การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสาร plumbagin ในเซลล์แขวนลอยจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง โดยการกระตุ้นด้วย methyl jasmonate ในอาหารสูตร B5

Enhancement of Plumbagin Production in Cell Suspension Derived from Hairy Root of *Plumbago indica* L. by Methyl Jasmonate Elicitation in B5 Medium

ปาริชาต ประสาทศิลป์[1] ศุภธิดา อับดุลลากาซิม[1,2] และ เสริมศิริ จันทร์เปรม[1,2*]

Parichat Prasartsin[1], Supatida Abdullakasim[1,2] and Sermsiri Chanprame[1,2]

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

[2] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140 Thailand and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE) Thailand

[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140 Thailand

รับเรื่อง: เมษายน 2559 Received: April 2016

รับตีพิมพ์: พฤษภาคม 2559 Accepted: May 2016

* corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

ABSTRACT: *Plumbago indica* L. is one of the important Thai herb which its root is the main source of plumbagin. Plumbagin has pharmacological activities such as anticancer and antimicrobial activities. The aim of this research is to enhance plumbagin production of cell suspension derived from hairy root of *P. indica* L.. The cell suspension was cultured for 30 days in three different media: Murashige and Skoog (MS), Gamborg (B5) and Schenk and Hidebrandt (SH). The result indicated that cell suspension cultured in B5 and SH media had similar growth but better growth than in MS medium. For plumbagin production, as analyzed by HPLC, revealed that the cells cultured in B5 medium could produce highest amount of plumbagin. Therefore, in this experiment, B5 was the most suitable medium for plumbagin production. Thereafter, cell growth and plumbagin production of cell suspension cultured in B5 medium in the culture cycle of 30 days were studied. The result indicated that cell suspension was in exponential phase during the 6th-18th day of culture. However, plumbagin was firstly detected in the 12th day and reach the maximum production in the 24th day of culture. The use of methyl jasmonate to elicit plumbagin production from cell suspension was also studied. Methyl jasmonate at the final concentrations of 0, 20, 40, 60, 80 and 100 μM were added to cell suspension culture. The elicitation was started at the 18th day of culture in which cells were in the exponential phase of growth. The results showed that 40 μM methyl jasmonate could elicit cells to produce

maximum amount of plumbagin of 7.14 mg/l media which was 3.24 times over the control at the first day after elicitation.

Keywords: Plumbago, cell suspension, plumbagin, methyl jasmonate

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(1): 139–150 ว. วิทย. กษ. (2560) 48(1): 139–150

บทคัดย่อ

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งในรากของเจตมูลเพลิงแดงมีสาร plumbagin ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพิ่มศักยภาพการผลิตสาร plumbagin ในเซลล์แขวนลอยที่ชักนำจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง โดยทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นเวลา 30 วัน ในอาหาร 3 สูตร คือ Murashige and Skoog (MS), Gamborg (B5) และ Schenk and Hidebrandt (SH) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B5 และ SH มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันแต่ดีกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ส่วนการสร้างสาร plumbagin ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี high performance liquid chromatography พบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B5 ผลิตสาร plumbagin มากที่สุด ดังนั้น อาหารสูตร B5 จึงเป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสาร plumbagin สำหรับการทดลองนี้ และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตร B5 เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตและการผลิตสาร plumbagin ในช่วง 30 วันของการเพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์อยู่ในระยะ exponential phase ในช่วงวันที่ 6–18 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการผลิตสาร plumbagin นั้น ตรวจพบว่าเริ่มสร้างได้ในวันที่ 12 และสร้างมากขึ้นชัดเจนในวันที่ 18 โดยสร้างได้มากที่สุด ในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับการศึกษาผลของ methyl jasmonate ต่อการผลิตสาร plumbagin โดยเติม methyl jasmonate ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ ลงในเซลล์แขวนลอยที่มีอายุ 18 วัน พบว่า methyl jasmonate ทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นการสร้างสาร plumbagin ในเซลล์แขวนลอยได้ โดยความเข้มข้นสุดท้ายที่ 40 มิลลิโมลาร์ สามารถสร้างสาร plumbagin ได้สูงสุด 7.14 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 หลังการกระตุ้น ซึ่งมากกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น 3.24 เท่า

