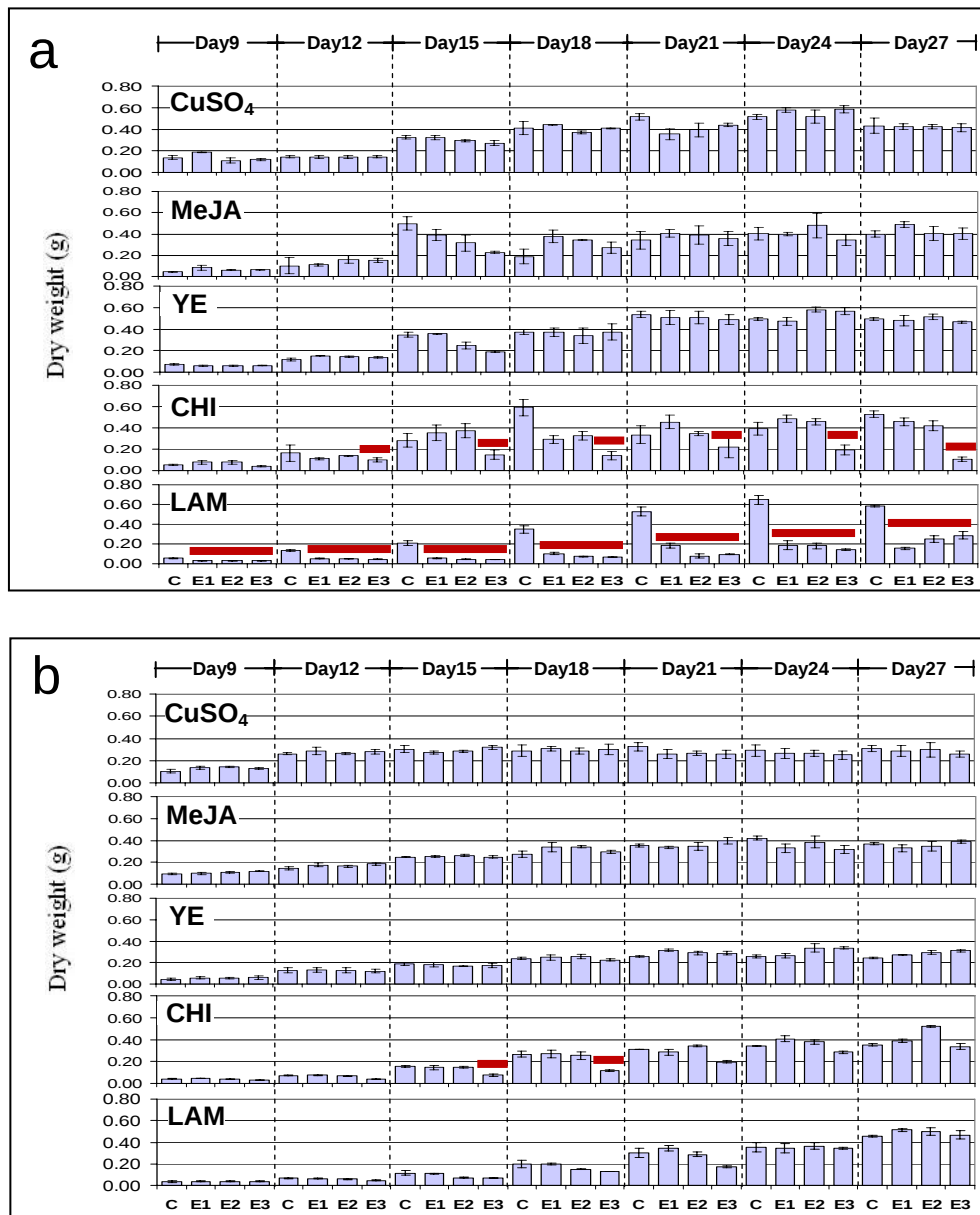
MeJA ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์

Chitosan ที่ความเข้มข้นสูง (50 มิลลิกรัม/ลิตร) แสดงผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. candollei* var. *mirifica* อย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.05$ ) ตั้งแต่วันที่เซลล์มีอายุ 12 ถึง 27 วัน ส่วน *P. candollei* var. *candollei* ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วันที่เซลล์มีอายุ 15 ถึง 18 วัน

LAM ในทุกความเข้มข้นยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ PM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่เซลล์มีอายุ 12 วัน แต่สำหรับเซลล์ PC นั้นพบว่า LAM ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญ โดย LAM ที่ความเข้มข้นปานกลางและสูง (0.1 และ 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ PC เพียงเล็กน้อย ในวันที่ 15-18 ของอายุเซลล์

การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาร chitosan และ LAM นี้ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ (browning) อย่างไรก็ตามเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่เป็นสีน้ำตาลคล้ำนี้สามารถที่จะเกิดขึ้นเป็นเซลล์ใหม่ได้โดยสังเกตเห็นได้ในช่วงระยะที่เซลล์กำลังเติบโต (exponential phase)

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าสารกระตุ้นชนิด oligosaccharide ได้แก่ chitosan และ LAM ในความเข้มข้นที่กล่าวมามีผลยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกวาวเครือขาวโดยเฉพาะ *P. candollei* var. *mirifica* ในขณะที่สารละลาย CuSO<sub>4</sub>, MeJA และ YE ไม่แสดงผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 19



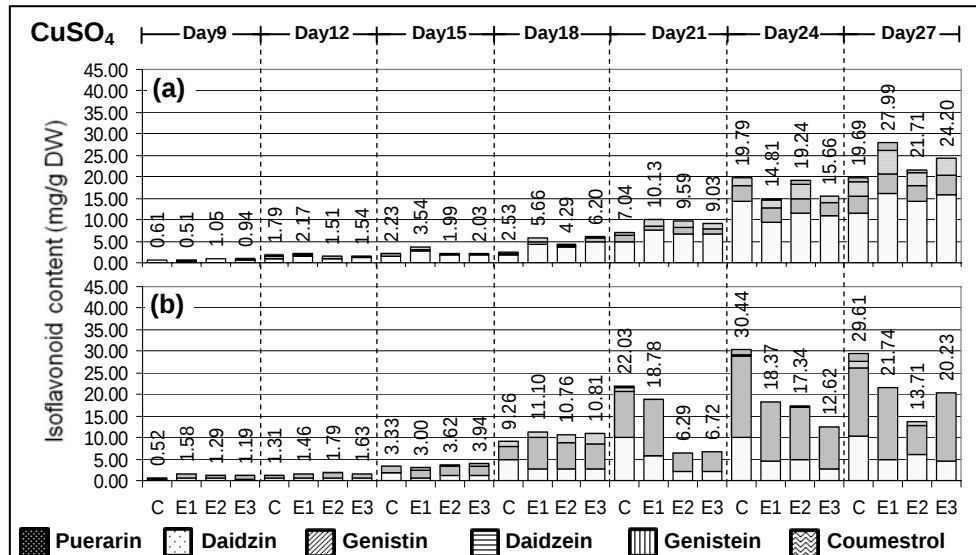
รูปที่ 19 แสดงผลของสารกระตุ้นในความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย รากขาวเครือขาว; *P. candollei* var. *mirifica* (a); *P. candollei* var. *candollei* (b); ความเข้มข้นของ สารกระตุ้นที่ใช้ดังนี้ CuSO<sub>4</sub> : C = กลุ่มควบคุม, E1= 0.125 มิลลิกรัม/ลิตร, E2 = 0.625 มิลลิกรัม/ลิตร, E3 = 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร; MeJA : C = กลุ่มควบคุม, E1= 0.5  $\mu$ M, E2 = 1.0  $\mu$ M, E3 = 2.0  $\mu$ M); YE : C = กลุ่มควบคุม, E1= 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร, E2 = 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร, E3 = 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร; chitosan : C = กลุ่มควบคุม, E1= 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร, E2 = 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร, E3 = 50.0 มิลลิกรัม/ ลิตร; LAM : C = กลุ่มควบคุม, E1= 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, E2 = 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, E3 = 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร วันที่ระบุคืออายุของเซลล์; เส้นทึบแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## การศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว

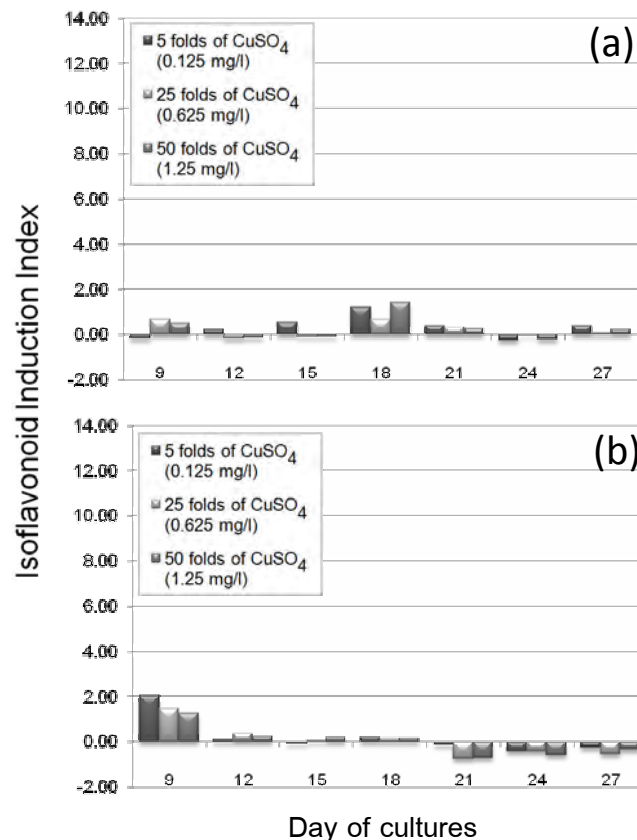
### ผลของสารกระตุ้นชนิด abiotic ต่อการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์

#### Copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ )

เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *mirifica* (PM) และ *P. candollei* var. *candollei* (PC) ได้รับการกระตุ้นด้วย  $\text{CuSO}_4$  พบว่าการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ถูกกระตุ้นเพียงเล็กน้อยโดยเมื่อเติม  $\text{CuSO}_4$  (รูปที่ 20) เมื่อเติม  $\text{CuSO}_4$  0.125 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เซลล์ PM มีการสะสมสารหรือแสดงด้วยค่า isoflavonoid induction index (II index) ที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากวันที่ 12 ถึงวันที่ 18 คือเท่ากับ 0.21 ถึง 1.24 ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ PC พบว่าค่า II index มีค่าสูงสุดจากการกระตุ้นด้วย  $\text{CuSO}_4$  คือ 2.04 ตั้งแต่เซลล์อายุ 9 วัน (3 วันหลังจากเติม  $\text{CuSO}_4$ ) ดังแสดงในรูปที่ 21 การที่  $\text{CuSO}_4$  แสดงผลต่อการกระตุ้นนี้อาจเนื่องจากสารไอโซฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลิกทำหน้าที่ในการเป็นสารจับกับโลหะหนัก (metal-chelating compounds) ซึ่งช่วยลดความเป็นพิษจากโลหะคอปเปอร์<sup>46</sup> ดังนั้นจึงมีการสะสมของสารไอโซฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นเพื่อบทบาทดังกล่าวเมื่อเซลล์ได้รับ  $\text{CuSO}_4$  มากขึ้นกว่าปกติ อย่างไรก็ตามเมื่อเซลล์ *P. candollei* ได้รับ Cu เป็นเวลานาน โดยเฉพาะในความเข้มข้นสูงถึง 50 เท่าของอาหารเหลวสูตร MS (1.25 มิลลิกรัม/ลิตร) จะพบว่าเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงที่เซลล์หยุดเติบโต (stationary phase) จะทำให้การสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ลดลง เนื่องจากเมื่อพืชได้รับโลหะหนักเช่น Cu ในขนาดสูง จะรบกวนการทำงานของระบบเอนไซม์ภายในเซลล์ เปลี่ยนแปลง DNA รบกวนกระบวนการ metabolism ซึ่งส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช<sup>47</sup>



รูปที่ 20 สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a), *P. candollei* var. *candollei* (b)) หลังถูกกระตุ้นด้วย copper sulfate ที่ความเข้มข้นต่างๆ (C = กลุ่มควบคุม, E1 = 0.125 มิลลิกรัม/ลิตร, E2 = 0.625 มิลลิกรัม/ลิตร, E3 = 1.25 มิลลิกรัม/ลิตร) ในช่วงอายุของเซลล์ทุก 3 วัน



รูปที่ 21 Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย copper sulfate ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a) และ *P. candollei* var. *candollei* (b))

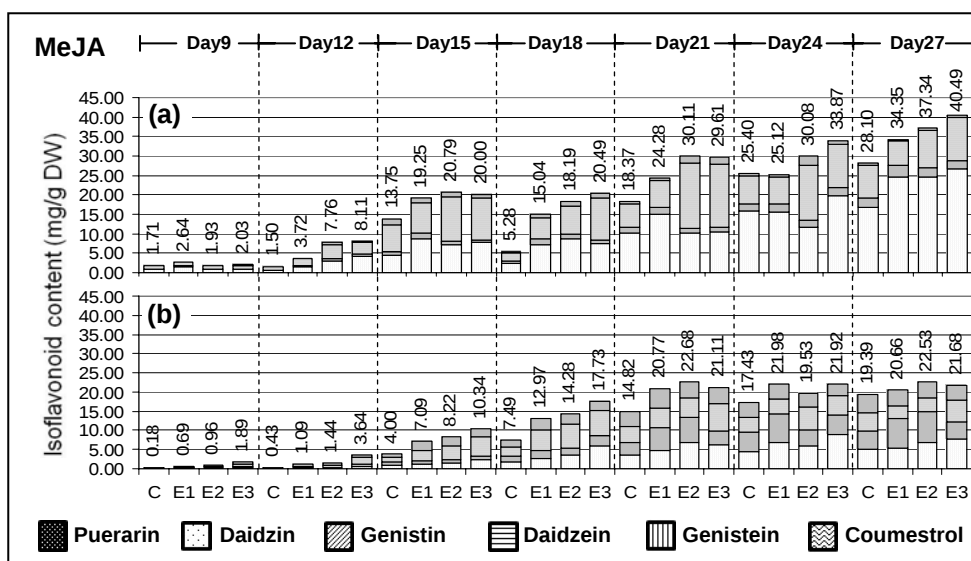
### Methyl jasmonate (MeJA)

ในการทดลองนี้ MeJA ซึ่งเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ศึกษาการเป็นสารกระตุ้น เหนี่ยวนำให้เกิดการการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์ โดยทุกความเข้มข้นของ MeJA เพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์รวมในวันที่ 9 ของอายุเซลล์ (หลังจากเติม MeJA 3 วัน) การเติม MeJA 1.0 และ 2.0 ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มการสะสมไอโซฟลาโวนอยด์รวม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.05$ ) ในเซลล์ PM เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในช่วงวันที่ 12 ถึงวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในเซลล์ PC MeJA 2.0 ไมโครโมลาร์ เหนี่ยวนำการสะสมไอโซฟลาโวนอยด์รวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงวันที่ 9 ถึงวันที่ 18 ของอายุเซลล์

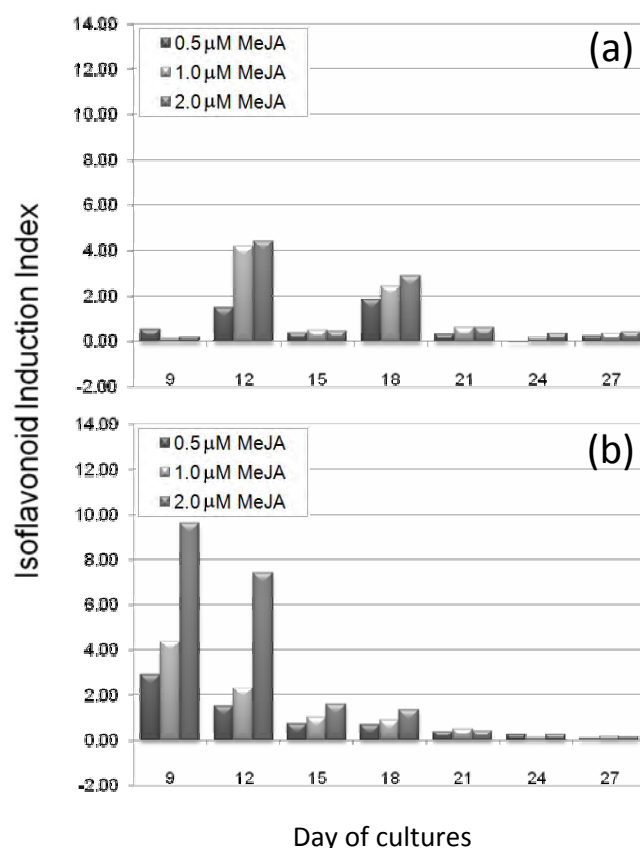
MeJA ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ เหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของไอโซฟลาโวนอยด์รวมในปริมาณที่สูงมาก โดยให้ค่า II index เท่ากับ 4.41 ในเซลล์ PM ในวันที่ 12 ของอายุเซลล์ และเท่ากับ 9.62 ในเซลล์ PC ในวันที่ 9 ของอายุเซลล์ (รูปที่ 22) จากผลการศึกษาพบว่า MeJA กระตุ้นการสะสมของไอโซฟลาโวนอยด์รวมในช่วงแรกเมื่อเติมสารกระตุ้น หรือในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของเซลล์ กวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์ ซึ่งลักษณะการกระตุ้นในช่วงแรกนี้พบว่าคล้ายคลึงกับการกระตุ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของยอป่า (*Morinda elliptica*), Ohelo (*Vaccinium pahalae*) และองุ่น (*Vitis vinifera*) ที่มีการสร้างสาร anthraquinones, anthocyanin และ stilbene ตามลำดับ<sup>48-50</sup>

มีงานวิจัยที่พบว่า MeJA ในความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช<sup>51-53</sup> ซึ่งงานวิจัยนี้ในการศึกษาเบื้องต้นพบว่า MeJA ที่ความเข้มข้น 5, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์ส่วนมากตาย หลังจากเติม MeJA ได้ 3-6 วัน ดังนั้นความเข้มข้นของ MeJA ซึ่งใช้ในการวิจัยนี้ได้ปรับขนาดลงมาจึงเป็นขนาดที่ไม่ทำอันตราย ต่อเซลล์และสามารถเพิ่มการสะสมของสารไอโซฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ได้

ในระบบของการกระตุ้นด้วย reactive oxygen species (ROS) สามารถอธิบายได้ว่ากลไกกระตุ้นผ่านทางสารกลุ่ม jasmonate ซึ่งเกี่ยวข้องกับสารภายในเซลล์คือ jasmonic acid และสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง จะมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของเซลล์พืชต่อความเครียดและการแสดงออกของยีนต่อการสร้างสาร phytoalexin<sup>54-56</sup> MeJA แสดงฤทธิ์ในการกระตุ้นการสะสมสารในงานวิจัยต่างๆ เช่น การเติม MeJA ทำให้เนื้อเยื่อของถั่วเหลือง (*Glycine max*), *Pueraria montana* หรือเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. tuberosa* เพิ่มการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์<sup>57</sup> ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการวิจัยนี้ที่ใช้ MeJA ในความเข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์ เพื่อกระตุ้นการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในกวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์



รูปที่ 22 สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a), *P. candollei* var. *candollei* (b)) หลังถูกกระตุ้นด้วย methyl jasmonate ที่ความเข้มข้นต่างๆ (C = กลุ่มควบคุม, E1 = 0.5 ไมโครโมลาร์, E2 = 1.0 ไมโครโมลาร์, E3 = 2.0 ไมโครโมลาร์) ในช่วงอายุของเซลล์ทุก 3 วัน

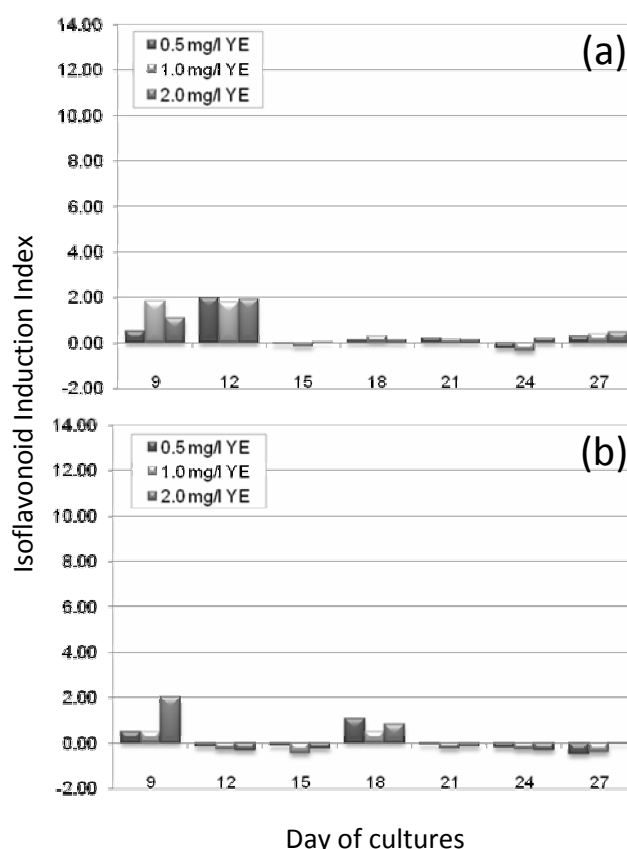


รูปที่ 23 Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย methyl jasmonate ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a) และ *P. candollei* var. *candollei* (b))

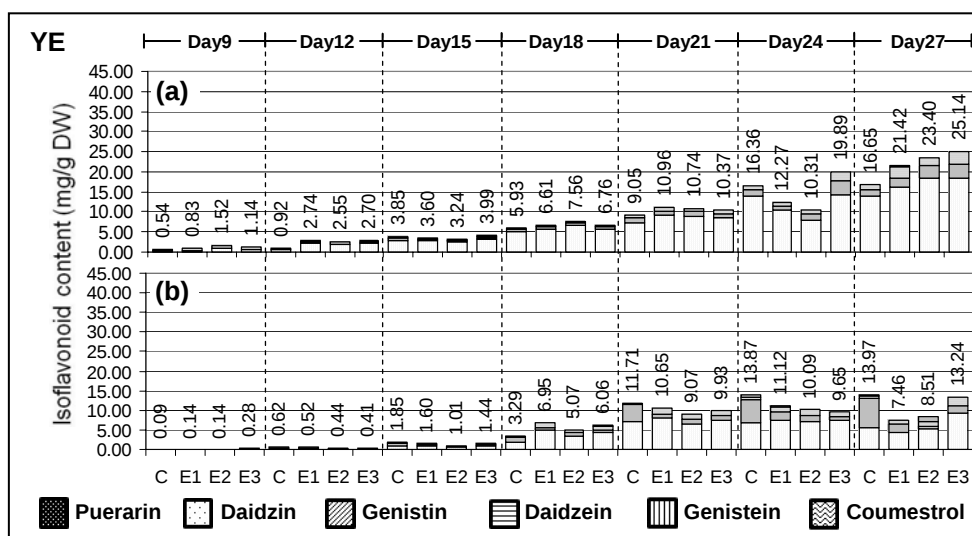
## ผลของสารกระตุ้นชนิด biotic ต่อการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์

### Yeast extract (YE)

ในการศึกษานี้พบว่า YE กระตุ้นการสะสมสารเฉพาะในช่วงแรกหลังจากที่มีการเติมลงไปให้อาหารเท่านั้น การเติม YE ในความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพิ่มค่า II index ในมากกว่า 0.5 ในวันที่ 9 ถึงวันที่ 12 สำหรับเซลล์ PM และในวันที่ 9 สำหรับเซลล์ PC โดยเมื่อเซลล์มีอายุ 15 วันพบว่า YE ลดการสะสมสารโดยแสดงด้วยค่าติดลบของ II index ยกเว้นเซลล์ PM ที่ถูกกระตุ้นด้วย YE ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 24) สาร daidzein และ genistein ถูกกระตุ้นโดยทุกความเข้มข้นของ YE หลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้นในวันที่ 12 (เซลล์มีอายุ 18 วัน) ส่วนสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์จะพบการสะสมในเซลล์กาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์ในปริมาณต่ำ (รูปที่ 25) ซึ่งเกิดในลักษณะเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของ white lupin และ chickpeas ที่มีอัตราส่วนระหว่างไอโซฟลาโวนอยด์ต่อไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่มากขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย YE<sup>58, 59</sup> ในการศึกษาพบว่า YE แสดงฤทธิ์ต่อการกระตุ้นการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย PM และ PC ต่ำ เหมือนกับในงานวิจัยอื่นซึ่งพบความสามารถในการกระตุ้นสารของ YE ที่ต่ำเมื่อเทียบกับสารกระตุ้นอื่น<sup>58, 60, 61</sup>.



