รายงานฉบับสมบูรณ์

การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glaba* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ

In Vitro Culture of Licorice (*Glycyrrhiza glaba* L.) Root for Secondary Metabolite Production

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2556

จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

รายงานฉบับสมบูรณ์

การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glaba* L.) ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ

In Vitro Culture of Licorice (*Glycyrrhiza glaba* L.) Root for Secondary Metabolite Production

ที่ปรึกษาโครงการ

ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง

หัวหน้าโครงการ

ดร.วิภารัตน์ พิทักษ์ด่านธรรม (ชำนาญการ)

ผู้ร่วมโครงการ

นายดำรงศักดิ์ อายุวนานนท์

นางสาววิลาสินี กวีกิจธรรมกุล

ดร. เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์

มกราคม 2559

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2556

จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยปีที่ 1 นี้ รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2556 ขอขอบคุณคณะกรรมการติดตามและประเมินผลโครงการที่ช่วยเสนอแนะ และให้คำแนะนำในการดำเนินการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยประสานงานและอำนวยความสะดวกต่างๆ ซึ่งคณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

มกราคม 2559

ชื่อโครงการ **การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glaba* L.) ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ**
In Vitro Culture of Licorice (*Glycyrrhiza glaba* L.) Root for Secondary Metabolite Production

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย
ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2579-1026

หัวหน้าโครงการ
ดร.วิภารัตน์ พิทักษ์ด่านธรรม (ชำนาญการ)
ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออุตสาหกรรม ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8600-3

ผู้ร่วมโครงการ

นายดำรงศักดิ์ อายุวนานนท์
ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8600-3

นางสาววิลาสินี กวีกิจธรรมกุล
ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออุตสาหกรรม ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8600-3 ต่อ 301

ดร. เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์
หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120 โทรศัพท์และโทรสาร 02-5646700

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2556 จำนวน 419,000.00 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน ปี) กรกฎาคม 2556

บทคัดย่อ

ชะเอมเทศเป็นพืชที่มีศักยภาพในการสร้าง และสะสมสารสำคัญทางชีวภาพ ด้วยมีการสะสมสารในกลุ่ม glycyrrhizin ในส่วนของลำต้น และราก แต่เนื่องจากชะเอมเทศไม่สามารถปลูกเลี้ยงได้ในสภาพภูมิอากาศประเทศไทย การศึกษาวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้สามารถผลิตสารสำคัญดังกล่าวได้ รายงานผลการวิจัย ปีที่1 ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคในการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ รวมถึงการทดลองถ่ายยีนที่มีผลในการกระตุ้นให้พืชมีการสร้างรากฝอยจำนวนมาก อีกทั้งมีการสร้างและสะสมสารสำคัญทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น เริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดชะเอมเทศพบว่า วิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดชะเอมเทศคือ แช่เมล็ดในเอทานอล 70% นาน 1 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite 10% ร่วมกับ tween-20 0.02% นาน 10 ถึง 20 นาที การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดยอดใหม่จำนวนมากโดยทำการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ BAP kinetin และ TDZ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP 1 2 หรือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดชะเอมเทศมีการสร้างยอดใหม่สูงสุด คือ 3.44 3.56 และ 3.00 ยอด ที่ระยะเวลา 30 วัน ยอดชะเอมเทศสามารถเกิดรากได้ 100% เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA หรือ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการทดลองถ่ายยีน *rolABC* เข้าสู่ส่วนของ ราก ใบ และลำต้นชะเอมเทศ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พลาสมิด pEXM120 เบื้องต้นพบว่ามีเฉพาะส่วนของรากที่สามารถสร้างรากใหม่ที่มียีน *rolABC* การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงรากในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี GA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รากชะเอมเทศมีการสร้างรากฝอยใหม่ดีที่สุด โดยเมื่อเลี้ยงในสภาพมืด รากเดิมมีการสร้างรากฝอยได้ดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง เมื่อทำการทดลองถ่ายยีน *rolABC* โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ A13 พบว่าส่วนของลำต้นที่มีการสร้างบาดแผลโดยวิธีการจิ้ม สามารถสร้างรากฝอยได้ดีที่สุด และรากฝอยที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที จากการวิเคราะห์รากชะเอมเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อทั้งรากที่ได้รับการถ่ายยีน และรากที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค HPLC เบื้องต้นพบว่ารากทั้งสองชนิดมีการสะสมสาร glycyrrhizin ซึ่งยังต้องศึกษาเชิงลึกต่อไปเพื่อทราบองค์ประกอบทางเคมีของสารทุติยภูมิอื่น ๆจากสารสกัดรากชะเอมเทศ พร้อมทั้งเปรียบเทียบปริมาณสาร glycyrrhizin จากรากชะเอมเทศที่มีการถ่ายยีนและไม่มีการถ่ายยีน เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรในสภาพปลอดเชื้อ และการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ชะเอมเทศ การเพาะเลี้ยงราก การถ่ายยีน

Abstract

Licorice (*Glycyrrhiza glaba* L.) is a potential plant for producing and accumulating of secondary metabolites, glycyrrhizin, in stem and root. Since licorice cannot be grown in Thailand, the study of licorice root culture for producing secondary metabolites is an alternative method. In the first year, report is aimed to study the *in vitro* propagation of licorice, genes transferred of *rolABC* to induce hairy root, and increase accumulation of secondary metabolites. Licorice seeds were initiated by surface sterilization. The suitable procedure is soaked in 70% ethanol, for 1 minute, and shaked in 10% sodium hypochlorite combined with 0.02% tween-20 for 10 or 20 minutes. To establish shoots in multiplication medium, MS medium supplemented with BAP, kinetin and TDZ were used. The shoot multiplication medium supplemented with 1.0 2.0 and 3.0 mg/L BAP gave the highest shoot formation number, 3.44 3.56 and 3.00 shoots, within 30 days. Roots were produced 100% from shoots on MS medium without hormone, or supplemented with 1 mg/L IBA or IAA. The *rolABC* gene was transferred to root leaf and stem via *Agrobacterium tumefaciens* stain EHA105 with plasmid pEXM120. Preliminary result showed that, new roots harboring *rolABC* was obtained from only initial root. *In vitro* cultured of licorice roots produced maximum hairy roots in liquid MS medium supplemented with 0.5 mg/L GA and 1 mg/L IAA. Root production in darkness was slightly better in light condition. *Agrobacterium rhizogenes* A13 were used for transferred *rolABCD*. The result showed that, making wound on the stem for gene transfer produced the highest of hairy root and the maximum hairy root was found in liquid MS medium supplemented with 40 g/L sucrose on shaker at 60 rpm. HPLC analysis, glycyrrhizin was found from crude extracts of both the gene transferred and control licorice root cultures. However, the qualitative and quantitative analysis of glycyrrhizin and other secondary metabolites should be investigated from both root cultures for supported to *in vitro* natural product cultures and other utilizations.

Keyword: Licorice, *Glycyrrhiza glaba* L., Root culture, *Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium rhizogenes*

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญภาพ	(2)
สารบัญตาราง	(3)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัยและการวิเคราะห์	11
อภิปลายและวิจารณ์ผล	30
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	31
บรรณานุกรม	32
ภาคผนวก	35

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมี และขั้นตอนการสังเคราะห์ Glycyrrhizic acid 3
ภาพที่ 2 ต้นชะเอมเทศที่ได้จากการเพาะเมล็ด 11
ภาพที่ 3 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดยอดใหม่ที่ระยะเวลา 30 วัน 12
ภาพที่ 4 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดยอดใหม่ บนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 13
ภาพที่ 5 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากที่ระยะเวลา 30 วัน 15
ภาพที่ 6 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากที่ระยะเวลา 30 วัน 16
ภาพที่ 7 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์แต่ละเส้นจับกับเบสบนพลาสมิด pEXM 17
ภาพที่ 8 ผลการถ่ายยีน *rolABC* เข้าสู่ส่วนต่าง ๆ ของชะเอมเทศที่ระยะเวลา 30 วัน 18
ภาพที่ 9 ผลการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *rolC* จากรากใหม่ของชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีน 18
ภาพที่ 10 ลักษณะรากฝอยที่เกิดจากการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 บนแผ่นใบและลำต้นของชะเอมเทศ 20
ภาพที่ 11 รากที่เกิดจากบาดแผลชนิดรอยตัดและเข็มจิ้มบนลำต้นชะเอมเทศ 21
ภาพที่ 12 ดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR 23
ภาพที่ 13 การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในสภาวะมืด 24
ภาพที่ 14 การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในสภาวะมีแสงสว่าง 25
ภาพที่ 15 การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสูตร GIL3 25
ภาพที่ 16 รากฝอยชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีน *rolC* 26
ภาพที่ 17 เปรียบเทียบสูตรอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ระหว่าง MS กับ B5 27
ภาพที่ 18 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในพืชในอาหารสูตร MS 28
ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของรากฝอยชะเอมเทศ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ 29

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวอย่าง พืชที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงรากเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ ที่ถูกชักนำโดย การถ่ายยีน จาก *Agrobacterium rhizogenes* 4

ตารางที่ 2 อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ใช้ในการชักนำให้ยอดเกิดยอดใหม่ 5

ตารางที่ 3 อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ใช้ในการชักนำให้ยอดเกิดยอดใหม่ 6

ตารางที่ 4 อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ใช้ในการชักนำให้ยอดเกิดราก 6

ตารางที่ 5 อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ใช้ในการชักนำให้ยอดเกิดราก 7

ตารางที่ 6 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดยอดใหม่ บนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 13

ตารางที่ 7 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากใสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 14

ตารางที่ 8 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากบนอาหารสูตร MS ที่มี สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 16

ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA3300*rolABC* หรือ pCAMBIA3300*rolABC* หรือ pCAMBIA3300*rolC* 17

ตารางที่ 10 จำนวนรากฝอยจากการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 บนแผ่นใบและลำต้นชะเอมเทศ 19

ตารางที่ 11 จำนวนรากฝอยจากการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 จากการสร้าง บาดแผลด้วยเข็มและมีด 21

ตารางที่ 12 การเกิดรากฝอยจากการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 ที่ความเข้มข้นระดับ ต่างๆบนลำต้นชะเอมเทศ 22

ตารางที่ 13 รากฝอยที่เกิดจากการถ่ายโดนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 ที่ได้รับ AS ในความเข้มข้นเท่า 23

ตาราง ที่ 14 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด ของรากฝอยของชะเอมเทศ ที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และ B5 26

ตาราง ที่ 15 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด ของรากฝอยของชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และเติมฮอร์โมนที่ความเข้มข้นต่างๆ 27

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของรากฝอยของชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และเติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ 28

บทนำ

ชะเอมเทศ เป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักกันมานาน ลำต้นมีความสูงประมาณ 1-2 เมตร ใบเป็นใบประกอบ ลักษณะเป็นรูปขนนก ออกสลับกัน มีใบย่อยประมาณ 9-17 ใบ ส่วนก้านใบย่อยสั้นมาก ใบสีเขียวอมเหลือง ดอกออกเป็นช่อ กลีบดอกสีม่วงอ่อน ๆ ก้านดอกสั้นมาก ฝักมีลักษณะแบน ผิวข้างนอกเรียบ ตั้งแต่ในอดีตมีการใช้ชะเอมเทศเป็นสมุนไพรรักษาโรคต่างๆหลายชนิด เช่น วัณโรคปอด หอบหืด โรคกระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็กและหลอดลมอักเสบเป็นต้น อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่นำสารสกัดจากชะเอมเทศ มาใช้ในเครื่องสำอาง โดยมีสรรพคุณ ทำให้ผิวหนังขาวกระจ่างขึ้น หรือยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิว ในด้านอาหาร ชะเอมเทศเป็นสารที่ให้ความหวานแต่ไม่ให้พลังงาน จึงสามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยชะเอมเทศ เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ต้านอาการอักเสบ ต้านการเกิดมะเร็ง ต้านอาการภูมิแพ้ผิวหนัง จากสรรพคุณของชะเอมเทศที่มีอยู่มากมาย คณะผู้วิจัย จึงมองเห็นความสำคัญของสมุนไพรชนิดนี้ เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์อาหารเฉพาะกลุ่มต่อไป

ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ เพื่อนำสารดังกล่าวไปใช้ ทางเภสัชวิทยา เครื่องสำอาง อาหารเสริม สีย้อม และอื่น ๆ กำลังเป็นที่สนใจ มีรายงานการศึกษาอย่างกว้างขวางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการไปจนถึงการเพิ่มปริมาณการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงการชักนำให้มีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิในเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ข้อดีของการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชคือ สามารถเพาะเลี้ยง และผลิตสารได้ตลอดทั้งปี สารที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ รากพืชนับเป็นส่วนของพืชที่มีศักยภาพในการนำมาเพาะเลี้ยง เนื่องจากมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงรากพืช โดยมีการใช้แบคทีเรียที่เรียกว่า *Agrobacterium rhizogenes* เพื่อชักนำให้ส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ทำให้เซลล์พืชมีการพัฒนาเกิดเป็นรากฝอยเป็นจำนวนมาก โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีราคาแพงเพื่อชักนำให้เกิดราก ซึ่งจะสามารถช่วยลดต้นทุนในการเพาะลี้ยงรากพืชได้เป็นอย่างมาก นอกจากนั้นส่วน T-DNA ที่นำเข้าไปยังมีส่วนกระตุ้นให้รากที่เกิดขึ้นมีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิมากขึ้นด้วย ชะเอมเทศนับเป็นพืชหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ เนื่องจากชะเอมเทศมีการสะสมสารทุติยภูมิกลุ่ม glycyrrhizin ในส่วนของลำต้น และราก ข้อเสนอโครงการนี้จึงสนใจศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารในกลุ่ม glycyrrhizin ซึ่งจะสามารถนำไปต่อยอดให้เกิดประโยชน์ได้ในทางเภสัชวิทยา เครื่องสำอาง และอื่น ๆได้ในอนาคต

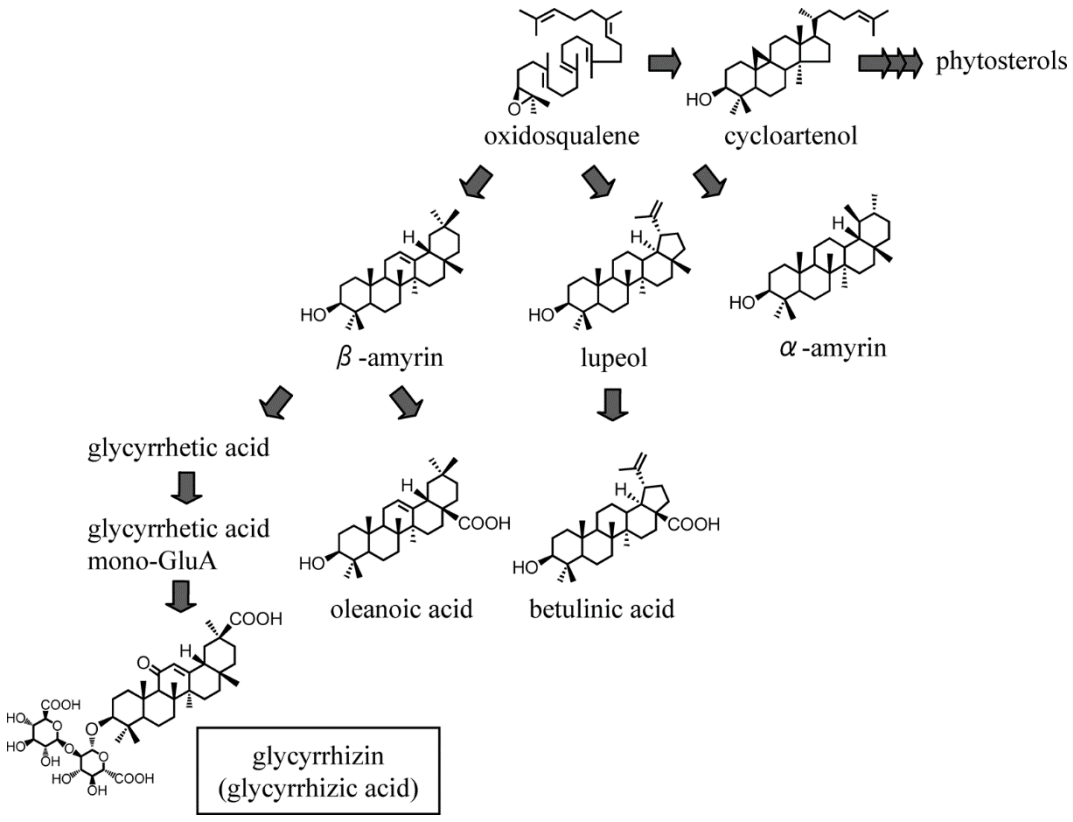
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงต้นชะเอมเทศบนอาหารแข็งในสภาพปลอดเชื้อ
2. ศึกษาวิธีการชักนำให้เกิดรากฝอย การกระตุ้นให้มีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิในชะเอมเทศ โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium rhizogenes*
3. ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวในสภาพปลอดเชื้อ
4. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำให้รากชะเอมเทศมีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิ ในอาหารเหลวสภาพปลอดเชื้อ

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ชะเอมเทศ (Liquorice, Licorice) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycyrrhiza glabra* L. จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae เป็นพรรณไม้ที่มีอายุนานหลายปี ลำต้นมีความสูงประมาณ 1-2 เมตร ใบเป็นใบประกอบลักษณะเป็นรูปขนนก และจะออกสลับกัน มีใบย่อยประมาณ 9-17 ใบ ส่วนก้านใบย่อยนั้นจะสั้นมาก ใบจะเป็นสีเขียวอมเหลือง ดอกจะออกเป็นช่อ กลีบดอกจะเป็นสีม่วงอ่อน ๆ และก้านดอกจะสั้นมาก ฝักจะมีลักษณะแบน และผิวข้างนอกจะเรียบ

สาร Glycyrrhizin ที่สกัดได้จากชะเอมเทศ มีคุณสมบัติ ต้านอาการอักเสบ (anti-inflammatory), ลดการเกิดหนอง (anti-ulcerous), ลดอาการแพ้บริเวณผิวหนัง (antiallergic), ต้านการเกิดมะเร็ง (anticancer) และเพิ่มภูมิคุมกัน (immuno-modulating activities) นอกจากนี้สาร glycyrram ซึ่งเป็นเกลือแอมโมเนียมโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นสารให้ความหวาน โดยให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโคสถึง 300 เท่า (Kondratenko *et al.* 2005). โครงสร้างทางเคมี และขั้นตอนการสังเคราะห์ Glycyrrhizic acid จากชะเอมเทศ แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมี และขั้นตอนการสังเคราะห์ Glycyrrhizic acid ซึ่งเป็นสารสำคัญที่แยกได้จากชะเอมเทศ (Kojoma *et al.,* 2009)

การใช้ Agrobacterium rhizogenes ชักนำให้เกิดรากฝอย และกระตุ้นให้มีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิในรากพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

Agrobacterium rhizogenes เป็นเชื้อแบคทีเรีย แกรมลบ ที่เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับพืชจะสามารถกระตุ้นให้เซลล์พืชสร้างรากฝอยได้ โดย *Agrobacterium rhizogenes* จะส่งถ่าย DNA ซึ่งเป็นพลาสมิดขนาดใหญ่ เรียกว่า root inducing plasmid (pRi) ซึ่งมีส่วนของ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืช จะสามารถกระตุ้นให้เซลล์พืชสร้าง ออกซิน (endogenous auxin) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลกระตุ้นให้เซลล์พืชที่ได้รับการถ่าย T-DNA มีการสร้างรากได้ (*Chandra and Chanda*, 2011) มากไปกว่านั้นยังมีรายงานว่ารากพืชที่ถูกกระตุ้นด้วย Ri พลาสมิดจะสามารถสร้างและสะสมสารทุติยภูมิได้ไม่ต่างจากพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ มีรายงานการใช้ *Agrobacterium rhizogenes* ในการส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่จีโนมพืชเพื่อกระตุ้นให้เซลล์พืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีการสร้างรากฝอยเพิ่มขึ้นในพืชหลายชนิด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1ตัวอย่าง พืชที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงรากเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่ถูกชักนำโดย การถ่ายยีนจาก *Agrobacterium rhizogenes*

สารทุติยภูมิ	ชนิดพืช	เอกสารอ้างอิง
Scopolamine	*Atropa belladonna*	Bonhomme *et al.* 2000
Hysocyamine and Scopolamine	*Datura innoxia*	Shimomura *et al.* 1991
Anthraquinone	*Rubia tinctoria*	Saito *et al.* 1991
Solasodine	*Solanum khasianum*	Jacob and Malpathak 2004
Withanolide A	*Withania somnifera*	Murthy *et al.* 2008
Indole alkaloids	*Catharanthus roseus*	Ciau-Uitz *et al.* 1994
Artemisinin	*Artemisia sp.*	Mannan *et al.* 2008

การชักนำให้เซลล์พืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิ

จากรายงานการเพาะเลี้ยงรากพืชในสภาพปลอดเชื้อ พบว่ามักมีการใช้ตัวกระตุ้น (elicitors) ได้แก่ปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ พีเอช หรือสารบางชนิด เช่น เพคติน (pectin) เซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของพืช หรือสารพวก ไคติน (chitin) กลูแคน (glucan) ซึ่งได้จากเชื้อจุลินทรีย์ ในการกระตุ้นให้รากพืชมีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น (Goel *et al* 2011) เช่นมีการใช้ chitosan ร่วมกับการเพาะเลี้ยงราก *Hypericum perforatum* สามารถกระตุ้นให้รากมีการสร้างสาร xanthones เพิ่มขึ้น 2.7 เท่า (Tocci *et al.* 2012) มีการใช้ Coumaric acid และ tyramine กระตุ้นให้ราก *Gloriosa superba* สร้างสารโคชิซิน (colchicine) เพิ่มขึ้น 5 ถึง 6 เท่า (Ghosh *et al* 2002) นอกจากนี้มีการใช้ heptasaccharide และ octasaccharide กระตุ้นให้ราก Panax ginseng มีการสร้าง saponins เพิ่มขึ้น 4 เท่า (Zhou *et al.* 2007)

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมเนื้อเยื่อเริ่มต้นเพื่อใช้ในการทดลองที่ 1 และ 2

- ฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) ด้วยวิธีต่าง ๆ คือ วิธีที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อด้วย 10% sodium hypochlorite ร่วมกับ 0.02% (v/v) tween-20 นาน 10 นาที วิธีที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อด้วย 10% sodium hypochlorite ร่วมกับ 0.02% (v/v) tween-20 นาน 20 นาที คือ วิธีที่ 3 แช่เมล็ดใน 70% (v/v) เอทานอล นาน 1 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย 10% sodium hypochlorite ร่วมกับ 0.02% (v/v) tween-20 นาน 10 นาที วิธีที่ 4 แช่เมล็ดใน 70% (v/v) เอทานอล นาน 1 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย 10% sodium hypochlorite ร่วมกับ 0.02% (v/v) tween-20 นาน 20 นาที วิธีการละ 25 เมล็ด จากนั้นนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) จนเมล็ดงอก บันทึกผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และอัตราการงอกของเมล็ด
- เพาะเลี้ยงส่วนยอดและตาข้างบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP (6-benzylaminopurine) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายเนื้อเยื่อทุกๆ 30 วัน จนได้จำนวนยอดและตาข้างเพียงพอต่อการนำไปทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากต่อไป

การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงต้นชะเอมเทศบนอาหารแข็งในสภาพปลอดเชื้อ

- ทำการทดลองชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดยอดใหม่สองครั้งโดยครั้งที่หนึ่ง เลี้ยงยอดชะเอมเทศบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP หรือ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 2) เพื่อชักนำให้เกิดยอดใหม่ สูตรอาหารละ 2 ซ้ำ ๆละ 20 ชิ้น ครั้งที่สองเลี้ยงยอดชะเอมเทศบนอาหาร แข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP หรือ Kinetin หรือ TDZ (*N*-phenyl-*N'*-1,2,3-thidiazol-5-ylurea) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 3) จำนวนสูตรอาหารละ 4 ซ้ำ ๆละ 3 ชิ้น

ตารางที่ 2 อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ใช้ในการชักนำให้ยอดเกิดยอดใหม่

ชื่อสูตรอาหาร	BAP (mg/L)	Kinetin (mg/L)
GS1	0	0
GS2	1	0
GS3	2	0
GS4	3	0
GS5	0	1
GS6	0	2
GS7	0	3

ตารางที่ 3 อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ใช้ในการชักนำให้ยอดเกิดยอดใหม่

ชื่อสูตรอาหาร	BAP (mg/L)	Kinetin (mg/L)	TDZ (mg/L)
A1	0	0	0
A2	1	0	0
A3	2	0	0
A4	3	0	0
A5	0	1	0
A6	0	2	0
A7	0	3	0
A8	0	4	0
A9	0	0	0.5
A10	0	0	1
A11	0	0	2

ทำการทดลองชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากสองครั้งโดยครั้งที่หนึ่งทำการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA (1-naphthaleneacetic acid) IBA (3-indolebutyric acid) หรือ IAA (indole-3-acetic acid) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้ยอดเกิดราก สูตรอาหารละ 4 ซ้ำ ๆละ 4 ชิ้น (ตารางที่ 4) การทดลองครั้งที่สองชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากซ้ำ โดยการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA (3-indolebutyric acid) และ/หรือ IAA (indole-3-acetic acid) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ สูตรอาหารละ 2 ซ้ำ ๆละ 10 ชิ้น (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ใช้ในการชักนำให้ยอดเกิดราก

ชื่อสูตรอาหาร	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	IAA (mg/L)
GR1	0	0	0
GR4	0	0.5	0
GR5	0	1	0
GR6	0	0	0.5
GR7	0	0	1
GR10	0	0.5	0.5

ตารางที่ 5 อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ใช้ในการชักนำให้ยอดเกิดราก

ชื่อสูตรอาหาร	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	IAA (mg/L)
GR1	0	0	0
GR2	0.5	0	0
GR3	1	0	0
GR4	0	0.5	0
GR5	0	1	0
GR6	0	0	0.5
GR7	0	0	1
GR8	0.5	0.5	0
GR9	0.5	0	0.5
GR10	0	0.5	0.5

การทดลองที่ 2 การศึกษาเพื่อชักนำให้ เกิดรากฝอยในชะเอมเทศ โดยการชักนำ T-DNA เข้าสู่เนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆโดยใช้เชื้อ Agrobacterium

- เชื้อที่นำมาใช้ในการชักนำให้เกิดรากคือ *Agrobacterium rhizogenese สายพันธุ์ A13* ที่มีการตัดโคลนพลาสมิดด้วย EHA 101 pIG121Hm ที่มี Gus-intron เป็น reporter ยีน และ *Agrobacterium tumrfaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pEXM120 ที่มี *Nos-NPTII ยีน, 35S-GUS* ยีน, *rolABC* ยีนและ *35S-R* ยีน
- เตรียมเชื้อ *Agrobacterium* สำหรับถ่ายยีน โดยนำโคโลนีเดี่ยว เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB (Luria Bertani medium) ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเลี้ยงเชื้อใหม่ (restart culture) ในอาหาร LB ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AS 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราส่วน เชื้อ:อาหาร เท่ากับ 1:100 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนเชื้อมีความขุ่นวัดค่าได้ OD_{600} = 0.4-0.5 นำเชื้อที่ได้ใช้ในการถ่ายโอนยีน
- เตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อชะเอมเทศสำหรับการถ่ายยีน โดยเลี้ยงต้นชะเอมเทศบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วันก่อนนำมาถ่ายยีน ตัดชิ้นส่วนใบขนาด 1.0 ตารางเซนติเมตร และลำต้นยาว 1 เซนติเมตร
- การทดลองที่ 2.1 ศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีน บนแผ่นใบ และลำต้นของชะเอมเทศ โดยการใช้มีดตัดแผ่นใบ และส่วนของลำต้น จากนั้นใช้เข็มจุ่มเชื้อแล้วสร้างบาดแผล 3-4 บาดแผลต่อ 1 ชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี สาร cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2-7 วัน ขึ้นกับการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium* บันทึกผลการเกิดรากใหม่ และการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ยืนยันผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR ส่วนของยีน *rolC*