คำสำคัญ: เจตมูลเพลิงแดง, เซลล์แขวนลอย, สาร plumbagin, สาร methyl jasmonate

บทนำ

เจตมูลเพลิงแดง *(Plumbago indica* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่ในรากพบสารสำคัญในกลุ่ม naphthoquinone คือ สารพลัมบาจิน (plumbagin) (Dinda *et al*., 1999) ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Taraszkiewicz *et al*., 2012) และสามารถยับยั้งอาการอักเสบ (Onodera *et al*., 2015) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Li *et al*., 2014) เป็นต้น การสร้างและสะสมสารทุติยภูมิของพืชนั้นสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ แต่โดยส่วนใหญ่ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกยาวนาน และสารทุติยภูมิที่สกัดได้อาจมีปริมาณน้อยหรือไม่สม่ำเสมอ ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้จึงมีการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สิ่งกระตุ้น (elicitor) เพื่อชักนำให้พืชในสภาพเพาะเลี้ยงสร้างสารทุติยภูมิที่ต้องการในระยะเวลาสั้น ทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตสารทุติยภูมิได้มากกว่าพืชที่ปลูกตามธรรมชาติอีกด้วย (Chuntaratin, 2006) สาร plumbagin เป็นสารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตัวเองของพืช และมีรายงานการใช้สิ่งกระตุ้นที่เป็นสารเคมี เช่น salicylic acid chitin chitosan yeast extract และ acetic acid เพื่อเพิ่มการผลิตสาร plumbagin จาก hairy root และเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง (Chuntaratin, 2006; Chansuthep, 2010) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้สิ่งกระตุ้นจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารทุติยภูมิ

สาร jasmonate และ methyl jasmonate เป็นสารที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีรายงานว่ามีคุณสมบัติเป็นตัวส่งสัญญาณในกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชต่อสิ่งเร้าภายนอก ทั้งที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิต จึงมีการใช้สารชนิดนี้เป็นตัวกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิด (Cheong and Choi, 2003) เช่น กระตุ้นการสร้างสาร plumbagin ใน hairy root ของเจตมูลเพลิง (Gangopadhyay *et al*., 2011) และกระตุ้นการสร้างสาร plumbagin ใน *Drosera indica* (Juengwatanatrakul *et al*., 2011) ทั้งนี้ในการกระตุ้นให้เซลล์พืชสร้างสารทุติยภูมิได้มากขึ้นนั้น การเลือกชนิดสิ่งกระตุ้น ความเข้มข้น และระยะเวลาที่พืชสัมผัสกับสิ่งกระตุ้นเป็นสิ่งสำคัญที่ส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพ การผลิตสารทุติยภูมิ Zaker *et al*. (2015)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยที่ได้จาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงผลิตสาร plumbagin โดยใช้ methyl jasmonate เป็นสารกระตุ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอย

นำชิ้นส่วน hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง ซึ่งได้จากการกระตุ้นด้วยเชื้อ Rhizobium rhizogenes สายพันธุ์ K599 และอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4–dichlorophenoxyacetic acid (2,4–D) 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6-benzylaminopurine (BA) 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นจึงย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็งที่ใช้ชักนำแคลลัส เพาะเลี้ยงในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุก 21 วัน จำนวน 3 ครั้ง เพื่อให้ได้เซลล์แขวนลอยที่มีความสม่ำเสมอ

2. การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสาร plumbagin

นำเซลล์แขวนลอย 1 กรัม มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) B5 (Gamborg *et al*., 1968) และ SH (Schenk and Hidebrandt, 1972) ซึ่งเติม 2,4–D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ใช้อาหารเพาะเลี้ยง 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน บันทึกน้ำหนักแห้ง และวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 3 ทรีทเมนต์ ทำการทดลอง 9 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ฟลาสก์

วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3. การศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสาร plumbagin

เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง 1 กรัม ในอาหารเหลวสูตร B5 ที่เติม 2,4–D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ใช้อาหารเพาะเลี้ยง 25 มิลลิลิตร ในสภาพมืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน บันทึกน้ำหนักแห้งทุก 3 วัน เพื่อนำมาคำนวณหา dry growth index (DGI) โดยคำนวณจาก

dry growth index (DGI) = (น้ำหนักแห้งสุดท้าย – น้ำหนักแห้งเริ่มต้น) / น้ำหนักแห้งเริ่มต้น

วิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยเครื่อง HPLC ในวันที่ 0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 และ 30 ของการเพาะเลี้ยงวาง แผนการทดลองแบบ CRD มี 11 ทรีทเมนต์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ฟลาสก์ วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

4. การศึกษาผลของ methyl jasmonate ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสาร plumbagin

นำเซลล์แขวนลอย 1 กรัม มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ซึ่งเติม 2,4–D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ในสภาพมืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 วัน แล้วเติมสารละลาย methyl jasmonate ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้สำหรับละลาย methyl jasmonate เป็นชุดควบคุม บันทึกน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยเครื่อง HPLC ในวันที่ 1 2 3 5 7 และ 9 หลังจากการกระตุ้น โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จัดสิ่งทดลองแบบ factorial โดยมี 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ methyl jasmonate และจำนวนวันหลังการกระตุ้น ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ฟลาสก์ วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

5. การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin

การสกัดสาร plumbagin ทำตามวิธีการของ Chuntaratin (2006) โดยกรองแยกเซลล์ออกจากอาหารเพาะเลี้ยงด้วยกระดาษ Whatman No. 1 แล้วนำเซลล์มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นบดให้ละเอียดแล้วสกัดด้วย methanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สำหรับสาร plumbagin ในอาหารเพาะเลี้ยงนั้นสกัดด้วย ethyl acetate โดยใช้อัตราส่วน ethyl acetate: อาหารเพาะเลี้ยง 1:1 แล้วระเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ปริมาณ plumbagin ทำโดยละลายตะกอนด้วย methanol (HPLC grade) และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเครื่อง HPLC เทียบกับสาร plumbagin มาตรฐาน (Sigma: Cat. No. 481–42–5, a.i. 98%) ใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax®SB C18 โดยใช้ methanol และ acetic acid (0.4 เปอร์เซ็นต์) ในอัตราส่วน 60 : 40 เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณสาร plumbagin จากความเข้มข้นของ plumbagin มาตรฐานจากสมการ linear regression equation และค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Agilent Chemstation (Agilent Technologies, 2001)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยและการผลิตสาร plumbagin

จากการเพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งเติม 2,4–D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า hairy root เปลี่ยนจากสีขาวกลายเป็นสีเทา และพบการเกิดแคลลัสในบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วน hairy root หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (Figure 1A) ต่อมาแคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีเทา มีลักษณะเป็น friable callus ผิวเรียบฉ่ำน้ำ และมีขนรากเล็กๆ สีขาวฟู ปกคลุมบางส่วน (Figure 1B) เมื่อย้ายแคลลัสดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน พบว่า กลุ่มเซลล์แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ได้เซลล์แขวนลอยที่มีสีเทา ซึ่งเมื่อได้ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีลักษณะยาวเรียวและผนังบาง (Figure 1C)

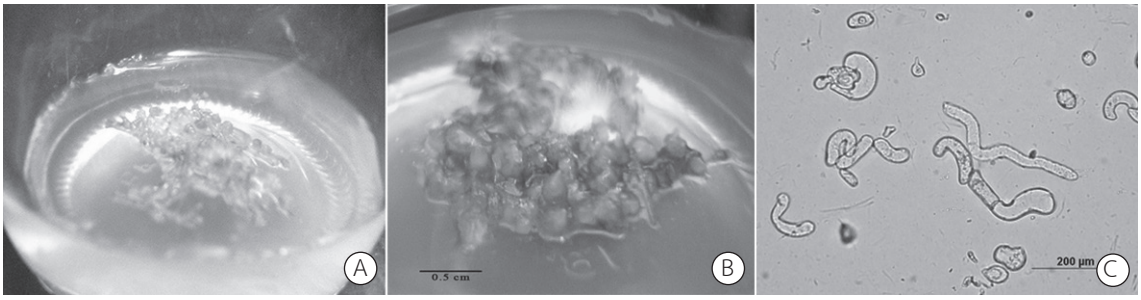

Figure 1 Hairy root derived callus on MS medium supplemented with 0.2 mg/l 2,4-D and 0.4 mg/l BA for 2 weeks (A), 4 weeks (B) and character of cells at 3 weeks under microscope (20x objective lens) (C)

จากนั้น เมื่อนำเซลล์แขวนลอยไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 3 สูตร พบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SH มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด มีน้ำหนักแห้งสูงสุด 14.29 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร รองลงมา คือ อาหารเหลวสูตร B5 และ MS แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin พบว่าเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B5 สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิตสาร plumbagin ได้ดีที่สุด (Figure 2) ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้อาหารสูตร B5 ในการเพาะเลี้ยง

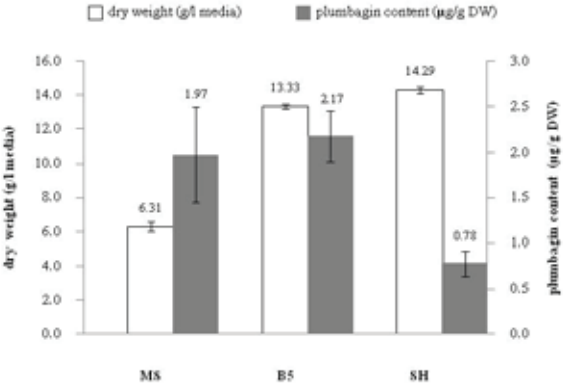

Figure 2 Dry weight and plumbagin content of suspension cells cultured on MS B5 and SH media supplemented with 0.2 mg/l 2,4-D and 0.4 mg/l BA for 21 days in dark condition at 25±2°C