รูปที่ 24 Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย yeast extract ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกาวเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a) และ *P. candollei* var. *candollei* (b))

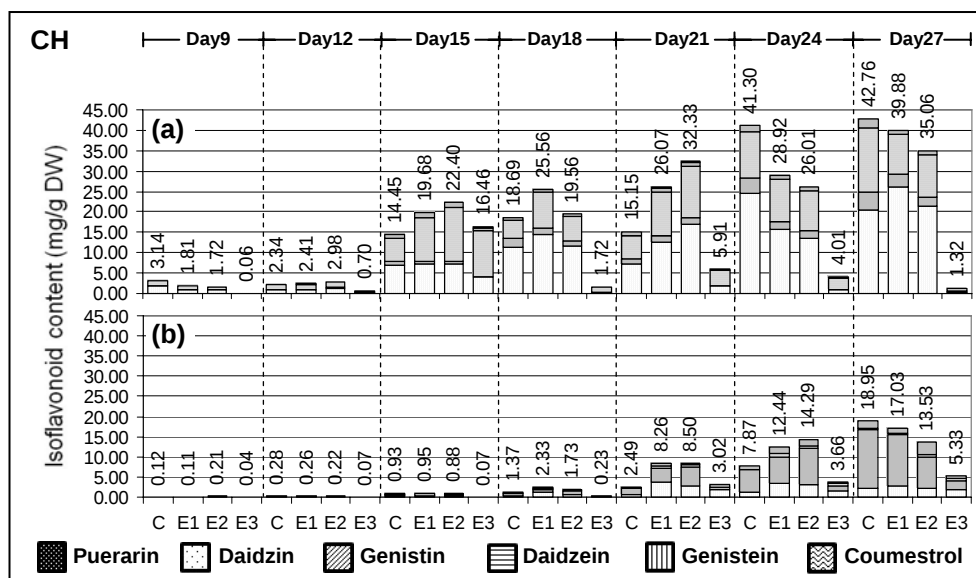


รูปที่ 25 สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกาวาเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a), *P. candollei* var. *candollei* (b)) หลังถูกกระตุ้นด้วย yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ (C = กลุ่มควบคุม, E1 = 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร, E2 = 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร, E3 = 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร) ในช่วงอายุของเซลล์ทุก 3 วัน

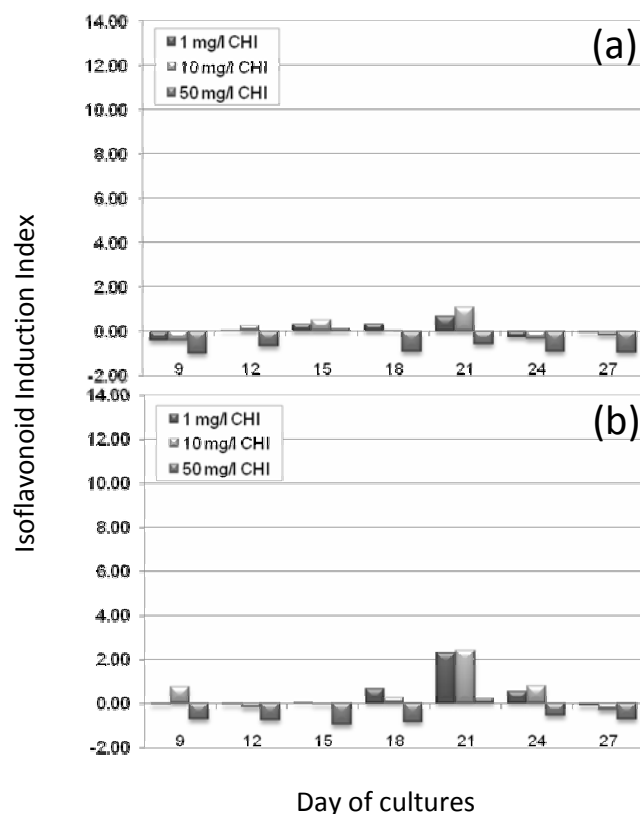
### Chitosan (CHI)

การใช้ chitosan ( $\beta$ -1,4-linked glucosamine) เพื่อกระตุ้นการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์ PM และ PC พบว่า chitosan ในความเข้มข้นสูงคือ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ลดการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ ในขณะที่ chitosan 1.0 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร เพิ่มการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ ในกาวเครือขาว ทั้งสองพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 26 พบว่าค่า II index สูงสุดในวันที่ 21 ของอายุเซลล์ PM และ PC เท่ากับ 1.13 และ 2.41 ตามลำดับ (รูปที่ 27) อย่างไรก็ตามหลังจากที่เซลล์ทั้งสองพันธุ์เข้าสู่ช่วงปลายของการเจริญเติบโต (stationary phase) พบว่าปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ในกลุ่มควบคุมมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติม chitosan ซึ่งมีบางงานวิจัยที่พบว่า chitosan แสดงฤทธิ์ที่ต่ำในการกระตุ้นสารเมื่อเทียบกับสารกระตุ้นอื่น<sup>49, 51</sup>

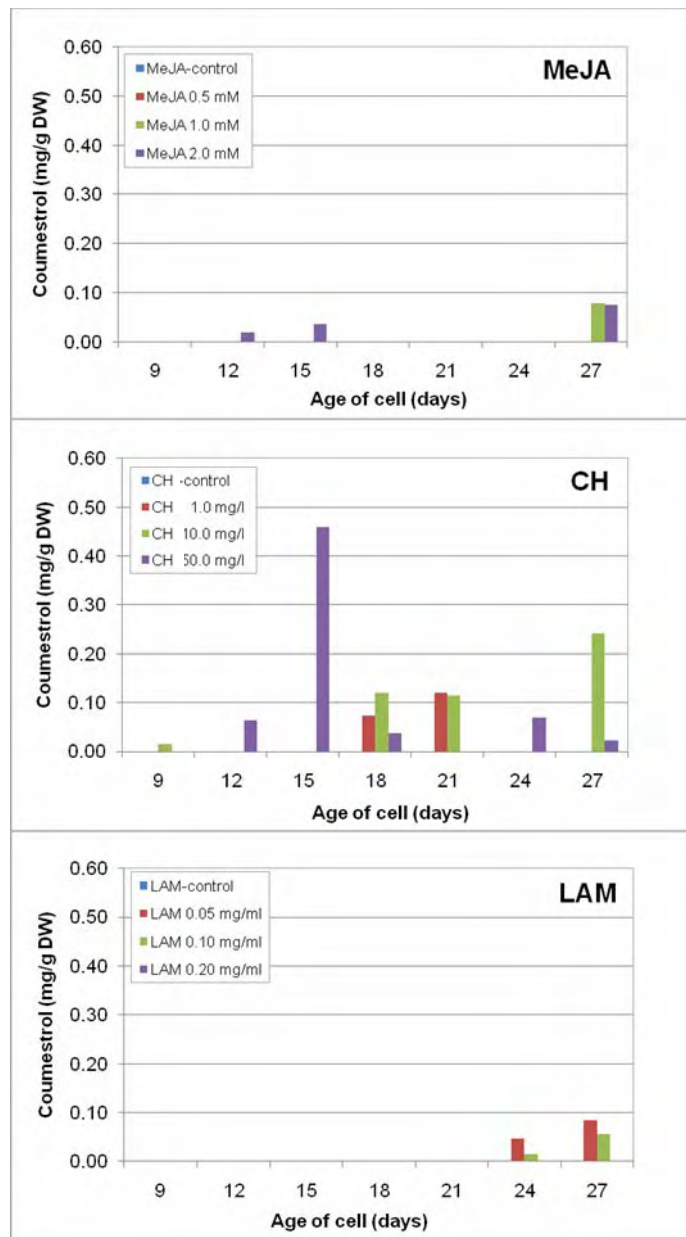
ในการศึกษานี้พบสาร coumestrol ในบางตัวอย่างของเซลล์ PM ซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วย chitosan ในความเข้มข้น 1.0, 10 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ดังรูปที่ 28 โดยเซลล์ PM อายุ 15 วันที่ถูกกระตุ้นด้วย chitosan เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร พบการสะสมของสาร coumestrol ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงคือ 0.46 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งได้กล่าวไปแล้วว่าเซลล์ที่ได้รับ chitosan ในขนาดสูงจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำซึ่งแสดงถึงเซลล์ที่เสื่อมลง ซึ่งการสะสมของสาร coumestrol อาจมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำของเซลล์ PM ที่ไวต่อการถูกกระตุ้นมากกว่าเซลล์ PC โดยทั่วไปแล้วการสร้างหรือการสะสมสารอาจเกี่ยวข้องกับความเครียดของเซลล์หรือความสามารถในการกระตุ้นของสารกระตุ้นแต่ละชนิด<sup>62</sup> มีรายงานการพบสาร coumestrol ในเซลล์รากของ PM ในธรรมชาติ<sup>6, 10, 63</sup> นอกจากนั้นมียางวิจัยพบว่า chitosan เพิ่มการสะสมสาร coumestrol ในรากเพาะเลี้ยงของ *Psoralea lachnostachys* ที่อายุมากกว่า (แสดงโดยมีสีน้ำตาล) ส่วนสาร daidzein จะสะสมในเนื้อเยื่อที่อายุน้อยกว่าแทน<sup>19</sup> ดังนั้นการสะสมของสาร coumestrol ในเซลล์ PM นี้ อาจสัมพันธ์กับการเสื่อมของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยความเครียดเมื่อได้รับ chitosan ในการวิจัยนี้



รูปที่ 26 สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a), *P. candollei* var. *candollei* (b)) หลังถูกกระตุ้นด้วย chitosan ที่ความเข้มข้นต่างๆ (C = กลุ่มควบคุม, E1 = 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร, E2 = 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร, E3 = 50.0 มิลลิกรัม/ลิตร) ในช่วงอายุของเซลล์ทุก 3 วัน



รูปที่ 27 Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย chitosan ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a) และ *P. candollei* var. *candollei* (b))

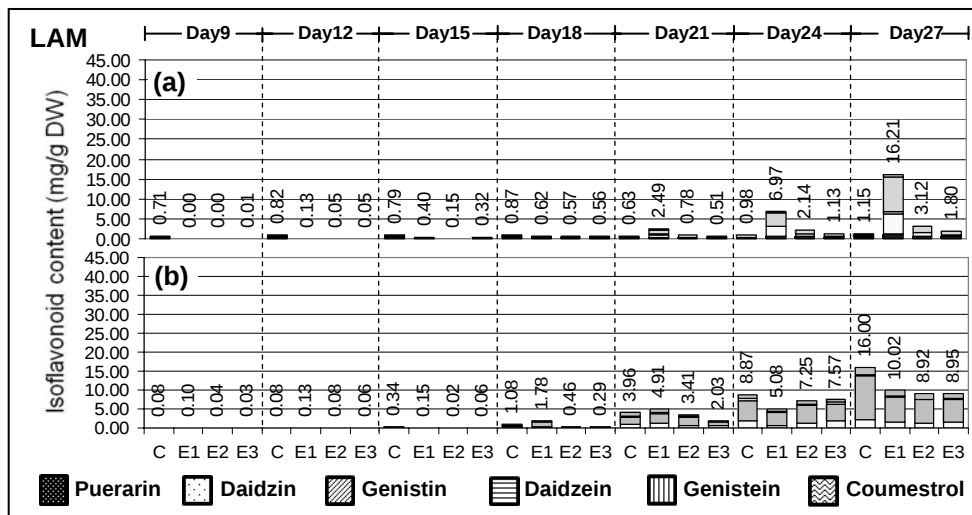


**รูปที่ 28** การสะสมของ coumestrol ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *P. candollei* var. *mirifica* เมื่อถูกกระตุ้นด้วย MeJA, chitosan และ LAM ที่ความเข้มข้นต่างๆ

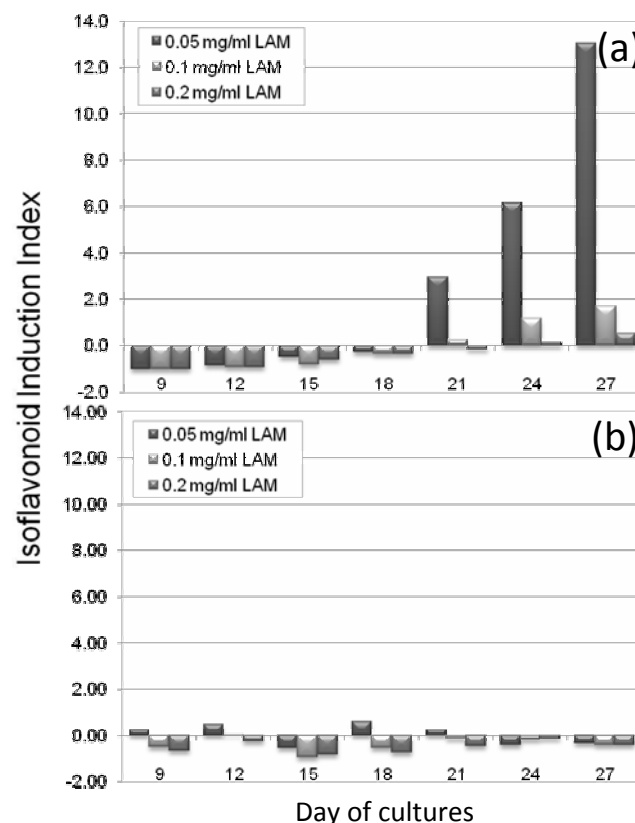
### Laminarin (LAM)

พบว่า LAM ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กระตุ้นการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย PM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.05$ ) เมื่อเซลล์เริ่มมีอายุ 21 วัน (รูปที่ 29) และการเติม LAM 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยังช่วยกระตุ้นค่า II index ในเซลล์ PM ให้สูงถึง 13.06 ในวันที่ 27 ของอายุเซลล์ (รูปที่ 30) ซึ่ง LAM ทั้ง 3 ความเข้มข้นทำให้เซลล์ PM เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำเหมือนลักษณะเดียวกับการใช้ chitosan ถึงแม้ว่าเซลล์จะสามารถโตขึ้นได้ใหม่ตั้งแต่วันที่ 18 ของอายุเซลล์ แต่ในภาพรวมเซลล์ยังถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่เติมสารกระตุ้นจนถึงในช่วง stationary phase อาจเกิดจากการที่สาร phytoalexin ถูกสังเคราะห์หลังจากที่เซลล์ได้รับความเครียดจากสารกระตุ้น ซึ่งสารกระตุ้นบางชนิดจะกีดขวางการสร้างสารปฐมภูมิที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของเซลล์แต่เร่งการสร้างสารทุติยภูมิแทนซึ่งทำให้เซลล์เติบโตลดลง<sup>48</sup> พบผลในรูปแบบเดียวกันนี้คือมีการสะสมสารเพิ่มขึ้นในขณะที่การเจริญเติบโตของเซลล์พีซลดลง โดยพบในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของยอป่า (*Morinda elliptica*)<sup>48</sup> วานิลลา (*Vanilla planifolia*)<sup>60</sup> และ *Salvia miltiorrhiza*<sup>64</sup> เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น ส่วนเซลล์ PC พบว่าการที่เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ PC ตอบสนองต่อสารกระตุ้นได้ไม่ดีเท่าเซลล์ PM ซึ่งสาร LAM ในทุกความเข้มข้นไม่ทำให้เซลล์ PC เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำจึงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ PC อย่างไรก็ดี LAM แสดงฤทธิ์ยับยั้งการสะสมในเซลล์ PC หลังจากวันที่ 24 ของอายุเซลล์ ซึ่งไม่เหมือนกับเซลล์ PM มีงานวิจัยพบว่า LAM ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลดการสร้างสาร resveratrol ในรากเพาะเลี้ยงของถั่วลิสง<sup>65</sup>

ในการวิจัยนี้พบว่าสาร LAM ช่วยกระตุ้นการสะสมสาร puerarin ซึ่งไม่พบในกลุ่มควบคุมของกาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์ ในเซลล์ PM ตั้งแต่วันที่ 12 หลังจากเติมสารกระตุ้น (ตารางที่ 10) ซึ่งการพบสาร puerarin นี้สังเกตได้ว่าพบร่วมกับการที่สาร genistin และสาร genistein มีการสะสมลดลงหรือหายไป (รูปที่ 29) ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการสังเคราะห์สาร puerarin ซึ่งเป็น C-glucoside ของสาร daidzein อย่างไรก็ดีข้อมูลวิถีชีวสังเคราะห์ของสาร puerarin ยังมีจำกัดมาก<sup>66, 67</sup> ดังนั้นสาร LAM อาจสามารถใช้เป็นสารกระตุ้นในการศึกษาการแสดงออกของยีนบางตัวที่มีผลต่อการสังเคราะห์สาร puerarin โดยเฉพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวเครือขาว นอกจากนั้น LAM ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยังสามารถกระตุ้นให้มีการสะสมสาร coumestrol (น้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง) ในบางตัวอย่างของเซลล์ PM เมื่อเซลล์อายุ 24 วันขึ้นไปหรือเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase (รูปที่ 28)



รูปที่ 29 สารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a), *P. candollei* var. *candollei* (b)) หลังถูกกระตุ้นด้วย laminarin ที่ความเข้มข้นต่างๆ (C = กลุ่มควบคุม, E1 = 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, E2 = 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, E3 = 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในช่วงอายุของเซลล์ทุก 3 วัน



รูปที่ 30 Isoflavonoid induction index ต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ของการกระตุ้นด้วย laminarin ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *mirifica* (a) และ *P. candollei* var. *candollei* (b))

ตาราง 10 ค่าเฉลี่ยการสะสมสาร puerarin ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย *P. candollei* var. *mirifica* หลังจากถูกกระตุ้นด้วย laminarin (LAM)\*

| ความเข้มข้น<br>LAM (มิลลิกรัม/<br>มิลลิลิตร) | ปริมาณ puerarin เฉลี่ย (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) หลังการเติม LAM ที่วัน<br>ต่าง ๆ* |    |    |               |               |               |               |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----|----|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                              | 3                                                                                    | 6  | 9  | 12            | 15            | 18            | 21            |
| 0.00                                         | ND**                                                                                 | ND | ND | ND            | ND            | ND            | ND            |
| 0.05                                         | ND                                                                                   | ND | ND | 0.2244±0.0115 | 0.3940±0.0620 | 0.6890±0.4597 | 1.3808±0.4133 |
| 0.10                                         | ND                                                                                   | ND | ND | 0.2789±0.0351 | 0.2345±0.0560 | 0.5325±0.1562 | 0.7657±0.1662 |
| 0.20                                         | ND                                                                                   | ND | ND | 0.3107±0.0433 | 0.1990±0.0175 | 0.2562±0.0249 | 0.5338±0.0346 |

\* LAM ในทุกความเข้มข้นถูกเติมเมื่อเซลล์มีอายุ 6 วัน; \*\*ND = not determined

โดยสรุปผลการวิจัยในบทนี้พบว่า methyl jasmonate แสดงฤทธิ์ที่เด่นในการกระตุ้นการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นทราบแล้วว่าสาร methyl jasmonate เกี่ยวข้องโดยตรงกับ jasmonate signaling และวิถีชีวสังเคราะห์ของสาร oxylipin ในขณะที่สารกระตุ้นที่เป็นสารชีวภาพ (biotic elicitors) จะมีความซับซ้อนต่อการตอบสนองความเครียดของเซลล์พืช หลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย methyl jasmonate 2.0 ไมโครโมลาร์ พบว่าเซลล์ PM มีการสะสมไอโซฟลาโวนอยด์ สูงสุดเท่ากับ 40.49 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ในวันที่ 27 ของอายุเซลล์ โดยพบว่ามากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย *P. tuberosa*<sup>68</sup>

พบว่าไม่มีสารกระตุ้นใดที่ศึกษา แสดงฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์ นอกจากนั้น chitosan และ laminarin ความเข้มข้นสูงยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์กวาวเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *mirifica* ที่แสดงการตอบสนองต่อสารกระตุ้นมากกว่าพันธุ์ *P. candollei* var. *candollei*

การศึกษานี้พบว่า MeJA ในความเข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์ สามารถใช้เป็นตัวกระตุ้นให้มีการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงแขวนลอยรากกวาวเครือขาว แทนการสกัดจากรากในธรรมชาติซึ่งอาจไม่เพียงพอในอนาคต นอกจากนั้นปริมาณของสารไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ เช่น daidzin และ genistin ซึ่งพบว่ามีสะสมเพิ่มขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์อย่างรวดเร็วในวันที่ 27 ของอายุเซลล์ โดยในช่วงวันดังกล่าวเซลล์เพิ่มปริมาณจาก 16.5±2.8 มิลลิกรัม เป็น 488.22±30.31 มิลลิกรัม ในเซลล์กวาวเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *mirifica* และจากน้ำหนักเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย 7±1.8 มิลลิกรัม เป็น 345±17.56 มิลลิกรัม ในเซลล์กวาวเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *candollei* ซึ่งการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเซลล์ในช่วงเวลาเพียง 27 วันนี้ เหมาะกับการใช้เป็นแหล่งในการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งรากจากธรรมชาติของ *P. candollei* ต้องการเวลาในการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์มากกว่ามาก นอกจากนั้นเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย MeJA ยังสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูงมากกว่าในรากธรรมชาติมาก (ตารางที่ 7)

# บทที่ 6

## การชักนำรากเพาะเลียงของกาวเครือขาว และการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์

รากเพาะเลียง (hairy root culture) เป็นเทคนิคในการกระตุ้นให้พืชสร้างรากจำนวนมากโดยการถ่ายยีน (transform) ของเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* ที่กระตุ้นให้เซลล์พืชเจริญไปเป็นรากจำนวนมาก การวิจัยในบทนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากเพาะเลียงของกาวเครือขาวทั้ง 2 พันธุ์ (*P. candollei* var. *candollei* และ *P. candollei* var. *mirifica*) ศึกษาการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของรากเพาะเลียงกาวเครือขาว และผลของแสงต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในรากเพาะเลียงของ *P. candollei* var. *candollei*

### ระเบียบวิธีวิจัย

#### การชักนำให้เกิดรากเพาะเลียง (Hairy root culture) ของกาวเครือขาว

วัสดุพืชใช้ต้นกล้าอายุ 7 วันของกาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei* และ *P. candollei* var. *mirifica*) ในสภาพปลอดเชื้อ สำหรับแบคทีเรียใช้ *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 และ *A. rhizogenes* ATCC 43057

อาหารเพาะเลียงพืชใช้ MS<sup>24</sup> ที่เติม 3% Sucrose และ 0.55% Agargel<sup>®</sup> สำหรับอาหารเลี้ยงแบคทีเรียใช้ yeast manitol broth (YMB) media<sup>69</sup>

#### 1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำเมล็ดกาวเครือขาวทั้ง 2 พันธุ์ แช่และเขย่าใน Funguran<sup>®</sup> (1 กรัม/ลิตร) เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นแช่เมล็ดกาวเครือขาวในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2% ที่ผสม Tween80<sup>®</sup> เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นตัดเปลือกหุ้มเมล็ดออก และวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS

## 2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *A. rhizogenes* ATCC 15834 และ ATCC 43057 และการพัฒนาสภาวะชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยง

นำเชื้อ *A. rhizogenes* ทั้งสองสายพันธุ์ จากที่เก็บไว้ที่  $-80^{\circ}\text{C}$  มาเลี้ยงในอาหาร YMB ที่มี acetosyringone 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  ในสภาพมืด

นำต้นกล้ากวาวเครือขาวทั้ง 2 พันธุ์ที่มีอายุ 7 วันในสภาพปลอดเชื้อ มาแบ่งเป็น 4 ส่วน ได้แก่ ใบ (leaves) ใบเลี้ยง (cotyledons) เอพิคอติล (epicotyls) และ ไฮโปคอติล (hypocotyls) ดังแสดงในตารางที่ 11 จากนั้นนำไปแช่ใน suspension ของเชื้อ *A. rhizogenes* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เขย่านาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและซับด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ทำการย้าย ใบ ใบเลี้ยง เอพิคอติล และ ไฮโปคอติล ที่ไม่ผ่านการ inoculation ด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* (ชุดควบคุม) และชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการ inoculation ด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* ทั้ง 2 สายพันธุ์ (ชุดการทดลอง) ลงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี acetosyringone ที่ความเข้มข้น 0, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  ในสภาพมืด

ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารสูตร MS ใหม่ที่มียาปฏิชีวนะ cefotaxime 500 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อกำจัดเชื้อส่วนเกิน เมื่อรากเจริญเป็นเวลา 2-3 อาทิตย์ จึงย้ายรากลงในอาหาร Gamborg's B5<sup>70</sup> ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ

หลังจากวางเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์ ทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลชีพ และหลังจากเริ่มวางเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ วัดผลการเกิดราก และทำการย้ายรากที่ได้ลงอาหารใหม่ทุกๆ 2-3 สัปดาห์

### การตรวจสอบยีนของแบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* ในรากเพาะเลี้ยงของกวาวเครือขาว ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

นำรากเพาะเลี้ยงของกวาวเครือขาวที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวสูตร Gamborg's B5 มาสกัดด้วยชุดสกัด DNA (Qiagen®) และนำ DNA ที่ได้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องมือ Nanodrop spectroscopy จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาใช้เป็นแม่แบบ (template) ในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจหายีน *rolB* และ *rolC* โดยใช้ DNA จาก *A. rhizogenes* เป็นชุดควบคุม และใช้ primer 2 คู่ คือ *rolB*-1 (5'-GCTCTTGCAAGTCTAGATTT-3'); *rolB*-2 (5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3') และ *rolC*-1 (5'-CTCCTGACATCAAACCTCGTC-3'); *rolC*-2 (5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3')<sup>71</sup>