- การทดลองที่ 2.2 ศึกษาวิธีการสร้างบาดแผลบนส่วนของลำต้นชะเอมเทศ ที่มีต่อการเกิดรากฝอย โดยเปรียบเทียบ 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 จิ้มส่วนของลำต้นชะเอมเทศ ด้วยเข็มที่มีเชื้อเปรียบเทียบกับวิธีที่ 2 ใช้ใบมีดที่จุ่มในสารละลายเชื้อในการตัด จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี สาร cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2-7 วัน ขึ้นกับการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium* บันทึกผลการเกิดรากใหม่ และการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ยืนยันผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR ส่วนของยีน *rolC*
- การทดลองที่ 2.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อต่อการเกิดรากฝอยบนส่วนของลำต้นชะเอมเทศ โดยนำเชื้อที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2 มาทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ให้มีความเข่มข้นสามระดับคือ 1, 0.1 และ 0.01 เท่า จากนั้นนำเชื้อที่เจือจางแล้วทำการถ่ายโอนยีนบนส่วนของลำต้น โดยวิธีการใช้เข็มจุ่มเชื้อแล้วสร้างบาดแผล 3-4 บาดแผลต่อ 1 ชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี สาร cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2-7 วัน ขึ้นกับการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium* บันทึกผลการเกิดรากใหม่ และการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ยืนยันผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR ส่วนของยีน *rolC*
- การทดลองที่ 2.4 ศึกษาผลของความเข้มข้น ของสาร AS (acetosyringone) ต่อความสามารถในการกระตุ้น *A. rhizogenes* A13 ในการถ่ายโอนยีนบนชิ้นส่วนของชะเอมเทศเพื่อการชักนำให้เกิดรากฝอย โดยนำเชื้อที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2 มาเลี้ยงร่วมกับ AS ความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปหมุนเหวี่ยงที่เครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 – 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการถ่ายโอนยีนบนส่วนของลำต้น โดยวิธีการใช้เข็มจุ่มเชื้อแล้วสร้างบาดแผล 3-4 บาดแผลต่อ 1 ชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี สาร cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2-7 วัน ขึ้นกับการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium* บันทึกผลการเกิดรากใหม่ และการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ยืนยันผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR ส่วนของยีน *rolC*
- การตรวจสอบยีน *rolC* จากดีเอ็นเอของรากฝอยต้นชะเอมเทศ สกัดดีเอ็นเอจากรากฝอยที่ต้องการทำงานตรวจสอบยีน *rolC* โดยตัดชิ้นส่วนรากที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน หรือรากฝอยที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร บดตัวอย่างรากในสารละลาย Solution 1 ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ดูดของเหลวที่ได้จากการบดปริมาณ 300 ไมโครลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์จากนั้นเติมสารละลาย Solution 2 ปริมาณ 300 ไมโครลิตร กลับหลอด 10 ครั้ง เติมสารละลาย Solution 3 ปริมาณ 192 ไมโครลิตร และ chloroform ปริมาณ 200 ไมโครลิตร กลับหลอด 10 ครั้ง ทำการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์เติม Isopropanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร กลับหลอด 10 ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ทำการล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol 100 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสออกให้หมด เติม dH_2O+RNase ปริมาณ 30 ไมโครลิตร นำ DNA ที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณโดยกระบวนการปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบของสารละลายผสมปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา

10X buffer	1	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	0.5	ไมโครลิตร
2 mM dNTP	1	ไมโครลิตร
10 µM primer *rol*CF	0.4	ไมโครลิตร
10 µM primer *rol*CR	0.4	ไมโครลิตร
Toptag	0.05	ไมโครลิตร
H_2O	6.15	ไมโครลิตร

- กระบวนการเพิ่มปริมาณยีน *rol*C

  denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.45 นาที

  annealing อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.45 นาที

  extension อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

- วิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟไรซิส (agarose gel electrophoresis) ด้วยเจลอะกาโรส 1 % ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ เป็นเวลา 15 นาที

การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศรวมทั้งกระตุ้นให้มีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิ ในสภาพปลอดเชื้อ

- ชักนำให้ข้อเดี่ยวจากต้นชะเอมเทศที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเกิดรากในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่ GA_3 (gibberiric acid) และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA (1-naphthaleneacetic acid) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 – 120 รอบ/นาที
- เพิ่มปริมาณรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่ GA_3 และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวมถึงศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณราก เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาล ปริมาณชิ้นส่วนเริ่มต้น ปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยง ขนาดและชนิดของภาชนะที่ใช้เลี้ยง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า

การทดลองที่ 4 *การชักนำให้รากชะเอมเทศที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสร้างและสะสมสารทุติยภูมิ โดยการใช้ปัจจัยสภาพแวดล้อม และสารกระตุ้น*

- นำรากฝอยชะเทศที่ผ่านการทดสอบด้วยเทคนิค PCR แล้วว่าเป็นรากได้รับการถ่ายยีน *rol*C เพิ่มปริมาณบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร
- การทดลองที่ 4.1 ศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อพืช 2 สูตร ระหว่าง MS กับ B5 โดยนำรากของชะเอมเทศที่ได้มาจากการเพิ่มปริมาณ ตัดเป็นรากเดี่ยว ความยาว 3 – 4 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดเหลว ระหว่าง MS กับ B5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มี cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำออกมาวัดความยาวและชั่งน้ำหนักสด

ของราก จดบันทึกความยาวและน้ำหนักสดของราก วิเคราะห์เปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณของรากที่เลี้ยงใน 2 สูตรอาหาร

- การทดลองที่ 4.2 ศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพิ่มปริมาณราก โดยนำรากชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีนตัดเป็นรากเดี่ยวความยาว 3 – 4 เซนตริเมตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำเอาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้มาจากการทดลองที่ 2 มาเลี้ยงรากของชะเอมเทศต่อ โดยเติมฮอร์โมนออกซิน คือ IAA หรือ IBA ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำออกมาวัดความยาวและชั่งน้ำหนักสดของราก จดบันทึกความยาวและน้ำหนักสดของราก วิเคราะห์เปรียบเทียบความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซิน
- การทดลองที่ 4.3 การศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส โดยนำรากของชะเอมเทศตัดเป็นรากเดี่ยวความยาว 3 – 4 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำเอาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้มาจากการทดลองที่ 2 และความเข้มข้นฮอร์โมนออกซินที่เหมาะสมที่ได้มาจากการทดลองที่ 3 มาเลี้ยงรากของชะเอมเทศต่อ เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และนำออกมาวัดความยาวและชั่งน้ำหนักสดของราก บันทึกความยาวและน้ำหนักสดของราก และวิเคราะห์เปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส
- การวิเคราะห์สารทุติยภูมิ จากรากชะเอมเทศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค HPLC โดยสกัดรากชะเอมเทศอบแห้งด้วย 80% เอทานอล 3 ครั้งและนำไประเหยตัวนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอล ได้สารละลายจากรากชะเอมเทศ ทำการหาสภาวะที่เหมาะในหารวิเคราะห์สาร glycyrrhizin ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิสำคัญที่พบในรากชะเอมเทศ โดยใช้สาร glycyrrhizin เป็นสารมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Sabbioni และคณะ โดยใช้ C8 column ขนาด 150 มิลลิเมตร และใช้ photodiode array เป็น detector และใช้ระบบ isocratic elution ด้วย methanol-acetonitrile-water-acetic acid (35:35:30:1 by vol) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm และทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Jiang และคณะ โดยใช้ C18 column ขนาด 150 มิลลิเมตร และใช้ photodiode array เป็น detector และใช้ระบบ isocratic elution ด้วย methanol-water-acetic acid (65:34:1) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

การทดลองที่ 5 ศึกษาเบื้องต้นด้านเศรษฐศาสตร์ในการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ

- ศึกษาต้นทุนการผลิต และความคุ้มทุนในการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ ในระดับห้องปฏิบัติการ (ไม่ได้ศึกษาเนื่องจากเป็นแผนงานของปีถัดไป)

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์

การเตรียมเนื้อเยื่อเริ่มต้นเพื่อใช้ในการทดลองที่ 1 และ 2

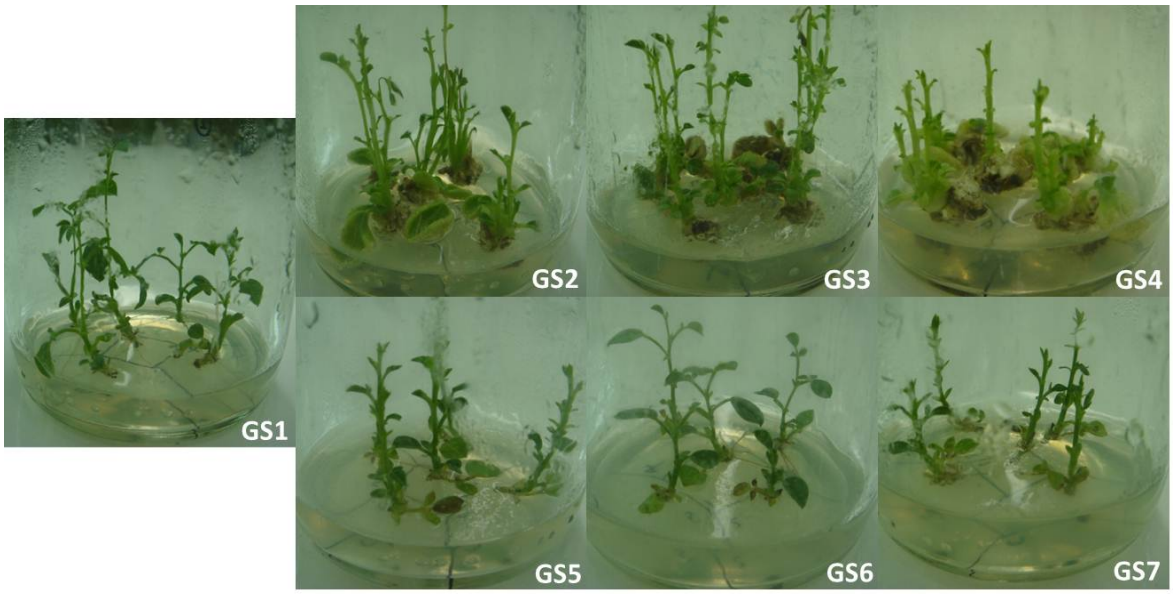
จากการทดลองฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดชะเอมเทศทั้ง 4 วิธี พบว่าวิธีการที่ 3 คือ แช่เมล็ดใน เอทานอล 70% นาน 1 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite 10% ร่วมกับ tween-20 0.02% นาน 10 นาที และวิธีการที่ 4 คือแช่เมล็ดใน เอทานอล 70% นาน 1 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite 10% ร่วมกับ tween-20 0.02% นาน 20 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อรา 10% ส่วนวิธีการที่ 1 คือ ฟอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite 10% ร่วมกับ tween-20 0.02% นาน 10 นาที และวิธีการที่ 2 คือ ฟอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite 10% ร่วมกับ tween-20 0.02% นาน 20 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อรา 35% และ 40% ตามลำดับ โดยเมล็ดที่ปลอดเชื้อจะเริ่มงอก สัปดาห์ที่ 2 หลังการเพาะบนอาหารสูตร MS จากนั้นเพิ่มปริมาณยอด บนอาหารสูตร MS ที่มี BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้ปริมาณยอดเพียงพอต่อการทดลองที่ 1 และ 2 ย้ายยอดเริ่มต้นทั้งหมดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1 เดือน ก่อนนำมาใช้ในการทดลองที่ 1 และ 2 (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 ต้นชะเอมเทศที่ได้จากการเพาะเมล็ด

การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงต้นชะเอมเทศบนอาหารแข็งในสภาพปลอดเชื้อ

<u>ผลการทดลองเพิ่มปริมาณยอดชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ ครั้งที่ 1</u>

จากการทดลองเพิ่มปริมาณยอดใหม่ บนอาหารสูตร MS ที่มี BAP 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดชะเอมเทศมีการสร้างยอดใหม่จากบริเวณโคนต้นได้ 0, 4.2, 3.2, 1.4, 0, 0 และ0.2 ยอดตามลำดับ โดยยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP ทุกระดับความเข้มข้นจะมีการสร้างแคลลัสบริเวณโคนต้น ลำต้นบวม ใบเป็นเกร็ด ยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนเป็นสีเขียวเหลือง ส่วนยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin ทุกระดับความเข้มข้น ไม่มีการสร้างแคลลัสบริเวณโคนต้นลำต้น ตาบริเวณข้อยืดยาวขึ้นมาเป็นยอดใหม่ (ภาพที่ 3)



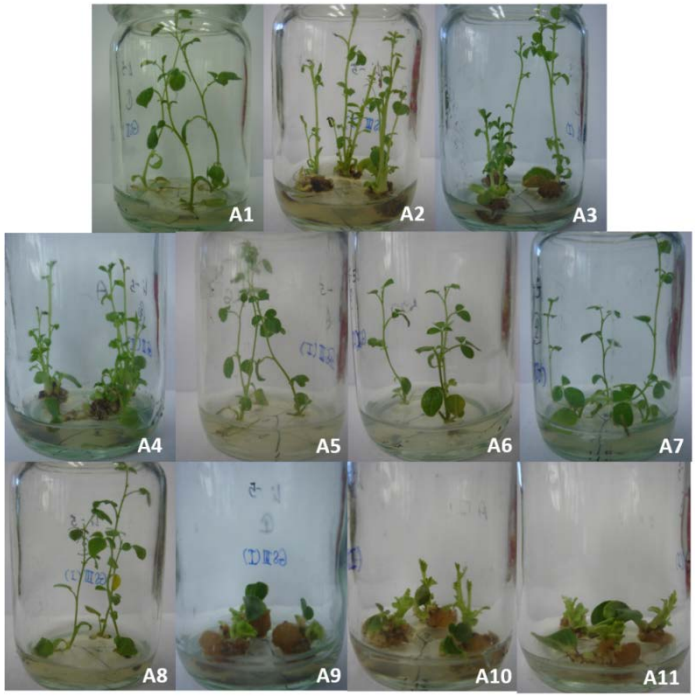
ภาพที่ 3 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดยอดใหม่ที่ระยะเวลา 30 วัน ; GS1 = MS, GS2 = MS + 1 mg/L BAP, GS3 = MS + 2 mg/L BAP, GS4 = MS + 3 mg/L BAP, GS5 = MS + 1 mg/L Kinetin, GS6 = MS + 2 mg/L Kinetin, GS7 = MS + 3 mg/L Kinetin

<u>ผลการทดลองเพิ่มปริมาณยอดชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ ครั้งที่ 2</u>