การเจริญเติบโตและการผลิตสาร plumbagin ของเซลล์แขวนลอยในช่วงอายุ 30 วันของการเพาะเลี้ยง

เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่ชักนำได้จาก hairy root มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ที่เติม 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา

30 วัน โดยตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตทุก 3 วัน พบว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตเริ่มต้นเป็นระยะ lag phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการปรับตัวในช่วง 6 วันแรก แล้วเข้าสู่ระยะ exponential phase ซึ่งเป็นช่วงที่มีการแบ่งเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 6–18 และมีค่า dry growth index (DGI) สูงสุดเท่ากับ 10.38 ในวันที่ 18 (Figure 3) จากนั้นเซลล์เริ่มเข้าสู่ stationary phase และตามมาด้วยระยะ decline phase ที่ประมาณ 21 วันของการเพาะเลี้ยง ซึ่งช่วงนี้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตน้อยลงและเริ่มมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากการที่มีค่า DGI ลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารอาหารและออกซิเจนในอาหารที่ลดลง (Silja *et al*., 2014) หรืออาจเนื่องจากเซลล์มีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาสู่อาหารเพาะเลี้ยง (Sakunphueak and Panichayupakaranant, 2010)

สำหรับการผลิตสาร plumbagin ของเซลล์แขวนลอยนั้น พบว่ามีการผลิตสาร plumbagin ในปริมาณน้อยมากในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงมีการผลิตสาร plumbagin เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 12 เป็นต้นไป และสร้างมากขึ้นชัดเจนในวันที่ 18 และสร้างสารได้สูงสุดในวันที่ 24 จากนั้นการผลิตสารเริ่มลดลง (Figure 3)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและการผลิตสาร plumbagin ของเซลล์แขวนลอย พบว่า มีการสร้างสาร plumbagin มากขึ้นเมื่อเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตเต็มที่ โดยจะเห็นได้ว่าเซลล์แขวนลอยมีการเริ่มสร้างสาร plumbagin มากขึ้นในระยะ late exponential phase และสร้างสาร plumbagin สูงสุดในระยะ stationary phase ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Komaraiah *et al.* (2001) ซึ่งศึกษาการผลิตสาร plumbagin จากเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงและ

พบว่าเซลล์แขวนลอยผลิตสาร plumbagin มากที่สุดในช่วง stationary phase ซึ่งส่วนใหญ่พืชมักสร้างสารทุติยภูมิในระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโต

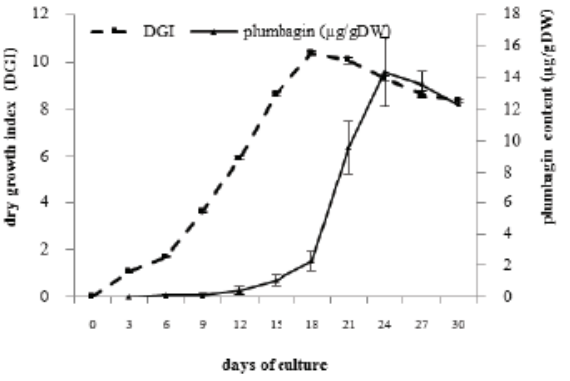

Figure 3 Dry growth index (DGI) and plumbagin content of hairy root derived suspension cell *Plumbago indica* during 30 days of culture in B5 medium supplemented with 0.2 mg/l 2,4–D and 0.4 mg/l BA in dark condition at 25±2°C

เต็มที่ เนื่องจากในระยะแรกของการเจริญเติบโตพืชมักใช้ธาตุอาหารต่าง ๆ ในการสร้างสารปฐมภูมิ (primary metabolite) ที่จำเป็นสำหรับใช้ในการเจริญเติบโต (Bourgaud *et al*., 2001)

เซลล์แขวนลอยที่อยู่ในระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตนั้นมีการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่แตกต่างกันตามระยะของการเจริญเติบโต ดังนั้นการให้สิ่งกระตุ้นแก่เซลล์แขวนลอยในระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันจึงมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ทั้งในด้านการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งพบได้ในพืชหลายชนิด (Chuntaratin, 2006) นอกจากนี้สิ่งกระตุ้นบางชนิดยังอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้อีกด้วย (Sabaterjara *et al*., 2014) ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์จึงมีความสำคัญต่อการกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิโดยใช้สารกระตุ้น สำหรับงานวิจัยนี้พบว่า เซลล์แขวนลอยเจตมูลเพลิงแดงอายุ 18 วันของการเพาะเลี้ยง เป็นช่วงเวลาที่คาดว่าน่าจะเหมาะสมในการเติมสารกระตุ้น เนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตเต็มที่และเริ่มมีการสร้างสาร plumbagin ปริมาณมากขึ้น

ผลของ methyl jasmonate ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสาร plumbagin ของเซลล์แขวนลอย

เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ซึ่งเติม 2,4–D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 18 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับทดสอบผลของสารกระตุ้น มาเติม methyl jasmonate ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 40 60 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ โดยใช้อาหารเหลวที่เติม ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่ออาหาร 25 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม (เนื่องจากใช้ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย methyl jasmonate) เมื่อวิเคราะห์การเจริญเติบโต (Table 1) พบว่าความเข้มข้นของ methyl jasmonate ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งเห็นได้จากน้ำหนักแห้งในทรีทเมนต์ที่เติมและไม่เติม methyl jasmonate มีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ แต่ระยะเวลาที่เซลล์แขวนลอยได้รับ methyl jasmonate มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากผลการทดลองเห็นว่าน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยที่ได้รับ methyl jasmonate มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาที่เซลล์แขวนลอยสัมผัส methyl jasmonate เพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบโดยน้ำหนักแห้งเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 5 และลดต่ำสุดในวันที่ 9 หลังถูกกระตุ้น แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ methyl jasmonate และระยะเวลาที่เซลล์แขวนลอยได้รับ methyl jasmonate ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งพิจารณาจากค่าน้ำหนักแห้ง

การที่ความเข้มข้นของ methyl jasmonate ไม่มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยลดลงอาจเนื่องจากช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้มีความเข้มข้นต่ำในช่วง 20–100 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shohael *et al.* (2008) ซึ่งศึกษาการใช้ methyl jasmonate กระตุ้นการสร้างสาร eleutheroside ใน *Eleutherococcus sessiliflorus* และพบว่า methyl jasmonate ความเข้มข้นต่ำในช่วงไม่เกิน 200 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์ลดลงเล็กน้อย แต่ในเซลล์ที่ได้รับ methyl jasmonate ความเข้มข้นสูงกว่านี้มีน้ำหนักแห้งลดลง การใช้สารกระตุ้นความเข้มข้นสูงมีผลทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์ลดลงนี้มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่นในเจตมูลเพลิงแดง (Chuntaratin, 2006) *Impatiens balsamina* (Sakunphueak and Panichayupakaranant, 2010) และ *Mentha x piperita* (Krzyzanowska *et al*., 2012) ซึ่งอาจเนื่องจากสารกระตุ้นที่มีความเข้มข้นสูงสามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองทางสรีรวิทยาอย่างรวดเร็ว และนำไปสู่การตายของเซลล์ (Namedo, 2007) หรืออาจเนื่องจาก jasmonate ยังมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตโดยยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสและการเพิ่มขนาดของเซลล์ (Zhang and Turner, 2008; Wasternack, 2014)

เมื่อนำเซลล์แขวนลอยมาวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin พบว่า สารละลายตัวอย่างที่สกัดจากเซลล์แขวนลอยปรากฏ peak ที่มี retention time ใกล้เคียงกับสารละลาย plumbagin มาตรฐาน ที่ประมาณ 15 นาทีเช่นกัน (Figure 4 A,B) และผลการคำนวณปริมาณสาร plumbagin พบว่าความเข้มข้นของ methyl jasmonate และระยะเวลาที่เซลล์แขวนลอยสัมผัส methyl jasmonate มีอิทธิพลต่อปริมาณสาร plumbagin (Table 1) โดยเซลล์แขวนลอยที่ได้รับ methyl jasmonate ความเข้มข้นสุดท้าย 20–100 มิลลิโมลาร์ มีการสร้างสาร plumbagin เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์แขวนลอยที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (Figure 4) โดย methyl jasmonate ความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยสร้างสาร plumbagin ได้ดีกว่าความเข้มข้นสูง โดยให้ผลดีในช่วงวันแรกของการกระตุ้น ทั้งนี้เคยมีรายงานการใช้ methyl jasmonate ความเข้มข้น 50–200 มิลลิโมลาร์ กระตุ้นการสร้างสาร plumbagin ใน *Drosera indica* และพบว่าผลิตสาร plumbagin ได้มากที่สุดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย methyl jasmonate ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (Juengwatanatrakul *et al*., 2011)

Table 1 The effects of methyl jasmonate and elicitation duration on the average of dry weight and plumbagin production of hairy root derived suspension cells cultured in B5 medium supple mented with 0.2 mg/l 2,4-D and 0.4 mg/l BA in dark condition at 25±2°C

