Thesis Title Enhancement of Peroxidase Production in Callus Cultures of Drumstick Tree

Author Miss Thidarat Riyathong

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Lalida Shank	Advisor
Asst. Prof. Dr. Srisulak Dheeranupattana	Co-advisor

ABSTRACT

To obtain plantlets of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) with identical genetic make up for propagation or field studies, *in vitro* cultures of drumstick tree were produced from seed explants. The seedling germination was successful in culture on MS (Murashige & Skoog) agar medium pH 5.8 in the absence of growth regulators. For multiple shoots induction, BA 2.0 mg/l was found to produce 100% shoot formation with the highest average number of 10.8 shoots per explant. For plant regeneration, callus grown in MS medium containing 0.5 mg/l NAA produced both shoots and roots. Tissue culture protocol reported in this study is an alternative mean of propagation of drumstick plantlets with uniform genotypes for breeding selection and field experiments. The range of 2,4-D concentrations of 0 – 4.0 mg/l was tested for callus induction of shoot and root from *in vitro* seedling of drumstick tree. Shoot-derived callus and root-derived callus of drumstick tree were successfully established via callus induction on the MS medium supplemented with 0.5 mg/l of 2,4-D. Both types of obtained callus were white - yellowish, friable and loose - formation. The medium was used for production and subculturing all of drumstick tree callus cultures for study of peroxidase specific activity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

To enhance the peroxidase production of drumstick tree callus, elicitation of drumstick tree suspension cultures with various elicitors at different concentrations was carried out using chitosan (5 - 100 mg/l), salicylic acid (5 - 30 mg/l) and vanadium pentoxide (V_2O_5) (0.25 - 4.0 mg/l) in MS liquid medium pH 5.8 containing 0.5 mg/l 2,4-D on shaker at 100 rpm for 24 hr, 48 hr and 72 hr of elicitation time. Peroxidase specific activity, using guaiacol as enzyme substrate was determined in native drumstick tree (stems, leaves and roots), callus cultures of the plant (shoot-derived callus and root- derived callus) and elicited callus cultures at each elicitation time period. In native plant, crude extract from roots provided the highest peroxidase specific activity, followed by those from stems and leaves with the specific activity values of 19.73 ± 0.18 unit/mg, 16.56 ± 1.43 and 13.38 ± 1.04 unit/mg, respectively. Crude extract of root- derived callus and shoot-derived callus of drumstick tree possessed specific activity values of 167.25 ± 16.12 and 103.99 ± 10.64 unit/mg protein. These values are significantly higher than their counter parts from native drumstick tree suggesting the potential use of the callus cultures as new and improved sources of peroxidase.

To enhance peroxidase production in callus cultures of drumstick tree, both types of callus, those derived from shoot and derived from root, were elicited by various elicitors at different concentrations and elicitation time periods. Results of elicitation revealed that the effective elicitors for elicitation which could enhance peroxidase production in drumstick tree callus culture were chitosan and salicylic acid, while V_2O_5 elicitor was not suitable for elicitation of peroxidase activity in drumstick tree callus cultures.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเพิ่มการผลิตเปอร์ออกซิเดสในแคลลัสคัลเจอร์ของมะรุม

