PDF4380041 ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

โดย เสริมศิริ จันทร์เปรม และคณะ

15 ตุลาคม 2546

สัญญาเลขที่ PDF/41/2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

คณะผู้วิจัย

เสริมศิริ จันทร์เปรม

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พร้อมจิต ศรลัมพ์

ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/41/2543

ชื่อโครงการ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : นางเสริมศิริ จันทร์เปรม ภาควิชาพืชสอน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

E-mail address : agrsrc@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2543 – 30มิถุนายน 2545 (ขยายระยะเวลาถึง 30 มิถุนายน 2546)

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่นิยมใช้ส่วนของรากมาเป็นส่วนประกอบในยาไทยหลายขนาน ประกอบกับการปลูกในเชิงการค้ายังมีน้อยเนื่องจากใช้เวลาปลูกเลี้ยงนาน จึงมีการขุดเก็บรากจากป่า ทำให้ในอนาคตอาจเกิดการสูญพันธุ์ แนวทางการอนุรักษ์ทำได้โดยส่งเสริมให้มีการผลิตเป็นการค้ามากขึ้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามามีบทบาทในแง่ของการขยายพันธุ์ให้มีปริมาณมากพอสำหรับการผลิตเป็นการค้า นอกจากนี้การผลิตสารทุติยภูมิจากรากในสภาพเพาะเลี้ยงก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดการขุดเก็บรากจากป่าธรรมชาติ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในเบื้องต้นคือ ศึกษาการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ และการศึกษาการเพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงเพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิตสารทุติยภูมิเพื่อทดแทนสารจากธรรมชาติ

ในการทดลองเพื่อขยายพันธุ์นั้นพบว่า เจตมูลเพลิงแดงสามารถขยายพันธุ์ได้ดีเมื่อนำส่วนของปลายยอด หรือส่วนของตาข้าง มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดขนาดเล็กจำนวนมาก (สูงสุดถึง 201.6 ยอดต่อตาข้าง 1 ตา) และยอดขนาดเล็กสามารถพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และออกรากได้ดีพร้อมที่จะนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ในส่วนของการเพาะเลี้ยง hairy root นั้น จากการวิจัยพบว่า *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC 13332 สามารถชักนำให้ต้นเจตมูลในสภาพปลอดเชื้อเกิดลักษณะ hairy rootได้ดี และ hairy root ที่ได้สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญในสภาพที่ไม่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดใดเลย ซึ่งสภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของ hairy root คืออาหารเหลวสูตร B5 ในสภาพมืด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่สำคัญในรากเจตมูลเพลิงแดง พบว่ารากเพาะเลี้ยงมีการผลิตสารดังกล่าวเช่นเดียวกับรากในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามปริมาณสารต่อน้ำหนักแห้งรากยังน้อยกว่าการผลิตได้จากรากธรรมชาติ โดยพบว่าสภาพเพาะเลี้ยงที่ให้ปริมาณสารสูงสุดคือ สูตรอาหาร B5 เลี้ยงในสภาพอาหารแข็งในที่มืด อย่างไรก็ตามแม้ว่าการผลิตสารจาก hairy root จะยังต่ำกว่าในธรรมชาติ แต่มีข้อพิจารณาคือได้ผลเร็วกว่า นอกจากนี้ยังอาจใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมกับสารกระตุ้นบางอย่างซึ่งมีรายงานในต่างประเทศว่าสามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชในสภาพเพาะเลี้ยงสร้างสารทุติยภูมิได้มากกว่าธรรมชาติ ซึ่งเป็นแนวทางที่น่าสนใจศึกษาวิจัยต่อไป

คำหลัก : เจตมูลเพลิงแดง การขยายพันธุ์ การเพาะเลี้ยงราก สาร plumbagin

Abstract

Project Code : PDF/41/2543

Project Title : Hairy root culture of *Plumbago indica* L. for secondary metabolite production

Investigator : Ms. Sermsiri Chanprame

Dept. of Horticulture, Fac. Of Agriculture Kamphaeng Saen, Kasetsart Univ. Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom.

E-mail Address : agrsrc@ku.ac.th

Project Period : July 1, 2000 – June 30, 2002 (extended to July 30, 2003)

Plumbago indica L. is one of the important Thai medicinal plants. Root of this plant have been extensively used in folk medicine. Commercial plantation of *P. indica* still not so attractive due to it's long planting duration. Roots collecting from forest habitat in high quantity year round may lead to the endanger of this specie. The conservation criterias can be devided into 2 ways, firstly, encourage commercial plantation in which micropropagation can plays role in the adequate quantity propagule production. The *in vitro* production of secondary metabolite from root culture is the second criteria. Thus, in this research, high efficiency procedures for *P. indica* micropagation and *in vitro* production of plumbagin, the main secondary metabolite in *P. indica*, from hairy root culture were aimed.

The micropropagation results demonstrated that up to 201 shootlets can be regenerated from a single axicillary bud when culture in MS medium supplemented with 3 mg/l BA. The developed multiple shoots can be fully developed into normal shoots when cultured on MS+1 mg/l BA and can be rooted in MS medium prior to *ex vitro* transplanting.

For hairy root culture, it was revealed that *Agrobacterium rhizogenes* 'ATCC 13332' can effectively induced hairy root in *P. indica*. The hairy root, then, can be cultured in which the best conditions for root growth were liquid B5 medium in dark condition. However, the highest plumbagin content of hairy root culture was obtained from solid B5 medium in dark condition. The plumbagin content in hairy root, however, revealed the lower quantity compared to the root collected from plant grown in nature. Nonetheless, hairy root still be of the interest due to its as turnover rate of every month compared to the natural grown plant of 3 years harvested. The high potential of using elicitors for over production in hairy root culture is also one of the techniques that, in theory, can effectively employed. These ideas will be targeted for future research of hairy root culture for secondary metabolite production.

Keyword : *Plumbago. Indica* L., micropropagation, hairy root culture, plumbagin

คำนำ

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่สำคัญชนิดหนึ่งอยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ใบเดี่ยวรูปมนรี ปลายใบแหลม โคนใบมน มีสีเขียวอมแดง ออกสลับกัน (alternate) ไปตามข้อต้น (Chuakul *et al.*, 1994) ออกดอกเป็นช่อ ดอกย่อยมีสีแดง ตอนปลายแผ่ออก 5 แฉก กลีบรองดอกสีเขียวมีขน ที่โคนขนมีต่อมสำหรับขับเมือกเหนียว ๆ ในธรรมชาติพบเจตมูลเพลิงแดงกระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปในประเทศเขตร้อนและเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้มานานในหลายประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Chuakul *et al.*, 1994; พเยาว์, 2539) ในประเทศไทยใช้ส่วนของรากเจตมูลเพลิงแดงมาเป็นส่วนประกอบในตำรายาไทยหลายขนานที่สำคัญ โดยระบุสรรพคุณใช้เป็นยาขับประจำเดือน ออกฤทธิ์ต่อมดลูกและช่วยให้ร่างกายเกิดความอบอุ่น แก้ปอดชื้นปอดปวม กระตุ้นลำไส้และกระเพาะอาหารให้ทำการบดย่อยดีขึ้นและช่วยขับน้ำย่อยอาหาร (บุษบา และ นิวัต, 2519) แก้ปวดข้อ ระงับอาการอาการปวดฟัน กระตุ้นให้น้ำลายมากขึ้น ซึ่งจะช่วยลดการเกิดฟันผุและลดอาการเหงือกอักเสบ นอกจากนี้ยังใช้รับประทานเพื่อขับพยาธิ และทาแก้กลากเกลื้อน (เชวงเกียรติ, 2529) และแก้ท้องร่วง (วิทย์, 2542) เป็นต้น สารออกฤทธิ์ที่สำคัญในเจตมูลเพลิงแดงคือ plumbagin ซึ่งพบสะสมอยู่มากในส่วนของราก มีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ รวมทั้งยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Krishnaswamy and Purushothaman,1980) ต้านมาลาเรีย (Sunan *et al.*, 1995) คุมกำเนิด (นันทวัน และ อรนุช, 2539) นอกจากนี้ในรากของเจตมูลเพลิงแดงยังพบสารประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น stigmasterol (Dinda *et al.*, 1992) plumbaginol (Dinda *et al.*, 1994) compesterol และ1,4-napthoquinone (บุษบา และคณะ, 2519) จึงทำให้มีผู้สนใจและนิยมนำมาใช้ประโยชน์ทางยากันมากจนเป็นที่ต้องการของตลาด การปลูกในเชิงการค้ายังมีน้อยเนื่องจากใช้เวลาในการปลูกยาวนานเพื่อให้ได้รากที่มีคุณภาพดี จึงยังมีการขุดเก็บรากออกมาจากป่าในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยเป็นจำนวนมาก ซึ่งในอนาคตอาจเกิดการสูญพันธุ์และการขุดรากจำนวนมายังส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยาของป่าอีกด้วย จึงสมควรที่จะหาทางอนุรักษ์ โดยการศึกษาวิธีการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ต้องขุดเก็บรากจากธรรมชาติ ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อส่วนเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพสูง เพราะเป็นวิธีที่สามารถควบคุมได้ทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตที่ต้องการได้ ใช้ระยะเวลาการผลิตสั้น และไม่จำกัดฤดูกาล มีรายงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาในเรื่องของการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น Hartmann *et al.*

(1986) ศึกษาปริมาณ tropane alkaloid ใน root culture และ cell suspension culture ของ *Atropa belladonna* Nahalka *et al.* (1996) ทำการศึกษาปริมาณสาร plumbagin ใน cell suspension culture ของ *Drosophyllum lusitanicum* นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติพิเศษที่เหมาะสมกับการชักนำให้ผลิตสารทุติยภูมิจากในพืชหลายชนิด เช่น แพงพวยฝรั่ง *Catharanthus roseus* เพื่อผลิตสาร indole alkaloids (Parr, 1989) พืชสกุล *Gentiana* ผลิตสาร secoiridoid glycosides และ xanthones (Momcilovic *et al*,, 1997) ใน *Cassia obtusifolia* เพื่อผลิตสาร anthraquinones (Guo *et al.*, 1998) สาร solasodine จาก *Solanum aviculare* (Kittipongpatana *et al.*, 1998) ดังนั้นการผลิตสารทุติยภูมิโดยการเพาะเลี้ยง hairy root จึงเป็นวิธีหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารทุติยภูมิเพื่อทดแทนสารจากธรรมชาติ และเพื่อนำไปสู่การใช้สมุนไพรพื้นบ้านของไทยในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงโดยในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนตายอดและตาข้างในสภาพปลอดเชื้อและชักนำให้เกิดรากเพื่อนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติหรือใช้เพื่อเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำให้เกิด hairy root

2. เพื่อศึกษาเทคนิคการ infect และสายพันธุ์ของเชื้อ *A. rhizogenes* ที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิด hairy root ในเจตมูลเพลิงแดง

3. เพื่อให้ทราบถึงสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง

4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของ hairy root ในสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ต่อการผลิตสาร plumbagin รวมทั้งเปรียบเทียบปริมาณการผลิตสารในสภาพเพาะเลี้ยงกับการผลิตสารในรากจากธรรมชาติ เพื่อประเมินศักยภาพการผลิตสาร plumbagin โดยการเพาะเลี้ยง hairy root

การตรวจเอกสาร

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae มีชื่อสามัญ: rose-colored leadwort official leadwort fire plant lead wort และ Indian leadwort ชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ในภาษาไทย เช่น ปิดปิวแดง (อีสาน), คุ้ยวู่ (กะเหรี่ยง-กาญจนบุรี), ไฟใต้ดิน เจตมูลเพช (ใต้), ตั้งซูโว้ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), อุบะกูจ๊ะ (มาเลย์, ปัตตานี) เจตมูลเพลิงแดง (ภาคกลาง (พเยาว์, 2539) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชีย เช่น ประเทศไทย อินเดีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และ จีน เป็นต้น ในประเทศไทยจะพบตามป่าดงดิบ และป่าเบญจพรรณทั่วไป (วิทย์, 2542)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น: เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก (herb) จะแตกกิ่งก้านสาขารอบ ๆ ต้นมากมาย ซึ่งกิ่งอ่อนหรือกิ่งที่เล็ก จะมีร่องสี่เหลี่ยม ลำต้นสีเขียวออกแดงเข้มสูงประมาณ 2-3 เมตร (วิทย์, 2542)

ใบ: ใบเดี่ยวออกสลับกันไปตามข้อต้น (alternate) ลักษณะใบเป็นรูปมนรี (elliptic-ovate ยาว 6-10 เซนติเมตร กว้าง 3-5 เซนติเมตร ขอบใบเป็นคลื่นเล็กน้อย ปลายใบแหลม โคนใบมนเว้า มีสีเขียวอมแดง ซึ่งใบจะคล้ายใบมะลิ แต่จะใหญ่กว่า (Chuakul *et al.*, 1994)

ดอก: ออกเป็นช่ออยู่ที่ส่วนยอดของต้น ช่อดอกเป็นแบบ raceme ดอกมีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ ยาว 8-9 มิลลิเมตร มีสีเขียวและมีขนปกคลุมอยู่ซึ่งขนนี้จะมีต่อมเหนียว ๆ ติดมือ กลีบดอก 5 กลีบ สีแดงบางมาก โคนดอก (style-base) จะเป็นหลอดเล็ก ๆ มีขนสั้น (short-hairy) มีอับละอองเรณู (anther) 5 อัน ติดแบบ opposite กับกลีบดอก รังไข่ 1 อัน แบบ superior ovary รูปร่างแบบ ovoid-oblong มี 5 locule

ผล: ฝักกลม จะแตกออกเมื่อแก่ (dry dehiscent)

ราก: รากมีสีน้ำตาลดำยาวประมาณ 0.5-1.5 เมตร (Chuakul *et al.*, 1994)

ต้นเจตมูลเพลิงแดง

ดอกเจตมูลเพลิงแดง

รากแห้งเจตมูลเพลิงแดงที่ขายทั่วไปในตลาด

ภาพที่ 1 ลักษณะต้น ดอก และรากแห้งของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.)