จากรายงานผลการวิจัยครั้งที่ 1 พบว่ายอดชะเอมเทศที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP ทุกระดับความเข้มข้น มีการสร้างแคลลัสบริเวณโคนต้น ลำต้นบวม ใบเป็นเกร็ด ส่วนยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin ทุกระดับความเข้มข้น ไม่มีการสร้างแคลลัสบริเวณโคนต้นลำต้นและให้จำนวนยอดที่แตกใหม่น้อย ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของ Kinetin เป็น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้เพิ่มการใช้ TDZ ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการแตกกอในพืชได้ดีโดยเฉพาะไม้เนื้อแข็ง ภายหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน บันทึกผลการแตกกอพบว่ายอดชะเอมเทศที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต และยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin ทุกระดับความเข้มข้น ไม่มีการแตกยอดใหม่ และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดใหม่เท่ากับ 0.11 ยอด ส่วนยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดใหม่ 1.89 และ 1.78 ยอดตามลำดับ ยอดที่ได้มีลักษณะบวม ไม่ยืดยาวมีการเกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น ยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดใหม่ 3.44 3.56 และ 3.00 ยอดตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยจำนวนยอดใหม่ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 6 และภาพที่ 4 โดยค่าที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับค่าเฉลี่ยจำนวนยอดใหม่เมื่อเลี้ยงยอดบนอาหารสูตรอื่น ๆโดยยอดที่เกิดใหม่ที่ได้ใบมีขนาดเล็กลำต้นอวบ แต่เมื่อตัดยอดใหม่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ลำต้น ใบ และรากที่สร้างขึ้นใหม่บนอาหารสูตรดังกล่าวมีลักษณะปกติ

ตารางที่ 6 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดยอดใหม่ บนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 30 วัน

สูตรอาหาร/ซ้ำ	BAP (mg/L)	Kinetin (mg/L)	TDZ (mg/L)	ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด (ยอด)	ค่าเฉลี่ยความยาวยอด (cm.)
A1	0	0	0	0.00[a]	0.00[a]
A2	1	0	0	3.44[c]	3.16[d]
A3	2	0	0	3.56[c]	2.79[cd]
A4	3	0	0	3.00[c]	2.13[c]
A5	0	1	0	0.00[a]	0.00[a]
A6	0	2	0	0.00[a]	0.00[a]
A7	0	3	0	0.00[a]	0.00[a]
A8	0	4	0	0.00[a]	0.00[a]
A9	0	0	0.5	1.89[b]	1.12[b]
A10	0	0	1	1.78[b]	1.19[b]
A11	0	0	2	0.11[a]	0.03[a]



ภาพที่ 4 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดยอดใหม่ บนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆที่ระยะเวลา 30 วัน A1 = MS, A2 = MS + 1 mg/L BAP, A3 = MS + 2 mg/L BAP, A4 = MS + 3 mg/L BAP, A5 = MS + 1 mg/L Kinetin, A6 = MS + 2 mg/L Kinetin, A7 = MS + 3 mg/L Kinetin, A8 = MS + 4 mg/L Kinetin, A9 = MS + 0.5 mg/L TDZ, A10 = MS + 1 mg/L TDZ, A11 = MS + 2 mg/L TDZ

ผลการทดลองการชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ ครั้งที่ 1

จากการชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อพบว่า ยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ยอดเกิดรากได้ 60% มีจำนวนรากต่อต้น 2.83 ราก ส่วนยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และจำนวนรากต่อต้นดังตารางที่ 6 เมื่อพิจารณาลักษณะรากที่เกิดพบว่า ยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต รวมถึงยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA หรือ IAA ทุกระดับความเข้มข้นให้รากที่ปกติ คือราก ผอม ขาว มีการสร้างรากแขนงและรากฝอยเล็กน้อย ยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ทั้งสองระดับความเข้มข้น (GR2 และ GR3) รวมถึงยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ร่วมกับ IBA หรือ IAA (GR8 และ GR9) มีการสร้างแคลลัสแข็งบริเวณโคนต้นก่อนที่จะสร้างราก รากที่ได้มีทั้งรากที่ปกติ และรากที่อวบเปราะหักง่าย ดังตารางที่ 7 และภาพที่ 5

ตารางที่ 7 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากใสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ	ต้นที่เกิดราก (%)	จำนวนราก/ต้น (ราก)
GR1	MS	60	2.83
GR2	MS+0.5mg/L NAA	70	2.29
GR3	MS+1mg/L NAA	90	3.11
GR4	MS+0.5mg/L IBA	100	2.40
GR5	MS+1mg/L IBA	90	2.22
GR6	MS+0.5mg/L IAA	100	2.50
GR7	MS+1mg/L IAA	100	2.30
GR8	MS+0.5mg/L NAA+0.5mg/L IBA	100	3.50
GR9	MS+0.5mg/L NAA+0.5mg/L IAA	90	3.22
GR10	MS+0.5mg/L IBA+0.5mg/L IAA	70	1.86

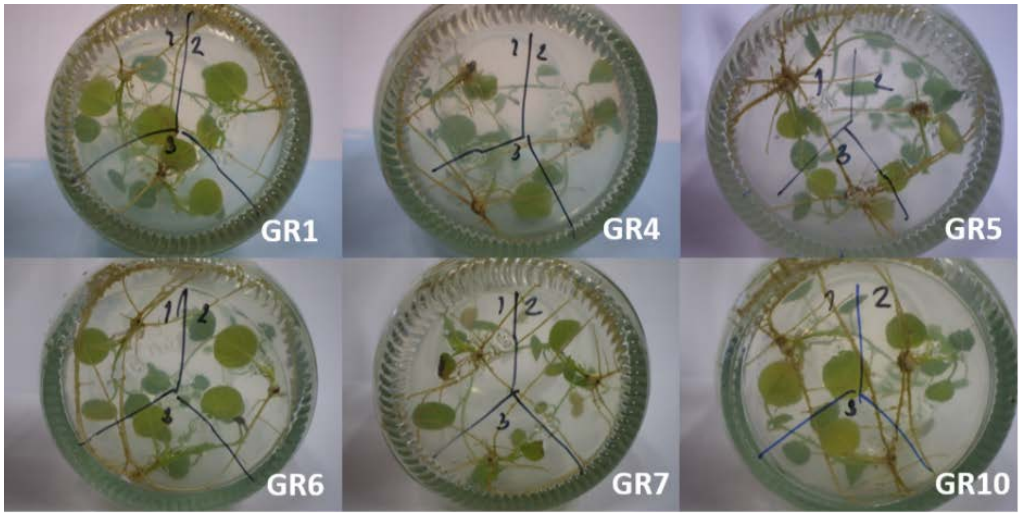
ภาพที่ 5 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากที่ระยะเวลา 30 วัน ; GR1 = MS, GR2 = MS + NAA 0.5 mg/L, GR3 = MS + NAA 1 mg/L, GR4 = MS + IBA 0.5 mg/L, GR5 = MS + IBA 1 mg/L, GR6 = MS + IAA 0.5 mg/L, GR7 = MS + IAA 1 mg/L, GR8 = MS + NAA 0.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L, GR9 = MS + NAA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L, GR10 = MS + IBA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L

ผลการทดลองการชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ ครั้งที่ 2

จากการรายงานผลการวิจัยครั้งที่ 1 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA และ NAA ร่วมกับออกซินชนิดอื่นให้รากที่มีลักษณะบวมเปราะหักง่าย จึงได้ทำการทดลองชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากซ้ำโดยเลือกใช้เฉพาะ IBA และ IAA ภายหลังการชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มี IBA และ IAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 30 วันพบว่า ยอดชะเอมเทศที่เลี้ยงบนอาหารทุกสูตรมีการสร้างราก และเป็นรากปกติไม่บวมเปราะหักง่าย โดยยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างรากสูงสุด 100% ยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างราก 80% ส่วนยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างราก 93.33% ดังตารางที่ 8 และภาพที่ 6

ตารางที่ 8 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากบนอาหารสูตร MS สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 30 วัน

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ	ต้นที่เกิดราก (%)	จำนวนราก/ต้น (ราก)
GR1	MS	100.00	3.75
GR4	MS+0.5mg/L IBA	80.00	2.92
GR5	MS+1mg/L IBA	100.00	3.80
GR6	MS+0.5mg/L IAA	80.00	3.00
GR7	MS+1mg/L IAA	100.00	3.33
GR10	MS+0.5mg/L IBA+0.5mg/L IAA	93.33	3.00



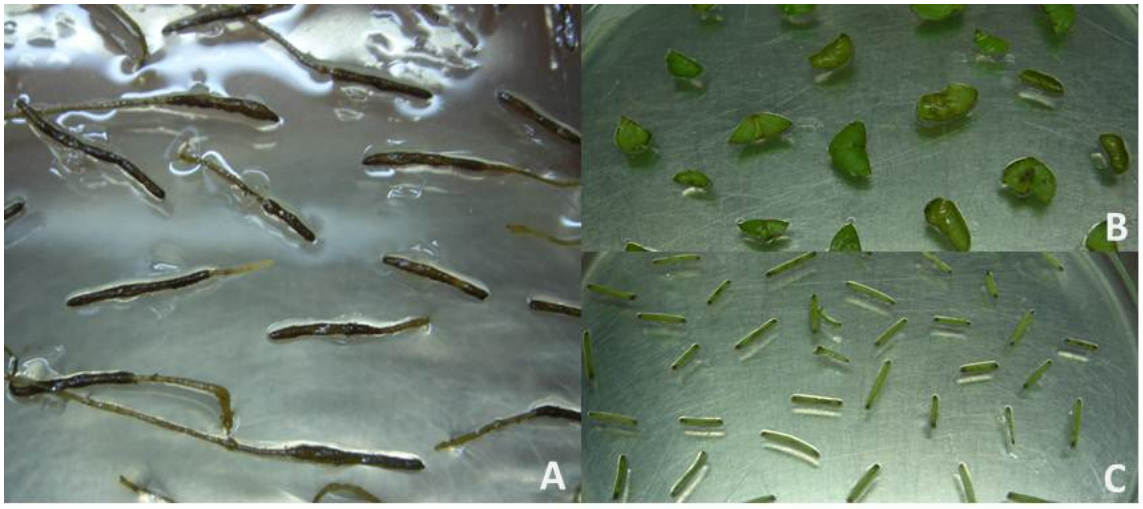
ภาพที่ 6 การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดรากที่ระยะเวลา 30 วัน ; GR1 = MS, GR4 = MS + 0.5 mg/L IBA, GR5 = MS + 1 mg/L IBA, GR6 = MS + 0.5 mg/L IAA, GR7 = MS + 1 mg/L IAA, GR10 = MS + 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L IAA

การทดลองที่ 2 การศึกษาเพื่อชักนำให้ส่วนต่าง ๆของชะเอมเทศ เกิดราก โดยการชักนำ T-DNA เข้าสู่เนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆโดยใช้เชื้อ Agrobacterium

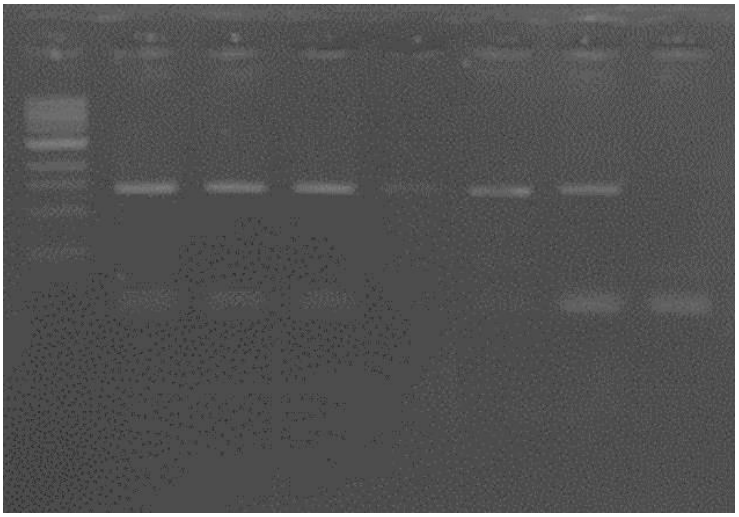
ผลการศึกษาการชักนำให้ชะเอมเทศเกิดรากฝอย โดยการชักนำ T-DNA เข้าสู่เนื้อเยื่อโดยใช้เชื้อ Agrobacterium tumrfaciens

การทดลองถ่ายยีน *rol*ABC เข้าสู่ส่วนแผ่นใบ ลำต้น และรากของชะเอมเทศ โดยใช้ *Agrobacterium tumrfaciens* สายพันธุ์ EHA105 พลาสมิด pEXM120 ที่มี *Nos-NPTII ยีน, 35S-GUS* ยีน, *rol*ABC ยีน เบื้องต้นภายหลังการถ่ายยีน 30 วัน พบว่าชะเอมเทศมีการสร้างรากใหม่จากชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นรากเท่านั้น ส่วนแผ่นใบ และลำต้นยังไม่มีการสร้างราก (ภาพที่ 7) เมื่อนำรากที่ผ่านการถ่ายยีนมาสกัด DNA แล้วใช้เทคนิค PCR ยืนยันผล โดยใช้ไพรเมอร์ที่จับกับส่วนของยีน *rol*C ขนาด 2000 bp พบว่ารากใหม่ที่สุ่มมา 20 ราก สามารถเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *rol*C ได้ทั้งสิ้น 18 ราก (ภาพที่ 8) โดยรากมีการเจริญเติบโตยืดยาว และสร้างรากแขนงได้ในช่วง เดือนแรกหลังการถ่ายยีนจากนั้นพบว่ารากไม่มีการยืดยาวและไม่สร้างรากแขนงต่อ

เมื่อทำการติดตามผลการถ่ายยีนโดยการตรวจสอบส่วนของยีน *rol*C ที่ทำการถ่ายยีนด้วยพลาสมิส pEXM120 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *rol*C ได้จากทั้ง 18 รากที่มีการตรวจพบยีน *rol*C ที่ระยะเวลา 60 วันภายหลังการถ่ายยีน ผู้วิจัยจึงได้พยายามสร้างพลาสมิสลูกผสมขึ้นใหม่โดยทำการตัดย้ายยีน *rol*ABC จากพลาสมิด pEXM120 ไปยังพลาสมิด pCAMBIA3300 ซึ่งจะสามารถทำให้ยีนที่นำเข้าสู่เซลล์พืชอยู่ได้อย่างถาวร โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 9 โดยตำแหน่งที่ไพรเมอร์แต่ละเส้นจับ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 7 ผลการถ่ายยีน *rol*ABC เข้าสู่ส่วนต่าง ๆ ของชะเอมเทศที่ระยะเวลา 30 วัน; A = รากชะเอมเทศ, B = ใบชะเอมเทศ, C = ลำต้นชะเอมเทศ



