



วิทยานิพนธ์

การผันแปรทางสัณฐาน พันธุกรรม และการผลิตสาร plumbagin
ของต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง

Morphological Variation, Genetic Variation and Plumbagin
Production of *Plumbago indica* L. Regenerated from Hairy Roots

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผันแปรทางสัณฐาน พันธุกรรม และการผลิตสาร plumbagin ของต้นที่พัฒนา
มาจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง

Morphological Variation, Genetic Variation and Plumbagin Production of
Plumbago indica L. Regenerated from Hairy Roots

นามผู้วิจัย นางสาวชนากานต์ ลักษณะ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 12 เดือน กันยายน พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผันแปรทางสัณฐาน พันธุกรรม และการผลิตสาร plumbagin ของต้นที่พัฒนา
มาจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง

Morphological Variation, Genetic Variation and Plumbagin Production
of *Plumbago indica* L. Regenerated from Hairy Roots

โดย

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ

เสนอ

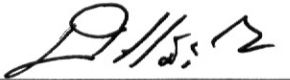
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2551

ชนากานต์ ลักษณะ 2551: การผันแปรทางสัณฐาน พันธุกรรม และการผลิตสาร
plumbagin ของต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการ
สหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. 87 หน้า

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) ที่พัฒนามาจาก
hairy root พบว่าต้นใหม่ที่ได้มีลักษณะสัณฐานเปลี่ยนแปลงไปจากต้นเดิมซึ่งสามารถแบ่งความ
ผิดปกติตามลักษณะทรงต้นและลักษณะใบออกเป็น 4 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่ 1 ใบรูปรี ขาว ขอบใบ
ม้วนเป็นคลื่น ผิวใบขน ขี้เถี ปล้องสั้น ลำต้นเดี่ยวแฉะ กลุ่มที่ 2 ลักษณะคล้ายกลุ่มที่ 1 แต่ลำต้นสูง
กลุ่มที่ 3 ใบรูปรี ขนาดสั้น ผิวใบขน ขอบใบม้วนเป็นคลื่นเฉพาะใบยอด ลำต้นเดี่ยวแฉะ กลุ่มที่ 4
มีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกลุ่มที่ 1 แต่ใบผิดปกติมากกว่าโดยปลายใบงอจนกระทั่งม้วนกลับไป
ด้านหลังทำให้เห็นเป็นก้อน ขี้เถีและปล้องสั้นมากทำให้ต้นกอดกันเป็นกระจุก เมื่อตรวจสอบการ
มีอยู่ของยีน *rol* ของเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ในจีโนมของต้นพืชเหล่านี้ด้วยเทคนิค
PCR พบว่ามีทั้งต้นที่มีการคงอยู่ของทั้งยีน *rolA rolB* และ *rolC* หรือมีเฉพาะยีน *rolB* และ *rolC*
และต้นที่มียีน *rolC* เพียงยีนเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานที่
เปลี่ยนแปลงไปกับการมีอยู่ของยีน *rol* พบว่า ยีน *rol* มีผลต่อลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของใบ
และยีน *rolA* อาจมีผลทำให้ต้นพืชเดี่ยวแฉะ แต่ต้นที่มีทั้ง 3 ยีนรวมอยู่ด้วยกันแสดงลักษณะ
ผิดปกติของต้นและใบมากกว่าต้นที่มียีน *rol* ไม่ครบทั้ง 3 ยีน เมื่อนำรากจากต้นอายุ 1 ปีที่มียีน *rol*
อยู่มาวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC พบว่า ต้นที่มียีน *rolC* มีปริมาณสาร
plumbagin สูงกว่ารากของต้นปกติ ดังนั้นยีน *rolC* จึงอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของสาร
plumbagin ส่วนยีน *rolB* นั้นยังไม่สามารถสรุปความเกี่ยวข้องได้ชัดเจน อย่างไรก็ตามพบว่ามีบาง
ต้นที่มียีน *rol* ทั้ง 3 ชนิดอยู่ในต้นเดียวกันแสดงลักษณะแตกต่างจากต้นอื่นที่มียีน *rol* ครบทั้ง 3
ยีนเช่นเดียวกัน จึงตรวจสอบจำนวนชุดของยีนด้วยเทคนิค Southern hybridization พบว่ามียีน *rol*
อยู่จำนวน 1-2 ชุด และเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสายต้นเจตมูลเพลิงแดง
ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 35 คู่ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 1,270 แถบ มีแถบ
ดีเอ็นเอที่เป็นพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 174 แถบ คิดเป็น 13.7 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าต้นเจตมูลเพลิงแดง
ที่นำมาวิเคราะห์มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ชนากานต์ ลักษณะ
ลายมือชื่อนิสิต


ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

12 / 9 / 51

Chanakan Laksana 2008: Morphological Variation, Genetic Variation and Plumbagin Production of *Plumbago indica* L. Regenerated from Hairy Roots. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame, Ph.D. 87 pages.

The hairy root culture of *Plumbago indica* L., induced by *Rhizobium rhizogenes* strain K599, was found to regenerate plantlets easily, but morphological characters of plantlets were different from those of the original species. These phenotypic differences could be divided into four different groups. *Group I*: plants had long and elliptical blade with curly leaf edge and wrinkled leaf surface and plants were dwarf. *Group II*: plants had general characters similar to *group I* plants except they were tall. *Group III*: plants had short and elliptical blade with curly leaf edge and wrinkled leaves, found only on the top of the plant, and they were dwarf. *Group IV*: plants had general characters similar to the *group I* but had a higher degree of abnormality such as the leaf apex was tightly rolled backward and plants were extremely dwarf. The detection of *rol* genes by PCR technique and the analysis by HPLC of plumbagin content in root of these plantlets were performed to determine the relationship between the abnormal characters and the presence of the *rol* genes that were transferred from bacterial to plant genome. The results revealed that *rolA* gene might be involved in the dwarfism. However, the plants that contained *rolA*, *rolB* and *rolC* genes were found to be much more abnormal than that contained only 1 or 2 genes. The *rolC* gene might be involved in the increase of plumbagin content as the roots of the *rolC* containing plants showed higher plumbagin content than those of the control roots. For *rolB*, the correlation to the phenotypes was not clearly relevant. Southern hybridization analysis of some plants that contained all of 3 *rol* genes but differed in morphological character showed that they contained 1 or 2 copies of *rol* genes. The analysis of genetic variation in all lines using AFLP technique with 35 pairs of primers generated 1,270 DNA bands with 174 polymorphic bands, which were equal to 13.7% of total bands. It was indicated that the genetic variation was induced in *P. indica* L. regenerated from hairy root.

Chanakan Laksana
Student's signature

Sermsiri Chanprame. 12 / 9 / 08
Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงยิ่ง ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษาวิธีการดำเนินการวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยเหลือในด้านอื่น ๆ เสมอมา ขอกราบขอบพระคุณกรรมการที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ ดร. กุลนาถ ออบสุวรรณ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนิ์ สงประยูร ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ให้การสนับสนุนทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยและงบประมาณในการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณเพชรรัตน์ จันทรพิณ ที่ให้คำแนะนำในการทำการทดลอง และขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว รวมทั้งทุกคนในครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้การส่งเสริมในด้านการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้า ด้วยดีเสมอมา

ชนากานต์ ลักษณะ

กันยายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	
อุปกรณ์	20
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	33
สรุป	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	65
ภาคผนวก	79
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>rol</i> ชนิดต่าง ๆ	24
2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR	25
3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์จีโนมของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root โดยวิธี AFLP	30
4 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานกับการคงอยู่ของยีน <i>rol</i> ชนิดต่างๆในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root จำนวน 50 สายต้น	40
5 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานกับการคงอยู่ และจำนวนชุดของยีน <i>rol</i> ในสายต้นที่มียีน <i>rol</i> ครอบทั้ง 3 ยีน แต่มีลักษณะสัณฐานแตกต่างจากต้นอื่นๆ ที่มียีน <i>rol</i> ครอบทั้ง 3 ยีนเช่นเดียวกัน	46
6 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานกับการคงอยู่ของยีน <i>rol</i> และการเกิดพอร์ลิเมอร์ฟิซึมในสายต้นที่มียีน <i>rol</i> ครอบทั้ง 3 ยีน แต่มีลักษณะสัณฐานแตกต่างจากต้นอื่นๆ ที่มียีน <i>rol</i> ครอบทั้ง 3 ยีนเช่นเดียวกัน	54
7 ลักษณะสัณฐานกับการคงอยู่ของยีน <i>rol</i> จำนวนชุดของยีน <i>rol</i> การเกิดพอลิเมอร์ฟิซึม และปริมาณสาร plumbagin ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ <i>R. rhizogenes</i> สายพันธุ์ K599	59
 ตารางผนวกที่	
1 ปฏิบัติการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิด	81

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร plumbagin	6
2	ตำแหน่งของยีนบน T-DNA	9
3	สายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ <i>R. rhizogenes</i> สายพันธุ์ K599 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต	33
4	ลักษณะสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไปของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ <i>R. rhizogenes</i> สายพันธุ์ K599	35
5	ลักษณะช่อดอก และดอกของต้นเจตมูลเพลิงแดงปกติ เปรียบเทียบกับลักษณะช่อดอก และดอกของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root	37
6	รากของเจตมูลเพลิงแดงอายุ 1 ปี หลังออกปลูกในกระถางเปรียบเทียบกับระหว่างลักษณะรากของต้นปกติ และลักษณะรากของสายต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ <i>R. rhizogenes</i> สายพันธุ์ K599	37
7	การคงอยู่ของยีน <i>rolA</i> ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ตรวจสอบด้วยวิธี PCR	41
8	การคงอยู่ของยีน <i>rolB</i> ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ตรวจสอบด้วยวิธี PCR	42
9	การคงอยู่ของยีน <i>rolC</i> ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ตรวจสอบด้วยวิธี PCR	43
10	ตรวจสอบการคงอยู่ และจำนวนชุดของยีน <i>rol</i> ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงบางสายต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ <i>R. rhizogenes</i> สายพันธุ์ K599 และตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ	47
11	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root โดยคู่ไพรเมอร์ E-CAG/ M-CAC	51
12	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root โดยคู่ไพรเมอร์ E-CAG/M-CTA	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13 ถ่ายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root โดยคู่ไพรเมอร์ E-CGT/ M-CAG	53
14 calibration curve ของ plumbagin standard reference	55
15 chromatogram ของ plumbagin standard reference	56
16 chromatogram ของตัวอย่างสารสกัดจากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงสายต้นที่ 36 ที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ <i>R. rhizogenes</i> สายพันธุ์ K599	56
17 ปริมาณสาร plumbagin ของรากอายุ 1 ปี ที่ได้จากสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ทั้ง 50 สายต้น เปรียบเทียบกับต้นควบคุม	58
18 ปริมาณสาร plumbagin ของรากอายุ 1 ปี ที่ได้จากสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root จำนวน 9 สายต้น ที่พบว่าปริมาณสารสูงกว่าต้นปกติมาก แยกเป็น 7 สายต้น จากกลุ่มที่ 1 และ 2 สายต้น จากกลุ่มที่ 2 เปรียบเทียบกับต้นควบคุม	58
ภาพผนวกที่	
1 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rolA</i>	84
2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rolB</i>	85
3 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rolC</i>	86

**การผันแปรทางสัณฐาน พันธุกรรม และการผลิตสาร plumbagin
ของต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง**

**Morphological Variation, Genetic Variation and Plumbagin Production
of *Plumbago indica* L. Regenerated from Hairy Roots**

คำนำ

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยชนิดหนึ่ง อยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae ซึ่งพบได้ทั่วไปในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รากเจตมูลเพลิงแดง มีสารทุติยภูมิที่สำคัญชนิดหนึ่งคือสาร plumbagin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone (สุภาพรณ์, 2547) สารนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (ภูมิพิชญ์ และปรีชา, 2536; สุปรานี และสุพัตรา, 2542) ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อยีสต์ และมาลาเรีย (Likhitwitayawuid *et al.*, 1998) และในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงระดับของกลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Hsu *et al.*, 2006; Gomathinayagam *et al.*, 2008) ซึ่งพบว่ากลไกยับยั้งเกิดขึ้นโดยการชักนำให้เซลล์เกิด apoptosis หรือเกิด cell cycle arrest เป็นต้น ซึ่งผลงานวิจัยในด้านต่าง ๆ เหล่านี้จะนำไปสู่การนำสาร plumbagin มาใช้ประโยชน์ในวงการเภสัชกรรมในอนาคต

ทั้งนี้ในการพัฒนาสู่อุตสาหกรรมยานั้นวัตถุดิบที่จะนำมาเข้าสู่กระบวนการสกัดสารทุติยภูมิจะต้องมีความสม่ำเสมอ และมีปริมาณมากเพียงพอที่จะรองรับอุตสาหกรรมยาที่มีแนวโน้มพัฒนาขึ้น ซึ่งการผลิตสารทุติยภูมิจากรากในสภาพเพาะเลี้ยงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะเข้ามามีบทบาทในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นระบบที่สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณของผลผลิตให้เป็นไปตามความต้องการ จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารทุติยภูมิจากรากในสภาพเพาะเลี้ยงนั้น พบว่ามีการปลูกเชื้อ *Rhizobium rhizogenes* (ชื่อเดิม *Agrobacterium rhizogenes*) ที่เป็นเชื้อสาเหตุของลักษณะอาการ hairy root ให้กับพืชและมีผลทำให้พืชที่ถูกเชื้อบุกรุกเกิดรากฝอยขึ้นเป็นจำนวนมากตรงบริเวณเชื้อบุกรุกเข้าสู่เซลล์ (Casanova *et al.*, 2005) รากที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า hairy root ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือ ไม่ตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วงของโลกและสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในสภาพเพาะเลี้ยงโดยไม่ต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโต จึงทำให้สามารถผลิตรากและสารทุติยภูมิได้ในปริมาณมาก ซึ่งรากที่มีลักษณะนี้ Srivastava (1998) อธิบายว่ายังสามารถ

ทำหน้าที่หลักได้เช่นเดียวกับรากปกติและมีเมทาบอไลต์เช่นเดียวกับรากทั่วไป โดยที่ผ่านมามีงานวิจัยในพืชหลายชนิดเช่น โสม (Yang and Choi, 2000) *Centaurium erythaea* (Piatczak *et al.*, 2006) และเรดปัท (Thimmaraju *et al.*, 2008) เป็นต้น สำหรับเจตมูลเพลิงแดงนั้น สุภากรณ์ (2547) ได้ทดลองชักนำให้เกิด hairy root โดยเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี และรากที่ได้มีการเจริญเติบโตดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และต่อมามีรายงานเพิ่มเติมว่ารากที่ได้มีการสร้างสาร plumbagin ได้มากกว่ารากปกติที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยง (Chuntaratin, 2006) นอกจากนี้ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงยังสามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้ง่ายโดยยอดดังกล่าวเจริญได้ดีและสร้างรากที่มีลักษณะเป็น hairy root จำนวนมาก แต่ยอดที่ได้มีลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไปจากต้นปกติหลายประการ เช่น ข้อถี่ ลำต้นเตี้ยแกระ ใบบิดเบี้ยวเป็นคลื่น (สุภากรณ์, 2547) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานนี้อาจเป็นผลมาจากยีน *rol* ของเชื้อ *R. rhizogenes* (Casanova *et al.*, 2005)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการมีอยู่ของยีน *rol* ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและปริมาณสาร plumbagin ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจาก hairy root ซึ่งเป็นงานวิจัยที่ทำต่อเนื่องมาจากการงานของ สุภากรณ์ (2547) และ Chuntaratin (2006) ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้นอกจากจะได้ต้นที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากขึ้นสำหรับเป็นแนวทางการปรับปรุงพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงให้มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิมากขึ้นแล้ว ยังจะนำไปสู่ความเข้าใจในกระบวนการควบคุมและการแสดงออกทางสัณฐานของยีน *rol* ได้มากขึ้นด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *rol* ที่มีต่อสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *Rhizobium rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ทั้งในด้านลักษณะด้านพันธุกรรม และด้านความสามารถในการผลิตสาร plumbagin ในแต่ละสายต้น

การตรวจเอกสาร

เจตมูลเพลิงแดงเป็นพืชสมุนไพรที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย (Vermeulen, 1998) และพบกระจายพันธุ์ในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย เจตมูลเพลิงแดงอยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Plumbago indica* L. มีชื่อสามัญในภาษาอังกฤษว่า rose coloured leadwort, indian leadwort, fire plant และ official leadwort (ภูมิพิชญ์ และปรีชา, 2536) ในประเทศไทยมีชื่อพื้นบ้านหลายชื่อ เช่น ปิดปิวแดง (อีสาน) คู้ยวู้ (กะเหรี่ยง - กาญจนบุรี) ไฟใต้ดิน (ใต้) ตั้งชูโว้ (กะเหรี่ยง - แม่ฮ่องสอน) อุบะกูจ๊ะ (มลายู) (วุฒิ, 2540)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเจตมูลเพลิงแดง

เจตมูลเพลิงแดงเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ขอดสีแดงอ่อน ลำต้นกลมเรียบ สีเขียวเข้มออกแดง มีสีแดงบริเวณข้อ สูง 1-2 เมตร ใบ มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว สีเขียวอมแดง เรียงสลับ ผิวใบมัน รูปไข่แกมวงรี ปลายใบแหลม โคนใบมน คล้ายกับใบมะลิแต่ใหญ่กว่าใบมะลิเล็กน้อย (ภูมิพิชญ์ และ ปรีชา, 2536; พเยาว์, 2537; วุฒิ, 2540) กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อแบบช่อกระจุกเชิงลด ออกที่ปลายกิ่ง มีดอกย่อย 10-15 ดอก กลีบดอกสีแดง รูปรี มี 5 กลีบ โคนกลีบดอกเชื่อมกันเป็นหลอดเล็ก ๆ (นิจศิริ, 2547) กลีบเลี้ยงสีเขียวมีต่อมซึ่งเมื่อจับจะรู้สึกเหนียว (นันทวัน และ อรณัฐ, 2539) ผล ทรงรียาว เมื่อผลแก่จะแตกออกตามร่อง รากมีสีน้ำตาลดำ ยาว 0.5-1.5 เมตร มีลักษณะเป็นเส้น ๆ ขนาดใหญ่ (Chuakul *et al.*, 1994) การขยายพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงนิยมใช้การปักชำกิ่ง (วุฒิ, 2540) หรือปักชำราก เนื่องจากตามธรรมชาติติดเมล็ดน้อยมาก

สารทุติยภูมิในเจตมูลเพลิงแดง

ในเจตมูลเพลิงแดงมีสารทุติยภูมิที่สำคัญคือสาร plumbagin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม alkylated naphthoquinone (Ichihara *et al.*, 1980) และสารในกลุ่ม 3-chloroplumbagin 1,4-naphthoquinone (Dinda and Chel, 1992) ซึ่งพบมากในส่วนราก สำหรับส่วนที่อยู่เหนือพื้นดิน (aerial part) พบสารกลุ่ม campesterol (บุษบา และคณะ, 2519) 6-hydroxyplumbagin, stigmasterol (Dinda and Chel, 1992) และ plumbagin (Dinda *et al.*, 1994)

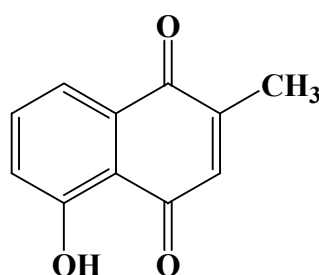
สรรพคุณของเจตมูลเพลิงแดงในการแพทย์

ในเอกสารทางการแพทย์แผนไทยระบุว่าเจตมูลเพลิงแดงเป็นสมุนไพรที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีรสร้อน ใบใช้แก้ลมในกองเสมหะ ช่วยย่อยอาหาร และขับผายลม ดอกใช้แก้โรคตา และโรคที่ทำให้หนาวและเย็น ผลแก้โรคพยาธิผิวหนัง และแก้ฝี ลำต้นใช้ขับโลหิตระดู แก้ปวดท้อง (วุฒิ, 2540) กระพี้ใช้แก้เกลื้อนช้าง แก่นใช้แก้ขี้เรื้อนกว้าง (psoriasis) และขี้เรื้อนน้ำเต้า (นันทวัน และอรนุช, 2539) รากใช้บำรุงธาตุ บำรุงโลหิต ขับลมในกระเพาะอาหารและลำไส้ ขับโลหิตระดู แก่ริดสีดวงทวาร แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย มีฤทธิ์บีบมดลูกทำให้แท้งได้ ดังนั้นจึงมีการนำมาใช้ในการคุมกำเนิด นอกจากนี้ยังใช้ทาแก้โรคผิวหนัง กลากเกลื้อน (สุนทร, 2536; วุฒิ, 2540) แก่ธาตุพิการ เสมหะในทรวง ปอดบวม กุดทะราด พยาธิ รังแค ปวดศีรษะ ขับเหงื่อ (นันทวัน และอรนุช, 2539) ระวังอาการปวดฟัน (ก่องกานดา, 2536) แก้เลือดคั่งขึ้นเมื่อคลอดบุตรแล้ว แก้โรคเข้าข้อและเป็นอัมพาต และในภาคเหนือของไทยนิยมนำรากเจตมูลเพลิงแดงมาใส่ในยาคลองเหล้าเพื่อบำรุงโลหิต ขับประจำเดือน และช่วยให้เจริญอาหาร (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2541) นอกจากนี้ในประเทศอินเดียนิยมใช้เจตมูลเพลิงแดงเป็นยาอายุรเวท รักษาโรคหลายชนิดเช่น โรคท้องร่วง โรคผิวหนัง ไข้ข้ออักเสบ โรคเรื้อน และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร (Sakamoto *et al.*, 2007)

ในทางการแพทย์แผนปัจจุบันมีรายงานว่าสาร plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ต้านทานเชื้อราหลายชนิดเช่น *Candida albicans* (ภูมิพิชญ์ และปรีชา, 2536; สุปรานี และสุพัตรา, 2542; Dzoyem *et al.*, 2007) และเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชเช่น *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* (ศกุนตลา, 2548) ด้านเชื้อแบคทีเรีย ด้านยีสต์ ด้านมาลาเรีย (Likhitwitayawuid *et al.*, 1998) ยับยั้งเซลล์มะเร็ง เช่น มะเร็งปอด (Hsu *et al.*, 2006) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Zhao and Lu, 2006) มะเร็งต่อมลูกหมาก (Powolny and Singh, 2008) เป็นต้น โดยสาร plumbagin จะขัดขวางกระบวนการทำงานของเซลล์ในช่วง G2/M ในวัฏจักรของเซลล์ (Zhao and Lu, 2006)

สูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร plumbagin

สาร plumbagin มีสูตรทางเคมีคือ $C_{11}H_8O_3$ และมีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthalenedione หรือ 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone มีน้ำหนักโมเลกุล 188.17 ดาลตัน เป็นสารประกอบประเภท quinone จัดอยู่ในกลุ่ม naphthoquinone มีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 2 วง (Budavari, 1996) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สูตร โครงสร้างทางเคมีของสาร plumbagin (Durand and Zenk, 1971)

การผลิตสารทุติยภูมิในสภาพปลอดเชื้อ

กระบวนการสกัดสารทุติยภูมิเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมยาจะต้องมีความสม่ำเสมอและมีปริมาณมากเพียงพอ ซึ่งการผลิตสารทุติยภูมิในสภาพปลอดเชื้อเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะเข้ามามีบทบาทในการพัฒนาวัตถุดิบ เนื่องจากเป็นระบบที่สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณของผลผลิตให้เป็นไปตามความต้องการ ซึ่งมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตสารทุติยภูมิในสภาพปลอดเชื้อเช่น

Wungsintaweekul (2006) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย และแคลล์จากห้วใต้ดินของกวาวเครือขาวพบว่าเซลล์ทั้ง 2 มีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิคือ สาร Daidzein และ Genistein และเซลล์แขวนลอยผลิตสารได้มากกว่าแคลล์

อรสา (2543) ได้ศึกษาการสร้างสาร plumbagin จากเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาวพบว่า อาหารสูตร LS ที่เติมฮอร์โมน NAA 2,4 -D อย่างละ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงและเซลล์แขวนลอยจากส่วนของใบอ่อน และเซลล์

เพาะเลียงสามารถผลิตสาร plumbagin ได้มากในสูตรอาหาร MS ที่มี 2,4-D หรือ BA เพื่อเป็นแหล่งฮอร์โมนและเติม manital เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน

ส่วนของรากสามารถเพาะเลี้ยงได้เช่นกัน โดย Yu *et al.* (2002) ได้เพาะเลี้ยงรากของโสม (*Panax ginseng*) ร่วมกับสิ่งกระตุ้นคือ Jasmonic acid ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าสามารถผลิตสาร ginsenoside เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับรากในธรรมชาติและ Panichayupakaranant and Tewtrakul (2002) ได้ศึกษาการผลิตสาร plumbagin จากรากเพาะเลียงที่ชักนำจากใบของเจตมูลเพลิงแดงพบว่า รากที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณสาร plumbagin มากที่สุด และเมื่อชักนำรากจากใบของต้นที่ผลิตสาร plumbagin สูงสุด แล้วนำรากไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ที่เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์พบว่า รากเพาะเลียงให้ปริมาณสาร plumbagin เพิ่มขึ้นถึง 0.129 ± 0.0139 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังมีรากอีกชนิดหนึ่งคือ hairy root ที่มีผู้นิยมใช้เพาะเลี้ยงกันมาก ซึ่ง hairy root ได้มาจากการปลูกเชื้อ *Rhizobium rhizogenes* โดย hairy root สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้โดยรวมทั้งให้ปริมาณสารได้มากกว่าในรากปกติ และยังสามารถพัฒนาต้นจาก hairy root ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (สุภาภรณ์, 2547)

