

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5880033

ชื่อโครงการ : การสร้างเซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสตัดแต่งพันธุกรรมจากต้นกระท่อมเพื่อใช้ในการผลิตแอลคาลอยด์

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ภก. ทศธร จรุงรัตน์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

E-mail address : tossaton.ch@rsu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (พ.ศ. 2558-2560)

การศึกษาครั้งนี้ได้เหี่ยวนำชิ้นส่วนจากต้นกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) ให้กลายเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสแบบร่วน (friable callus) ด้วยฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ พบว่าฮอร์โมน 2,4-D ให้แคลลัสในลักษณะที่ต้องการและมีการเจริญเติบโตดีกว่าการเหี่ยวนำด้วยฮอร์โมนชนิดอื่น ทั้งนี้ตรวจพบแอลคาลอยด์ mitragynine เฉพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสรุ่นที่หนึ่งทั้งจากการเหี่ยวนำด้วยฮอร์โมน 2,4-D และ NAA แต่ตรวจไม่พบ mitragynine ในเซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสรุ่นถัดมาและในเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ที่เลี้ยงด้วยฮอร์โมน 2,4-D ทั้งนี้อาจเกิดจากเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวขาดการแสดงออกของยีนในชีวสังเคราะห์ของ mitragynine ผู้วิจัยจึงทำการหาวิธีการถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยงของต้นกระท่อม (genetic transformation) ซึ่งประสบความสำเร็จในการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นชิ้นส่วนตั้งต้นในการถ่ายยีน tryptophan decarboxylase (*tdc*) และใช้การถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 โดยมีอัตราความสำเร็จที่ 2% อย่างไรก็ตาม เมื่อวัดระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *tdc* โดยวิธี quantitative real-time (qRT) PCR ของเซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสตัดแต่งพันธุกรรมเปรียบเทียบกับใบกระท่อม พบว่า mRNA ของ *tdc* ของเซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสตัดแต่งพันธุกรรม มีระดับการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกับเซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสปกติและน้อยกว่าในใบกระท่อม และจากการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วย LC-MS ไม่พบ mitragynine ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า เซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสตัดแต่งพันธุกรรมของต้นกระท่อมที่เพาะเลี้ยงในอาหาร WPM ด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 mg/L ไม่สามารถสร้างสาร mitragynine ได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากขาดการแสดงออกของยีนในช่วงท้ายของชีวสังเคราะห์ mitragynine หรืออาจเกิดจากการขาดองค์ประกอบที่สำคัญภายในเนื้อเยื่อของเซลล์เพาะเลี้ยงเอง

คำหลัก : *Agrobacterium tumefaciens*, cell suspension, genetic transformation, *Mitragyna speciosa*, mitragynine

Abstract

Project Code: TRG5880033

Project Title: Establishment of transgenic *Mitragyna speciosa* callus culture for alkaloids production

Investigators : Tossaton Charoonratana, Ph.D

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Rangsit University

E-mail address : tossaton.ch@rsu.ac.th

Project Period : 2 years (2015-2017)

In this study, the medium manipulation for *Mitragyna speciosa* friable callus induction was observed and it was found that the best callus formation was obtained from WPM supplemented with 1 mg/L 2,4-D. Mitragynine, an indole alkaloid, was detected in the first generation of both callus induced from 2,4-D and NAA. On the other hand, it was absence in the next generation calluses and in cell suspension grown in liquid WPM supplemented with 1 mg/L 2,4-D. Since the expression of genes involving in mitragynine biosynthesis of *M. speciosa* cell culture may be inadequate, the aim to study on genetic transformation was attended. A successful in genetic transformation allowed us to transform tryptophan decarboxylase (*tdc*) into *M. speciosa* callus culture for the first time using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 with the transformation efficiency of 2%. Transcription profile of *tdc* mRNA from transgenic callus was measured by quantitative real-time (qRT) PCR in comparison with wild type callus. The results showed that the *tdc* mRNA of the transgenic callus was expressed as same as the wild type callus, and the expression was less than that of in *M. speciosa* leaf. In addition, the metabolite analysis using LC-MS revealed no mitragynine in both calluses. It was concluded that the *M. speciosa* transgenic callus cultured in WPM supplemented with 1 mg/L 2,4-D was unable to produce mitragynine. This may be due to lack of gene expression in late steps of mitragynine biosynthesis or the lack of differentiate tissues in callus culture.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, cell suspension, genetic transformation, *Mitragyna speciosa*, mitragynine