ทำปฏิกิริยา PCR ที่ 25 ไมโครลิตร โดยส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย GoTaq® Green Master Mix 12.5 ไมโครลิตร; คู่ primer ของยีน *rolB* หรือ *rolC* ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ และแม่แบบ DNA 5 ไมโครลิตร โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

|                      | เวลา (วินาที) | อุณหภูมิ (°C) |
|----------------------|---------------|---------------|
| Initial denaturation | 120           | 95            |
| 30 cycles of         |               |               |
| Denaturation         | 30            | 95            |
| Annealing            | 45            | 53.5          |
| Extension            | 45            | 72            |
| Final extension      | 360           | 72            |

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ มาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน 0.5X Tris-boric-EDTA buffer และนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนจะนำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ 260 นาโนเมตร

### การสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์จากรากพะเล้งของกวาวเครือขาว

นำรากพะเล้ง 4 line จาก *P. candollei* var. *candollei* และ 3 line จาก *P. candollei* var. *mirifica* ไปสกัดด้วย methanol และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีที่ได้กำหนดขึ้นในบทที่ 3 โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 6 ชนิดคือ coumestrol puerarin daidzein daidzin genistein และ genistin

### การศึกษาผลของแสงต่อการผลิตสารในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของรากพะเล้งของกวาวเครือขาว

ซึ่งรากพะเล้งของกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei*) line C6 ปริมาณ 0.1 กรัม พะเล้งใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml ที่มีอาหารเหลวสูตร Gamborg's B5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วางพะเล้งภายใต้สภาวะมืดและสภาวะที่ได้รับแสงที่ความเข้มแสง  $37.5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 110 รอบ/นาที ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำๆ ละ 1 flask เก็บผลการทดลองที่ 7, 14 และ 28 วัน โดยบันทึกน้ำหนักสด (กรัม) น้ำหนักแห้ง (กรัม) และวิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง) ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีที่ได้กำหนดขึ้นในบทที่ 3

## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

ตารางที่ 11 แสดงการตอบสนองต่อสภาวะการชักนำให้เกิดรากพะเลียงของกาวเครือขาว แสดงผลของสายพันธุ์ของเชื้อและปริมาณ acetosyringone

ตารางที่ 11 การตอบสนองต่อสภาวะการชักนำให้เกิดรากพะเลียงของกาวเครือขาว

| พันธุ์                                    | ชิ้นส่วน  | %การตอบสนอง              |                       |                       |                       | MS<br>(ชุดควบคุม) |
|-------------------------------------------|-----------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
|                                           |           | ATCC 15834*              |                       | ATCC 43057**          |                       |                   |
|                                           |           | AS***<br>100 ไมโครโมลาร์ | AS<br>200 ไมโครโมลาร์ | AS<br>100 ไมโครโมลาร์ | AS<br>200 ไมโครโมลาร์ |                   |
| <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> | ใบ        | 16.67                    | 0                     | 58.33                 | 0                     | 0                 |
|                                           | ใบเลี้ยง  | 50.00                    | 0                     | 8.33                  | 0                     | 16.67             |
|                                           | เอปิคอทิล | 41.67                    | 0                     | 50.00                 | 16.67                 | 0                 |
|                                           | ไฮโปคอทิล | 16.67                    | 0                     | 8.33                  | 0                     | 0                 |
| <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>  | ใบ        | 50.00                    | 0                     | 25.00                 | 0                     | 16.67             |
|                                           | ใบเลี้ยง  | 16.67                    | 0                     | 50.00                 | 16.67                 | 0                 |
|                                           | เอปิคอทิล | 33.33                    | 0                     | 25.00                 | 16.67                 | 0                 |
|                                           | ไฮโปคอทิล | 16.67                    | 0                     | 0                     | 16.67                 | 0                 |

\* *A. rhizogenes* American type culture collection number 15834

\*\* *A. rhizogenes* American type culture collection number 43057

\*\*\* Acetosyringone

ผลการวิจัยพบว่าต้นกล้ากาวเครือขาว *P. candollei* var. *candollei* (รูปที่ 31) เมื่อ inoculation ด้วย *A. rhizogenes* ATCC 15834 และวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ มีการตอบสนองดีที่สุดชิ้นส่วนใบเลียง 50% รองลงมาคือชิ้นส่วนเอปิคอทิล 41.67% ในขณะที่ชิ้นส่วนใบและไฮโปคอทิล มีการตอบสนองเท่ากันคือ 16.67% ในทางตรงกันข้ามพบว่าต้นกล้ากาวเครือขาวที่วางเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ ไม่มีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดรากพะเลียง

เมื่อ inoculation ต้นกล้ากาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei*) ด้วย *A. rhizogenes* ATCC 43057 และวางเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ มีการตอบสนองได้ดีที่สุดในชิ้นส่วนใบ 58.33% รองลงมาคือ ชิ้นส่วนเอปิคอทิล 50% ในขณะที่ชิ้นส่วนใบเลียงและไฮโปคอทิล มีการตอบสนองเท่ากันคือ 8.33% และเมื่อวางเลี้ยงใน MS ที่มี acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีเพียงชิ้นส่วนเอปิคอทิลเท่านั้นที่มีการตอบสนอง 16.67%

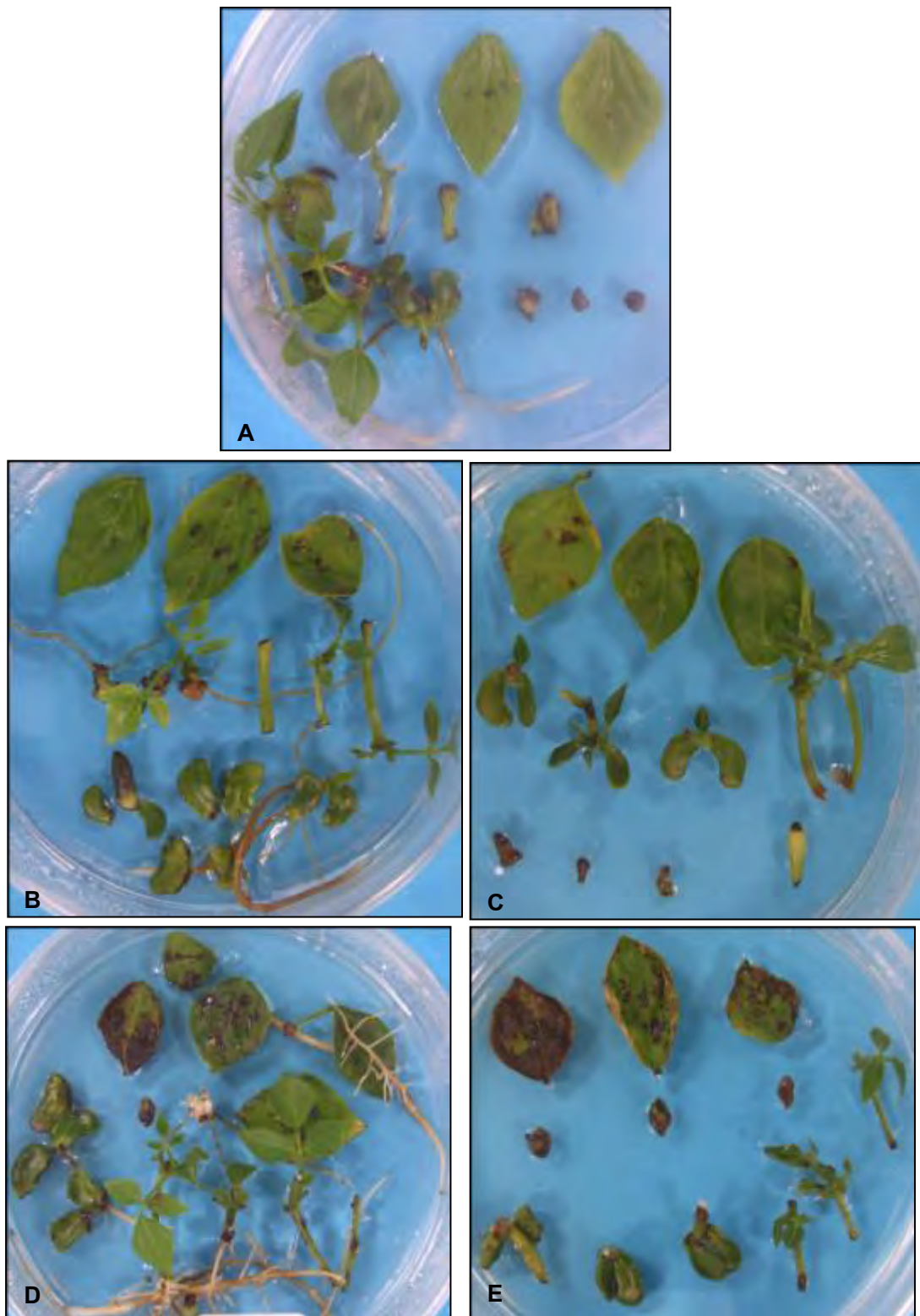
ในชุดควบคุม พบว่าชิ้นส่วนใบเลียงของ *P. candollei* var. *candollei* มีการตอบสนอง 16.67% เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่มี acetosyringone ในขณะที่ชิ้นส่วนอื่นไม่มีการตอบสนอง

สำหรับผลการตอบสนองต่อการชักนำรากพาะเลี้ยงในต้นกล้ากวาวเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *mirifica* เมื่อ inoculation ด้วย *A. rhizogenes* ATCC 15834 และวางเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ มีการตอบสนองดีที่สุดที่สุดในชิ้นส่วนใบ 50% รองลงมาคือเอปิคอติล 33.33% ในขณะที่ใบเลี้ยงและไฮโปคอติลมีการตอบสนองเท่ากันคือ 16.67% ซึ่งแตกต่างจากต้นกล้ากวาวเครือขาวที่วางเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ ที่ไม่พบการตอบสนองต่อสภาวะการชักนำให้เกิดรากพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับใน *P. candollei* var. *candollei*

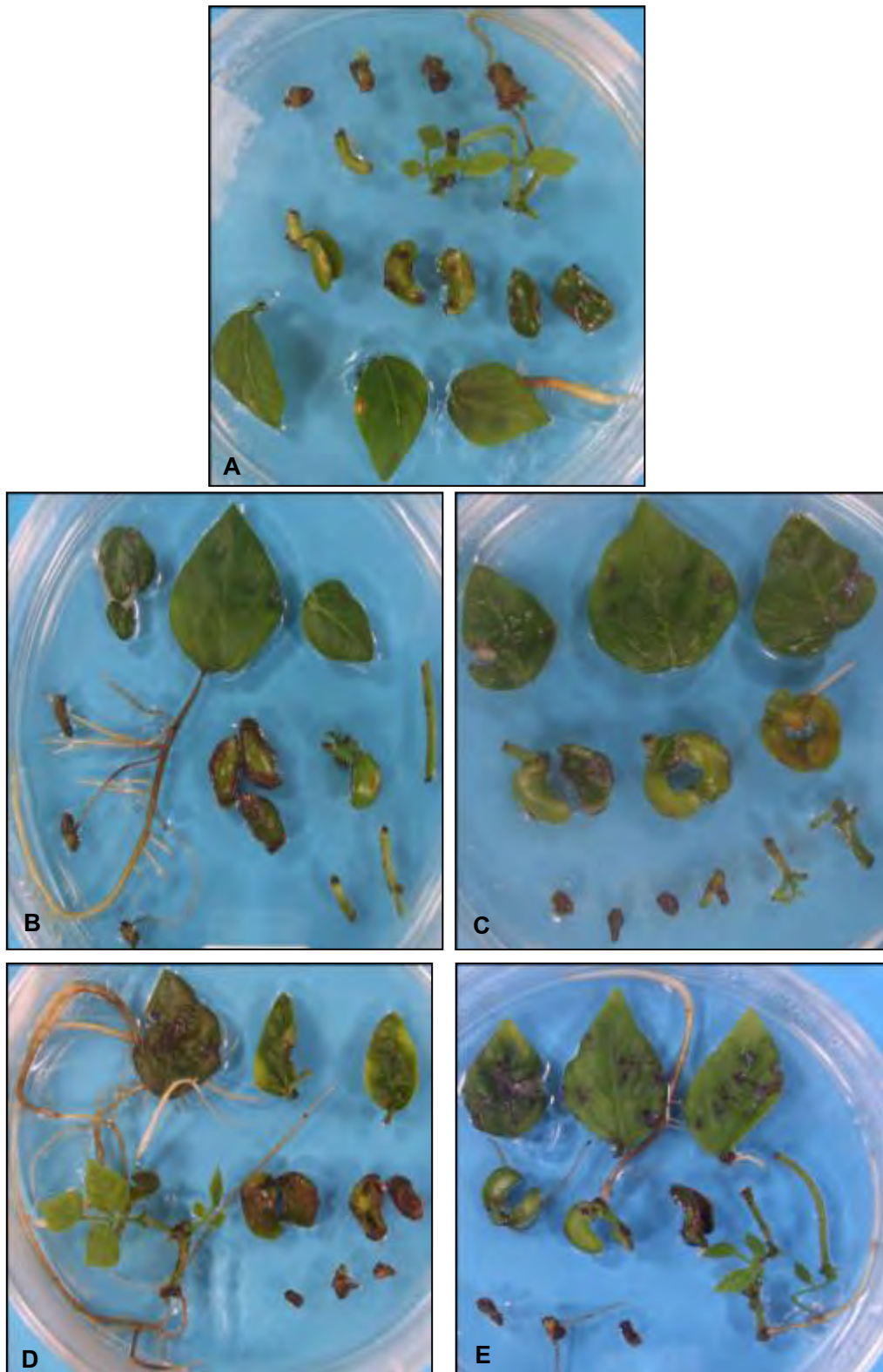
ต้นกล้ากวาวเครือขาว *P. candollei* var. *mirifica* (รูปที่ 32) เมื่อ inoculation ด้วย *A. rhizogenes* ATCC 43057 ที่วางเลี้ยงในอาหารที่มี acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ มีการตอบสนองได้ดีที่สุดในชิ้นส่วนที่เป็นใบเลี้ยง 50% รองลงมาคือ ใบและเอปิคอติลตอบสนอง 25% เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ใบเลี้ยง เอปิคอติล และไฮโปคอติล ที่ถูกชักนำด้วย *A. rhizogenes* ATCC 43057 และวางเลี้ยงในอาหารที่มี acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ มีการตอบสนองเท่ากันคือ 16.67% ในขณะที่ชิ้นส่วนใบไม่มีการตอบสนอง

ในชุดควบคุม พบว่าชิ้นส่วนใบของ *P. candollei* var. *mirifica* มีการตอบสนอง 16.67% เมื่อทำการวางเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่มี acetosyringone ในขณะที่ชิ้นส่วนอื่นไม่มีการตอบสนอง

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนพืชแต่ละชนิด มีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดรากพาะเลี้ยงแตกต่างกันไป โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยใน *Brassica oleracea* และ *B. campestris* ซึ่งทั้งพันธุ์และชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้มีผลต่ออัตราการเกิดรากพาะเลี้ยง<sup>72</sup> acetosyringone ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งอัตราการเกิดรากพาะเลี้ยง โดยอาจมีสาเหตุมาจากการที่ acetosyringone นั้นเป็นสารกลุ่ม phenolic ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ได้<sup>73</sup> ดังนั้นการที่มี acetosyringone มากเกินไป อาจทำให้เนื้อเยื่อพืชตายได้



รูปที่ 31 กวาวเครือขาว *P. candollei* var. *candollei* ที่วางเลี้ยงในอาหาร MS (A) กวาวเครือขาวที่ถูกชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงด้วย *A. rhizogenes* ATCC 15834 และวางเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี Acetosyringone เข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (B และ C) กวาวเครือขาวที่ถูกชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงด้วย *A. rhizogenes* ATCC 43057 และวางเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี Acetosyringone เข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (D และ E)



รูปที่ 32 กวาวเครือขาว *P. candollei* var. *mirifica* ที่วางเลี้ยงในอาหาร MS (A) กวาวเครือขาวที่ถูกชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงด้วย *A. rhizogenes* ATCC 15834 และวางเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี Acetosyringone เข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (B และ C) กวาวเครือขาวที่ถูกชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงด้วย *A. rhizogenes* ATCC 43057 และวางเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี Acetosyringone เข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (D และ E)

**การตรวจสอบยีนของแบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* ในรากเพาะเลี้ยงของกาวเครือขาวด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)**

เมื่อทำการย้ายเลี้ยงรากเพาะเลี้ยงกาวเครือขาว ที่ได้จากการชักนำด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* ลงในอาหารสูตร Gamborg's B5 ในระยะหนึ่ง พบว่าหลังจากย้ายเลี้ยง 5-6 ครั้ง (ทุก 2 สัปดาห์) รากเพาะเลี้ยงที่ยังเจริญเติบโตและมีชีวิตอยู่ มีจำนวนทั้งหมด 11 line โดย 6 line ได้มาจาก *P. candollei* var. *candollei* (C1-C6) และ อีก 5 line ได้มาจาก *P. candollei* var. *mirifica* (M1-M6) (ตารางที่ 12)

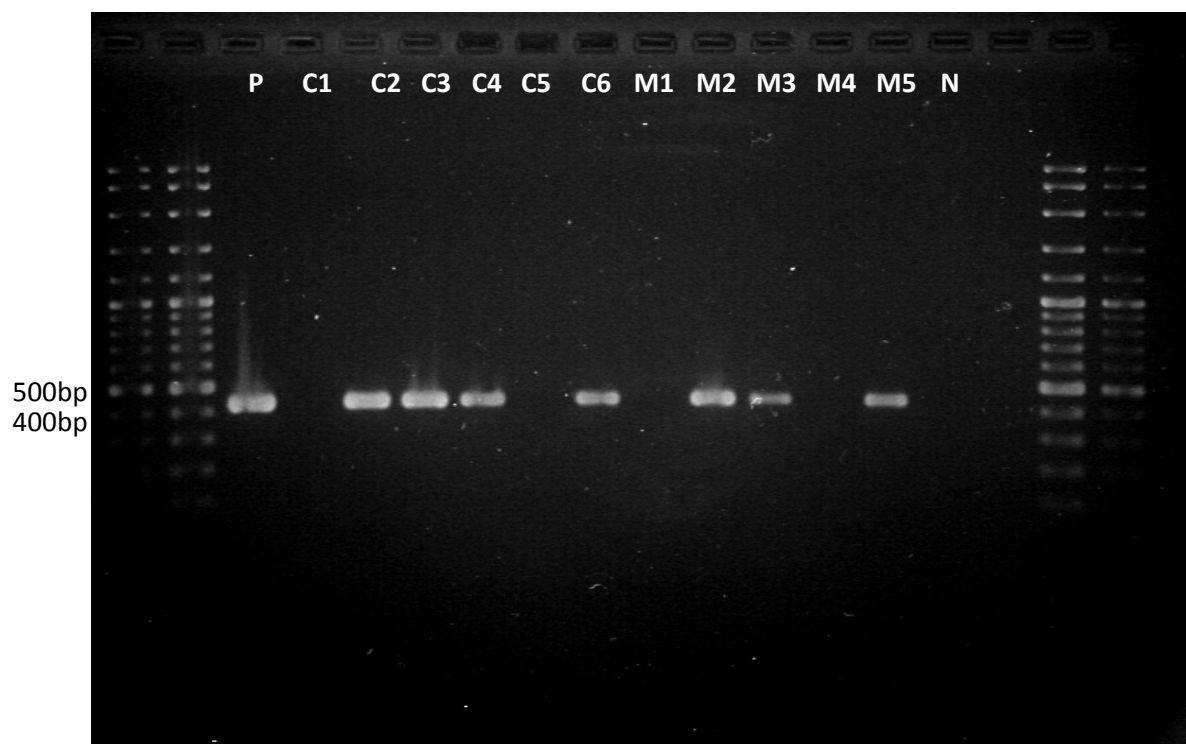
เมื่อนำ DNA ที่ได้จากการสกัดไปวัดความเข้มข้นโดยใช้วิธี spectroscopy พบว่า มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 3.97 ถึง 74.16 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และจากการนำ DNA ที่สกัดได้ไปตรวจหายีน *rolB* และ *rolC* ด้วยวิธี PCR พบว่ามีรากของ *P. candollei* var. *candollei* 4 line จากทั้งหมด 6 line ที่พบทั้งยีน *rolB* และ *rolC* ส่วน *P. candollei* var. *mirifica* มีรากที่มีการถ่ายยีนสำเร็จ 3 line จากทั้งหมด 5 line (รูปที่ 33, 34) ทั้งนี้การที่รากเพาะเลี้ยงมียีน *rolB* และ *rolC* อยู่ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า รากเพาะเลี้ยง line ดังกล่าวเป็นรากที่ผ่านการเหนี่ยวนำ โดย *A. rhizogenes* รูปที่ 35 แสดงรากเพาะเลี้ยงของ *P. candollei* ทั้งสองพันธุ์

**ตารางที่ 12** สภาวะการชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงโดยใช้ *A. rhizogenes*

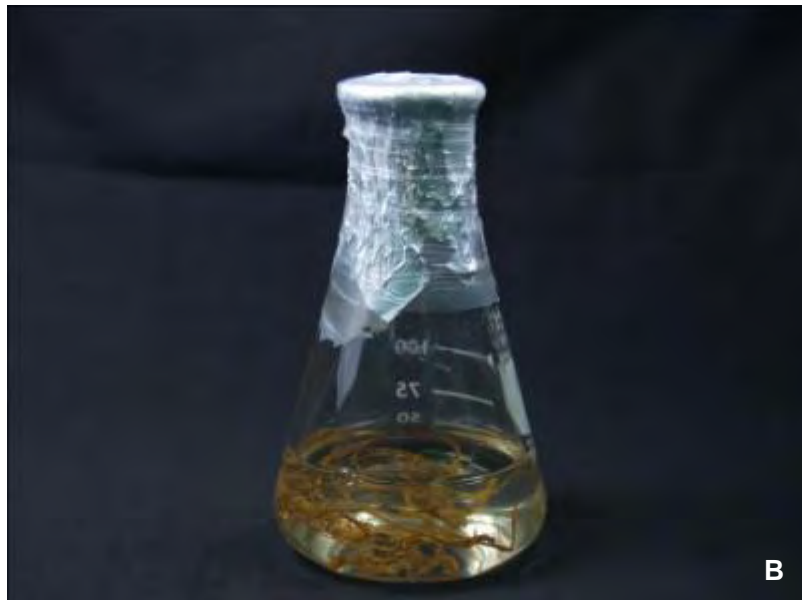
| <i>P. candollei</i><br>varieties             | <i>A. rhizogenes</i><br>ATCC No. | ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น<br>(explants) | Acetosyringone<br>(ไมโครโมลาร์) | Root lines |
|----------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|------------|
| <i>P. candollei</i> var.<br><i>candollei</i> | 43057                            | ไฮโปคอติล                         | 100                             | C1         |
|                                              | 43057                            | ใบ                                | 100                             | C2         |
|                                              | 43057                            | เอปิคอติล                         | 100                             | C3         |
|                                              | 43057                            | ใบเลี้ยง                          | 100                             | C4         |
|                                              | 15834                            | เอปิคอติล                         | 100                             | C5         |
|                                              | 15834                            | ใบเลี้ยง                          | 100                             | C6         |
| <i>P. candollei</i> var.<br><i>mirifica</i>  | 43057                            | เอปิคอติล                         | 100                             | M1         |
|                                              | 43057                            | ใบ                                | 100                             | M2         |
|                                              | 15834                            | เอปิคอติล                         | 100                             | M3         |
|                                              | 15834                            | ใบ                                | 100                             | M4         |
|                                              | 15834                            | ใบเลี้ยง                          | 100                             | M5         |



รูปที่ 33 ผลของการตรวจสอบยีน *rolB* ในรากพะยะเลี้ยงของ *P. candollei* var. *candollei* (C1-C6) และ *P. candollei* var. *mirifica* (M1-M5) ด้วยวิธี PCR โดย P คือ positive control จากแบคทีเรีย (650 bp) และ N คือ negative control ที่ใช้น้ำกลั่นแทน DNA แม่แบบ



รูปที่ 34 ผลของการตรวจสอบยีน *rolC* ในรากพะเลียงของ *P. candollei* var. *candollei* (C1-C6) และ *P. candollei* var. *mirifica* (M1-M5) ด้วยวิธี PCR โดย P คือ positive control จากแบคทีเรีย (450 bp) และ N คือ negative control ที่ใช้น้ำกลั่นแทน DNA แม่แบบ

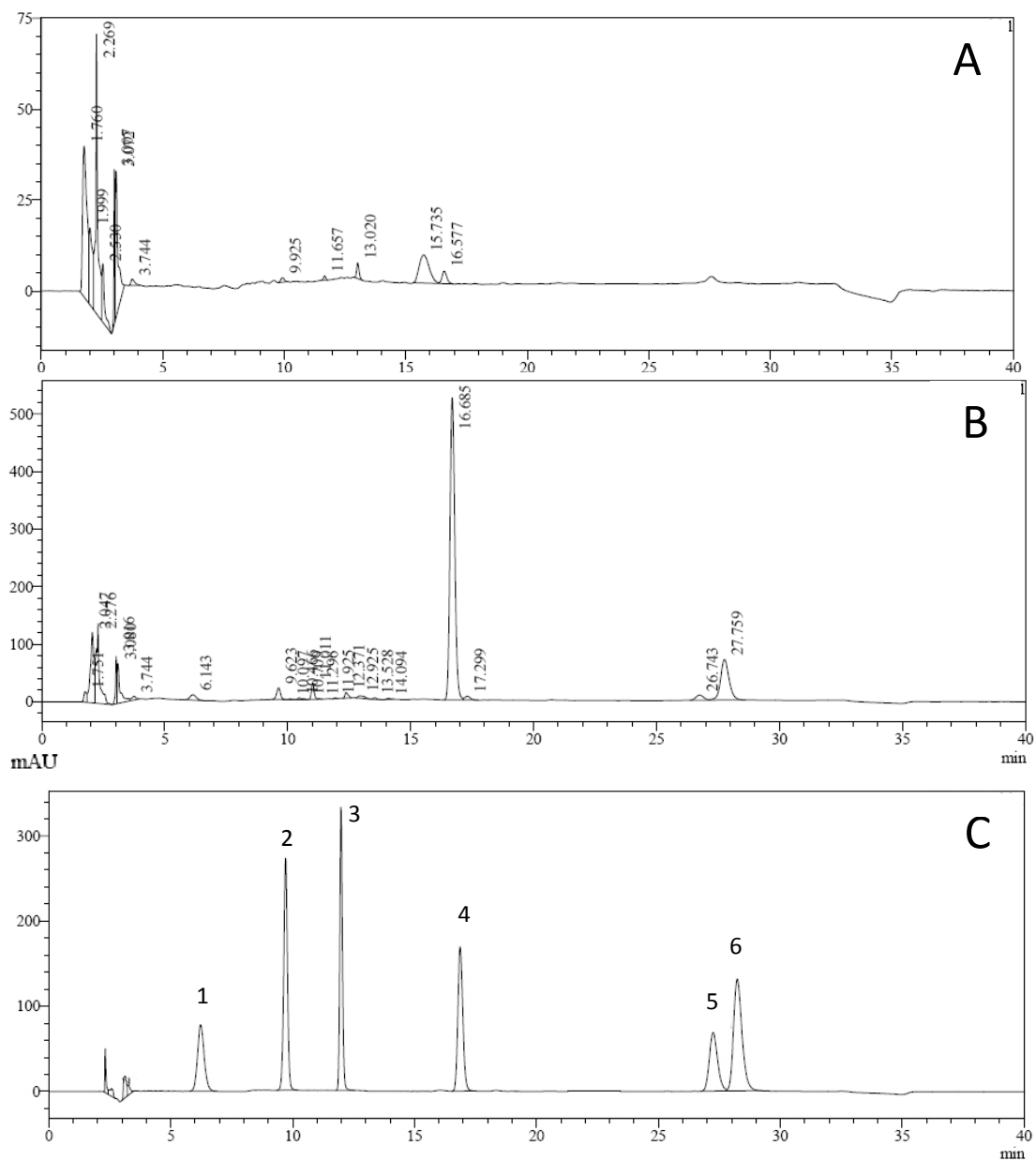


รูปที่ 35 รากพะยะเลี้ยงของ *P. candollei* var. *candollei* (A) และ *P. candollei* var. *mirifica* (B)

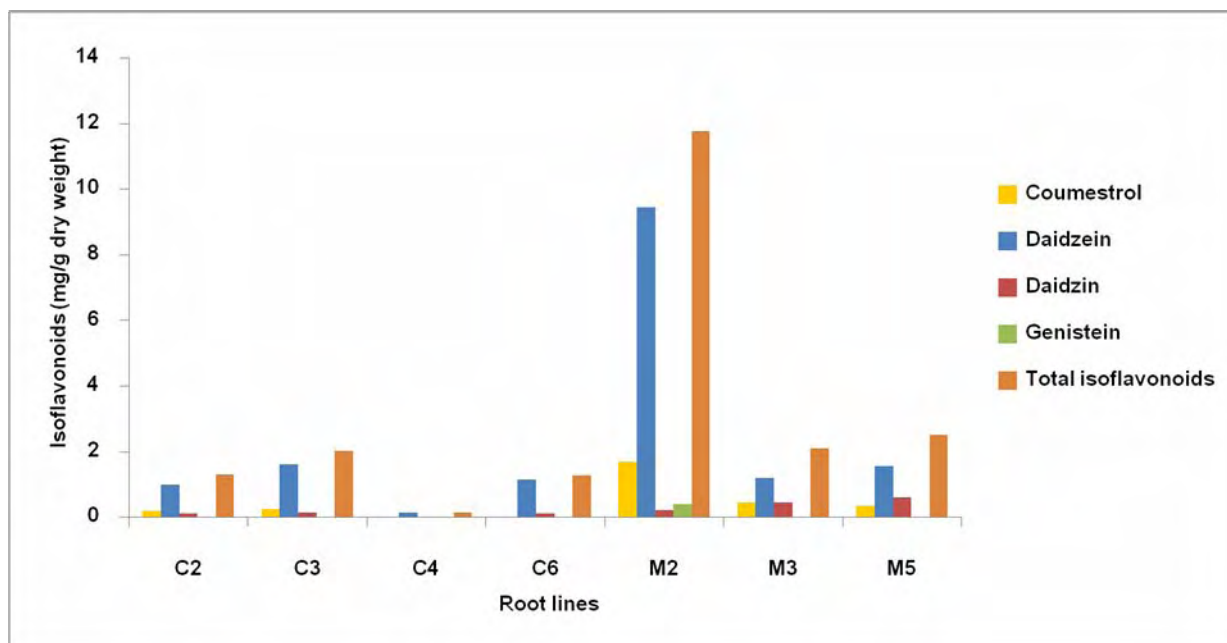
### การสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ จากรากพะเล้งของกวาวเครือขาว

รูปที่ 36 แสดง HPLC chromatogram ของรากพะเล้งกวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์ จากการวิจัยพบว่า รากพะเล้งของ *P. candollei* var. *candollei* ทั้งหมด 4 line (C2, C3, C4 และ C6) ทุก line มีการสะสมสาร daidzein daidzin และ coumestrol แต่ไม่มีการสะสมสาร genistin, genistein และ puerarin ทั้งนี้รากพะเล้ง line C2 มีการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดคือ 1.31 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง (รูปที่ 37)

ในรากพะเล้งของ *P. candollei* var. *mirifica* ทั้งหมด 3 line (M2, M3 และ M5) มีการสะสมสาร daidzein, daidzin และ coumestrol ในทุก line และพบสาร genistein เฉพาะ line M2 แต่ไม่พบสาร puerarin และ genistin ในทุก line โดยรากพะเล้ง line M2 มีการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดคือ 11.77 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง (รูปที่ 37)



รูปที่ 36 HPLC chromatogram ของรากแพะเลียงของ *P. candollei* var. *candollei* (A), *P. candollei* var. *mirifica* (B) และสารมาตรฐาน (C) โดย 1: puerarin 2: daidzin 3: genistin 4: daidzein 5: genistein และ 6: coumestrol



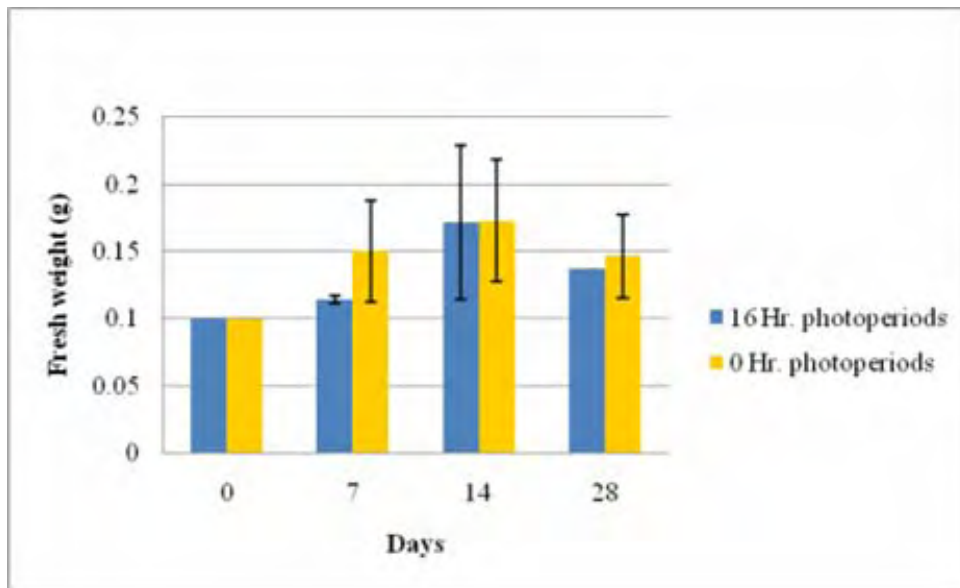
รูปที่ 37 ปริมาณและรูปแบบการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ในรากพะเลียงของถั่วเครือขาว 2 พันธุ์ (C1-6: *P. candollei* var. *candollei*; M1-5: *P. candollei* var. *mirifica*)

## การผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ของรากพะเลียงของกวาวเครือขาวเมื่อวางเลี้ยงภายใต้สภาวะแสงและสภาวะมืด

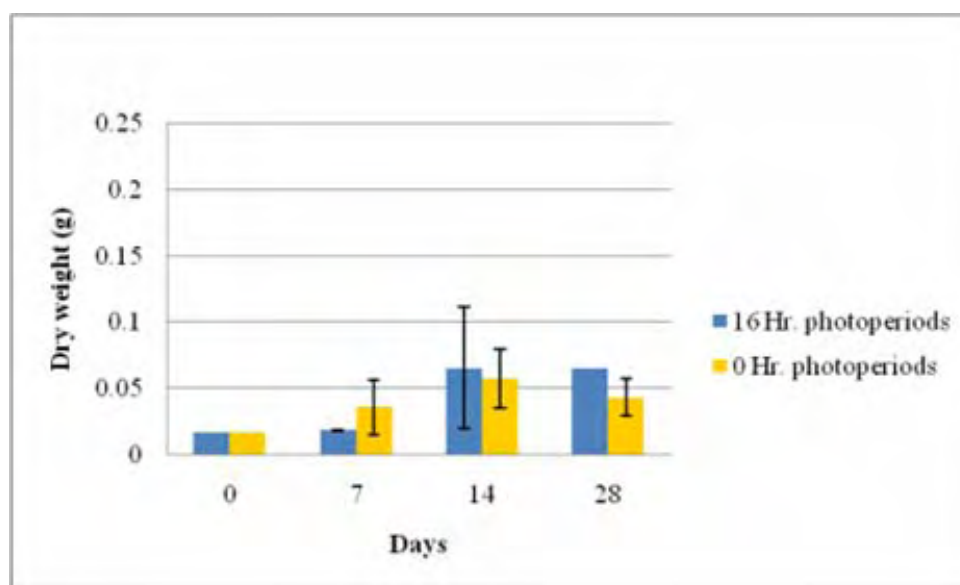
เมื่อทำการวางเลี้ยงรากพะเลียงของ *P. candollei* var. *candollei* ภายใต้สภาวะมืดและสภาวะแสง จากผลการวิจัยพบว่า น้ำหนักสดโดยเฉลี่ยของรากพะเลียงที่วางเลี้ยงในสภาวะมืดและในสภาวะแสงค่อยๆเพิ่มขึ้น และมีน้ำหนักสดสูงสุดที่ 14 วัน เท่ากับ  $0.17 \pm 0.06$  กรัม (ในสภาพมืด) และ  $0.17 \pm 0.05$  กรัม (ในสภาพแสง) หลังจากนั้นพบว่า น้ำหนักสดของทั้ง 2 กลุ่ม มีแนวโน้มลดลงเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน โดยที่วางเลี้ยงในสภาวะมืดและในสภาวะแสงมีน้ำหนักสดเฉลี่ยอยู่ที่  $0.14$  และ  $0.15 \pm 0.03$  กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 38)

ในส่วนของน้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยของกลุ่มที่วางเลี้ยงในสภาวะมืดและในสภาวะแสง พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกับน้ำหนักสดคือเพิ่มขึ้นในช่วง 14 วัน โดยในกลุ่มที่วางเลี้ยงในสภาวะมืดมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุดที่  $0.07 \pm 0.05$  กรัม และกลุ่มที่วางเลี้ยงในสภาวะแสงมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุด  $0.06 \pm 0.02$  กรัม และน้ำหนักแห้งมีแนวโน้มลดลงเมื่อพะเลียงเป็นเวลา 28 วัน (รูปที่ 39)

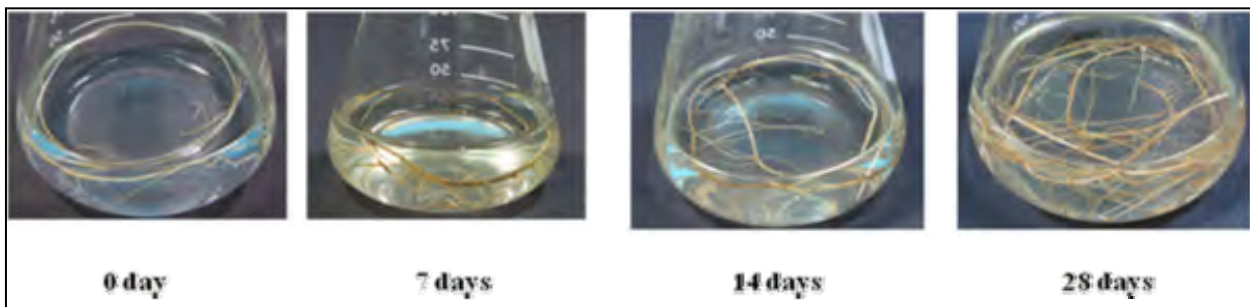
และเมื่อพิจารณาถึงลักษณะภายนอกของรากพะเลียงทั้งที่วางเลี้ยงในสภาวะมืดและในสภาวะแสง พบว่ารากพะเลียงที่วางเลี้ยงในสภาวะมืดตลอดระยะเวลา 28 วัน จะมีลักษณะรากเป็นสีขาวมีบางส่วนที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แต่พบน้อยกว่ารากพะเลียงในกลุ่มที่วางเลี้ยงในสภาวะแสงซึ่งรากพะเลียงส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างชัดเจน (รูปที่ 40-41)



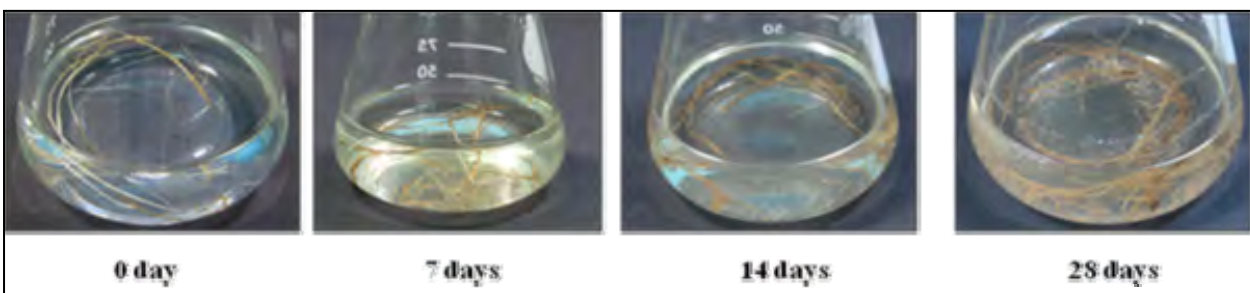
รูปที่ 38 น้ำหนักสดเฉลี่ยของรากพะยะเลียงกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei*) เมื่อพะยะเลียง ภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน และภายใต้สภาวะมืด



รูปที่ 39 น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของรากพะยะเลียงกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei*) เมื่อพะยะเลียง ภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน และภายใต้สภาวะมืด



รูปที่ 40 ลักษณะของรากเพาเลียงกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei*) เมื่อเพาเลียงภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน



รูปที่ 41 ลักษณะของรากเพาเลียงกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei*) เมื่อเพาเลียงภายใต้สภาวะมืด

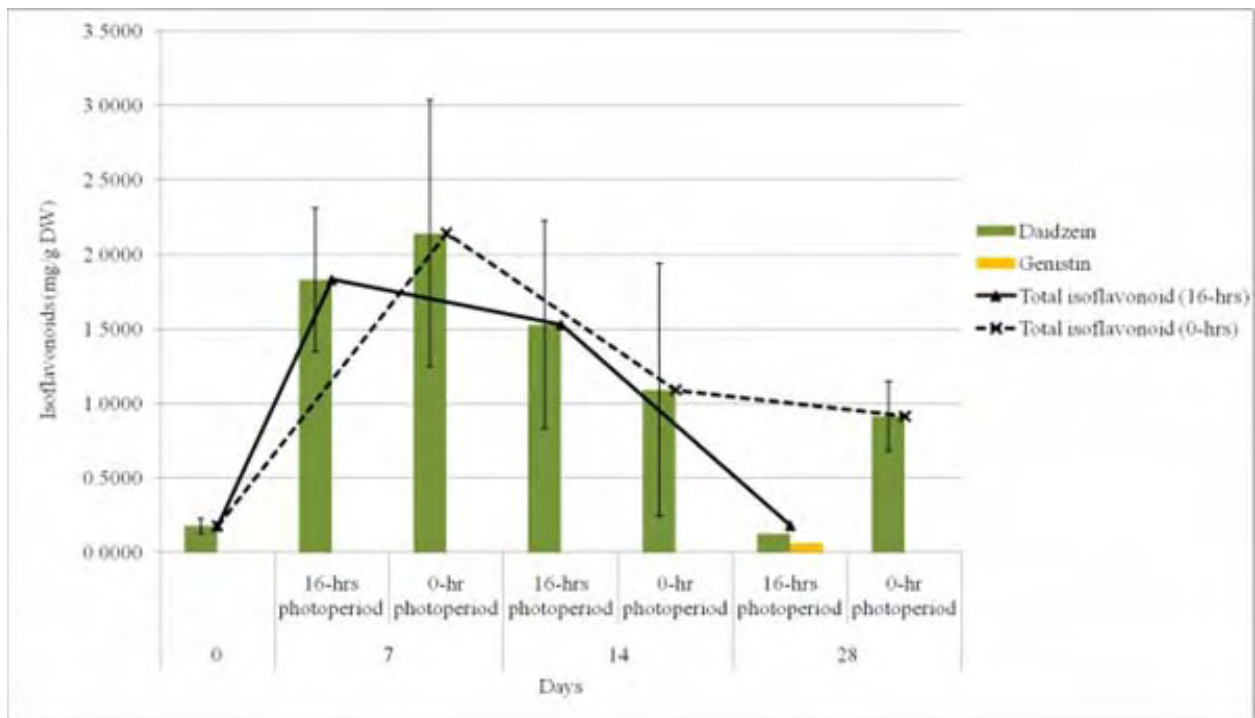
รูปที่ 42 แสดงการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของรากเพาเลียงกวาวเครือขาว ซึ่งพบ daidzein เป็นสารหลัก โดยมีปริมาณการสะสมสูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาเลียงทั้งในสภาวะแสงและในสภาวะมืด รากที่เพาเลียงในสภาวะแสง มีปริมาณ daidzein  $1.83 \pm 0.05$  มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง และรากที่เพาเลียงในสภาวะมืด มีปริมาณ daidzein  $2.14 \pm 0.89$  มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง จากนั้นปริมาณจึงค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาการเพาเลียงเพิ่มขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้จากรากเพาเลียงกับปริมาณสารในเซลล์เพาเลียงแขวนลอยพบว่ารากเพาเลียงในการทดลองนี้ พบเพียง daidzein และ genistein เท่านั้น ในขณะที่ในเซลล์เพาเลียงแขวนลอยจะพบสารไอโซฟลาโวนอยด์ ที่มีความหลากหลายได้แก่ daidzein daidzin genistein และ genistin

การที่พบสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่ไม่มากและไม่หลากหลาย อาจเป็นผลมาจาก line ของรากเพาเลียงที่เลือกมาใช้ในการทำการทดลองนี้ (C6) ซึ่งสะสมสารเพียงแค่ 2 ชนิด ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้หากเลือก line ที่มีการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์สูงกว่า อาจจะทำให้มีการสะสมสารในปริมาณที่มากขึ้นและหลากหลายมากขึ้น และจากรูปที่ 37 จะเห็นได้ว่า รากเพาเลียง line อื่นๆ เช่น M2 มีปริมาณการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์สูง แต่ line ที่มีการสะสมสารในปริมาณสูงนี้ไม่สามารถเจริญได้ดีและตายไปก่อนจะนำมาใช้ในการทดลองนี้

นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าวันที่รากเพาเลียงมีการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ สูงที่สุดคือวันที่ 7 ของการเลี้ยง (รูปที่ 42) ซึ่งเร็วกว่าเมื่อเทียบกับในเซลล์เพาเลียงแขวนลอยที่ต้องใช้เวลา 18-24 วัน

(บทที่ 3) เพื่อให้ได้ปริมาณการสะสมสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์สูงสุด ดังนั้นหากเลือกรากเพาะเลี้ยง line ที่มีการสะสมสารมากและหลากหลายมาใช้แล้ว รากเพาะเลี้ยงอาจเป็นอีกทางเลือกในการผลิตสาร ไอโซฟลาโวนอยด์ในเวลาสั้นกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย ซึ่งจะต้องทำการทดลองเพื่อคัดเลือก line ที่สร้างและสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์สูง และกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรากเพาะเลี้ยงต่อไป



รูปที่ 42 การสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในรากเพาะเลี้ยงของ *P. candollei* var. *candollei* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสงและในสภาวะมืด

# บทที่ 7

## บทสรุปและข้อเสนอแนะ

วัตถุดิบสมุนไพรเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร สำหรับกวาวเครือขาว (*Pueraria candollei*) เป็นสมุนไพรที่ยังต้องเก็บจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งอาจมีปัญหาในเรื่องการอนุรักษ์ พันธุ์ ความสม่ำเสมอของปริมาณผลผลิต และการควบคุมปริมาณสารสำคัญในหัวกวาวเครือขาว ดังนั้น เทคโนโลยีชีวภาพ เช่น เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยและรากเพาะเลี้ยงจึงอาจเป็นทางเลือกที่สามารถนำมาใช้แก้ปัญหาดังกล่าวได้ ทั้งนี้จากการวิจัยโครงการนี้ได้กำหนดวิธีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของ กวาวเครือขาว 2 พันธุ์ (varieties) ได้แก่ *Pueraria candollei* var. *candollei* และ *P. candollei* var. *mirifica* และทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสของกวาวเครือขาว (*P. candollei* var. *candollei*) จากเนื้อเยื่อใบ ลำต้น และราก โดยสูตรอาหาร MS ที่มี BA 0.56 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้กระตุ้นการสร้างแคลลัส เพื่อเลี้ยง เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย และเมื่อศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของทั้งสอง พันธุ์โดยการวิเคราะห์ผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ ส่วนของพืชตั้งต้นที่ใช้ในการกระตุ้นแคลลัส และ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ต่อน้ำหนักสดและแห้งของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย พบว่าส่วนของพืชตั้งต้น ที่ใช้ในการกระตุ้นแคลลัสมีผลต่อน้ำหนักสดและแห้งของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยอย่างมีนัยสำคัญ และ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีผลต่อน้ำหนักสดและแห้งของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยอย่างมีนัยสำคัญ

การตรวจสอบสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์จากตัวอย่างของพืชกวาวเครือขาวในงานวิจัยนี้ ได้ใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี คือ high-performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งได้ พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ โดยวิเคราะห์สาร 6 ชนิดพร้อมกัน ได้แก่ genistein genistin daidzein daidzin puerarin และ coumestrol การศึกษาใช้ภูมิภาคเคลื่อนที่แบบ อัตราส่วนระหว่าง 0.2% ของกรดอะซิติกในน้ำ และอะซีโตนไตริล ใช้อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร ต่อนาที ศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงที่ใช้เป็นกราฟมาตรฐานในช่วง 5-160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ ค่าความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (correlation coefficient) ค่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ (LOD) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื่อถือได้ (LOQ) ค่าความถูกต้อง (accuracy) และค่าความแม่นยำ (precision) ที่ประกอบด้วยค่า reproducibility และค่า repeatability ของสาร มาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ AOAC กำหนด

จากการวิเคราะห์สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกาวเครือขาวโดยวิธี HPLC พบสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์หลักคือ daidzin และยังพบสาร daidzein และ genistin ในปริมาณที่สูงกว่า daidzein และ genistein ซึ่งต่างกับในรากของพืชในธรรมชาติ ทั้งนี้เซลล์เพาะเลี้ยงของกาวเครือขาวอาจจะเป็นวัตถุดิบในการผลิตสาร daidzin และ genistin ได้ดีกว่าพืชในธรรมชาติ เมื่อศึกษารูปแบบการเจริญ และการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยในถังเพาะเลี้ยงขนาด 3 ลิตร พบว่าค่าน้ำหนักสดต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยง มีค่าน้อยกว่าเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในระบบ flask และมีรูปแบบการสร้างสารที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับการเลี้ยงใน flask คือมี daidzin และ genistin เป็นสารหลัก ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงในถังเลี้ยงขนาดใหญ่ยังไม่เหมาะสม เช่นระบบกวนผสม ระบบอากาศในถังเลี้ยง เป็นต้น