ภาพที่ 8 ผลการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *rol*C จากรากใหม่ของชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีน; เลนส์ที่ 1 = 1 Kbp maker (Thermo, Lithuania), เลนส์ที่ 2-7 = ส่วนของ DNA ขนาด 2000 bp ที่เพิ่มปริมาณได้จากรากที่ได้รับการถ่ายยีน, เลนส์ที่ 8 = ผลการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *rol*C จากรากที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA3300*rol*ABC หรือ pCAMBIA3300*rol*BC หรือ pCAMBIA3300*rol*C

Primer Name	No.bp	Sequences
RolAF	21	CAGTAGCGGCGCTCAACTTAG
RolBF	24	GTACTTTAACGTCTCTCTATGGCG
RolCF	22	CTTGTTGATGGTTGCACTCTCG
RolCR	20	AAAATGCATGGGAAGCAGAG

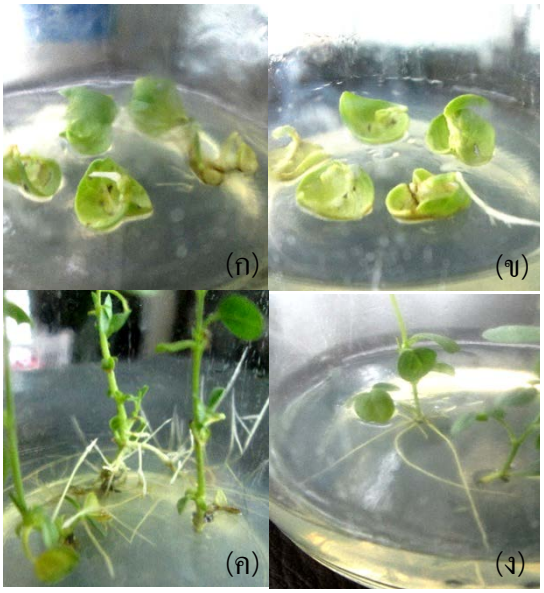
ภาพที่ 9 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์แต่ละเส้นจับกับเบสบนพลาสมิด pEXM

ผลการศึกษาการชักนำให้ชะเอมเทศเกิดรากฝอย โดยการชักนำ T-DNA เข้าสู่เนื้อเยื่อโดยใช้เชื้อ Agrobacterium rhizogenese

ผลการทดลองที่ 2.1 ศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายยีน เข้าสู่แผ่นใบ และลำต้นของชะเอม
ศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีน บนแผ่นใบ และลำต้นของชะเอมเทศ โดยการใช้มีดตัดแผ่นใบ และส่วนของลำต้น จากนั้นใช้เข็มจุ่มเชื้อแล้วสร้างบาดแผล 3-4 บาดแผลต่อ 1 ชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสาร cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อ *Agrobacterium* ที่ปนเปื้อนรอบๆชิ้นส่วน หลังจากการถ่ายโอนยีนในชิ้นเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิดเป็นเวลา 15 และ 30 วัน พบว่าในระยะเวลา 15 วันหลังการถ่ายโอนยีน แผ่นใบของชะเอมเทศสามารถเกิดรากฝอยได้ 1.67% ของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด ส่วนลำต้นของชะเอมเทศยังไม่มีการสร้างรากฝอยที่เวลา 15 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วันหลังการถ่ายโอนยีนพบว่าทั้งแผ่นใบและลำต้นของชะเอมเทศสามารถผลิตรากฝอยได้ 6.67% และ 5.56% ตามลำดับ โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนรากฝอยต่อชิ้นเนื้อเยื่อแผ่นใบและลำต้นของชะเอมเทศมีค่าเท่ากับ 1 ± 0.45 เส้นต่อชิ้นแผ่นใบ และ 3 ± 2.65 เส้นต่อชิ้นลำต้น ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยการเกิดรากฝอยดังกล่าวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 10) ลักษณะทางกายภาพของรากฝอยที่งอกจากแผ่นใบมีลักษณะของรากเป็นรากเดียว เส้นหนางอกออกจากบริเวณโคนก้านใบ ไม่มีการงอกเจริญของรากฝอยจากบริเวณบาดแผลรอยจิ้มบนแผ่นใบ มีการแตกแขนงของปลายรากฝอยเล็กน้อยในรากฝอยหลังถ่ายยีนได้ 30 วัน โดยแผ่นใบของชะเอมเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายโอยยีนจะไม่มีการงอกเจริญของรากฝอย ส่วนรากฝอยที่งอกจากลำต้นของชะเอมเทศ มีลักษณะเป็นเส้นสีขาวยาวเรียบไม่หนาเท่ากับรากที่เกิดจากแผ่นใบ มีการแตกแขนงของรากฝอยมากกว่ารากของชะเอมเทศที่เกิดโดยธรรมชาติ และมีเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่า (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 10 จำนวนรากฝอยจากการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 บนแผ่นใบและลำต้นชะเอมเทศ

ชนิดของชิ้นเนื้อเยื่อ	ชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด	รากฝอยจากการถ่ายยีน (%)		ค่าเฉลี่ยรากฝอยต่อต้น (15 วัน)	ค่าเฉลี่ยรากฝอยต่อต้น (30 วัน)
		15 วัน.	30 วัน		
แผ่นใบ	60	1.67	6.67	1 ± 0.71^{ab}	1 ± 0.45^{ab}
ลำต้น	36	0	5.56	0^{a}	3 ± 2.65^{b}

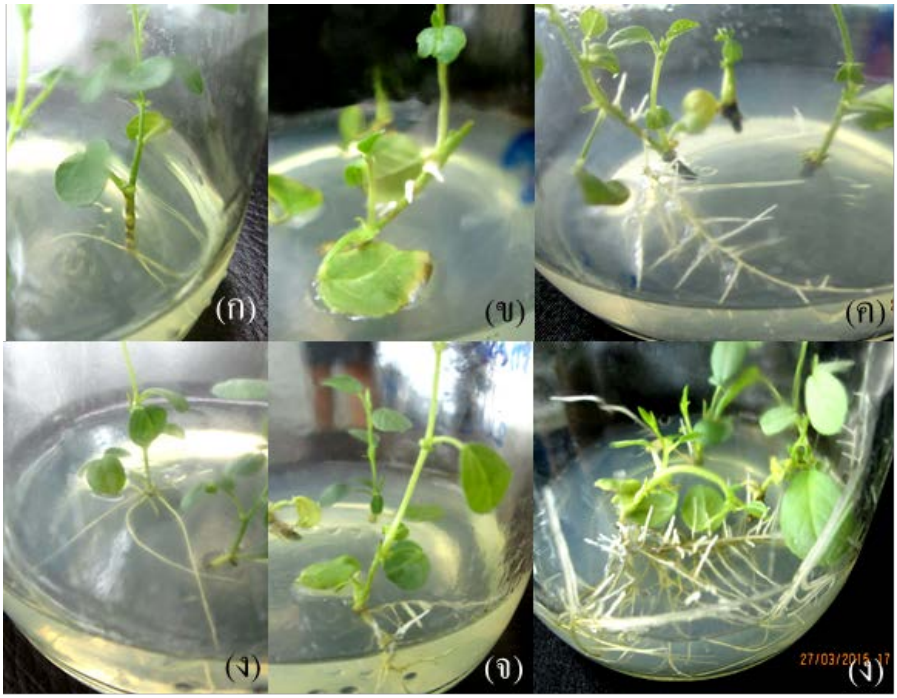


ภาพที่ 10 ลักษณะรากฝอยที่เกิดจากการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 บนแผ่นใบและ ลำต้นของชะเอมเทศ (ก) รากฝอยที่เกิดจากแผ่นใบของชะเอมเทศที่เกิดภายหลังการถ่ายโอนยีน 15 วัน (ข) รากฝอยที่เกิดจากแผ่นใบของชะเอมเทศที่เกิดภายหลังการถ่ายโอนยีน 30 วัน (ค) รากฝอยของชะเอมเทศที่เกิดจากลำต้นภายหลังการถ่ายโอนยีน 30 วัน (ง) รากฝอยของต้นชะเอมเทศที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายโอนยีน

ผลการทดลองที่ 2.2 ศึกษาวิธีการสร้างบาดแผลบนส่วนของลำต้นชะเอมเทศ ที่มีต่อการเกิดรากฝอย โดยเปรียบเทียบ 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 จิ้มส่วนลำต้นชะเอมเทศบริเวณใต้ข้อ ด้วยเข็มที่มีเชื้อ เปรียบเทียบกับวิธีที่ 2 ใช้ใบมีดที่จุ่มในสารละลายเชื้อตัด จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี สาร cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาวิธีการสร้างบาดแผลในการถ่ายโอนยีนด้วย *A. rhizogenes* A13 บนลำต้นชะเอมเทศ ด้วยการจิ้มหรือการตัดหลังจากการถ่ายโอนยีน พบว่าหลังจากการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 15 วัน ลำต้นของชะเอมเทศที่ถูกสร้างบาดแผลด้วยเข็มและการตัดด้วยใบมีดสามารถชักนำการงอกเจริญของรากฝอยได้ทั้ง 2 วิธี โดยวิธีการสร้างบาดแผลด้วยเข็มและการตัดด้วยใบมีดบนลำต้นของชะเอมเทศสามารถผลิตรากฝอยได้เท่ากับ 15% และ 11.1% ของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมดตามลำดับ หลังจากการถ่ายโอนยีนเป็นระยะเวลา 30 วัน ลำต้นของชะเอมเทศที่ถูกสร้างบาดแผลด้วยวิธีการจิ้มด้วยเข็มและการตัดด้วยใบมีดสามารถผลิตรากฝอยได้เท่ากับ 33.3% และ 11.1% ของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยของรากฝอยต่อชิ้นลำต้นของชะเอมเทศหลังจากการถ่ายโอนยีนระยะเวลา 30 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนรากฝอยต่อชิ้นลำต้นพืชที่สร้างบาดแผลโดยวิธีการจิ้มด้วยเข็มและการตัดด้วยมีดมีค่าเฉลี่ยของรากฝอยต่อชิ้นลำต้นเท่ากับ 3 ± 1.52 เส้นต่อต้น และ 2.5 ± 1.16 เส้นต่อต้นตามลำดับ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยวิธี Fisher's Significant Difference (LSD) พบว่าการสร้างบาดแผลด้วยการจิ้มและการตัดบนลำต้นของชะเอมเทศให้ค่าเฉลี่ยของรากฝอยต่อต้นมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าความสำเร็จของการชักนำการงอกเจริญของรากฝอยจากการจิ้มด้วยเข็มเท่ากับ 23.33 % ของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด และการตัดด้วยใบมีดเท่ากับ 11.11 % ของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด มีค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % การสร้างบาดแผลด้วยการจิ้มบนลำต้นของชะเอมเทศในขั้นตอนการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 11)

ตารางที่ 11 จำนวนรากฝอยจากการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 จากการสร้าง บาดแผลด้วยเข็มและมีดผ่าตัดบนลำต้นชะเอมเทศ

ชนิดของบาดแผล	ชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด	รากฝอยจากการถ่ายยีน(%)		ค่าเฉลี่ยรากฝอยต่อต้น (15 วัน)	ค่าเฉลี่ยรากฝอยต่อต้น (30 วัน)
		15 วัน	30 วัน		
การจิ้ม	60	15[a]	23.33[b]	2 ± 0.989[a]	2.5 ± 1.160[a]
การตัด	60	11.1[a]	11.1[a]	2.25 ± 1.258[a]	3 ± 1.516[a]



ภาพที่ 11 รากที่เกิดจากบาดแผลชนิดรอยตัดและเข็มจิ้มบนลำต้นชะเอมเทศ (ก) รากชะเอมเทศที่เกิดจากลำต้นที่ผ่านการจิ้มด้วยเข็มที่ไม่*มี A. rhizogenes A13* (ข) รากฝอยที่เกิดจากการจิ้มด้วยเข็มที่มี *A. rhizogenes A13* ระยะเวลา 15 วัน (ค) รากฝอยที่เกิดจากการจิ้มด้วยเข็มที่มี *A. rhizogenes* A13 ระยะเวลา 30 วัน (ง) รากชะเอมเทศที่เกิดจากลำต้นที่ผ่านการตัดด้วยใบมีดที่ไม่มี *A. rhizogenes* A13 (จ) รากฝอยที่เกิดจากการตัดด้วยใบมีดที่มี *A. rhizogenes* A13 ระยะเวลา 15 วัน (ฉ) รากฝอยที่เกิดจากการตัดด้วยใบมีดที่มี *A. rhizogenes A13* ระยะเวลา 30 วัน

ผลการทดลองที่ 2.3 ผลของความเข้มข้นของเชื้อต่อการเกิดรากฝอยบนส่วนของลำต้นชะเอมเทศ เตรียมเชื้อ *Agrobacterium* โดยนำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเลี้ยงเชื้อใหม่ (restart culture) ในอาหาร LB ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AS 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราส่วน เชื้อ: อาหาร เท่ากับ 1:100 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนเชื้อมีความขุ่นวัดค่าได้ OD_{600} = 0.4-0.5 นำเชื้อที่ได้เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ให้มีความเข้มข้นสามระดับคือ 1, 0.1 และ 0.01 เท่า จากนั้นนำเชื้อที่เจือจางแล้วทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ส่วนของลำต้นโดยวิธีการใช้เข็มจุ่มเชื้อแล้วสร้างบาดแผล 3-4 บาดแผลต่อ 1 ชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี สาร cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาผลของความเข้มข้นเชื้อ *A. rhizogenes* A13 โดยการถ่ายยีนที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ไปยังลำต้นของชะเอมเทศเพื่อชักนำการเกิดรากฝอย พบว่าความเข้มข้นของ *A. rhizogenes* A13 ไม่มีผลต่อการชักนำการเกิดของรากฝอย และค่าเฉลี่ยของรากฝอยต่อต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 การเกิดรากฝอยจากการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 ที่ความเข้มข้นระดับ ต่างๆบนลำต้นชะเอมเทศ

ความเข้มข้น *A. rhizogenes* (OD_{600nm})	ชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด	รากฝอยจากการถ่ายยีน (%)		ค่าเฉลี่ยรากฝอยต่อต้น (30 วัน)	ค่าเฉลี่ยรากฝอยต่อต้น (60 วัน)
		30 วัน	60 วัน		
0.00648	36	2.7	5.55	3 ± 2.12[a]	3 ± 1.73[a]
0.0648	36	0	5.55	0[a]	1.5 ± 1.00[a]
0.648	36	2.7	2.7	1 ± 0.71[a]	3 ± 4.24[a]