ผู้เขียน นางสาวธิดารัตน์ ริยาธง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ลลิดา แชงค์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เพื่อให้ได้มาซึ่งต้นมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเดียวกันเพื่อการขยายพันธุ์ หรือเพื่อการศึกษาในแปลงปลูก คัลเจอร์ของต้นมะรุมปลอดเชื้อจึงถูกผลิตขึ้นจากการใช้เมล็ด การงอกของเมล็ดมะรุมประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น Murashige & Skoog (MS medium) พีเอช 5.8 โดยไม่ต้องมีสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ สำหรับการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่าบนอาหารวุ้น MS ที่ประกอบด้วย BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เกิดการชักนำยอดได้ 100% โดยให้จำนวนยอดสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 10.8 ต่อชิ้นส่วน สำหรับการพัฒนาให้เกิดการสร้างต้นใหม่ แคลลัสที่ถูกเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS ที่มีองค์ประกอบของ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นพบว่ามีการสร้างทั้งยอดและราก ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงที่รายงานในงานวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์ในเชิงทางเลือกต่อการขยายพันธุ์มะรุมที่ให้ลักษณะทางจีโนไทป์เดียวกันสำหรับทั้งการคัดเลือกสายพันธุ์ และการทดลองในแปลงปลูก ช่วงความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ 0 – 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกนำมาทดลองโดยการเติมลงไปในอาหารวุ้น MS สำหรับการชักนำแคลลัสจากยอดและรากที่ได้จากต้นมะรุมปลอดเชื้อ การชักนำแคลลัสจากยอดและรากนั้นประสบความสำเร็จบนการชักนำในอาหารวุ้น MS ที่มีองค์ประกอบของ 2,4-D เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ชักนำได้ทั้งสองชนิดมีลักษณะสีขาวอมเหลืองเกาะกันอย่างหลวมๆ สูตรอาหารดังกล่าวถูกใช้ในการต่อแคลลัสคัลเจอร์ และการผลิตแคลลัสคัลเจอร์ที่จะได้นำไปใช้ในการศึกษาแอคติวิตีจำเพาะของเปอร์ออกซิเดสต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อที่จะเพิ่มการผลิตเปอร์ออกซิเดสในแคลลัสมะรุม จึงได้ใช้กระบวนการอิลิซิเตชันโดยการใช้อิลิซิเตอร์หลายชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบ คือ ไคโตซาน (5, 10, 15, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร), กรดซาลิซิลิค (5, 10, 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ วานาเดียมเพนทอกไซด์ (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในอาหารเหลว MS ที่มีองค์ประกอบของ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. ในแต่ละช่วงเวลาที่ใช้ในการอิลิซิเตชัน แอคติวิตีจำเพาะของเปอร์ออกซิเดสถูกวัดโดยใช้ไกวเอคอลเป็นสารตั้งต้น ในต้นมะรุมธรรมชาติ (จากลำต้น ใบ และราก) แคลลัสคัลเจอร์ของมะรุม (ทั้งแคลลัสจากยอด และแคลลัสจากราก) และแคลลัสทั้งจากยอด และจากรากที่ถูกนำมาผ่านกระบวนการอิลิซิเตชันที่ระยะเวลาต่างๆ ในต้นมะรุมธรรมชาติพบว่า สารสกัดที่ได้จากรากมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดที่ได้จากลำต้น และจากใบตามลำดับคือ 19.73 ± 0.18, 16.56 ± 1.43 และ 13.38 ± 1.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนสารสกัดของแคลลัสจากราก และแคลลัสจากยอดของมะรุมมีแอคติวิตีจำเพาะของเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 167.25 ± 16.12 และ 103.99 ± 10.64 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่ได้จากสารสกัดของแคลลัสคัลเจอร์มะรุมทั้งสองชนิดมีค่าสูงกว่าที่พบในส่วนต่างๆจากต้นมะรุมธรรมชาติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้เปอร์ออกซิเดสจากแคลลัสคัลเจอร์ของมะรุมนั้น เป็นแหล่งใหม่ของเปอร์ออกซิเดสที่สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เพื่อเป็นการเพิ่มการผลิตเปอร์ออกซิเดสในแคลลัสคัลเจอร์ของมะรุม แคลลัสสองชนิดทั้งที่มาจากยอด และที่มาจากรากได้ถูกนำมาอิลิซิตด้วยอิลิซิเตอร์หลายชนิด ที่ความเข้มข้นของอิลิซิเตอร์ และระยะเวลาที่ใช้ในการอิลิซิเตชันที่แตกต่างกัน ผลการทดลองจากกระบวนการอิลิซิเตชันพบว่า อิลิซิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพที่สามารถเพิ่มการผลิตเปอร์ออกซิเดสในแคลลัสคัลเจอร์ของมะรุมในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ไคโตซาน และกรดซาลิซิลิค ส่วนวานาเดียมเพนโทไซด์นั้นไม่เหมาะสมต่อการใช้ในกระบวนการอิลิซิเตชันของเปอร์ออกซิเดสแอคติวิตีในแคลลัสคัลเจอร์ของมะรุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved