บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การปรับปรุงเทคนิคเบื้องต้นบางประการที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 เทคนิคการเพาะเมล็ดลำโพงกาสลัก

การวิจัยนี้ใช้ explant จากต้นกล้าลำโพงกาสลัก ซึ่งต้องเพาะในสภาพปลอดเชื้อ แต่เนื่องจากเมล็ดลำโพงกาสลัก มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนา และ แข็งมาก การเพาะโดยวิธีธรรมดาจึงไม่ได้ผล เนื่องจากเอมบริโอไม่สามารถงอกออกมาได้ การงอกของเมล็ดพืชนี้ ในธรรมชาติเข้าใจว่าจำเป็นต้องอาศัยจุลชีพในดินช่วยย่อยสลายเปลือกหุ้มเมล็ดก่อนเอมบริโอจึงสามารถงอกออกมาได้ การทดลองนี้ได้ศึกษาวิธีการเพาะเมล็ดหลายวิธี พบว่าวิธีที่ให้ผลดีคือ นำเมล็ดมาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกก่อนในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งทำให้ได้ต้นที่มีความแข็งแรง มีเปอร์เซนต์การงอกสูงถึงประมาณ 90 %

1.2 เทคนิคการฆ่าเชื้อ A. rhizogenes บน hairy root

การฆ่าเชื้อ A. rhizogenes หลังจากทำ co-culture แล้วตามวิธีของ Kamada และคณะ (1986) ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์ท่านอื่นๆใช้ โดยการเติม carbenicillin 0.5-1.0 กรัม/ลิตร ลงในอาหารแข็ง พบว่าไม่สามารถใช้ได้ในการทดลองนี้ ซึ่งในวิธีการแก้ไขนี้ไม่อาจจะเลือกใช้ปริมาณ carbenicillin เพิ่มมากขึ้นได้ เนื่องจากเกรงว่าไปมีผลกระทบต่อการเจริญของ hairy rootได้ในภายหลัง จึงจำเป็นต้องใช้ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่มีผู้เคยใช้คือไม่เกิน 1 กรัม/ลิตร โดยนำ hairy root มาล้างในอาหารเหลว ซึ่งใส่ carbenicillin 1 กรัม/ลิตร หลาย ๆ ครั้ง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งซึ่งใส่ carbenicillin 0.5 กรัม/ลิตร เป็นระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งได้ผลดีขึ้นเนื่องจากการล้างทำให้ A. rhizogenes ถูกกำจัดไปได้มาก และทั่วถึงกว่าการวางชิ้น hairy root ไว้กับที่บนอาหารแข็ง

2. การชักนำให้เกิด hairy root

เมื่อทำ co-culture ระหว่าง A. rhizogenes และ explantของลำโพงกาสลัก พบว่า A. rhizogenes สายพันธุ์ R1000 A4 และ 8196 มีเปอร์เซนต์การเกิดสูงมากคือ 98.5 % 95.7 % และ 76.2 % ตามลำดับ เมื่อมีชิ้นใบเป็น explant ส่วนในสายพันธุ์ 15834 ให้ผลน้อยมากเพียง 33.6 % (ตารางที่ 2) และ เมื่อเทียบกับบนรอยตัดลำต้น พบว่าเปอร์เซนต์การเกิด hairy root บนชิ้นใบสูงกว่ามาก (ตารางที่ 3) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการเจริญของเชื้อ A. rhizogenes บนรอยตัดลำต้นที่มากเกินไป ไปทำลายเนื้อเยื่อบริเวณรอยตัดมากกว่าไปชักนำให้เกิด hairy root ส่วนในชิ้นใบไม่พบปัญหาดังกล่าวนี้เนื่องจากใช้เทคนิคในการทำ co-culture ต่างกัน โดยในรอยตัดลำต้นใช้วิธีการป้ายเชื้อลงบนรอยตัด และไม่มีการฆ่าเชื้อระหว่างการเลี้ยงแบบ co-culture แต่ในชิ้นใบใช้วิธีแช่ชิ้นใบใน bacterial solution หลังจากนั้น 4 วัน ต้องนำชิ้นใบมาเลี้ยงในอาหารที่ใส่ carbenicillin จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อส่วนเกินไว้ได้ และด้วยเหตุผลเดียวกันนี้ อาจเป็นสาเหตุให้เปอร์เซนต์การชักนำให้เกิด hairy root บนชิ้นใบสูงกว่าบนรอยตัดของลำต้นเป็นอย่างมาก นอกเหนือจากสาเหตุความแตกต่างของเนื้อเยื่อในใบ และในลำต้น ซึ่งใบมีเซลล์ parenchyma มากอยู่ในชั้นเนื้อเยื่อ mesophyll และเซลล์ parenchyma นี้เกิด redifferentiation ไปได้ง่าย ส่วนลำต้นมีเซลล์ parenchyma อยู่ที่ pith ซึ่งเมื่อเทียบจากพื้นที่บริเวณรอยตัดแล้ว บนชิ้นใบมีรอยตัดผ่านเซลล์ parenchyma มากกว่าบนลำต้น และจากความสามารถในการชักนำให้เกิด hairy root ได้ดีไม่เท่ากันใน A. rhizogenes สายพันธุ์ต่างๆ 4 สายพันธุ์นี้ อาจเป็นไปได้ว่าเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ (Petit และคณะ , 1983 และ White และคณะ, 1985) ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานที่ได้ผลการทดลองทำนองเดียวกัน โดย David และ Tempe (1988) พบว่าการชักนำให้เกิด hairy root ใน Brassica oleracea L. โดย A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 และ 15834 ให้ผลดีกว่าสายพันธุ์ 8196 TR 101 และ TR 7 และ Brillanceau และคณะ (1989) พบว่าการชักนำให้เกิด hairy root ใน Catharanthus roseus G. Don โดย A. rhizogenes สายพันธุ์ 15834 ได้ผลดีกว่าสายพันธุ์ HRI และ A4 ดังนั้นจึงเห็นได้ว่านอกจากความสามารถในการชักนำให้เกิด hairy root จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ของ A. rhizogenes แล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย

3. การศึกษาการเจริญของ hairy root

3.1 การเจริญของ hairy root บน explant

การศึกษาการเจริญของ hairy root บนรอยตัดของลำต้น และชิ้นใบ หลังจากสามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้แล้ว เป็นขั้นตอนที่ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง hairy root ขณะอยู่บน explant ให้โตและแข็งแรงพอก่อนจะแยกลงเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อไป พบว่าในที่มืด hairy root สามารถเจริญได้ดีกว่าที่สว่าง โดยให้ผลเหมือนกันทั้ง hairy root ที่อยู่บนลำต้น (ตารางที่ 7) และ บนชิ้นใบ (ตารางที่ 12) และใน hairy root ทุกเบอร์ ยกเว้นเพียง hairy root R1000 ที่เจริญบนลำต้น ซึ่งพบว่าให้ผลการเจริญไม่ดีมาตั้งแต่เริ่มเกิด ดังนั้น การเปรียบเทียบจึงไม่สามารถเห็นผลของความแตกต่างได้ กรณีที่ hairy root บน explant สามารถเจริญในที่มืด ได้ดีกว่าในที่สว่างนั้น ยังไม่ทราบสาเหตุที่ชัดเจน อย่างไรก็ดีการทดลองนี้สามารถใช้เป็นประโยชน์ต่อไปได้ เนื่องจาก hairy rootเพิ่งจะเริ่มเกิดยังไม่มีความแข็งแรงพอ จึงต้องเลือกสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญ นอกจากนี้ยังพบว่า hairy root ที่เจริญบนชิ้นใบ มีการเจริญดีกว่า hairy root บนรอยตัดของลำต้น ใน hairy root ทุกเบอร์ และทั้งในสภาวะสว่าง และมืด จึงเห็นได้ว่าการใช้ใบเป็น explant สำหรับชักนำให้เกิด hairy rootนี้ นอกจากให้ผลดีต่อการชักนำให้เกิด hairy root แล้ว ยังเป็นผลดีต่อมาถึงการเจริญของ hairy root บน explant อีกด้วย ที่เป็นเช่นนี้เป็นไปได้ว่า hairy root บนชิ้นใบสามารถได้รับอาหารทั้งทางตรง และทางอ้อม คือ รับผ่านทาง hairy root โดยตรง และรับผ่านทางใบตามลักษณะการเลี้ยง ซึ่งวางไว้บนอาหารทำให้ hairy root สามารถสัมผัสอาหารได้ ต่างจากใน hairy root บนรอยตัดลำต้น ซึ่งได้รับแต่อาหารที่ส่งผ่านมาทางลำต้นเท่านั้น

3.2 การเจริญของ hairy root ที่แยกมาเลี้ยง

3.2.1 การเจริญของ hairy root ในอาหารแข็ง

การศึกษาการเจริญของ hairy root ในอาหารแข็งเป็นการศึกษาเพื่อหาสูตรที่ hairy root สามารถเจริญได้ดีเพื่อการขยายปริมาณ hairy root ในอาหารแข็งก่อนจะนำไปศึกษาการเจริญ และขยายปริมาณในอาหารเหลวต่อไป จากการที่พบว่าสูตรอาหารที่มีผู้นิยมใช้เลี้ยง hairy root ที่พบได้บ่อยคือ สูตร MS (Tanaka และคณะ, 1985 ; Kamada และคณะ, 1986; Nakamura และคณะ, 1988 ; Mugnier, 1988 และ Noda และคณะ 1987) และสูตร B5 (Hamill และคณะ, 1986 ; Payne และคณะ, 1987 ;

Robin และคณะ, 1987 และ Parr และคณะ, 1988) ผู้วิจัยจึงได้นำสองสูตรนี้มาเป็นหลักในการศึกษาร่วมกับสูตร White ที่ปรับปรุงใหม่ โดยทุกสูตรใช้ธาตุอาหารรองตามสูตร MS แต่มีธาตุอาหารหลักต่างกัน ซึ่งสามารถเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นของอิออนของธาตุต่างๆได้ดังนี้

สูตรอาหาร	ความเข้มของอิออนของธาตุอาหารหลัก (mM)								
	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	NH_4^+	NO_3^-	$H_2PO_4^-$	Cl^-	SO_4^{2-}
A (MS)	20.04	–	2.99	1.50	20.61	39.40	1.25	5.98	1.54
B (1/2 MS)	10.02	–	1.49	0.75	10.30	19.70	0.62	2.99	0.75
C (B5)	25.00	1.00	1.00	1.00	2.00	25.00	1.10	2.00	2.00
D (1/2 B5)	12.50	0.55	0.50	0.50	1.00	12.50	0.55	1.00	1.00
E (White)	1.66	2.94	1.27	2.92	–	3.33	0.12	0.87	4.33

ผลการทดลองพบว่า hairy root เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสูตร C (modified B5) ขณะที่ในสูตร A (modified MS) hairy rootมีการกลายเป็นแคลลัสในภายหลัง ในสูตร B (modified 1/2 MS) เมื่อเลี้ยง hairy root ไปแล้วพบว่า รากมีสีออกไปทางสีน้ำตาลอ่อน ๆ ในสูตร D (modified 1/2 B5) hairy root มีสีขาว แต่เจริญได้ช้ากว่าสูตร C และในสูตร E hairy root เจริญได้ช้าที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของอิออนของธาตุอาหารหลักต่างกัน ซึ่งจะเห็นได้ชัดว่าในสูตร A มี NH_4^+ สูงกว่าสูตร C ถึง 10 เท่า ส่วนปริมาณอิออนอื่น ๆ ไม่แตกต่างกันมากนักกับสูตร C จึงอาจเป็นไปได้ว่า NH_4^+ เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ hairy root มีการกลายเป็นแคลลัส ประกอบกับ hairy root เป็นที่มียีนสำหรับการสังเคราะห์ auxin ได้เองอยู่คือยีน tms-1 และ tms-2 (Schroder และคณะ, 1984 Thomashow และคณะ 1984) จึงอาจเป็นปัจจัยร่วมที่ทำให้เกิดการกลายของ

hairy root ไปเป็นแคลลัสได้โดยง่าย ทั้งที่เลี้ยงในอาหารซึ่งไม่มีฮอร์โมนใด ๆ ส่วนในสูตร B ถึงแม้จะมีปริมาณความเข้มข้นของอิออนลดลงครึ่งหนึ่งจากสูตร A ทำให้ปริมาณใกล้เคียงกับในสูตร C เกือบทุกธาตุ แต่อย่างไรก็ดีความเข้มข้นของ NH_4^+ ยังคงมีความแตกต่างกันถึง 5 เท่า จึงเป็นไปได้เช่นกันว่าการที่ hairy root ที่เจริญในอาหารสูตร B มีสีออกน้ำตาลอ่อน ต่างจากในสูตร C ซึ่งมีสีขาว อาจเนื่องมาจาก NH_4^+ ไปมีผลอย่างหนึ่งอย่างใดต่อการเจริญของ hairy root เช่นกัน และในสูตร D และ E hairy root มีการเจริญได้ช้าทั้งนี้เนื่องจากปริมาณธาตุอาหารหลักไม่เพียงพอ โดยเฉพาะในสูตร E ซึ่งมีน้อยมากจนสามารถเห็นการเจริญแตกต่างจากสูตรอื่น ๆ อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังสามารถเห็นลักษณะการเจริญของ hairy root จากอาหารทั้ง 5 สูตร ได้ว่ามีการเจริญเร็วกว่า in vitro root แตกสาขามาก และไม่มีทิศทางการเจริญที่แน่นอน ต่างจากใน in vitro root ในอาหารทั้ง 5 สูตร ซึ่งมีการเจริญช้า แทบไม่มีการแตกสาขาใหม่ และมีทิศทางการเจริญลงสู่พื้น (ภาพที่ 13 และ14) ลักษณะการเจริญของ hairy root ดังกล่าวเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปแม้เป็น hairy root จากพืชต่างชนิดกัน (Tabata และคณะ, 1985 ; Ooms และคณะ, 1985 ; Noda และคณะ, 1987 ; Mergnier, 1988 และ Jaziri และคณะ, 1988) ซึ่งยังไม่พบว่ามีนักวิทยาศาสตร์ท่านใดอธิบายสาเหตุของปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้ได้ แต่เชื่อว่า auxin ที่ hairy root สร้างขึ้นเองโดยยีนที่ติดมากับ T-DNA น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเลี้ยง hairy rootในอาหารสูตร C ไประยะหนึ่งสามารถเกิด regenerationจาก hairy root ไปเป็นต้นได้เองโดยไม่ต้องอาศัยฮอร์โมนใด ๆ ชักนำ ได้ต้น transformed plant ที่มีลักษณะใบเป็นคลื่น ลำต้นเตี้ย เนื่องจากข้อปล้องสั้น เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Tepfer (1984) ซึ่งได้ต้นจาก hairy root ของ Nicotiana sp. Noda และคณะ(1987) ได้ต้นจาก hairy root ของ Armoracia lapathifolia Gilib Petit (1987) ได้ต้นจาก hairy root ของ Nicotiana tabaccum var. Samsum และการทดลองของ David และ Tempe ซึ่งได้ต้นจาก hairy root ของ Brassica oleracea L. ซึ่งในปี 1988 Schmulling และคณะได้ทำการทดลองและพบว่าการเกิด regenerationใน hairy root เป็นผลจากยีน rol A rol B และ rol C ในT_L-DNA คุณสมบัตินี้นับได้ว่าเป็นข้อได้เปรียบของการนำ A. rhizogenes มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทางพันธุวิศวกรรม เพราะนอกจาก T-DNA จาก Ri plasmid จะเป็นพาหะที่นำยีนใหม่เข้าไปได้เช่นเดียวกับ T-DNA จาก Ti plasmid ของ A. tumefacience แล้ว เซลล์ที่ได้รับยีนใหม่ติดไปกับ

T-DNA ของ A. rhizogenes ยังมีโอกาสเกิด regeneration เป็นต้นไปได้ง่ายกว่า

3.2.2 การเจริญของ hairy root ในอาหารเหลว

เนื่องจากการศึกษาการเจริญของ hairy rootในอาหารแข็งทั้ง 5 สูตร เป็นเพียงการสังเกตลักษณะการเจริญของ hairy root และหาสูตรอาหารแข็งที่เหมาะสำหรับขยายปริมาณเพื่อรอเลี้ยงในอาหารเหลวต่อไปเท่านั้น ไม่สามารถบอกถึงสัดส่วนของการเจริญของ hairy root ที่แน่นอนได้ และเนื่องจากอาหารสูตร A สูตร B และสูตร C เป็นสูตรที่มีการเจริญดีกว่าสูตร D และสูตร E มาก การศึกษาการเจริญของ hairy root ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ จึงเลือกมา 3 สูตร คือ สูตร A สูตร B และสูตร C และมี hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1) เป็นตัวแทนในการศึกษา ในที่สว่างและมืด ซึ่งสามารถบอกถึงความแตกต่างของการเจริญได้ดีกว่า โดยพบว่าการเจริญของ hairy root ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 มีการเจริญที่สามารถเห็นความแตกต่างของการเจริญได้ชัดเจนกว่าในสัปดาห์ที่ 1 โดยพบว่าเมื่อเทียบระหว่างชนิดของ hairy root แล้ว hairy root A4 (1) มีการเจริญดีกว่า hairy root R1000 (1) ในอาหารทุกสูตร โดยเฉพาะในอาหารสูตร C ในที่มืดสามารถเห็นความแตกต่างของการเจริญได้มากที่สุด (ตารางที่ 15) แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกันของ hairy root ซึ่งได้มาจาก plasmid ที่ต่างชนิดกัน (Petit และคณะ, 1983 และ White และคณะ, 1985) มีผลต่อการเจริญที่ต่างกันของ hairy root ต่อมาด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ hairy root ทั้งสองคือสูตร C ซึ่งดีกว่าสูตร A และสูตร B (ตารางที่ 16) สอดคล้องกับผลการเจริญของ hairy root ในอาหารแข็งที่พบว่าสูตร C ให้ลักษณะการเจริญของ hairy root ดีกว่าสูตรอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่าถึงแม้โดยทั่วไป hairy root จะสามารถเจริญได้รวดเร็วในอาหารที่ไม่ใส่ฮอร์โมนได้ก็ตาม แต่สูตรอาหารก็ยังคงมีความสำคัญต่อการส่งเสริมการเจริญของ hairy root ทางหนึ่งด้วยเช่นกัน เช่นเดียวกับที่ Mano และคณะ (1989)ได้ทำการศึกษาการเจริญของ hairy root ของ Duboisia leichhardtii ในอาหารสูตรต่างๆ 10 สูตร พบว่าอาหารสูตร B5 และสูตร HF-2 ให้การเจริญดีกว่าสูตรอื่นๆ ซึ่งตรงกับผลการทดลองที่ได้นี้ที่พบว่าสูตร C ซึ่งเป็นสูตรดัดแปลงจาก B5 ก็ให้การเจริญของ hairy root ของ Datura metel L. ดีกว่าสูตรอื่นๆเช่นกัน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจาก hairy root ทั้งสองชนิดนี้เป็น hairy root ที่มาจากพืชใน family เดียวกันคือ Solanaceae หรืออาจด้วยธรรมชาติของ hairy root เองที่เหมาะจะเจริญในอาหารสูตร B5 เนื่องจากพบว่ามี hairy root ของพืชชนิดอื่นอีกหลาย

ชนิดที่ไม่ได้อยู่ใน family เดียวกันนี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตร B5 เช่นกันดังกล่าวมาแล้วข้างต้น และในส่วนของการเจริญของ hairy root ในสภาวะแสงต่างกัน พบว่าแสงไม่มีผลต่อการเจริญของ hairy rootโดยส่วนใหญ่ ยกเว้นใน hairy root A4 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร C ในสัปดาห์ที่ 2 ที่พบว่า ที่มืดให้การเจริญดีกว่าที่สว่าง (ตารางที่ 17) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก hairy root A4 (1) เป็น hairy root ที่เจริญได้ดีอยู่เดิมแล้ว และเมื่อมาเจริญในอาหารสูตร C ซึ่งเป็นสูตรที่เหมาะสม hairy root A4 (1) จึงเจริญได้เต็มที่กว่า ทำให้สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างการเจริญในที่สว่าง และที่มืดได้ชัดเจนกว่า สอดคล้องกับผลการทดลองในอาหารแข็ง ที่พบว่าสามารถเห็นความแตกต่างของการเจริญในที่สว่าง และที่มืดได้ชัดเจนเฉพาะในอาหารสูตร C เท่านั้น โดยที่มืดมีการเจริญดีกว่าในที่สว่าง

3.2.3 การเจริญของ in vitro rootในอาหารเหลว

จากการศึกษาการเจริญของ in vitro root ในอาหารเหลวสูตร B และ สูตร C เมื่อเทียบกับ hairy root แล้วพบว่า hairy root เจริญได้ดีกว่า in vitro root เฉพาะในอาหารสูตร C ประมาณ 2 เท่า และไม่พบการเจริญที่แตกต่างกันระหว่าง hairy root และ in vitro root ที่เจริญในอาหารสูตร B ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของ hairy root ที่สามารถผลิตแอลคาลอยด์ได้มากกว่า in vitro root และเมื่อผลิตมาในปริมาณมาก hairy root จะปล่อยสารดังกล่าวลงในอาหาร (Hamill และคณะ, 1986 ; Christen และคณะ, 1989 และ Parr และคณะ 1988) ซึ่งไปรบกวนการเจริญของ hairy root นอกจากนี้ยังพบว่า in vitro root มีการเจริญในอาหารสูตร B และสูตร C ไม่แตกต่างกัน ซึ่งต่างจากใน hairy root ที่เจริญในอาหารสูตร C ได้ดีกว่าสูตร B แสดงให้เห็นว่าการเจริญของ in vitro root ต้องการปัจจัยอื่นมาส่งเสริมการเจริญด้วย นอกจากธาตุอาหารที่ได้รับ ซึ่งอาจเป็นฮอร์โมนที่ hairy root สามารถสังเคราะห์ได้สูง แต่ใน in vitro root ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เท่าใน hairy root และท้ายสุดพบว่า in vitro root สามารถเจริญในที่สว่างดีกว่าในที่มืด

ดังนั้นอาจสรุปการเจริญของ hairy rootได้ว่า

1. hairy root มีการเจริญที่รวดเร็ว สามารถแตกสาขาได้มาก และไม่มีทิศทางของการเจริญที่แน่นอน

2. hairy root ที่มาจาก A. rhizogenes ต่างสายพันธุ์กัน มีการเจริญไม่เหมือนกัน จากการทดลองนี้พบว่า hairy root A4 สามารถเจริญไปเป็น

แคลลัสได้ง่ายกว่าใน hairy root R1000 และ hairy root R1000 สามารถเจริญไปเป็นต้นได้ง่ายกว่าใน hairy root A4 และในด้านอัตราการเจริญเมื่อใช้ hairy root A4(1) และ hairy root R1000(1) เป็นตัวแทนในการศึกษาจาก hairy root ทั้ง 6 เบอร์ แล้วพบว่า hairy root A4(1) มีการเจริญดีกว่า hairy root R1000(1)

3. hairy root สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตร A B C และ D ซึ่งเป็น high salt โดยเจริญได้ดีที่สุดในสูตร C (modified B5) ส่วนในสูตร E ซึ่งเป็น low salt (modified White) ให้ผลการเจริญน้อยมาก นอกจากนี้ยังพบว่าสูตร A (MS) ทำให้ hairy root กลายเป็นแคลลัสได้ ส่วนในสูตร C ทำให้ hairy root เกิด regeneration ได้

4. โดยส่วนใหญ่แล้วแสงไม่มีผลต่อการเจริญของ hairy root แต่เมื่อมีปัจจัยอื่นเหมาะสมเช่น ชนิดของ hairy root สูตรอาหาร และระยะเวลาการเจริญในช่วงหนึ่งที่ hairy root สามารถเจริญได้เต็มที่แล้ว จะพบว่า hairy root สามารถเจริญในที่มืดได้ดีกว่าในที่สว่าง ดังจะเห็นได้จากผลการเจริญในอาหารแข็ง และในอาหารเหลวสูตร C

4. การตรวจหา และวิเคราะห์หาปริมาณ tropane alkaloid

4.1 การตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC

การตรวจหา tropane alkaloid โดยการตรวจสอบด้วยวิธี TLC นี้ทำให้ทราบว่า ตัวอย่างที่นำมาตรวจมี atropine (อยู่ในกลุ่ม tropane alkaloid) อยู่จริง ซึ่งได้แก่ hairy root A4 hairy root R1000 residue จากสารละลายตัวอย่างของ hairy root in vitro root และ hairy root A4 ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดไม่สมบูรณ์ แต่ไม่พบในแคลลัสที่ได้จาก hairy root A4 และยังพบว่า จำนวน spot แอลคาลอยด์ใน hairy root ทั้งสองชนิด มีมากกว่าในตัวอย่างอื่น ๆ อาจเนื่องมาจาก hairy root มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แอลคาลอยด์ในปริมาณมาก จนทำให้สามารถตรวจพบแอลคาลอยด์บางชนิดซึ่งสังเคราะห์ได้น้อยใน in vitro root และไม่สามารถตรวจพบโดยวิธีนี้ได้ หรือ hairy root อาจสามารถสังเคราะห์แอลคาลอยด์ได้มากชนิดกว่า in vitro root จริง ๆ ตามที่ Christen และคณะ(1990) พบว่ามีแอลคาลอยด์จำนวนถึง 19 ชนิดใน hairy root ของ Datura candida ส่วนใน residue ที่ได้จากสารละลายตัวอย่างของ hairy root อาจเป็นไปได้ว่ามีแอลคาลอยด์บางชนิด มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารอื่น ที่ไม่สามารถตรวจสอบ

พบได้โดยวิธีนี้ ระหว่างที่ทิ้งไว้เป็นเวลานาน และใน hairy root ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดไม่สมบูรณ์นั้น อาจเป็นไปได้ว่าวิธีการสกัดนี้ ไม่สามารถแยกแอลคาลอยด์ออกมาจาก hairy root ได้ หรือ แอลคาลอยด์อาจเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นในระหว่างการสกัด และท้ายสุด ในแคลลัส ซึ่งตรวจสอบไม่พบสารใดเลย อาจเนื่องมาจาก แคลลัสมีแอลคาลอยด์ในปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบพบด้วยวิธีนี้

4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLC

จากผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC ดังกล่าวทำให้ทราบเบื้องต้นว่าสารใดมี atropine อยู่จริง แต่ยังไม่สามารถตรวจสอบปริมาณแอลคาลอยด์ที่แน่นอนได้ ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLC ในขั้นต่อมาจึงทำให้สามารถทราบถึงปริมาณแอลคาลอยด์ในแต่ละตัวอย่าง ทั้งหมด 48 ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้ค่อนข้างแน่นอน ซึ่งพบว่า hairy root A4 และ hairy root R1000 ซึ่งมีอย่างละ 3 เบอร์ และแต่ละเบอร์มาจากคนละต้นนั้น ให้ปริมาณ atropine แตกต่างกัน โดยใน hairy root A4 มีปริมาณ atropine สูงสุดอยู่ที่ hairy root A4(2) คือเฉลี่ย 0.42 %DW จากทั้งสี่สภาวะ โดยมีปริมาณ atropine สูงสุดในสภาวะมืด อายุ 2 สัปดาห์เท่ากับ 0.49 %DW และใน hairy root R1000 มีปริมาณ atropine สูงสุดอยู่ที่ hairy root R1000(3) คือเฉลี่ย 0.41 %DW จากทั้งสี่สภาวะ โดยมีปริมาณ atropine สูงสุดในสภาวะมืด อายุ 1 สัปดาห์เท่ากับ 0.56 %DW ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jaziri และคณะ (1988) ที่พบว่าปริมาณ scopolamine ที่ได้จาก hairy root ของ Datura stramonium แต่ละ hairy root ซึ่งมาจากต้นกล้าคนละต้น มีปริมาณไม่เท่ากัน และ Mono และคณะ (1989) ยังได้เคยรายงานถึงปริมาณ scopolamine และ hyoscyamine ใน hairy root 45 clone ของ Duboisia leichhardtii ว่ามีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งแต่ละ hairy root clone ของเขามาจาก 1 root meristem จึงเป็นไปได้ว่าการที่ hairy root A4 แต่ละเบอร์ และ hairy root R1000 แต่ละเบอร์ มีปริมาณ atropine ไม่เท่ากัน เนื่องมาจาก hairy root ที่ได้ มาจากคนละต้นกันทำให้พันธุกรรมของ hairy root แต่ละเบอร์ต่างกัน หรือมีสาเหตุร่วมจากพันธุกรรมของแต่ละ root meristem ของ hairy root ต่างกันด้วย ดังที่ Jouanin และคณะ(1987) พบว่าขนาดความยาวของ T-DNA ที่สอดแทรกเข้าสู่ genome พืชในแต่ละครั้งนั้นมีขนาดไม่แน่นอน ทั้ง T_L-DNA และ T_R-DNA บางครั้งยังพบการเชื่อมกันของ T_L-DNA และ T_R-DNA ในhairy root ด้วย ซึ่งเป็นที่ทราบแล้วว่า hairy root ที่มีเฉพาะ T_L-DNA หรือ T_R-DNA เข้าไปอัน

ใดอันหนึ่ง จะมีผลทำให้เจริญได้ไม่ดีเท่า hairy root ที่ได้รับทั้ง T_L-DNA และ T_R-DNA (Vilamine และ Casse-Delbert, 1987) นอกจากนี้ Ambros และคณะ (1986) ยังพบด้วยว่าจำนวนชุดของ T_L-DNA ที่พบใน hairy root มีต่างกันตั้งแต่ 1-4 ชุด และไม่มีตำแหน่งสอดแทรกที่แน่นอนใน genome พืช รวมทั้งไม่มีโครโมโซมแห่งเฉพาะสำหรับการสอดแทรก ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ จึงสามารถเป็นเหตุให้ hairy root ที่แม้จะเกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์เดียวกันแต่เกิดจากการเกิด infection คนละครั้งกัน สามารถแสดงลักษณะออกมาไม่เหมือนกัน จึงอาจเป็นเหตุให้การแสดงออกของยีนซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการชีวสังเคราะห์ของแอลคาลอยด์อยู่ในระดับที่ต่างกันไปได้เช่นกัน

เมื่อศึกษาปริมาณ atropine ใน hairy root ระหว่าง hairy root ที่เจริญในที่สว่างและที่มืด พบว่า hairy root ที่เจริญในที่มืด มีปริมาณ atropine สูงกว่าในที่สว่างใน hairy root ทุกเบอร์ ทั้งที่มีอายุ 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ นั้น อาจเนื่องมาจาก enzyme ที่ทำอยู่ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ atropine สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่ไม่มีแสง หรืออาจเนื่องมาจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ไม่สามารถเกิดได้เต็มที่ เมื่อพืชอยู่ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งในเรื่องนี้ยังไม่พบสาเหตุที่แน่ชัด

เมื่อศึกษา atropine ใน hairy rootอายุต่างกันพบว่า hairy root จะสังเคราะห์ปริมาณ atropine ได้มากในสัปดาห์ใด นั้นขึ้นอยู่กับ ชนิดของ hairy root ดังจะเห็นได้จาก hairy root A4(1) hairy root A4(2) และ hairy root R1000(2) มีปริมาณ atropine ในสัปดาห์ที่ 2 มากกว่าสัปดาห์ที่ 1 แต่ใน hairy root A4(3) hairy root R1000(1) และ hairy root R1000(3) มีปริมาณ atropine ในสัปดาห์ที่ 1 มากกว่าสัปดาห์ที่ 2 ทั้งที่เลี้ยงในที่สว่าง และที่มืด จึงเป็นไปได้ว่าเนื่องจากลักษณะพันธุกรรมของ hairy rootแต่ละเบอร์ไม่เหมือนกันดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นด้วยเช่นกัน

และเมื่อศึกษาปริมาณ atropine ใน hairy root ที่เจริญในอาหารสูตรA สูตร B และสูตร C โดยมี hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1) เป็นตัวแทนศึกษา ซึ่งพบว่าใน hairy root A4 (1) มีปริมาณ atropine น้อยในสูตร A เฉลี่ย 0.08 %DW จากทั้งสี่สภาวะ โดยมีปริมาณ atropine สูงสุดในที่มืด อายุ 2 สัปดาห์ เพียง 0.13 %DW ต่างจาก hairy root R1000 (1) ซึ่งพบว่ามีปริมาณ atropine สูงในสูตร A เฉลี่ย 0.25 %DW จากทั้งสี่สภาวะ โดยมีปริมาณ atropine สูงสุดในที่มืด อายุ 1 สัปดาห์ เท่ากับ 0.36 %DW ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการเจริญของ hairy root A4 (1)

และ hairy root R1000(1) ที่ต่างกันดังกล่าวมาข้างต้น ซึ่งพบว่า hairy root A4 (1) สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ง่ายในสูตร A แต่สำหรับ hairy root R1000 (1) สามารถเกิดแคลลัสในสูตร A ได้เช่นกันแต่ช้ากว่าถึง 2 เท่า นอกจากนี้สามารถสังเกตสีและลักษณะของ hairy root A4(1) และ hairy root R1000(1) ที่เจริญในอาหารสูตร A ได้ว่า ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยใน hairy root A4 (1) มีสีน้ำตาล และมีการกลายของเนื้อเยื่อ hairy root ไปเป็นแคลลัสบางส่วน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเนื้อเยื่อแคลลัสสามารถสังเคราะห์แอลคาลอยด์ได้ในปริมาณน้อยมาก (Hiraoka และ Tabata, 1974; Yamada และ Hashimoto, 1982 และ Yamada และ Endo, 1984) และจากการวิเคราะห์แอลคาลอยด์ในแคลลัสที่เกิดจาก hairy root ก็ไม่สามารถตรวจสอบพบ atropine ในเนื้อเยื่อแคลลัสทั้งที่เจริญในที่สว่างและที่มืด และที่มีอายุ 1 และ 2 สัปดาห์ ส่วนในสูตร B และ C นั้นพบว่าปริมาณ atropine ไม่ต่างกันนัก ดังจะเห็นได้จาก ใน hairy root A4(1) มีปริมาณ atropine เฉลี่ยในอาหารทั้งสองสูตร 0.17 %DW เท่ากัน แต่ในสูตร B ปริมาณ atropine สูงสุดอยู่ที่สภาวะมืด อายุ 1 สัปดาห์เท่ากับ 0.24 %DW ส่วนในสูตร C ปริมาณ atropine สูงสุดอยู่ที่สภาวะมืด อายุ 2 สัปดาห์เท่ากับ 0.26 %DW จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเลี้ยง hairy root A4(1) ในอาหารที่มี NH_4^+ สูงไปนานๆจะทำให้ปริมาณ atropine ลดลง สอดคล้องกับผลที่ได้ในสูตร A ซึ่งเป็นสูตรที่มีปริมาณ NH_4^+ สูงมากทำให้ปริมาณ atropine ที่ได้น้อย และยิ่งลดลงมากกว่าเดิมในสัปดาห์ที่ 2 ส่วนใน hairy root R1000(1) ที่เจริญในสูตร B นั้นมีปริมาณ atropine ไม่ต่างจากสูตร A เท่าใดนัก โดยปริมาณ atropine เฉลี่ยในสูตร B คือ 0.26 %DW ปริมาณสูงสุดอยู่ที่สภาวะมืด อายุ 2 สัปดาห์เท่ากับ 0.31 %DW และในสูตร C มีปริมาณ atropine น้อยกว่าในสูตร A และ B เล็กน้อย โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ยคือ 0.21 %DW ปริมาณสูงสุดอยู่ที่สภาวะมืด อายุ 1 สัปดาห์เท่ากับ0.26 %DW

ผลการทดลองที่กล่าวมาแสดงให้เห็นถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปริมาณ atropine ใน hairy root ซึ่งได้แก่ ชนิดของ hairy root ซึ่งพบว่าแม้ว่า hairy root จะเกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์เดียวกัน แต่เกิดจาก explant คนละต้น และยังเท่ากับเป็นการเกิด infection คนละครั้งด้วยนี้ จะทำให้ hairy root มีพันธุกรรมที่ต่างกันด้วยและไปมีผลต่อความสามารถในการสังเคราะห์แอลคาลอยด์ที่ไม่เท่ากัน ในแต่ละ hairy rootด้วย นอกจากนี้แสง และ สูตรอาหารก็มีความสำคัญเช่นกัน ในการทดลองนี้พบว่าที่มืด hairy root สามารถสังเคราะห์ atropine ได้มากกว่าในที่สว่าง และอาหารสูตรที่มี NH_4^+ สูงไม่เหมาะจะ

ใช้เลี้ยง hairy root A4 เนื่องจากทำให้เซลล์กลายสภาพไปเป็นแคลลัสและมีผลให้มีการสังเคราะห์ atropine ลดลง

เมื่อศึกษาปริมาณ atropine ใน in vitro root เทียบกับ hairy rootในอาหารสูตร C พบว่ามีปริมาณ atropine สูงสุดในin vitro rootอยู่ที่ 0.17 %DW ส่วนใน hairy root อยู่ที่ hairy root A4(2) คือ 0.49 %DW ในอาหารสูตรเดียวกัน ในที่มืด หรือประมาณ 3 เท่าของ in vitro root ซึ่ง hairy root ทั้ง 6 เบอร์ ที่เลี้ยงในอาหารสูตร C นี้ล้วนแต่มีปริมาณ atropine สูงกว่า in vitro rootเกือบทั้งสิ้น ทั้งที่เลี้ยงในที่สว่าง และที่มืด โดยยกเว้นเพียง hairy root A4(1) ที่เลี้ยงในที่สว่างเท่านั้น ที่มีปริมาณ atropine น้อยกว่า in vitro root ที่เลี้ยงในที่สว่างเพียง 0.02 %DW ส่วนการเทียบปริมาณ atropine ใน in vitro root กับ hairy root ที่เลี้ยงในอาหารสูตร B ทำการเปรียบเทียบได้เฉพาะใน hairy root 2 เบอร์ คือ hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1) ซึ่งเป็น hairy root ที่ถูกเลือกมาศึกษาการเจริญในอาหารต่างสูตรกันดังกล่าวมาแล้วข้างต้น พบว่าปริมาณ atropine สูงสุดใน in vitro root อยู่ที่ 0.16 %DW ส่วนใน hairy root อยู่ที่ hairy root R1000(1) คือ 0.31 %DW ในอาหารสูตรเดียวกัน ในที่มืด หรือประมาณ 2 เท่าของ in vitro root ส่วนใน hairy root A4(1) พบว่ามีปริมาณ atropine น้อยกว่า in vitro root 0.01 %DW เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน ในที่มืด ทั้งนี้เนื่องจากสูตร B เป็นสูตรที่ไม่เหมาะกับการเลี้ยง hairy root A4ดังที่กล่าวมาแล้ว

อย่างไรก็ดีแม้ว่าจะมีความแตกต่างในด้านความสามารถในการสังเคราะห์ atropine ใน in vitro root กับ hairy root แต่พบว่า in vitro rootสามารถสังเคราะห์ atropine ในที่มืดได้ดีกว่าในที่สว่างเช่นเดียวกับ hairy root ดังนั้นกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ atropine ในin vitro root และใน hairy root จึงน่าจะเหมือนกัน แต่การที่ hairy root มี atropine มากกว่าอาจเนื่องมาจากยีนใน T-DNA ที่เข้าไปอยู่ใน genome ของ hairy root ไปกระตุ้นการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ผลิต enzyme ที่ใช้ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ ทำให้ hairy root สามารถสังเคราะห์ atropine ได้ในปริมาณมาก

การวิจัยนี้จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลี้ยง hairy rootเพื่อผลิตสารแอลคาลอยด์ต่อไปได้ โดยคำนึงถึงปัจจัยต่างๆในการเลี้ยงได้แก่ สายพันธุ์ของ A. rhizogenes ส่วนของ explant สภาวะแสง สูตรอาหาร ตลอดจน hairy root line