ผลการทดลองที่ 2.4 ผลของความเข้มข้น ของสาร AS ต่อความสามารถในการกระตุ้น *A. rhizogenes* A13 ในการถ่ายโอนยีนบนชิ้นส่วนของชะเอมเทศเพื่อการชักนำให้เกิดรากฝอย โดยนำเชื้อที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2 มาเลี้ยงร่วมกับ AS ความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 – 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการถ่ายโอนยีนบนส่วนของลำต้น โดยวิธีการใช้เข็มจุ่มเชื้อแล้วสร้างบาดแผล 3-4 บาดแผลต่อ 1 ชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสาร cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าลำต้นของชะเอมเทศมีงอกเจริญของรากฝอยหลังจากการถ่ายโอนยีนเป็นระยะเวลา 30 วัน ที่ความเข้มข้นของอะซิโตไซริงโกน 3 ระดับ คือ 0.05 0.1 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่าความสามารถในการงอกเจริญของรากฝอยบนลำต้นของชะเอมเทศมีค่าเท่ากับ 42.42% 27.27% และ 30.3% ของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยของรากฝอยต่อชิ้นลำต้นของชะเอมเทศหลังจากการถ่ายโอนยีนเป็นระยะเวลา 30 วัน มีค่าเฉลี่ยของรากฝอยต่อลำต้นเท่ากับ 2.07 ± 2.37 1.77 ± 1.17 และ 2 ± 1.33 เส้นต่อลำต้น บนความเข้มข้นของ AS เท่ากับ 0.05 0.1 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

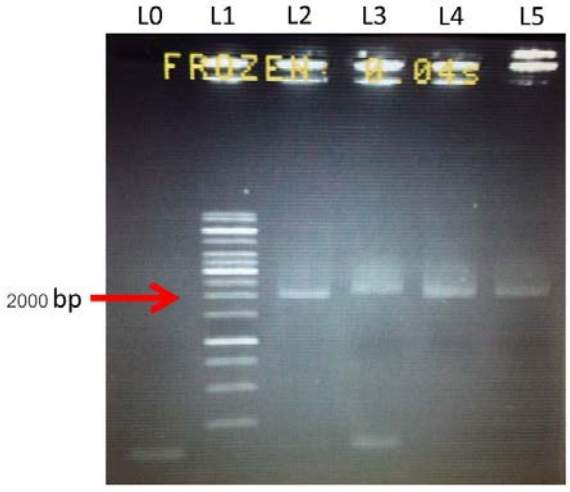
ความเข้มข้นของ AS เท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร มีความสามารถในการชักนำการงอกเจริญของรากฝอยสูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ใส่ AS ความ

เข้มข้นเท่ากับ 0.1 และ 0.5 กรัมต่อลิตร และจากการตรวจสอบทางสถิติ พบว่าค่าเฉลี่ยของรากฝอยต่อชิ้นลำต้นของชะเอมเทศจากการทดลองทั้ง 3 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 รากฝอยที่เกิดจากการถ่ายโดนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 ที่ได้รับ AS ในความเข้มข้นเท่ากับ 0.05 0.1 และ 0.5 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น AS (กรัมต่อลิตร)	ชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด	รากฝอยจากการถ่ายยีน (%)		ค่าเฉลี่ยรากฝอยต่อต้น (15 วัน)	ค่าเฉลี่ยรากฝอยต่อต้น (30 วัน)
		15 วัน	30 วัน		
0.05	33	0	42.42[a]	0	2.07 ± 2.37[a]
0.1	33	0	27.27[c]	0	1.77 ± 1.17[a]
0.5	33	0	30.3[b]	0	2 ± 1.33[a]

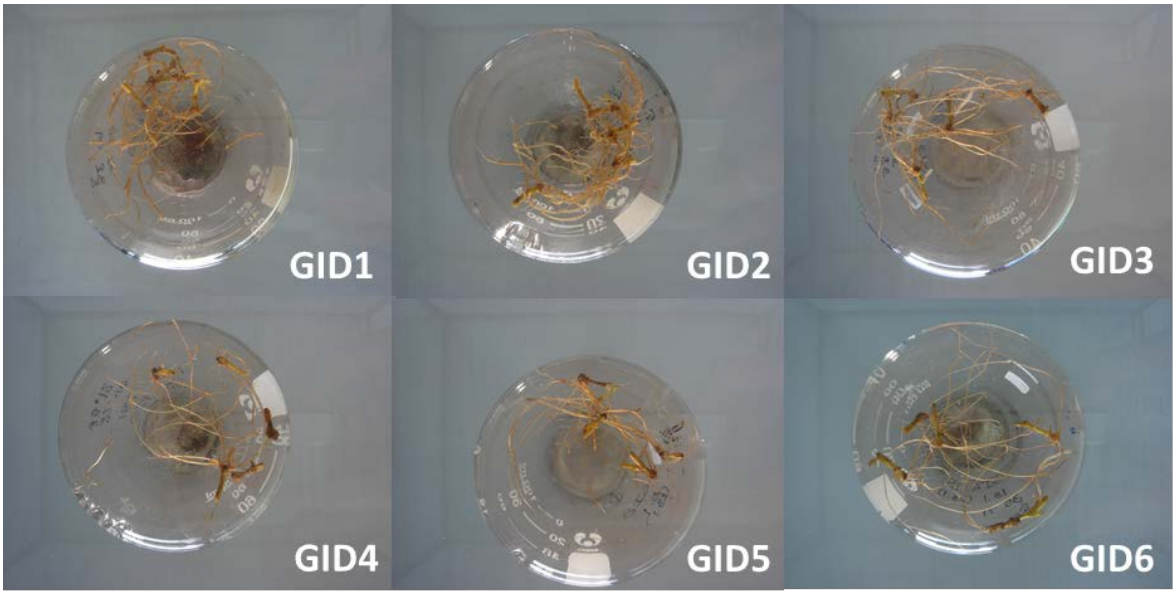
จากผลการตรวจสอบยีน *rol*C บนรากฝอยของชะเอมเทศที่เจริญจากบริเวณรอยแผลที่ทำการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 พบว่าแถบของดีเอ็นเอของ *A. rhizogenes* A13 ปรากฏที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 2000 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rol*C ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอจากรากฝอยของชะเอมเทศที่เกิดจากการถ่ายโอนยีนโดย *A. rhizogenes* A13 ปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2000 คู่เบส (ภาพที่ 12)



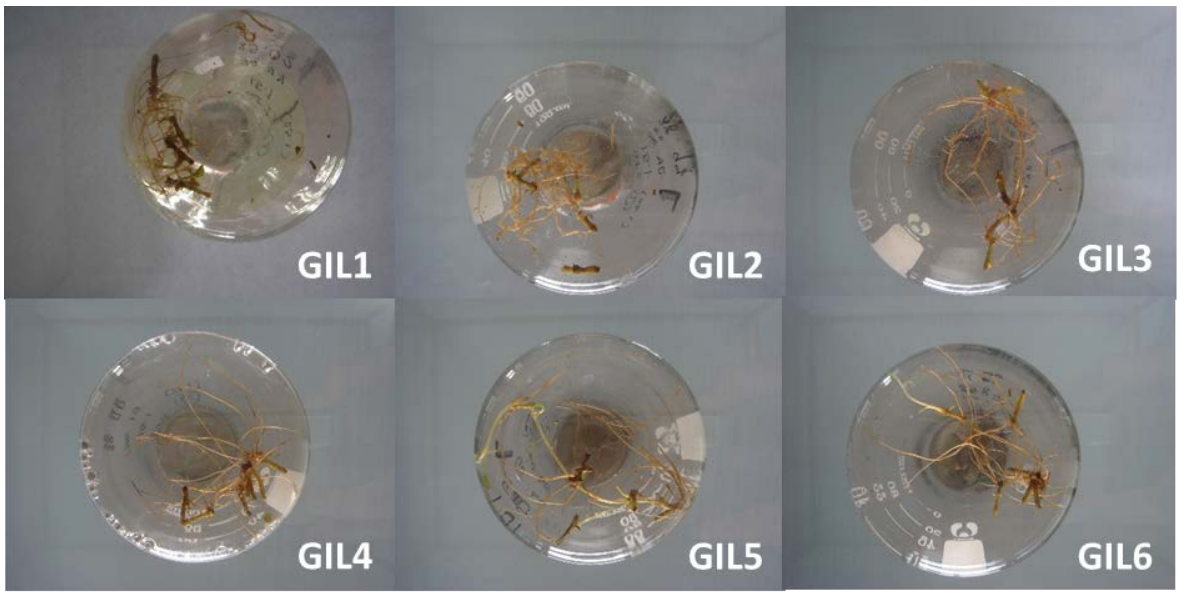
ภาพที่ 12 ดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟไรซิส (L0) คือ ผลการเพิ่มปริมาณ *rol*C จากรากที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (L1) 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) (L2) คือ ผลการเพิ่มปริมาณ *rol*C จากพลาสมิด *A. rhizogenes* A13 (L3 – L5) ผลการเพิ่มปริมาณ *rol*C จากรากที่ได้รับการถ่ายยีนจาก *A. rhizogenes* A13

การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศรวมทั้งกระตุ้นให้มีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิ ในสภาพปลอดเชื้อ

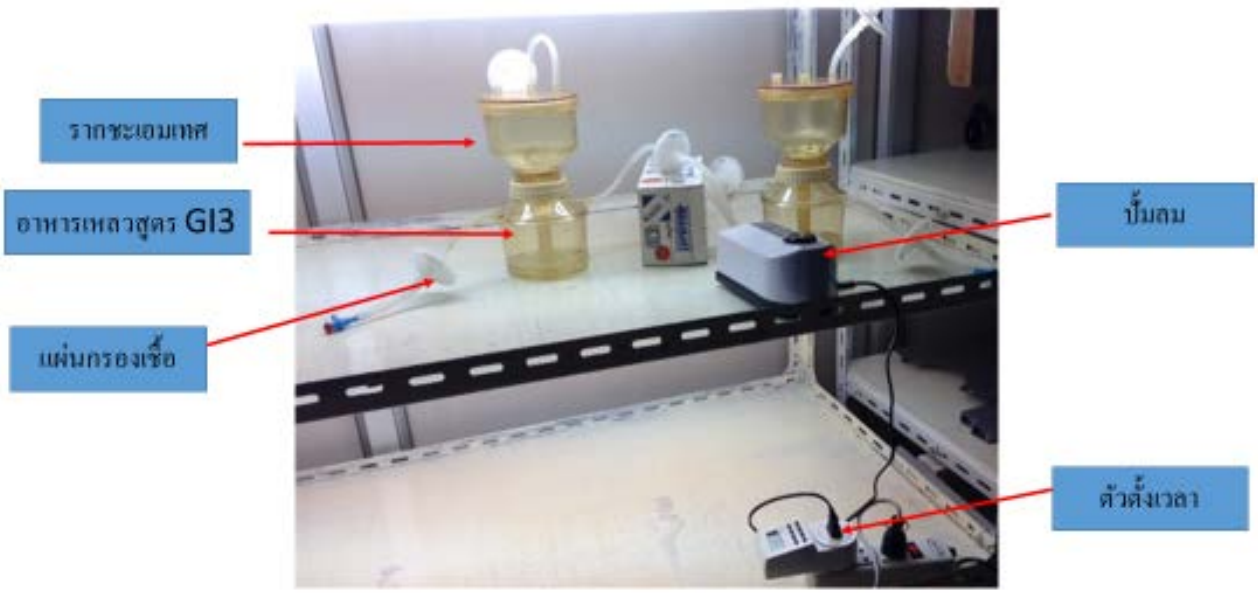
การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ โดยใช้รากที่มีส่วนโคนต้นติดอยู่ด้วย พบว่ารากชะเอมเทศ ที่เลี้ยงในอาหารเหลวทุกสูตรทั้งในสภาวะมีแสง และไม่มีแสงเริ่มมีการสร้างรากฝอยภายหลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสภาวะมืด และสภาวะที่มีแสงสว่างสังเกตเห็นความแตกต่างไม่เด่นชัดในเรื่องของการสร้างราก เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารพบว่ามีการสร้างรากฝอยสีขาวงอกจากรากเดิมอย่างเห็นได้ชัด ในสัปดาห์ที่ 2 โดยรากชะเอมเทศที่เลี้ยงในอาหารสูตร GI3 มีการสร้างรากฝอยจากรากเดิมมากที่สุด ซึ่งรากที่เลี้ยงในอาหารสูตร GI3 ในสภาวะมืด (GID3) มีการเกิดรากฝอยได้ดีกว่ารากที่เลี้ยงในอาหารสูตร GI3 ในสภาวะมีแสง (GIL3) เล็กน้อย ในสัปดาห์ที่ 4 รากใหม่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและหยุดการเจริญเติบโต (ภาพที่ 13 และภาพที่ 14) ผู้วิจัยจึงทำการทดลองซ้ำ โดยนำสูตรอาหาร GI3 มาทดลองโดยเปลี่ยนวิธีการทดลองจากเครื่องเขย่ามาเป็นระบบ temporary immersion (TM) ดังภาพที่ 15 โดยระบบ TM ใช้รากชะเอมเทศเริ่มต้นที่ 1 กรัม ต่ออาหาร 300 มิลลิลิตร และทำการให้อาหารโดยใช้ปั๊มลมดูดอาหารขึ้นมาจนท่วมราก ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วปล่อยลง ทุกๆ 3 ชั่วโมง วันละ 8 ครั้ง ในสภาวะมืด ผลการทดลองพบว่ารากชะเอมเทศที่เลี้ยงด้วยระบบ TM แห้งและไปติดกับขอบของตัวขวด โดยไม่มีการสร้างรากใหม่ และรากกลายเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 เมื่อทดลองตัดแยกรากออกเป็นรากเดี่ยว ๆ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในอาหารสูตรทดลองทุกสูตร



ภาพที่ 13 การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในสภาวะมืดที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ GID1= MS + 0.5 mg/L GA + 1 mg/L NAA, GID2 = MS + 1 mg/L GA + 1 mg/L NAA, GID3 = MS + 0.5 mg/L GA + 1 mg/L IAA, GID4 = MS + 1 mg/L GA + 1 mg/L IAA, GID5 = MS + 0.5 mg/L GA + 1 mg/L IBA, GID6 = MS + 1 mg/L GA + 1 mg/L IBA