เชื้อ *Rhizobium rhizogenes*

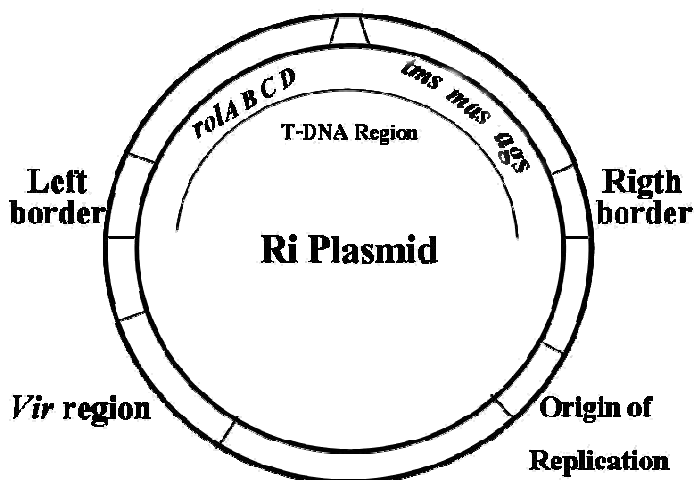
เชื้อ *Rhizobium rhizogenes* ชื่อเดิมคือ *Agrobacterium rhizogenes* (Young *et al.*, 2001) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน จัดอยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ภายหลังถูกเปลี่ยนชื่อมาเป็น *R. radiobacter* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคมะเร็ง (crown gall) และในปัจจุบันนำมาใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชกันมาก เชื้อ *R. rhizogenes* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค hairy root ที่พบได้ในพืชใบเลี้ยงคู่ พืชที่เป็นโรสดังกล่าวจะมีรากฝอยเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากตรงบริเวณที่เชือบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืช เชื้อ *R. rhizogenes* สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มตามการสร้างสารในกลุ่ม opine ซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียชักนำให้พืชสร้างขึ้นเมื่อเชือบุกรุกพืช (สุรินทร์, 2548) ซึ่งได้แก่ กลุ่มที่สร้างสาร mannopine เช่น สายพันธุ์ 8196 TR7 และ TR101 กลุ่มที่สร้างสาร cucumopine เช่น สายพันธุ์ K599 ในขณะที่กลุ่มที่สร้างสาร agropine เช่น สายพันธุ์ ATCC15834 A4 T5843 ATCC11325 และ ATCC13332 และกลุ่มที่สร้างสาร mikimopine (Shi and Kintzios, 2003) โดยสาร opine เหล่านี้จะเป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่จะเป็นอาหารของเชื้อ *R. rhizogenes* (สุรินทร์, 2548; Altamura, 2003)

กลไกการเกิด hairy root

โรค hairy root เป็นโรคพืชที่เกิดในพืชชั้นสูง ลักษณะอาการของโรคคือ เกิดรากฝอยจำนวนมากบริเวณที่ถูกเชื้อบุกกรุก โดยการเจริญของรากที่เกิดขึ้นจะต่างจากรากพืชปกติ คือมีการแตกแขนงของรากในปริมาณมากและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Liu *et al.*, 2002) และมีทิศทางการเจริญของรากไม่แน่นอน แต่ยังมีกระบวนการ metabolism เช่นเดียวกับรากทั่วไป (Srivastava, 1998) การเกิด hairy root มีกลไกคล้ายกับการเกิดโรค crown gall ที่เกิดจากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* โดยเชื้อ *R. rhizogenes* จะมีพลาสมิด Ri (Root inducing plasmid) เมื่อเชื้อ *R. rhizogenes* เข้าบุกรุกที่บริเวณบาดแผลหรือช่องเปิดของพืชจะมีการส่ง T-DNA (transferred DNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิด Ri เข้าไปในเซลล์พืชและแทรกตัวอยู่ในโครโมโซมของพืช (Tepfer, 1990) ภายใน T-DNA มียีนที่กำหนดการสร้างสาร opine ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชแล้วเซลล์พืชจึงสามารถสร้างสาร opine ขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ri นั้น ทำให้เชื้อ *R. rhizogenes* สามารถเจริญเติบโตโดยใช้สาร opine ที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ เนื่องจากเชื้อมียีนที่กำหนดให้ย่อยสลายสาร opine ในการสร้างสาร opine ของพืชนี้ แม้เมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไปจากพืชแล้วพืชจะยังคงสังเคราะห์สาร opine ได้เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปรวมกับจีโนมของเซลล์พืชอย่างถาวร นอกจากนี้ในส่วนของ T-DNA ยังมียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ควบคุมการเจริญเติบโต โดยฮอร์โมนกลุ่มออกซิน ทำให้เซลล์พืชที่ได้รับชิ้นส่วน T-DNA มีการเจริญอย่างรวดเร็วและสามารถพัฒนาเป็นรากหรือยอดได้ดี (Liu *et al.*, 2002)

สำหรับการเคลื่อนย้ายส่วนของ T-DNA จากเชื้อเข้าสู่จีโนมพืชนั้นขอบเขตของยีนที่ถูกเคลื่อนย้ายถูกกำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) 25 คู่เบสที่วางตัวอยู่ที่ส่วนปลาย 2 ข้างของ T-DNA เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) บริเวณที่อยู่ใกล้ LB-DNA ประกอบด้วย 18 open reading frame (ORFs) โดยมียีนที่สำคัญคือยีน *rolA rolB rolC* และ *rolD* ซึ่งตรงกับ ORFs ที่ 10 11 12 15 ตามลำดับ ส่วนบริเวณที่อยู่ใกล้ RB-DNA ประกอบด้วยยีน *aux1 aux2 mas1 mas2* และ *ags* (ภาพที่ 2) สำหรับสร้างฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน และสาร opine (Grant *et al.*, 1991) การเคลื่อนย้าย T-DNA จาก Ri-plasmid มีกลไกเช่นเดียวกับการย้าย T-DNA จาก Ti-plasmid ของ *A. tumefaciens* ตัวจีโนมของพืช โดยมียีนบริเวณ virulence region (*vir* region) ทำหน้าที่ส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช การแสดงออกของยีนใน *vir* region ถูกกระตุ้นโดยสารกลุ่ม phenolic compound คือ acetosyringone ซึ่งพืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล โดยสารเหล่านี้ทำให้ยีนบริเวณ

vir region เกิด transcription ได้ *vir* enzyme ไปทำหน้าที่ส่งเสริมการเคลื่อนย้าย T-DNA จาก Ri หรือ Ti-plasmid ไปสู่จีโนมพืชในแบบดิเอ็นเอสายเดี่ยว โดย *vir* enzyme จะมีทิศทางการส่งถ่ายเริ่มจากขอบเขตทางขวา (RB) ไปจดด้านซ้าย (LB) ดังนั้น RB จึงเป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA เข้าสู่จีโนมพืช ส่วนขอบเขตทางซ้าย (LB) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดจุดสิ้นสุดของชิ้นดิเอ็นเอที่ถูกส่งเท่านั้น ซึ่งแม้ว่าจะมีเพียง RB แต่ไม่มีส่วน LB การย้าย T-DNA ก็เกิดขึ้นได้ แต่จะมีขนาดไม่แน่นอนเพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายจะเกิดขึ้นแบบสุ่ม ทำให้ยีนบางส่วนอาจขาดหายไปได้ (สุรินทร์, 2548) และ Ambros *et al.* (1986) ยังพบอีกว่า T-DNA ไม่มีตำแหน่งที่สอดคล้องแทรกเข้าสู่จีโนมของพืชที่แน่นอน เนื่องจากพบว่าเกิดการขาดหายไปของยีนบางส่วนในระหว่างการแทรกเข้าไปในจีโนมพืช โดยได้ใช้เทคนิค *in situ* hybridization ในการศึกษาตำแหน่งของ T-DNA บนโครโมโซมของ hairy root ของ *Crepis capillaries* ที่เกิดจาก *R. rhizogenes* สายพันธุ์ 8169 พบว่าไม่มีตำแหน่งสอดคล้องที่เฉพาะเจาะจงของ T-DNA บนโครโมโซมของ hairy root และยังสามารถพบได้ทั้ง T-DNA 1 ชุด บนโครโมโซมใดโครโมโซมหนึ่งหรือแบบที่มี T-DNA 2 ชุด บนโครโมโซมต่างแท่งในเซลล์เดียวกัน



ภาพที่ 2 ตำแหน่งของยีนบน T-DNA (ดัดแปลงจาก White *et al.*, 1985 ; Rhodes *et al.*, 1990)

hairy root ที่เกิดขึ้นเนื่องจากผลของยีนที่อยู่บน Ri-plasmid ที่ถูกย้ายเข้าไปรวมกับจีโนมพืชนี้ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในสภาพปลอดเชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Srivastava, 1998) จึงมีการเพาะเลี้ยง hairy root เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น การผลิตสารทุติยภูมิ โดยสุภาภรณ์ (2547) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง hairy root ในเจตมูลเพลิงแดง พบว่า hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ในที่มีดีให้ปริมาณสาร plumbagin มากกว่ารากปกติที่ได้จากการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ hairy root ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสามารถเกิดต้นได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาในพืชชนิดอื่นอีกหลายชนิดเช่น Nishikawa and Ishimaru (1997) พบว่ารากของ *Scutellaria baicalensis* ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สามารถผลิตสารในกลุ่ม flavonoid ได้ ในขณะที่รากต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อไม่พบสารนี้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า hairy root สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้คืออีกด้วยเช่น จากรายงานของ Giri *et al.* (2001) ที่พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง hairy root ของต้นชิงเฮา (*Artemisia annua*) คืออาหารสูตร 1/2MS หรือ 1/4MS และพบว่า hairy root ของพืชดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ ส่วนงานวิจัยของรังสิรัตน์ (2535) ที่ได้เพาะเลี้ยง hairy root ของลำโพงกาสลักในสูตรอาหาร MS สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาให้เกิดเป็นต้นได้ เช่นเดียวกับ Tepfer (1990) ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้จาก hairy root ของ *Nicotiana sp.* อย่างไรก็ตาม Subroto *et al.* (2001) รายงานว่าต้นที่ได้พัฒนาจาก hairy root ของ *Solanum nigrum* L. มีลักษณะเตี้ย แคระแกร็น ขอบปล้องสั้น ใบสีเข้ม หงิกงอ ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน *rol*

การแสดงออกของยีน *rol*

การทำงานที่แน่นอนของยีน *rol* ซึ่งส่งผลให้ภายหลังการถ่ายยีนจากพลาสมิด Ri ของ *R. rhizogenes* ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานในแบบต่าง ๆ ในต้นพืชที่พัฒนามาจาก hairy root นั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามในภาพรวมพบว่าการแสดงออกของยีน *rol* ทำให้พืชหลายชนิดมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานอย่างเห็นได้ชัด รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับความไวต่อฮอร์โมนในพืชหลายชนิด (สุรินทร์, 2548) Christey ได้รายงานไว้ในปี 2001 ว่ามีการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* ในพืชแล้วประมาณ 79 ชนิด จาก 55 สกุล 27 วงศ์ ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่เกือบทั้งหมด และมี gymnosperm จำนวน 1 วงศ์ โดยรายงานว่า ต้นที่สามารถพัฒนามาจาก hairy root จะมีลักษณะทางสัณฐานแตกต่างจากต้นปกติ เช่น มีลำต้นเตี้ยแคระ มีการแตกกิ่งก้านมากขึ้น ใบหิก มีปริมาณรากเพิ่มมากขึ้น และมีรูปแบบดอกที่หลากหลาย ซึ่งจากการศึกษาผลโดยตรงของยีน *rol* ต่อพืชโดยการถ่ายยีนเฉพาะส่วนของยีน *rol* ซึ่งประกอบด้วยยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงลักษณะทางสัณฐาน ทั้งในต้นที่มีการคงอยู่ของยีน *rol* เพียงยีนเดียวหรือรวมกันหลายยีน พบว่าทำให้ลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมได้ (Casanova *et al.*, 2005) ซึ่งลักษณะต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นนั้นมาจากการแสดงออกของยีน *rol* และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเฉพาะในด้านปรับปรุงพันธุ์ไม้ประดับเช่น ลักษณะเตี้ยแคระเหมาะสำหรับใช้เป็นไม้กระถางได้ดี (Hosokawa *et al.*, 1997) จากผลของการแสดงออกของยีน *rol* ดังกล่าวจึงมีผู้นำแนวคิดนี้ไปพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์พืชชนิด

อื่น ๆ มากขึ้นเช่น Winefield *et al.* (1999) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* ในต้นพิทูเนียทำให้ต้นเตี้ย แคระ และดอกมีจำนวนมากขึ้นทำให้เหมาะสำหรับการทำเป็นไม้กระถางหรือ Zhu *et al.* (2003) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* ในต้นแพร์ทำให้ได้ต้นที่มีจำนวนรากเพิ่มขึ้นจึงทำให้มีการเจริญเติบโตดี ซึ่งเป็นผลให้มีการศึกษาผลของยีน *rol* แต่ละชนิดเพิ่มมากขึ้นทำให้ต่อมาทราบรายละเอียดและกลไกการทำงานของยีน *rol* ชนิดต่าง ๆ มากขึ้นโดยมีข้อมูลในแต่ละยีนดังนี้

ยีน *rolA*

มีรายงานว่ายีน *rolA* สามารถแสดงออกได้ดีในส่วนของ phloem ทำให้พบการแสดงออกของยีนมากในส่วนของลำต้น ส่วนการแสดงออกของยีนในรากและใบจะน้อย ยีน *rolA* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะสัณฐานของพืช เช่น ในยาสูบพบว่าทำให้เกิดอาการใบหงิก ซึ่งมีสาเหตุมาจากเกิดการยับยั้งกระบวนการ elongation ในเซลล์ parenchyma ที่อยู่ใกล้กับ vascular bundle นอกจากนี้พบว่าใบมีสีเขียวเข้มขึ้น จำนวนดอกลดลง ลำต้นเตี้ยเป็นพุ่ม (Lee *et al.*, 2001) Dehio *et al.* (1993) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *rolA* ในต้นยาสูบพบว่าการลดลงของฮอร์โมนออกซิน ไซโตไคนิน จิบเบอเรลลิน และแอบซิสสิกแอซิด แต่การลดลงของฮอร์โมนนั้นขึ้นอยู่กัยชนิดของเนื้อเยื่อด้วย ทำให้มีผู้สนใจที่จะศึกษาผลของการแสดงออกของยีน *rolA* เช่น Lee *et al.* (2001) ได้ถ่ายยีน *rolA* เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าวโดยใช้ CaMV35S เป็นโปรโมเตอร์ พบว่าต้นข้าวที่ชักนำจากโปรโตพลาสต์มีลักษณะเปลี่ยนแปลงจากต้นปกติคือ ลำต้นเตี้ย แคระ ใบหงิก สีเขียวเข้ม ช่อดอกสั้น จำนวนรากลดลง และเมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rolA* ด้วยเทคนิค PCR พบว่าการคงอยู่ของยีน *rolA* เมื่อตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *rolA* ด้วยเทคนิค Southern hybridization พบจำนวนชุดของยีนอย่างน้อย 1 ชุด

ยีน *rolB*

ยีน *rolB* มีรายงานว่าพบการแสดงออกในส่วนของเซลล์ phloem parenchyma และ pericycle ทำให้ส่วนลำต้น ราก และเนื้อเยื่อเจริญของส่วนดอก การศึกษาของ Cardarelli *et al.* (1987) พบว่ายีน *rolB* มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิด hairy root โดยได้มีการศึกษาในพืชหลายชนิดที่มีการคงอยู่ของยีน *rolB* เพียงยีนเดียวพบว่าสามารถชักนำให้เกิด hairy root และรากมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีการแตกแขนง และเจริญเติบโตแบบไม่เป็นไปตามแรงโน้มถ่วงของโลก แต่พบว่าถ้าถ่ายยีน *rolB* เพียงยีนเดียวโดยไม่มียีน *aux* ที่อยู่ในส่วนของ T_R-DNA ด้วยจะไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ นอกจากยีน *rolB* สามารถชักนำให้เกิด hairy root แล้วยังสามารถ

กระตุ้นให้รากที่เกิดขึ้นมีการสร้างเนื้อเยื่อเจริญ (meristem tissue) และพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืชตามความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องอีกด้วย (Altamura, 2003) Maurel *et al.* (1990) ได้ถ่ายยีน *rolB* เข้าสู่ยาสูบ พบว่ายีน *rolB* สามารถกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนในกลุ่มออกซินได้เพิ่มขึ้น 20-200 เท่า ในขณะที่ยีน *rolC* สามารถเพิ่มออกซินได้ 10 เท่า แต่ก็ยังพบว่าทั้งยีน *rolB* และ *rolC* ขาก็สามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีน *rolB* ยังทำให้ลักษณะทางสัณฐานอื่น ๆ เปลี่ยนแปลงไปจากปกติอีกเมื่อมีการเติมฮอร์โมนลงในอาหารเพาะเลี้ยงหรือเมื่อมียีน *rolC* ร่วมอยู่ด้วยเช่น รูปร่างใบแตกต่างจากปกติ เพิ่มจำนวนเกสรเพศเมียเพิ่มมากขึ้น ส่วนในไม้ผลยีน *rolC* Welanders *et al.* (2003) ได้ทดลองปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* ในดินแอปเปิ้ล พบว่ายีน *rolB* ทำให้มีรากมากขึ้น และรากมีความแข็งแรงส่งผลให้การทรงตัวของต้นดีขึ้น อย่างไรก็ตาม Cola *et al.* (1996) ได้ถ่ายยีน *rolB* เข้าสู่ยาสูบ พบว่าเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดรากได้แต่ไม่สามารถทำให้เซลล์พัฒนาเป็นต้นได้

ยีน *rolC*

ยีน *rolC* มีการแสดงออกในส่วนของเซลล์ phloem companion และเซลล์ root protophloem initial (Guivarc'h *et al.*, 1996) สำหรับพืชที่มีการคงอยู่ของยีน *rolC* จะมีลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไปเช่น ลดการข่มตายอดทำให้ต้นแตกแขนงมาก ใบรูปร่างผิดปกติไป ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง ลำต้นเตี้ยแคระ ความยาวปล้องลดลง ซึ่งลักษณะเตี้ยแคระมีสาเหตุมาจากการลดขนาดเซลล์ epidermis ในส่วน internode นอกจากนี้ยังพบว่า ดอกมีขนาดเล็ก ออกดอกเร็วขึ้น และปริมาณรากเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับต้นปกติ แต่เมื่อเทียบกับระหว่างที่มียีน *rol* ครอบงำยีนกับต้นที่มียีน *rolC* เพียงยีนเดียวพบว่าต้นที่มียีน *rol* ครอบงำยีนจะมีปริมาณรากมากกว่า (Palazon *et al.*, 1997) นอกจากนี้ Schmulling *et al.* (1988) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *rolC* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35S พบว่ามีผลทำให้ดอกตัวผู้เป็นหมัน และใบมีสีเขียวเข้ม ลำต้นเตี้ยแคระ เป็นพุ่ม ดังนั้นยีน *rolC* จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาพันธุ์ไม้ประดับ

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่น ๆ ที่ยืนยันผลที่เกี่ยวข้องกับยีน *rolC* อีกหลายรายงานเช่น Casanova *et al.* (2005) ได้ทำการถ่ายยีน *rolC* โดยใช้ CaMV35S เป็นโปรโมเตอร์ ในใบและกลีบดอกของคาร์เนชั่นแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0-0.05 μM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 μM สามารถชักนำให้เกิดรากและต้นได้ แม้จะไม่เติม TDZ ดังนั้นยีน *rolC* จึงเป็นยีนที่ทำหน้าที่คล้ายคลึงกับฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน และออกซิน

Lee *et al.* (2004) ได้ศึกษาการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ 15834 ที่ใบเลี้ยง ลำต้น รากของต้นอ่อน *Taraxacum platycarpum* พบว่า ส่วนของรากเกิด hairy root ดีที่สุด และ hairy root สามารถเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ และต้นที่ได้มีลักษณะทางสัณฐานแตกต่างจากต้นปกติ คือมีการแตกกิ่งก้านมากกว่าต้นปกติ ใบหจิก ลำต้นเตี้ย และเมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR และ Southern hybridization พบการคงอยู่ของยีน *rolC* ทุกต้น

Piatczak *et al.* (2006) ได้รายงานผลการศึกษาของการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ LBA 9402 ในใบของ *Centaureum erythraea* พบว่าสามารถชักนำให้เกิด hairy root และเมื่อนำ hairy root ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสามารถพัฒนาให้เกิดต้นได้ดี และต้นที่ได้มีการแตกแขนงของกิ่งก้านมาก ใบหจิก มีดอกมาก และจากการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rol* ใน hairy root ด้วยวิธี PCR พบว่ามียีน *rolC* อยู่

ยีน *rolD*

ยีน *rolD* สามารถพบได้เฉพาะในส่วน T_L-DNA ของเชื้อในกลุ่มที่สร้างสาร agropine เท่านั้น Limami *et al.* (1998) ได้ศึกษาผลของยีน *rolD* ในต้นแครอต พบว่าทำให้ต้นเตี้ยแคระ และ Mauro *et al.* (1996) ได้ศึกษาในต้นยาสูบพบว่าผลทำให้ดอกออกเร็วขึ้น แต่พบว่ายีน *rolD* สามารถชักนำให้เกิดรากได้น้อยมาก ซึ่งจากผลการศึกษาผลของการคงอยู่ของยีน *rolD* นั้นพบว่า มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของพืชน้อยมากจึงไม่มีผู้นิยมนักที่จะศึกษายีนนี้ (Casanova *et al.*, 2005)

การแสดงออกที่เป็นผลมาจากยีน *rol* หลายชนิดร่วมกัน

มีรายงานว่า การแสดงออกของยีนที่มากกว่า 1 ยีนจะทำให้มีการแสดงผลต่อพืชมากกว่าการ แสดงออกของยีนเพียงยีนเดียว (Mercuri *et al.*, 2003) เช่น Michael and Spina (1995) รายงานว่า ยาสูบและพืชสกุลอื่น ๆ ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* พบว่ามีการคงอยู่ของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* สามารถที่จะพัฒนาให้เป็นต้นได้ และพืชจะมีลักษณะทางสัณฐานแตกต่างจากต้นปกติ เช่น ใบหจิก ขี้อปล้องสั้น จำนวนยอดลดลง ทิศทางรากไม่เป็นไปตามแรงโน้มถ่วงของโลก ชะลอการ ออกดอก จำนวนละอองเกสรลดลง มีผลทำให้ติดเมล็ดน้อยลง และ Giovannini *et al.* (1997) ได้ ทดลองปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* ใน *Osteospermum ecklonis* ซึ่งเป็นไม้ประดับ พบว่าต้นที่มีทั้งยีน

rolA rolB และ *rolC* ทำให้พืชออกดอกเร็วขึ้น และมีจำนวนดอกมากขึ้น ส่วนต้นที่มีทั้งยีน *rolA* และ *rolB* ทำให้ก้านดอกสั้น และใบสีเขียวเข้ม ทำให้ต้นที่ได้มีความสวยงามมากกว่าต้นปกติ

Choi *et al.* (2004b) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* RI000 ให้กับส่วน hypocotyl ของต้น แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) พบว่าสามารถชักนำให้เกิด hairy root และเมื่อนำ hairy root มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อก็สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสามารถชักนำให้เกิดต้นจาก hairy root ได้อีกด้วย โดยต้นที่เกิดมานั้นมีรากมากกว่าต้นปกติ ลำต้นมีข้อปล้องสั้น ใบหึงก กลิบบอกเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีชมพูอ่อน ปลายกลีบดอกสีขาว และจากการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *VirC rolB* และ *rolC* ทั้งใน hairy root และในต้นที่พัฒนามาจาก hairy root โดยวิธี PCR และ Southern hybridization พบว่ามีการคงอยู่ของยีน *rolB* และ *rolC* จำนวน 1-2 ชุด แต่ไม่พบการคงอยู่ของยีน *VirC*

Thimmaraju *et al.* (2008) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* กลุ่มที่สร้างสาร agropine 4 สายพันธุ์ คือ A4 A2/83 A20/83 และ LMG-150 ในต้น red beet พบว่าการใช้เชื้อสายพันธุ์ LMG-150 และปลูกเชื้อให้กับส่วนของ cotyledon สามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้ดีที่สุด โดย hairy root มีสีแดง และมี IAA สูง หลังจากนั้นนำ hairy root ที่ได้ไปปลูกเชื้ออีกรอบด้วย พลาสมิด pPCV002-A ที่มียีน *rolA rolB* และ *rolC* เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rol* พบการคงอยู่ของยีน *rolA rolB* และ *rolC* และตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *rolA* ด้วยเทคนิค Southern hybridization จำนวน 10 สายต้น พบว่า 9 สายต้น มีจำนวนชุดยีนอย่างน้อย 2 ชุด และมี 1 สายต้นที่มีจำนวนชุดยีน 1 ชุด ซึ่งจำนวนชุดของยีนที่มากขึ้นไม่ได้ทำให้การเจริญเติบโตของราก และปริมาณสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น

มีหลายงานวิจัยที่รายงานในทำนองเดียวกันว่าจำนวนชุดยีนที่มากขึ้นไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน แต่กลับพบว่าจำนวนชุดยีนเพียงชุดเดียวเป็นสิ่งที่ดีที่สุดสำหรับการถ่ายยีน (Lacroix *et al.*, 2006) โดย Dai *et al.* (2001) ได้ปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ในแคลลัสข้าว และ Wang (1996) ได้ปลูกเชื้อชนิดเดียวกันนี้ในใบอ่อนของ *Medicago truncatula* แล้วเมื่อตรวจสอบสายต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อโดยวิธี Southern hybridization พบว่ามีการคงอยู่ของยีน *gus* และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay พบว่าต้นที่มีการคงอยู่ของยีน *gus* เพียงชุดเดียวจะมีการแสดงออกมากกว่ามียีนหลายชุด เช่นเดียวกับ Christensen *et al.* (2008) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC15834 ในต้น กุหลาบหิน (*Kalanchoe blossfeldiana*) แล้วตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในส่วน T_L-DNA ที่

ประกอบด้วยยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ด้วยเทคนิค Southern hybridization จำนวน 5 สายต้น พบว่ามีการคงอยู่ของยีนจำนวน 1 ชุด 2 สายต้น คือ สายต้นที่ 306 และ 319 ส่วนต้นที่มีการคงอยู่ของยีน 2 ชุดมี 1 สายต้น คือสายต้นที่ 331 และต้นที่มีการคงอยู่ของยีนมากกว่า 5 ชุด มี 2 สายต้นคือสายต้นที่ 312 และ 324 โดยต้นที่มีการคงอยู่ของยีนเพียงชุดเดียวจะมีลักษณะทรงต้นเดี่ยวแคระ ใบหึง ดอกมีขนาดเล็กกว่าดอกปกติ ส่วนต้นที่มีการคงอยู่ของยีนตั้งแต่ 2 ชุด ต้นจะสูงกว่าต้นที่มีการคงอยู่ของยีนเพียงชุดเดียว ใบหึงเล็กน้อยและดอกมีขนาดเท่ากับดอกปกติ ซึ่งอาจเป็นเพราะยีนที่เข้าไปมากไปยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ถ่ายเข้าไป นอกจากนี้ Kohli *et al.* (1998) และ Van der Hoeven *et al.* (1994) พบว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปจะแทรกในตำแหน่งต่างกันบนโครโมโซมเนื่องจากการแทรกแบบสุ่ม ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนได้ไม่เท่ากัน