เมื่อทำการศึกษาผลของสารกระตุ้นในความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวเครือขาว พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของกาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์มีการตอบสนองแตกต่างกันในด้านการเจริญเติบโตและการสะสมสาร โดย chitosan 50 มิลลิกรัม/ลิตร และ laminarin 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกาวเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *mirifica* การเติมสาร methyl jasmonate เหนี่ยวนำการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ในกาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์อย่างเด่นชัด ส่วนการเติม laminarin ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกาวเครือขาวพันธุ์ *P. candollei* var. *mirifica* มีการสร้าง puerarin ซึ่งไม่พบสารนี้ในเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เพื่อเพิ่มการสร้างสารในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยกาวเครือขาวได้

ในส่วนของการชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงของกาวเครือขาว พบว่าชิ้นส่วนจากต้นอ่อนของกาวเครือขาวที่มีอายุ 7 วันเมื่อวางเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC 15834 หรือ ATCC 43057 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ มีการเกิดรากที่มีการถ่ายยีนของแบคทีเรีย และเมื่อวิเคราะห์การสร้างสารด้วยวิธี HPLC พบสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดคือ daidzin daidzein genistin และ genistein โดยสารหลักที่พบคือ daidzein ซึ่งมีปริมาณการสะสมสูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงทั้งในสภาวะแสง 16 ชั่วโมงและในสภาวะมืด ซึ่งการสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์นี้ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยต้องใช้เวลา 18-24 วัน ดังนั้นรากเพาะเลี้ยงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะสาร daidzein ในเวลาสั้น อย่างไรก็ตามก็ควรทำการทดลองเพื่อกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อไป เช่นศึกษาสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับรากเพาะเลี้ยงของกาวเครือขาว

จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยและรากเพาะเลี้ยงของกาวเครือขาว มีศักยภาพในการผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้ นอกจากนี้การใช้สารกระตุ้น (elicitor) ยังช่วยเพิ่มการผลิตสารสำคัญให้มากขึ้น เพื่อสามารถใช้เป็นแหล่งในการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์สำหรับใช้ในทางยาและเครื่องสำอางในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

1. Kashemsanta L, Suvatabandhu K, Airy Shaw AK. A new species of *Pueraria* (Leguminosae) from Thailand, yielding an oestrogenic principle. Kew Bull 1952;4:549-51.
2. Niyomdham C. Note on Thai and Indo-Chinese Phaseoleae (Leguminosae-Papilionoideae). Nord J Bot 1992;12:339-46.
3. สมภพ ประธานธรรักษ์, วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. การศึกษาทางพฤกษศาสตร์และเคมีของกวาวเครือขาว. การสัมมนาแนวทางการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย 2543:113-7.
4. หลวงอนุสารสุนทร. ตำรายาหัวกวาวเครือ. เชียงใหม่: โรงพิมพ์อุปติพงษ์; 2474.
5. Ingham J, Tahara S, Dziedzic S. A chemical investigation of *Pueraria mirifica* roots. Z Naturforsch 1986;41C:403-8.
6. Ingham J, Tahara S, Dziedzic S. Coumestans from the roots of *Pueraria mirifica*. Z Naturforsch 1988;43C:5-10.
7. Ingham J, Tahara S, Dziedzic S. Minor isoflavones from the roots of *Pueraria mirifica*. Z Naturforsch 1989;44C:724-6.
8. Schoeller W, Dohrn M, Hohlweg W. An estrogenic substance from the tubers of the Siamese vine, *Butea superba*. Naturwissenschaften 1940;28:532.
9. Kashemsanta L, Subatabandhu K, Bartlett S, Pope G. Estrogenic substance (miroestrol) from the tuberous roots of *Pueraria mirifica*. Proc Pacific Sci Congr Pacific Sci Assoc 9th Bangkok Thailand 1963;5:37-40.
10. Chansakaow S, Ishikawa T, Seki H, Sekine K, Okada M, Chaichantipyuth C. Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The Known miroestrol may be an artifact. J Nat Prod 2000;63:173-5.
11. Jones HEH, Pope GS. A method for the isolation of miroestrol from *Pueraria mirifica*. J Endocrinol 1961;22:303-12.
12. Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, et al. Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. Planta Med 2000;66:572-5.
13. สมภพ ประธานธรรักษ์. ไฟโตเอสโตรเจน. คลินิก 2542;179:847-52.
14. ยุทธนา สมิตะสิริ. ภาพรวมงานวิจัยและพัฒนากวาวเครือขาวตั้งแต่อดีต (พ.ศ.2524) ถึงปัจจุบัน (พ.ศ.2541). ใน: เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการเรื่องกวาวเครือ; 2541; นนทบุรี: สถาบันการแพทย์แผนไทย, กระทรวงสาธารณสุข; 2541. p. 13-7.
15. ทรงพล ชีวะพัฒน์, ปราณี ขวลิตรำรง, สดุดี รัตนจรัสโรจน์, อัญชลี จูทะพุทธิ, สมเกียรติ ปัญญามัง. พิษวิทยาของกวาวเครือขาว. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2543;42:202-23.

16. Verpoorte R, Contin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 2002;1:13-25.
17. Yu O, McGonigle B. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. *Adv Agron* 2005;86:147-90.
18. Bouque V, Bourgard F, Nguyen C, Guckert A. Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1998;53:35-40.
19. Bourgard F, Bouque V, Guckert A. Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1999;56:97-104.
20. Lui C, Zhu J, Lui Z, Li L, Pan R, Jin L. Exogenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy roots of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Plant Growth Regul* 2002;38:37-43.
21. Shi HP, Kintzios S. Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. *Plant Cell Rep* 2003;21:1103-7.
22. Kintzios S, Makri O, Pistola E, Matakias T, Shi HP, Economou A. Scale-up production of puerarin from hairy roots of *Pueraria phaseoloides* in an airlift bioreactor. *Bitechnol Lett* 2004;26:1057-9.
23. Matkowski A. *In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *J Plant Physiol* 2004;161:343-6.
24. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962;15:473-97.
25. Evans DE, Coleman JOD, Kearns A. *Plant cell culture*. New York: BIOS Scientific; 2003.
26. Litwack G. *Plant hormones*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
27. Bubán T. The use of benzyladenine in orchard fruit growing: a mini review. *Plant Growth Regul* 2000;32:381-90.
28. Coenen C, Lomax TL. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Sci* 1997;2:351-6.
29. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). IFPMA: Geneva 2005.
30. Andlauer W, Martena MJ, Furst P. Determination of selected phytochemicals by reversed-phase high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J Chromatogr* 1999;849:341-8.
31. Felipe DF, Filho BPD, Nakamura CV, Franco SL, Cortez DgAG. Analysis of neolignans compounds of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck by HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41:1371-5.

32. Aoki T, Akashi T, Ayabe S-i. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *J Plant Res* 2000;113:475-88.
33. Jung W, Yu O, Lau SM, et al. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat Biotechnol* 2000;18:208-12.
34. Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, et al. Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med* 2000;66:572-5.
35. Luczkiewicz M, Glod D. Morphogenesis-dependent accumulation of phytoestrogens in *Genista tinctoria* in vitro cultures. *Plant Sci* 2005;168:967-79.
36. Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2002;20:101-53.
37. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H, Putalun W. Production of isoflavonoids in callus cultures of *Pueraria candollei* var. *mirifica*. *Z Naturforsch C* 2009;64:239-43.
38. Dewick P. Isoflavonoids. In: Harborne JB, ed. *The flavonoids*. London: Chapman & Hall; 1994.
39. Inoue T, Fujita M. Biosynthesis of puerarin in *Pueraria* root. *Chem Pharm Bull* 1977;25:3226-31.
40. Honda H, Liu C, Kobayashi T. Large-scale plant micropropagation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2001;72:157-82.
41. Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2005;81:287-300.
42. Doran PM. Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors. *Biotechnol Progr* 1999;15:319-35.
43. Curtis WR. Application of bioreactor design principles to plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2005;81:255-64.
44. Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J Biotechnol* 1997;59:39-52.
45. Zhong J-J. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. In: *Plant Cell*; 2001:1-26.
46. Jung C, Maeder V, Funk F, Frey B, Sticher H, Frossard E. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil* 2003;252:301-12.
47. Ali MB, Hahn E-J, Paek K-Y. Copper-induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors. *Plant Cell Rep* 2006;25:1122-32.

48. Chong TM, Abdullah MA, Lai OM, Mor'Aini FM, Lajis NH. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochem* 2005;40:3397-405.
49. Fang Y, Smith MAL, Pepin MF. Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*). *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 1999;35:106-13.
50. Krisa S, Larronde F, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Me'rillon J-M. Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: methyl jasmonate induction and <sup>13</sup>C biolabeling. *J Nat Prod* 1999;62:1688-90.
51. Bhuiyan MNH, Adachi T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *J Plant Physiol* 2003;160:1117-24.
52. Colque R, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Improved production of galantamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Planta Med* 2004;70:1180-8.
53. Zhao J, Fujita K, Yamada J, Sakai K. Improved  $\beta$ -thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;55:301-5.
54. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2005;23:283-333.
55. Creelman RA, Mullet JE. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4114-9.
56. Sudha G, Ravishankar GA. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell Tiss Org Cult* 2002;71:181-212.
57. Graham TL, Graham MY. Signaling in soybean phenylpropanoid responses. *Plant Physiol* 1996;110:1123-33.
58. Gagnon H, Ibrahim RK. Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. *Phytochemistry* 1997;44:1463-7.
59. Mackenbrock U, Gunia W, Barz W. Accumulation and metabolism of medicarpin and maackiain malonylglucosides in elicited chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *J Plant Physiol* 1993;142:385-91.
60. Funk C, Brodelius P. Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* 1990;29:845-8.

61. Sanchez-Sampedro MA, Fernandez-Tarrago J, Corchete P. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. J Biotechnol 2005;119:60-9.
62. Vasconsuelo AA, Giuletti AM, Boland R. Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. Plant Sci 2004;166:405-13.
63. Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, et al. Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogen activity. Planta Med 2000;66:572-5.
64. Zhao J-L, Zhou L-G, Wu J-Y. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. Appl Microbiol Biotechnol 2010;87:137-44.
65. Medina-Bolivar F, Condori J, Rimando AM, et al. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. Phytochemistry 2007;68:1992-2003.
66. Inoue T, Fujita M. Biosynthesis of puerarin in *Pueraria* root. Chem Pharm Bull 1977;25:3226-31.
67. Inoue T, Fujita M. Biosynthesis of isoflavone C-glycoside in *Pueraria* root. Chem Pharm Bull 1974;22:142-1423.
68. Goyal S, Ramawat KG. Increased isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* by elicitors. Indian J biotech 2008;7:378-82.
69. Doran PM. Hairy roots: culture and applications. Amsterdam: Harwood Academic; 1997.
70. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 1968;50:151-8.
71. Furner IJ, Huffman GA, Amasino RM, Garfinkel DJ, Gordon MP, Nester EW. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. Nature 1986;319:422-7.
72. Christey MC, Sinclair BK, Braun RH, Wyke L. Regeneration of transgenic vegetable brassicas (*Brassica oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation. Plant Cell Rep 1997;16:587-93.
73. Nicholson RL, Hammerschmidt R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annu Rev Phytopathol 1992;30:369-89.

# ภาคผนวก

ผลผลิตจากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

## 1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1.1 Boonsongcheep P, Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanturug S\*. Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. Plant Cell Tiss Organ Cult 2010; 101: 119-126.
- 1.2 Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanturug S\*. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. Plant Cell Tiss Organ Cult; DOI 10.1007/s11240-010-9785-6.

## 2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

### 2.1 เชิงวิชาการ

มีการผลิตนักวิจัยระดับปริญญาโท 1 คน และนักวิจัยระดับปริญญาเอก 1 คน

## 3. อื่น ๆ

### 3.1 ผลงานวิจัยที่เสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

- 3.1.1 Boonsongcheep P, Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanturug S. Initiation of callus and suspension cultures of two varieties of *Pueraria candollei* and their isoflavonoid production. The Sixth Princess Chulabhorn International science congress. November 25-29, 2007, Bangkok, Thailand.
- 3.1.2 Korsangruang S, Boonsongcheep P, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanturug S. Simultaneous HPLC analysis of isoflavonoids in *Pueraria candollei* tuberous roots and suspension cultures. The Sixth Princess Chulabhorn International science congress. November 25-29, 2007, Bangkok, Thailand.

# Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures

Panitch Boonsongcheep · Sirintra Korsangruang ·  
Noppamas Soonthornchareonnon · Yupyn Chintapakorn ·  
Promchit Saralamp · Sompop Prathanturug

Received: 13 August 2009 / Accepted: 3 January 2010 / Published online: 12 January 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** We established cell suspension cultures derived from leaf, stem, and root calli of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* using liquid Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.56  $\mu$ M 6-benzyladenine (BA) and 4.52  $\mu$ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Growth of the cell suspension cultures progressed to the stationary phase within 15–24 days. Methanolic extracts of cell suspension cultures of both varieties of *P. candollei* were analyzed using a validated HPLC protocol. All cell lines derived from leaf, stem, and root explants produced four major isoflavonoids: daidzein, daidzin, genistein, and genistin; these isoflavonoids were detected only in the roots of intact plants. Furthermore, the isoflavonoid contents of the cell suspension cultures were higher than those of intact plants. Thus, cell suspension culture of both varieties of *P. candollei* may be an effective tool for isoflavonoid production.

**Keywords** Analytical method validation · Cell suspension culture · HPLC · Isoflavonoids · *Pueraria candollei*

## Abbreviations

|       |                                   |
|-------|-----------------------------------|
| BA    | 6-Benzyladenine                   |
| 2,4-D | 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid    |
| MS    | Murashige and Skoog (1962) medium |
| TDZ   | Thidiazuron                       |

## Introduction

*Pueraria candollei* Graham ex Benth. (Fabaceae) consists of two varieties, viz. *P. candollei* Grah. ex Benth. var. *candollei* and *P. candollei* Grah. ex Benth. var. *mirifica* (A. Shaw et Suvat.) Niyomdham (Keung 2002; Niyomdham 1992). Dried tuberous roots of both varieties have been used in Thai traditional medicine for rejuvenation (Cain 1960). *P. candollei* var. *mirifica* tuberous root contains a number of phytoestrogens, including isoflavonoids (viz. genistein, daidzein), isoflavonoid glycosides, (viz. genistin, daidzin, puerarin), chromenes (viz. miroestrol), coumestans (viz. coumestrol), and pterocarpans (viz. tuberosin) (Chansakaow et al. 2000a, b; Ingham et al. 1986). Pharmacological activities have been reported, including estrogenic activity (Chansakaow et al. 2000b; Trisomboon et al. 2004a, b, 2006), prevention of bone loss (Urasopon et al. 2007), and antioxidant activity (Cherdshewasart and Sutjit 2008).

In the last decade, cell cultures have played an important role in the production of secondary metabolites. This technique is suitable for studying biosynthetic pathways

P. Boonsongcheep · S. Korsangruang · P. Saralamp ·  
S. Prathanturug (✉)

Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy,  
Mahidol University, 447 Sri-ayuthaya Road, Bangkok 10400,  
Thailand  
e-mail: pyspr@mahidol.ac.th

N. Soonthornchareonnon  
Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol  
University, 447 Sri-ayuthaya Road, Bangkok 10400, Thailand

Y. Chintapakorn  
Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn  
University, Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

and the relationship between secondary metabolite production and cell growth which are important factors for industrial applications (Kieran et al. 1997; Sakuta and Komamine 1988).

Callus cultures of *P. candollei* var. *mirifica* were established by culturing root, cotyledon, stem, leaf, and shoot explants on Murashige and Skoog medium (MS) (Murashige and Skoog 1962) supplemented with a combination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin or 2,4-D and 6-benzyladenine (BA) (Thanonkeo and Panichajakul 2006). These cultures produced isoflavonoids, daidzein and genistein; the yields of these products were approximately 34 times higher than those in the intact tuberous root. Moreover, the enhancement of isoflavonoid production, i.e., daidzein, daidzin, genistein, genistin, and puerarin, in stem- and leaf-derived callus cultures of *P. candollei* var. *mirifica* using thidiazuron (TDZ) has been reported (Udomsuk et al. 2009). However, cell suspension culturing of the plant, which is a key method for secondary metabolite production, has not been established. Cell suspension cultures of *Glycine max* contained higher amounts of total isoflavonoids (72 mg g<sup>-1</sup> DW) than that of callus culture (46.3 mg g<sup>-1</sup> DW) (Federici et al. 2003). *Pueraria thomsonii* and *P. lobata* cell suspension cultures have been successfully established (Li and Zhang 2006; Xu et al. 2006).

The objectives of the present study were to initiate cell suspension cultures derived from *P. candollei* leaf, stem, and root calli and to study the growth pattern of those cultures. To elucidate the isoflavonoid accumulation pattern in *P. candollei* cell suspension cultures, it was necessary to simultaneously analyze six isoflavonoids, i.e., daidzein, daidzin, genistein, genistin, coumestrol, and puerarin. In this paper, therefore, we report a validated method for simultaneous quantitative analysis of these compounds in *P. candollei* cell suspension cultures using an HPLC system.

## Materials and methods

### Plant materials

Two varieties of *P. candollei* were used in this experiment. Pods of *P. candollei* var. *candollei* were collected from Kanchanaburi Province, Thailand, while pods of *P. candollei* var. *mirifica* were collected from Saraburi Province, Thailand. Herbarium specimens were deposited at the Herbarium of the Department of Pharmaceutical Botany, Mahidol University (collector numbers: Prathan-turarug 00113 and Prathan-turarug 00101 for *P. candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica*, respectively).

### Callus and cell suspension cultures

#### *In vitro* culture establishment

Seeds were surface sterilized with 2% sodium hypochlorite solution containing Tween 80<sup>®</sup> (1 drop 100 ml<sup>-1</sup> solution) for 30 min and then rinsed three times with sterile distilled water. The sterilized seeds were then cultured on Murashige and Skoog (MS) semi-solid medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 3% sucrose and 0.55% Agargel<sup>®</sup> and were maintained at 25 ± 3°C with a 16-hr photoperiod and a light intensity of 37.5 μEm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### Callus induction

Leaf, stem, and root explants from in vitro-grown 2-month-old *P. candollei* var. *candollei* plants were used to inoculate on MS media supplemented with 3% sucrose, 0.55% Agargel<sup>®</sup> and a combination of BA (0, 0.56, 2.22, or 4.44 μM) and 2,4-D (0, 0.57, 2.26, or 4.52 μM) in sterile petri dishes. For each treatment, 12 replicates were performed.

After 4 weeks, intensity of callus formation was scored (Table 1). The induced calli were friable with a creamy white to green color. The combination of 0.56 μM BA and 4.52 μM 2,4-D, selected because it mediated efficient callus induction, was used in the cell suspension culture medium for both varieties of *P. candollei*.

#### Cell suspension culture establishment

Calli (500 mg) derived from leaf, stem, and root explants of *P. candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* were transferred to 50 ml of culture medium in a 125-ml Erlenmeyer flask, and the cultures were maintained on a shaker at 110 rpm for 24 days.

#### Growth determination and isoflavonoid extraction

Every 3 days, three flasks of each cell line were harvested, and the fresh weight was determined by filtration through Whatman filter paper (No. 1) under vacuum. The harvested cells were dried at 60°C for 48 h, and dry weights were determined. Each dry sample was extracted with 75 ml of methanol (anhydrous, JT baker, USA) in an ultrasonic bath at 40°C for 30 min. The extraction was repeated three times. Subsequently, the extracts were combined and filtered through Whatman filter paper (No. 1) and then evaporated to dryness under vacuum using a rotary evaporator.

**Table 1** Growth of calli derived from *P. candollei* var. *candollei* leaf, stem, and root explants

| Explants                | Leaf | Stem | Root | Leaf | Stem | Root | Leaf | Stem | Root | Leaf | Stem | Root |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| BA ( $\mu\text{M}$ )    |      | 0    |      |      | 0.56 |      |      | 2.22 |      |      | 4.44 |      |
| 2,4-D ( $\mu\text{M}$ ) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 0                       | +    | +    | +    | +    | ++   | +    | +    | +    | ++   | +    | +    | +    |
| 0.57                    | +    | ++   | +++  | ++   | ++   | +++  | ++   | ++   | +++  | ++   | ++   | +++  |
| 2.26                    | +    | ++   | +++  | ++   | +++  | ++++ | ++   | ++   | +++  | ++   | ++   | +++  |
| 4.52                    | ++   | +++  | +++  | ++   | +++  | ++++ | ++   | ++   | +++  | ++   | ++   | +++  |

The growth was scored as follows: + small groups of calli formed, ++ groups of calli formed approximately 2 mm, +++ groups of calli formed around original tissue larger than 2 mm, ++++ groups of calli covered the explant

## HPLC analysis

### HPLC conditions and validation

HPLC analysis was carried out on a Shimadzu HPLC model LC-10ADVP analytical workstation coupled with an SPD-M10AVP photodiode array detector. The instrument was equipped with a Purospher RP-18 column (250 mm  $\times$  3.0 mm, i.d., 5  $\mu\text{m}$  particle size). The injection volume was 5  $\mu\text{l}$ . The mobile phase consisted of solvent A (0.2% acetic acid in water) and solvent B (acetonitrile, Fisher Chemical, UK). The gradients of solvent B were varied as follows: 15% B (5 min), 15–30% B (5 min), 30% B (12 min), 30–32% B (3 min), 32% B (5 min), 32–15% B (2 min), and 15% B (8 min), with a flow rate of 0.5 ml min<sup>-1</sup>. Stock solutions of the pure compounds coumestrol (Fluka, USA), daidzein (Sigma, USA), daidzin (Fluka, USA), puerarin (Sigma, USA), genistein (Sigma, USA), and genistin (Sigma, USA) were simultaneously prepared. The stock solutions were serially diluted with methanol (HPLC grade, Fisher chemical, UK) to make samples with concentrations of 5, 10, 20, 40, 80, and 160  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , and the absorbances of these dilutions were measured at 243, 248, 248, 249, 259, and 259 nm for coumestrol, daidzein, daidzin, puerarin, genistein, and genistin, respectively. The calibration curve for each standard was constructed by plotting the areas under the curve (AUC) versus the concentration. The slope and correlation coefficient ( $R^2$ ) were calculated by linear regression, which was done using the LCMS solution program of the HPLC instrument. Limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) were determined by calculation of the ratios of signal to noise equal to 10:1 and 3:1, respectively. The precision of the analysis method was measured using repeatability and reproducibility studies. Mixtures of the six standards at 5, 40, and 160  $\mu\text{g ml}^{-1}$  concentrations were prepared and used for evaluation. The repeatability and reproducibility studies were expressed as the relative standard deviation (%RSD). The accuracy of the method was evaluated using recovery studies by adding

known amounts of the standard solution to the extract. The sample was spiked with three concentrations of standards (10, 20, and 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively). Each analysis was done in triplicate. The parameters achieved from the validation of this method (Table 2) were in the range recommended by the Association of Analytical Communities guidelines for single-laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals (AOAC International 2002).

### Analysis of cell suspension culture for isoflavonoids

A 10-mg sample of each dried extract was accurately weighed; the sample was then re-dissolved, and the volume was adjusted with methanol (HPLC grade, Fisher chemical, UK) to 10 ml. The extract was filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  syringe filter prior to HPLC analysis. The sample amounts were determined using the area under the curve using the equation for the linear regression obtained from the calibration curve.