ภาพที่ 14 การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในสภาวะมีแสงสว่างที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ GIL1= MS + 0.5 mg/L GA + 1 mg/L NAA, GIL2 = MS + 1 mg/L GA + 1 mg/L NAA, GIL3 = MS + 0.5 mg/L GA + 1 mg/L IAA, GIL4 = MS + 1 mg/L GA + 1 mg/L IAA, GIL5 = MS + 0.5 mg/L GA + 1 mg/L IBA, GIL6 = MS + 1 mg/L GA + 1 mg/L IBA



ภาพที่ 15 การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสูตร GIL3 = MS + 0.5 mg/L GA + 1 mg/L IAA

ผลการทดลองที่ 4 *การชักนำให้รากชะเอมเทศที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสร้างและสะสมสารทุติยภูมิ โดยการใช้ปัจจัยสภาพแวดล้อม และสารกระตุ้น*

ผลการเพิ่มปริมาณรากของชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีน rolC

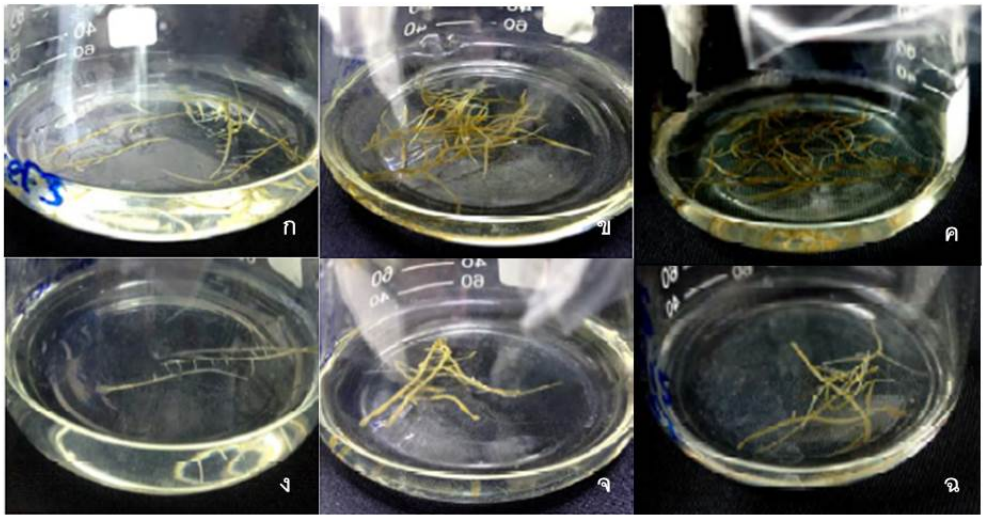
นำรากของชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีนมาเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็งสูตร MS cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณรากให้เพียงพอต่อการนำไปเพาะเลี้ยงรากฝอย จากการเพิ่มปริมาณรากฝอยเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ารากของชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีนเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 16)

ภาพที่ 16 รากฝอยชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีน *rol*C ภายหลังการเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ผลการทดลองที่ 4.1 ศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 2 สูตร คือ MS และ B5 เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของรากฝอยของชะเอมเทศที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS กับ B5 พบว่าให้ผลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ รากของชะเอมเทศเจริญได้ดีที่สุดในสูตรอาหาร MS (ตารางที่ 14 และภาพที่ 17)

ตาราง ที่ 14 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด ของรากฝอยของชะเอมเทศ ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนซึ่งเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และ B5 เป็นเวลา 0, 2, 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)		
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4
MS	0.02±0.00[a]	0.17±0.06[a]	0.36±0.12[a]
B5	0.01±0.00[b]	0.16±0.05[b]	0.28±0.14[b]

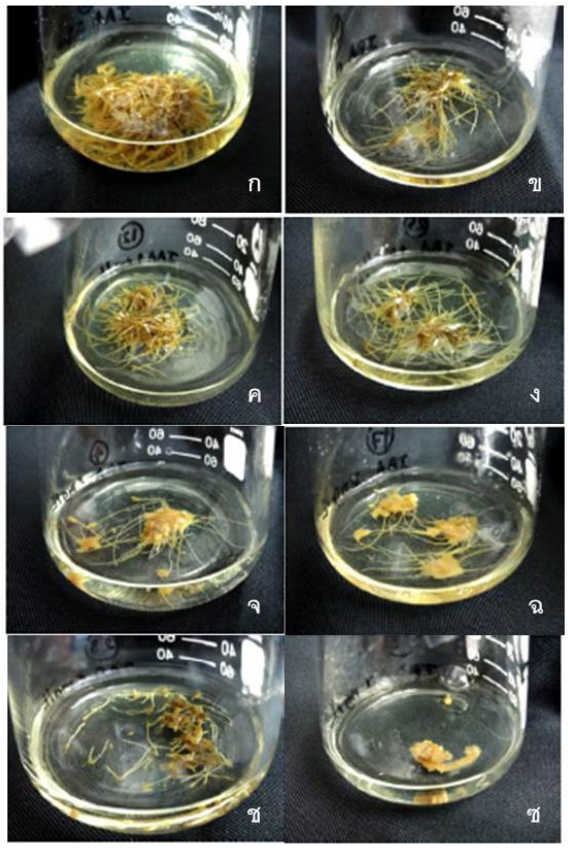


ภาพที่ 17 เปรียบเทียบสูตรอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 2 สูตร ระหว่าง MS (ภาพ ก, ข และ ค) กับ B5 (ภาพ ง, จ และ ฉ) ที่เวลา 0 สัปดาห์ (ภาพ ก และ ง), เวลา 2 สัปดาห์ (ภาพ ข และ จ) และที่เวลา 4 สัปดาห์ (ภาพ ค และ ฉ)

ผลการทดลองที่ 4.2 ศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพิ่มปริมาณราก เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของรากฝอยของชะเอมเทศที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนออกซิน ชนิด IAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ รากของชะเอมเทศเจริญได้ดีที่สุดในสูตรอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนออกซิน ชนิด IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 15 และภาพที่ 18)

ตาราง ที่ 15 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด ของรากฝอยของชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และเติมฮอร์โมนที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 0, 2, 4 สัปดาห์

ฮอร์โมน (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสด (กรัม)		
		สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4
	0	0.0183 ± 0.01^{ab}	0.0150 ± 0.01^{a}	0.1300 ± 0.16^{a}
IAA	0.5	0.0143 ± 0.00^{ab}	0.3433 ± 0.34^{c}	3.1067 ± 0.47^{c}
	1.0	0.0167 ± 0.01^{ab}	0.2167 ± 0.04^{abc}	1.0633 ± 0.88^{b}
	2.0	0.0167 ± 0.01^{ab}	0.2633 ± 0.12^{bc}	0.8967 ± 0.37^{b}
	4.0	0.0117 ± 0.00^{a}	0.1233 ± 0.06^{ab}	0.3700 ± 0.15^{ab}
IBA	0.5	0.0183 ± 0.00^{b}	0.0667 ± 0.05^{ab}	0.3467 ± 0.02^{ab}
	1.0	0.0143 ± 0.00^{ab}	0.0933 ± 0.07^{ab}	0.4567 ± 0.25^{ab}
	2.0	0.0167 ± 0.01^{ab}	0.1500 ± 0.06^{abc}	0.9367 ± 0.16^{b}
	4.0	0.0117 ± 0.00^{a}	0.3333 ± 0.03^{ab}	0.1433 ± 0.17^{abc}

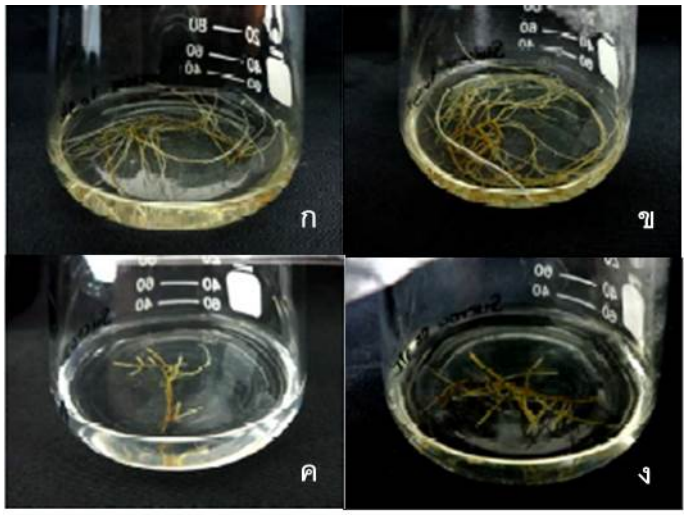


ภาพที่ 18 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในพืชในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA (ภาพ ก, ค, จ และ ช) กับ IBA (ภาพ ข, ง, ฉ และ ซ) ความเข้มข้น 0.5, 1 , 2, 4 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ที่เวลา 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 4.3 การศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของรากฝอยของชะเอมเทศที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม น้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้น 30, 40, 50 และ60 กรัมต่อลิตร พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ รากของชะเอมเทศเจริญได้ดีที่สุดในสูตรอาหาร MS น้ำตาล ซูโครส ที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการเจริญเติบโต (ตาราง ที่ 16 และภาพที่ 19)

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของรากฝอยของชะเอมเทศที่ได้รับการถ่ายโอนยีนซึ่งเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และเติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 0 และ 4สัปดาห์

น้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2
30	0.0167 ± 0.01^{a}	1.0367 ± 0.11^{b}
40	0.0167 ± 0.01^{a}	2.1467 ± 0.20^{c}
50	0.0133 ± 0.01^{a}	0.2267 ± 0.03^{a}
60	0.0133 ± 0.01^{a}	0.1200 ± 0.04^{a}



ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของรากฝอยชะเอมเทศ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30 (ก), 40 (ข), 50 (ค)และ60 (ง) กรัมต่อลิตร ที่เวลา 4 อาทิตย์

ผลการวิเคราะห์สารทุติยภูมิจากรากชะเอมเทศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค HPLC จากการสกัดรากชะเอมเทศอบแห้งด้วย 80% เอทานอล 3 ครั้งและนำไประเหยตัวทำละลายจนได้สารสกัดหยาบสีน้ำตาลเข้มพบว่า รากชะเอมแห้งที่ไม่ได้ถ่ายยีน 0.36 กรัม ได้สารสกัด 0.128 กรัม (35.5 %) และรากชะเอมแห้งที่ได้รับการถ่ายยีน 2.0 กรัม ได้สารสกัด 0.908 กรัม (45.4 %) เมื่อนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอล ได้สารละลายจากรากชะเอมเทศ แล้วทำการหาสภาวะที่เหมาะในหารวิเคราะห์สาร glycyrrhizin ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิสำคัญที่พบในรากชะเอมเทศ โดยใช้สาร glycyrrhizin เป็นสารมาตรฐานวิเคราะห์ตามวิธีของ Sabbioni และคณะ โดยใช้ C8 column ขนาด 150 มิลลิเมตร และใช้ photodiode array เป็น detector และใช้ระบบ isocratic elution ด้วย methanol-acetonitrile-water-acetic acid (35:35:30:1 by vol) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ผลปรากฏว่า mobile phase มีสภาพขั้วสูงมากเกินไป จึงทำให้สารมาตรฐานถูกตรวจวัดที่เวลา 2.6 นาที จึงต้องปรับลดสภาพขั้วของ mobile phase ให้เหมาะสมมากกว่านี้ เมื่อทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Jiang และคณะ โดยใช้ C18 column ขนาด 150 มิลลิเมตร และใช้ photodiode array เป็น detector และใช้ระบบ isocratic elution ด้วย methanol-water-acetic acid (65:34:1) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 มิลลิเมตร ผลปรากฏว่า mobile phase มีสภาพขั้วต่ำเกินไป จึงทำให้การวิเคราะห์สารมาตรฐานถูกตรวจวัดที่เวลา 34 นาที ซึ่งต้องปรับสภาพขั้วของ mobile phase ให้เหมาะสมมากกว่านี้ เมื่อทำการวิเคราะห์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Jiang และคณะ โดยใช้ เครื่อง MPLC : C18 column ขนาด 150 มิลลิเมตร และใช้ UV detector เป็น detector และใช้ระบบ isocratic elution ด้วย methanol-water-acetic acid (75:24.5:0.5) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่า สารมาตรฐาน glycyrrhizin ถูกตรวจวัดที่เวลา 11.54 นาที ดังนั้นจึงนำวิธีการนี้ไปวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดรากชะเอมเทศในสภาวะปลอดเชื้อ ได้แก่ รากชะเอมเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและรากชะเอมเทศที่มีการถ่ายยีน ผลการวิเคราะห์เบื้องต้น พบว่า ตัวอย่างรากชะเอมเทศทั้งสอง มีสาร glycyrrhizin เป็นองค์ประกอบสำคัญในสารสกัดที่ได้จากรากชะเอมเทศที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