มีรายงานว่าตำแหน่งของการแทรกตัวของยีน *rol* ที่ต่างกันนั้นมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานของพืชเช่นกัน (Camilleri and Jouanin, 1991; Abhyankar *et al.*, 2005) ซึ่งการทำเทคนิค เอเอฟแอลพี (AFLP) มาใช้จะช่วยยืนยันการแทรกของยีนที่ตำแหน่งแตกต่างกันได้ โดยเทคนิค AFLP สามารถเลือกคู่ไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันจำนวนมาก (สุรินทร์, 2545) แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือพอลิเมอร์ฟิซิมที่เกิดขึ้นทำให้สามารถบอกความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ได้รับการถ่ายยีนได้ เช่น Labra *et al.* (2001) ได้ถ่ายยีน *A. tumefaciens* ที่บรรจุพลาสมิด pMOG22 ในเซลล์ของข้าว แล้วนำต้นที่ชักนำจากเซลล์จำนวน 10 ต้นและต้นปกติ 10 สายต้น ไปสกัดดีเอ็นเอแล้วนำไปตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ 4 คู่ พบว่าต้นที่ชักนำจากเซลล์จำนวน 10 ต้นเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 288 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่มีพอลิเมอร์ฟิซิม 19 แถบ ส่วนในต้นปกติไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซิม และ Rosati *et al.* (2005) ได้ถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิดบรรจุยีน *gr* ในต้น *Nicotiana glauca* ส่งผลให้ต้นมีลักษณะสัณฐานแตกต่างจากต้นปกติ และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP พบว่าต้นที่ถ่ายยีนให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกันแสดงว่าเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern hybridization จำนวนชุดของยีนแตกต่างกันด้วย

การผลิตสารทุติยภูมิจาก hairy root

มีรายงานว่า hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้มากกว่ารากปกติที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Sevón and Oksman-Caldentey, 2002) ที่ผ่านมามีพืชหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยาที่ประสบความสำเร็จในการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* และสามารถสร้างสารสำคัญในปริมาณมาก เช่น

Azlan *et al.* (2002) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ LBA9402 ในต้นโทงเทง (*Physalis minima*) สามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้ และเมื่อนำ hairy root ไปสกัดสาร physalins ด้วยวิธี HPLC พบว่าให้ปริมาณสารเพิ่มขึ้น ซึ่งสารนี้สามารถนำไปรักษาโรควัณโรคได้ ในขณะที่ Lorence *et al.* (2003) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณสารโดยการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* เช่นกันโดยได้ปลูกเชื้อในส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ (hypocotyl cotyledon และใบอ่อน) ในต้น *Camptotheca acuminata* และพืชบางชนิดในกลุ่ม Apocynaceae Olacaceae Rubiaceae พบว่าเนื้อเยื่อมีการเจริญของ hairy root ซึ่งเกิดจากการเข้าไปแทรกตัวของยีน *rol* ในจีโนมของพืช และเมื่อตรวจสอบปริมาณสารด้วยวิธี HPLC พบปริมาณสารต้านมะเร็ง 2 ชนิดคือ camptothecin และสาร 10-hydroxycamptothecin เพิ่มขึ้น ซึ่งยีน *rolB* และ *rolC* เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารทุติยภูมิในรากเปลี่ยนแปลงไป

สำหรับงานวิจัยในประเทศไทยนั้น รังสิรัตน์ (2535) ได้เพาะเลี้ยง hairy root ของต้นลำโพงกาสลัก (*Datura metel* Linn.) ที่เกิดจากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* พบว่าสามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้ดี และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตก็เจริญได้รวดเร็วกว่าปกติ และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสาร atropine โดยวิธี HPLC พบปริมาณสารมากกว่าปกติถึง 2 เท่า

นอกจากนี้ ยังมีการนำ hairy root มาใช้ประโยชน์ในด้านอื่นเช่น ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดย Maria *et al.* (2008) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ LBA9402 ให้กับ *Brassica napus* ทำให้ได้ hairy root ที่สามารถผลิตเอนไซม์ peroxidase ได้เพิ่มขึ้นเป็นปริมาณมาก hairy root ดังกล่าวสามารถกำจัดสาร phenol ที่ถูกปลดปล่อยออกมาพร้อมกับของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งพบว่าสามารถกำจัดสาร phenol ได้สูงถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และการใช้ hairy root นั้นราคาถูกกว่าวิธีกำจัดแบบเดิมที่ใช้การสกัดหรือดูดซับด้วยถ่าน

ในกรณีของเจตมูลเพลิงแดงนั้นสุภาภรณ์ (2547) ได้เพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 และ ATCC13332 ในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS B5 1/2 MS และ 1/2B5 ในสภาพที่มีแสง และที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า hairy root ที่เกิดจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ที่มีมีการเจริญเติบโตดีที่สุด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ใน hairy root ด้วยวิธี HPLC พบว่า hairy root ให้ปริมาณสาร plumbagin มากกว่ารากปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ ต่อมา Chuntaratin (2006) ได้ศึกษาเพิ่มเติมใน hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันคือ 1/4B5 1/2B5 B5 1/4MS 1/2MS และ MS โดยแต่ละสูตรเติมซูโครสในระดับที่แตกต่างกันคือ 0 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC พบว่าการเพาะเลี้ยง hairy root ด้วยอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณสาร plumbagin มากที่สุดคือ 78.71 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ สูตร 1/2B5 ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณสาร 69.67 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีรายงานการผลิตสาร plumbagin จากรากของต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง

ผลของยีน *rol* ต่อการผลิตสารทุติยภูมิ

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *rolA* นั้นยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่ได้มีการทดลองถ่ายยีน *rolA* เข้าสู่พืชเช่น ในต้นยาสูบพบว่าสามารถกระตุ้นให้สร้างสารนิโคตินเพิ่มมากขึ้น (Palazon *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยในแคลลัสของต้น *Rubia cordifolia* พบว่าให้สาร anthraquinone เพิ่มขึ้นจากต้นปกติ 2.8 เท่า และเมื่อชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสก็พบว่ายังมีการคงอยู่ของยีน *rolA rolB* และ *rolC* (Shkryl *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษา ยีน *rolA* ที่มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิยังมีน้อยมาก เนื่องจากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ายีน *rolA* มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิค่อนข้างน้อย (Bulgakov, 2008)

สำหรับยีน *rolB* มีรายงานว่า มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิค่อนข้างมาก โดยได้มีการศึกษาในพืชหลายชนิด และพบว่าเมื่อมีการคงอยู่ของยีน *rolB* มีผลทำให้ปริมาณสารทุติยภูมิสูงขึ้นมากเมื่อเทียบกับการมีอยู่ของเฉพาะยีน *rolA* และ *rolC* เช่นต้น *Rubia cordifolia* ที่มีการคงอยู่ของยีน *rolB* ให้สาร anthraquinone เพิ่มขึ้นถึง 15 เท่า (Shkryl *et al.*, 2007) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิใน *Vitis amurensis* ซึ่งเป็นองุ่นชนิดหนึ่งที่ผลิตสาร resveratrol ที่สามารถใช้เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยปกติพืชชนิดนี้จะมีปริมาณสารทุติยภูมิประมาณ 0.026% ซึ่งเป็นปริมาณสารที่น้อยมากไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ประโยชน์ ดังนั้นจึงมีการนำวิธีต่าง ๆ มาใช้เพื่อ

เพิ่มปริมาณสารเช่น การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ที่มีการผลิตสารสูงและการใช้สารกระตุ้นการเพื่อเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นที่จะใช้ในการสังเคราะห์สาร resveratrol ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แต่วิธีการดังกล่าวให้ปริมาณสารเพิ่มขึ้นน้อยมาก แต่เมื่อถ่ายยีน *rolB* ทำให้ปริมาณสารเพิ่มเป็น 3.15% หรือเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 100 เท่า (Bulgakov, 2008) อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *rolB* นั้นมีผลที่เป็นข้อจำกัดคือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเมื่อทดลองยับยั้งการทำงานของยีน *rolB* โดยใช้ tyrosine phosphatase inhibitor เนื่องจากยีน *rolB* สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีน tyrosine phosphatase ได้ (Flippini *et al.*, 1996) พบว่าเมื่อสามารถยับยั้งการสร้าง tyrosine phosphatase ได้ เซลล์ก็สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นแต่การผลิตสารทุติยภูมิก็น้อยลงด้วย (Kiselev *et al.*, 2007; Shkryl *et al.*, 2007)

ในกรณีของยีน *rolC* ก็มีรายงานทำนองเดียวกับยีน *rolB* ว่าสามารถกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิในกลุ่ม tropane alkaloid pteridine alkaloid indole alkaloid ginsenosides และ anthraquinone ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่สำคัญในพืชชนิดต่าง ๆ ได้มากกว่าปกติ แต่ปริมาณสารที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับผลที่เกิดจากยีน *rolC* พบว่าน้อยกว่าผลที่เกิดจากยีน *rolB* เช่นใน *Rubia cordifolia* พบว่าเมื่อมีการคงอยู่ของยีน *rolB* อยู่ทำให้มีสารเพิ่มขึ้น 15 เท่า แต่การมียีน *rolC* สามารถเพิ่มปริมาณสารได้เพียง 1.3-1.8 เท่า (Bulgakov, 2008) แต่มีบางงานวิจัยที่มีผลต่างออกไป เช่น Pinol and Palazon (1996) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *rol* กับปริมาณสารในกลุ่ม tropane alkaloid ในต้น *Datura stramonium* พบว่าการเพิ่มขึ้นของสารมีความสัมพันธ์กับยีน *rolC* และ ในงานวิจัยต่อเนื่องโดย Palazon *et al.* (1998) พบว่าการเพิ่มขึ้นของสารกลุ่ม indole alkaloids ไม่มีความสัมพันธ์กับยีน *rolA* และ *rolB* แต่ต้นที่มีการคงอยู่ของทั้งยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* มีปริมาณสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น รวมทั้งทำให้ต้นมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นด้วย เพราะถึงแม้ว่ายีน *rolB* จะมีส่วนในการช่วยเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิแต่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช ส่วนยีน *rolC* จะกระตุ้นการทำงานของเซลล์ทำให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์ได้เนื่องจากยีน *rolC* ทำหน้าที่เหมือน cytokinin ดังนั้นต้นที่มียีน *rol* ทั้ง 3 ชนิดจึงมีการเจริญเติบโตดีกว่าต้นที่มีเพียงยีนเดียวหรือ 2 ยีน

นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของสารทุติยภูมิยังขึ้นอยู่กับตำแหน่งการแทรกของยีนด้วยโดย Abhyankar *et al.* (2005) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC15834 ในส่วน hypocotyl ของต้น *Psoralea carylifolia* ซึ่งมีสารสำคัญ คือ สาร glycoside และ daidzein พบว่าสามารถชักนำให้เกิด hairy root หลังจากนั้นนำ hairy root ที่มีลักษณะเหมือนกัน จำนวน 2 clone คือ PsI และ PsII มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำ AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ คือ E-AGG/M-CTC E-ACC/M-CTG E-AAC/M-CTC E-ACC/M-CTC และ E-ACC/M-CAA พบว่าทั้ง 2 clone เกิดพอลิมอร์ฟิซึมทั้ง

5 คู่มือไพรเมอร์ โดยทั้ง 2 line เกิดพอลิเมอร์ฟิซิมที่ต่างกัน และเมื่อสกัดสาร glycoside และ daidzein พบว่ามีปริมาณสารที่แตกต่างกัน โดยสาร glycoside ใน PsI เพิ่มขึ้น 17 เท่า และ PsII เพิ่มขึ้น 5 เท่า ส่วนสาร daidzein นั้นใน PsI มีสารเพิ่มขึ้น 160 เปอร์เซ็นต์ และ PsII มีสารเพิ่มขึ้น 58 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของทั้ง 2 line ด้วยเทคนิค AFLP พบว่าทั้ง 2 line ให้แถบดีเอ็นเอต่างกันอาจเป็นผลมาจากการเข้าแทรกของยีน *rol* ที่ตำแหน่งต่างกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

สายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ซึ่งได้มาจากการปลูกเชื้อ *Rhizobium rhizogenes* สายพันธุ์ K599 จากงานวิจัยของ สุภาภรณ์ (2547) และ ของ Chuntaratin (2006) จำนวน 50 สายต้น

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน

- 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ บีกเกอร์ กระบอกตวง
- 2.2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
- 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH- meter)
- 2.5 เครื่องชั่งสาร (balance)
- 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave)
- 2.7 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)
- 2.8 มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว (Petri dish) และตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.9 ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อ
- 2.10 โกร่งบดตัวอย่าง
- 2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centifuge) และเครื่องกวนตะกอน (vortex[®])
- 2.12 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)
- 2.13 ชุดเครื่องมือ gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล
- 2.14 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอเล็กโทรโฟริซิส
- 2.15 เครื่องอเล็กโทรโฟริซิสแบบตั้ง สำหรับ acrylamide gel
- 2.16 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator)
- 2.17 เครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 ของบริษัท Agilent Technologies

3. สารเคมี

- 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
- 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืช
- 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* โดยวิธี PCR
- 3.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำ AFLP
- 3.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Southern hybridization
- 3.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC

4. ไพรมเมอร์สำหรับตรวจสอบ ยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* และไพรมเมอร์สำหรับทำ AFLP ที่มีลำดับเบสดังตารางที่ 1 และตารางที่ 3

5. อุปกรณ์สำหรับนำพืชออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

ได้แก่ กระบะปลูก กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว ทรายผสมขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และ ดินผสม

6. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยา

- 6.1 โปรแกรมฐานข้อมูลสำหรับหาลำดับเบสของยีนหรือสายดีเอ็นเอที่สนใจ
จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/>

- 6.2 โปรแกรมสำหรับการออกแบบไพรมเมอร์และเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายดีเอ็นเอที่สนใจกับฐานข้อมูลคือโปรแกรม clustal W จาก website <http://www.ebi.ac.uk/clustal W/>

- 6.3 โปรแกรมสำหรับหาคำแทน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอคือโปรแกรม Webcutter จาก website <http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/cut2.com>

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ

R. rhizogenes สายพันธุ์ K599

นำต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ซึ่งได้มาจากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 จากงานวิจัยของ สุภาภรณ์ (2547) และ Chuntaratin (2006) จำนวน 50 สายต้น มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารแข็งสูตร MS รวมทั้งเพาะเลี้ยงต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อเพื่อใช้เป็นต้นควบคุม โดยเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตร ต่อวินาที เป็นเวลา 45 วัน แล้วนำต้นมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การคงอยู่ของยีนที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน และนำรากของต้นดังกล่าวมาตรวจสอบปริมาณสาร plumbagin ต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599

นำต้นเจตมูลเพลิงแดงที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้ออายุ 45 วัน มาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายปลูกลงในถาดหลุมขนาด 120 หลุม โดยใช้วัสดุปลูก คือ ทราย ผสมขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1 รดน้ำและคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น เมื่อครบ 7 วัน ตัดมุมสูง 2 มุม เพื่อเพิ่มการถ่ายเทอากาศ หลังจากนั้นอีก 2-3 วัน จึงย้ายต้นเจตมูลเพลิงแดงไปปลูกลงในกระถางขนาด 8 นิ้ว ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปร่างใบ สีใบ ขอบใบ ผิวใบ ความสูงลำต้น ลักษณะราก และลักษณะดอก

3. การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rolA rolB* และ *rolC* ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดง โดยวิธี

Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.1 ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* โดยนำลำดับเบสของ ยีนทั้งสามจาก *R. rhizogenes* สายพันธุ์ต่างๆ ในฐานข้อมูลลำดับเบส GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) มาออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk>) และโปรแกรม fastPCR เมื่อได้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมตามตารางที่ 1 แล้วจึง หาช่วงอุณหภูมิ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ด้วยการทำ gradient PCR โดยทดสอบกับ เชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 เมื่อได้ไพรเมอร์ อุณหภูมิ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมตามตารางที่ 2 จึงนำไปตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rol* ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ใช้ในงานวิจัยนี้

3.2 สกัดดีเอ็นเอจากใบของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงจากต้นที่ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยใช้วิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Aldrich and Cullis (1993) โดยเตรียมสารละลาย extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย 2% CTAB, 2% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.2% α -mercaptoethanol (v/v) แล้วตัดเนื้อเยื่อใบประมาณ 1 กรัม ใส่ในโกร่งและ เติมนิโตรเจนเหลวและบดตัวอย่างให้ละเอียด แล้วย้ายเนื้อเยื่อที่บดแล้วใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติมส่วนผสมของ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนประมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติมเอนไซม์ RNase/DNase-Free (US Biological, USA) 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของปริมาตร ส่วนใส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติมนส่วนผสมของ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมา แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใสที่ได้ และเติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยพลิก หลอดไปมาแล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% ตากตะกอน ดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 25-30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ ดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้ไปตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ ให้มีความจำเพาะกับยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ในขั้นตอนต่อไป

3.3 ตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rol* ในดีเอ็นเอของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงทั้ง 50 สายต้น โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการทดลองที่ 3.2 ไปตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์และอุณหภูมิตามตารางที่ 1 และปริมาณสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาตาม ตารางที่ 2 โดยใช้เครื่อง Thermal Cycler โดยมีปฏิกิริยาแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรก ใช้อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สำหรับยีน *rolA* 56 องศาเซลเซียส สำหรับยีน *rolB* หรือ 52 องศาเซลเซียส สำหรับยีน *rolC* นาน 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที ตามลำดับ และขั้นตอนสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดตรวจสอบผล โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE แล้วแยกขนาด โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย สารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation นำผลที่ได้มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการคงอยู่ของยีน *rol* ชนิดต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทาง ลักษณะของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจาก hairy root

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rol* ชนิดต่าง ๆ

ยีน	annealing temperature (°C)	ไพรเมอร์
<i>rol A</i>	50	Forward 5' CGTTGTCGGAATGGCCCAGACC 3'
		Reverse 5' CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC 3'
<i>rol B</i>	56	Forward 5' ATTTCCAGAAAAGGTGGGCC 3'
		Reverse 5' GTGATGCCGCAAGCAATGAC3'
<i>rol C</i>	52	Forward 5' CGTCCAGCGATGAGCTAAAG 3'
		Reverse 5' GCTGGTTGCTGGCATAAAG 3'

ตารางที่ 2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	<i>rolA</i>	<i>rolB</i>	<i>rolC</i>
1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2	2	2
2. dNTP (250 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร)	5	5	5
3. MgCl ₂ (5 มิลลิโมลาร์)	2	2	4
4. 10Xbuffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl)	2	2	2
5. ไพโรเมอร์ (0.125 ไมโครโมลาร์)	0.5	0.5	0.5
6. <i>Taq</i> DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.1	0.05	0.2
7. น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	8.4	8.45	6.3
ปริมาตรรวม	20	20	20

4. การตรวจสอบการคงอยู่และจำนวนชุดของยีน *rol* ด้วยเทคนิค Southern hybridization

4.1 การเตรียม DNA

สกัดดีเอ็นเอจากใบของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้วิธี CTAB ซึ่งคัดแปลงมาจาก Aldrich and Cullis (1993) ตามวิธีการในข้อ 3.2 ให้ได้ปริมาณอย่างน้อย 20 ไมโครกรัม แล้วนำดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เนื่องจากเอนไซม์ *EcoRI* ไม่มีจุดตัดในยีน *rol* (ตรวจสอบตำแหน่งตัดในยีน *rol* โดยใช้โปรแกรม Webcutter จาก website <http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/cut2.com>) นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 50 โวลต์ นานประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอทิลเบรไมด์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง

Gel Documentation

เตรียมดีเอ็นเอในเจลให้เป็นสายเดี่ยวและย้ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน โดยแช่เจลในสารละลาย depurination คือ 0.25 M HCl ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่านาน 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำ deionize ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว และแช่เจลในสารละลาย denaturation (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่านาน 15 นาที ทำซ้ำขั้นตอนของการแช่เจลในสารละลาย denaturation อีกรอบ ล้างเจลด้วยน้ำ deionize ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำเจลมาแช่ในสารละลาย neutralization (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่านาน 15 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกรอบ แล้วจึงล้างเจลด้วยน้ำ deionize ที่นิ่งฆ่าเชื้อ แล้วแช่เจลในสารละลาย 10 X SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นาน 10 นาที แล้วจึงย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลมาบนไนลอนเมมเบรน ซึ่งทำโดยจัดชุดทดลองเป็นชั้น โดยชั้นแรกวางเจลลงบนแผ่นกระดาษ 3MM[®] ที่ชุ่มไปด้วย 10 X SSC โดยทำเป็นสะพานให้ปลาย 2 ด้านอยู่ในอ่างที่มีสารละลาย 10 X SSC แล้ววางแผ่นไนลอนให้พอดีกับแผ่นเจล ชั้นต่อมาวางกระดาษ 3MM[®] จำนวน 3 แผ่นบนไนลอนเมมเบรน แล้ววางกระดาษซับหลายชั้นจนมีความหนาประมาณ 20 เซนติเมตร ชั้นบนสุดวางแท่งน้ำหนักขนาดประมาณ 500 กรัม ดีเอ็นเอจะเคลื่อนจากแผ่นเจลมายังเมมเบรน โดยใช้เวลาในการย้ายดีเอ็นเอไปยังแผ่นเมมเบรนนานประมาณ 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอออกจากเจล แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 2X SSC นาน 5 นาที นำเมมเบรนไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาไฮบริไดซ์ด้วยตัวตรวจสอบของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC*

ขั้นตอนการทำไฮบริไดซ์ เริ่มจากการทำ pre-hybridization โดยการนำแผ่นเมมเบรนมาบ่มในขวดไฮบริไดซ์ที่มีสารละลายไฮบริไดเซชัน (0.75 M NaCl, 75 mM sodium citrate, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02 % SDS, 1% Blocking solution) ปริมาตร 0.1 เท่าของขนาดพื้นที่เมมเบรน (ตารางเซนติเมตร) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นต้มดีเอ็นเอที่เป็นตัวตรวจสอบของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ที่ติดฉลากเรียบร้อยแล้วในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลายไฮบริไดเซชันปริมาตร 0.035 เท่าของขนาดพื้นที่เมมเบรน ผสมให้เข้ากันแล้วเติลงลงในขวดไฮบริไดซ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย low stringency buffer (20 X SSC 40 มิลลิลิตร, 20% SDS 2 มิลลิลิตร) 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และล้างซ้ำด้วยสารละลาย high stringency buffer (20 X SSC 10 มิลลิลิตร, 20 % SDS 2 มิลลิลิตร) 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แช่เมมเบรนที่ผ่านการล้างแล้วใน washing buffer [0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5 0.3% (v/v) Tween 20] 15 นาที นำแผ่นเมมเบรนใส่ถุงพลาสติก เติม blocking solution

(1% blocking reagent ใน maleic acid buffer) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 30 นาที จึงนำเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย anti-digoxigenin conjugated alkaline phosphate ที่เจือจาง 1:10,000 ส่วนในสารละลาย blocking solution เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วปรับสภาพเมมเบรนด้วยการแช่ในสารละลาย detection buffer เป็นเวลา 3 นาที โดยไม่ต้องเขย่า ย้ายเมมเบรนไปวางบนแผ่นพลาสติก ผสมสารละลาย detection buffer เข้ากับ chemiluminescent substrate (CDP Star™) ในอัตราส่วน 1:250-1:500 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นเมมเบรนให้ทั่ว วางทิ้งไว้ 15 นาที แล้วจึงรีดเอาสารละลายส่วนเกินทิ้งไป นำเมมเบรนไปประกบแผ่นฟิล์มในห้องมืด ประมาณ 10 นาที ล้างฟิล์มด้วยสารละลาย developer และ fixer แล้วตรวจสอบภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

4.2 การเตรียมและติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจสอบยีน *rolA rolB* และ *rolC*

เตรียมดีเอ็นเอของยีน *rolA rolB* และ *rolC* เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับเตรียมตัวตรวจสอบยีน *rolA rolB* และ *rolC* ซึ่งได้จากการนำพลาสมิดของ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของ ยีน *rolA rolB* และ *rolC* แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตัดแถบดีเอ็นเอของยีน *rol* เมื่อตัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจลแล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปติดฉลากด้วยสารไรรังสี digoxigenin โดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science, USA)

การติดฉลากดีเอ็นเอของยีน *rol* ทำโดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *rolA rolB* และ *rolC* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rol* โดยใช้ DIG-dUTP แทน dTTP เดิมส่วนผสมสำหรับเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ส่วนผสมเช่นเดียวกับการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rol* ตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE และหากยังไม่นำไปทำไฮบริไดเซชันสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. ศึกษาความหลากหลายของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงโดยวิธีเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

สกัดดีเอ็นเอจากใบเจตมูลเพลิงแดงโดยวิธี CTAB ตามวิธีการในข้อ 3.2 และปรับความ

เข้มข้นให้ได้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนดังนี้

5.1 ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 4 ไมโครลิตร ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *EcoRI* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, บริษัท Fermentas) และ *MseI* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, บริษัท Fermentas) ชนิดละ 1 ไมโครลิตร ใส่รวมกับบัฟเฟอร์ A (บริษัท Boehringer) 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

5.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

นำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากข้อ 5.1 จำนวน 20 ไมโครลิตรมาต่อดัวย adapter เข้าที่ปลายทั้ง 2 ด้านของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter โดยผสม 10x ligation buffer 1 ไมโครลิตร *EcoRI* adapter (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ *MseI* adapter (50 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ATP (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ลำดับเบสของ adapter มีความเฉพาะเจาะจงต่อปลายของดีเอ็นเอสายคู่ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* คือ

EcoRI adapter 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'

MseI adapter 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
3'-TACTCAGGACTCAT-5'

5.3 การทำ pre-selective amplification (PCR I)

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อกับ adapter แล้วมาเจือจาง 20 เท่าด้วยน้ำกลั่นเพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว

2 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ *EcoRI* และ ไพรเมอร์ *MseI* ที่เพิ่มเบสคัดเลือก 1 เบส ทางด้านปลาย 3' ชนิดละ 1 ไมโครลิตร 10x buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 1.2 ไมโครลิตร dNTP 4 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase (5 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) 0.4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยมีปฏิกิริยาแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 25 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และขั้นตอนสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ผลที่ได้จากการทำ pre-selective amplification คือจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *EcoRI* และอีกปลาย ด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *MseI* เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในขั้นตอนนี้จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ คัดเลือกได้ถึง 15 เท่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในขั้นตอนนี้จะใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบใน การทำ selective amplification

5.4 การทำ selective amplification (PCR II)

นำผลผลิตที่ได้จากการทำ pre-selective amplification มาเจือจาง 30 เท่าด้วยน้ำกลั่นเพื่อ ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้ไพรเมอร์ *EcoRI* และ ไพรเมอร์ *MseI* ที่มีเบสเพิ่มขึ้น 2-3 เบส (ตารางที่ 3) ชนิดละ 1 ไมโครลิตร 10x buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 1.2 ไมโครลิตร dNTP 4 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase (5 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) 0.4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยมีปฏิกิริยาแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 25 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และขั้นตอนสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