## Results and discussion

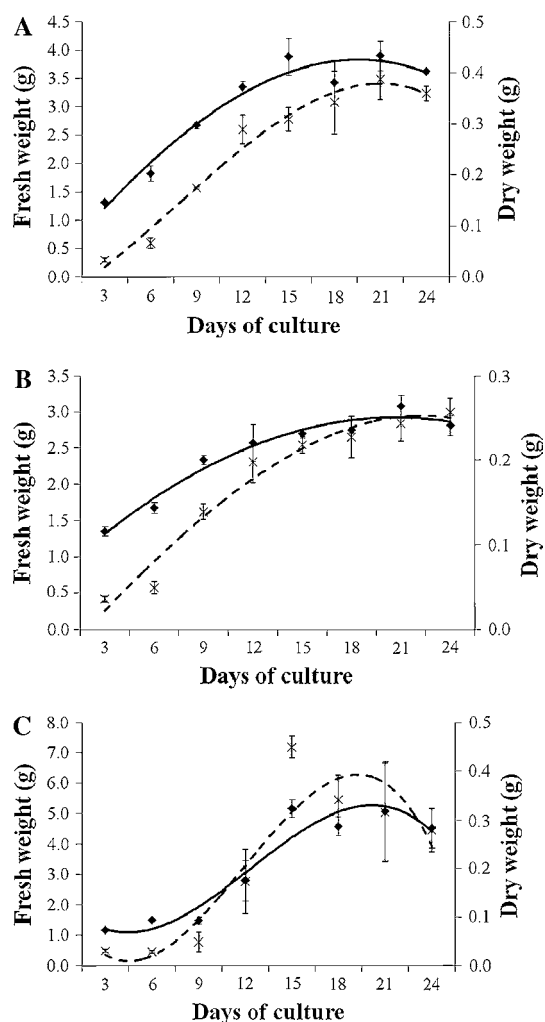
### Cell suspension culture establishment and growth characteristics

The growth characteristics were examined during the 24 days of culturing using fresh and dry weights (Figs. 1 and 2). All cell lines of *P. candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* were in lag phase for 3–6 and 3–9 days, respectively. Then, they started to grow exponentially until reaching a stationary phase within 18–21 and 21–24 days, respectively. Browning occurred in cell lines derived from the leaf, stem, and root of *P. candollei* var. *candollei* at days 15, 18, and 21 of culture respectively, whereas, no browning was observed in *P. candollei* var. *mirifica* throughout the culture period. The highest dried biomass of *P. candollei* var. *candollei*, 449.3 mg flask<sup>-1</sup>, was obtained from a root-derived cell line on day 15

**Table 2** Parameters of method validation for isoflavonoid analysis

| Compounds  | Linearity<br>Regression equation | $R^2$  | LOQ<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | LOD<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Precision                                  |                      | Repeatability (%RSD) |       |                           | Accuracy                                          |           |
|------------|----------------------------------|--------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|----------------------|----------------------|-------|---------------------------|---------------------------------------------------|-----------|
|            |                                  |        |                                  |                                  | Concentration<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Repeatability (%RSD) |                      |       | Reproducibility<br>(%RSD) | Standard<br>addition<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | %Recovery |
|            |                                  |        |                                  |                                  |                                            | Day 1                | Day 2                | Day 3 |                           |                                                   |           |
| Coumestrol | $Y = 29858.0X - 1673.078$        | 0.9999 | 2.13                             | 0.70                             | 10                                         | 2.27                 | 0.13                 | 2.22  | 2.16                      | 10                                                | 106.81    |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 40                                         | 0.27                 | 0.56                 | 0.89  | 0.98                      | 20                                                | 115.47    |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 160                                        | 1.49                 | 0.94                 | 0.88  | 1.05                      | 40                                                | 109.45    |
| Daidzein   | $Y = 23141.97X + 10620.11$       | 0.9999 | 2.81                             | 0.93                             | 10                                         | 1.39                 | 1.18                 | 0.60  | 1.55                      | 10                                                | 91.17     |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 40                                         | 0.45                 | 0.66                 | 1.02  | 0.84                      | 20                                                | 94.83     |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 160                                        | 2.23                 | 0.75                 | 0.94  | 1.41                      | 40                                                | 90.05     |
| Daidzin    | $Y = 29293.36X + 23036.68$       | 0.9999 | 2.21                             | 0.73                             | 10                                         | 0.88                 | 0.23                 | 1.41  | 1.68                      | 10                                                | 99.60     |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 40                                         | 0.23                 | 0.51                 | 0.77  | 0.85                      | 20                                                | 99.78     |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 160                                        | 2.28                 | 0.35                 | 1.02  | 1.41                      | 40                                                | 93.86     |
| Puerarin   | $Y = 10523.04X + 6633.135$       | 0.9999 | 4.33                             | 1.43                             | 10                                         | 2.91                 | 2.90                 | 1.82  | 4.82                      | 10                                                | 93.84     |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 40                                         | 0.51                 | 0.38                 | 1.07  | 0.66                      | 20                                                | 109.19    |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 160                                        | 2.82                 | 0.73                 | 0.99  | 1.83                      | 40                                                | 106.62    |
| Genistin   | $Y = 41985.9X + 41895.99$        | 0.9999 | 1.42                             | 0.46                             | 10                                         | 1.69                 | 1.01                 | 0.87  | 1.36                      | 10                                                | 97.30     |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 40                                         | 0.16                 | 0.50                 | 0.81  | 0.87                      | 20                                                | 101.40    |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 160                                        | 0.88                 | 0.49                 | 0.84  | 1.24                      | 40                                                | 97.84     |
| Genistein  | $Y = 26392.04X + 4818.56$        | 0.9999 | 2.26                             | 0.75                             | 10                                         | 2.25                 | 2.30                 | 1.01  | 1.83                      | 10                                                | 93.21     |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 40                                         | 0.22                 | 0.51                 | 0.86  | 0.88                      | 20                                                | 98.84     |
|            |                                  |        |                                  |                                  | 160                                        | 2.01                 | 1.08                 | 0.93  | 1.28                      | 40                                                | 95.05     |

$Y$  peak area,  $X$  the amount in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $R^2$  correlation coefficient,  $LOQ$  limit of quantification,  $LOD$  limit of detection

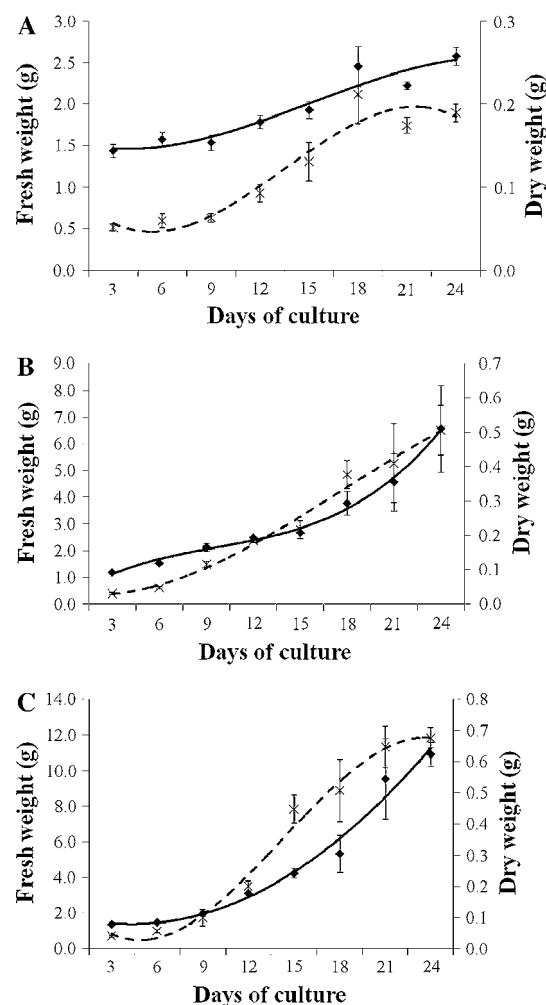


**Fig. 1** Growth of cell suspension cultures of *P. candollei* var. *candollei* (**a** leaf, **b** stem, **c** root); (solid line) fresh weight and (dashed line) dry weight

(Fig. 1c). For *P. candollei* var. *mirifica*, the highest dried biomass was obtained from a root-derived cell line ( $676.0 \text{ mg flask}^{-1}$ ) after 24 days of culture (Fig. 2c).

When comparing the fresh and dried biomasses for growth determination, we found that the growth curves for both fresh and dry weights (Figs. 1 and 2) had the same growth characteristics for each cell line.

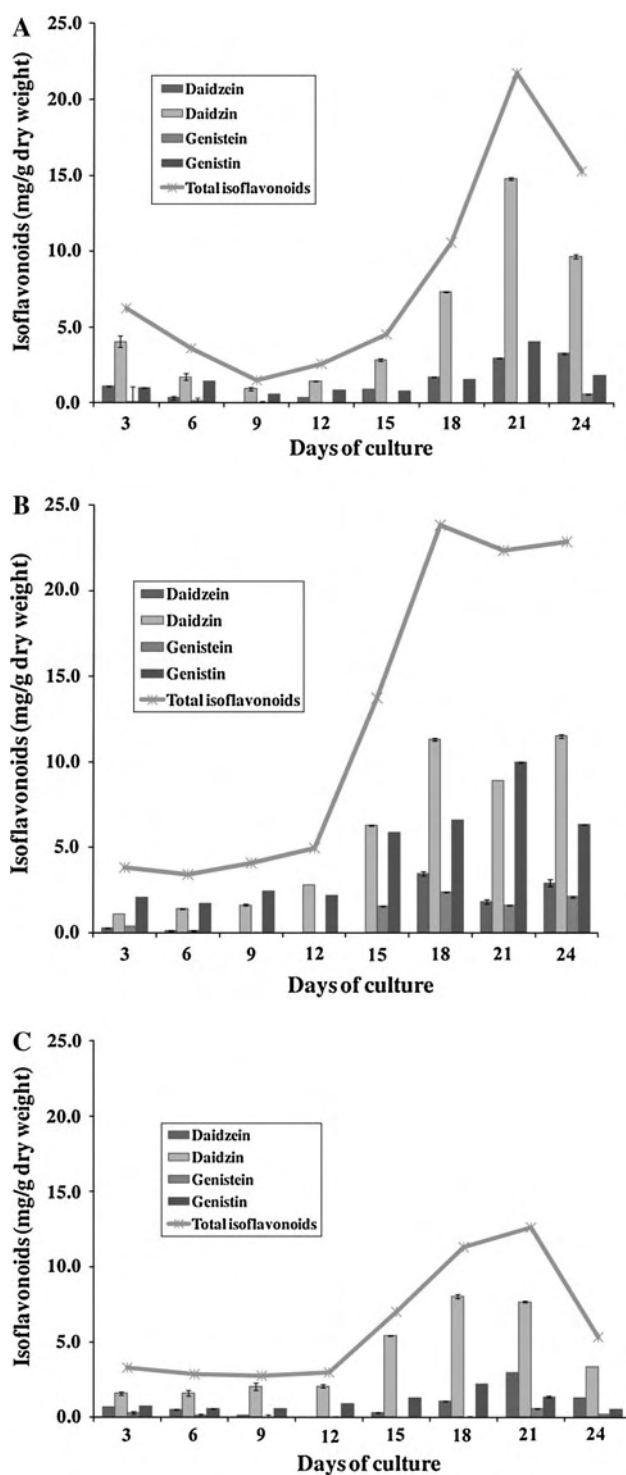
The effects of the plant variety (var. *candollei* and var. *mirifica*), type of initial explants (leaf, stem, and root), and the day of culture (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, and 24) on fresh and dry weights were analyzed using three-way ANOVA. The type of explant significantly affected only the fresh weight of the culture ( $P = 0.015$ ). Furthermore, the day of culture significantly affected the fresh and dried weights of the culture ( $P = 0.020$  and  $P = 0.007$ , respectively).



**Fig. 2** Growth of cell suspension cultures of *P. candollei* var. *mirifica* (**a** leaf, **b** stem, **c** root); (solid line) fresh weight and (dashed line) dry weight

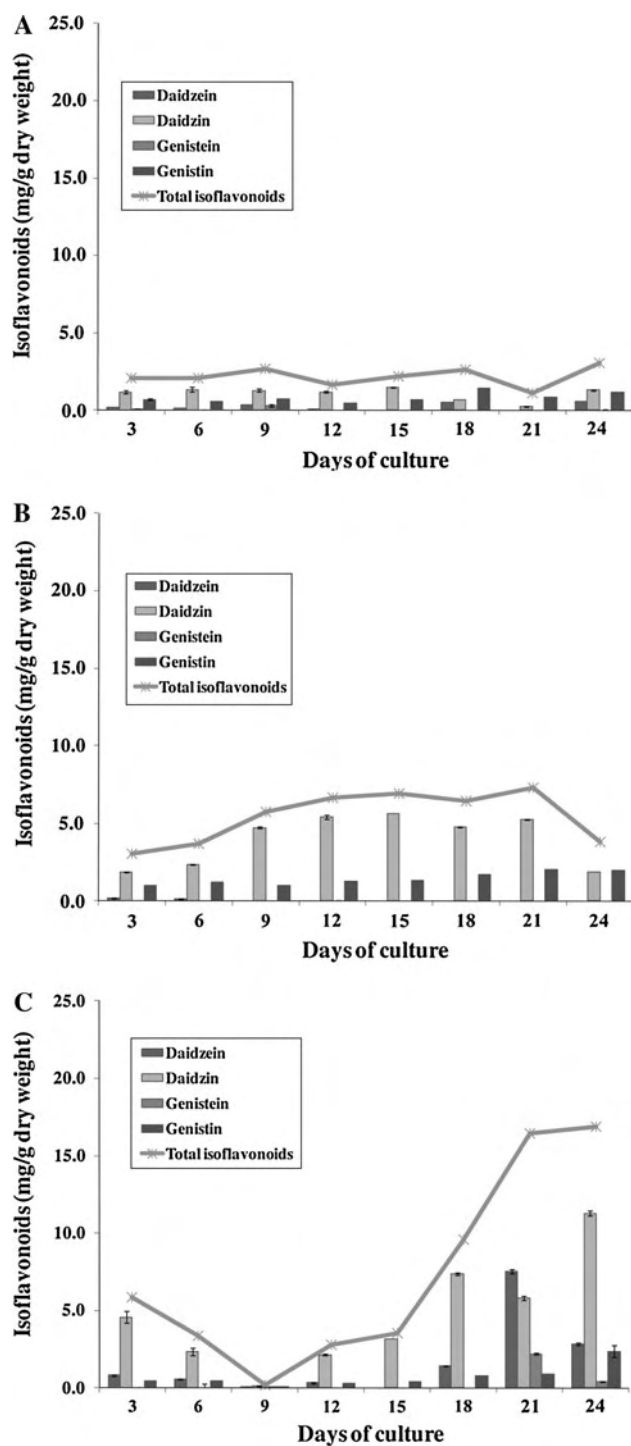
#### Isoflavonoid accumulation of cell suspension cultures

HPLC analysis of the suspension cultures demonstrated that four isoflavonoids, i.e., daidzein, genistein, daidzin, and genistin, were produced and accumulated in suspension culture of both varieties of *P. candollei* (Figs. 3 and 4). The highest total isoflavonoid contents for all cell lines were achieved within 18–24 days and varied from  $3.03$  to  $23.82 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ . Moreover, a stem-derived cell line of *P. candollei* var. *candollei* produced the highest total isoflavonoids ( $23.82 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ) on day 18 of culture. The major isoflavonoid that accumulated in every cell line was daidzin, which was present at a much higher concentration when compared to the other compounds (Figs. 3 and 4). However, the genistin content of stem-derived cell suspension cultures was quite comparable to that of daidzin (Fig. 3b).



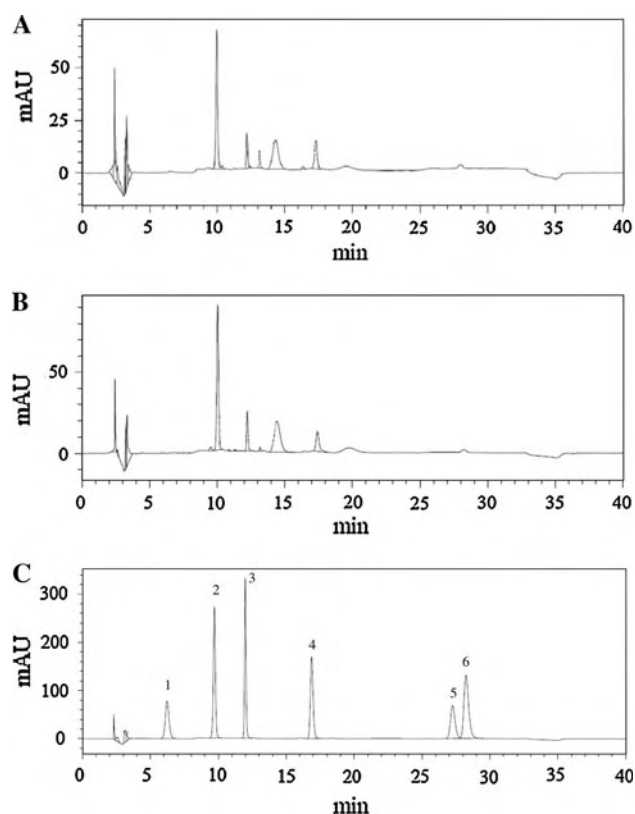
**Fig. 3** Isoflavonoid contents of cell suspension cultures of *P. candollei* var. *candollei* from different cell lines: leaf-derived (a), stem-derived (b) and root-derived (c) cell lines

In all the cell lines of *P. candollei* var. *candollei*, the total isoflavonoid contents started to increase from day 15 of culture. This also occurred in a *P. candollei* var. *mirifica* root-derived cell line, but not in leaf and stem-



**Fig. 4** Isoflavonoid contents of cell suspension cultures of *P. candollei* var. *mirifica* from different cell line: leaf-derived (a), stem-derived (b) and root-derived (c) cell lines

derived cell lines (Figs. 3 and 4). The HPLC chromatograms of cell suspension culturing from *P. candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* are shown in Fig. 5.



**Fig. 5** HPLC chromatograms of cell suspension cultures: root-derived cell suspension cultures of *P. candollei* var. *candollei* (a) and *P. candollei* var. *mirifica* (b). HPLC chromatogram of standard isoflavonoid compounds (c) for peak identification. 1 puerarin, 2 daidzin, 3 genistin, 4 daidzein, 5 genistein, and 6 coumestrol

Browning was observed in leaf- and stem-derived cell lines of *P. candollei* var. *candollei*, and high isoflavonoid contents were achieved in these cell lines. The highest isoflavonoid contents were found in the cell line derived from the stem of *P. candollei* var. *candollei* on day 18 of culture, which coincided with the day of culture browning.

The contents of isoflavonoid glycoside (daidzin and genistin) in cell suspension cultures of both varieties of *P. candollei* were higher than the contents of the non-conjugated forms (daidzein and genistein). This was similar to the accumulation pattern in the intact plant (Table 3); however, the isoflavonoid contents were much higher in the cell suspension cultures. The data from another publication also showed a similar pattern of

conjugated/non-conjugated isoflavonoid accumulation in the tuberous root of *P. candollei* var. *mirifica* (Cherdshe-wasart et al. 2007).

Puerarin and coumestrol were undetectable in all cell lines, whereas we found puerarin in the tuberous roots of both varieties (Table 3). However, both puerarin and coumestrol were found in the intact tuberous root of *P. candollei* var. *mirifica* (Chansakaow et al. 2000b; Ingham et al. 1986). The culturing period may affect the isoflavonoid accumulation profiles, especially in the case of coumestrol and puerarin. This might relate to the biosynthesis of these compounds, which are formed in later steps of biosynthesis pathways (Dewick 1994; Inoue and Fujita 1977). This occurred in the case of *P. candollei* var. *mirifica*: an 8-week-old callus (56 days) accumulated high amounts of daidzin, genistin, and puerarin (Udomsuk et al. 2009). Moreover, unorganized or dedifferentiated tissue may not accumulate certain metabolites because of the lack of cellular differentiation (Bourgaud et al. 2001; Su 1995).

In this study, the isoflavonoid accumulation patterns of *P. candollei* cell suspension cultures were different from those of the *P. candollei* var. *mirifica* callus cultured on semi-solid medium (Thanonkeo and Panichajakul 2006; Udomsuk et al. 2009). This difference may be due to factors that differ between suspension culture conditions and culturing of calli on semi-solid media, including shear stress from agitation and limited oxygen supplied in liquid medium. These factors might affect growth and secondary metabolite accumulation (Zhong et al. 1995).

From our results, cell suspension cultures of both varieties of *P. candollei* were able to produce higher amounts of isoflavonoid glycosides (daidzin and genistin) than non-conjugated isoflavonoids (daidzein and genistein). Additionally, the prices of those compounds are higher compared to the non-conjugated substances (daidzein and genistein). Our results showed that cell suspension cultures derived from both *P. candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* may be effective sources for producing the high-value isoflavonoid compounds daidzin and genistin. Moreover, the contents of isoflavonoids (daidzin, daidzein, genistin, and genistein) were higher in *P. candollei* cell suspension cultures (23.82 mg g<sup>-1</sup> DW), than in *Glycine max* suspension cultures (7.2 mg g<sup>-1</sup> DW) (Federici et al. 2003).

**Table 3** Average isoflavonoid contents in *P. candollei* intact plants

| Plant parts    | Plant varieties                           | Average content $\pm$ S.E. (mg g <sup>-1</sup> DW) |                 |                 |                  |                  |            |
|----------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------|
|                |                                           | Daidzein                                           | Daidzin         | Genistein       | Genistin         | Puerarin         | Coumestrol |
| Tuberous roots | <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> | 0.30 $\pm$ 0.09                                    | 0.46 $\pm$ 0.30 | 0.06 $\pm$ 0.01 | 0.16 $\pm$ 0.02  | 11.66 $\pm$ 1.94 | ND         |
|                | <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>  | 0.16 $\pm$ 0.06                                    | 0.23 $\pm$ 0.09 | ND              | 0.06 $\pm$ 0.004 | 5.52 $\pm$ 1.29  | ND         |

ND Not determined

In conclusion, we developed a cell suspension culture method for *P. candollei* that provided high production of daidzin and genistin, in as little as 24 days. The validated HPLC protocol was not time intensive and allowed accurate simultaneous analysis of the isoflavonoids accumulated in the *P. candollei* cell suspension cultures.

**Acknowledgments** This work was supported by the Thailand Research Fund (DBG4980009). SK is grateful for financial support from the Royal Golden Jubilee Program (PHD/0143/2548).

## References

- AOAC International (2002) AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals MD, Gaithersburg
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci* 161:839–851
- Cain JC (1960) Miroestrol: an oestrogen from the plant *Pueraria mirifica*. *Nature* 188:774–777
- Chansakaow S, Ishikawa T, Seki H, Sekine K, Okada M, Chaichantipyuth C (2000a) Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of “Kwao Keur”, *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. *J Nat Prod* 63:173–175
- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okada M, Higuchi Y, Kudo M, Chaichantipyuth C (2000b) Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med* 66:572–575
- Cherdshewasart W, Sutjit W (2008) Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine* 15:38–43
- Cherdshewasart W, Subtang S, Dahlan W (2007) Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *J Pharm Biomed Anal* 43:428–434
- Dewick P (1994) Isoflavonoids. In: Harborne JB (ed) *The flavonoids*. Chapman & Hall, London
- Federici E, Touche A, Choquart S, Avanti O, Fay L, Offord E, Courtois D (2003) High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures. *Phytochemistry* 64:717–724
- Ingham JL, Tahara S, Dziedzic SZ (1986) A chemical investigation of *Pueraria mirifica* roots. *Z Naturforsch* 41c:403–408
- Inoue T, Fujita M (1977) Biosynthesis of puerarin in *Pueraria* root. *Chem Pharm Bull* 25:3226–3231
- Keung WM (2002) *Pueraria: the genus Pueraria*. Taylor & Francis, New York
- Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J Biotechnol* 59:39–52
- Li L, Zhang CR (2006) Production of puerarin and isoflavones in cell suspension cultures of *Pueraria lobata* (Willd.): effects of medium supplementation with casein hydrolysate and coconut milk. *J Environ Biol* 27:21–26
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Niyomdham C (1992) Note on Thai and Indo-Chinese Phaseoleae (Leguminosae-Papilionoideae). *Nord J Bot* 12:339–346
- Sakuta M, Komamine A (1988) Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: Constabel F, Vasil I (eds) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press, Orlando
- Su W (1995) Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. *Appl Biochem Biotechnol* 50:189–230
- Thanonkeo S, Panichajakul S (2006) Production of isoflavones, daidzein and genistein in callus cultures of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica*. *Songklanakarin J Sci Technol* 28:45–53
- Trisomboon H, Malaivijitnond S, Suzuki J, Hamada Y, Watanabe G, Taya K (2004a) Long-term treatment effects of *Pueraria mirifica* phytoestrogens on parathyroid hormone and calcium levels in aged menopausal cynomolgus monkeys. *J Reprod Dev* 50:639–645
- Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Taya K (2004b) Estrogenic effects of *Pueraria mirifica* on the menstrual cycle and hormone-related ovarian functions in cyclic female cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Sci* 94:51–59
- Trisomboon H, Malaivijitnond S, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K (2006) Effect of *Pueraria mirifica* on the sexual skin coloration of aged menopausal cynomolgus monkeys. *J Reprod Dev* 52:537–542
- Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H, Putalun W (2009) Production of isoflavonoids in callus cultures of *Pueraria candollei* var. *mirifica*. *Z Naturforsch C* 64:239–243
- Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S (2007) *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. *Maturitas* 56:322–331
- Xu M, Dong J, Zhu M (2006) Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced puerarin biosynthesis in *Pueraria thomsonii* Benth. suspension cells through a salicylic acid (SA)-dependent and a jasmonic acid (JA)-dependent signal pathway. *Sci China Ser C* 49:379–389
- Zhong JJ, Yu JT, Yoshida T (1995) Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. *World J Microbiol Biotechnol* 11:461–467

# Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures

Sirintra Korsangruang · Noppamas Soonthornchareonnon ·  
Yupyn Chintapakorn · Promchit Saralamp ·  
Sompop Prathanurug

Received: 1 May 2010 / Accepted: 15 June 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** This study demonstrates the effects of various concentrations of abiotic and biotic elicitors on the cell growth and isoflavonoid accumulation of *P. candollei* var. *mirifica* (PM) and *P. candollei* var. *candollei* (PC) cell suspension cultures. The two plant varieties exhibited different growth responses and varied isoflavonoid accumulation after the addition of elicitors. Copper sulfate, methyl jasmonate (MeJA), and yeast extract did not significantly affect the growth of either plant variety, whereas oligosaccharide and the biotic elicitors used in this study [i.e., 50 mg l<sup>-1</sup> chitosan and all concentrations of laminarin (LAM)] suppressed the growth of PM. The addition of MeJA to the medium principally induced an effect on the isoflavonoid content in both PM and PC, with 2.0 μM MeJA inducing the highest isoflavonoid content, as indicated by the induction index—4.41 in PM and 9.62 in PC cells on the 12th and ninth day of culture, respectively. A maximum total isoflavonoid content of 40.49 mg g<sup>-1</sup> dry weight was achieved in PM 21 days after elicitation with 2.0 μM MeJA. LAM elicited the PM cell suspension culture to produce puerarin, which was not found in the unelicited culture. The results of this study provide

information that will be useful for enhancing the accumulation of isoflavonoids in *P. candollei* cell suspension cultures.