อภิปลายและวิจารณ์ผล

1. การติดตามผลการถ่ายยีน *rol*C ที่ทำการถ่ายยีนด้วยพลาสมิส pEXM120 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *rol*C ได้จากทั้ง 18 รากที่มีการตรวจพบยีน *rol*C ที่ระยะเวลา 60 วันภายหลังการถ่ายยีน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก พลาสมิดที่ใช้ เป็น multi-auto-transformation (MAT) vector system ซึ่งภายหลังการถ่ายยีนระยะหนึ่งจะมีการนำเอายีนเป้าหมายออกจากเซลล์พืช ด้วยระบบ site-specific recombination system (R/RS) (Ebinuma *et al.* 2005) ผู้วิจัยจึงได้พยายามสร้างพลาสมิสลูกผสมขึ้นใหม่โดยทำการตัดย้ายยีน *rol*ABC จากพลาสมิด pEXM120 ไปยังพลาสมิด pCAMBIA3300 ซึ่งจะสามารถทำให้ยีนที่นำเข้าสู่เซลล์พืชอยู่ได้อย่างถาวร หรือใช้ *Agrobacterium rhizogenes* ในการสร้างราก
2. รากชะเอมเทศ ที่เลี้ยงในสภาวะมืด และสภาวะที่มีแสงสว่างสังเกตเห็นความแตกต่างไม่เด่นชัดในเรื่องของการสร้างรากใหม่ แต่สังเกตเห็นความแตกต่างได้ชัด ในเรื่องการสร้างต้นใหม่ออกมาจากโคนรากที่เลี้ยงในสภาวะมีแสงสว่างซึ่งอาจเป็นอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงรากในอนาคต การเลี้ยงรากในอาหารเหลวจึงควรเลือกใช้เฉพาะส่วนของรากที่ไม่ติดโคนต้น ทั้งนี้มีรายงานการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงสว่างมีผลยับยั้งการสร้างรากใหม่ (Yang, *et al.* 2006) แต่มีรายงานในพืชหลายชนิดเช่น *Dracocephalum moldavica* ที่พบว่าเมื่อเลี้ยงรากในสภาวะที่มีแสงสว่างจะให้น้ำหนักสดของรากได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในที่มืด (Weremczuk-Jezyna, *et al.* 2013) และการเพาะเลี้ยงรากในสภาวะที่มีแสงสว่างให้ทั้งชนิด และปริมาณสารทุติยภูมิมากกว่าการเพาะเลี้ยงรากในที่มืด (Tusevski, *et al.* 2013)
3. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่แผ่นใบ และลำต้นของชะเอม พบว่าทั้งแผ่นใบและลำต้นสามารถสร้างรากฝอยได้ โดยส่วนของลำต้นสามารถสร้างรากฝอย ได้จำนวนมากกว่าแผ่นใบและรากที่เกิดมีการสร้างรากแขนงได้ดีกว่ารากที่เกิดจากแผ่นใบ ทั้งนี้ในการผลิตรากฝอยปริมาณมาก ก็มีการนำแผ่นใบชะเอมเทศมาใช้เป็นชิ้นเนื้อเยื่อสำหรับถ่ายยีนด้วยเช่นกัน เช่นมีการใช้ *A. rhizogenes* k599 ชักนำให้เกิดรากฝอยจากแผ่นใบเพื่อนำไปขยายเพิ่มปริมาณรากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Mehrotra, *et al.* 2008) ส่วนการสร้างบาดแผลโดยวิธีการใช้เข็มจิ้มสามารถชักนำให้ส่วนต่าง ๆของชะเอมเทศ รวมถึงพืชอื่น ๆมีการเกิดรากฝอยได้ดี เช่น Japanese apricot (Gao *et al*., 2009) เจตมูลเพลิงแดง (สุภาภรณ์, 2547) ความเข้มข้น AS ทั้งสามระดับทำให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักรากฝอยของชะเอมเทศ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แม้ว่า AS จะมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของยีน T-DNA ของ *A. rhizogenes* แต่ทั้งนี้ปัจจัยอื่น ๆเช่นสายพันธุ์ *A. rhizogenes* รวมถึงปัจจัยแวดล้อมทั้งชนิดของพืช และชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ใช้อาจมีอิทธิพลเหนือประสิทธิภาพในการทำงานของ AS
4. เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณรากชะเอมเทศ พบว่ารากชะเอมเทศสามารถเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร MS ได้ดีกว่าสูตร B5 อาจเนื่องจากสูตรอาหาร MS มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของรากฝอยมากกว่า แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอีกด้วยเนื่องจากงานวิจัยของ รังสิรัตน์ (2535) พบว่า รากฝอยของ *Datura metel* Linn. สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารดัดแปลงสูตร B5 แทนที่จะเป็น MS การเพิ่มปริมาณรากฝอยชะเอมเทศในอาหารที่มี IAA และ IBA พบว่าเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเพิ่มน้ำหนักสดรากได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ไม่มี IAA และ IBA แต่ทั้งนี้รากที่เกิดและเจริญในอาหารที่มี IAA และ IBA มีลักษณะที่ผิดปกติ คือรากจะบวมและเกิดเป็นกระจุกแน่น เมื่อเลี้ยงนานกว่า 4 สัปดาห์ รากไม่สามารถเจริญยืดยาวต่อไปได้ และตายในที่สุด อาจเนื่องมาจากฮอร์โมนออกซิน มีผลกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ และการยืดตัวของเซลล์พืช (พีรเดช, 2537) จึงทำให้รากชะเอมเทศที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมออกซินมีการเจริญเติบโตดีในระยะแรกเนื่องจากออกซินมีคุณสมบัติทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และการเกิดเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นจนไปเบียด

เนื้อเยื่ออื่น ๆ ดังนั้นเมื่อใช้ไปนานๆ หรือที่ความเข้มข้นสูงมาก ๆจะทำให้รากของชะเอมเทศเจริญได้ไม่ดีและตายได้ รากของชะเอมเทศเจริญได้ดีที่สุดในสูตรอาหาร MS น้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการเจริญเติบโต โดยทั่วไปพืชจะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อได้รับปริมาณของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มถึงจุดหนึ่งพืชจะลดการเจริญเติบโตลง เช่นใน Nephrolepis biserrata เมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มี น้ำตาล 15 – 45 กรัมต่อลิตร ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ดี แต่เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีปริมาณน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร การเจริญเติบโตจะลดลง (Sandra and Natoniel, 2004)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. วิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดชะเอมเทศคือ แช่เมล็ดใน เอทานอล 70% นาน 1 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite 10% ร่วมกับ tween-20 0.02% นาน 10 หรือ 20 นาที สารควบควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดชะเอมเทศสร้างยอดใหม่ได้แก่ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 หรือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดชะเอมเทศสามารถเกิดรากได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA หรือ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนในอาหารเหลวสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงรากในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี GA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รากชะเอมเทศมีการสร้างรากฝอยใหม่ดีที่สุด โดยเมื่อเลี้ยงในสภาพมืด รากเดิมมีการสร้างรากฝอยได้ดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง เมื่อทำการตัดแยกรากเป็นรากเดี่ยว ๆไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้
3. เมื่อทำการทดลองถ่ายยีน *rol*ABC เข้าสู่ส่วนของ ราก ใบ และลำต้นชะเอมเทศ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พลาสมิด pEXM120 เบื้องต้นพบว่ามีเฉพาะส่วนของรากที่สามารถสร้างรากใหม่ที่มี ยีน *rol*ABC แต่เนื่องจากรากที่จะใช้ในการถ่ายยีนมีปริมาณน้อย มีขนาดเล็ก ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง
4. เมื่อทำการทดลองถ่ายยีน *rol*ABC โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenese* สายพันธุ์ A13 พบว่าส่วนของลำต้นที่มีการสร้างบาดแผลโดยวิธีการจิ้ม สามารถสร้างรากฝอยได้ดีที่สุด และรากฝอยที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที
5. จากการวิเคราะห์รากชะเอมเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อทั้งรากที่ได้รับการถ่ายยีน และรากที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค HPLC เบื้องต้นพบว่ารากทั้งสองชนิดมีการสะสมสาร glycyrrhizin แต่ยังต้องศึกษาเชิงลึกต่อไปเพื่อทราบองค์ประกอบทางเคมีของสารทุติยภูมิอื่น ๆ จากสารสกัดรากชะเอมเทศ พร้อมทั้งเปรียบเทียบปริมาณสาร glycyrrhizin จากรากชะเอมเทศที่มีการถ่ายยีนและไม่มีการถ่ายยีน เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพร และพัฒนาการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

Awad, V., Shirke, R., Mukherjee, S., Khadke, S., Pawar, P., Meti, N., Harsulkar, A., 2011. Somatic embryogenesis, regeneration and in vitro production of glycyrrhizic acid from root cultures of Taverniera cuneifolia (Roth) Arn. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 47, 525-535.

Chandra, S., Chandra, R., 2011. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. Phytochemistry Reviews 10, 371-395.

Ciau-Uitz, R., Miranda-Ham, M.L., Coello-Coello, J., Chí, B., Pacheco, L.M., Loyola-Vargas, V.M., 1994. Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of Catharanthus roseus. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 30, 84-88.

Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Fliniaux, M.A., 2000. Effects of the rol C gene on hairy root: Induction development and tropane alkaloid production by Atropa belladonna. Journal of Natural Products 63, 1249-1252.

Ebinuma, H., K. Sugita, S. Endo, E. Matsunaga, and K. Yamada. 2005. Elimination of marker genes from transgenic plants using MAT vector system. In L. Pena (Ed.), Transgenic plants (pp. 237 – 253). Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.

Ghosh, B., Mukherjee, S., Jha, T.B., Jha, S., 2002. Enhanced colchicine production in root cultures of Gloriosa superba by direct and indirect precursors of the biosynthetic pathway. Biotechnology Letters 24, 231-234.

Giri, A., Narasu, M.L., 2000. Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. Biotechkknology Advances 18, 1-22.

Goel, M.K., Mehrotra, S., Kukreja, A.K., 2011. Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: An insight study. Applied Biochemistry and Biotechnology 165, 1342-1355.

Jacob, A., Malpathak, N., 2004. Green hairy root cultures of Solanum khasianum Clarke - A new route to in vitro solasodine production. Current Science 87, 1442-1447.

Jiang, Y., Lu, H. and Chen, F. 2004. Preparative purification of glycyyhizin extracted from the root of liquorice using high-speed counter-current chromatography. J. Chromatog. 1033, 183-186

Kojoma, M., Ohyama, K., Seki, H., Hiraoka, Y., Asazu, S.N., Sawa, S., Sekizaki, H., Yoshida, S., Muranaka, T., 2010. In vitro proliferation and triterpenoid characteristics of licorice (glycyrrhiza uralensis fischer, leguminosae) stolons. Plant Biotechnology 27, 59-66.

Kondratenko, R.M., Baltina, L.A., Mikhailova, L.R., Danilov, V.T., Gabbasov, T.M., Murinov, Y.I., Tolstikov, G.A., 2005. Obtaining glycyrrhizic acid and its practically useful salts from a commercial licorice root extract. Pharmaceutical Chemistry Journal 39, 84-88.

Mannan, A., Shaheen, N., Arshad, W., Qureshi, R.A., Zia, M., Mirza, B., 2008. Hairy roots induction and artemisinin analysis in Artemisia dubia and Artemisia indica. African Journal of Biotechnology 7, 3288-3292.

Mehrotra, S., A. K. Kukreja, S. P. S. Khanuja and B. N. Mishra. 2008. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of Glycyrrhiza glabra in bioreactor. Journal of Biotechnology. 21(2)

Mukundan, U., Hjortso, M.A., 1991. Growth and thiophene accumulation by hairy root cultures of Tagetes patula in media of varying initial pH. Plant Cell Reports 9, 627-630.

Murthy, H.N., Dijkstra, C., Anthony, P., White, D.A., Davey, M.R., Power, J.B., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2008. Establishment of Withania somnifera hairy root cultures for the production of withanolide A. Journal of Integrative Plant Biology 50, 975-981.

Sabbioni, C., Ferranti, A., Bugamelli, F., Forti, G. C. and Raggi, M. A. Simultaneous. 2006. HPLC Analysis, with Isocratic Elution, of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic acid in Liquorice Roots and Confectionery Products. Phytochem. Anal. 17, 25-31

Shanks, J.V., Morgan, J., 1999. Plant 'hairy root' culture. Current Opinion in Biotechnology 10, 151-155.

Shimomura, K., Sauerwein, M., Ishimaru, K., 1991. Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of solanaceous plants. Phytochemistry 30, 2275-2278.

Tusevski, O., Petreska Stanoeva, J., Stefova, M. and Simic, S. G. 2013. Phenolic profile of dark-grown and photoperiod-exposed hypericum perforatum L. hairy root cultures. The Scientific World Journal 2013, 1-9.

Tocci, N., D'Auria, F.D., Simonetti, G., Panella, S., Palamara, A.T., Pasqua, G., 2012. A three-step culture system to increase the xanthone production and antifungal activity of Hypericum perforatum subsp. angustifolium in vitro roots. Plant Physiology and Biochemistry 57, 54-58.

Weremczuk-Jezyna, I., Grzegorczyk-Karolak, I., Frydrych, B., Królicka, A., and Wysokinska, H. 2013. Hairy roots of Dracocephalum moldavica: Rosmarinic acid content and antioxidant potential. Acta Physiologiae Plantarum 35(7): 2095-2103.

Yang, S. H., X. F. Liu, X. Shen, and J. H. Zheng. 2006. Ri plasmid transformation of Glycyrrhiza uralensis and effects of some factors on growth of hairy roots. Zhongguo Zhongyao Zazhi 31(11): 875-878.

Zhou, L., Cao, X., Zhang, R., Peng, Y., Zhao, S., Wu, J., 2007. Stimulation of saponin production in Panax ginseng hairy roots by two oligosaccharides from Paris polyphylla var. yunnanensis. Biotechnology Letters 29, 631-634.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. สำนักพิมพ์ วี.บี. บุ๊คเซนเตอร์, กรุงเทพฯ.

รังสิรัตน์ รัตนโกเมศ. ศึกษาแฮรี่รูทของลำโพงสลักที่เกิดจากอะโกรแบคทีเรียม ไรโซจีเนส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

ภาคผนวก

สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการทดลอง

1. สูตรอาหาร Luria broth agar (LB agar)

ทริปซิน (Tryptone)	10.00	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.00	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.00	กรัม
วุ้น	15.00	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1	ลิตร
pH 7.0		

2. สูตรอาหาร Murashige and Shoog medium

Stock solution 1

ชื่อสาร	มิลลิกรัมต่อลิตร	10X(กรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650	16.5
KNO_3	1900	19.0
$CaCl_2.2H_2O$	440	4.4
$MgSO_4.7H_2O$	370	3.7
KH_2PO_4	170	1.7

Stock solution 2

ชื่อสาร	มิลลิกรัมต่อลิตร	200X(กรัมต่อลิตร)
H_3BO_3	6.2	1.24
$MnSO_4.H_2O$	22.3	4.46
$ZnSO_4.H_2O$	10.93	2.186
KI	0.83	0.166
$Na_2MoO_2.2H_2O$	0.25	0.05
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.005
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.005

Stock solution 3

ชื่อสาร	มิลลิกรัมต่อลิตร	100X(กรัมต่อลิตร)
Disodium EDTA	37.25	3.725
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	2.785

Stock solution 4

ชื่อสาร	มิลลิกรัมต่อลิตร	100X(กรัมต่อลิตร)
Glycine	2.0	0.20
Nicotinic acid	0.5	0.05
Pyridoxine-HCl	0.5	0.05
Thiamin-HCl	0.1	0.01
Myo-Inositol	100	10.0

คณะนักวิจัย

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย
ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2579-1026

หัวหน้าโครงการ
ดร.วิภารัตน์ พิทักษ์ด่านธรรม (ชำนาญการ)
ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออุตสาหกรรม ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8600-3

ผู้ร่วมโครงการ
ดร. เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์
หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120 โทรศัพท์และโทรสาร 02-5646700

นางสาววิลาสินี กวีกิจธรรมกุล
ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออุตสาหกรรม ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8600-3 ต่อ 301

นายดำรงศักดิ์ อายุวนานนท์
ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8600-3