5.5 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR II มาเติมสีย้อม sequencing dye (10 mM EDTA pH 8.0, 98% formamide, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol) 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปแยกขนาดโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน denaturing polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4.5% ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที ย้อมเจลด้วยวิธี silver staining โดยนำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่สารละลายกรดอะซิติก

ความเข้มข้น 10% โดยวางบนเครื่องเขย่า 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที นำมา
 ย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate (1% silver nitrate, 0.56% formaldehyde) บนเครื่องเขย่า 30 นาที
 นำแผ่นกระจกล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำมาทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยการเขย่าใน
 สารละลาย developer (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulfate, 0.56% formaldehyde)
 และเมื่อแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดอะซิติก 10% ล้างกระจกเจลครั้งสุดท้าย
 ด้วยน้ำกลั่น 2 นาที แล้วจึงนำกระจกไปผึ่งให้แห้ง แล้วนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 3 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์จีโนมของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก
 hairy root โดยวิธี AFLP

ไพรมเมอร์ที่ใช้ใน PCRI		ไพรมเมอร์ที่ใช้ใน PCRII	
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
A	A	AA AAA	AAT
C	C	CGT CAG CT CTG CAC CTA	CAG CAT CTC CTG CAC CTA
G	G	GA GCA	GTA GTC GCC
T	T	TG TAC TCG	TGA TAC TCC

6. การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดง โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

6.1 นำรากของเจตมูลเพลิงแดงแต่ละสายต้นที่พัฒนาจาก hairy root ที่ออกปลูกในสภาพธรรมชาติจนมีอายุครบ 1 ปี มาแยกเป็นส่วนของรากหลักและรากแขนง นำมาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วบดรากแห้งจำนวน 100 มิลลิกรัม ให้ละเอียดด้วยโกร่ง เติมนีโทานอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วกวนตะกอนด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลา 10 นาที

6.2 นำสารแขวนลอยในข้อ 1 มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ได้สารละลายสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้ม จากนั้นนำเฉพาะส่วนสารละลายสีที่ได้ไปกลั่นแยกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนเหลือสารละลายปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร แล้วย้ายไปใส่ขวดสีชาขนาดเล็ก และนำไปวางในตู้ดูดควันจนกระทั่งเมทานอลที่เหลือระเหยหมดได้ตะกอนที่เหนียวข้น (crude extract)

6.3 นำตะกอนที่ได้จากแต่ละสายต้นมาละลายด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านแผ่นกรอง cellulose acetate ที่มีช่องขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ลงใน insert vial ประมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร plumbagin ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 ของบริษัท Agilent Technologies

โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการของ Chuntaratin (2006) คือ

คอลัมน์ : Agilent Zorbex SB-C18 (4.6 x 250 นาโนเมตร : 5 ไมโครเมตร)
 สารละลายตัวพา : 0.4 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะซิติก : เมทานอล (40 : 60 โดยปริมาตร)
 อัตราการไหลของตัวพา : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
 ตรวจวิเคราะห์ด้วยแสง UV : 270 นาโนเมตร
 ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ : 10 ไมโครเมตร
 ความดัน : 230 - 260 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

บันทึกผล และคำนวณหาปริมาณสาร plumbagin จากความเข้มข้นของ plumbagin ที่ใช้เป็นมาตรฐาน (Sigma : catalog number P7262 a.i. 98%) โดยคำนวณได้จากสมการ

linear regression equation และหาค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม
Agilent Chemstation (Agilent Technologies, 2001)

7. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน และห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล
ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

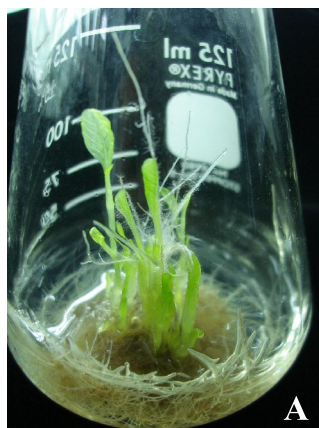
8. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2551

ผลและวิจารณ์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจาก hairy root ที่ได้จาก การปลูกเชื้อ *Rhizobium rhizogenes* สายพันธุ์ K599

จากการเพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้จากการชักนำด้วยการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ที่ได้จากงานวิจัยของ สุภาภรณ์ (2547) และ Chuntaratin (2006) พบว่า hairy root ที่ได้มีลักษณะพิเศษ คือ นอกจากการเจริญแบบไม่ตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วงของโลกแล้ว ยังสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่ายในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 3) โดยต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไปจากลักษณะปกติ เช่น เกิดลักษณะผิวใบย่น ขอบใบบิดม้วนเป็นคลื่น ลำต้นเตี้ยแกระ ข้อถี่ ปล้องสั้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยในพืชอื่น ๆ หลายชนิด เช่น Lee *et al.* (2004) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ 15834 ใน *Taraxacum platycarpum* โดยใช้ส่วนรากของต้นอ่อนสามารถชักนำให้เกิด hairy root ที่มีการแตกแขนง และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับ Koike *et al.* (2003) ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ กลุ่มที่สร้างสาร mikimopine ลงบนส่วนใบของต้น *Angellonia salicariifolia* สามารถชักนำให้เกิด hairy root และเมื่อนำ hairy root ไปเพาะเลี้ยงโดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตก็สามารถพัฒนาให้เกิดเป็นต้นได้



ภาพที่ 3 สายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต
A: สายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่เริ่มพัฒนาจาก hairy root ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวอายุ 2 เดือน
B: สายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจาก hairy root เมื่อตัดแยกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งอายุ 2 เดือน

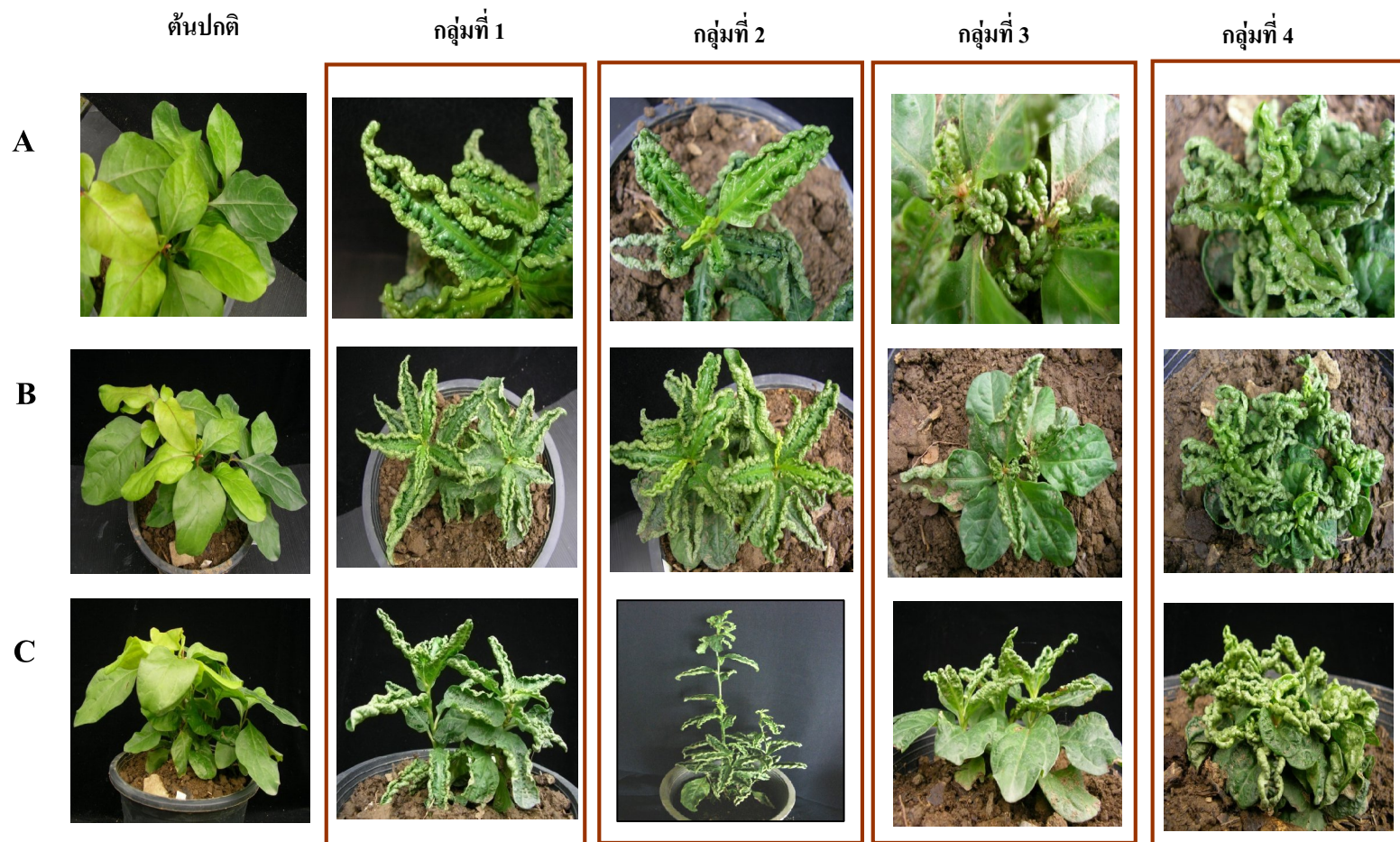
เมื่อศึกษาค้นที่พัฒนามาจาก hairy root จำนวน 50 สายต้น เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อเพื่อใช้เป็นต้นควบคุมในสภาพออกปลูกตามธรรมชาติ พบว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root มีลักษณะพื้นฐานแตกต่างจากต้นควบคุมอย่างเด่นชัด โดยพบว่าลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้นสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มหลัก (ภาพที่ 4) คือ

กลุ่มที่ 1 ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นคลื่น ผิวใบย่น ข้อถี่ ปล้องสั้น ลำต้นเตี้ยแคระ มีจำนวน 36 สายต้น

กลุ่มที่ 2 ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นคลื่น ผิวใบย่น ปล้องยาว ลำต้นสูง จำนวน 9 สายต้น

กลุ่มที่ 3 ใบรูปรี ขนาดสั้น ผิวใบย่น ขอบใบม้วนเป็นคลื่นเฉพาะใบยอด ลำต้นเตี้ยแคระ จำนวน 3 สายต้น

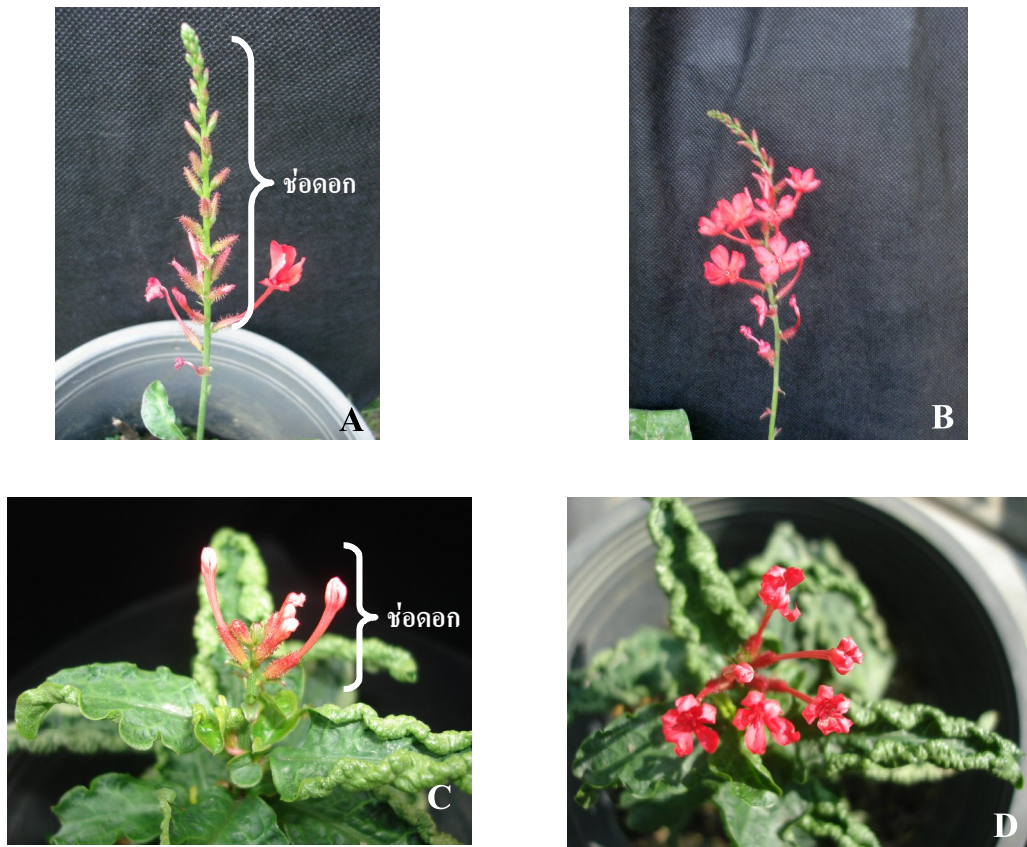
กลุ่มที่ 4 ใบรูปรี ขนาดสั้น ขอบใบม้วนเป็นริ้วคลื่น ปลายใบงอจนกระทั่งม้วนกลับไปด้านหลังทำให้เห็นเป็นก้อน ข้อถี่ และปล้องสั้นมากทำให้ต้นกอดกันเป็นกระจุก จำนวน 2 สายต้น



ภาพที่ 4 ลักษณะสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไปของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 A: ลักษณะใบ B: ลักษณะทรงต้นมองจากด้านบน C: ลักษณะทรงต้นมองทางด้านข้าง (กลุ่มที่ 1-4 คือสายต้นที่พัฒนาจาก hairy root)

นอกจากนี้ลักษณะดอก และรากก็เปลี่ยนแปลงไปจากต้นปกติเช่นกัน โดยพบว่าต้นที่พัฒนา มาจาก hairy root มีช่อดอกสั้นกว่าช่อดอกปกติมาก และดอกมีขนาดเล็กลง (ภาพที่ 5) ส่วนลักษณะของรากจะมีรากฝอยเกิดขึ้นรอบ ๆ รากหลักในปริมาณมากกว่าต้นปกติ (ภาพที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al.* (2004) ที่ศึกษาต้น *Taraxacum platycarpum* ซึ่งชักนำจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ 15834 พบว่ารากมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป จากรากต้นปกติคือมีรากฝอยเพิ่มมากขึ้นและมีการแตกแขนงอย่างรวดเร็ว ซึ่ง Srivastava (1998) รายงานว่า hairy root แม้จะมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากรากปกติแต่มีเมทาบอลิซึมเช่นเดียวกับราก ปกติและยังสามารถทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับรากทั่วไปคือ สามารถดูดธาตุอาหารไปเลี้ยงลำต้นได้ ตามปกติ

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานที่พบในเจตมูลเพลิงแดงที่ศึกษานี้ มีลักษณะคล้ายกับ ที่พบในพืชอื่นอีกหลายชนิดจึงมีผู้นิยามลักษณะดังกล่าวนี้ว่า hairy root phenotype (Casanova *et al.*, 2005) ซึ่งรายงานที่พบในพืชอื่น ๆ เช่น แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* มีลักษณะใบหึง รากแตกแขนงมากกว่าปกติ และกลีบดอก เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีชมพูอมเหลือง ปลายกลีบดอกสีขาว (Choi *et al.*, 2004b) การเปลี่ยนแปลง ของลักษณะทางสัณฐานดังกล่าวนี้เป็นผลจากการย้ายยีนส่วน T-DNA (transfer-DNA) จาก พลาสมิดขนาดใหญ่ คือ Root-inducing plasmid (Ri-plasmid) เข้าสู่จีโนมพืช (Willmitzer *et al.*, 1982) ซึ่งส่วนของ T-DNA นั้นจะประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนพืชโดยเฉพาะที่ เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ออกซิน คือ ยีน *tms1* และ *tms2* ซึ่งยีนเหล่านี้นอกจากจะทำให้พืช เจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้วยังทำให้มีปริมาณ รากเพิ่มขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้ในส่วนของ T-DNA ยังมียีน *rolA rolB rolC* และ *rolD* ที่พบว่าส่งผล ทำให้ลักษณะสัณฐานของพืชเปลี่ยนแปลงไปจากต้นปกติ (Casanova *et al.*, 2005) โดยยีน *rolB* เป็น ยีนที่มีบทบาทหลักต่อการสร้างรากและทำงานร่วมกับยีน *aux1* และ *aux2* (Cardarelli *et al.*, 1987) ส่วนยีน *rolC* ทำหน้าที่คล้ายกับฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินคือช่วยให้เกิดการพัฒนามีผลจาก hairy root ได้ง่าย (Casanova *et al.*, 2005)



ภาพที่ 5 ลักษณะช่อดอก (A) และดอกของต้นเจตมูลเพลิงแดงปกติ (B) เปรียบเทียบกับลักษณะช่อดอก (C) และดอก (D) ของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root



ภาพที่ 6 รากของต้นเจตมูลเพลิงแดงอายุ 1 ปี หลังออกปลูกในกระถาง เปรียบเทียบระหว่าง ลักษณะรากของต้นปกติ (A) และลักษณะรากของสายต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 (B)

การคงอยู่ของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root

จากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* แล้วนำมาทำปฏิกิริยา PCR กับดีเอ็นเอของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root จำนวน 50 สายต้น เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rol* โดยนำผลจากการทำ PCR ไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอกาโรสเจล เข้มข้น 1% ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ เมื่อนำไปตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบแถบดีเอ็นเอขนาด 248 bp ของยีน *rolA* (ภาพที่ 7) จำนวน 43 สายต้น แถบดีเอ็นเอ ขนาด 495 bp ของยีน *rolB* (ภาพที่ 8) จำนวน 48 สายต้น และแถบดีเอ็นเอขนาด 480 bp ของยีน *rolC* (ภาพที่ 9) จำนวน 50 สายต้น โดยยืนยันว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นยีน *rol* จริง จากการสุ่มตรวจลำดับเบสของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ในสายต้นที่ 22 38 และ 42 ซึ่งให้ผลสรุปว่าลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณตรงกับลำดับเบสของยีน *rol* ในพลาสมิดของ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 และตรงกับลำดับเบสของยีน *rol* ที่ได้จาก Gene Bank (ภาพผนวกที่ 1-3)

ซึ่งเมื่อนำผลมาวิเคราะห์เข้าร่วมกันพบว่าทุกต้นที่นำมาวิเคราะห์มียีน *rol* อย่างน้อย 1 ยีน ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าทุกต้นที่ตรวจสอบมียีน *rolC* อยู่ด้วยซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัย เช่น Lee *et al.* (2004) ได้ทำการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ 15834 ใน *Taraxacum platycarpum* โดยใช้ส่วนรากของต้นอ่อนพบว่า ต้นที่พัฒนามาจาก hairy root มีลักษณะแตกต่างจากต้นปกติคือ ขอบใบหิก ใบสั้น จำนวนรากมากขึ้น เมื่อนำไปตรวจสอบการคงอยู่ของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *rolC* พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp ในขณะที่ต้นปกติไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว นอกจากนี้ Lee *et al.* (2001) ได้รายงานผลการถ่ายยีนในโปรโตพลาสต์ของข้าว โดยใช้ *A. rhizogenes* (ชื่อเดิมของ *R. rhizogenes*) ที่มีพลาสมิด pRiA4 โดยมี 35S CaMV เป็นโปรโมเตอร์ พบว่าต้นที่พัฒนามาจาก hairy root มีลักษณะแตกต่างจากต้นปกติ โดยใบมีสีเขียวเข้ม หักงอ ขอบใบหิก หลังจากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากต้นที่ได้ แล้วนำไปทดสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน *rolA* พบว่าในต้นข้าวทุกต้นให้แถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp ของยีน *rolA* ในขณะที่ต้นปกติไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว

เมื่อนำผลการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rol* โดยวิธี PCR มาจัดแบ่งกลุ่มพบว่ามีต้นที่มีเฉพาะยีน *rolC* ชนิดเดียวมีจำนวน 2 สายต้น ต้นที่มีเฉพาะยีน *rolB* และ *rolC* มีจำนวน 5 สายต้น และ ต้นที่มีทั้งสามยีนจำนวน 43 สายต้น ส่วนในต้นควบคุมไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *rol* ทั้ง 3 ยีน ซึ่งการที่บางสายต้นมียีน *rol* ไม่ครบทั้ง 3 ยีนนั้นอาจเนื่องมาจากการเคลื่อนย้าย T-DNA จาก

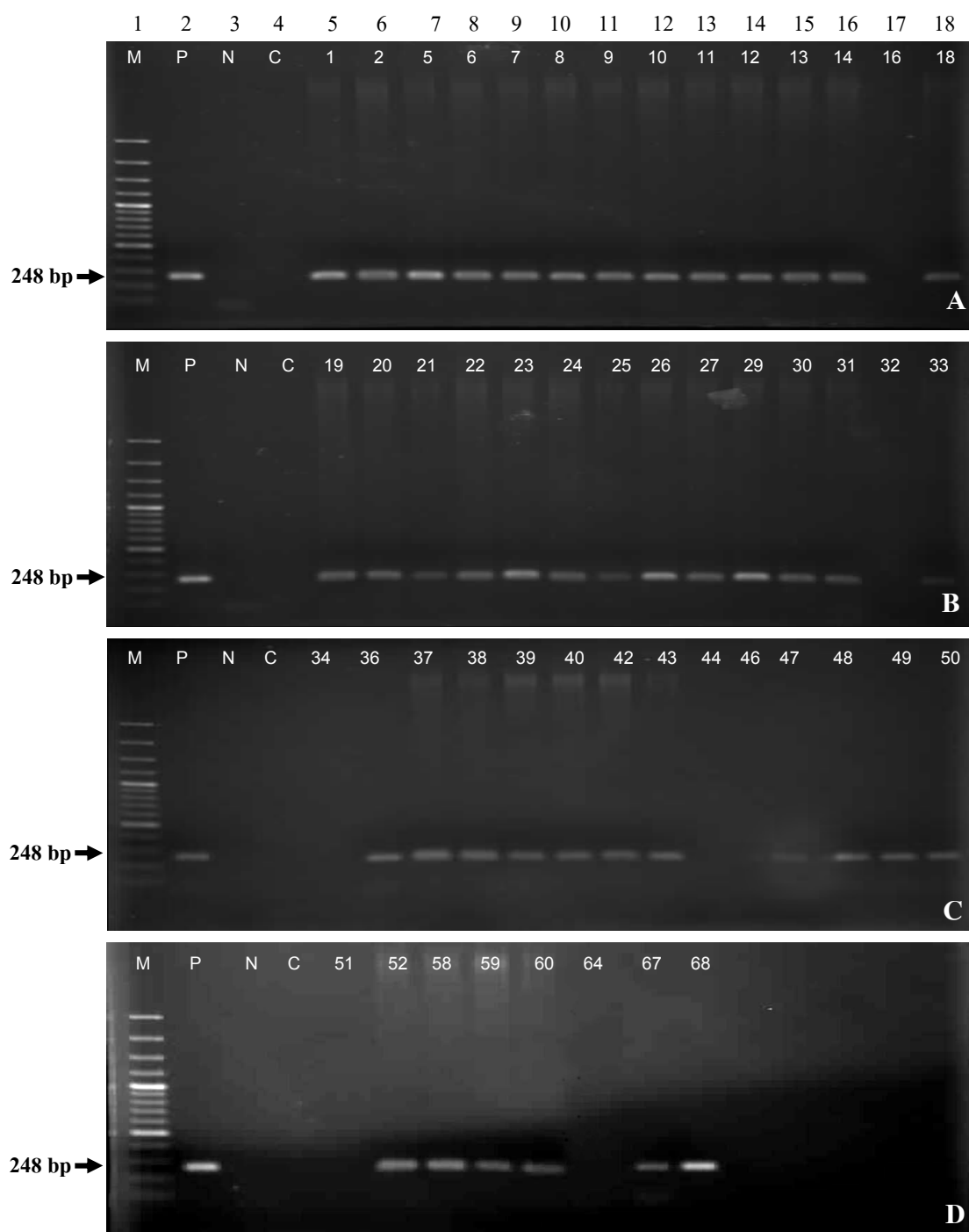
Ri-plasmid สูจิโนมพีชนั้นมียางานว่า ส่วนของ T-DNA ที่เข้าไปอาจเกิดการขาดหายไปของยีนบางส่วนในระหว่างการแทรกเข้าไปในจีโนมพีชทำให้บางต้นอาจมีเพียง 1 ยีนหรือ 2 ยีนได้ (Jouanin *et al.*, 1987)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานและการคงอยู่ของยีน *rol* พบว่า ในแต่ละกลุ่มของพีชที่แม้ว่าจะมีลักษณะสัณฐานคล้ายกันนั้นยังพบความแตกต่างในเรื่องการมีอยู่ของยีน *rol* ได้ (ตารางที่ 4) แต่อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานกับการคงอยู่ของยีน *rol* สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า ยีน *rolA* อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะเดี่ยวแกระ เนื่องจากต้นที่มียีน *rolA* ส่วนใหญ่ลำต้นจะมีปล้องสั้น และข้อถี่ ซึ่งแนวโน้มดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Schmulling *et al.* (1988) อย่างไรก็ตาม มีบางต้นที่แม้ว่าจะมียีน *rolA* แต่มีลำต้นสูงเช่น สายต้นที่ 29 36 และ 42 ในกลุ่มที่ 2 อาจเป็นเพราะการแทรกตัวของยีน *rol* เข้าไปในจีโนมของพีชซึ่งอาจมีจำนวนชุดของยีนที่เข้าไปแทรกในจีโนมพีชมากกว่า 1 ชุดหรืออาจเกิดการแทรกในตำแหน่งที่ต่างกัน (Casanova *et al.*, 2005; Abhyankar *et al.*, 2005; Thimmaraju *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่มียีน *rol* ครบทั้ง 3 ยีนในต้นเดียวกันแสดงลักษณะผิดปกติของต้นและใบมากกว่าต้นที่มียีน *rol* ไม่ครบทั้ง 3 ยีน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะที่พบในต้นบีโกเนีย (Kiyokawa *et al.*, 1996) และลิลลี่ (Mercuri *et al.*, 2003) ที่พบว่า ต้นที่มีครบทั้ง 3 ยีนจะเดี่ยวกว่าต้นที่มียีน *rol* เพียงยีนเดียวหรือ 2 ยีน สำหรับยีน *rolB* นั้นจากงานวิจัยนี้ไม่สามารถสรุปความเชื่อมโยงที่ชัดเจนต่อลักษณะสัณฐานของเจตมูลเพลิงแดงที่เปลี่ยนแปลงได้