	Dry weight (g/l media)	plumbagin content (g/l media)
methyl jasmonate (μM)	The average value of day 1-9	
0	14.20	1.90 c
20	14.36	2.98 b
40	14.60	3.77 a
60	14.24	3.51 a
80	14.32	3.54 a
100	14.36	3.55 a
F-test	ns	**
Days after elicitation	The average value of all methyl jasmonate concentrations	
1	14.44[ab]	4.09[a]
2	14.72[a]	2.38[b]
3	14.68[ab]	2.55[b]
5	14.24[b]	3.85[a]
7	14.28[b]	3.88[a]
9	13.68[c]	2.51[b]
F-test	**	**
Concentration x Duration	ns	**

** Means in the same column followed by the same alphabet are not significantly different (P≤0.01) analysed by DMRT.

การกระตุ้นด้วย methyl jasmonate ในการทดลองนี้พบการปลดปล่อยสาร plumbagin ลงสู่อาหารเพาะเลี้ยงปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณ plumbagin ที่สะสมภายในเซลล์ ปริมาณสาร plumbagin ที่แสดงในการทดลองนี้เป็นผลรวมที่สกัดได้จากเซลล์และในอาหารเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการใช้สารกระตุ้นบางชนิดทำให้เซลล์ปลดปล่อยสารทุติยภูมิออกสู่อาหารเพาะเลี้ยง เช่น งานวิจัยของ Chansuthep (2010) ที่ใช้ salicylic acid กระตุ้นให้ hairy root เจตมูลเพลิงแดงผลิตสาร plumbagin และปลดปล่อยสู่อาหารเพาะเลี้ยงปริมาณมากกว่าที่สะสมอยู่ในเซลล์ และงานวิจัยของ Chuntaratin (2006) ที่รายงานว่าสาร chitosan สามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงปลดปล่อยสาร plumbagin ออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงปริมาณมาก แสดงว่าคุณสมบัติของสารกระตุ้นแต่ละชนิดที่แตกต่างกันนอกจากจะมีผลต่อการผลิตสาร plumbagin แล้วยังมีผลต่อการปลดปล่อยสารออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงอีกด้วย

เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของความเข้มข้น และระยะเวลาที่เซลล์แขวนลอยสัมผัส methyl jasmonate พบว่าทั้ง 2 ปัจจัยมีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณสาร plumbagin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) โดย methyl jasmonate ทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นการสร้างสาร plumbagin ในเซลล์แขวนลอยได้ทุกระยะเวลาหลังการกระตุ้น ยกเว้นในวันที่ 9 โดยเซลล์แขวนลอยที่ได้รับ methyl jasmonate ความเข้มข้นสุดท้าย 40 มิลลิโมลาร์

สามารถสร้างสาร plumbagin ได้สูงสุด 7.14 มิลลิกรัมต่อการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร 1 ลิตร ในวันที่ 1 หลังการกระตุ้น ซึ่งมากกว่าชุดควบคุม 3.24 เท่า (Figure 4C) ในภาพรวมของการกระตุ้นพบว่า เซลล์แขวนลอยมีการสร้างสาร plumbagin สูงในวันที่ 1 หลังการกระตุ้น และลดลงในวันที่ 2 และ 3 หลังจากนั้นเซลล์แขวนลอยมีการสร้างสาร plumbagin เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในวันที่ 5 และ 7 แล้วกลับลดลงอีกครั้งในวันที่ 9 หลังการกระตุ้น (Figure 5) ในขณะที่เซลล์แขวนลอยที่ไม่ถูกกระตุ้นมีแนวโน้มสร้างสาร plumbagin เพิ่มมากขึ้น และสร้างได้มากที่สุดในวันที่ 9 ซึ่งตรงกับวันที่ 26 ของรอบการเพาะเลี้ยงปกติ

การที่เซลล์แขวนลอยมีการสร้างสาร plumbagin สูงมากในวันแรกหลังการกระตุ้นแล้วลดลงในวันต่อมาอาจเนื่องจาก methyl jasmonate มีผลต่อกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชและสาร plumbagin จัดอยู่ในกลุ่มของสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการป้องกันตัว เมื่อเซลล์แขวนลอยได้รับการกระตุ้นด้วย methyl jasmonate จึงสร้างสาร plumbagin ขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ตรวจพบว่าเซลล์มีปริมาณสาร plumbagin สูงในวันแรก แต่การลดลงในวันต่อมานั้นอาจเป็นเพราะสาร plumbagin เป็นสารทุติยภูมิที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงอาจมีกระบวนการย่อยสลายสารเพื่อนำไปเป็นวัตถุดิบใน

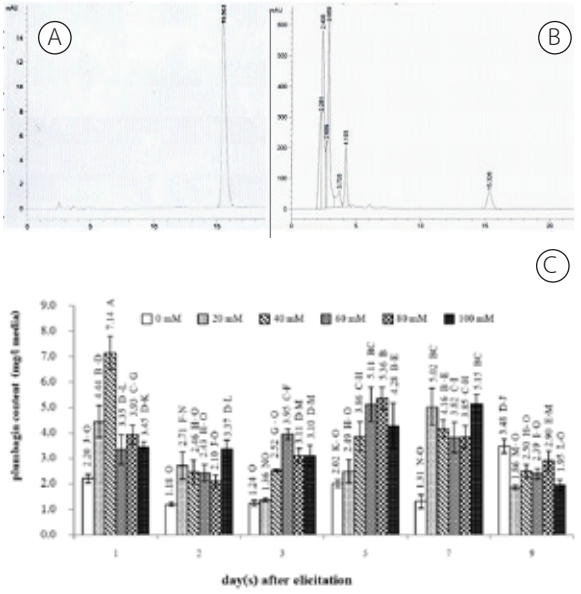

Figure 4 Chromatogram of 10 mg/l standard plumbagin (Sigma: catalog number 481-42-5) (A) and the extract of Plumbago indica hairy root derived suspension cells (B). The plumbagin content of hairy root derived suspension cells cultured in B5 medium supplemented with 0.2 mg/l 2,4-D and 0.4 mg/l BA in dark condition at 25±2°C and elicited with 0-40 mM methyl jasmonate for 1-9 days(C)

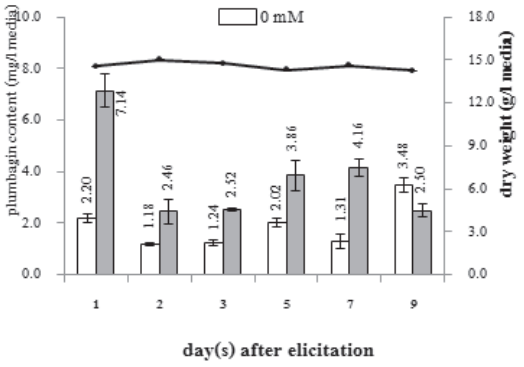

Figure 5 The plumbagin content of hairy root derived suspension cells cultured in B5 medium supplemented with 0.2 mg/l 2,4-D and 0.4 mg/l BA in dark condition at 25±2°C and elicited with 40 mMmethyl jasmonate for 1-9 days

การสร้างสารปฐมภูมิหรือสารมัธยันต์ชนิดอื่นที่จำเป็นในกระบวนการเจริญเติบโต หรืออาจเปลี่ยนไปเป็นสารทุติยภูมิชนิดอื่นซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่าเพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อเซลล์เอง (Kurian and Sankar, 2007; Chansuthep, 2010)

ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่รายงานว่า methyl jasmonate สามารถกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิ ได้ในพืชหลายชนิด ทั้งนี้การที่ methyl jasmonate มีความสามารถในการกระตุ้นให้พืชหลายชนิดสร้างสารทุติยภูมิได้มากขึ้นนั้น เนื่องจากมีรายงานว่า methyl jasmonate เป็นตัวส่งสัญญาณใน signal transduction pathway ซึ่งชักนำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชแสดงออกและผลิตสารทุติยภูมิออกมาป้องกันตัวเองจากสิ่งเร้า และความเครียดต่าง ๆ (Gangopadhyay *et al*., 2011)

สรุป

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยที่ชักนำได้จาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงในอาหารเหลว 3 สูตร พบว่าอาหารสูตร B5 ให้การเจริญเติบโตของเซลล์ดีและมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลผลิตสาร plumbagin สูง โดยเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 เริ่มสร้างสาร plumbagin มากขึ้นในระยะ late exponential phase ช่วงวันที่ 12–18 และสร้างได้สูงสุดในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งอยู่ในระยะ stationary phase เป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตเต็มที่

การใช้สาร methyl jasmonate ความเข้มข้นในช่วง 20–100 มิลลิโมลาร์ ในการกระตุ้นการผลิต plumbagin ในเซลล์แขวนลอยที่ชักนำได้จาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง พบว่าความเข้มข้นของ methyl jasmonate ในช่วงดังกล่าวไม่มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ระยะเวลาที่เซลล์แขวนลอยสัมผัสกับ methyl jasmonate ที่นานนั้นมีผลทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง ส่วนผลของการสร้างสาร plumbagin นั้นพบว่า methyl jasmonate มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้างสาร plumbagin โดยเซลล์แขวนลอยที่ได้รับ methyl jasmonate ความเข้มข้นสุดท้าย 40 มิลลิโมลาร์ สามารถสร้างสาร plumbagin ได้ดีที่สุด โดยสร้างสารได้สูงสุดในวันที่ 1 หลังการกระตุ้น ซึ่งมากกว่าชุดควบคุม 3.24 เท่า

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยงบประมาณสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Agilent Technologies. 2001. Agilent Chemstation (Computer Program). Agilent Technologies, USA.

Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 161: 839–851.

Chansuthep, S. 2010. Plumbagin Production by Hairy Root Culture of *Plumbago indica* Linn. in Shaked Flasks and in Bioreactor. MS Thesis. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Cheong, J.J. and Y.D. Choi. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. Trends Genet. 19: 409–413.

Chuntaratin, P. 2006. Production of Plumbagin by Hairy Root, Callus and Cell Suspension Cultures of *Plumbago indica* L. Ph.D. Thesis. Kasetsart University, Bangkok.

Dinda, B., S.K. Das, A.K. Hajra, A. Bhattacharya, K. De, G. Chel and B. Achari. 1999. Chemical constituents of *Plumbago indica* roots and reactions of plumbagin: part II. Indian J. Chem. 38B: 577–582.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojimar. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Exp. Cell Res. 50: 151–158.

Gangopadhyay, M., S. Dewanjee and S. Bhattacharya. 2011. Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root cultures. J. Biosci. Bioeng. 111: 706–710.

Juengwatanatrakul, T., S. Sakamoto, H. Tanaka and W. Putalun. 2011. Elicitation effect on production of plumbagin in *in vitro* culture of *Drosera indica* L. J. Med. Plants Res. 5: 4949–4953.

Komaraiah, P., P.B. Kavi Kishor and S.V. Ramakrishna. 2001. Production of plumbagin from cell suspension cultures of *Plumbago rosea* L. Biotechnol. Lett. 23: 1269–1272.

Krzyzanowska, J., A. Czubacka, L. Pecio, M. Przybys, T. Doroszewska, A. Stochmal and W. Oleszek. 2012. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha x piperita* cell suspension cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult. 108: 73–81.

Kurian, A. and A. Sankar. 2007. Medicinal plants. New India Publishing, India. 356 p.11

Li Y.C., S.M. He, Z.X. He, M. Li, Y. Yang, J.X. Pang, X. Zhang, K. Chow, Q. Zhou, W. Duan, Z.W. Zhou, T. Yang, G.H. Huang, A. Liu, J.X. Qui, J.P. Liu and S.F. Zhou. 2014. Plumbagin induces apoptotic and autophagic cell death through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway in human non–small cell lung cancer cells. Cancer Lett. 344: 239–259.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473–479.

Namedo, G.A. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacogn. Rev. 1: 69–79.

Onodera, T., I. Kuriyama, Y. Sakamoto, M. Kawamura, K. Kuramochi, K. Tsubaki, A. Tabata, H. Naganune and Y. Mizushina. 2015. 5–O–acyl plumbagins inhibit DNA polymerase activity and suppress the inflammatory response. Arch. Biochem. Biophys. 573: 100–110.

Sabaterjara, A.B., L. Almagro and M.A. Pedreno. 2014. Induction of extracellular defense–related proteins in suspension cultured–cell of *Daucus carota* elicited with cyclodextrins. Plant Physiol. Biochem. 77: 133–139.

Sakunphueak, A. and P. Panichayupakaranant. 2010. Increased production of naphthoquinones in Impatiens *balsamina* root cultures by elicitation with methyl jasmonate. Bioresour. Technol. 101: 8777–8783.

Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199–204.

Shohael, A.M., H.N. Murthy, E.J. Hahn, H.L. Lee and K.Y. Paek. 2008. Increased eleutheroside production in *Eleutherococcus sessiliflorus embryogenic* suspension cultures with methyl jasmonate treatment. Biochem. Eng. J. 38(2): 270–273.

Silja, P.K., G.P. Gisha and K. Satheeshkumar. 2014. Enhanced plumbagin accumulation in embryogenic cell suspension cultures of *Plumbago rosea* L. following elicitation. Plant Cell Tissue Organ Cult. 119: 469–477.

Taraszkiewicz, A., S. Jafra, A. Skrzypczak, M. Kaminski and A. Krolicka. 2012. Antibacterial activity of secondary metabolites from *in vitro* culture of Drosera gigantean against the plant pathogenic bacteria Pseudomonas *syringae* pv. *syringae* and *P. syringae* pv. *morsprunorum.* J. Plant Pathol. 94: 63–68.

Wasternack, C. 2014. Action of jasmonates in plant stress responses and development. Biotechnol. Adv. 32: 31–39.

Zaker, A., C. Sykora, F. Gossnitzer, P. Abrishamchi, J. Asili, S.H. Mousavi and C. Wawrosch. 2015. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. Ind. Crops Prod. 67: 97–102.

Zhang, Y. and J.G. Turner. 2008. Wound–induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. PLoS ONE. 3(11): e3699.