การขยายพันธุ์ และการเก็บเกี่ยวผลผลิต

การขยายพันธุ์โดยทั่วไปสามารถทำได้ 2 วิธีคือ ใช้เมล็ด และปักชำ (วิทย์, 2542) การเก็บเกี่ยวเพื่อการนำรากไปใช้ประโยชน์ต้องปลูกเลี้ยงไว้ประมาณ 3-4 ปี จึงจะสามารถขุดเก็บรากได้ และมักพบว่าพื้นที่ที่ปลูกเจตมูลเพลิงแดงจะไม่มีต้นไม้อื่นขึ้น เนื่องจากรากเจตมูลเพลิงแดงจะมีการระบายความร้อนออกมาทำให้เมล็ดพืชอื่นไม่สามารถงอกได้ (บุษบา และ นิวัต, 2519)

การนำมาใช้ประโยชน์ในด้านเภสัชกรรม

เจตมูลเพลิงแดงเป็นพืชสมุนไพรที่จัดอยู่ในประเภทที่มีรสร้อน และมักพบว่าพื้นที่ที่ปลูกต้นเจตมูลเพลิงแดงจะไม่มีต้นไม้อื่นขึ้นมากนักเนื่องจาก รากเจตมูลเพลิงแดงจะมีการระบายความร้อนออกมาทำให้เมล็ดพืชอื่นไม่สามารถงอกได้ (บุษบา และ นิวัติ, 2519) มีตำรายาไทยหลายขนานใช้ส่วนของใบ แก้อพัทธปิตตะสมุฏฐาน (น้ำดีนอกฝัก) แก้ลมในกองเสมหะ ช่วยย่อยอาหาร ขับผายลม ใช้ส่วนของดอก แก้อพัทธปิตตะสมุฏฐาน (น้ำดีนอกฝัก) ส่วนของลำต้นใช้ แก้โลหิตอันเกิดแต่กองกำเดา รากมีรสร้อน ใช้บำรุงธาตุ บำรุงโลหิต ขับลมในกระเพาะและลำไส้ ขับโลหิตระดู ทำเป็นผงแก้ริดสีดวงทวารและเกลื่อนฝี ให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย กระจายเลือดลม แก้ปวดท้อง ผสมในยาธาตุแก้ท้องเสีย นำมาทำเป็นยาพอกแก้ปวดศรีษะ นำมาเคี้ยวแก้ปวดฟัน (จินดาพร, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์บีบมดลูกทำให้แท้งได้ และยังใช้ทาแก้โรคผิวหนัง กลากเกลื้อน ส่วนของเปลือกใช้ ฆ่าแมงคาเรืองเข้าหู กระพี้ใช้ แก้เกลื้อนช้าง แก่นใช้ แก้ขี้เรื้อนกวาง ขี้เรื้อนน้ำเต้า ผลใช้แก้โรคพยาธิ แก้ฝี (วุฒิ, 2540) ส่วนรายงานการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา เช่น dermatophytes black mold white mold และ *Candida albicans* ที่ทำให้เกิดรังแคบนหนังศรีษะ เป็นต้น (พิบูลย์ และ ชัยสิทธิ์, 2519) ต้านเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Krishnaswamy and Purushothaman,1980) ต้านมาลาเรีย คุมกำเนิด (นันทวัน และ อรนุช, 2539) สารเคมีที่พบในรากเจตมูลเพลิงแดงมีหลายชนิด เช่น

ส่วนของราก	กลุ่มสารที่พบ	สารที่พบ
Root	fenzenoid	benzene meta-dinitro
	carbohydrate	fructose and glucose

	flavanoid	leucodelphidinin
	quinoid	naphthoquinone, 1,4 naphthoquinone and alpha plumbagin
	alkaloid	naphthylamine
Rootbark	alkane	arachidyl alcohol
	carbohydrate	glucose
	lipid	lignoceric acid linoleic acid oleic acid
	quinoid	plumbagin
	steroid	sitosterol, beta

ประเทศที่มีการใช้ประโยชน์จากเจตมูลเพลิงแดง เช่น ในประเทศอินเดีย นำรากมาทำเป็นยาทำให้เกิดการแท้ง นำรากมาต้มใช้ดื่มรักษา black water fever ใช้ภายนอกเป็น counter-irritant ในประเทศฟิลิปปินส์นำมาใช้เป็นยาขับปัสสาวะ และยารักษาโรคเรื้อน สำหรับในประเทศไทยได้นำมาทำป็นยาแผนโบราณ อย่างในท้องตลาดที่มีเจตมูลเพลิงแดงเป็นส่วนผสมอยู่ ได้แก่ ยาห่อบำรุงโลหิตตราแม่เลื่อน ยาสำหรับดองเหล้าตราแก่นนคร (บุษบา และ นิวัต, 2519) ประเทศจีน และประเทศอื่น ๆ ในทวีปเอเชีย ได้ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง rheumatiod arthritis แก้ฟกช้ำ และใช้เป็นยาทำให้แท้งลูก (สุปราณี และ สุพัตรา, 2542)

คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสาร plumbagin

สาร plumbagin ($C_{11}H_8O_3$) มีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthalenedioneหรือ 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone มีน้ำหนักโมเลกุล 188.17 เป็นสารประกอบประเภท quinone ในกลุ่ม naphthaquinone ที่มาจาก polyketide pathway โครงสร้างหลักประกอบด้วย 2-benzene ring สารกลุ่มนี้ที่พบในธรรมชาติพบอยู่ใน เชื้อรา แบคทีเรีย และในพืชชั้นสูงพบมากกว่า 20 วงศ์ พบได้ในเกือบทุกส่วนของพืช มีลักษณะทางกายภาพของสารนี้มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองเข้มมักพบอยู่ในรูปอิสระ สามารถระเหิดได้เมื่อได้รับความร้อน 78-79 องศาเซลเซียส สามารถ

ละลายในตัวทำละลายชนิดที่มีขั้ว เช่น alcohol acetone chloroform benzene และ acetic acid (Durand and zenk, 1971; Seigler, 1998)

การสกัดสารและตรวจสอบปริมาณสาร plumbagin

Crouch *et al.* (1990) ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสาร plumbagin จากพืชสกุล *Drosera* (*D. capensis* และ *D. natalensis*) ที่เจริญเติบโตอยู่ในสภาพธรรมชาติและในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ HPLC ในการแยกสาร และวิเคราะห์ปริมาณสารโดยใช้ spectrophotometer ที่ มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่า *D. capensis* ที่เจริญเติบโตอยู่ในสภาพธรรมชาติมีปริมาณ plumbagin มากกว่า *D. natalensis* และพบว่าในสภาพธรรมชาติพืชทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณสาร plumbagin มากกว่าที่พบในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Oyedapo (1996) แยกสกัดสาร plumbagin จากเจตมูลเพลิงขาว (*P. zeylanica*) โดยใช้น้ำหนักของรากแห้ง 25 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม NaCI 0.2 โมลาร์ ใน sodium phosphate buffer 5 มิลลิโมลาร์ pH 7.2 แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารแขวนลอย จากนั้นนำสารแขวนลอยนี้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ส่วนที่เป็นกากสีน้ำตาล นำส่วนกาก 2.5 กรัม มาละลายใน phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปศึกษา anti-inflammatory พบว่า สามารถเกิด anti-inflammatory ในหนูได้

Oyedapo and Amos (1997) สกัดราก *P. zeylanica* ด้วย ethanol จะได้สารสีน้ำตาล พบว่า สารสกัดที่ได้ไปเพิ่มการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง lactate dehydrogenase acid และ alkaline phosphatase ใน serum ของหนูทดลอง

บุษบา และ นิวัติ (2519) ทำการศึกษาวิธีการแยกสารในรากเจตมูลเพลิงแดงโดย Brontrager test ระเหย crude extract จนแห้งบน water bath ละลาย residue ในน้ำ 30 มิลลิลิตร แล้วกรอง ทำการเขย่า filtrate กับ 10 มิลลิลิตร ด้วย benzene ใน separatory funnel ปล่อยให้แยกชั้น และไข benzene ลงในหลอดทดลอง เติม ammonia test solution 5 มิลลิลิตร อีกวิธีคือการ

สกัดด้วย citric acid solution 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนัก extract/petroleum ether ปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนัก extract ส่วนชั้น citric acid layer สกัดด้วย petroleum ether หลาย ๆ ครั้งแล้วกรองด้วย filtrate ระเหยแห้ง ใส่ alcohol 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อละลาย residue แล้วอุ่น กรองขณะร้อน และ ตั้งบน water bath ให้ alcohol ระเหยออกไปจนความเข้มข้นเหลือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ผลึกที่ได้นำมาตกผลึกซ้ำใน alcohol 20 เปอร์เซ็นต์ จุดหลอมเหลวของสารสำคัญของรากเจตมูลเพลิงแดงเท่ากับ 72-73 องศาเซลเซียส ส่วนการวิเคราะห์โดยใช้ chromatography แบบ Thin-Layer chromatography (TLC) ใช้ CCl_4-Ethyl acetate (9:1) และ Chloroform saturatedกับน้ำ ใช้ Plate:Sillica gel G ตรวจสอบโดย ammonia เป็นการทดสอบสารที่สกัดจากวิธีดังกล่าว

การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

มีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชสกุล *Plumbago* ได้แก่

Rout *et al.* (1999a และ b) ได้นำส่วนข้อของ *P. zeylanica* Linn. หรือเจตมูลเพลิงขาวมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 - 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก แล้วยังพบว่า เมื่อนำชิ้นส่วนของใบและลำต้นมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 และ 8.88 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ และเมื่อนำ callus นี้มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ และIAA ความเข้มข้น 1.42 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ เมื่อนำยอดที่เกิดขึ้นไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร half-strength MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินสามารถชักนำให้เกิดรากได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อนำชิ้นส่วนตาข้างจากต้นเจตมูลเพลิงขาวมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดยอดปริมาณมากได้เช่นกัน และเมื่อนำยอดไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร half-strength MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี

Kumar and Bhavanandan (1988) ได้ทดลองนำข้อของ *Plumbago rosea* L. (ชื่อปัจจุบัน *P. indica* L.) มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจาก callus

รศนา และ สุภวรรณ (2543) นำตาข้างของต้นเจตมูลเพลิงแดงมาทำการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 6 - 8 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และเมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เกิด callus ขนาดใหญ่สีน้ำตาล เริ่มมีรากงอก เมื่อมีอายุ 3 สัปดาห์ มียอดเล็ก ๆ เกิดขึ้นเมื่ออายุ 1 เดือน โดยสูตรอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้การเจริญของยอดและรากดีที่สุดหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน และการนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร half-strength MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.5 และ IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี แต่เมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทำให้เกิด callus สีเทาเป็นปุยขนาดใหญ่เมื่ออายุ 1 เดือน ลำต้นและก้านใบมีสีแดง เจริญเติบโตช้าและมีขนาดเล็ก

รังสิมา และคณะ (2543) ทำการศึกษาผลของการใช้ไซโตไคนิน คือ BA และ kinetin ร่วมกับออกซินคือ NAA ในสูตรอาหารดัดแปลง MS เพื่อเพิ่มอัตราการขยายพันธุ์ของต้นเจตมูลเพลิงแดงโดยนำส่วนของยอดที่มีความสูง 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงพบว่า การใช้ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด 27.7 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ในขณะที่ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด 11.1 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเท่านั้น

นอกจากพืชในสกุล *Plumbago* แล้วยังมีพืชอีกหลายชนิดที่พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและชักนำให้เกิดยอดได้ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินและออกซินชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น Atta-Alla และ van Staden (1997) นำปลายยอดของ *Yucca aloifolia* L. มาเพาะเลี้ยงพบว่า สูตรอาหาร half-strength MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 17.8

ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอด 5.2 ยอดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ส่วนการเกิดรากพบว่า เลี้ยงบนสูตรอาหาร half-strength หรือ half-strength MS สามารถชักนำให้เกิดรากได้

Castillo and Jordan (1997) ได้นำตายอดของ *Minthostachys andina* (Brett.) มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.05 ไมโครโมลาร์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดี

Koroch *et al.* (1997) นำชิ้นส่วนปลายยอดและข้อของ *Hedeoma multiflorum* มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร half-strength MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 22.2 ไมโครโมลาร์ ให้ปริมาณยอดต่อชิ้นพืชเฉลี่ยมากที่สุด

Fracaro and Echeverrigaray (2001) พบว่า เมื่อนำตายอดของ *Cunila galioides* มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.8 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก

Abrie and van Staden (2001) นำตายอดและตาข้างของ *Aloe polyphylla* ที่เกิดจากการเพาะเมล็ดบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมน้ำตาล มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดี

จากงานวิจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วนี้จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ที่จะนำตายอดและตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่จะมีประโยชน์สำหรับการผลิตต้นพันธุ์สำหรับการปลูกเจตมูลเพลิงแดงเป็นการค้า

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตสาร plumbagin

สุปาราณี และ สุพัตรา (2542) ศึกษาการสร้างสาร plumbagin จากรากเพาะเลี้ยงของต้นเจตมูลเพลิงแดงและขาวพบว่า เมื่อนำใบอ่อนของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ พบว่า สูตรที่ชักนำให้เกิดรากดีที่สุดคือ สูตรอาหาร B5 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณการสร้างสาร

plumbagin พบว่า รากเพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงแดงสามารถผลิตสาร plumbagin ได้มากกว่ารากเพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงขาว

จาริณีย์ (2543) ได้ทำการปรับปรุงสูตรอาหารเพื่อเพิ่มการสร้าง plumbagin ในรากเพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงแดง โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและ $(NH_4)_2SO_4$ ในสูตรอาหาร B5 ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อเติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ และ$(NH_4)_2SO_4$ 2 เท่า ทำให้รากเพาะเลี้ยงสร้างสาร plumbagin ได้มากกว่ารากเพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงขาว

Heble *et al.* (1974) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ และการผลิตสาร plumbagin ใน *P. zeylanica* พบว่า เซลล์ที่มี pigment สีแดงเข้ม ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้สาร plumbagin อยู่ในระดับมิลลิกรัมต่อ100 กรัมน้ำหนักสด

Crouch *et al.* (1990) นำใบของพืชในสกุล *Drosera* มาเลี้ยงในสูตรอาหาร 1/5-strength MS (1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA และ BA ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นยอดและราก ซึ่งพบใน *D. natalensis* การใช้สูตรอาหาร 1/5-strength MS (1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60-80 วัน จะพัฒนาไปเป็นยอด ส่วนการใช้สูตรอาหาร 1/5-strength MS (1962) ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 80-100 วัน จะพัฒนาไปเป็นราก ใน *D. capensis* ใช้สูตรอาหาร 1/5-strength MS (1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60-80 วัน จะพัฒนาไปเป็นยอด และ 1/5-strength MS (1962) ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.0125 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 80-100 วัน จะพัฒนาไปเป็นราก เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin พบว่าพืชในสกุล *Drosera* ทั้ง 2 ชนิด ที่เลี้ยงในสภาพ *in vitro* และ *in vivo* ให้ปริมาณสาร plumbagin น้อยกว่าสารที่สกัดได้จากรากของพืชในสกุล *Plumbago* คือ *P. auriculata* Lam.

Nahalka *et al.* (1996) ทำการศึกษา chemiosmotic สำหรับการเจริญและการสะสมสาร plumbagin ของ *Drosophyllum lusitanicum* Link. โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากส่วนของตาข้างที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS (1962) ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำมาเลี้ยงให้ได้ cell suspension ในสูตรอาหารเหลว B5 (1968) ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร แล้วนำ cell suspension มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเหลว B5 ที่มีค่า PH และปริมาณน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน เพื่อการเพิ่มปริมาณสาร plumbagin พบว่า การใช้น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ที่มีค่า pH 3.5 สามารถเพิ่มปริมาณสาร plumbagin ได้ดีที่สุด

การเกิดและการใช้ประโยชน์ของ hairy root ในการผลิตสารทุติยภูมิ

การเกิด hairy root ในพืช

hairy root เป็นโรคพืชชนิดหนึ่งที่เกิดในพืชชั้นสูง ซึ่งมีลักษณะเป็นรากฝอยจำนวนมากเกิดขึ้นมาจากต้นพืช โดยเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *A. rhizogenes* ที่บุกรุกเข้าสู่ต้นพืชบริเวณที่มีบาดแผล (de Cleene and de Lay, 1981) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ อยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae อาศัยอยู่ในดิน ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *A. tumefaciens*

โดยส่วนใหญ่ hairy root จะเกิดกับพืชพวกใบเลี้ยงคู่ (dicotyledon) Ackermann (1977) ได้ทดลองนำเชื้อ *A. rhizogenes* มา infect ต้นยาสูบซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ พบว่า ทำให้เกิด hairy root ขึ้นได้ จากการตรวจสอบ host range ของโรคในรายงานการวิจัยของ de Cleene and de Lay (1981) พบว่า *A. rhizogenes* สายพันธุ์ TR7 ไม่สามารถชักนำให้เกิด hairy root ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 16 ชนิดที่ทดสอบ แต่ในพืชใบเลี้ยงคู่ที่ทดสอบจำนวน 202 ชนิด เกิด hairy root ได้ถึง 37 ชนิด Mugnier (1988) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ A4 พบว่า สามารถชักนำให้เกิด hairy root ในพืชใบเลี้ยงคู่ได้ 40 ชนิด แต่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่เกิด hairy root เช่นกัน นอกจากชนิดของพืชแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีกที่มีผลต่อการชักนำให้เกิด hairy root เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรีย เห็นได้จากรายงานของ de Cleene and de Lay (1981) ได้นำ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ TR7 มาชักนำให้เกิด hairy root ใน *Atropa belladonna* แต่ไม่ประสบความสำเร็จ แต่ Mugnier (1988) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ A4 พบว่า สามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้ในพืชชนิดเดียวกัน จากการรายงานของ Toivonen and Rosenqvist (1995) ได้ชักนำให้เกิด hairy

root ใน *Glycyrrhiza glabra* โดยใช้ *A. rhizogenes* 3 สายพันธุ์ คือ A4 LBA/9402 และ C58C18 พบว่า สายพันธุ์ C58C18 ซึ่งเป็น mannopine type ให้ผลการเกิด hairy root ได้ดี การวิจัยของ Kittipongpatana *et al.* (1998) ได้ชักนำให้เกิด hairy root ใน *Solanum aviculare* Forst. โดยใช้ *A. rhizogenes* 4 สายพันธุ์ คือ A4 ATCC11325 ATCC43057 และ ATCC15834 พบว่า สายพันธุ์ ATCC15834 และ A4 ซึ่งเป็น agropine type ชักนำให้เกิด hairy root ได้ดีกว่าสายพันธุ์ ATCC11325 และ ATCC43057 ส่วน Cho *et al.* (2000) พบว่า เมื่อ infect เชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ซึ่งเป็น cucumopine type ที่ปราศจาก binary vectors ไปที่ชิ้นส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon) ของถั่วเหลือง สามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การเกิด hairy root ยังเกี่ยวข้องกับชนิดของเนื้อไม้ โดยพบว่าการชักนำให้เกิด hairy root ในไม้เนื้อแข็งบางชนิดจะเกิดขึ้นค่อนข้างยาก เนื่องมาจากสารพวก phenolic compound ซึ่งออกจากรอยตัด นอกจากนี้สภาพแวดล้อมอื่น ๆ ก็มีผลเช่นกัน (Mugnier, 1988)

ลักษณะของ hairy root จะมีลักษณะการเจริญบางอย่างแตกต่างจากรากปกติทั่วไปคือ มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเจริญเติบโตได้มากกว่ารากปกติ (Flores and Filner,1985) มีการแตกกิ่งก้านสาขาของรากในปริมาณที่มาก และมีทิศทางการเจริญของรากที่ไม่แน่นอน แต่ขณะเดียวกัน hairy root ยังทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับรากปกติ และ มีกระบวนการสร้างเมตาบอลิซึมเช่นเดียวกับรากทั่วไป โดยพบว่าสามารถดูดอาหารไปเลี้ยงลำต้นได้ตามปกติ (Srivastava, 1998) จากการทดลองของ Tanaka *et al.* (1985) ได้ชักนำให้เกิด hairy root ในรากสะสมอาหารของ *Brassica napus* L. พบว่า hairy root สามารถดูดอาหารไปเลี้ยงส่วนยอดให้เจริญได้อย่างเต็มที่เช่นเดียวกับรากปกติ

นอกจากนี้ยังพบว่า hairy root ยังสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ (regeneration) ขึ้นมาได้ เช่น ในรายงานการวิจัยของ Tepfer (1984) พบว่า hairy root ของยาสูบ และ *Convovulus arvensis* สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้เองและสามารถชักนำ hairy root ของแครอทให้เกิดเป็นต้นโดยผ่าน somatic embryogenesis ได้อีกด้วย Nakamura *et al.* (1988) พบว่า hairy root ของ *Nicotiana tabaccum* var. Samsun ที่เกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์ A4 สามารถเกิดเป็นต้นได้ในสูตรอาหาร MS (1962) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Tanaka *et al.* (1995) สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจาก hairy root ของ *Vinca minor* ซึ่งเกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์ pRi 1724 โดยเลี้ยง hairy root ในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 2.2 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิด

ยอดได้ปริมาณมาก Ohara *et al.* (2000) พบว่า hairy root ที่เกิดจากใบของ *Crotalaria juncea* ซึ่งเกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์ A13 สามารถเกิดเป็นต้นได้ในสูตรอาหาร half-MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จะเห็นได้ว่า hairy root สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป จึงนับได้เป็นข้อได้เปรียบและเป็นสิ่งจูงใจให้นักวิทยาศาสตร์มาสนใจศึกษา *A. rhizogenes* มากขึ้นและพยายามนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในทำนองเดียวกับ *A. tumefaciens* เนื่องจากได้มีการศึกษาในระดับโมเลกุลแล้วว่า *A. rhizogenes* และ *A. tumefaciens* มีความคล้ายคลึงกันมาก

กลไกการเกิด hairy root

A. rhizogenes ทำให้เกิด hairy root ในพืช โดยมีกลไกคล้ายกับการเกิดโรค crown gall ซึ่งเกิดจากสาเหตุคือ *A. tumefaciens* ซึ่งเชื้อทั้งสองนี้จะเข้าตรงบริเวณที่เกิดบาดแผลและทำการย้ายยีนจากเซลล์ของเชื้อเข้าไปยัง genome ของพืช ซึ่งมีรายงานยืนยันเกี่ยวกับกลไกการเกิด hairy root เช่น Chilton *et al.* (1982) พบว่าการเกิด hairy root โดยเชื้อ *A. rhizogenes* เป็นผลจากการถ่ายยีนบางส่วนคือ T-DNA (Transfer-DNA) จากพลาสมิดขนาดใหญ่คือ Root inducing plasmid (Ri-plasmid) เข้าสู่ genome ของพืชโดยได้แยก DNA จากเนื้อเยื่อ hairy root ของแครอท ซึ่งเกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์ 8196 นำไปทำ DNA hybridization กับ DNA จาก Ri-plasmid ของ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ 8196 พบว่า มีการจับคู่ของ DNA จาก Ri-plasmid กับบางส่วนของ DNA ของ hairy root แสดงว่ามี DNA จาก Ri-plasmid ย้ายเข้าไปอยู่ใน genome ของพืช Willmitzer *et al.* (1982) พบว่า เมื่อทำการแยก RNA จากเนื้อเยื่อ hairy root ของมันฝรั่งและมะเขือเทศซึ่งเกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์ 15834 แล้วสร้าง DNA โดยใช้ RNA ที่แยกได้นี้เป็นแม่แบบ แล้วนำไปทำ hybridize กับ DNA จาก Ri-plasmid ของ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ 15834 พบการจับของ DNA ทั้งสองเช่นกัน ในรากที่เป็น hairy root มีการสร้างสารในกลุ่ม opine ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน สารในกลุ่มนี้เป็นสารชนิดพิเศษที่พบได้ยากในพืชปกติ ชนิดของสารในกลุ่ม opine ที่เซลล์สร้างขึ้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เข้าบุกรุกพืช และสารประเภท opine นี้ก็สามารถพบได้ใน crown gall tumor เช่นกัน แต่เป็น opine ชนิดที่แตกต่างกันกับที่เกิดจาก hairy root สำหรับสาร opine ที่พบใน hairy root ที่เกิดจาก *A. rhizogenes* แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มคือ agropine mannopine cucumopine และ mikimopine (Savka *et al.*, 1990; Kanokwaree, 1997) สายพันธุ์ที่สร้างสาร agropine ได้แก่ สายพันธุ์ A4 15834 ATCC11325 และ ATCC13332 สายพันธุ์ที่สร้างสาร

mannopine ได้แก่ สายพันธุ์ 8196 TR7 และ TR101 เป็นต้น (Petit *et al.*, 1983) และสายพันธุ์ที่สร้างสาร cucumopine ได้แก่สายพันธุ์ K599 เป็นต้น (Savka *et al.*, 1990) สาร opine ที่เซลล์พืชสร้างขึ้นนี้จะเป็นอาหารของ *Agrobacterium* เพราะเป็นแหล่งให้ธาตุคาร์บอนและไนโตรเจนของ *Agrobacterium* (Ellis and Murphy, 1981; สุรินทร์, 2543) สารเหล่านี้สร้างขึ้นโดยยีนของเชื้อที่อยู่ระหว่าง T-DNA ดังนั้นการตรวจสอบสาร opine ใน hairy root จะต้องทำให้ hairy root ปลอดเชื้อ *Agrobacterium* ก่อน (Ellis and Murphy, 1981) *A. rhizogenes* สายพันธุ์ที่สร้าง opine ต่างชนิดกันมี T-DNA แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์สร้าง agropine มี T-DNA 2 ส่วนอยู่แยกจากกันใน Ri-plasmid คือ T_L-DNA (T-DNA left) T_R-DNA (T-DNA right) ใน T_L-DNA ไม่พบยีนที่ homologous กับ T_L-DNA ของ Ti-plasmid ของ *A. tumefaciens* แต่ใน T_R-DNA พบยีนที่ homologous กับ T_R-DNA ของ Ti-plasmid 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *tms* gene คือ trptophan monooxygenase และ indoleacetamide hydrolase ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ auxin ส่วนยีน *tmr* คือ isopentenyl tranferase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้าง isopentenyl adenosine และยีน *ags* ทำหน้าที่สังเคราะห์ agropine (Huffman *et al.*, 1984; Jouanin, 1984; Gelvin, 1990) จากรายงานของ Vilaine and Casse-Delbart (1987) พบว่า T_L-DNA และ T_R-DNA มีอิสระต่อกันในการชักนำให้เกิด hairy root แต่เมื่อขาด T_L-DNA หรือ T_R-DNA อย่างใดอย่างหนึ่ง พบว่า ทำให้ hairy root เจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร ดังที่ ได้ทำการศึกษาโดยดัดแปลง Ri-plasmid ของ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ A4 จาก wild type ซึ่งมีทั้ง T_L-DNA และ T_R-DNA ให้กลายเป็น Ri-plasmid ที่มีเฉพาะ T_L-DNA หรือ T_R-DNA อย่างใดอย่างหนึ่ง แล้วนำมาชักนำให้เกิด hairy root ใน *Nicotiana tabacum* และ *L. esculatum* พบว่าใน *N. tabacum* เกิด hairy root ได้เมื่อใช้สายพันธุ์ A4 ที่มีเฉพาะ T_L-DNA ให้ hairy root ที่เจริญได้ดีและไม่มีทิศทางการเจริญที่แน่นอน และ เมื่อใช้สายพันธุ์ A4 ที่มีเฉพาะ T_R-DNA พบว่า hairy root เกิดได้น้อยมากหรือไม่เกิดเลย และมีการเจริญได้ไม่ดี สำหรับใน *L. esculatum* เกิด hairy root ได้น้อย เมื่อใช้สายพันธุ์ A4 ที่มีเฉพาะ T_L-DNA และเมื่อใช้สายพันธุ์ A4 ที่มีเฉพาะ T_R-DNA พบว่า hairy root เกิดได้มากกว่าและเจริญได้ดี ส่วนสายพันธุ์ที่สร้าง mannopine และ cucumopine จะมี T-DNA เพียง 1 แห่ง (Gelvin, 1990) สายพันธุ์ที่สร้าง mannopine มี T-DNA ที่ homologous กับ T-DNA ของ Ti-plasmid ใน *A. tumefaciens* เพียง 1 ตำแหน่ง คือ ยีน *man* ทำหน้าที่สังเคราะห์ mannopine (Lahners *et al.*, 1984)

การเคลื่อนย้าย T-DNA จาก Ri-plasmid สู่ genome ของพืช มีกลไกเช่นเดียวกับการเคลื่อนย้าย T-DNA จาก Ti-plasmid สู่ genome ของพืช โดยมียีนบริเวณ virulence region (vir region) ซึ่งทำหน้าที่ส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช

การแสดงออกของยีนใน vir region ถูกกระตุ้นโดยสารพวก phenolic compound ที่เกิดขึ้นบริเวณบาดแผลของพืช (Stachel *et al.*, 1986) โดยสารเหล่านี้ทำให้ยีนบริเวณ vir region เกิด transcription ให้ vir enzyme ไปทำหน้าที่ส่งเสริมการเคลื่อนย้าย T-DNA จาก Ri หรือ Ti-plasmid ไปสู่ genome พืช โดย vir enzyme ไปทำหน้าที่บริเวณ right และ left border sequence ของ T-DNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 24-25 bp และมีลำดับเบสเป็น inverted repeat (Slightom,1986; Jouanin *et al.*, 1987; kanokwaree,1997) โดยเริ่มที่ right border ก่อน ดังนั้น right และ left border sequence จะเป็นตัวกำหนดขอบเขต T-DNA แล้วยังเป็น recognition site สำหรับ vir enzyme อีกด้วย ซึ่งบริเวณที่อยู่ระหว่าง left และ right border ของ T-DNA จะมียีนที่กำหนดการสังเคราะห์สาร opine และยังมียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชพวกออกซินและไซโตไคนินด้วย เป็นเหตุให้เซลล์พืชที่ได้รับยีนดังกล่าวให้มีการเจริญเติบโตรวดเร็วและไม่จำกัดขนาดของ T-DNA ที่เข้าไปใน genome ของพืช มีขนาดไม่แน่นอนเนื่องจากการเกิด deletion ระหว่างการแทรกเข้าไป จากรายงานของ Jouanin *et al.* (1987) ได้วิเคราะห์ DNA ที่แยกมาจากแต่ละ line ของ hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ A4 ของพืช 3 ชนิดคือ *Nicotiana plumbaginifolia* *N. tabacum* และ *Brassica napus* พบว่า T_L-DNA ในพืชทั้ง 3 ชนิด มีความยาวค่อนข้างคงที่ ส่วน T_R-DNA มีขนาดต่างกัน นอกจากนี้ David *et al.*, 1988 ยังยืนยันการวิจัยซึ่ง พบว่า T-DNA ของแต่ละ hairy root line จากแครอทต้นเดียวกันที่เกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์ 8196 มีขนาดไม่เท่ากัน ซึ่งเป็นการยืนยันว่าความยาวของ T-DNA ที่เข้าไปมีขนาดไม่แน่นอน และชนิดของพืชที่เป็น host ยังไม่สามารถใช้เป็นตัวกำหนดความยาว T-DNA ได้เช่นกัน นอกจากนี้จำนวนชุด T-DNA ที่เข้าไปก็มีจำนวนไม่แน่นอน เช่น จากรายงานการวิจัยของ Jouanin *et al.* (1987) ชักนำพืช 3 ชนิด ให้เกิด hairy root โดยใช้เชื้อสายพันธุ์ A4 พบว่า hairy root สายพันธุ์ต่างๆ ของ *N. plumbaginifolia* มี T_L-DNA จำนวน 1-2 ชุด และ T_R-DNA จำนวน 0-1 ชุด ส่วนของ *N. tabacum* มี T_L-DNA จำนวน 3 ชุด และ T_R-DNA จำนวน 1 ชุด และ *B. napus* มี T_L-DNA จำนวน 3-4 ชุด และ T_R-DNA จำนวน 1-4 ชุด Ambros *et al.* (1986) พบว่า T-DNA ไม่มีตำแหน่งที่สอดแทรกที่แน่นอนใน genome ของพืช โดยได้ทำการศึกษาตำแหน่งของ T-DNA บนโครโมโซมของ hairy root สายพันธุ์ต่างๆ ของ *Crepis capillaris* ที่เกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์ 8169 โดยวิธี *In situ* hybridization พบว่า ไม่มีตำแหน่งสอดแทรกที่เฉพาะเจาะจงของ T-DNA บนโครโมโซมของ hairy root และยังสามารถพบได้ทั้ง T-DNA 1 ชุด บนโครโมโซมใดโครโมโซมหนึ่งหรือ T-DNA 2 ชุด บนโครโมโซมต่างแท่งในเซลล์เดียวกันหรือ T-DNA 3 ชุด บนโครโมโซมแท่งเดียวกันอีกด้วย

การแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิด hairy root

การแสดงออกของยีนที่มีความสำคัญต่อการเกิด hairy root มี 4 ตำแหน่งคือ *rol* A *rol* B *rol* C และ *rol* D ซึ่งมีขนาดประมาณ 0.65 1.05 0.85 และ 1.25 kb ตามลำดับ (Taylor *et al.*, 1958) โดยยีนทั้ง 4 มีการแสดงออกถึงความรุนแรงในการชักนำให้เกิด hairy root ต่างกัน (Spena *et al.*, 1987) และยังมีผลต่อลักษณะของ transformed plant ที่เกิดจาก hairy root อีกด้วย โดยการศึกษาของ Schmulling *et al.* (1988) ใน transformed plant ของยาสูบที่เกิดจาก hairy root ที่ถูกชักนำโดย *A. rhizogenes* ซึ่งมีการรวมกันของยีน *rol* A *rol* B และ *rol* C แบบต่างๆ กัน พบว่า transformed plant ที่มีเฉพาะยีน *rol* A ใบมีรูปร่างเปลี่ยนแปลง ยอดเกสรตัวเมียและดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น seed capsule ใหญ่ขึ้น และปล้องสั้น ส่วน transformed plant ที่มีเฉพาะยีน *rol* B ใบมีรูปร่างเปลี่ยนแปลง ดอกเล็กลง seed capsule เล็ก ละอองเกสรน้อยลง และปล้องสั้น transformed plant ที่มีทั้งยีน *rol* A *rol* B และ *rol* C ใบจะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปมาก ดอก และ seed capsule เล็กมาก และ ปล้องสั้น

การแสดงออกของยีนใน T_R -DNA ใน *A. rhizogenes* พบว่า มียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ออกซิน คือ ยีน *tms* (ซึ่งเป็น homologous กับ T_R -DNA ของ *A. tumefaciens*) แบ่งออกเป็น 2 ตำแหน่ง คือ ยีน *tms* 1 ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ tryptophan monooxygenase ทำหน้าที่เปลี่ยน tryptophan เป็น indole-3-acetamide (Thomashow *et al.*, 1986) และยีน *tms* 2 code ซึ่งสังเคราะห์เอนไซม์ amidohydrolase ทำหน้าที่เปลี่ยน indole-3-acetamide ไปเป็น indole-3-acetic acid (Schroder *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*, 1984) นอกจากนี้ยังมียีน *tmr* ซึ่งสังเคราะห์เอนไซม์ isopentenyl transferase ที่ทำหน้าที่สร้าง isopentenyl adenosine ซึ่งเป็นสารพวกไซโตไคนินอีกด้วย ยีนต่างๆ เหล่านี้ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ดังนั้นส่วนสำคัญที่ทำให้มีการส่ง T-DNA จาก *Agrobacterium* ไปยังพืชคือ ยีน vir และ right และ left border sequence ของ T-DNA แต่ส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างสาร opine และฮอร์โมนพืชที่อยู่ภายใน T-DNA นั้น ไม่มีหน้าที่ในการส่งถ่าย T-DNA แต่อย่างใด

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

รังสิรัตน์ (2535) ได้นำ hairy root ของต้นกล้าลำโพงกาสลัก (*Datura metel* Linn.) ที่เกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์ A4 8196 R1000 และ 15834 ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อผลิตสาร atropine พบว่า ได้ผลดีบนชิ้นใบโดยสายพันธุ์ A4 8196 และ R1000 เมื่อแยก hairy root มาเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ซึ่งไม่ใส่ฮอร์โมน พบว่า hairy root สามารถเจริญได้ดีและรวดเร็วกว่ารากปกติ เมื่อศึกษาค่า growth index ของน้ำหนักสดของ hairy root พบว่า การเจริญในสูตรอาหารดัดแปลง B5 ดีกว่าสูตรดัดแปลง MS ประมาณ 2 เท่า และยังพบว่า transformed plant เกิดขึ้นมาจาก hairy root ได้ แต่ transformed plant ที่ได้มีลักษณะข้อสั้น ใบเป็นคลื่น และเจริญช้ามาก การวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ใน hairy root โดยวิธี HPLC พบว่า ปริมาณ atropine ใน hairy root 3 สายพันธุ์ที่เกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์ A4 และ R1000 มีปริมาณต่างกัน โดยมีปริมาณสูงสุด 0.49 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และ 0.56 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ atropine ในรากปกติ พบว่า hairy root มีปริมาณ atropine สูงกว่าในรากปกติประมาณ 2 เท่า และพบว่า hairy root ที่เจริญในที่มืดมีปริมาณ atropine สูงกว่า hairy root ที่เจริญในที่มีแสง

Yoshikawa and Furuya (1987) ได้ทำการศึกษาปริมาณแอลคาลอยด์จาก hairy root ของโสม (*Panax ginseng*) ซึ่งเลี้ยงในสูตรอาหาร MS (1962)) ที่ไม่เติมฮอร์โมน พบว่า hairy root ของโสมเจริญได้ช้ากว่า แต่มีปริมาณแอลคาลอยด์ saponin และ ginsenosides มากกว่าในรากปกติ 1.78 เท่า แต่เมื่อเติมฮอร์โมน IBA และ kinetin ลงในอาหารด้วยจะช่วยให้การเจริญ และปริมาณแอลคาลอยด์ของ hairy root สูงขึ้นกว่าเดิม 2.02 และ 2.80 เท่า ตามลำดับ

Robin *et al.* (1987) ศึกษาการเติม selective agent เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ hairy root ของ *Nicotiana rustica* ที่มี nicotine สูงพบว่า การเติม nicotinic acid 2.45 ไมโครโมลาร์ ลงในสูตรอาหาร B5 ทำให้การเจริญของ hairy root ลดลง แต่มีผลดีต่อการผลิตสารแอลคาลอยด์ของ hairy root ทำให้สาร nicotine anatabine nornicotine และ anabasine เพิ่มขึ้นได้

Christen *et al.* (1989) ศึกษาปริมาณแอลคาลอยด์ที่พบใน hairy root *Datura candida* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS (1962) อายุ 1 เดือน พบว่า มี scopolamine 0.57 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และ hyoscyamine 0.11 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าในรากปกติ

Ikuli and Demeyer (1997) ได้นำ *Datura stramonium* มา infect ด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC 15834 โดยเลี้ยงไว้ 6-8 สัปดาห์ หลังจากการ infect แล้วตัดรากให้มีความยาวอย่างน้อย 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงในสูตรอาหารเหลว B5 แล้วทำการศึกษาอายุการเพาะเลี้ยง พบว่า เมื่อเก็บรากที่เพาะเลี้ยงหลังจาก 6 สัปดาห์ ให้ปริมาณสาร hyoscyamine เพิ่มมากขึ้นกว่าเมื่ออายุ 4 สัปดาห์

Kittipongpatana *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตสาร solasodine จากการเพาะเลี้ยง hairy root ของ *Solanum aviculare* Forst. พบว่า เมื่อนำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ สามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้ต่างกัน โดยสายพันธุ์ ATCC15834 A4 ATCC43057 และ ATCC11325 ให้เปอร์เซ็นต์ การเกิด hairy root คือ 90 83 43 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณของสาร solasodine พบว่า สูตรอาหาร 1.50 เท่าของ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณสารถึง 6.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และที่เลี้ยงในสูตรอาหาร 1.50 เท่าของ B5 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณสาร 5.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

Guo *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาการผลิตสาร antraquinones จากการเพาะเลี้ยง hairy root ของ *Cassia obtusifolia* โดยการนำชิ้นส่วนใบเลี้ยงมา infect ด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ 9402 พบว่า สามารถผลิตสารในกลุ่ม antraquinones ออกมาได้ และเมื่อทำการศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยง พบว่า เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร MS (1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มธาตุอาหาร Eu^{3+} จะช่วยกระตุ้นการสร้างสาร antraquinones ได้เพิ่มขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้ต้นเจตมูลเพลิงแดง (*P. indica* L.) ที่ได้มาจากสวนยาไทยทองนพคุณ อำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และใช้ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 มาศึกษาเทคนิคการชักนำและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิโดยมีวิธีการดังนี้ คือ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจตมูลเพลิงแดง

การฟอกฆ่าเชื้อ นำท่อนพันธุ์ของเจตมูลเพลิงแดงจากสวนยาไทยทองนพคุณ อำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี มาฟอกฆ่าเชื้อโดยตัดกิ่งที่มีตาข้างและตายอดมาล้างด้วยน้ำสะอาดจากนั้นตัดแยกชิ้นส่วนของตายอดและตาข้างแช่ลงในสารละลายยาปฏิชีวนะเพ็นสเตรป (M&H Manufacturing Co., LTD.) ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตรร่วมกับสารกำจัดเชื้อรา Benlate (ดูปองท์, ประเทศไทย จำกัด) ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ผิวพืช จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนลงในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วจึงนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ (a.i. sodium hypochlorite 6 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ แล้วล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

1.1 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

นำส่วนของตาข้างและตายอดของเจตมูลเพลิงแดงที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (1962) เพื่อให้ได้ต้นสำหรับใช้ในการทดลอง จากนั้นตัดส่วนของตาข้างและตายอดจากชิ้นพืชในสภาพเพาะเลี้ยงนี้มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 28 $\mu mol/m^2/s$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 4 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD จัดสิ่งทดลองแบบ 5 × 2 factorial มี 2 ปัจจัย คือ สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA จำนวน 5 ระดับ และชิ้นส่วนของพืช 2 ชนิดคือ ตายอดและตาข้าง ทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วนพืช

บันทึกผล - จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช

- ความยาวเฉลี่ยของยอด
- จำนวนใบเฉลี่ยของแต่ละยอด

1.2 การชักนำให้ยอดพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

นำเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ดีที่สุดสำหรับชักนำให้เกิดยอด (จากการทดลองที่ 1 คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาเพาะเลี้ยงโดยตัดก้อน callus ที่มียอดขนาดเล็กให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้ยอดพัฒนายืดยาวขึ้น โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 28 $\mu mol/m^2/s$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วนพืช

บันทึกผล
- จำนวนยอดที่สมบูรณ์
- ความยาวเฉลี่ยของยอด
- จำนวนใบเฉลี่ยต่อยอด

1.3 การชักนำให้เกิดราก

นำยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ ความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร มีใบจำนวนใบ 3-4 ใบ มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร และสูตรอาหาร half-strength MS ซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 28 $\mu mol/m^2/s$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน โดยจะเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วนพืช

บันทึกผล
- ลักษณะของราก
- น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของราก
- จำนวนของราก
- ความยาวเฉลี่ยของราก

2. การชักนำให้เกิด hairy root

2.1 การเตรียมเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332

1.1.1 การวัดความขุ่นของเชื้อ (turbidity) โดยการ streak เชื้อ *A. rhizogenes* แต่ละสายพันธุ์ลงบนสูตรอาหารแข็ง YEB จนได้ single colony จากนั้นนำ single colony ย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YEB โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 280 รอบต่อนาที ในช่วงระยะเวลา 2 ถึง 72 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่า optical density (O.D.) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร แล้วนำมาเขียนกราฟที่ได้มาหาช่วงที่เหมาะสมต่อการ infect พืช ซึ่งควรเป็นช่วงการเจริญที่อยู่ในระยะ log phase ซึ่งในการปฏิบัติครั้งต่อไป จะใช้วิธีคำนวณเวลาในการเพาะเลี้ยงโดยอ้างอิงจากค่า O.D. ที่ได้จากกราฟ

2.2 การ infect พืชด้วยเชื้อ *A. rhizogenes*

นำต้นเจตมูลเพลิงแดงที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ที่มีความสูงอยู่ในช่วง 4-6 เซนติเมตร มาชักนำให้เกิด hairy root โดยนำเชื้อ *A. rhizogenes* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YEB ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เขย่าด้วยความเร็ว 280 รอบต่อนาที ช่วงระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำมา infect บนลำต้นของเจตมูลเพลิงแดง โดยแบ่งวิธีการทำบาดแผล 2 วิธีการ ดังนี้

<u>วิธีที่ 1</u> นำปลายเข็มที่มีขนาด 26G1/2 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มสารละลายเชื้อ แล้วนำไปแทงบนลำต้นเจตมูลเพลิงแดงตั้งแต่ข้อที่ 4 จากโคนขึ้นไป เพื่อทำให้เกิดบาดแผล 20 บาดแผลต่อต้น (ดัดแปลงมาจาก Kanokwaree, 1997)

<u>วิธีที่ 2</u> นำมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมากรีดบนลำต้นให้เป็นแนวยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดตรงบริเวณรอยบาดแผล (ดัดแปลงมาจาก Cho *et al.*, 2000)

หลังจากทำการ infect ด้วยวิธีการต่างๆ ดังกล่าวแล้ว ย้ายต้นพืชมาเลี้ยงในสูตรอาหารแข็ง MS (1962) ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 28 $\mu mol/m^2/s$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 วัน จากนั้นย้ายลงในสูตรอาหาร MS (1962) ที่เติมยาปฏิชีวนะ

cefotaxime ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เพื่อกำจัดเชื้อ *A. rhizogenes*

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD)

ทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ต้น

การบันทึกผลการทดลองโดยเปรียบเทียบผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเกิด hairy root โดยนับจากจำนวนชิ้นพืชที่เกิด hairy root

3. <u>การเพาะเลี้ยง hairy root</u>

เพาะเลี้ยง hairy root ในอาหารและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เพื่อให้ได้สูตรอาหารและสภาพเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณของ hairy root โดยนำ hairy root ที่กำจัดเชื้อ *A. rhizogenes* ออกหมดแล้ว (ผลจากข้อ 1) น้ำหนักสดเริ่มต้น 0.1 กรัม ย้ายมาเลี้ยงในอาหารแข็งและสูตรอาหารเหลว MS half-strength MS B5 และ half-strength B5 ในสภาพที่มีแสงสว่าง (ความเข้มแสงประมาณ 28 $\mu mol/m^2/s$ ช่วงแสง 16 ชั่งโมงต่อวัน) และที่มืด ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ 4 x 2 x 2 factorial in CRD

ปัจจัยที่ 1 คือ อาหารสูตรต่าง ๆ 4 สูตร

ปัจจัยที่ 2 คือ สภาพอาหารแข็งและอาหารเหลว

ปัจจัยที่ 3 คือ สภาพที่มีแสงและที่มืด

ทำการทดลองจำนวนทรีทเมนต์ละ 20 ขวด

บันทึกผลการทดลองโดย เปรียบเทียบผลการเจริญของ hairy root ที่เกิดจาก *A. rhizogenes* เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารและสภาวะที่แตกต่างกัน โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย growth index ของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งโดยใช้สูตรคำนวณ คือ

น้ำหนักแห้งของ hairy root Fresh growth index (FGI) = $\frac{\text{final fresh weight} - \text{initial fresh weight}}{\text{initial fresh weight}}$

น้ำหนักสดของ hairy root Dry growth index (DGI) = $\frac{\text{final dry weight} - \text{initial dry weight}}{\text{initial dry weight}}$

4. <u>การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin</u>

4.1 การสกัดแยกสาร plumbagin (ดัดแปลงจาก อรสา, 2543)

4.1.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

4.1.2 บดเนื้อเยื่อแห้งให้ละเอียดแล้วนำมาชั่ง 500 มิลลิกรัม ใส่ลงใน flask ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลายชนิดที่มีขั้ว (polar solvent) คือ เมทานอล จำนวน 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.1.3 นำข้อ 4.1.2 ที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร จะได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อนถึงเข้ม จากนั้นนำมาวางบน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้เมทานอลระเหยออกจนหมด ใช้เวลา 2 วัน

4.1.4 นำ crude ที่ได้จากข้อ 4.1.3 มาละลายด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ จำนวน 400 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายที่ละลายได้มากรองด้วย syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ใส่ลงใน vial ที่มี insert vial จากนั้นนำไประเหยแห้ง

4.1.5 นำ crade ข้อ 4.1.4 มาละลายด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร ที่ผ่านการกรองแล้ว ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

4.2 การวิเคราะหปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography)

4.2.1 ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ (อรสา, 2543) ชนิดของเครื่อง Agillent รุ่น 1100 ชนิดของคอลัมน์ Agilent Zorbax SB-C18 Stable bond ® Analytical 4.6 มิลลิลิตร IDX250 มิลลิลิตร (5 ไมโครลิตร) Serial number USCL 011275 made in U.S.A
สภาวะของการเครื่องระบบส่งตัวทำละลาย อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที
สภาวะของการวิเคราะห์ผล Detection ดูดกลืนแสง 270 นาโนเมตร
Temperature 25-30 องศาเซลเซียส
Flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที

4.2.2 การเตรียมสาร ที่เป็นของเหลวซึ่งจะเข้าสู่ระบบส่งตัวทำละลาย ต้องผ่านการกรองก่อนทุกชนิด ดังนี้

4.2.2.1 น้ำกลั่น (กลั่นไว้ไม่เกิน 3 วัน) และ กรดอะซิติค 40 เปอร์เซ็นต์ การกรองโดยใช้กระดาษกรอง cellulose สำหรับกรองน้ำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

4.2.2.2 เมทานอล 60 เปอร์เซ็นต์ กรองโดยใช้กระดาษกรอง teplon สำหรับกรองน้ำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร
สารละลายที่ใช้ในระบบวิเคราะห์ (solvent system) เตรียม กรดอะซิติค:เมทานอล ในอัตราส่วน 40 : 60 เปอร์เซ็นต์

4.2.3 กระบวนการวิเคราะห์ เตรียมฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่องโดยล้างเข็มฉีดด้วยเมทานอล 10เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารละลายตัวอย่าง 2 ซ้ำ ใช้ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่อง 10 ไมโครลิตร รอจนเครื่องรายงานผล

การบันทึกผล หาปริมาณสาร plumbagin จากความเข้มข้นของ plumbagin ที่คำนวณได้จากสมการ liner regression equation ของ plumbagin standard และค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์

4.3 การเปรียบเทียบปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root กับรากธรรมชาติและรากปกติที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่สภาพอาหารแข็งและเหลว และสภาพที่มีแสงและที่มืด มาเปรียบเทียบกับรากแห้งธรรมชาติที่มีอายุ 3-4 ปี ที่นำมาจากร้านหลวงธรรมโอสถ ตำบลบ้านยาง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และรากที่เกิดจากต้นที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีอายุ 2-3 เดือน

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการพัฒนาพันธุ์พืชและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและพันธุวิศวกรรม ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

เวลาทำการทดลอง

ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2543 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2546

ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์

1.1 การชักนำให้เกิดยอด

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเจตมูลเพลิงแดงให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยนำตายอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า BA ทุกระดับความเข้มข้นสามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชสร้าง organogenic callus ได้ดี โดย callus ที่ได้มีลักษณะคล้ายกันคือ มีสีเขียวปนน้ำตาลเกาะกันแน่นเป็นกลุ่ม ซึ่ง BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิด callus ได้ดีที่สุด แคลลัสที่ได้จากทุกสูตรอาหารที่ทดสอบสามารถพัฒนาไปเป็นยอดจำนวนมากได้ แต่สูตรที่ใช้ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ callus เกิดยอดได้มากที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดจากชิ้นส่วนเริ่มต้นตายอด 89.50 ยอด และจากชิ้นส่วนเริ่มต้นตาข้าง 201.62 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ส่วนตายอดและตาข้างที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนพืชจะไม่สร้าง callus แต่จะเกิดเป็นยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ขนาดใหญ่ โดยเกิดยอดสูงสุดเพียง 1.4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเท่านั้น (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 2 และ 3)

จากการทดลองนี้พบว่า ปัจจัยที่ทดสอบให้ผลการทดลองที่แตกต่างทางสถิติ โดยชิ้นส่วนเริ่มต้นมีผลอย่างมากต่อปริมาณยอดที่เกิดขึ้น ซึ่งการใช้ชิ้นส่วนตาข้างให้ผลดีกว่าชิ้นส่วนของตายอดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และเมื่อพิจารณาปัจจัยของสารควบการเจริญเติบโต คือ ระดับของ BA พบว่ามีความแตกต่างยิ่งทางสถิติเช่นกัน ในส่วนของปัจจัยร่วมระหว่างชิ้นส่วนพืชและความเข้มข้นของ BA ที่ใช้พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 1 และ ตารางภาคผนวกที่ 1)

1.2 การชักนำให้ยอดพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

จากการทดลองชักนำให้เกิดยอดจาก callus ซึ่งพบว่า การใช้ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดจำนวนมากที่สุด แต่ยอดที่ได้มีขนาดเล็กและไม่สมบูรณ์จึงได้ตัดแบ่งและย้ายแคลลัสที่เกิดยอดเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ที่มีความเข้มข้นต่ำลงคือ 1 และ 2

มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรที่ไม่เติม BA เพื่อชักนำให้ยอดเหล่านั้นพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์พบว่า เมื่อย้ายลงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดสามารถยืดยาวพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ดี จำนวนใบเพิ่มขึ้นและขยายขนาดใบเพิ่มขึ้นคล้ายใบปกติ ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดจะมีขนาดสั้นและเล็ก ขณะที่การเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม BA เลยนั้นยอดจะไม่พัฒนา และมีการตายของยอดบางส่วน (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 4)

1.3 การชักนำให้เกิดราก

เมื่อนำยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ขนาดเล็กที่ได้จากการชักนำให้ยอดพัฒนาขึ้นเป็นยอดสมบูรณ์ในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดรากพบว่า การเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร half-strength MS จะเกิดรากฝอยจำนวนมาก ส่วนยอดที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS จะให้รากที่ยาวอวบ มีรากฝอยน้อย และสำหรับยอดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิด callus ลักษณะฉ่ำน้ำบริเวณโคนต้นและเกิดรากจำนวนน้อย มีขนาดสั้นมาก (ภาพที่ 5) จึงทำให้ไม่สามารถวัดและวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้ ส่วน half-strength MS และ MS เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test พบว่า จำนวนของรากเฉลี่ยและความยาวเฉลี่ยต่อราก ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่น้ำหนักสดและแห้งของรากเฉลี่ยต่อต้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและแห้งของรากที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร half-strength MS ให้ค่าเฉลี่ยมากกว่าสูตรอาหาร MS (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 5)

ตารางที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่มีต่อการเกิดยอดและการเกิด callus ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน

ชิ้นส่วนพืช	BA (มก./ล.)	คะแนนการเกิด callus	จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.)	จำนวนใบเฉลี่ยต่อยอด (ใบ)
ตายอด	0	0.00	1.40c	4.15a	5.85
	1	1.75	42.22bc	0.66b	3.75
	2	1.80	68.90bc	0.44bc	3.23
	3	1.87	89.50b	0.43bc	3.31
	4	2.00	73.67bc	0.35c	2.37
ตาข้าง	0	0.00	1.10c	4.29a	6.05
	1	2.35	66.10bc	0.70b	3.79
	2	2.85	75.00bc	0.30c	3.68
	3	3.20	201.60a	0.20c	3.23
	4	3.33	179.60a	0.20c	2.94
Pr-F	ผลของอาหาร	-	0.0001	0.0001	0.0001
	ผลของชิ้นส่วนพืช	-	0.0015	0.2561	0.0369
	ผลของอาหาร×ผลของชิ้นส่วนพืช	-	0.0322	0.2903	0.6530

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

คะแนนการเกิด callus

0 = ไม่เกิด callus 1 = เกิด callus เล็กน้อย (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ซม.) 2 = เกิด callus ปานกลาง (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 ซม.) 3 = เกิด callus มาก (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 ซม.)

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของยอดที่พัฒนาขึ้น หลังจากนำยอดเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

BA (มก./ล.)	จำนวนยอดที่สมบูรณ์ (ยอด)	ความยาวของยอด (ซม.)	จำนวนใบ
0	0b	0b	0b
1	23.8a	1.088a	3.984a
2	7.2b	1.026a	3.672a
P-value	0.0001	0.0001	0.0001
C.V.	54.99	14.99	11.10

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 3 ผลของสูตรอาหารต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดในสภาพเพาะเลี้ยงของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน

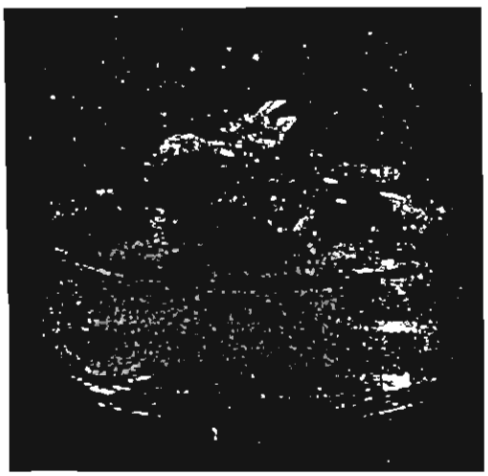
สูตรอาหาร	จำนวนของรากเฉลี่ย	ความยาวเฉลี่ยต่อราก (ซม.)	น้ำหนักสดของรากเฉลี่ยต่อต้น (ก.)	น้ำหนักแห้งของรากเฉลี่ยต่อต้น (ก.)
Half-strength MS	12.0a	2.37b	0.464a	0.0741a
MS	3.40b	7.218a	0.119b	0.0180b
MS+NAA 0.5 มก/ล	ND	ND	ND	ND
MS+NAA 1 มก/ล	ND	ND	ND	ND
MS+NAA 1.5 มก/ล	ND	ND	ND	ND
MS+NAA 2 มก/ล	ND	ND	ND	ND
Pr>F[1/]	0.3303	0.0901	0.0082	0.0033

[1/] การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test จากข้อมูลเฉพาะสูตรอาหาร Half-strength MS และสูตรอาหาร MS

ND = ไม่สามารถบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้เนื่องจาก รากสั้นเป็นกระจุกสีน้ำตาลปนขาวบริเวณรอยตัด และเกิด callus สีเทาเกาะเป็นก้อนฉ่ำน้ำ

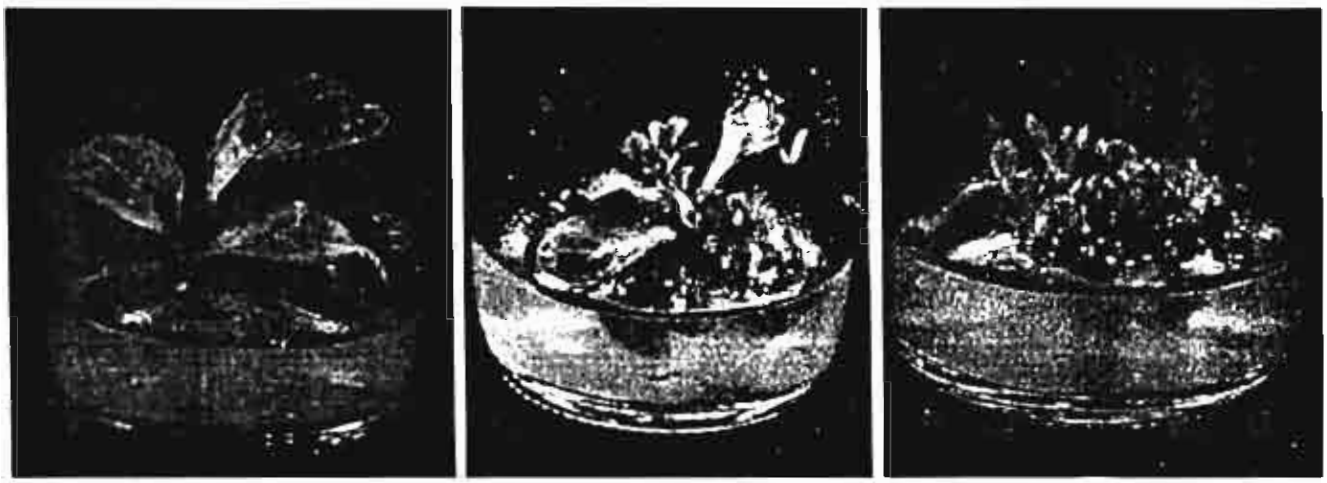
MS+BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร MS+BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร MS+BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

MS+BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร



MS+BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

<u>ภาพที่ 2</u> ลักษณะของยอดเจตมูลเพลิงแดงที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตายอดในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่ออายุ 4 เดือน



MS+BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร MS+BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร MS+BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

MS+BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

MS+BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

<u>ภาพที่ 3</u> ลักษณะของยอดเจตมูลเพลิงแดงที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตาข้างในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่ออายุ 4 เดือน

MS+BA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

MS+BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

MS+BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 4 ลักษณะการพัฒนาของยอดที่ได้จากการนำยอด callus ที่มียอดขนาดเล็กจากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเลี้ยงบนสูตรอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

Half strength-MS

MS

MS+NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

MS+NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

MS+NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

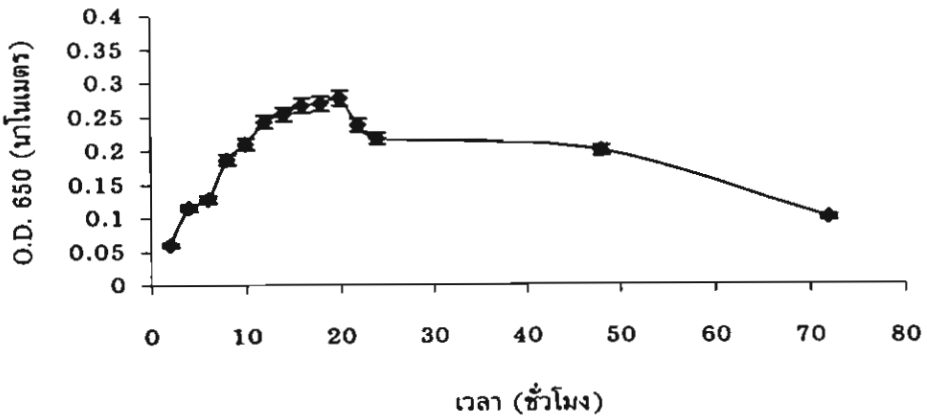
MS+NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

<u>ภาพที่ 5</u> ลักษณะการเกิดรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่เลี้ยงนาน 3 เดือน

2. <u>การชักนำให้เกิด hairy root</u>

2.1 การเตรียมเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332

เมื่อนำค่า O.D. ที่วัดได้จากระยะเวลาในการเลี้ยงต่าง ๆ กันมาเขียนกราฟพบว่า ระยะเวลาที่เชื้อมีการเจริญเติบโตแบบ log phase อยู่ในช่วงของการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10-20 ชั่วโมง (ภาพที่ 6) อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลดังกล่าวการทดลองนี้เลือกใช้ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อที่ 12 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อนำเชื้อในระยะดังกล่าวมานับจำนวนเซลล์ของเชื้อโดยวิธี colony count พบว่า มีความเข้มข้นของเชื้อ 1.5×10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



<u>ภาพที่ 6</u> การเจริญของเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ในอาหารเหลวสูตร YEB เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 280 รอบต่อนาที

2.2 การ infect พืชด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332

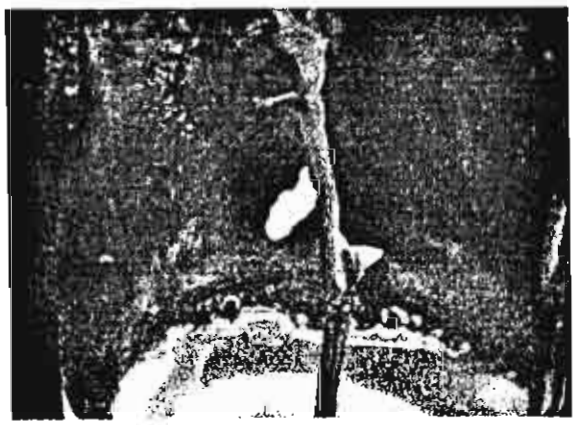
จากการทดลองทำบาดแผลบนลำต้น 2 วิธี แล้ว infect โดยใช้เชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 พบว่า วิธีการใช้เข็มแทงและวิธีการกรีดมีเปอร์เซ็นต์ต้นที่เกิด hairy root เฉลี่ย 67 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การชักนำให้เกิด hairy root บนลำต้นเจตมูลเพลิงแดง โดยเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 โดยวิธีการทำบาดแผล 2 วิธี เป็นเวลา 4 สัปดาห์

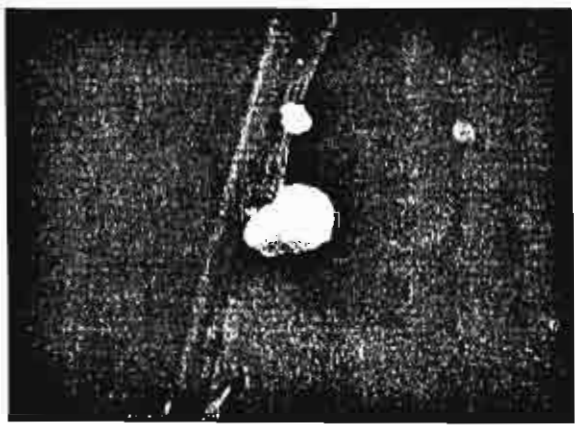
วิธีการทำบาดแผล	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		เฉลี่ย %HR
	HR	%HR	HR	HR %	
กรีดด้วยมีด	18	60	22	73	67
แทงด้วยเข็ม	20	67	19	63	65
Pr>F[1/]					0.3126[NS]

[1/] การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test NS = ไม่แตกต่างทางสถิติ

HR = จำนวนชิ้นพืชที่เกิด hairy root จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น 30 ชิ้น

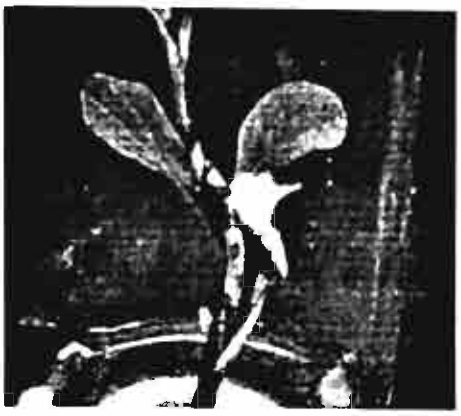


กรีดด้วยมีด



แทงด้วยเข็ม

ภาพที่ 7 การเกิด hairy root บนลำต้นเจตมูลเพลิงแดง



แทงด้วยเข็ม

กรีดด้วยมีด

ภาพที่ 8 การชักนำให้เกิด hairy root บนลำต้นเจตมูลเพลิงแดง โดยเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 โดยวิธีการทำบาดแผล 2 วิธี เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3. การเพาะเลี้ยง hairy root

3.1 ผลการเพาะเลี้ยง hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร B5 half-strength B5 MS และ half-strength MS ในสภาพที่มีแสงและที่มืด แล้วนำมาหาค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) พบว่า สูตรอาหาร B5 ในสภาพอาหารเหลวและที่มืด ให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ดีที่สุด คือ 3.94 และ 1.89 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

นอกจากนี้ hairy root ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร และสภาพการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ สามารถชักนำให้ hairy root เกิดการ regeneration ได้ โดยเลี้ยงในสภาพที่มีแสงจะเกิดการ regeneration ให้ยอดที่มีสีเขียว และในสภาพที่มืดก็สามารถเกิดการ regeneration ได้เช่นกัน แต่น้อยกว่าในที่มีแสงให้ยอดมีสีเหลือง และเมื่อนำยอดทีมีสีเหลืองย้ายมาเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง สามารถเปลี่ยนเป็นยอดที่มีสีเขียวได้เช่นกัน ส่วนลักษณะของต้นที่ regeneration มีหลายลักษณะคือ ลักษณะต้นที่เหมือนต้นปกติ

แต่บางต้นมีลักษณะเตี้ยแคระแกร็น ข้อปล้องสั้น ใบหงิกงอและสั้นเป็นกระจุก ขอบใบม้วน และรากที่เกิดมีทิศทางการเจริญที่ไม่แน่นอน เป็นต้น

เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติจากปัจจัยต่าง ๆ คือ สูตรอาหาร สภาพอาหารแข็งและเหลว และสภาพที่มีแสงและมืด รวมถึงปัจจัยร่วมต่าง ๆ พบว่า ปัจจัยของสูตรอาหารคือ B5 half-strength B5 MS half-strength MS และ ปัจจัยสภาพอาหารแข็งและเหลว ให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ ส่วนสภาพที่มีแสงและที่มืดให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ ส่วนค่า Dry Growth Index (DGI) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อวิเคราะห์อิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับสภาพอาหารแข็งและเหลวให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ อิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับสภาพที่มีแสงและที่มืดให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ ส่วนค่า Dry Growth Index (DGI) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อิทธิพลร่วมระหว่างสภาพอาหารแข็งและเหลวกับสภาพที่มีแสงและที่มืดให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ และอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัยคือ สูตรอาหารกับสภาพอาหารแข็งและเหลว และสภาพที่มีแสงและที่มืดให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 5 ถึง 11 และ ภาพที่ 9)

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยของ Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร B5 half-strength B5 MS และ half-strength MS เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	Fresh Growth Index (FGI) FGI±SD	Dry Growth Index (DGI) DGI±SD
B5	3.53a	1.70a
half-strength B5	3.31b	1.50b
MS	3.22c	1.34c
half-strength MS	3.21c	1.37d
Pr> F	0.0001	0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยของ Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสภาพอาหารแข็งและเหลว เป็นเวลา 1 เดือน

สภาพอาหาร	Fresh Growth Index (FGI) FGI±SD	Dry Growth Index (DGI) DGI±SD
อาหารแข็ง	3.26b	1.38b
อาหารเหลว	3.37a	1.51a
Pr> F	0.0001	0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

<u>ตารางที่ 7</u> ค่าเฉลี่ยของ Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

สภาพที่มีแสงและมืด	Fresh Growth Index (FGI) FGI±SD	Dry Growth Index (DGI) DGI±SD
แสง	3.29b	1.47b
มืด	3.34a	1.49a
Pr> F	0.0011	0.0273

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของ Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารและสภาพอาหารแข็งและเหลว เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	สภาพอาหาร	Fresh Growth Index (FGI) FGI±SD	Dry Growth Index (DGI) DGI±SD
B5	อาหารแข็ง	$3.35b \pm 7.637e^{-2}$	$1.59b \pm 9.550e^{-2}$
	อาหารเหลว	$3.70a \pm 3.061e^{-1}$	$1.83a \pm 8.750e^{-2}$
half-strength B5	อาหารแข็ง	$3.29bcd \pm 1.050e^{-1}$	$1.46d \pm 1.083e^{-1}$
	อาหารเหลว	$3.33bc \pm 1.815e^{-1}$	$1.54c \pm 1.269e^{-1}$
MS	อาหารแข็ง	$3.20de \pm 3.620e^{-2}$	$1.32f \pm 2.601e^{-2}$
	อาหารเหลว	$3.24cde \pm 4.444e^{-2}$	$1.43de \pm 2.720e^{-2}$
half-strength MS	อาหารแข็ง	$3.18e \pm 9.577e^{-2}$	$1.30f \pm 1.989e^{-2}$
	อาหารเหลว	$3.24cde \pm 3.582e^{-2}$	$1.39e \pm 3.640e^{-2}$
Pr> F		0.0001	0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของ Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารและสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	สภาพที่มีแสงและมืด	Fresh Growth Index (FGI) FGI±SD	Dry Growth Index (DGI) DGI±SD
B5	แสง	$3.42b \pm 8.136e^{-2}$	$1.70a \pm 1.039e^{-1}$
	มืด	$3.63a \pm 3.654e^{-1}$	$1.72a \pm 1.875e^{-1}$
half-strength B5	แสง	$3.31c \pm 1.873e^{-1}$	$1.49b \pm 8.568e^{-2}$
	มืด	$3.30cd \pm 9.849e^{-2}$	$1.51b \pm 1.540e^{-1}$
MS	แสง	$3.21cd \pm 4.238e^{-2}$	$1.38c \pm 4.661e^{-2}$
	มืด	$3.23cd \pm 4.662e^{-2}$	$1.37c \pm 7.575e^{-2}$
half-strength MS	แสง	$3.20d \pm 5.739e^{-2}$	$1.33c \pm 3.082e^{-2}$
	มืด	$3.22cd \pm 9.119e^{-2}$	$1.35c \pm 6.715e^{-2}$
Pr> F		0.0001	0.2851

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

<u>ตารางที่ 10</u> ค่าเฉลี่ยของ Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสภาพอาหารแข็งและเหลวและสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

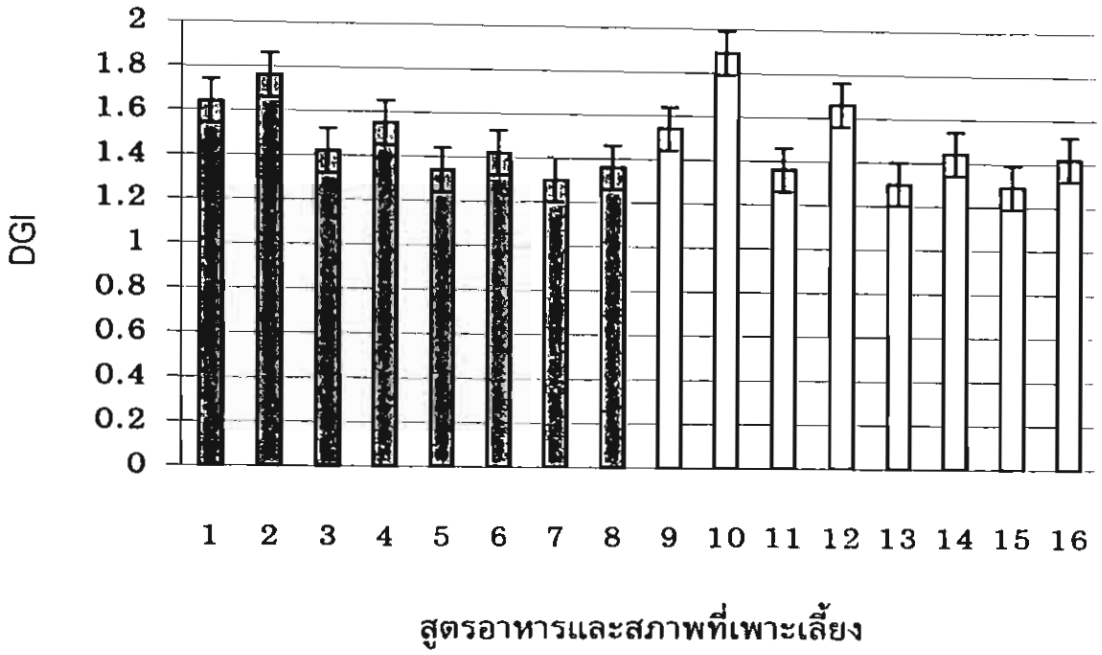
สภาพอาหาร	สภาพที่มีแสงและมืด	Fresh Growth Index (FGI) FGI±SD	Dry Growth Index (DGI) DGI±SD
อาหารแข็ง	แสง	$3.28b \pm 1.139e^{-1}$	$1.46b \pm 1.572e^{-1}$
อาหารแข็ง	มืด	$3.23b \pm 6.697e^{-2}$	$1.37c \pm 1.054e^{-1}$
อาหารเหลว	แสง	$3.29b \pm 1.620e^{-1}$	$1.49b \pm 1.637e^{-1}$
อาหารเหลว	มืด	$3.46a \pm 3.188e^{-1}$	$1.60a \pm 1.993e^{-1}$
	Pr> F	0.0001	0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยของ Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร สภาพอาหารแข็งและเหลว และสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

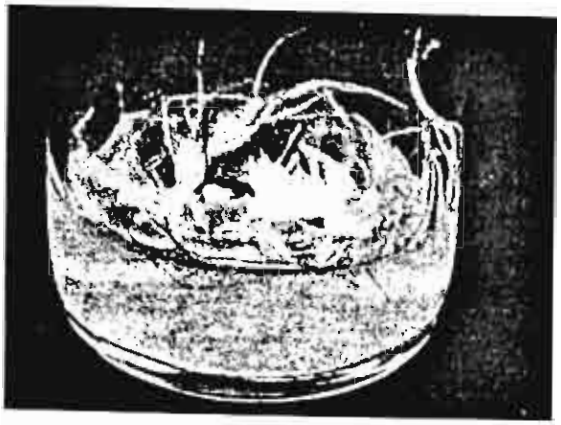
สูตรอาหาร	สภาพอาหาร	สภาพที่มีแสงและมืด	Fresh Growth Index (FGI) FGI±SD	Dry Growth Index (DGI) DGI±SD
B5	อาหารแข็ง	แสง	3.39bc±8.017e^{-2}	1.64c±1.098e^{-1}
		มืด	3.32cde±5.888e^{-2}	1.54d±4.522e^{-2}
	อาหารเหลว	แสง	3.46b±6.773e^{-2}	1.76b±5.109e^{-2}
		มืด	3.94a±2.532e^{-1}	1.89a±5.941e^{-2}
half-strength B5	อาหารแข็ง	แสง	3.27def±2.421e^{-1}	1.42e±3.163e^{-2}
		มืด	3.22ef±3.433e^{-2}	1.36f±1.457e^{-2}
	อาหารเหลว	แสง	3.36cd±1.067e^{-1}	1.55d±7.086e^{-2}
		มืด	3.38bc±6.168e^{-2}	1.66c±3.927e^{-2}
MS	อาหารแข็ง	แสง	3.21f±4.668e^{-2}	1.34fg±1.776e^{-2}
		มืด	3.19f±1.969e^{-2}	1.30g±1.877e^{-2}
	อาหารเหลว	แสง	3.22ef±3.945e^{-2}	1.42e±2.314e^{-2}
		มืด	3.26def±4.040e^{-2}	1.44e±2.763e^{-2}
half-strength MS	อาหารแข็ง	แสง	3.19f±1.088e^{-2}	1.30g±1.796e^{-2}
		มืด	3.18f±3.302e^{-2}	1.29g±2.150e^{-2}
	อาหารเหลว	แสง	3.22ef±6.915e^{-2}	1.36f±1.185e^{-2}
		มืด	3.25ef±1.179e^{-1}	1.42e±2.360e^{-2}
	Pr>F		0.0001	0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

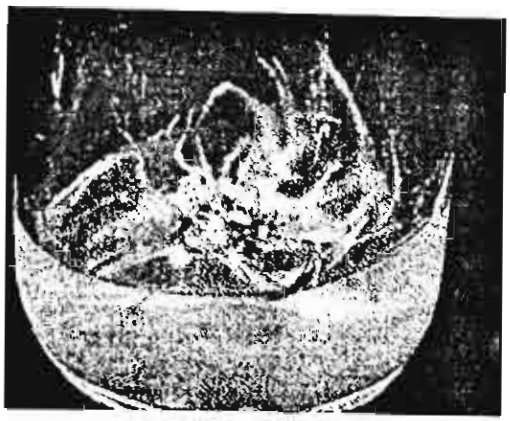


ภาพที่ 9 ค่าเฉลี่ยของ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร สภาพอาหารแข็งและเหลวและสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

1 = สูตร B5 อาหารแข็ง ที่มีแสง
2 = สูตร B5 อาหารเหลว ที่มีแสง
3 = สูตร half-strength B5 อาหารแข็ง ที่มีแสง
4 = สูตร half-strength B5 อาหารเหลว ที่มีแสง
5 = สูตร MS อาหารแข็ง ที่มีแสง
6 = สูตร MS อาหารเหลว ที่มีแสง
7 = สูตร half-strength MS อาหารแข็ง ที่มีแสง
8 = สูตร half-strength MS อาหารเหลว ที่มีแสง
9 = สูตร B5 อาหารแข็ง ที่มืด
10 = สูตร B5 อาหารเหลว ที่มืด
11 = สูตร half-strength B5 อาหารแข็ง ที่มืด
12 = สูตร half-strength B5 อาหารเหลว ที่มืด
13 = สูตร MS อาหารแข็ง ที่มืด
14 = สูตร MS อาหารเหลว ที่มืด
15 = สูตร half-strength MS อาหารแข็ง ที่มืด
16 = สูตร half-strength MS อาหารเหลว ที่มืด

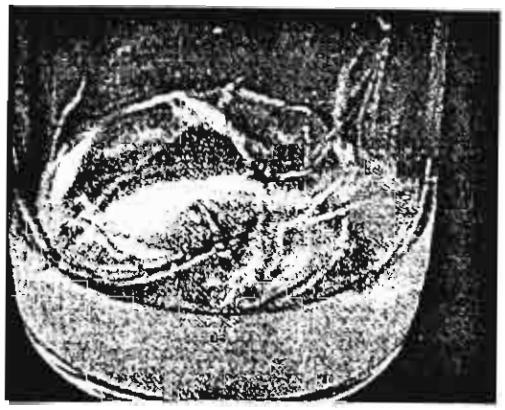


สูตรอาหาร B5



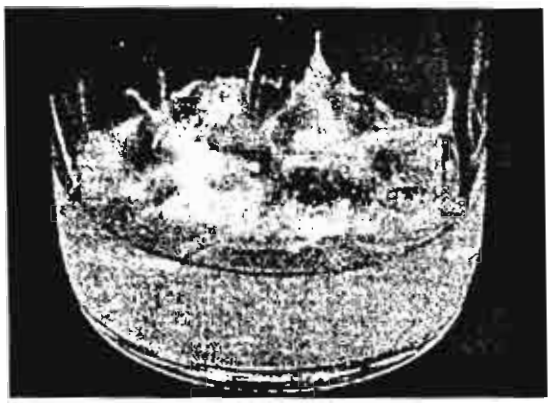
สูตรอาหาร half-strength B5

สูตรอาหาร MS

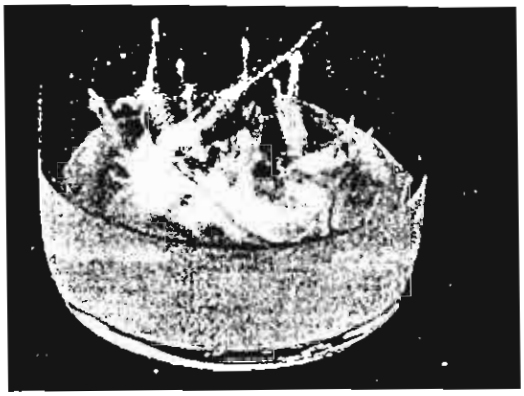


สูตรอาหาร half-strength MS

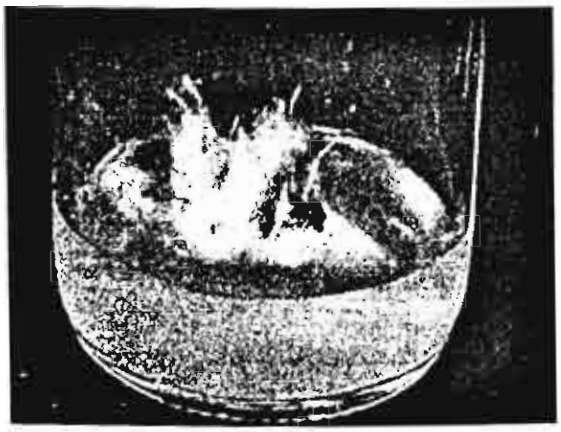
<u>ภาพที่ 10</u> การเจริญเติบโตของ hairy root ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร สภาพอาหารแข็งและสภาพที่มีแสง เป็นเวลา 1 เดือน



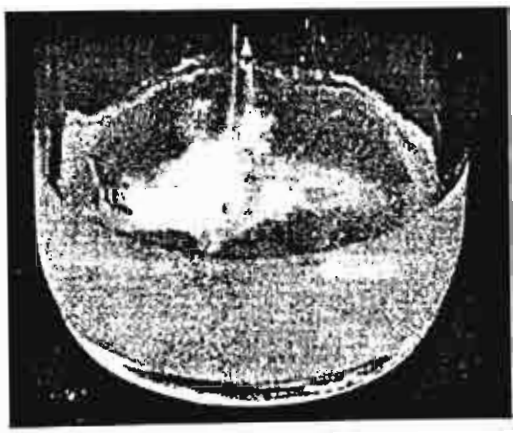
สูตรอาหาร B5



สูตรอาหาร half-strength B5



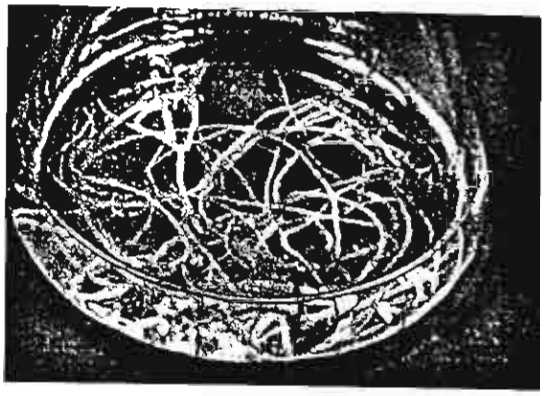
สูตรอาหาร MS



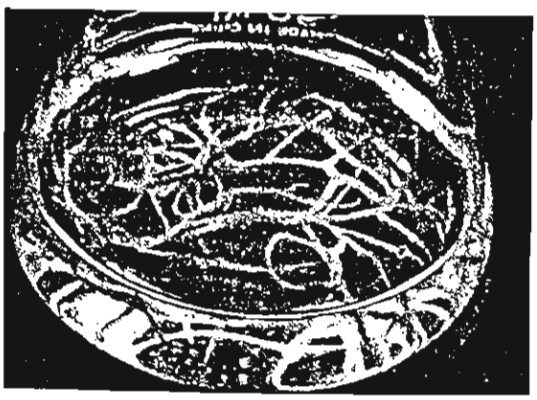
สูตรอาหาร half-strength MS

<u>ภาพที่ 11</u> การเจริญเติบโตของ hairy root ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร สภาพอาหารแข็งและสภาพที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

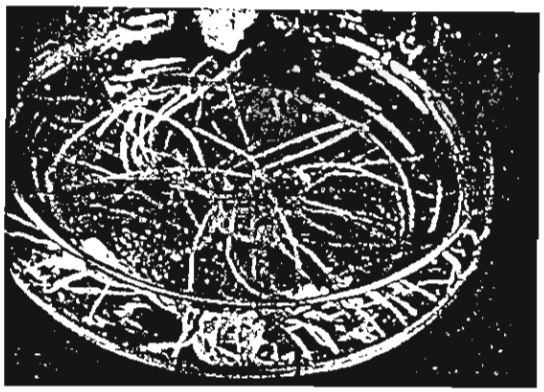
สูตรอาหาร B5



สูตรอาหาร half-strength B5



สูตรอาหาร MS

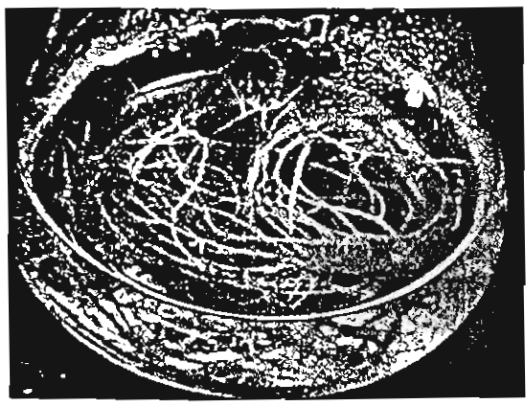


สูตรอาหาร half-strength MS

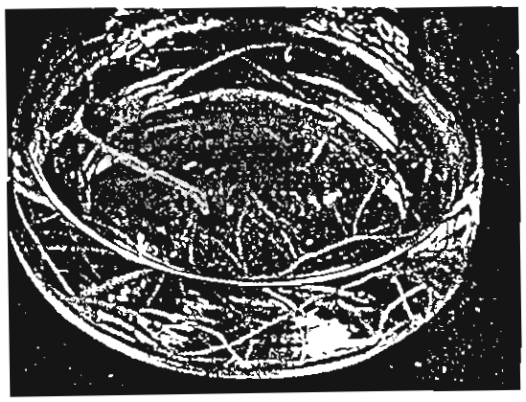
<u>ภาพที่ 12</u> การเจริญเติบโตของ hairy root ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร สภาพอาหารเหลวและสภาพที่มีแสงเป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร B5

สูตรอาหาร half-strength B5



สูตรอาหาร MS



สูตรอาหาร half-strength MS

<u>ภาพที่ 13</u> การเจริญเติบโตของ hairy root ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร สภาพอาหารเหลวและสภาพที่มีด เป็นเวลา 1 เดือน

4. การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin

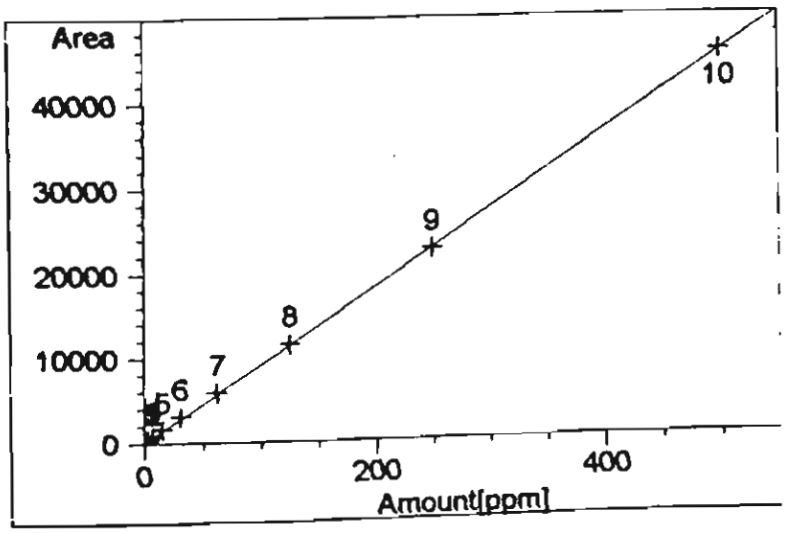
4.1 ผล calibration curve ของ plumbagin standard reference

การทำ calibration curve ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากจะทำให้สามารถแปรผลของพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC มาเป็นปริมาณ plumbagin ได้ในที่สุด (ภาพที่ 15) แสดง chromatogram ของ plumbagin standard reference มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 500-0.98 ไมโครกรัมต่อ 500ไมโครลิตร มีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (ตารางที่ 12) ซึ่งให้ calibration curve ของ plumbagin standard reference และมีสมการ linear regression คือ $y = 90.81331x+92.61311$ ($r = 0.99997$) โดย y คือ ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (ตารางหน่วย) และ x คือ ค่าความเข้มข้นของ plumbagin (ไมโครกรัมต่อ 500 ไมโครลิตร) และเวลาที่ plumbagin standard reference ออกคือ 14.043 นาที ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร

ดังนั้นเมื่อทราบพื้นที่ใต้กราฟ และเวลาของสารที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC ก็จะสามารถทราบถึงค่าความเข้มข้นของ plumbagin ซึ่งจะนำไปหาปริมาณ plumbagin ได้ต่อไป

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ plumbagin standard reference ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วยวิธี HPLC ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร

Restime (min)	Level	Amount	Area	Amt/area
14.043	1	0.98	106.08289	$9.20563e^{-3}$
	2	1.95	204.38295	$9.55559e^{-3}$
	3	3.91	398.91736	$9.79213e^{-3}$
	4	7.81	795.78149	$9.81739e^{-3}$
	5	15.62	1560.44617	$1.00132e^{-3}$
	6	31.25	3073.58545	$1.01673e^{-3}$
	7	62.50	5918.30664	$1.05605e^{-3}$
	8	125.00	$1.15204e^{4}$	$1.08503e^{-3}$
	9	250.00	$2.26311e^{4}$	$1.10468e^{-3}$
	10	500.00	$4.55343e^{4}$	$1.09807e^{-3}$



ภาพที่ 15 calibration curve ของ plumbagin standard reference

4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ใน hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ด้วยวิธี HPLC

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ใน hairy root ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ พบว่า สูตรอาหาร B5 เลี้ยงอยู่ในสภาพอาหารแข็งและที่มืด ให้ปริมาณสาร plumbagin มากที่สุดคือ 121.27 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 19)

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติจากปัจจัยต่าง ๆ คือ สูตรอาหาร สภาพอาหารแข็งและเหลว และสภาพที่มีแสงและที่มืด รวมถึงปัจจัยร่วมต่าง ๆ พบว่า ปัจจัยของสูตรอาหารคือ B5 half-strength B5 MS half-strength MS และปัจจัยสภาพอาหารแข็งและเหลว ปัจจัยที่มีแสงและที่มืดให้ปริมาณสาร plumbagin มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ และอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับสภาพอาหารแข็งและเหลว อิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารกับสภาพที่มีแสงและที่มืด อิทธิพลร่วมระหว่างสภาพอาหารแข็งและเหลวกับสภาพที่มีแสงและที่มืดให้ปริมาณสาร plumbagin มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ และอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัยให้ปริมาณสาร plumbagin มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 13 ถึง 19 และ ภาพที่ 16)

จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง hairy root เพื่อเพิ่มปริมาณการเจริญเติบโตของ hairy root กับปริมาณสาร plumbagin ที่ได้ที่เลี้ยงในสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ พบว่า สูตรอาหาร B5 สภาพอาหารเหลวเลี้ยงในที่มืด ให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ดีที่สุด แต่ให้ปริมาณสาร plumbagin เพียง 61.23 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง เมื่อเทียบกับสูตรอาหาร B5 สภาพอาหารแข็งเลี้ยงในที่มืด ให้ปริมาณสาร plumbagin 121.27 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง แต่ให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root เพียง 3.32 และ 1.54 ตามลำดับ

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร B5 half-strength B5 MS และ half-strength MS เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	ปริมาณสาร plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)
B5	47.05a
half-strength B5	36.82b
MS	8.27d
half-strength MS	28.68c
Pr> F	0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสภาพอาหารแข็งและเหลว เป็นเวลา 1 เดือน

สภาพอาหาร	ปริมาณสาร plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)
อาหารแข็ง	34.46a
อาหารเหลว	25.65b
Pr> F	0.0003

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

สภาพที่มีแสงและมืด	ปริมาณสาร plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)
แสง	3.97b
มืด	56.44a
Pr> F	0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารและสภาพอาหารแข็งและเหลว เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	สภาพอาหาร	ปริมาณสาร plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)
B5	อาหารแข็ง	$62.09a \pm 6.835e^{-2}$
	อาหารเหลว	$32.00a \pm 3.375e^{-2}$
half-strength B5	อาหารแข็ง	$36.58a \pm 3.691e^{-2}$
	อาหารเหลว	$37.06a \pm 3.865e^{-2}$
MS	อาหารแข็ง	$7.46a \pm 3.711e^{-4}$
	อาหารเหลว	$9.07a \pm 7.045e^{-3}$
half-strength MS	อาหารแข็ง	$31.70a \pm 3.302e^{-2}$
	อาหารเหลว	$25.66a \pm 2.626e^{-2}$
Pr> F		0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารและสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	สภาพที่มีแสงและมืด	ปริมาณสาร plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)
B5	แสง	$2.84c \pm 1.162e^{-4}$
	มืด	$91.25a \pm 3.470e^{-2}$
half - strength B5	แสง	$4.92c \pm 1.529e^{-3}$
	มืด	$68.71b \pm 1.192e^{-2}$
MS	แสง	$5.08c \pm 2.431e^{-3}$
	มืด	$11.46c \pm 4.299e^{-3}$
half - strength MS	แสง	$3.02c \pm 1.201e^{-4}$
	มืด	$54.34b \pm 6.970e^{-3}$
Pr> F		0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสภาพอาหารแข็งและเหลวและสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

สภาพอาหาร	สภาพที่มีแสงและมืด	ปริมาณสาร plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)
อาหารแข็ง	แสง	$4.87b \pm 2.010e^{-3}$
อาหารแข็ง	มืด	$64.05a \pm 4.368e^{-2}$
อาหารเหลว	แสง	$3.07b \pm 3.467e^{-4}$
อาหารเหลว	มืด	$48.83a \pm 2.242e^{-2}$
	Pr> F	0.0020

