240217

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการชักนำแฮรีรูทจากต้นกวาวเครือขาวโดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 และศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเจริญและผลิตสารดาอิดเซอินและเจนิสเตอินจากแฮรีรูทที่คัดเลือกได้ จากการชักนำชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกวาวเครือขาวที่มีอายุในช่วง 1-4 สัปดาห์ ให้เกิดแฮรีรูทโดยใช้เชื้อ *A. rhizogenes* ATCC15834 พบว่าชิ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดแฮรีรูทได้สูงที่สุดคือ ใบเลี้ยง และยอด ในขณะที่ลำต้นมีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแฮรีรูทต่ำที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าชิ้นส่วนจากต้นกวาวเครือขาวที่มีอายุ 1 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดแฮรีรูทได้ดีกว่าชิ้นส่วนที่มาจากต้นกวาวเครือขาวที่มีอายุ 2-4 สัปดาห์ จากการวิเคราะห์แฮรีรูทด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าแฮรีรูทที่ได้จากการชักนำด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* มียีน *rol*B และ *rol*C สอดแทรกอยู่บนโครโมโซมของเซลล์พืช

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารดาอิดเซอินและเจนิสเตอินจากแฮรีรูทของกวาวเครือขาว ได้แก่ ชนิดของสูตรอาหาร แสง ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และอัตราเร็วในการเขย่า พบว่าแฮรีรูทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS สามารถเจริญและผลิตสารดาอิดเซอินและเจนิสเตอินได้สูงที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 16.66 ± 0.64 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารดาอิดเซอินและเจนิสเตอินสูงสุดเท่ากับ 4.78 ± 0.06 และ 0.82 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สำหรับอิทธิพลของแสงต่อการเจริญและการผลิตสารนั้น พบว่าแฮรีรูทที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง สามารถเจริญและผลิตสารดาอิดเซอินได้ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม พบว่าการเพาะเลี้ยงแฮรีรูทในสภาวะให้แสง มีแนวโน้มทำให้การผลิตสารเจนิสเตอินสูงกว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ไม่ให้แสงประมาณ 1.43 เท่า

สำหรับผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญและการผลิตสารดาอิดเซอินและเจนิสเตอิน พบว่าแฮรีรูทที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการเจริญและให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงที่สุดคือ 19.5 ± 0.08 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการผลิตสาร พบว่าแฮรีรูทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตสารดาอิดเซอินได้สูงที่สุด (6.85 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในขณะเดียวกันก็สามารถผลิตสารเจนิสเตอินได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกับการเพาะเลี้ยงแฮรีรูทในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและอัตราเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตสารดาอิดเซอินและเจนิสเตอินนั้น พบว่าแฮรีรูทสามารถเจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูงคือ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิต่ำคือ 22 และ 26 องศาเซลเซียส แต่ภายใต้การเพาะเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส แฮรีรูทมีการผลิตและสะสมสารดาอิดเซอินและเจนิสเตอินได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลของการเจริญและการผลิตสาร จากแฮรีรูทที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอัตราเร็วในการเขย่าที่แตกต่างกัน คือ 90, 110 และ 130 รอบต่อนาที พบว่าแฮรีรูทสามารถเจริญและผลิตสารดาอิดเซอินได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอัตราเร็วในการเขย่า 110 รอบต่อนาที ขณะที่การผลิตสารเจนิสเตอิน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกสภาวะ

This research aims to induce the hairy roots from *Pueraria candollei* Wall. ex. Benth. var. *mirifica* using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834, and investigate the effect of some factors on growth and production of daidzein and genistein by hairy root cultures of *P. candollei.* Hairy root was induced from different explants of 1- to 4-week-old seedlings of *P. candollei* and the transformation frequency was recorded after *Agrobacterium* transformation. Cotyledon and shoot segments of *P. candollei* gave the highest transformation frequency whereas stem segment gave the lowest. Furthermore, the explants derived from 1-week-old plant seedlings gave higher transformation frequency than those derived from 2- to 4-week-old plant seedlings. Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis of the transformed roots revealed the insertion of *rol*B and *rol*C within the plant chromosome.

The effects of some factors such as type of cultivation medium, light, initial concentration of sucrose in the culture medium, incubation temperature and agitation speed on growth, daidzein and genistein production by hairy roots of *P. candollei* were investigated. The results showed that MS medium gave the maximum growth of 16.66 ± 0.64 gL^{-1} as well as the maximum dadizein and genistein content of 4.78 ± 0.06 and 0.82 ± 0.04 mg g^{-1} DW, respectively, as compared to other types of cultivation medium. Growth and daidzein production from hairy roots cultivated under light (16/8 h light/dark period) and dark conditions were not significantly different; however, hairy roots cultivated under light condition produced genistein approximately 1.43-fold higher than that obtained from hairy roots cultivated under dark condition.

The influence of initial sucrose concentration in the culture medium on growth, daidzein and genistein production by hairy root cultures of *P. candollei* was evaluated, and the maximum growth of 19.5 ± 0.08 g L^{-1} was obtained when hairy roots were cultivated in medium containing 4.5 % (w/v) sucrose. With respect to daidzein and genistein production, hairy roots cultivated in medium containing 3.0% (w/v) sucrose gave the maximum daidzein content (6.85 ± 0.26 mg g^{-1}DW), while genistein content obtained from hairy roots cultivated in medium containing 3.0 or 4.5% (w/v) were not significantly different. Besides, the influences of incubation temperature and agitation speed on growth, daidzein and genistein production by hairy root cultures of *P. candollei* were also investigated. Hairy roots cultivated at 30°C exhibited higher growth than those observed at 22 or 26°C; however, the maximum daidzein and genistein contents were obtained when hairy roots were cultivated at 26°C. Agitation speed at 110 rpm gave the highest growth and daidzein content compared to other speeds. However, genistein contents obtained from hairy root at 90, 110 and 130 rpm were not significantly different.