**Keywords** Elicitor · Fabaceae · HPLC · Isoflavonoid · Medicinal plant · *Pueraria candollei* · Tissue culture

## Abbreviations

|                   |                                           |
|-------------------|-------------------------------------------|
| BA                | 6-Benzyladenine                           |
| CHI               | Chitosan                                  |
| CuSO <sub>4</sub> | Copper sulfate                            |
| 2,4-D             | 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid            |
| II index          | Isoflavonoid induction index              |
| JA                | Jasmonic acid                             |
| LAM               | Laminarin                                 |
| MeJA              | Methyl jasmonate                          |
| PC                | <i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i> |
| PM                | <i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>  |
| YE                | Yeast extract                             |

## Introduction

*Pueraria candollei* var. *candollei* (PC) and *P. candollei* var. *mirifica* (PM) (Fabaceae) are two well-known legume species. In Thailand, they are commonly known as “kwao krua”. The botanical characteristics of both plants are similar; however, PM has shorter pods covered with longer hairs (Prathanurug et al. 2000; van der MaeSen 2002). The dried, tuberous roots of PM are used ethnomedically as a tonic for rejuvenation in elderly individuals (Kashemsanta and Lakshnakara 1952). The chemical constituents of these plants include chromenes, coumestrans, and

S. Korsangruang · P. Saralamp · S. Prathanurug (✉)  
Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy,  
Mahidol University, 447 Sri-ayuthaya Road, Bangkok 10400,  
Thailand  
e-mail: pyspr@mahidol.ac.th

N. Soonthornchareonnon  
Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol  
University, 447 Sri-ayuthaya Road, Bangkok 10400, Thailand

Y. Chintapakorn  
Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn  
University, Bangkok, Thailand

isoflavones, such as daidzein, genistein (and their glycosides, daidzin and genistin), and puerarin, all of which possess estrogenic activity (Chansakaow et al. 2000; Ingham et al. 1986; Tahara 1987). *P. candollei* is currently used as an active ingredient in numerous herbal and cosmetic products.

Plants have many defensive systems that work as protective mechanisms against disturbance or attack by physical, chemical, microorganismal, or biological factors. After triggering the signal transductions of the defensive pathway, transcription factors regulate the production of secondary metabolites by means of phytoalexins—low-molecular-weight substances with various useful biological actions (Endress 1994; Evans 2002; Zhao et al. 2005). The production, accumulation, and excretion of secondary metabolites into cell cultures can be induced by both biotic and abiotic elicitors (Braz et al. 1990; Endress 1994). The abiotic elicitation effects of heavy metals, in the form of inorganic salts added to the culture medium, have been studied in plant culture systems. For example, copper (Cu) is usually used in the form of sulfate or chloride salts to induce secondary metabolite production in plants (Bhuiyan and Adachi 2003; Engelmann et al. 2009; Hakamatsuka et al. 1991; Liu and Dixon 2001). The jasmonic acid (JA) signaling pathway is a transducer or mediator for elicitor signaling that can lead to the accumulation of plant secondary metabolites (Zhao et al. 2005). Exogenous applications of jasmonic acid and its related compounds (such as methyl jasmonate, MeJA) have been used to study the effects of these elicitors on plant secondary metabolite production (Chen and Chen 2000; Gadzovska et al. 2007; Hayashi et al. 2003; Kirakosyan et al. 2006; Modolo et al. 2002). Biotic elicitors have been intensively studied with respect to their role in isoflavonoid accumulation via various mechanisms of elicitation. Yeast extract (YE) is often used as a biotic elicitor in plant–microbe interaction studies. For example, YE was used to induce chalcone synthase (*CHS*) expression in cell suspension cultures of *P. lobata* to clone the gene-coding enzyme (Nakajima et al. 1991). Poly- or oligosaccharides are signaling molecules with elicitation pathways that have been intensively studied because these compounds can substitute for fungal elicitors during a pathogen attack (Zhao et al. 2005). Chitin and chitosan (CHI, deacetylated chitin) are exogenous biotic elicitors that are derived from the fungal cell wall (Montesano et al. 2003). These elicitors have been studied for their effects on phenylpropanoid metabolic enzymes (Funk and Brodelius 1990) and secondary metabolite production (Zhang et al. 2000; Wise et al. 2009). Laminarin, a linear  $\beta$ -1,3-glucan, is an interesting glucan elicitor that has also been used in studies on the effects of elicitation on secondary metabolite production (Aziz et al. 2003; Cosi et al. 2007; Klarzynski et al. 2000).

Plant cell cultures are appropriate tools for examining secondary metabolite production (Evans 2002), especially cell suspension culture techniques that can aid in the understanding of elicitation and immobilization, including how these processes function in bioreactor studies (Bourgaud et al. 2001; George 2008). Cell suspension cultures from PC and PM have recently been established to concomitantly analyze isoflavonoid compounds (Boonsongcheep et al. 2010). There are a number of publications related to the improvement of isoflavonoid accumulation using various elicitors in cell cultures of *Pueraria* spp. (Goyal and Ramawat 2008; Hakamatsuka et al. 1991; Maojun et al. 2006; Park et al. 1995). However, to the best of our knowledge, there have been no reports on the effects of elicitors on isoflavonoid accumulation in *P. candollei* cell suspension cultures.

The aims of this study were (1) to determine the effects of various concentrations of abiotic and biotic elicitors on the cellular growth rate and the accumulation of isoflavonoids in *P. candollei* cell suspension cultures and (2) to identify the most effective elicitor capable of inducing the highest amount of isoflavonoids. Elicitors were applied in the pre-exponential phase of the growth curve (representing the period when the cell is preparing for growth) in order to study their effect on the growth promotion that is associated with secondary metabolism. The data derived from this study will be useful in improving isoflavonoid production in *P. candollei* cell suspension cultures in various fields of plant biotechnology and will also aid in the study of the isoflavonoid biosynthesis pathway.

## Materials and methods

### Plant cell cultures and elicitor treatments

Calli were obtained from PM and PC roots using the protocol established by Boonsongcheep et al. (2010). A 500-mg sample of callus tissue was transferred into a 125-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of MS (Murashige and Skoog 1962) medium supplemented with 0.56  $\mu\text{M}$  6-benzyladenine (BA) and 4.52  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The cultures were maintained on a shaker at 110 rpm at  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  under a 16/8-h light/dark photoperiod with light supplied at an intensity of  $37.5 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Six days after initiation of the cell suspension culture, an aliquot of each elicitor [copper (II) sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Whitehouse Station, NJ), MeJA (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), YE (Merck), CHI (minimum 85% deacetylated, Sigma), and laminarin (LAM) (Sigma–Aldrich)] was added to separate flasks. The final concentrations of each elicitor were (1)  $\text{CuSO}_4$ : 0.125, 0.625, 1.25  $\text{mg l}^{-1}$  (equivalent to 5-, 25- and 50-fold  $\text{CuSO}_4$  in

MS media, respectively); (2) MeJA: 0.5, 1.0, 2.0  $\mu\text{M}$ ; (3) YE: 0.5, 1.0, 2.0  $\text{mg l}^{-1}$ ; (4) CHI: 1.0, 10.0, 50.0  $\text{mg l}^{-1}$ ; (5) LAM: 0.05, 0.1, 0.2  $\text{mg ml}^{-1}$ . The cells were incubated with each elicitor for a further 21 days under identical growth conditions.

The controls for the  $\text{CuSO}_4$ , YE, and LAM treatments contained sterile deionized water in the same quantities as the added elicitors. The controls for the CHI and MeJA treatments contained 1% acetic acid (Merck) and absolute ethanol (Merck) solvent, respectively, which were added in the same quantities as the elicitors. The pH of all of the experimental media was adjusted to 5.8 before autoclaving. Stock  $\text{CuSO}_4$ , YE, LAM, and CHI solutions, including the 1% acetic acid solution, were sterilized by autoclaving, whereas the stock MeJA solution and ethanol were filter-sterilized through a 0.20- $\mu\text{m}$  syringe filter.

#### Cell growth and isoflavonoid content determination

Following the addition of the elicitor to the cell suspension, three flasks for each treatment, including the control group, were collected every 3 days from the ninth to the 27th day of culture. The collected cells were dried at  $60^\circ\text{C}$  for 48 h to obtain the dried biomass as described by Boonsongcheep et al. (2010). The growth index for the *P. candollei* cell suspension cultures was determined on a phytomass dry weight (DW) basis as follows: dry growth index = (Final DW – Initial DW)/Initial DW (Kittipongpatana et al. 1998).

For the isoflavonoid analysis, each sample was extracted three times with methanol (anhydrous; JT Baker, Deventer, the Netherlands) using a sonication technique at  $45^\circ\text{C}$  for 30 min. After complete evaporation, 100 mg of the extract was dissolved with methanol [high-performance liquid chromatography (HPLC) grade; Fisher Chemical, Thermo Fisher, Waltham, MA], and the volume was adjusted to 10.0 ml for HPLC analysis. Separation was performed in a purospher RP-18 column ( $250 \times 3.0$  mm i.d., particle size 5  $\mu\text{m}$ ). The gradient of the mobile phases between solvent A (0.2% acetic acid in water) and solvent B (acetonitrile) was carried out using validated simultaneous HPLC (Boonsongcheep et al. 2010).

To compare the induction effect of each elicitor on the isoflavonoid accumulation of the *P. candollei* cell suspension cultures, the isoflavonoid induction index was determined from the total isoflavonoid content using the following equation: isoflavonoid induction index (II Index) = (Total isoflavonoid<sub>elicitor</sub> – Total isoflavonoid<sub>control</sub>)/Total isoflavonoid<sub>control</sub>.

#### Statistical analysis

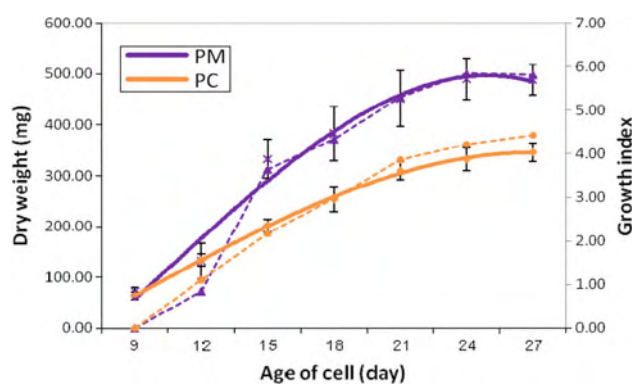
Three replications were conducted for each treatment. The data obtained were analyzed using analysis of variance

(ANOVA) and Duncan's analysis with significance set at a  $p$  value = 0.05.

## Results and discussion

#### Growth and isoflavonoid accumulation of the untreated *P. candollei* cell suspension cultures

Figure 1 shows the growth pattern of the untreated cell suspension cultures (control) based on dried biomass. The stationary phase of the growth curve indicates that PM cell suspension cultures grew about 1.5-fold better than those of PC. The highest average dried biomass from all of the experiments of the untreated PM phytomass was  $490.27 \text{ mg flask}^{-1}$ , which occurred on the 24th day of culture; the untreated PC cell suspension cultures had an average dried biomass of  $345.99 \text{ mg flask}^{-1}$  on the 27th day. The cell suspension cultures of both varieties reached the stationary phase at the 24th day of cell culture (Fig. 1), as indicated by the growth index. Daidzin and genistin were the major glycoside compounds present in the culture medium of both varieties. The highest average total isoflavonoid contents in the PM and PC cell suspension cultures were found on day 27 of the culture and measured 21.67 and  $19.58 \text{ mg g}^{-1}$  DW, respectively. The ratios of non-conjugated:conjugated isoflavonoid (daidzin:daidzein and genistin:genistein) accumulation in the PM cell suspension were 16:9 and 3:1, respectively, whereas the PC cell suspension accumulated these isoflavonoids at ratios of 3:1 and 7:1, respectively. Our results show the same pattern of isoflavonoid accumulation in *P. candollei* cell suspension cultures as was previously reported by Boonsongcheep et al. (2010).



**Fig. 1** Growth and growth index of the *Pueraria candollei* cell suspension cultures (*PC Pueraria candollei* var. *candollei*, *PM P. candollei* var. *mirifica*). The lines show the average dried biomass of the untreated cells from all experiments. Solid line dry weight, dashed line growth index

### The effects of elicitors on the growth of *P. candollei* cell suspension cultures

The growth of PM and PC cell suspension cultures was not affected by the addition of CuSO<sub>4</sub>, MeJA, and YE to the medium at the concentrations used in this study (Fig. 2a, b). High concentrations of CHI (50 mg l<sup>-1</sup>) significantly suppressed the growth of PM (from the 12th day to the 27th day of culture) and PC (from the 15th day to the 18th day of culture) ( $p = 0.05$ ). LAM, at all of the concentrations examined, also significantly suppressed the growth of PM up to the 12th day of culture ( $p = 0.05$ ); however, it had no significant effect on the growth of the PC cell suspension (Fig. 2). The LAM treatments at 0.1 and 0.2 mg ml<sup>-1</sup> slightly decreased the dried biomass of the PC cells between the 15th day and the 18th day of the culture. In addition to the growth-suppression effects of CHI and LAM, cells treated with these compounds also developed serious browning. The browned cells could, however, slowly re-grow within the phase of exponential growth. These results demonstrate that the oligosaccharide biotic elicitors (CHI and LAM) are able to suppress the growth of *P. candollei* cell suspension cultures, especially in PM cells, while CuSO<sub>4</sub>, MeJA, and YE did not significantly affect the growth of the suspension cultures.

### The effects of CuSO<sub>4</sub> on isoflavonoid accumulation

After the PM and PC cell suspension cultures were treated with CuSO<sub>4</sub>, a slight accumulation effect in the total isoflavonoid content was observed until the cells reached a stationary phase (Fig. 3). When PM cells were treated with five doses of CuSO<sub>4</sub> in MS media, the II Index gradually increased from the 12th day (0.21) to the 18th day (1.24). In contrast, in the PC cell culture, the highest II Index (2.04) was obtained 3 days following the addition of CuSO<sub>4</sub> (five doses) to MS media (Fig. 8a). Because polyphenolic compounds, such as isoflavonoids, act as metal-chelating compounds that could alleviate metal toxicity in plant cells (Jung et al. 2003), it is possible that the five-fold treatment dosage of CuSO<sub>4</sub> in this study induces the accumulation of isoflavonoids in PM cells.

Plant cells generate hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) after receiving a signal from abiotic elicitors such as metal ions (Apel and Hirt 2004). In general, high doses of metal, such as Cu, may cause toxicity in cells by interfering with enzymatic activity, causing DNA alterations, disturbing metabolism, and inhibiting growth (Fernandes and Henriques 1991; Maksymiec 1997). Ali et al. (2006) reported that the concentration and the time of Cu exposure affected the growth of *Panax ginseng* root cultures, including the ginsenoside content and other enzyme activities, and that Cu uptake also increased in the cells. Our results may

imply that CuSO<sub>4</sub>, especially at higher concentrations (25- and 50-fold doses in the MS media), affects *P. candollei* cells after long periods of exposure and causes a decrease in isoflavonoid accumulation when cells were closed to the stationary phase of their growth.

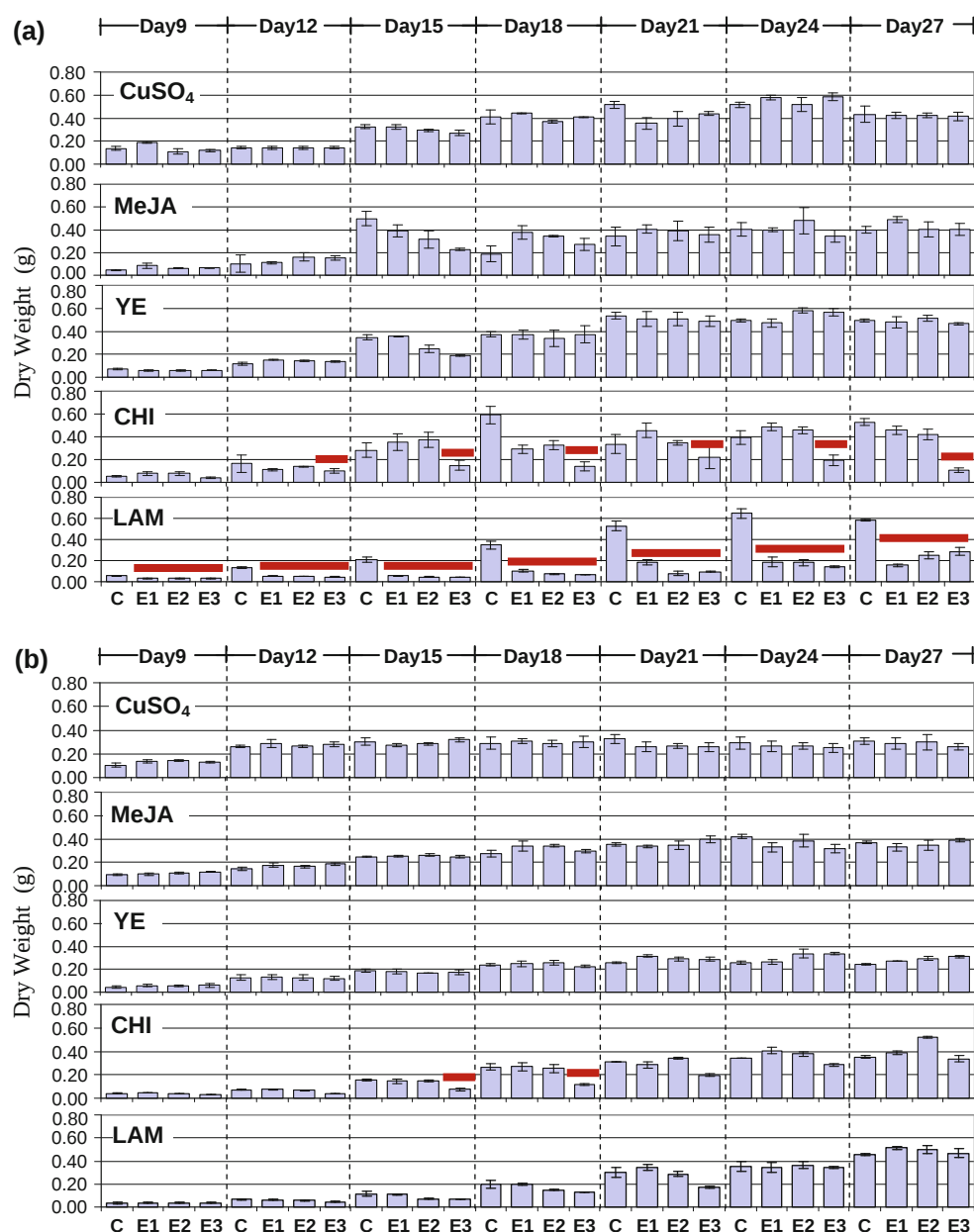
### The effects of MeJA on isoflavonoid accumulation

Methyl jasmonate, a well-known abiotic elicitor, induced isoflavonoids in the PM and PC cell cultures at all concentrations. The addition of MeJA generally increased the total isoflavonoid content after 3 days of elicitation (i.e., on day 9 of culture) (Fig. 4). The addition of 1.0 and 2.0 μM MeJA significantly increased the total isoflavonoid content in the PM cells to a higher level than the control from the 12th day to the 21st day of culture ( $p = 0.05$ ), whereas 2.0 μM MeJA significantly enhanced the total isoflavonoid content in the PC cell suspension from the ninth day to the 18th day of culture ( $p = 0.05$ ). MeJA (2.0 μM) enhanced the accumulation of isoflavonoids; the II Index was 4.41 in PM cells on the 12th day and 9.62 in the PC cells on the ninth day of culture (Fig. 8b). These results demonstrate that MeJA induced isoflavonoid accumulation in the early growth phase after the addition of the elicitor in both plant varieties. Comparable trends for the early induction of MeJA were observed for anthraquinones, anthocyanin, and stilbene in their accumulation in morinda, ohelo, and grape cell suspension cultures, respectively (Chong et al. 2005; Fang et al. 1999; Krisa et al. 1999).

In previous studies, a high concentration of MeJA was found to inhibit the growth of plant cell cultures (Bhuiyan and Adachi 2003; Colque et al. 2004; Zhao et al. 2010). Our preliminary study found that MeJA at concentrations of 5, 50, and 100 μM almost caused cell death after 3–6 days of elicitation (data not shown). Given these results, the concentrations of MeJA that were used in this study were not harmful to the cell growth and were accompanied by the enhancement of isoflavonoids and their glycoside accumulation.

### The effects of YE on isoflavonoid accumulation

In this study, YE enhanced the early accumulation of isoflavonoids after elicitation. Treatments with 0.5, 1.0, and 2.0 mg l<sup>-1</sup> YE resulted in II Indices of >0.5 on the ninth and 12th day in PM cell cultures and on the ninth day in PC cell cultures. The II Index approached negative values or displayed a suppression effect on the 15th day of culture, except in the PM cells that were treated with 2.0 mg l<sup>-1</sup> YE (Fig. 8c). Daidzein and genistein were induced by all concentrations of YE by day 12 following the addition of the elicitor to the medium (18th day of culture), whereas the non-glucosylated compounds were found at lower



**Fig. 2** Growth of *P. candollei* var. *mirifica* (a) and *P. candollei* var. *candollei* (b) cell suspension cultures after elicitation. The cells were treated with copper sulphate ( $\text{CuSO}_4$ ; C Control, E1 0.125 mg l<sup>-1</sup>, E2 0.625 mg l<sup>-1</sup>, E3 1.25 mg l<sup>-1</sup>), methyl jasmonate (MeJA; C control, E1 0.5  $\mu\text{M}$ , E2 1.0  $\mu\text{M}$ , E3 2.0  $\mu\text{M}$ ), yeast extract (YE; C control, E1 0.5 mg l<sup>-1</sup>, E2 1.0 mg l<sup>-1</sup>; E3 = 2.0 mg l<sup>-1</sup>), chitosan

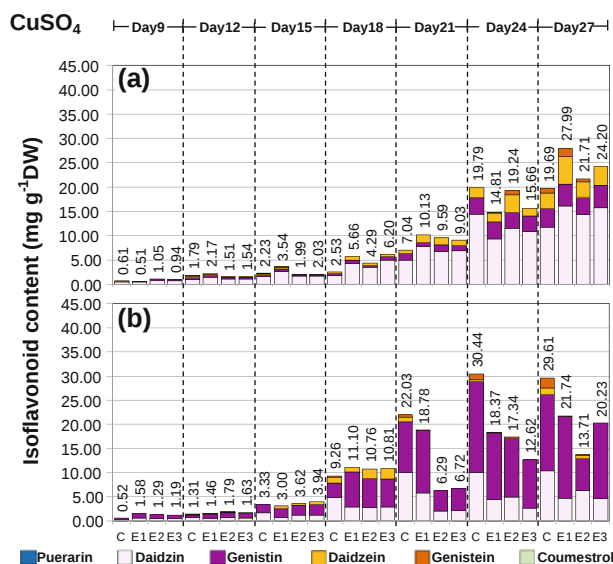
(CHI; C control, E1 1.0 mg l<sup>-1</sup>, E2 10.0 mg l<sup>-1</sup>, E3 50.0 mg l<sup>-1</sup>), and laminarin (LAM; C control, E1 0.05 mg l<sup>-1</sup>, E2 0.1 mg l<sup>-1</sup>, E3 0.2 mg l<sup>-1</sup>). The age of the cells is indicated by the day and is partitioned by dashed lines. The bold lines show the suppression effect of elicitors on the growth of cells when compared with the control at the 95% confidence interval (95% CI)

concentrations in the control cultures of both cell varieties (Fig. 5). Similar evidence of the increasing ratio between the isoflavonoid aglycones and their glucoconjugated compounds was also observed in the YE-treated roots of white lupin seedlings (Gagnon and Ibrahim 1997) and in the YE-treated cell suspension cultures of chickpeas (Mackenbrock et al. 1993). In our study, YE had a weak induction effect towards isoflavonoid accumulation in the PM and PC cell suspension cultures. Similarly, a number of

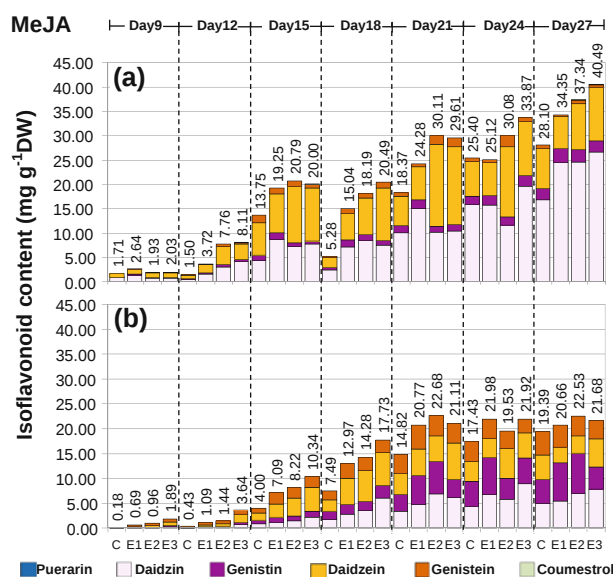
publications report that YE is less effective towards plant cells than the other elicitors (Funk and Brodelius 1990; Gagnon and Ibrahim 1997; Sanchez-Sampedro et al. 2005).