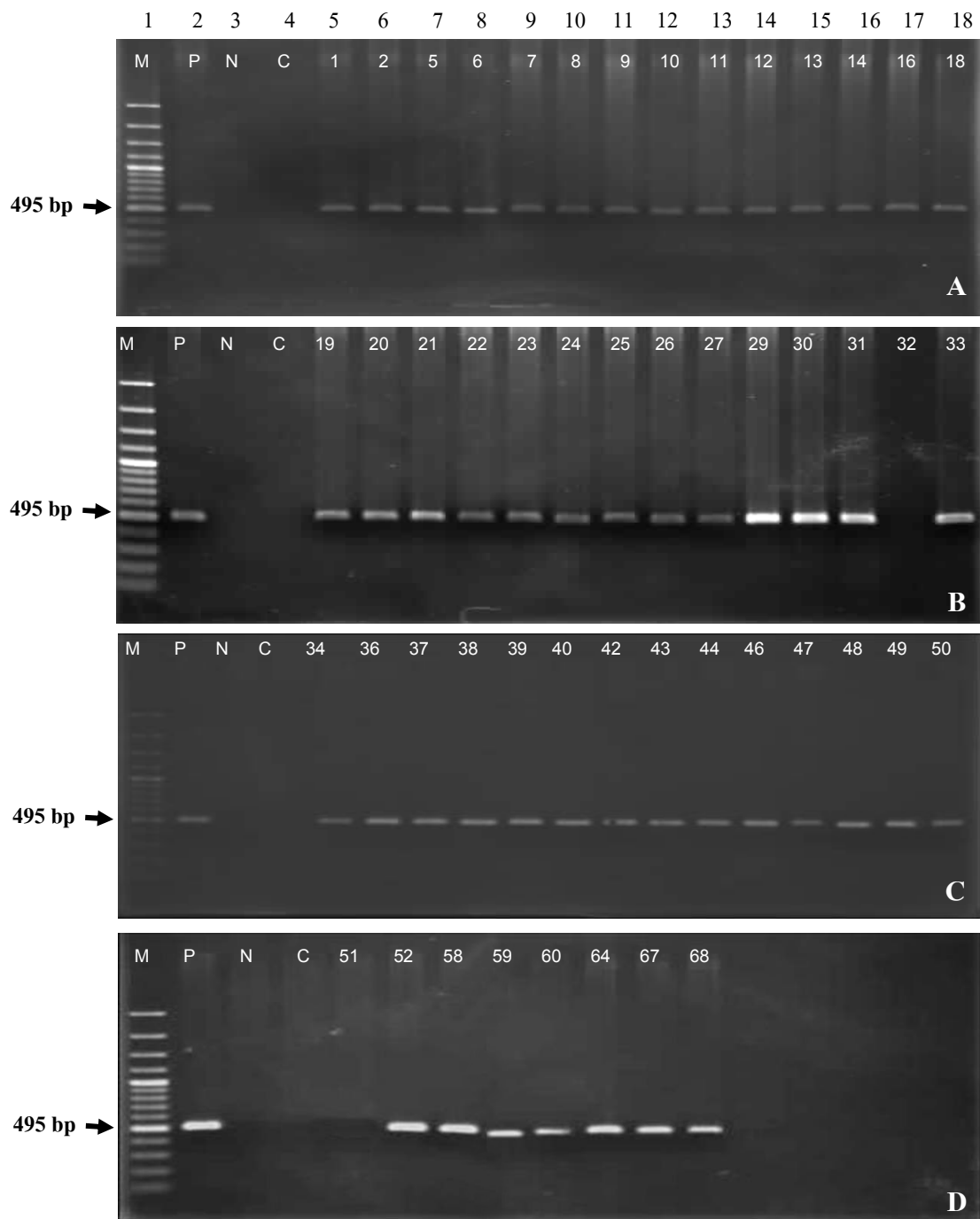
ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานกับการคงอยู่ของยีน *rol* ชนิดต่าง ๆ ในสายต้น
 เจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root จำนวน 50 สายต้น

กลุ่มที่	ลักษณะสัณฐาน	ยีน <i>rol</i> ที่ตรวจพบ	หมายเลขสายต้น
1	ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นริ้วคลื่น ผิวใบขุ่น ขั้วถี่ ปล้องสั้น ลำต้น เตี้ยแคระ (36)	<i>rolB rolC</i> (1)	16
			1 2 6 7 8 9 10 11 12 13
		<i>rolA rolB</i>	14 18 20 21 22 24 26 27 31
		<i>rolC</i> (35)	33 37 38 39 40 43 47 48 49
			50 52 58 59 60 67 68
2	ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นคลื่น ผิวใบขุ่น ปล้องยาว ลำต้นสูง (9)	<i>rolC</i> (2)	32 51
		<i>rolB rolC</i> (4)	34 44 46 64
		<i>rolA rolB rolC</i> (3)	29 36 42
3	ใบรูปรี ขนาดสั้น ผิวใบขุ่น ขอบใบ ม้วนเป็นคลื่นเฉพาะใบยอด ลำต้น เตี้ยแคระ (3)	<i>rolA rolB rolC</i> (3)	19 23 30
4	ใบรูปรี ขนาดสั้น ขอบใบม้วนเป็น ริ้วคลื่น ปลายใบงอจนกระทั่งม้วน กลับไปด้านหลังทำให้เห็นเป็นก้อน ขั้วถี่ และปล้องสั้นมากทำให้ต้น กอดกันเป็นกระจุก (2)	<i>rolA rolB rolC</i> (2)	5 25

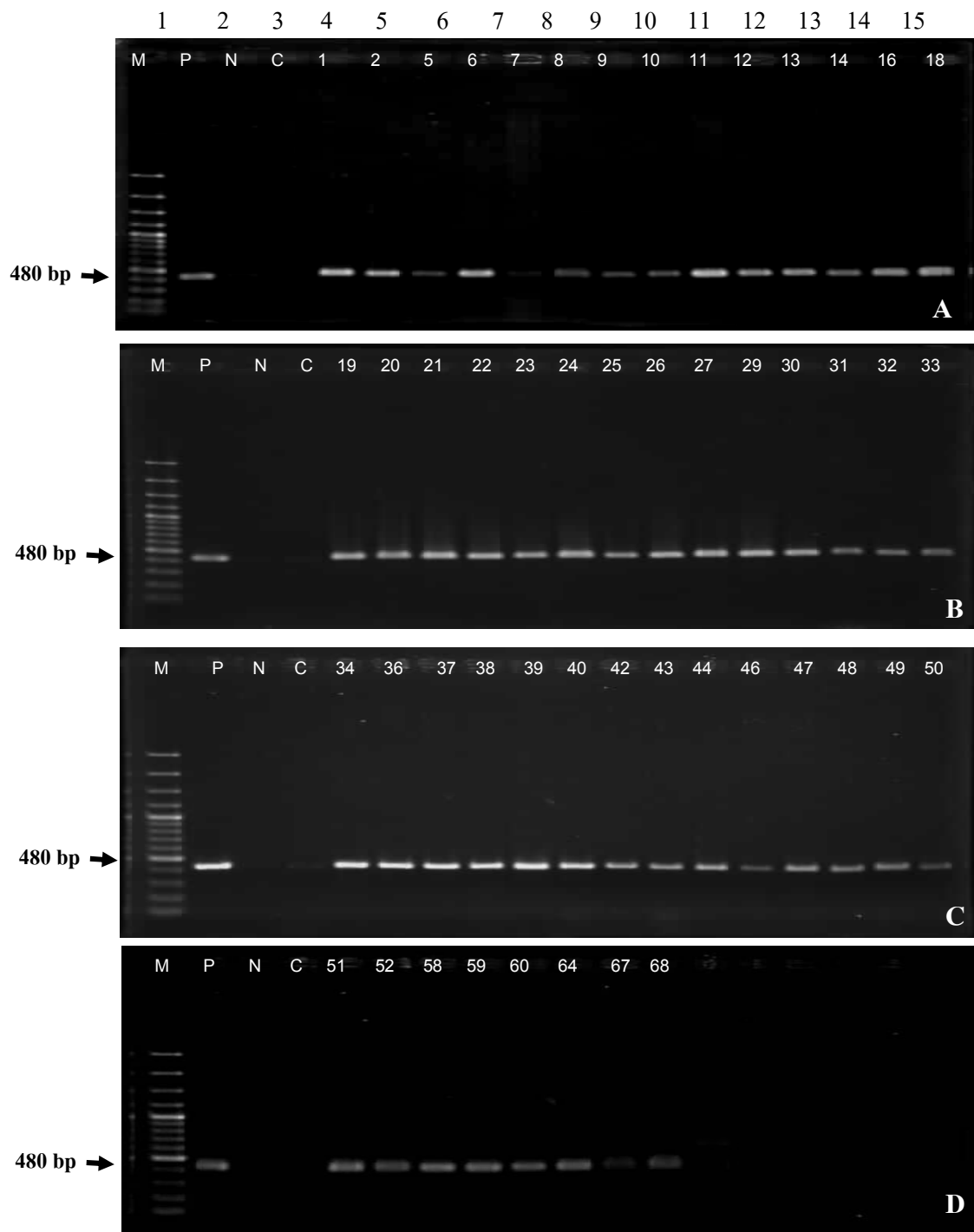
หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บ () หมายถึง จำนวนต้นที่ตรวจพบ



ภาพที่ 7 การคงอยู่ของยีน *rolA* ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ตรวจสอบโดยวิธี PCR
 M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder, P = positive control คือ lane 2, N = negative control คือ lane 3, C = ดีเอ็นเอต้นปกติ ภาพ A: lane 5-18 คือ DNA ของ สายต้นที่ 1 2 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 ภาพ B: lane 5-18 คือ DNA ของสายต้นที่ 19 20 21 22 23 24 25 26 27 29 30 31 32 33 ภาพ C: lane 5-18 คือ DNA ของสายต้นที่ 34 36 37 38 39 40 42 43 44 46 47 48 49 50 ภาพ D: lane 5-18 คือ DNA ของสายต้นที่ 51 52 58 59 60 64 67 68



ภาพที่ 8 การคงอยู่ของยีน *rolB* ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ตรวจสอบโดยวิธี PCR
 M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder, P = positive control คือ lane 2, N = negative control คือ lane 3, C = ดีเอ็นเอต้นปกติ ภาพ A: lane 5-18 คือ DNA ของ สายต้นที่ 1 2 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 ภาพ B: lane 5-18 คือ DNA ของสายต้นที่ 19 20 21 22 23 24 25 26 27 29 30 31 32 33 ภาพ C: lane 5-18 คือ DNA ของสายต้นที่ 34 36 37 38 39 40 42 43 44 46 47 48 49 50 ภาพ D: lane 5-18 คือ DNA ของสายต้นที่ 51 52 58 59 60 64 67 68



ภาพที่ 9 การคงอยู่ของยีน *rolC* ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ตรวจสอบโดยวิธี PCR
 M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder, P = positive control คือ lane 2, N = negative control
 คือ lane 3, C = ดีเอ็นเอต้นปกติ ภาพ A: lane 5-18 คือ DNA ของ สายต้นที่ 1 2 5 6 7 8 9 10 11
 12 13 14 15 16 17 18 ภาพ B: lane 5-18 คือ DNA ของสายต้นที่ 19 20 21 22 23 24 25 26 27 29
 30 31 32 33 ภาพ C: lane 5-18 คือ DNA ของสายต้นที่ 34 36 37 38 39 40 42 43 44 46 47 48 49
 50 ภาพ D: lane 5-18 คือ DNA ของสายต้นที่ 51 52 58 59 60 64 67 68

การตรวจสอบการคงอยู่ และ จำนวนชุดของยีน *rol* ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *Rhizobium rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ด้วยเทคนิค Southern hybridization

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการคงอยู่ของยีน *rol* ด้วยเทคนิค PCR กับลักษณะทางสัณฐานในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 พบว่ามีบางต้นที่แม้ว่าจะมียีน *rolA* แต่มีลำต้นสูง เช่น สายต้นที่ 29 36 และ 42 หรือบางต้นที่มียีน *rol* ครบทั้ง 3 ยีนแต่ใบม้วนเป็นคลื่นเฉพาะใบยอด เช่น สายต้นที่ 19 23 และ 30 ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวนชุดของยีน *rol* ที่เข้าไปแทรกในจีโนมพืชมีมากกว่า 1 ชุด ตามที่ Abhyankar *et al.* (2005) และ Camilleri and Jouanin (1991) ได้อธิบายไว้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาจำนวนชุดของยีน *rol* ที่แทรกเข้าอยู่ในจีโนมของเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้เทคนิค Southern hybridization โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ตรวจสอบโดยวิธี PCR แล้วพบว่ามียีน *rol* ครบทั้ง 3 ยีน แต่ลักษณะทางสัณฐานแตกต่างจากต้นอื่น ๆ ที่มียีน *rol* ครบทั้ง 3 ยีน จำนวน 7 สายต้น (ตารางที่ 5) ซึ่งเป็นต้นที่อยู่ในกลุ่มที่ 2 จำนวน 3 สายต้น คือ สายต้นที่ 29 36 และ 42 กลุ่มที่ 3 จำนวน 3 สายต้น คือสายต้นที่ 19 23 และ 30 กลุ่มที่ 4 จำนวน 1 สายต้นคือสายต้นที่ 5 และ สายต้นที่มียีน *rol* ครบทั้ง 3 ยีน แต่ลักษณะสัณฐานไม่ต่างจากต้นอื่น ๆ ในกลุ่มที่ 1 คือ สายต้นที่ 9 อีก 1 สายต้นรวมทั้งตรวจสอบในต้นปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* เพื่อใช้เป็นต้นควบคุม ผลปรากฏว่าสามารถตรวจสอบพบแถบสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์มที่ได้จากดีเอ็นเอจากต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ทุกสายต้น แสดงว่าทั้ง 8 สายต้นมีการคงอยู่ของยีน *rol* ที่ถ่ายทอดเข้าไป และต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ใช้เป็นต้นควบคุมไม่ปรากฏแถบสีดำ

เมื่อพิจารณาจากรายละเอียดพบว่ามี 5 สายต้น ที่มีจำนวนชุดของยีน *rol* 1 ชุด คือ สายต้นที่ 5 9 29 36 และ 42 ส่วนสายต้นที่ 19 23 และ 30 มีจำนวนชุดของยีน *rolC* 2 ชุด (ภาพที่ 10) โดย 3 สายต้นนี้เป็นต้นที่อยู่ในกลุ่มที่ 3 ที่มีลักษณะทางสัณฐานต่างจากกลุ่มอื่น คือ ขอบใบม้วนเป็นคลื่นเฉพาะใบยอด ซึ่งอาจเป็นเพราะการมีอยู่ของยีน 2 ชุด ทำให้การแสดงออกของยีนน้อยกว่าการแสดงออกของยีนเพียงชุดเดียว (Carrier *et al.*, 1998) ซึ่งโดยปกติแล้วถ้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีจำนวนชุดของยีนที่ถูกถ่ายมากกว่า 1 ชุด มักจะพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ถ่ายทอดเข้าไป (Finnegan and MacElroy, 1994)

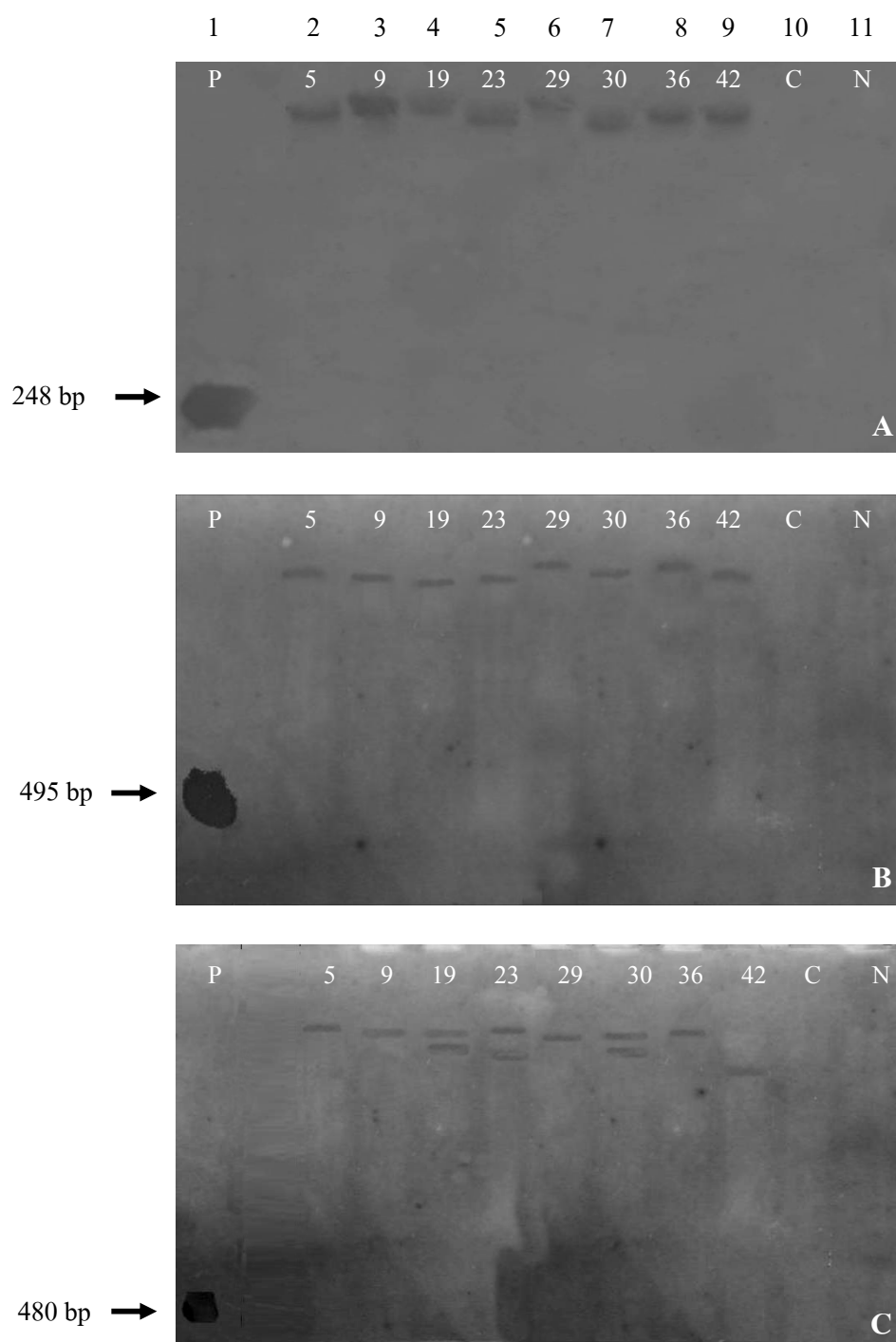
ในประเด็นเรื่องจำนวนชุดของยีนที่มีผลต่อการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานนั้น มีรายงานของ Thimmaraju *et al.* (2008) ที่ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* กลุ่มที่สร้างสาร agropine

4 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ A4 A2/83 A20/83 และ LMG-150 ในต้น *Beta vulgaris* ซึ่งเมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rol* พบว่ามียีน *rolA* *rolB* และ *rolC* และจากผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *rolA* ด้วยเทคนิค Southern hybridization จำนวน 10 สายต้น พบว่า 9 สายต้น มีจำนวนชุดยีน 1 ชุด และมี 1 สายต้น มีจำนวนชุดยีน 2 ชุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานพบว่าต้นที่มีจำนวนชุดของยีน 2 ชุด มีการเจริญเติบโตของราก และปริมาณสารทุติยภูมิแตกต่างจากต้นที่มี 1 ชุด โดยจำนวนชุดยีนเพียงชุดเดียวจะมีรากยาวกว่าและปริมาณสารทุติยภูมิมากกว่าต้นที่มีจำนวนชุดของยีน 2 ชุด และ Lacroix *et al.* (2006) ได้อธิบายว่าจำนวนชุดของยีน 1 ชุดเป็นสิ่งที่ดีที่สุดสำหรับการถ่ายยีนเนื่องจากถ้าพืชตัดแปลงพันธุกรรมมีจำนวนชุดของยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปมากมักจะพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ถ่ายเข้าไป

นอกจากนี้จากการศึกษาจำนวนชุดของยีนพบว่ามีอีก 4 สายต้นคือสายต้นที่ 5 29 36 และ 42 ที่มียีน *rol* ครอบทั้ง 3 ยีนและมีจำนวนชุดของยีนอย่างละ 1 ชุด แต่มีลักษณะทางสัณฐานบางประการแตกต่างจากต้นอื่นที่มียีน *rol* ครอบทั้ง 3 ยีนและมีจำนวนชุดของยีนเพียง 1 ชุดเช่นเดียวกัน ซึ่งลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างไปนี้อาจเป็นเพราะมีการแทรกของยีน *rol* เข้าไปในจีโนมในตำแหน่งที่ต่างกันน่าจะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน (Abhyankar *et al.*, 2005) ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีรายงานในพืชชนิดอื่น เช่น Winefield *et al.* (1999) ได้ถ่ายยีน *rolC* ในพิทูเนีย พบว่าสายต้นพิทูเนียที่มีจำนวนชุดของยีน 1 ชุดเท่ากันแต่แสดงลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างกัน โดยแต่ละสายต้นมีความสูงและขนาดดอกที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะฐานกับการคงอยู่ และจำนวนชุดของยีน *rol* ในสายต้นที่มียีน *rol* ทั้ง 3 ยีน แต่มีลักษณะฐานแตกต่างจากต้นอื่น ๆ ที่มียีน *rol* ครบทั้ง 3 ยีนเช่นเดียวกัน

กลุ่มที่	ลักษณะทางสัณฐาน	หมายเลข สายต้นที่ศึกษา	ยีนที่ตรวจพบ	การมีอยู่ และจำนวนชุดของยีน <i>rol</i>		
				<i>rolA</i>	<i>rolB</i>	<i>rolC</i>
2	ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นคลื่น ผิวใบขน ปล้องยาว ลำต้นสูง	36 29 42	<i>rolA rolB rolC</i>	1	1	1
3	ใบรูปรี ขนาดสั้น ผิวใบขน ขอบใบม้วน เป็นคลื่นเฉพาะใบยอด ลำต้นเตี้ยแคระ	19 23 30	<i>rolA rolB rolC</i>	1	1	2
4	ใบรูปรี ขนาดสั้น ขอบใบม้วนเป็นริ้วคลื่น ปลายใบงอจนกระทั่งม้วนกลับไปด้านหลัง ทำให้เห็นเป็นก้อน ข้องถี่ และปล้องสั้นมาก ทำให้ต้นกอดกันเป็นกระจุก	5	<i>rolA rolB rolC</i>	1	1	1



ภาพที่ 10 ตรวจสอบการคงอยู่ และจำนวนชุดของยีน *rol* ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงบางสายต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 และตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ A: ยีน *rolA* B: ยีน *rolB* และ C: ยีน *rolC* P: positive control (*R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599) Lane 2-9 : สายต้นเจตมูลเพลิงแดง C: ดันปกติ N: negative control

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายต้นเจตมูลเพลิงแดง โดยวิธีเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

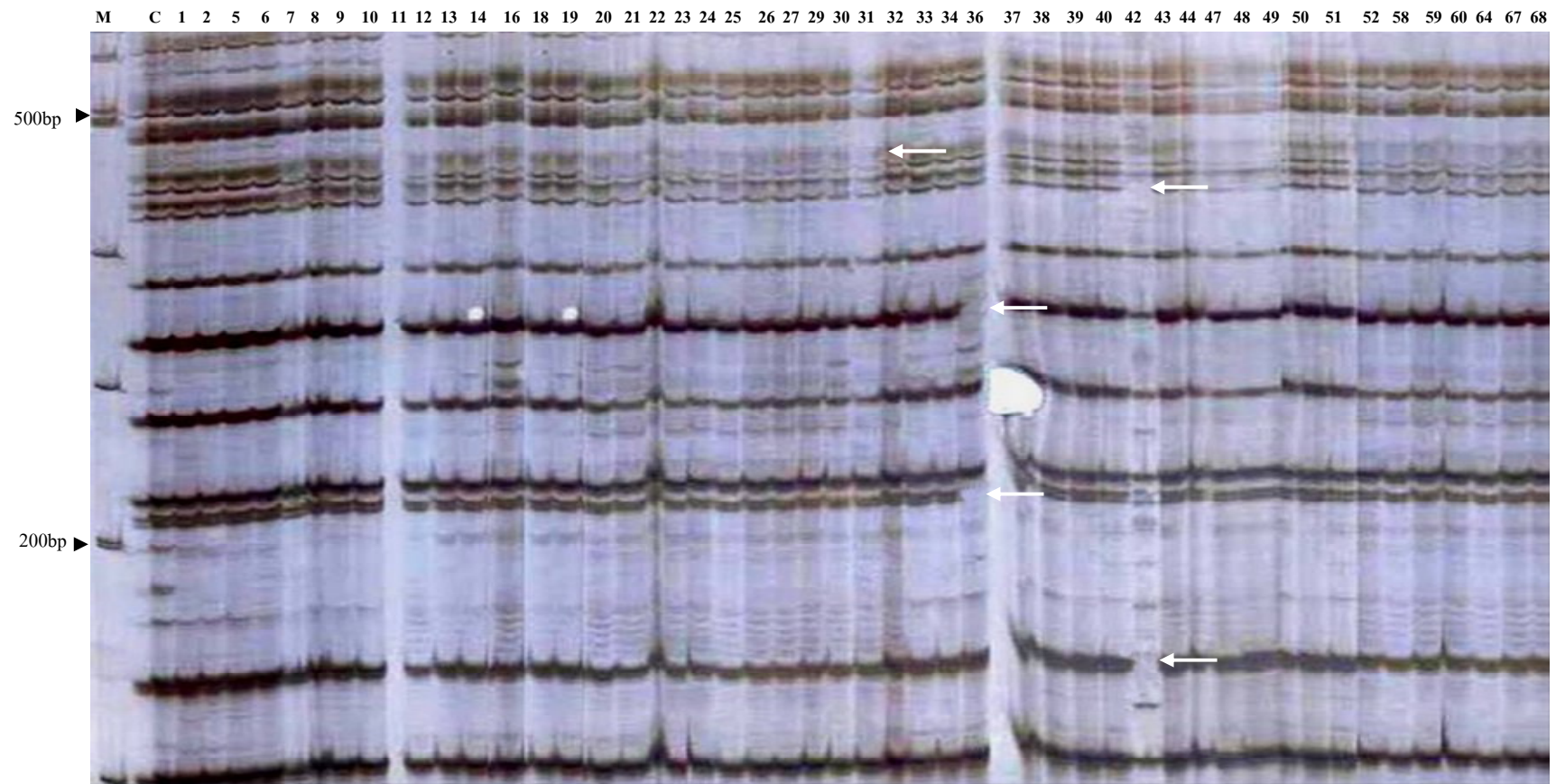
จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีบางต้นที่มี ยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปเหมือนกันแต่ลักษณะทางสัณฐานต่างกันซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเป็นเพราะมีการ แทรกตัวของยีน *rol* เข้าไปในจีโนมในตำแหน่งที่ต่างกันซึ่งข้อสันนิษฐานนี้สืบเนื่องมาจาก ผลงานวิจัยของ Rosati *et al.* (2005) ที่ได้ถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* เข้าสู่ต้น *Nicotiana langsdorffii* ส่งผลให้ต้นที่ได้รับยีน *gr* มีลักษณะสัณฐานแตกต่างจากต้นปกติ และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP พบว่าต้นที่ได้รับยีนให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกันแสดงว่าเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนั้นในการทดลองกับสายต้นเจตมูลเพลิงแดงในครั้งนี้จึงได้ตรวจสอบความหลากหลายทาง พันธุกรรมของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงดังกล่าวด้วยเทคนิค AFLP โดยการศึกษาที่ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 35 คู่ (ตารางที่ 3) เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดจากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงจำนวน 50 สายต้น โดยการเข้าไปแทรกของยีน *rol* ใน ตำแหน่งต่าง ๆ ในจีโนมพืชอาจมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานของพืช จากผลการทดลองพบว่าเมื่อนำ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากขั้นตอน selective amplification มาแยกขนาดด้วยการทำ อิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 1,270 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 1,096 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็นพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 174 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน 1 ถึง 15 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ซึ่งคิดเป็นพอลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 4.9 แถบต่อ คู่ไพรเมอร์ หรือประมาณ 13.70 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root นั้นมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ AFLP มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม แบบของแถบ ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างเป็นพอลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไป เกิดขึ้นใหม่ มีการจัดเรียงตัว ใหม่ภายในตำแหน่งจดจำ หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของ เอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกลำโพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่ม ปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ หรือการสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งจดจำเฉพาะของเอนไซม์ มีผลทำ ให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนแปลงไป (Vos *et al.*, 1995 ; Kokotovic *et al.*, 1999)

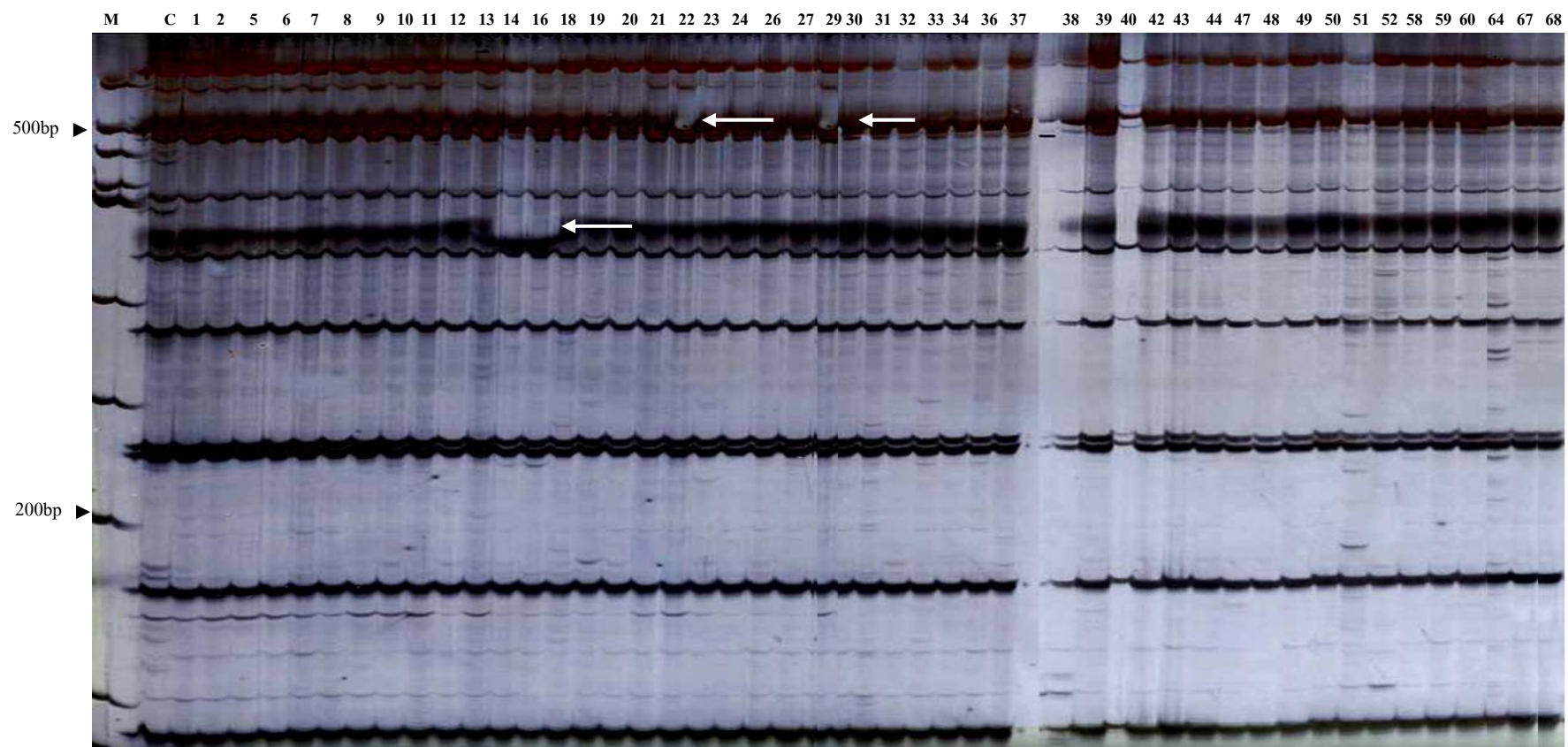
จากการศึกษาแถบดีเอ็นเอของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงจำนวน 50 สายต้น มีสายต้นที่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึมจำนวน 19 สายต้น (ตารางที่ 7) และสายต้นที่มีการคงอยู่ของยีน *rol* ทั้ง 3 ยีนแต่มีลักษณะทางสัณฐานแตกต่างจากต้นอื่น ๆ ที่มียีนครบทั้ง 3 ยีนเช่นเดียวกัน จำนวน 5 สายต้น คือ สายต้น 5 25 29 36 และ 42 พบว่ามีพอลิเมอร์ฟิซึมในสายต้นที่ 29 36 และ 42 (ภาพที่ 11 12 และ 13 ศรีชัย) ซึ่งเป็นสายต้นที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ดังนั้นการที่มีลักษณะทางสัณฐานแตกต่างจากต้นอื่นนั้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากการแทรกตัวของยีน *rol* ในตำแหน่งที่ต่างจากต้นอื่น ๆ ซึ่งผลในลักษณะนี้สอดคล้องกับงานของ Choi *et al.* (2004a) ที่พบว่าต้นที่ได้จาก hairy root มีลักษณะสัณฐานและปริมาณสารทุติยภูมิแตกต่างกันนั้นเกิดจากตำแหน่งการแทรกของยีนส่วน T-DNA แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ยืนยันผลในทำนองเดียวกันคือ งานวิจัยของ Abhyankar *et al.* (2005) ที่ได้ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC15834 ในส่วน hypocotyl ของต้น *Psoralea carylifolia* ซึ่งมีสารทุติยภูมิที่สำคัญ คือ สาร glycoside และ daidzein พบว่าสามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้และเมื่อนำ hairy root 2 line ที่มีการเจริญเติบโตและการแตกแขนงของรากเหมือนกันคือ line PsI และ PsII มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำ AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ พบว่าทั้ง 2 line เกิดพอลิเมอร์ฟิซึมได้จากทั้ง 5 คู่ไพรเมอร์ และเมื่อสกัดสาร glycoside และ daidzein พบว่าทั้ง 2 line มีปริมาณสารที่แตกต่างกัน โดยสาร glycoside ใน PsI เพิ่มขึ้น 17 เท่า และ ใน PsII เพิ่มขึ้น 5 เท่า สำหรับสาร daidzein นั้นใน PsI ให้สารเพิ่มขึ้น 160 เปอร์เซ็นต์ และ PsII ให้สารเพิ่มขึ้น 58 เปอร์เซ็นต์

สำหรับสายต้นที่ 5 และ 25 ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 4 พบว่าไม่มีพอลิเมอร์ฟิซึมทั้ง 2 สายต้น และสายต้นที่ 5 มีจำนวนชุดยีน 1 ชุด แต่ทั้ง 2 สายต้นมีลักษณะสัณฐานที่ต่างกันมีจากกลุ่มอื่นอย่างเด่นชัด คือ ปลายใบงอจนกระทั่งม้วนกลับไปด้านหลังทำให้เห็นเป็นก้อน ขอบถี่ และปล้องสั้นมาก ทำให้ต้นกอดกันเป็นกระจุก ซึ่งอาจเป็นเพราะยีน *rol* ไม่ได้แทรกตรงตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงทำให้ทั้ง 2 สายต้น ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม (Masika *et al.*, 2000) หรือเป็นผลมาจากฮอร์โมนไซโตไคนิน โดยสายต้นในกลุ่มที่ 4 มีการคงอยู่ของยีน *rolA rolB* และ *rolC* ซึ่ง Casanova (2003) อธิบายว่า ยีน *rolC* ทำหน้าที่เหมือนไซโตไคนินซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของราก และ ต้น นกคด (2537) พบว่าถ้าต้นและรากได้รับปริมาณไซโตไคนินมากเกินไปจะยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นจากลักษณะสัณฐานของกลุ่มที่ 4 ที่เปลี่ยนแปลงไปจากต้นอื่นอย่างชัดเจนแต่ไม่มีพอลิเมอร์ฟิซึม และสายต้นที่ 5 มียีน *rol* เพียง 1 ชุด อาจเป็นผลจากการแสดงออกของยีน *rolC* ที่ทำหน้าที่คล้ายไซโตไคนินมีการแสดงออกของยีน *rolC* มากกว่าต้นอื่น ๆ จนทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Winefield *et al.* (1999) ได้ถ่ายยีน *rolC*

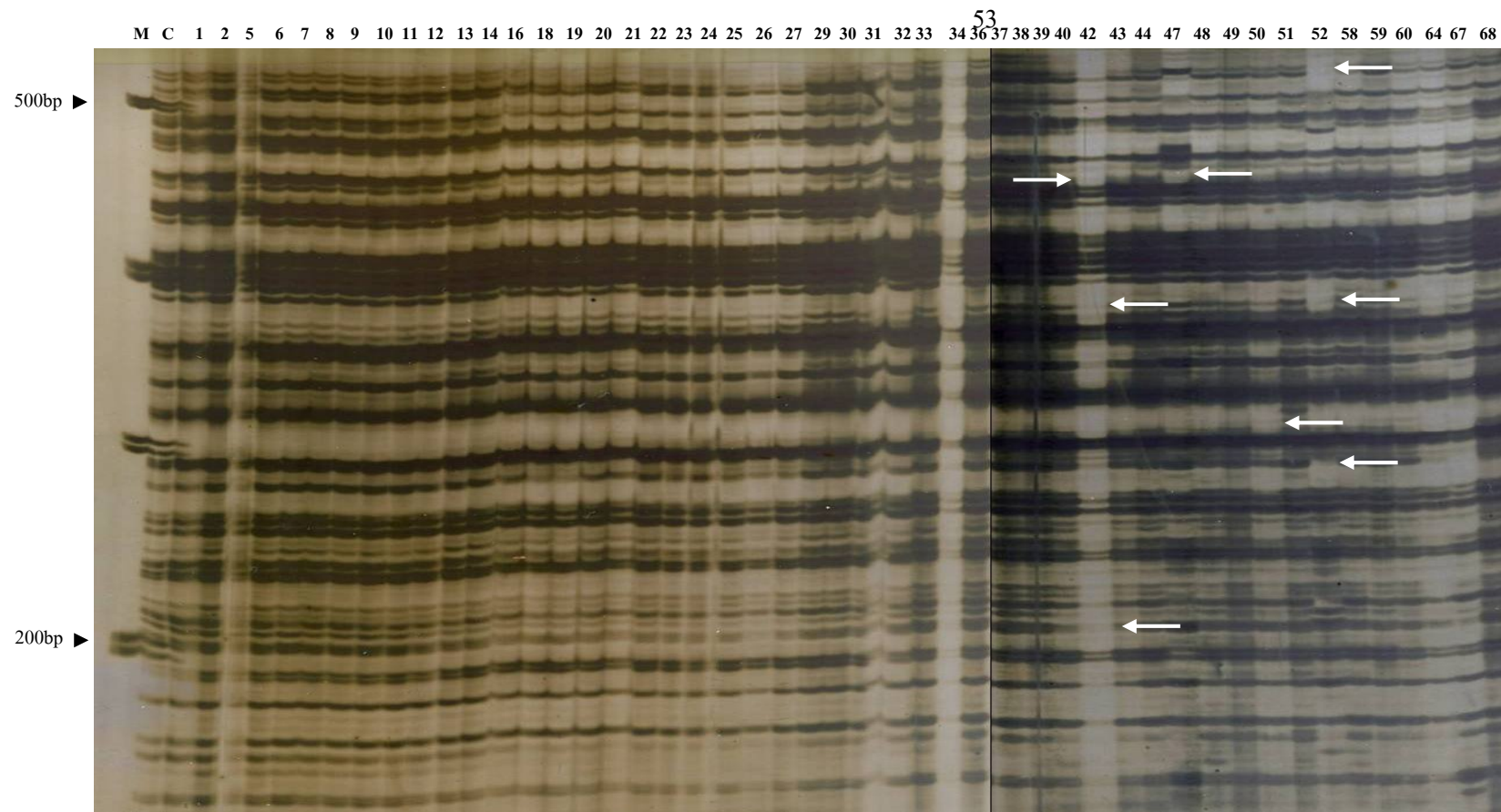
ในพืชนีย พบว่าในแต่ละสายต้นมีความสูงและขนาดดอกที่แตกต่างกันมาก เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค Southern hybridization พบว่ามีจำนวนชุดของยีน 1 ชุดเท่ากันทุกสายต้น และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Northern blot พบว่าสายต้นที่แสดงลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างจากต้นอื่นอย่างชัดเจน คือลำต้นเตี้ยแคระ และดอกมีขนาดเล็กมากที่สุดมีการแสดงออกของยีน *rolC* มากสุด



ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root โดยผู้ไพรเมอร์ E-CAG/M-CAC C คือ ดันควบคุม
M คือ ϕ x174 DNA/*Hinf*I marker



ภาพที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root โดยคู่ไพรเมอร์ E-CAG/M-CTA C คือ คั่นควบคุม
M คือ ϕ x174 DNA/*Hinf*I marker



ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root โดยคู่ไพรเมอร์ E-CGT/M-CAG C คือ ต้นควบคุม
M คือ ϕ x174 DNA/*Hinf*I marker

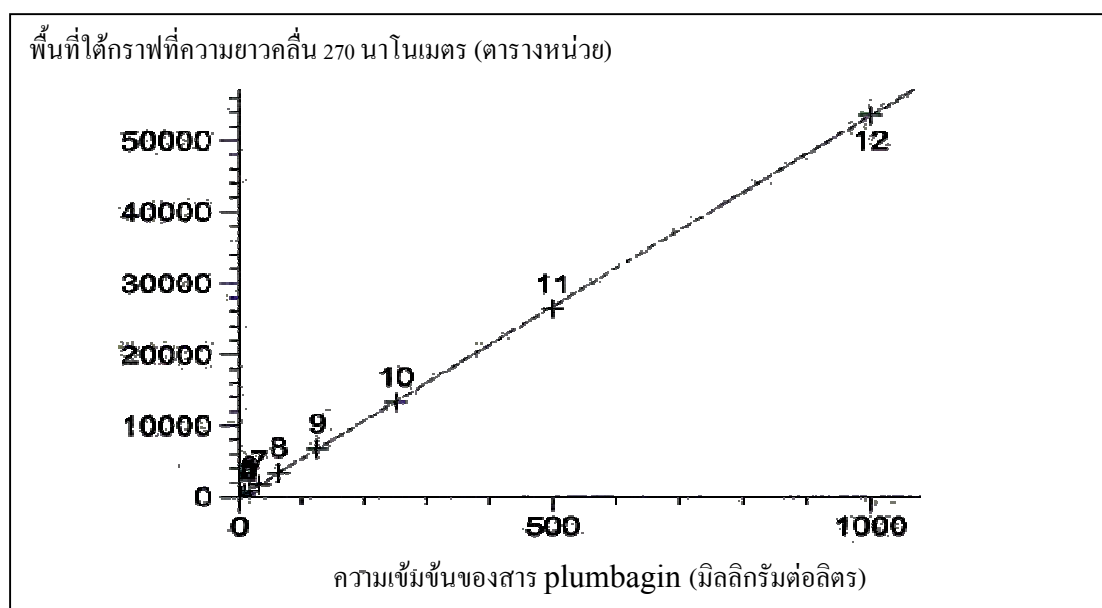
ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานกับการคงอยู่ของยีน *rol* และการเกิดพอร์ลิเมอร์ฟิซึมในสายต้นที่มียีน *rol* ครอบทั้ง 3 ยีน
แต่มีลักษณะสัณฐานแตกต่างจากต้นที่มียีน *rol* ครอบทั้ง 3 ยีนเช่นเดียวกัน

กลุ่มที่	ลักษณะทางสัณฐาน	การคงอยู่ของยีน	สายต้นที่มีลักษณะ	การเกิดพอร์ลิเมอร์ฟิซึม
			สัณฐานแตกต่างจาก ต้นอื่นๆ	
2	ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นคลื่น ผิวใบย่น ปล้องยาว ลำต้นสูง	<i>rolA rolB rolC</i>	36 29 42	เกิดพอร์ลิเมอร์ฟิซึม
3	ใบรูปรี ขนาดสั้น ผิวใบย่น ขอบใบม้วนเป็นคลื่น เฉพาะใบยอด ลำต้นเตี้ยแคระ	<i>rolA rolB rolC</i>	19 23 30	เกิดพอร์ลิเมอร์ฟิซึมเฉพาะ สายต้นที่ 30
4	ใบรูปรี ขนาดสั้น ขอบใบม้วนเป็นริ้วคลื่น ปลายใบ งอจนกระทั่งม้วนกลับไปด้านหลังทำให้เห็นเป็นก้อน ข้อถี่ และปล้องสั้นมากทำให้ต้นกอดกันเป็นกระจุก	<i>rolA rolB rolC</i>	5 25	ไม่เกิดพอร์ลิเมอร์ฟิซึม

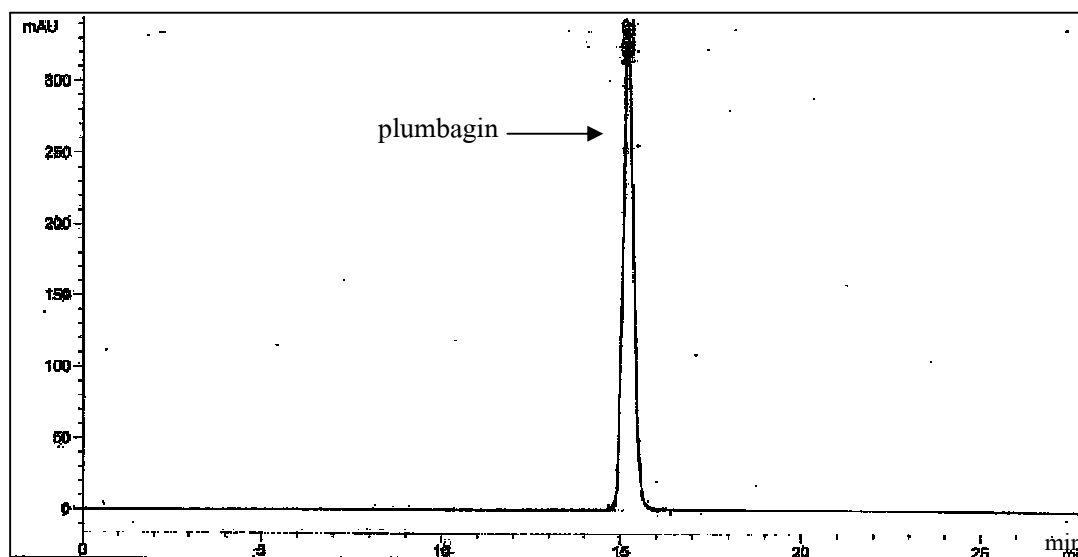
การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Calibration curve ของ plumbagin standard reference

การทำ calibration curve (ภาพที่ 14) เพื่อแปลผลของพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC มาเป็นปริมาณสาร plumbagin ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร โดยใช้สาร plumbagin มาตรฐาน (Sigma: catalog number P7262 a.i. 98 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้น 1,000 500 250 125 63 32 16 8 4 2 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งใช้เป็น calibration curve ของ plumbagin standard reference โดยมีสมการ linear regression คือ $y = 53.28555x - 18.87717$ ($r = 0.99997$) โดย y คือ ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (ตารางหน่วย) และ x คือ ค่าความเข้มข้นของสาร plumbagin (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ค่าเฉลี่ย retention time ของ plumbagin standard reference ประมาณ 15 นาที (ภาพที่ 15) ดังนั้นเมื่อทราบพื้นที่ใต้กราฟ และเวลาของสารที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC ก็สามารถทราบถึงปริมาณสาร plumbagin ได้

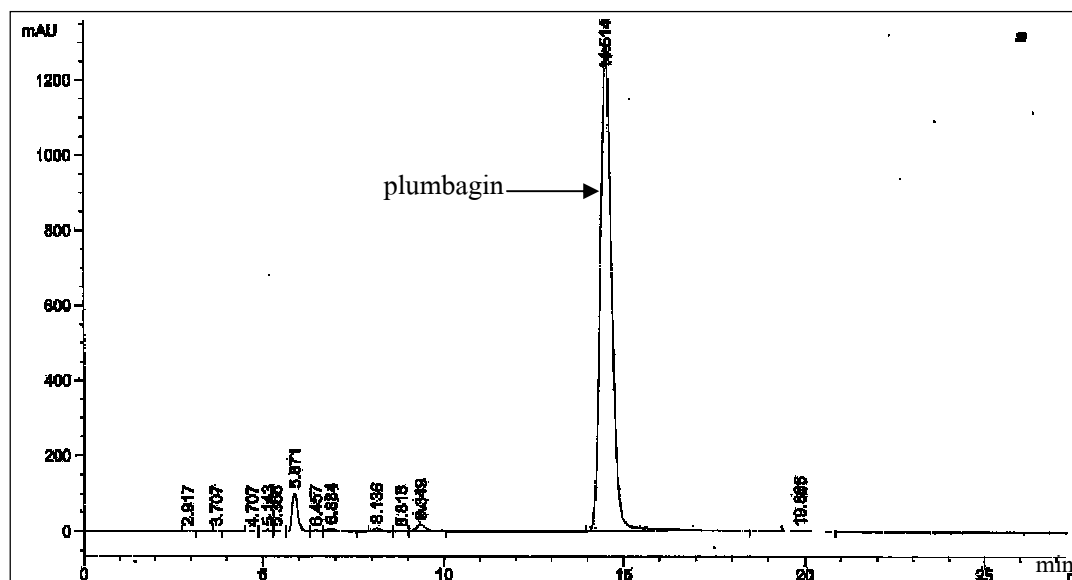


ภาพที่ 14 Calibration curve ของ plumbagin standard reference (Sigma, cat. no. P-7262)



ภาพที่ 15 Chromatogram ของ plumbagin standard reference (Sigma, cat. no. P-7262)

mAU = milli Absorbance Unit min = นาที



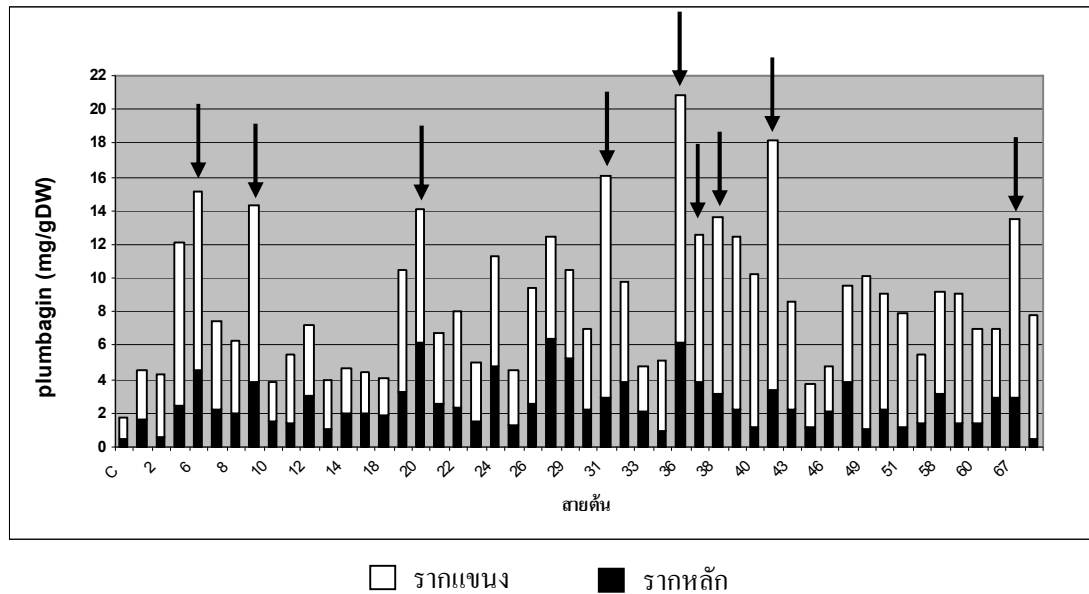
ภาพที่ 16 Chromatogram ของตัวอย่างสารสกัดจากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงสายต้นที่ 36 ที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599

chromatogram จะทำให้ทราบแน่ชัดว่าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีสาร plumbagin โดยการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ของ plumbagin standard reference กับสารตัวอย่าง จากการทดลองนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ในรากของสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 พบว่า peak ของสาร plumbagin standard reference กับ peak ของสารตัวอย่าง อยู่ในช่วงเวลาเฉลี่ยใกล้เคียงกันคือประมาณ 15 นาที (ภาพที่ 15 และ 16)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ในรากอายุ 1 ปี ที่ได้จากสายต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ที่มาจากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 พบว่ารากที่ได้มีปริมาณสาร plumbagin มากกว่ารากจากต้นปกติ โดยรากจากต้นปกติจะมีปริมาณสาร plumbagin ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อรากแห้ง 1 กรัม ส่วนรากของต้นที่ได้จาก hairy root ทุกสายต้นมีปริมาณสาร plumbagin มากกว่ารากจากต้นปกติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Piatczak *et al.* (2006) ที่พบว่าต้น *Centaurea erythraea* ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ LBA9402 มีปริมาณสารในกลุ่ม secoiridoids มากกว่าต้นปกติ 2 เท่า โดยให้ปริมาณสารอยู่ในช่วง 4-20 มิลลิกรัมต่อรากแห้ง 1 กรัม นอกจากนี้ยังพบว่า ส่วนรากแขนงมีปริมาณสาร plumbagin มากกว่าในรากหลัก (ภาพที่ 17) ซึ่งทุกสายต้นตรวจพบว่ามียีน *rolC* อยู่ นอกจากนี้มี 9 สายต้นที่มีปริมาณสารสูงกว่าต้นปกติมาก โดยมีสาร plumbagin อยู่ในช่วงประมาณ 12-20 มิลลิกรัมต่อรากแห้ง 1 กรัม (ภาพที่ 17 ครึ่ง และ ภาพที่ 18) โดยทั้ง 9 ต้นนั้นมีการคงอยู่ของทั้งยีน *rolA rolB* และ *rolC* ด้วยทั้ง 3 ยีน

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร plumbagin กับการคงอยู่ของยีน *rol* พบว่า ยีน *rolC* อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณสาร plumbagin เนื่องจากทุกสายต้นที่พัฒนามาจาก hairy root มียีน *rolC* อยู่และมีสาร plumbagin ในรากมากกว่าในรากจากต้นปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pinol and Palazon (1996) ที่พบว่าต้น *Datura stramonium* ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* และมียีน *rolC* อยู่มีปริมาณสาร hyoscyamine สูงกว่าต้นปกติแต่ต้นที่มีการคงอยู่ของเฉพาะยีน *rolA* และ *rolB* เท่านั้นไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารทุติยภูมิ โดยต้นที่มีปริมาณสารสูงสุด 2 สายต้นคือ สายต้น 36 และ 42 ซึ่งเป็นต้นที่ลักษณะฐานจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 และมียีน *rol* ครบทั้ง 3 ยีน เมื่อตรวจสอบโดย Southern hybridization มีจำนวนชุดของยีน 1 ชุด และเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค AFLP ก็เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นอื่นที่มียีน *rol* ครบทั้ง 3 ยีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Roessner *et al.* (2001) Batra *et al.* (2004) และ Choi *et al.* (2004b) ที่พบว่าในแต่ละสายต้นที่มีปริมาณสารทุติยภูมิแตกต่างกันให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน

เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากตำแหน่งการแทรกของยีนส่วน T-DNA เข้าไปในจีโนมพืชที่แตกต่างกันจึงส่งผลให้ปริมาณสารทุติยภูมิต่างกันด้วย



ตารางที่ 7 ลักษณะสัณฐานกับการคงอยู่ของยีน *rol* จำนวนชุดของยีน *rol* การเกิดพอลิเมอร์ฟิซึม และปริมาณสาร plumbagin ในสายต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root ที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599

กลุ่มที่	ลักษณะสัณฐาน	การคงอยู่ ของยีน		จำนวนชุดของยีน			การเกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	ปริมาณสาร Plumbagin (mg/gDW)
		<i>rolB</i>	<i>rolC</i>	<i>rolA</i>	<i>rolB</i>	<i>rolC</i>		
1	ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นริ้ว คลื่น ผิวใบขน ขั้วถี่ ปล้องสั้น ลำต้นเดี่ยวแกระ	<i>rolB rolC</i>	16	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	4.40
			1	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	4.53
			2	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	4.32
			6	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	15.15
			7	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	7.39
			8	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	6.26
		<i>rolA rolB</i>	9	1	1	1	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	14.27
			10	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	3.88
		<i>rolC</i>	11	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	5.41
			12	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	7.20
			13	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	3.99
			14	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	4.66
			18	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	4.10

ตารางที่ 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	ลักษณะพื้นฐาน	การคงอยู่ ของยีน	สายต้น	จำนวนชุดของยีน			การเกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	ปริมาณสาร Plumbagin (mg/gDW)
				<i>rolA</i>	<i>rolB</i>	<i>rolC</i>		
1	ใบรูปรี ขาว ขอบใบม้วนเป็นริ้วคลื่น ผิวใบขน ค่อนข้างสั้น ลำต้นเดี่ยวแกระ	<i>rolA rolB</i>	20	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	14.13
			21	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	6.80
			22	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	8.00
			24	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	11.24
			26	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	9.42
			27	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	12.43
		<i>rolC</i>	31	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	16.12
			33	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	4.72
			37	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	12.58
			38	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	13.62
			39	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	12.43
			40	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	10.22
			43	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	8.60

ตารางที่ 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	ลักษณะพื้นฐาน	การคงอยู่ ของยีน	สายต้น	จำนวนชุดของยีน			การเกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	ปริมาณสาร Plumbagin (mg/gDW)
				<i>rolA</i>	<i>rolB</i>	<i>rolC</i>		
1	ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นริ้วคลื่น ผิวใบย่น ขั้วถี่ ปล้องสั้น ลำต้นเดี่ยวแกระ	<i>rolA rolB</i> <i>rolC</i>	47	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	
			48	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	8.38
			49	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	10.15
			50	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	9.03
			52	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	5.46
			58	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	9.14
			59	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	9.07
			60	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	6.94
			67	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	13.54
			68	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	7.79
2	ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นคลื่น ผิว ใบย่น ปล้องยาว ลำต้นสูง	<i>rolC</i>	32	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	9.73
			51	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	7.89
		<i>rolB rolC</i>	34	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์ฟิซึม	5.13

ตารางที่ 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	ลักษณะพื้นฐาน	การคงอยู่ ของยีน	สายต้น	จำนวนชุดของยีน			การเกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	ปริมาณสาร Plumbagin (mg/gDW)
				<i>rolA</i>	<i>rolB</i>	<i>rolC</i>		
2	ใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นคลื่น ผิวใบขน ปลายยาว ลำต้นสูง	<i>rolB rolC</i>	44	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	3.748
			46	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	4.72
			64	nd	nd	nd	เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	6.97
		<i>rolA rolB rolC</i>	29	1	1	1	เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	10.53
			36	1	1	1	เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	20.80
			42	1	1	1	เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	18.12
3	ใบรูปรี ขนาดสั้น ผิวใบขน ขอบใบม้วน เป็นคลื่นเฉพาะใบยอด ลำต้นเตี้ยแคระ	<i>rolA rolB</i>	19	1	1	1	ไม่เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	10.44
			23	1	1	1	ไม่เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	5.00
		<i>rolC</i>	30	1	1	1	เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	6.97
4	ใบรูปรี ขนาดสั้น ขอบใบม้วนเป็นริ้ว คลื่น ปลายใบงอจนกระทั่งม้วนกลับ ไปด้านหลังเป็นก้อน ขั้วถี่และปล้อง สั้นมาก ทำให้ต้นกอดกันเป็นกระจุก	<i>rolA rolB rolC</i>	5	1	1	1	ไม่เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	12.12
			25	nd	nd	nd	ไม่เกิดพอลิเมอร์พีซีเอ็ม	4.49

หมายเหตุ nd คือสายต้นที่ไม่ได้ทำการศึกษา

สรุป

1. จากการเพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้จากการปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่จาก hairy root ได้ และเมื่อนำยอดที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ต้นที่เกิดใหม่มีลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไปจากต้นปกติหลายประการที่เด่นชัดคือ ขอบใบม้วนเป็นริ้วคลื่น และเมื่อนำสายต้นดังกล่าวออกปลูกในธรรมชาติยังคงพบความผิดปกติดังกล่าวได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเช่น มีลักษณะผิวใบย่น ขอบใบบิดม้วนเป็นริ้วคลื่น ลำต้นเดี่ยวแคระ ข้อปล้องสั้น ช่อดอกมีขนาดสั้นเป็นกระจุก ดอกมีขนาดเล็ก และมีรากแขนงมากกว่าต้นปกติ ซึ่งลักษณะที่เปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถจัดแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มตามระดับของความผิดปกติที่เกิดขึ้น

2. เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *rolA rolB* และ *rolC* ในจีโนมของพืชโดยวิธี PCR แล้วนำมาเชื่อมโยงกับลักษณะที่ผิดปกติ

กลุ่มที่ 1 ที่มีลักษณะสัณฐานคือใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นคลื่น ผิวใบย่น ข้อถี่ ปล้องสั้น ลำต้นเดี่ยวแคระ มีจำนวน 36 สายต้น ซึ่งในจำนวนนี้ 35 สายต้น มียีน *rolA rolB* และ *rolC* ครบทั้ง 3 ยีน แต่อีก 1 สายต้นมีเพียงยีน *rolB* และ *rolC* เท่านั้น

กลุ่มที่ 2 ที่มีลักษณะสัณฐานคือใบรูปรี ยาว ขอบใบม้วนเป็นคลื่น ผิวใบย่น ปล้องยาว ลำต้นสูง ซึ่งมีความหลากหลายของการคงอยู่ของยีน *rol* โดยพบการคงอยู่ของยีน *rolC* เพียงยีนเดียว 2 สายต้น สายต้นที่มีเพียงยีน *rolB* และ *rolC* มีจำนวน 4 สายต้น และมียีน *rolA rolB* และ *rolC* ครบทั้ง 3 ยีน จำนวน 3 สายต้น

กลุ่มที่ 3 ที่มีลักษณะสัณฐานคือใบรูปรี ขนาดสั้น ผิวใบย่น ขอบใบม้วนเป็นคลื่น เฉพาะใบยอด ลำต้นเดี่ยวแคระ มีจำนวน 3 สายต้น ซึ่งพบการคงอยู่ทั้งยีน *rolA rolB* และ *rolC* ครบทั้ง 3 ยีนในทุกสายต้น

กลุ่มที่ 4 ที่มีลักษณะพื้นฐานคือ ใบรูปรี ขนาดสั้น ขอบใบม้วนเป็นริ้วคลื่น ปลายใบงอจนกระทั่งม้วนกลับไปด้านหลังทำให้เห็นเป็นก้อน ขั้วถี่ และปล้องสั้นมากทำให้ต้นกอดกันเป็นกระจุก พบจำนวน 2 สายต้น และทั้ง 2 สายต้นนี้มียีน *rolA rolB* และ *rolC*

3. การศึกษาจำนวนชุดของยีน *rol* ด้วยเทคนิค Southern hybridization ในสายต้นที่มีการคงอยู่ของยีน *rolA rolB* และ *rolC* ครอบคลุมทั้ง 3 ยีนแต่ลักษณะทางสัณฐานแตกต่างจากต้นอื่น ๆ ที่มียีน *rol* ทั้ง 3 ยีนเช่นเดียวกัน จำนวน 8 สายต้น พบว่าทุกสายต้นที่ตรวจสอบมียีน *rol* แทรกอยู่ในจีโนมพืชที่ถ่ายเข้าไป แต่อาจอยู่ในตำแหน่งที่ต่างกัน เนื่องจากแถบสัญญาณสีดำที่เกิดขึ้นบนแผ่นยีนย่นได้ว่าจีนดีเอ็นเอมีขนาดต่างกัน และพบว่ามี 5 สายต้นที่มีจำนวนชุดของยีน *rolA rolB* และ *rolC* อย่างละ 1 ชุด ส่วนอีก 3 สายต้น มีจำนวนชุดของยีน *rolA rolB* อย่างละ 1 ชุด และยีน *rolC* 2 ชุด โดย 2 สายต้นจากทั้ง 3 สายต้นนี้เป็นต้นที่อยู่ในกลุ่มที่ 3 ที่แสดงลักษณะทางสัณฐานต่างจากกลุ่มอื่นคือ ขอบใบม้วนเป็นคลื่นเฉพาะใบยอด

4. จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP กับสายต้นเจตมูลเพลิงแดงทั้ง 50 สายต้น เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 1,270 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 1,096 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็นพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 174 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน 1 ถึง 15 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็นพอลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 4.9 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 13.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสายต้นที่เกิดพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 19 สายต้น แสดงว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก hairy root นั้นมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม และเมื่อศึกษาสายต้นที่มีการคงอยู่ของยีน *rol* ครอบคลุมทั้ง 3 ยีนแต่มีลักษณะแตกต่างจากต้นอื่น ๆ ที่มียีน *rol* ครอบคลุมทั้ง 3 ยีนเช่นเดียวกันพบว่าจำนวน 4 สายต้น คือ สายต้นที่ 29 30 36 และ 42 ที่มีพอลิมอร์ฟิซึมชัดเจนซึ่งอาจเกิดจากการเข้าแทรกของยีน *rol* ในจีโนมพืชที่ตำแหน่งต่างกันส่งผลให้เกิดการผันแปรทางสัณฐานที่ต่างกันได้

5. จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่ารากที่ได้จากต้นที่พัฒนามาจาก hairy root มีปริมาณสาร plumbagin มากกว่ารากของต้นปกติ โดยรากของต้นปกติจะมีปริมาณสาร plumbagin ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ส่วนสายต้นที่พัฒนามาจาก hairy root ทุกต้นมีปริมาณสาร plumbagin มากกว่าต้นปกติโดยมีปริมาณสารอยู่ในช่วง 4-20 มิลลิกรัมต่อรากแห้ง 1 กรัม นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนรากแขนง มีปริมาณสาร plumbagin มากกว่าในส่วนรากหลัก และเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับผลของการทำ AFLP พบว่าสายต้นที่มีปริมาณสารสูงสุด 2 สายต้นซึ่งมีลักษณะพื้นฐานอยู่ในกลุ่มที่ 2 ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกับต้นอื่นที่มียีน *rol* อยู่เหมือนกัน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต. 2536. ไม้ดอกและไม้ประดับ. ด้านสุทธาการพิมพ์จำกัด, กรุงเทพฯ.

นภคธ จรัสสัมฤทธิ์. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช.
สำนักพิมพ์ร่วมใจ, กรุงเทพฯ.

นันทวัน บุญยะประกัศร และ อรุณ ชัยเจริญพร. 2539. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน.
สำนักพิมพ์ประชาชนจำกัด, กรุงเทพฯ.

นิจศิริ เรืองรังสี. 2547. สมุนไพรไทย เล่ม 1. สำนักพิมพ์ บี เฮลท์ดี, กรุงเทพฯ.

บุษบา จินดาวิจักษณ์ นิวัต ชื่นคุณากร และ พรรณีภา ชุมศรี. 2519. การศึกษาวิธีการ
แยกทดสอบหาประเภทสารและการออกฤทธิ์ต่อสัตว์ทดลองของรากเจตมูลเพลิง
แดง. โครงการพิเศษเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล,
กรุงเทพฯ.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2537. สมุนไพรก้าวหน้าใหม่. ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ ที.
พี.พรินท์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

ภูมิพิชญ์ สุขาวรรณ และ ปรีชา กาบแก้ว. 2536. สมุนไพรใช้เป็นยา. อักษราพิพัฒน์,
กรุงเทพฯ.

รังสิรัตน์ รัตนโกเมศ. 2535. ศึกษา hairy root ของลำโพงกาสลักที่เกิดจากการย้ายยีนจาก
Agrobacterium rhizogenes. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักการเภสัชกรรมไทย. โอ.เอส.
พรินติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.

ศกุนตลา พร้อมมูล. 2548. ผลของสารสกัดจากต้นหยาดน้ำค้างและรากเจตมูลเพลิงแดง
ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv.
citri เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* .
ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนทรี สิงหนุตตรา. 2536. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. โอ.เอส.พรินติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.

สุปรานี บิลยะหิมา และ สุพัตรา แสงทอง. 2542. การศึกษาการสร้างสาร *plumbagin* โดยราก
เพาะเลี้ยงของเจตมูลเพลิงแดง. โครงการงานนักศึกษา. คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *hairy root* ของเจตมูลเพลิงแดง
(*Plumbago indica* L.) เพื่อผลิตสาร *plumbagin*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดี และ
เอเอฟแอลพี. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2541. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสมุนไพรที่
ใช้เป็นยาดองเหล้าในภาคเหนือของประเทศไทย. ข้อมูลวิชาการ. แหล่งที่มา:
<http://www.qsbg.org/project2.asp>. 8 มิถุนายน 2551.

อรสา ชูสกุล. 2543. การผลิตพลาสมาจินในเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว
Plumbago zeylanica L. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

- Abhyankar, G., V.D. Reddy, C.C. Giri, K.V. Rao, V.V.S. Lakshmi, S. Prabhakar, M. Vairamani, B.S. Thippeswamy and P.S. Bhattacharya. 2005. Amplifield fragment length polymorphism and metabolomic profile of hairy root of *Psoralea corylifolia* L. **Phytochem.** 66: 2441-2457.
- Agilent Technologies. 2001. **Agilent Chemstation (Computer Program)**. Agilent Technologies, U.S.A.
- Aldrich, K. J and C. A. Cullis. 1993. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using KlenTaq1 DNA polymerase, chelex 100 and gel purification of genomic DNA. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11: 128-141.
- Altamura, M.M. 2003. *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolD* genes : regulation and involvement in plant development. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 77: 89-101.
- Ambros, P.F., A.J.M. Matzke and M.A. Matzke. 1986. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosome by *in situ* hybridization. **The EMBO J.** 5: 2037-2077.
- Azlan J.G., M. Marziah, M. Radzali and R. Johari. 2002. Establishment of *Physalis minima* hairy root culture for the production of physalins. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 69: 271-278.
- Batra, J., A. Dutta, D. Singh, S. Kumar and J. Sen. 2004. Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left- and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration. **Plant Cell Rep.** 23: 148-154.
- Budavari, S. 1996. **Merck Index Twelfth** . Merck Research Laboratories Division of Merck and Co., Inc., New York.

- Bulgakov, V.P. 2008. Function of *rol* genes in plant secondary metabolite. **Biotechnol. Adv.** 26: 318-324.
- Camilleri, C and L. Jouanin. 1991. The T_r-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. **Mol. Plant Microbe Interact.** 4: 155-162.
- Cardarelli, M., L. Span, D. Mariotti, M.L. Mauro, M.A. Van Sluys and P. Costantino. 1987. The role of auxin in hairy root induction. **Mol. Gen. Genet.** 208: 457-463.
- Carrier, T., K.L. Jones and J.D. Keasling. 1998. mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. **Biotechnol. and Bioen.** 59: 666-672.
- Casanova, E., M.I. Trillas, L. Moysset and A. Vainstein. 2005. Influence of *rol* genes in floriculture. **Biotech. Adv.** 23: 3-39.
- Choi, H.K., Y.H. Choi, M. Verberne, A.W.M. Lefeber, C. Erkelens and R. Verpoorte. 2004a. Metabolic fingerprinting of wild type and transgenic tobacco plants by ¹H NMR and multivariate analysis technique. **Phytochem.** 65: 857-864.
- Choi, P.S., Y.D. Kim, K.M. Choi, H.J. Chung, D.W. Choi and J.R. Liu. 2004b. Plant regeneration from hairy root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. **Plant Cell Rep.** 22: 828-831.
- Christey, M. C. 2001. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 37: 687-700.

- Christensen, B., S. Sriskandarajah, M. Serek and R. Müller. 2008. Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* with *rol* genes is useful in molecular breeding towards compact growth. **Plant Cell Rep.** 27: 687-700.
- Chuakul, W., P. Saralamp and P. Supatarawanich. 1994. Pharmacognostic characters of *Plumbago indica* Linn. **Mahidol J. Pharm.** 21: 126-132.
- Chuntaratin, P. 2006. **Production of plumbagin by hairy root, callus and cell suspension cultures of *Plumbago indica* L.** Ph.D. thesis, Kasetsart University.
- Cola, A.D., P. Costantino and L. Spano. 1996. Cell commitment and *rolB* gene expression in the induction of root differentiation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 46: 203-209.
- Dai, S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R.N. Beachy and C. Fauquet. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Mol. Breed.** 7:25-33.
- Dehio, C., K. Grossmann, J. Schell and T. Schmulling. 1993. Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. **Plant Mol. Biol.** 23: 1199-1210.
- Dinda, B. and G. Chel. 1992. 6-Hydroxyplumbagin, a naphthoquinone from *Plumbago indica*. **Phytochem.** 31: 3652-3653.
- Dinda, B., G. Chel and B. Achari. 1994. A dihydroflavonol from *Plumbago indica*. **Phytochem.** 1994: 1083-1084.

- Durand, R. and M. H. Zenk. 1971. Biosynthesis of plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) *via* the acetate pathway in higher plant. **Tetrahedron Lett.** 52: 3009-3012.
- Dzoyem, J.P., J.G. Tangmouo, D. Lontsi, F.X. Etoa and P.J. Lohoue. 2007. *In vitro* antifungal activity of extract and plumbagin from the stem bark of *Diospyros crassiflora* Hiern (Ebenaceae). **Phytother. Res.** 21: 671-674.
- Finnegan, J. and D. MacElroy. 1994. Transgenic inactivation: plants fight back!. **Bio/technology** 12: 883-888.
- Flippini, F., R. Rossi, O. Martin, M. Trovato, P. Costantino and P.M. Downey. 1996. A plant oncogene as a phosphatase. **Nature** 379: 499-500.
- Giovannini, A., N. Pecchioni and M. Rabaglio. 1997. A characterization of ornamental *Datura* plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **In Vitro Cell Dev. Biol.** 33: 101-106.
- Giri, A., S. T. Ravindra, V. Dhingra and M. L. Narasu. 2001. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. **Current Sci.** 81: 378-382.
- Gomathinayagam, R., S. Sowmyalakshmi, F. Mardhatillah, R. Kumar, M.A. Akbarsha and C. Damodaran. 2008. Anticancer mechanism of plumbagin, a natural compound, on non-small cell lung cancer cells. **Anticancer Res.** 28 :785-792.
- Grant, J.E., E.M. Dommissie and A.J. Conner. 1991. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*, pp 50 - 73. In Murray D.R., ed. **Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology**. CAB International. Wallingford, UK.

- Guivarc'h A., M. Carneiro, F. Vilaine, V. Pautot and D. Chriqui. 1996. Tissue-specific expression of the *rolA* gene mediates morphological changes in transgenic tobacco. **Plant Mol. Biol.** 30: 125-134.
- Hosokawa, K., R. Matsuki, Y. Oikawa and S. Yamamura. 1997. Genetic transformation of gentian using wild-type *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 51: 137-140.
- Hsu, Y.L., C.Y. Cho, P.L. Kuo, Y.T. Huang and C.C. Lin. 2006. Plumbagin (5-Hydroxy-2-methyl-1,4-naphoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation *via* c-Jun NH₂- terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 *in vivo* and *in vitro*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 318: 484-494.
- Ichihara, A., M. Ubukata and S. Sakamura. 1980. Synthesis of plumbagin by the retro-diels-alder reaction. **Agric. Biol. Chem.** 44: 211-213.
- Jouanin, L., P. Guerche, N. Pamboukdjian, C. Tourneur, F. Casse-Delbart and J. Tourneur. 1987. Structure of T-DNA in plants regenerate from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. **Mol. Gen. Genet.** 206: 387-392.
- Kiselev, K.V., A.S. Dubrovina, M.V. Vesalova, V.P. Bulgakov, S.A. Zhuravlev and Y.N. Zhuravlev. 2007. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. **J. Biotechnol.** 128: 681-692.
- Kiyokawa, S., Y. Kikuchi, H. Kamada and H. Harada. 1996. Genetic transformation of *Begonia tuberhybrida* by Ri *rol* genes. **Plant Cell Rep.** 15: 606-609.

- Kohli, A., M. Leech, P. Vain, D.A. Laurie and P. Christou. 1998. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95: 7203-7208.
- Koike, Y., Y. Hoshino, M. Mii and M. Nakano. 2003. Horticultural characterization of *Angelonia salicariifolia* plants transform with wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Cell Rep.** 21: 981-987.
- Kokotovic, B., N.F. Friis., J.S. Jensen. and P. Ahrens. 1999. Amplified fragment length polymorphism fringerprint of Mycoplasma species. **J. Clin. Microbiol.** 37: 3300-3307.
- Labra, M., C. Savini, M. Bracale, N. Pelucchi, L. Colombo, M. Bardini and F. Sala. 2001. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Rep.** 20: 325-330.
- Lacroix, B., T. Tzfira, A. Vainstein and V. Citovsky. 2006. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. **Trends Genet.** 22: 29-37.
- Lee, M. H., E. S. Yoon and Y. E. Choi. 2004. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. **Plant Cell Rep.** 22: 822-827.
- Lee, S.H., N.W. Blackhall, J.B. Power, E.C. Cocking, D. Tepfer and M.R. Davey. 2001. Genetic and morphological transformation of rice with the *rolA* gene from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Sci.** 161: 917-925.

- Likhitwitayawuid, K., R. Kaewamatawong, N. Ruangrunsi and J. Krungkrai. 1998. Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. **Planta Med.** 64: 237-241.
- Limami, M.A., L.Y. Sun, C. Douat, J. Helgeson and D. Tepfer. 1998. Natural genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Physiol.** 118: 543-550.
- Liu, C., J. Zhu, Z. Liu, L. Li, R. Pan and L. Jin. 2002. Exogenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy roots of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. **Plant Growth Regul.** 38: 37-43.
- Lorence, A., F. Medina-Bolivar and C. L. Nessler. 2003. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots. **Plant Cell Rep.** 22: 437-441.
- Maria, S.C., V.D. Busto, P.S. Gonzalez, M.I. Medina, S. Milrad and E. Agostini. 2008. Application of *Brassica napus* hairy root cultures for phenol removal from aqueous solutions. **Chemosphere** 72: 1035-1042.
- Masika, D.K., A. Tait and C.M.R. Turner. 2000. Amplified restriction fragment length polymorphism in parasite genetics. **Parasitol. Today** 16: 350-353.
- Maurel, C., J. Brevet, H. Barbier-Brygoo, J. Guern and J. Temp. 1990. Auxin regulates the promoter of the root-inducing *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* in transgenic tobacco. **Mol. Gen. Genet.** 223: 58-64.
- Mauro M.L., M. Trovato, A.D. Paolis, A. Gallelli, P. Costantino, M.M. Altamura. 1996. The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants. **Dev. Biol.** 180: 693-700.

Mercuri, A., L. De Benedetti, S. Bruna, R. Bregliano, C. Bianchini and G. Foglia. 2003.

Agrobacterium- mediated transformation with *rol* genes of *Lilium longiflorum*

Thunb. The 21th International Symposium on Classical versus Molecular

Breeding of Ornamentals. **Acta Hort.** 612: 129-136.

Michael, T. and A. Spina. 1995. The plant oncogenes *rolA*, *rolB* and *rolC* from

Agrobacterium rhizogenes : Effect on morphology, development and hormone

metabolism. pp. 207-222. In Gartland, K.M.A and M.R. Davey, eds.

Agrobacterium Protocols. Human Press Inc. New Jersey , USA.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with

tobacco tissue culture. **Physiol. Plant** 15: 473-497.

Nishikawa, K. and K. Ishimaru. 1997. Flavonoids in root cultures of *Scutellaria*

baicalensis. **J. Plant Physiol.** 151: 633-636.

Palazon, J., R.M. Cusido, C. Roig and M.T. Piol. 1997. Effect of *rol* genes from

Agrobacterium rhizogenes TL-DNA on nicotine production in tobacco root

culture. **Plant Physiol Biochem.** 35: 155-162.

_____. 1998. Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots

and their regenerated plants. **Plant Cell Rep.** 17: 384-390.

Panichayupakaranant, P. and S. Tewtrakul. 2002. Plumbagin production by root cultures of

Plumbago rosea. **Electronic J. Biotech.** 5: 228-232.

Piatczak, E., A. Krolicka and H. Wysokinska. 2006. Genetic transformation of *Centaureum*

erythraea Rafn. by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of secoiridoids.

Plant Cell Rep. 25: 1308-1315.

- Pinol, M.T. and J. Palazon. 1996. Effects of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* on growth and hyoscyamine production in *Datura stramonium* root culture. **XDCE**. 109: 133-138.
- Powolny, A. A. and S.V. Singh. 2008. Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species. **Pharm. Res.** 25: 2171-2180.
- Rhodes, M.J.C., R.J. Robins, J.D. Hamill, A.J. Parr, M.G. Hilton and N.J. Walton. 1990. Properties of transformed root cultures, pp. 202-224. In B.V. Charlwood and M.J.C. Rhodes, eds. **Proceeding of the Phytochemical Society of Europe: Secondary Products from Plant Tissue Culture**, England.
- Roessner, U., A. Leudemann, D. Brust, O. Fiehn, T. Linke, L. Willmitzer and A.R. Fernie. 2001. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **Plant Cell** 13: 11-29.
- Rosati, A., P. Bogani and M. Buiatti. 2005. Genomic instability in *Nicotiana* transgenic olants detected by AFLP analysis, In **Proceeding of the XLIX Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Potenza**, Italy.
- Sakamoto, S., W. Putalan, R. Tsuchihashi, S. Sakamoto, W. Putalan, R. Tsuchihashi, S. Morimoto, J. Kinjo and H. Tanaka. 2007. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using highly-specific monoclonal antibodies against plumbagin. **Analytica. Chimica. Acta.** 607: 100-105.
- Schmulling T, J. Schell and A. Spena. 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. **Embo J.** 7: 2621-2629.

- Sevón, N. and K. M. Oksman-Caldentey. 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. **Planta Med.** 68: 859-860.
- Shi, H.P. and S. Kintzios. 2003. Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. **Plant Cell Rep.** 21: 1103-1107.
- Shkryl, Y.N., G.N. Veremeichik, V.P. Bulgakov, G.K. Tchernoded, N.P. Mischenko, S.A. Fedoreyev and Y.N. Zhuravlev. 2007. Individual and combined effects of the *rolA rolB* and *rolC* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. **Biotechnol. Bioeng.** 100: 118-125.
- Srivastava, P. S. 1998. **Plant Tissue Culture and Molecular Biology : Application and Prospect.** Narosa Publishing House, New Delhi.
- Subroto, M. A., N. Artanti, D. Sudrajat, A. Djanakum and E. Widayat. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Solanum nigrum* L.: spontaneous plant regeneration and endogenous IAA contents. **Ind. J. Agri. Sci.** 1: 53-59.
- Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. **Physiol. Plant** 79: 140-146.
- Thimmaraju, R., L. Venkatachalam and N. Bhagyalakshmi. 2008. Morphometric and biochemical characterization of red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots obtained after single and double transformations. **Plant Cell Rep.** 27: 1039-1052.
- Van der Hoeven, C., A. Dietz and J. Landsmann. 1994. Variability of organ-specific gene expression in transgenic tobacco plants. **Transgenic Res.** 3: 159-165.

- Vermeulen, N. 1998. **The Complete Encyclopedia of Container Plants.** Rebo International, Netherlands.
- Vos, P., R. Hoger, M. Bleeker, M. Reijans, Theo van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acid Res.** 23: 4407-4414.
- Wang, J.H., R.J. Rose and B.I. Donaldson. 1996. *Agrobacterium*-mediated Transformation and Expression of Foreign Genes in *Medicago truncatula*. **Aust. J. Plant Physiol.** 23: 265-270.
- Welander, M., L. H. Zhu and X.Y. Li. 2003. Transformation of dwarfing apple and pear rootstock with the *rolB* gene and its influence on rooting and growth. **Acta Hort.** 521: 133-138.
- White, F.F., B.H. Taylor, G.A. Huffman, M.P. Gordon and E.W. Nester. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. **J. Bacteriol.** 164: 33-44.
- Willmitzer, L., J. Sanchez-Serrano, E. Bushfield and J. Schell. 1982. DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissue. **Mol. Gen. Genet.** 186: 16-22.
- Winefield, C., D. Lewis, S. Arathoon and S. Deroles. 1999. Alteration of Petunia plant form through the introduction of the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. **Mol. Breed.** 5: 543-551.
- Wungsintaweekul, B. 2006. **Estrogenic-like compounds from some *Pueraria candollei* varieties and cell culture.** M.S. thesis, Chulalongkorn University.

- Yang, D.C. and Y.E. Choi. 2000. Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Panax ginseng*. **Plant Cell Rep.** 19: 491-496.
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr and H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 89-103.
- Yu, K.W., W. Gao, E.J. Hahn and K.Y. Peak. 2002. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. **Biochem. En. J.** 11: 211-215.
- Zhao, Y.L. and D.P. Lu. 2006. Effect of plumbagin on the human acute promyelocytic leukemia cells *in vitro*. **China J. Chinese Material Medica.** 14: 208-211.
- Zhu, L.H., X.Y. Li., A. Ahlman and M.Welander . 2003. The rooting ability of dwarfing pear rootstock BP10030 (*Pyrus communis*) was significantly increase by introduction of the *rolB* gene. **Plant Sci.** 165: 829-835.

ภาคผนวก

การตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *rolC*

1. การสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนเพื่อนำไปตรวจสอบลำดับเบสของยีน *rolA rolB* และ *rolC*

การสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *rolA rolB* และ *rolC* จากดีเอ็นเอของพืชที่ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* กับไพรเมอร์ที่จำเพาะด้วยเทคนิค PCR เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดตรวจสอบผลโดยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้กาวโรสความเจลเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ แยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย สารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation แล้วแยก ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจลออกาโรส

2. การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจลออกาโรสโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (บริษัท QIAGEN)

ตัดเจลตรงตำแหน่งที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยยีน *rolA* ตัดที่ตำแหน่ง 248 bp ยีน *rolB* ตัดที่ตำแหน่ง 495 bp และ *rolC* ตัดที่ตำแหน่ง 480 bp ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ชั่งน้ำหนัก เจลที่ได้แล้วเติมบัฟเฟอร์ QG 3 เท่าของน้ำหนักเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนเจล ละลายหมด เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายลงสู่ QIAquick spin column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม บัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที หมุนเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที อีกครั้งเพื่อกำจัดเอธานอลในบัฟเฟอร์ PE ออกให้หมด ย้าย QIAquick spin column ไปวางบนเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB (10Mm Tris-HCl pH 8.5) ตั้งทิ้ง 1 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ที่ต้องการ

3. การเชื่อมชิ้นส่วนของยีนกับพลาสมิด (ligation reaction)

โดยนำชิ้นส่วนของยีน *rol* ที่แยกจากเจลออกาโรสมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-T Easy Vector System โดยทำปฏิกิริยาดังตารางผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ 1 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิด

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
2X Rapid ligation buffer	4
pGEM [®] -T Easy Vector (50 ng)	1
PCR product	4
T4 DNA ligation (3 Weiss Units/μl)	1
รวม	10

4. การนำพลาสมิดเข้าสู่ competent cell (Transformation)

4.1 การเตรียม competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ในอาหาร LB broth 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปเลี้ยงต่อในอาหาร SOB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.2-0.4 บ่มที่น้ำแข็งนาน 15 นาที ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์เบาๆ ด้วยสารละลาย RF1 (10 mM KCl 50 mM MnCl₂·4H₂O 30 mM K-acetate 10 mM CaCl₂ 15% glycerol pH 5.8) ปริมาตร 1/3 เท่าของปริมาตร SOB บ่มบนน้ำแข็งนาน 15 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารทิ้ง ละลายเซลล์ตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย RF2 (10 mM MOPS 10 mM KCl 75 mM CaCl₂ 15% glycerol pH 6.8) ปริมาตร 1/25 เท่าของปริมาตร SOB แบ่ง competent cell ที่ได้ใส่หลอดเซนตริฟิวส์ที่เย็นหลอดละ 100 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงก่อนใช้ ส่วนที่

เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในการเตรียม competent cell ต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา

4.2 การนำพลาสมิดเข้าสู่ competent cell

นำพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของยีน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มี competent cell 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที และให้ความร้อนทันที (heat shock) โดยจุ่มลงในน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที 500 ไมโครลิตร และนำไปบ่มใน shaker incubator ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำสารละลายเซลล์แบคทีเรีย 200 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารสูตร LB ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือก colony สีขาวซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการ transformation มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในเครื่อง shaker incubator ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการสกัดพลาสมิด

5. การสกัดพลาสมิดโดยวิธีของ QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (บริษัท QIAGEN)

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผสม ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 (Resuspension buffer: 50 mM Tris-HCl 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร EDTA RNaseA 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วย้ายลงสู่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติimbัฟเฟอร์ P2 (Lysis buffer: 200 mM NaOH 1%SDS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาอย่างเบาๆ 4-6 ครั้ง เติimbัฟเฟอร์ N3 (Neutralization buffer: 3M potassium acetate pH5.5)นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ย้ายส่วนใสด้านบนสู่ QIAprep spin

column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 30-60 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PB (Equilibration buffer: 750 mM NaCl 50 mM MOPS pH 7.0 15% isopropanol 0.15% Triton X-100) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 30-60 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE (1 mM NaCl 50 mM MOPS pH 7.0 15% isopropanol) เพื่อล้าง QIAprep spin column ปริมาตร 750 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาทีอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ยังเหลือออกให้หมด ช้าย QIAprep spin column วางบนไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์ EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) หรือน้ำปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที สามารถทำซ้ำได้ถ้าคาดว่าจะยังมีพลาสมิดดีเอ็นเอเหลืออยู่บนเมมเบรน

6. การวิเคราะห์ลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

วิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด โดยบริษัท Macrogen Korea และนำลำดับเบสที่ได้แต่ละยีนมาเปรียบเทียบกับยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ซึ่งได้จากฐานข้อมูลของ GenBank เปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม GENEDOC

7. ผลการตรวจสอบลำดับเบสของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC*

เมื่อนำชิ้นส่วนของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ของพืชที่ปลูกเชื้อ *R. rhizogenes* และเชื่อมต่อกับพลาสมิดไปวิเคราะห์หาลำดับเบส พบว่ามีขนาด 248 คู่เบส 495 คู่เบส และ 480 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งแสดงลำดับเบสไว้ดังภาพที่ 10 11 และ 12 ตามลำดับ เมื่อนำลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีนทั้งสามมาเปรียบเทียบกับยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ของ *R. rhizogenes* ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม GENEDOC ผลการเปรียบเทียบพบว่าชิ้นส่วนของยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* มีลำดับเบสเหมือนกับยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ของ *R. rhizogenes* ในฐานข้อมูล ดังนั้น primer ที่สังเคราะห์ขึ้นมาสามารถนำไปใช้ในการศึกษาการคงอยู่ของยีนได้ และสามารถยืนยันได้ว่ายีนที่เข้าไปแทรกในจีโนมพืชคือยีน *rolA* *rolB* และ *rolC* ของ *R. rhizogenes*

```

          1280          *          1300          *          1320
rolA_1 : CGTTGTCGGAATGGCCCAGACCTTTGGAGAGGCCTCGCTCGTTGTCTCCGACC : 102
rolA_2 : CGTTGTCGGAATGGCCCAGACCTTTGGAGAGGCCTCGCTCGTTGTCTCCGACC : 100
rolA_3 : CGTTGTCGGAATGGCCCAGACCTTTGGAGAGGCCTCGCTCGTTGTCTCCGACC : 98
R. rhizogen : CGTTGTCGGAATGGCCCAGACCTTTGGAGAGGCCTCGCTCGTTGTCTCCGACC : 1324
              CGTTGTCGGAATGGCCCAGACCTTTGGAGAGGCCTCGCTCGTTGTCTCCGACC

          *          1340          *          1360          *          13
rolA_1 : TATTTGCGCGGGCTAAGGTCAAGAAGAAGAAGGCCAAACGTGTGTGCGCCGGGC : 155
rolA_2 : TATTTGCGCGGGCTAAGGTCAAGAAGAAGAAGGCCAAACGTGTGTGCGCCGGGC : 153
rolA_3 : TATTTGCGCGGGCTAAGGTCAAGAAGAAGAAGGCCAAACGTGTGTGCGCCGGGC : 151
R. rhizogen : TATTTGCGCGGGCTAAGGTCAAGAAGAAGAAGGCCAAACGTGTGTGCGCCGGGC : 1377
              TATTTGCGCGGGCTAAGGTCAAGAAGAAGAAGGCCAAACGTGTGTGCGCCGGGC

          80          *          1400          *          1420          *
rolA_1 : GATTTCCCTCCCTGACCAAATTGCAGAGCTTGATGATCTGAGCGTCACTCCTCT : 208
rolA_2 : GATTTCCCTCCCTGACCAAATTGCAGAGCTTGATGATCTGAGCGTCACTCCTCT : 206
rolA_3 : GATTTCCCTCCCTGACCAAATTGCAGAGCTTGATGATCTGAGCGTCACTCCTCT : 204
R. rhizogen : GATTTCCCTCCCTGACCAAATTGCAGAGCTTGATGATCTGAGCGTCACTCCTCT : 1430
              GATTTCCCTCCCTGACCAAATTGCAGAGCTTGATGATCTGAGCGTCACTCCTCT

          1440          *          1460          *          1480
rolA_1 : GGCTATAACTTCTCCTGGGCCTCCCGTGATGGTCAATGATCACGGAATTGCCA : 261
rolA_2 : GGCTATAACTTCTCCTGGGCCTCCCGTGATGGTCAATGATCACGGAATTGCCA : 259
rolA_3 : GGCTATAACTTCTCCTGGGCCTCCCGTGATGGTCAATGATCACGGAATTGCCA : 257
R. rhizogen : GGCTATAACTTCTCCTGGGCCTCCCGTGATGGTCAATGATCACGGAATTGCCA : 1483
              GGCTATAACTTCTCCTGGGCCTCCCGTGATGGTCAATGATCACGGAATTGCCA

          *          1500          *          1520          *          1
rolA_1 : CGAGGGGACGCTTTGTGCTGGACCGGAATATTAGACCTACG----- : 304
rolA_2 : CGAGGGGACGCTTTGTGCTGGACCGGAATATTAGACCTACG----- : 302
rolA_3 : CGAGGGGACGCTTTGTGCTGGACCGGAATATTAGACCTACG----- : 300
R. rhizogen : CGAGGGGACGCTTTGTGCTGGACCGGAATATTAGACCTACG----- : 1526
              CGAGGGGACGCTTTGTGCTGGACCGGAATATTAGACCTACG

```

ภาพผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rolA* (*rolA_1* คือลำดับเบสของยีน *rolA* ของสายต้นที่ 22 *rolA_2* คือลำดับเบสของยีน *rolA* ของสายต้นที่ 38 *rolA_3* คือลำดับเบสของยีน *rolA* ของสายต้นที่ 42 *R. rhizogenes* คือลำดับเบสของยีน *rolA* ใน *R. rhizogenes* จากฐานข้อมูลของ GeneBank)

```

*           120           *           140           *           160
rolB_1      : TTTCCAGAAAAGGTGGGCCCAAGGCGTGCTTGATTTGGAGGAAAACCGTCCGCC : 100
rolB_2      : TTTCCAGAAAAGGTGGGCCCAAGGCGTGCTTGATTTGGAGGAAAACCGTCCGCC : 101
rolB_3      : TTTCCAGAAAAGGTGGGCCCAAGGCGTGCTTGATTTGGAGGAAAACCGTCCGCC : 99
R rhizogen  : TTTCCAGAAAAGGTGGGCCCAAGGCGTGCTTGATTTGGAGGAAAACCGTCCGCC : 162
              TTTCCAGAAAAGGTGGGCCCAAGGCGTGCTTGATTTGGAGGAAAACCGTCCGCC

*           180           *           200           *
rolB_1      : GGTGGTCATACTTAAACAATCTGGCCCATACTTCTAAAAAACAAAGTATGTTAT : 154
rolB_2      : GGTGGTCATACTTAAACAATCTGGCCCATACTTCTAAAAAACAAAGTATGTTAT : 155
rolB_3      : GGTGGTCATACTTAAACAATCTGGCCCATACTTCTAAAAAACAAAGTATGTTAT : 153
R rhizogen  : GGTGGTCATACTTAAACAATCTGGCCCATACTTCTAAAAAACAAAGTATGTTAT : 216
              GGTGGTCATACTTAAACAATCTGGCCCATACTTCTAAAAAACAAAGTATGTTAT

220           *           240           *           260           *
rolB_1      : CATCCCCCATGCTTGTGCGATCAACCGGATTTGGCCAGAGAAAACGACCGACAT : 208
rolB_2      : CATCCCCCATGCTTGTGCGATCAACCGGATTTGGCCAGAGAAAACGACCGACAT : 209
rolB_3      : CATCCCCCATGCTTGTGCGATCAACCGGATTTGGCCAGAGAAAACGACCGACAT : 207
R rhizogen  : CATCCCCCATGCTTGTGCGATCAACCGGATTTGGCCAGAGAAAACGACCGACAT : 270
              CATCCCCCATGCTTGTGCGATCAACCGGATTTGGCCAGAGAAAACGACCGACAT

280           *           300           *           320
rolB_1      : GTATTTGTCTATCTATCTCGCGAGAAGATGCAGAAAGTACTGGAGGAAAAATCC : 262
rolB_2      : GTATTTGTCTATCTATCTCGCGAGAAGATGCAGAAAGTACTGGAGGAAAAATCC : 263
rolB_3      : GTATTTGTCTATCTATCTCGCGAGAAGATGCAGAAAGTACTGGAGGAAAAATCC : 261
R rhizogen  : GTATTTGTCTATCTATCTCGCGAGAAGATGCAGAAAGTACTGGAGGAAAAATCC : 324
              GTATTTGTCTATCTATCTCGCGAGAAGATGCAGAAAGTACTGGAGGAAAAATCC

*           340           *           360           *           3
rolB_1      : ATCACGTTTGGATTAGAGCGCCGCTGCTGGCGACCACGATGCAACCTATCGTAG : 316
rolB_2      : ATCACGTTTGGATTAGAGCGCCGCTGCTGGCGACCACGATGCAACCTATCGTAG : 317
rolB_3      : ATCACGTTTGGATTAGAGCGCCGCTGCTGGCGACCACGATGCAACCTATCGTAG : 315
R rhizogen  : ATCACGTTTGGATTAGAGCGCCGCTGCTGGCGACCACGATGCAACCTATCGTAG : 378
              ATCACGTTTGGATTAGAGCGCCGCTGCTGGCGACCACGATGCAACCTATCGTAG

80           *           400           *           420           *
rolB_1      : CGACCTCGTCCTCCAGGAGATGGTTCGATGCTCACAACATTGCTTGGCCGCACC : 370
rolB_2      : CGACCTCGTCCTCCAGGAGATGGTTCGATGCTCACAACATTGCTTGGCCGCACC : 371
rolB_3      : CGACCTCGTCCTCCAGGAGATGGTTCGATGCTCACAACATTGCTTGGCCGCACC : 369
R rhizogen  : CGACCTCGTCCTCCAGGAGATGGTTCGATGCTCACAACATTGCTTGGCCGCACC : 432
              CGACCTCGTCCTCCAGGAGATGGTTCGATGCTCACAACATTGCTTGGCCGCACC

440           *           460           *           480
rolB_1      : GCCGCGTGGAAGTAACCTGATCTGGAAGGTTTTAATCGCCATTTTTGCAAGTAC : 424
rolB_2      : GCCGCGTGGAAGTAACCTGATCTGGAAGGTTTTAATCGCCATTTTTGCAAGTAC : 425
rolB_3      : GCCGCGTGGAAGTAACCTGATCTGGAAGGTTTTAATCGCCATTTTTGCAAGTAC : 423
R rhizogen  : GCCGCGTGGAAGTAACCTGATCTGGAAGGTTTTAATCGCCATTTTTGCAAGTAC : 486
              GCCGCGTGGAAGTAACCTGATCTGGAAGGTTTTAATCGCCATTTTTGCAAGTAC

*           500           *           520           *           540
rolB_1      : CTTGTTTCATTACCTGCTGGAGTTAAAAGTGACAAATGTGTACGGCAGGGAGGT : 478
rolB_2      : CTTGTTTCATTACCTGCTGGAGTTAAAAGTGACAAATGTGTACGGCAGGGAGGT : 479
rolB_3      : CTTGTTTCATTACCTGCTGGAGTTAAAAGTGACAAATGTGTACGGCAGGGAGGT : 477
R rhizogen  : CTTGTTTCATTACCTGCTGGAGTTAAAAGTGACAAATGTGTACGGCAGGGAGGT : 540
              CTTGTTTCATTACCTGCTGGAGTTAAAAGTGACAAATGTGTACGGCAGGGAGGT

*           560           *           580           *
rolB_1      : TAGCCTGCACCTTTCTTCGTGCGGCAAGGCACTGGAAACCGCCTCCTATGACGT : 532
rolB_2      : TAGCCTGCACCTTTCTTCGTGCGGCAAGGCACTGGAAACCGCCTCCTATGACGT : 533
rolB_3      : TAGCCTGCACCTTTCTTCGTGCGGCAAGGCACTGGAAACCGCCTCCTATGACGT : 531
R rhizogen  : TAGCCTGCACCTTTCTTCGTGCGGCAAGGCACTGGAAACCGCCTCCTATGACGT : 594
              TAGCCTGCACCTTTCTTCGTGCGGCAAGGCACTGGAAACCGCCTCCTATGACGT

600           *           620           *           640
rolB_1      : CATTGCTTGCGGCATCAC----- : 550
rolB_2      : CATTGCTTGCGGCATCAC----- : 551
rolB_3      : CATTGCTTGCGGCATCAC----- : 549
R rhizogen  : CATTGCTTGCGGCATCAC----- : 612
              CATTGCTTGCGGCATCAC

```

ภาพผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rolB* (*rolB_1* คือลำดับเบสของยีน *rolB* ของสายต้นที่ 22 *rolB_2* คือลำดับเบสของยีน *rolB* ของสายต้นที่ 38 *rolB_3* คือลำดับเบสของยีน *rolB* ของสายต้นที่ 42 *R. rhizogenes* คือลำดับเบสยีน *rolA* ของ *R. rhizogenes* จากฐานข้อมูลของ GeneBank)

```

*      4020      *      4040      *      4060      *      4080
rolC_1      : CGTCCAGCGATGAGCTAAAGAAACACATCCAGGGCGCCTCAAAGGAGCGGACCCCCCTGACGGAGCCGGGTGAGGGCCAG : 96
R.rhizogen  : CGTCCAGCGATGAGCTAAAGAAACACATCCAGGGCGCCTCAAAGGAGCGGACCCCCCTGACGGAGCCGGGTGAGGGCCAG : 4080
              CGTCCAGCGATGAGCTAAAGAAACACATCCAGGGCGCCTCAAAGGAGCGGACCCCCCTGACGGAGCCGGGTGAGGGCCAG

*      4100      *      4120      *      4140      *      4160
rolC_1      : TCGATGGATGTTGACGAAGAGGGCGGTGCGCAAGACCCTGGGATACTGTACCTCTACGTCGATTGCCCGACGATGATGCG : 176
R.rhizogen  : TCGATGGATGTTGACGAAGAGGGCGGTGCGCAAGACCCTGGGATACTGTACCTCTACGTCGATTGCCCGACGATGATGCG : 4160
              TCGATGGATGTTGACGAAGAGGGCGGTGCGCAAGACCCTGGGATACTGTACCTCTACGTCGATTGCCCGACGATGATGCG

*      4180      *      4200      *      4220      *      4240
rolC_1      : ATGCTTTTATGGAGGGTCTTTGCCCTACAATTCCACGCACGGCGCGCTCATCACCAATCTTCCACCATACCAGAAAGATG : 256
R.rhizogen  : ATGCTTTTATGGAGGGTCTTTGCCCTACAATTCCACGCACGGCGCGCTCATCACCAATCTTCCACCATACCAGAAAGATG : 4240
              ATGCTTTTATGGAGGGTCTTTGCCCTACAATTCCACGCACGGCGCGCTCATCACCAATCTTCCACCATACCAGAAAGATG

*      4260      *      4280      *      4300      *      4320
rolC_1      : TAAGTCTCGGTGAGGTGTGCAGGGGGCTTAGGCAGGCATCAGGATTCTTTGGATACTAGGATGTTATCCGGAGCGCCTAC : 336
R.rhizogen  : TAAGTCTCGGTGAGGTGTGCAGGGGGCTTAGGCAGGCATCAGGATTCTTTGGATACGAGGATGTTATCCGGAGCGCCTAC : 4320
              TAAGTCTCGGTGAGGTGTGCAGGGGGCTTAGGCAGGCATCAGGATTCTTTGGATAC AGGATGTTATCCGGAGCGCCTAC

*      4340      *      4360      *      4380      *      4400
rolC_1      : TTCGCCGCACCTTTCTGTCCCCGGGTACTTCGTCAAGCTGGATGGGCAGATGGAACCTCAACAAAGGAAAGTCTCT : 416
R.rhizogen  : TTCGCCGCACCTTTCTGTCCCCGGGTACTTCGTCAAGCTGGATGGGCAGATGGAACCTCAACAAAGGAAAGTCTCT : 4400
              TTCGCCGCACCTTTCTGTCCCCGGGTACTTCGTCAAGCTGGATGGGCAGATGGAACCTCAACAAAGGAAAGTCTCT

*      4420      *      4440      *      4460      *      4480
rolC_1      : GACCTTCGACCTTTATGCCAGCAACCA----- : 443
R.rhizogen  : GACCTTCGACCTTTATGCCAGCAACCA----- : 4427
              GACCTTCGACCTTTATGCCAGCAACCA

```

ภาพผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rolC* (*rolC_1* คือลำดับเบสของยีน *rolC* ของสายต้นที่ 22 *R. rhizogenes* คือลำดับเบสยีน *rolA* ของ *R. rhizogenes* จากฐานข้อมูลของ GeneBank)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวชนากานต์ ลักษณะ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	5 มีนาคม 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดพัทลุง
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2548 สาขาทรัพยากรเกษตรชีวภาพ คณะทรัพยากรธรรมชาติและ อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