#### The effects of CHI on isoflavonoid accumulation

In PM and PC cell suspension cultures, higher (50.0 mg l<sup>-1</sup>) concentrations of CHI ( $\beta$ -1,4-linked glucosamine) decreased the total isoflavonoid content, whereas

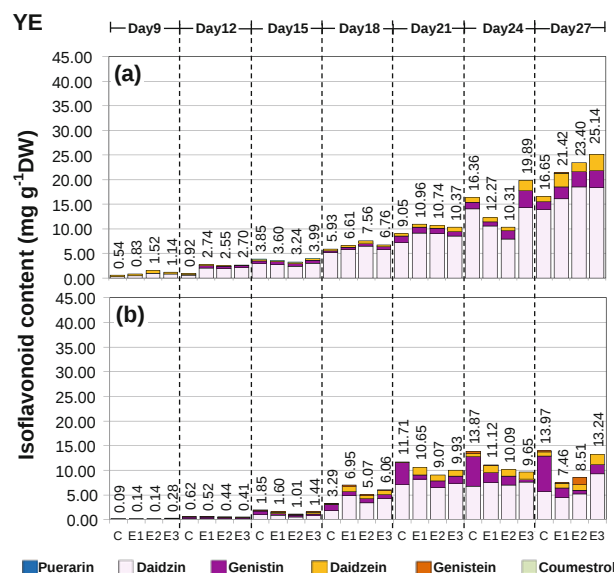


**Fig. 3** Isoflavonoid profiles of *P. candollei* var. *mirifica* (a) and *P. candollei* var. *candollei* (b) cell suspension cultures after treatment with  $\text{CuSO}_4$ . C control, E1 0.125 mg l<sup>-1</sup>, E2 0.625 mg l<sup>-1</sup>, E3 1.25 mg l<sup>-1</sup> (5-, 25-, 50-fold  $\text{CuSO}_4$  in MS media, respectively). The age of the cells is indicated by the day, which is partitioned by dashed lines

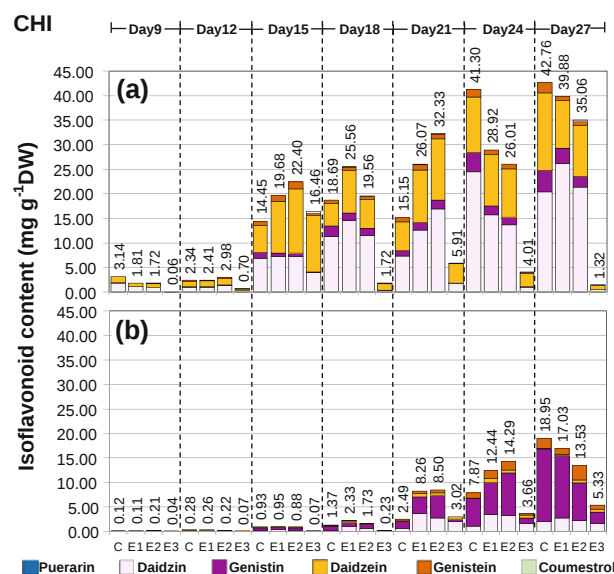


**Fig. 4** Isoflavonoid profiles of *P. candollei* var. *mirifica* (a) and *P. candollei* var. *candollei* (b) cell suspension cultures after treatment with MeJA. C Control, E1 0.5 μM, E2 1.0 μM, E3 2.0 μM. The age of the cells is indicated by the day, which is partitioned by dashed lines

concentrations ranging from 1.0 to 10.0 mg l<sup>-1</sup> increased the total isoflavonoid content in both cell varieties (Fig. 6). CHI at 10.0 mg l<sup>-1</sup> induced the highest II Index on the 21st day of culture, with II Index values of 1.13 and 2.41 in PM and PC cells, respectively (Fig. 8d). However, after both varieties arrived at the stationary phase of growth, a higher



**Fig. 5** Isoflavonoid profiles of *P. candollei* var. *mirifica* (a) and *P. candollei* var. *candollei* (b) cell suspension cultures after treatment with YE. C Control, E1 0.5 mg l<sup>-1</sup>, E2 1.0 mg l<sup>-1</sup>, E3 2.0 mg l<sup>-1</sup>. The age of the cells is indicated by the day, which is partitioned by dashed lines



**Fig. 6** Isoflavonoid profiles of *P. candollei* var. *mirifica* (a) and *P. candollei* var. *candollei* (b) cell suspension cultures after treatment with CHI. C Control, E1 1.0 mg l<sup>-1</sup>, E2 10.0 mg l<sup>-1</sup>, E3 50.0 mg l<sup>-1</sup>. The age of the cells is indicated by the day, which is partitioned by dashed lines

total isoflavonoid content was found in the controls relative to the CHI-treated cells. There have been reports of CHI being less effective than other biotic elicitors (Bhuiyan and Adachi 2003; Fang et al. 1999).

Coumestrol was detected in some samples of PM cells that were treated with 1.0, 10.0, and 50.0 mg l<sup>-1</sup> CHI.

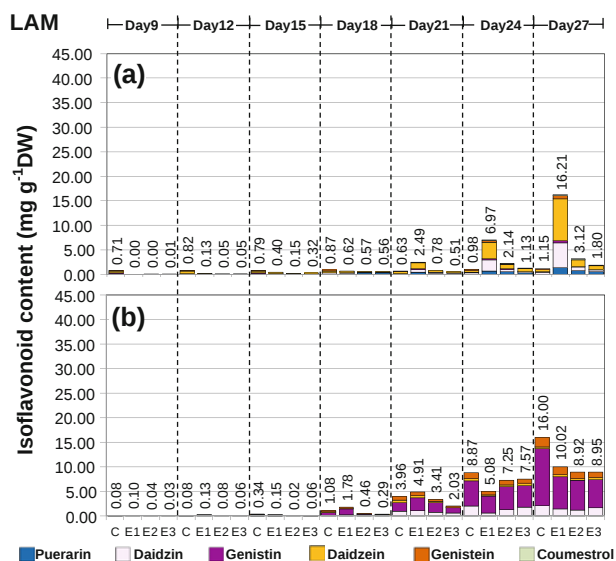
A relatively high amount of coumestrol ( $0.46 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ) was found in PM cells treated with  $50 \text{ mg l}^{-1}$  CHI on the 15th day of culture. It should be noted that a high concentration of CHI made the cells significantly brown with aging. The accumulation of coumestrol may relate to the browning of the cells, especially in the PM cells, which are more sensitive to stress than the PC cells. It is generally accepted that the production of compounds may relate to the stress level of the cell cultures, including the effectiveness of each elicitor (Vasconsuelo and Boland 2007). Coumestrol, a coumestans compound, has been reported to be found in the intact tuberous root of PM (Chansakaow et al. 2000; Ingham et al. 1988). In addition, Bourgaud et al. (1999) demonstrated that CHI increased the accumulation of coumestrol in the older (brown) tissue of *Psoralea lachnostachys* hairy root cultures, whereas daidzein was induced in younger tissue. In our study, the accumulation of coumestrol in the PM cell cultures may be related to stress-induced aging after the treatment with CHI.

#### The effects of LAM on isoflavonoid accumulation

LAM at  $0.05 \text{ mg ml}^{-1}$  significantly enhanced the production of isoflavonoid compounds in the PM cell suspension cultures on the 21st day ( $p = 0.05$ ), whereas higher concentrations showed only a slight effect on isoflavonoid production (Fig. 7). The addition of  $0.05 \text{ mg ml}^{-1}$  LAM produced the highest isoflavonoid accumulation in PM cells and resulted in an II Index of 13.06 on the 27th day of culture (Fig 8e). The use of  $0.05\text{--}2.0 \text{ mg ml}^{-1}$  LAM

caused browning in the PM cells that was similar to that observed in the CHI experiment. Although the cells were capable of re-growth after the 18th day of culture, the growth was still significantly suppressed from the day of elicitation to the stationary phase. This growth suppression may have been caused by the accumulation of phytoalexin compounds, which are biosynthesized in cells after a stress reaction. Some elicitors suppress primary metabolism and cause a shift towards secondary metabolite products that cause plant growth to slow down (Chong et al. 2005). Similar results for secondary metabolites associated with growth suppression were found in elicitor treatments on morinda, vanilla, and salvia cell suspension cultures (Chong et al. 2005; Funk and Brodelius 1990; Zhao et al. 2010). The PC cells were less sensitive to elicitors than the PM cell suspension cultures. LAM was not harmful to PC cells at any concentration and did not affect cell growth. Nevertheless, LAM did show a suppression effect in the PC cell suspension cultures after the 24th day of culture because it could not enhance the accumulation of isoflavonoid compounds as it did in the PM cells. LAM ( $1.0 \text{ mg ml}^{-1}$ ) has been reported to have a suppressive effect on resveratrol production in peanut hairy root cultures (Medina-Bolivar et al. 2007).

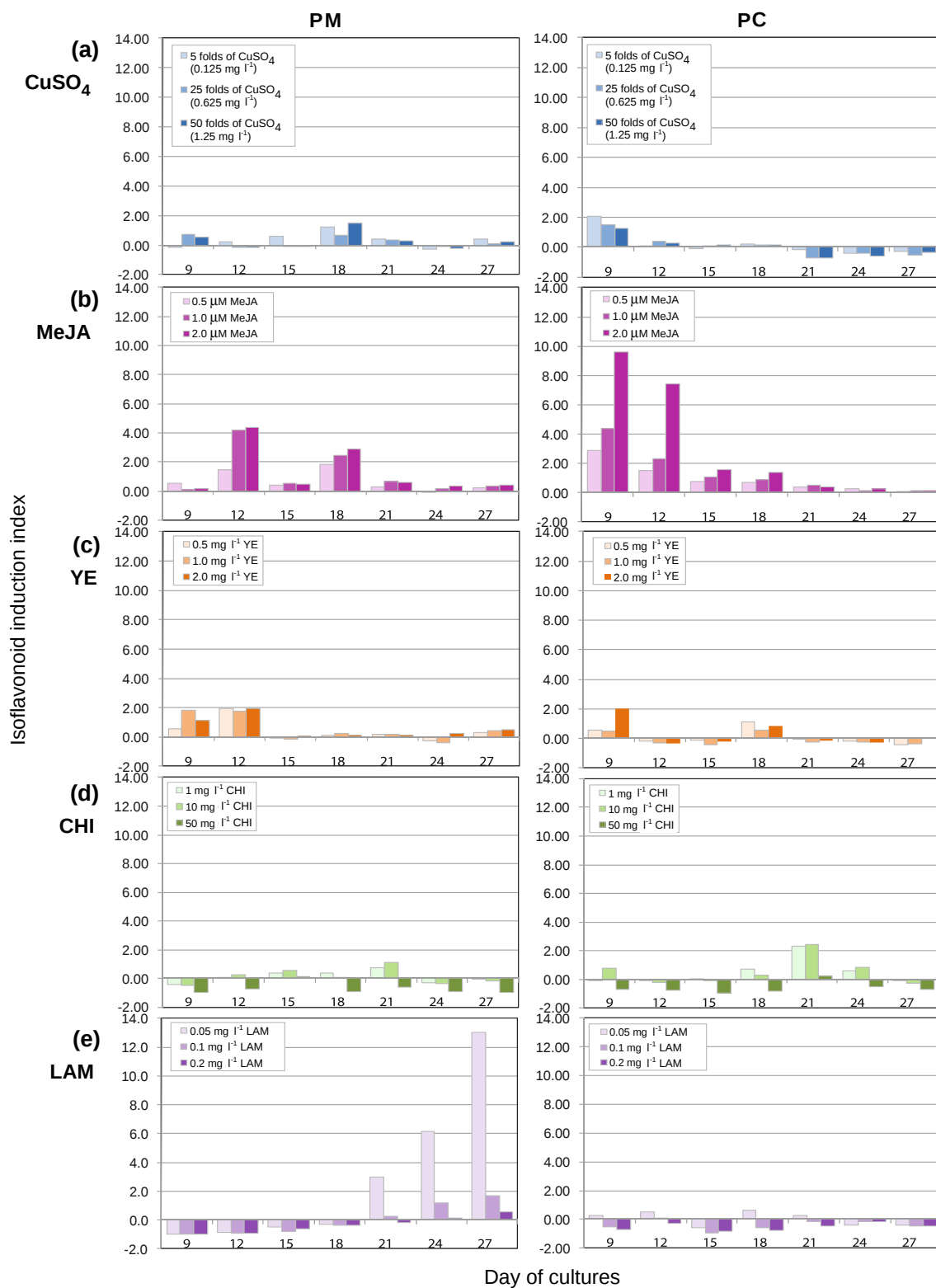
No puerarin was detected in the control groups of either plant variety, and this result is consistent with the findings of previous studies (Boonsongcheep et al. 2010). It is noteworthy, however, that LAM elicited the production of puerarin in the PM cell suspension culture 15 days after the addition of the elicitor (Table 1). This finding was coincident with the very low amounts or the absence of genistin and genistein in the cell cultures that were treated with LAM (Fig. 7). This effect may be related to the biosynthesis of puerarin, which is a daidzein-8-C-glucoside. Daidzein and genistein are biosynthesized in the same pathway, but there is an intermediate compound that is changed at a branch point by a number of catalytic enzymes (Yu and McGonigle 2005). There are only limited data on the puerarin biosynthesis pathway (Inoue and Fujita 1974, 1977); LAM treatment may thus be used to study the expression of some genes that are involved in the puerarin biosynthesis pathways, especially in cell suspension cultures. LAM at  $0.05$  and  $1.0 \text{ mg ml}^{-1}$  also induced low amounts of coumestrol ( $<0.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ) in some samples of PM cell cultures when the cells reached the stationary growth phase (after the 24th day of culture) (Fig. 7).



**Fig. 7** Isoflavonoid profiles of *P. candollei* var. *mirifica* (a) and *P. candollei* var. *candollei* (b) cell suspension cultures after treatment with LAM. C Control, E1  $0.05 \text{ mg ml}^{-1}$ , E2  $0.1 \text{ mg ml}^{-1}$ , E3  $0.2 \text{ mg ml}^{-1}$ . The age of the cells is indicated by the day, which is partitioned by dashed lines

#### Conclusion

Our results suggest that MeJA, the most-studied elicitor, had a superior induction effect on isoflavonoid accumulation



**Fig. 8** Comparison of the induction effect of the elicitors on isoflavonoid accumulation in *P. candollei* var. *mirifica* (PM) and *P. candollei* var. *candollei* (PC) cell suspension cultures. The data are presented as the isoflavonoid induction index (II Index)

in both of the varieties of *P. candollei* cell suspension cultures studied here. After treatment with 2.0  $\mu\text{M}$  MeJA, the total isoflavonoid contents in the PM cell suspension

were the highest, 40.49  $\text{mg g}^{-1}$  DW, on the 27th day compared with those found in the normal cell suspension cultures of PM, PC (Boonsongcheep et al. 2010), and in

**Table 1** Average puerarin contents in *Pueraria candollei* var. *mirifica* after elicitation with laminarin

| Laminarin concentration (mg ml <sup>-1</sup> ) | Day of culture (day after elicitation) |        |        |                 |                 |                 |                 |
|------------------------------------------------|----------------------------------------|--------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                                | 9 (3)                                  | 12 (6) | 15 (9) | 18 (12)         | 21 (15)         | 24 (18)         | 27 (21)         |
| 0.00                                           | ND                                     | ND     | ND     | ND              | ND              | ND              | ND              |
| 0.05                                           | ND                                     | ND     | ND     | 0.2244 ± 0.0115 | 0.3940 ± 0.0620 | 0.6890 ± 0.4597 | 1.3808 ± 0.4133 |
| 0.10                                           | ND                                     | ND     | ND     | 0.2789 ± 0.0351 | 0.2345 ± 0.0560 | 0.5325 ± 0.1562 | 0.7657 ± 0.1662 |
| 0.20                                           | ND                                     | ND     | ND     | 0.3107 ± 0.0433 | 0.1990 ± 0.0175 | 0.2562 ± 0.0249 | 0.5338 ± 0.0346 |

ND Not determined

Puerarin content is given in milligrams per gram dry weight

the elicitor-treated cell suspension of *P. tuberosa* (Goyal and Ramawat 2008) from previous studies. These results may imply that MeJA is connected directly to jasmonate signaling, including the oxylipin biosynthesis pathway, whereas the biotic elicitors have more complex stress responses. None of the elicitors tested here showed a dominant-enhancing property on cell growth in either variety. Moreover, high concentrations of CHI and LAM suppressed cell growth, especially in the PM cell suspension cultures.

In summary, the two plant varieties showed different growth responses and isoflavonoid accumulations after treatment with the elicitors. The differential response was especially prominent in the case of the oligosaccharide elicitor. The PM cell suspension was more sensitive than the PC cell suspension, and growth and isoflavonoid accumulation in the PM cells were more affected by elicitors than these processes in PC cells. To the best of our knowledge, this is the first time that the effects of abiotic and biotic elicitors on both *P. candollei* var. *mirifica* and *P. candollei* var. *candollei* have been reported. Our data on the effects of these elicitors in *P. candollei* cell suspension culture will be useful in enhancing the accumulation of isoflavonoid compounds in such cells and can also be used to further extend other plant culture models.

**Acknowledgments** This work was supported by The Thailand Research Fund (DBG4980009). SK is grateful for financial support from The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0143/2548).

## References

- Ali MB, Hahn E-J, Paek K-Y (2006) Copper-induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors. *Plant Cell Rep* 25:1122–1132
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bézier A, Lambert B, Joubert J-M, Pugin A (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant Microbe Inter* 16:1118–1128
- Bhuiyan MNH, Adachi T (2003) Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *J Plant Physiol* 160:1117–1124
- Boonsongcheep P, Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathantharug S (2010) Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 101:119–126
- Bourgaud F, Bourgaud V, Guckert A (1999) Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 56:97–104
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci* 161:839–851
- Braz W, Beimen A, Drager B (1990) Turnover and storage of secondary products in cell cultures. In: Charlwood BV, Rhodes MJC (eds) *Proc Phytochemical Society of Europe: 30 secondary products from plant tissue culture*. Clarendon Press, London, pp 79–102
- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okada M, Higuchi Y, Kudo M, Chaichantipyuth C (2000) Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogen activity. *Planta Med* 66:572–575
- Chen H, Chen F (2000) Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 19:710–717
- Chong TM, Abdullah MA, Lai OM, Mor'Aini FM, Lajis NH (2005) Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochem* 40:3397–3405
- Colque R, Viladomat F, Bastida J, Codina C (2004) Improved production of galantamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Planta Med* 70:1180–1188
- Cosi E, Bettini P, Bindi D, Buiatti M (2007) The use of excised roots from in vitro culture for the determination of superoxide production in plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 89:203–209
- Endress R (1994) *Plant cell biotechnology*. Springer, Berlin
- Engelmann NJ, Reppert A, Yousef G, Rogers RB, Lila MA (2009) In vitro production of radiolabeled red clover (*Trifolium pretense*) isoflavones. *Plant Cell Tiss Org Cult* 98:147–156
- Evans WC (2002) Plant cell and tissue culture; biochemical conversions; clonal propagation. In: Evans WC (ed) *Trease and Evans pharmacognosy*. W.B. Saunders, Edinburgh, pp 72–169
- Fang Y, Smith MAL, Pepin MF (1999) Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35:106–113
- Fernandes JC, Henriques FS (1991) Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot Rev* 57:246–273
- Funk C, Brodelius P (1990) Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* 29:845–848

- Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, Joseph C, Haguège D (2007) Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrone. *Plant Cell Tiss Org Cult* 89:1–13
- Gagnon H, Ibrahim RK (1997) Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. *Phytochemistry* 44:1463–1467
- George EF (2008) Plant tissue culture procedure—background. In: George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, pp 1–28
- Goyal S, Ramawat KG (2008) Increased isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* by elicitors. *Indian J Biotech* 7:378–382
- Hakamatsuka T, Ebizuka Y, Sankawa U (1991) Induced isoflavonoids from copper chloride-treated stems of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry* 30:1481–1482
- Hayashi H, Huang P, Inoue K (2003) Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell Physiol* 44:404–411
- Ingham JL, Tahara S, Dziedzic SZ (1986) A chemical investigation of *Pueraria mirifica* roots. *Z Naturforsch* 41c:403–408
- Ingham JL, Tahara S, Dziedzic SZ (1988) Coumestans from the roots of *Pueraria mirifica*. *Z Naturforsch* 43c:5–10
- Inoue T, Fujita M (1974) Biosynthesis of isoflavone C-glycoside in *Pueraria* root. *Chem Pharm Bull* 22:1422–1423
- Inoue T, Fujita M (1977) Biosynthesis of puerarin in *Pueraria* root. *Chem Pharm Bull* 25:3226–3231
- Jung C, Maeder V, Funk F, Frey B, Sticher H, Frossard E (2003) Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil* 252:301–312
- Kashemsanta MCL, Lakshnakara SK (1952) A new species of *Pueraria* (Leguminosae) from Thailand, yielding an estrogenic principle. *Kew Bull* 7:549–551
- Kirakosyan A, Kaufman PB, Chang SC, Warber S, Bolling S, Vardapetyan H (2006) Regulation of isoflavone production in hydroponically grown *Pueraria montana* (kudzu) by cork pieces, XAD-4, and methyl jasmonate. *Plant Cell Rep* 25:1387–1391
- Kittipongpatana N, Hock RS, Porter JR (1998) Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52:133–143
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert J-M, Yvin J-C, Kopp M, Kloareg B, Fritig B (2000) Linear b-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol* 124:1027–1037
- Krisa S, Larronde F, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Mérillon J-M (1999) Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: methyl jasmonate induction and <sup>13</sup>C biolabeling. *J Nat Prod* 62:1688–1690
- Liu C-J, Dixon RA (2001) Elicitor-induced association of isoflavone O-methyltransferase with endomembranes prevents the formation and 7-O-methylaiton of daidzein during isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. *Plant Cell* 13:2643–2658
- Mackenbrock U, Gunia W, Barz W (1993) Accumulation and metabolism of medicarpin and maackiain malonyl glucosides in elicited chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *J Plant Physiol* 142:385–391
- Maksymiec W (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34:321–342
- Maojun X, Jufang D, MuYuan Z (2006) Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced puerarin biosynthesis in *Pueraria thomsonii* Benth. suspension cells through a salicylic acid (SA)-dependent and a jasmonic acid (JA)-dependent signal pathway. *Science in China Series C: Life Sci* 49:379–389
- Medina-Bolivar F, Condori J, Rimando AM, Hubstenberger J, Shelton K, O'Keefe SF, Bennett S, Dolan MC (2007) Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry* 68:1992–2003
- Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. meridionalis elicitor. *Plant Physiol* 130:1288–1297
- Montesano M, Brader G, Palva ET (2003) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol Plant Pathol* 4:73–79
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3):473–497
- Nakajima O, Akiyama T, Hakamatsuka T, Shibuta M, Noguchi H, Sankawa U (1991) Isolation, sequence and bacterial expression of a cDNA or chalcone synthase from the cultured cells of *Pueraria lobata*. *Chem Pharm Bull* 39:1911–1913
- Park H-H, Hakamatsuka T, Sankawa U, Ebizuka Y (1995) Rapid metabolism of isoflavonoids in elicitor-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry* 38:373–380
- Prathanturug S, Chuakul W, Saralamp P, Soonthornchareonnon N (2000) Botanical and chemical study of *Pueraria candollei*. In: Sompong S, Budagosa N (eds) *Seminar on herbal development in Thailand*. Fuang-fa printing, Bangkok, pp 113–117
- Sanchez-Sampedro MA, Fernandez-Tarrago J, Corchete P (2005) Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J Biotechnol* 119:60–69
- Tahara S (1987) Structure elucidation of kwakhurin, a new prenylated isoflavone from *Pueraria mirifica* roots. *Z Naturforsch* 42c:510–518
- van der MaeSen LJG (2002) *Pueraria*: botanical characteristics. In: Keung WM (ed) *Pueraria: The genus Pueraria*. Taylor & Francis, London
- Vasconsuelo A, Boland R (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci* 172:861–875
- Wise ML, Sreenath HK, Skadsen RW, Kaeppler HF (2009) Biosynthesis of avenanthramides in suspension cultures of oat (*Avena sativa*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 97(1):81–90
- Yu O, McGonigle B (2005) Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Adv Agron* 86:147–190
- Zhang CH, Mei XG, Liu L, Yu LJ (2000) Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotech Lett* 22:1561–1564
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23:283–333
- Zhao J-L, Zhou L-G, Wu J-Y (2010) Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:137–144