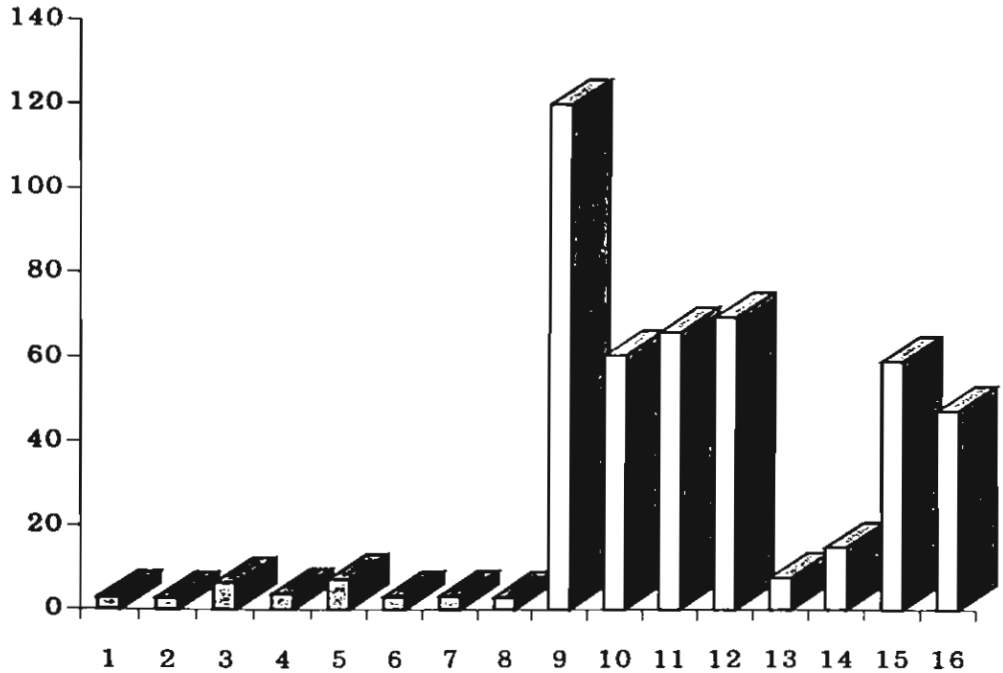
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร สภาพอาหารแข็งและเหลว และสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	สภาพอาหารแข็งและเหลว	สภาพที่มีแสงและมืด	ปริมาณสาร plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)
B5	อาหารแข็ง	แสง	$2.91d \pm 1.414e^{-5}$
		มืด	$121.27a \pm 2.701e^{-3}$
	อาหารเหลว	แสง	$2.78d \pm 1.485e^{-4}$
		มืด	$61.23b \pm 5.657e^{-5}$
half - strength B5	อาหารแข็ง	แสง	$6.25d \pm 2.121e^{-5}$
		มืด	$66.91b \pm 2.019e^{-2}$
	อาหารเหลว	แสง	$3.60d \pm 1.414e^{-4}$
		มืด	$70.51b \pm 2.319e^{-3}$
MS	อาหารแข็ง	แสง	$7.19d \pm 9.192e^{-5}$
		มืด	$7.74d \pm 3.111e^{-4}$
	อาหารเหลว	แสง	$2.98d \pm 2.121e^{-5}$
		มืด	$15.17d \pm 3.960e^{-4}$
half - strength MS	อาหารแข็ง	แสง	$3.13d \pm 3.536e^{-5}$
		มืด	$60.27b \pm 2.192e^{-3}$
	อาหารเหลว	แสง	$2.92d \pm 1.000^{-8}$
		มืด	$48.40c \pm 1.414e^{-4}$
	Pr>F		0.0001

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test

plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)



สูตรอาหารและสภาพที่เพาะเลี้ยง

ภาพที่ 16 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร สภาพอาหารแข็งและเหลว และสภาพที่มีแสงและที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน

1 = สูตร B5 อาหารแข็ง ที่มีแสง
2 = สูตร B5 อาหารเหลว ที่มีแสง
3 = สูตร half-strength B5 อาหารแข็ง ที่มีแสง
4 = สูตร half-strength B5 อาหารเหลว ที่มีแสง
5 = สูตร MS อาหารแข็ง ที่มีแสง
6 = สูตร MS อาหารเหลว ที่มีแสง
7 = สูตร half-strength MS อาหารแข็ง ที่มีแสง
8 = สูตร half-strength MS อาหารเหลว ที่มีแสง
9 = สูตร B5 อาหารแข็ง ที่มืด
10 = สูตร B5 อาหารเหลว ที่มืด
11 = สูตร half-strength B5 อาหารแข็ง ที่มืด
12 = สูตร half-strength B5 อาหารเหลว ที่มืด
13 = สูตร MS อาหารแข็ง ที่มืด
14 = สูตร MS อาหารเหลว ที่มืด
15 = สูตร half-strength MS อาหารแข็ง ที่มืด
16 = สูตร half-strength MS อาหารเหลว ที่มืด

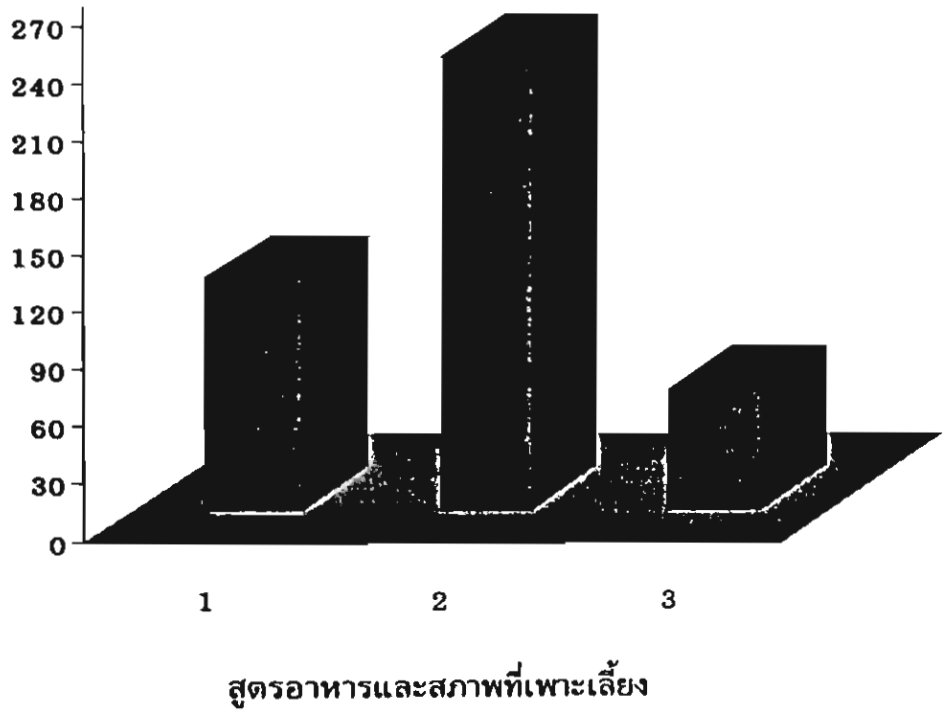
4.2 ผลการเปรียบเทียบปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ A. *rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 กับรากธรรมชาติและรากปกติที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจากรากธรรมชาติ และรากปกติที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ 238.72 และ 62.78 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ hairy root ที่เลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงในสภาพอาหารแข็งและเหลว และสภาพที่มีแสงและที่มืด ที่ให้ปริมาณสาร plumbagin มากที่สุด ที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 19 พบว่า รากธรรมชาติ ให้ปริมาณสาร plumbagin มากกว่า hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรากปกติที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า รากปกติที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้ปริมาณสาร plumbagin น้อยกว่า hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ดังตารางที่ 20

<u>ตารางที่ 20</u> การเปรียบเทียบปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่มากที่สุด กับรากธรรมชาติและรากปกติที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ประเภทของราก	ปริมาณสาร plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)
hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332	121.27
รากธรรมชาติ	238.72
รากปกติที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	62.78

plumbagin (ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง)



<u>ภาพที่ 17</u> การเปรียบเทียบปริมาณสาร plumbagin ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่มากที่สุด กับรากจากธรรมชาติและรากปกติที่เพาะเลี้ยง

1 = hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332
2 = รากจากธรรมชาติ
3 = รากปกติที่เพาะเลี้ยง

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์

จากการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเจตมูลเพลิงแดงให้สามารถเกิดยอดได้ปริมาณมาก โดยนำชิ้นส่วนของตายอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารต่าง ๆ พบว่า เมื่อนำชิ้นส่วนของตายอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถให้ปริมาณยอดมากที่สุดทั้งนี้อาจเนื่องจาก เมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินสามารถกระตุ้นการเกิดยอดหรือชักนำการสร้างตาข้าง และเกิด callus พร้อมกันได้ โดยชิ้นส่วนของตาข้างจะให้ปริมาณยอดที่มากและเกิด callus ได้ดีกว่าชิ้นส่วนของตายอด ทั้งนี้เพราะชิ้นส่วนของตายอดมีอิทธิพลของตายอด (apical bud dominance) ซึ่งเกิดจากผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการแตกยอดได้น้อยกว่าการใช้ชิ้นส่วนของตาข้างที่ได้ตัดตายอดออกไปแล้ว ซึ่งตาข้างจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีและสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ปริมาณมาก เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน (รังสฤษดิ์, 2540) จากผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Rout *et al.* (1999a และ b) ที่พบว่า เมื่อนำชิ้นส่วนตาข้างของ *P. zeylanica* มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม BA จะไม่เกิด callus ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ และเมื่อนำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 และ 8.88 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ จากรายงานของ Budimir and Vujicic (1992) พบว่า BA สามารถชักนำให้เกิด adventitious bud ได้จำนวนมากจากชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นตาข้างของ *Picea omorika* และจากรายงานของ Fracaro and Echeverrigaray (2001) พบว่า เมื่อนำตาข้างของ *Cunila galioides* มาเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดการแตกยอดจำนวนมาก

อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดนั้นให้ยอดที่มีขนาดเล็กไม่สมบรูณ์ มีใบขนาดเล็กเพียง 2-3 ใบ ยอดมีขนาดสั้น ส่วนการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้ยอดที่สมบูรณ์และมีความยาวยอดมากกว่า แต่เกิดการแตกยอดได้จำนวนน้อย และจากการทดลองนี้พบว่า การเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดและตาข้างบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA มากกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ยอดใหม่ที่ไม่สมบูรณ์และการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Whiley and Saranah (1985) ที่พบว่า เมื่อเลี้ยงขิงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นที่สูงจะทำให้ยอดจำนวนมากแต่มีการ

เจริญเติบโตของยอดไม่สมบูรณ์ เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นที่ต่ำลงมา ซึ่งจะให้ยอดที่สมบูรณ์แต่ปริมาณของยอดน้อยกว่า

การวิจัยในประเทศไทยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขยายพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงนั้นแม้ว่าจะมีอยู่บ้างแต่ผลที่ได้ก็ยังนับว่าไม่เป็นที่น่าพอใจนักเช่น จากงานวิจัยของ รังสิมา และคณะ (2543) พบว่า เมื่อนำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA อย่างเดียวให้ผลที่ดีกว่า ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จากงานวิจัยดังกล่าวพบว่าให้จำนวนยอดสูงสุดเพียง 27.7 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเท่านั้น และเมื่อเติม riboflavin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ให้ยอดเพียง 40.9 ยอดชิ้นส่วนพืช ซึ่งถือว่าเกิดยอดจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้ และจากรายงานของ รศนา และสุภวรรณ (2543) ซึ่งรายงานว่า เมื่อนำตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด callus ได้และให้ยอดถึง 256 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ซึ่งแม้ว่าจะสามารถทำให้เกิดยอดได้ดีแต่ไม่ได้มีการศึกษาการพัฒนาของยอดรวมถึงการชักนำให้เกิดรากของยอดที่เกิดใหม่แต่อย่างใด ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการทดลองนำก้อน callus ที่มียอดขนาดเล็กมากมายที่เกิดจากตาข้างที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่ให้ยอดดีที่สุดคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตัดแบ่งและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้นต่ำลง ซึ่งพบว่า สามารถชักนำให้ยอดพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ และมีการเจริญเติบโตที่ดีบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ต้นที่ได้ไม่มีรากเกิดขึ้นจึงต้องชักนำให้ยอดเหล่านั้นออกราก

จากการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ซึ่งพบว่า เมื่อลดความเข้มข้นของสารสูตรอาหาร half-strength MS มีผลทำให้เกิดรากจำนวนมาก ซึ่งผลการทดลองลักษณะนี้พบได้ในพืชหลายชนิดเช่น เจตมูลเพลิงขาว (Rout *et al.*, 1999a) และ *Yucca aloifolia* (Attalla and van Staden 1997) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Skirvin and Chu (1979) ที่นำยอดของ *Rosa hybrida* L. ที่เพาะเลี้ยงมาย้ายลงในสูตรอาหาร half-strength MS ซึ่งแม้ว่าจะที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินก็สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการที่นำยอดของเจตมูลเพลิงแดงมาเลี้ยงในสูตรอาหาร half-strength MS กับ MS พบว่า สูตรอาหาร MS ทำให้เกิดรากที่มีลักษณะเหมาะสมกับการนำออกปลูกในธรรมชาติมากกว่า กล่าวคือ มีลักษณะรากที่ยาว อวบ แข็งแรง มีรากแขนงในจำนวนที่พอเหมาะซึ่งทำให้การล้างทำความสะอาด และนำออกปลูกทำได้ง่าย และต้นพืชไม่ชอกช้ำ นอกจากนี้จากการสังเกตยังพบว่า

ส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS จะมีลักษณะสมบูรณ์และใบมีสีเขียวเข้มกว่าการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร half-strength MS ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพืชได้รับปริมาณอาหารเต็มที่จึงทำให้ได้ต้นที่สมบูรณ์

สำหรับยอดที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เกิด callus สีเทาและมีลักษณะฉ่ำน้ำบริเวณโคนต้นและเกิดรากจำนวนน้อยมีขนาดสั้นมาก ทำให้ไม่สามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รศนา และ สุภวรรณ (2543) เมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิด callus สีเทาเป็นปุยขนาดใหญ่ เริ่มมีรากงอกออกมาจาก callus ลักษณะลำต้นและก้านใบมีสีแดง ลำต้นไม่ค่อยเจริญเติบโต มีขนาดเล็ก

2. <u>การชักนำให้เกิด hairy root</u>

จากการเตรียมเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 โดยการวัดค่า O.D. ที่ 650 นาโนเมตร ได้เลือกใช้ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อที่ 12 ชั่วโมง ในการทดลองครั้งนี้เนื่องจาก อยู่ในช่วงระยะเวลา 10-20 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตแบบ log phase

การชักนำให้เกิด hairy root โดยการทำบาดแผลบนลำต้น 2 วิธี และเมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการทำบาดแผลโดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติจะให้ผลที่ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่จากการสังเกตพบว่าการกรีดด้วยมีดจะให้จำนวน hairy root ต่อต้นมากกว่าใช้เข็มแทง เนื่องจากการกรีดด้วยมีดทำให้เกิดบาดแผลที่มีขนาดยาวและกว้าง และถ้าเชื้อ *A. rhizogenes* มีจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมและมากพอที่จะใช้ในการปลูกเชื้อบนเซลล์พืช ก็สามารถจะเข้าไปในยึดเกาะที่ตำแหน่งเป้าหมายที่เฉพาะเจาะจงบนผิวของเซลล์พืชและสามารถเคลื่อนย้าย T-DNA จาก Ri-plasmid ไปสู่ genome พืชได้ดี (ธนุสรา, 2530)

3 <u>การเพาะเลี้ยง hairy root</u>

ในการเพาะเลี้ยง hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* โดยการหาค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) เพื่อให้ทราบถึงสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ

ที่มีผลต่อการเจริญของ hairy root ซึ่งสูตรอาหารที่มีผู้นิยมใช้เลี้ยง hairy root ที่พบได้บ่อยคือ สูตรอาหาร MS และ สูตรอาหาร B5 (van der Heijden *et al.*,1994; Yamanaka *et al.*, 1996 and Kittipongpatana *et al.*, 1998) จึงได้นำสูตรเหล่านี้มาเป็นหลักในการศึกษา โดยทุกสูตรอาหารใช้ธาตุอาหารรองตามสูตรอาหาร MS แต่มีธาตุอาหารหลักต่างกัน ซึ่งสามารถเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นของอิออนของธาตุต่าง ๆ ดังนี้ (รังสิรัตน์, 2535)

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของอิออนของธาตุอาหารหลัก (mM)								
	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	NH_4^+	NO_3^-	$H_2PO_4^-$	Cl^-	SO_4^{2-}
MS	20.04	-	2.99	1.50	20.61	39.40	1.25	5.98	1.54
half-strength MS	10.02	-	1.49	0.75	10.30	19.70	0.62	2.99	0.75
B5	25.00	1.10	1.00	1.00	2.00	25.00	1.10	2.00	2.00
half-strength B5	12.50	0.55	0.50	0.50	1.00	12.50	0.55	1.00	1.00

พบว่า การเจริญของ hairy root ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 มีการเจริญที่สามารถเห็นความแตกต่างได้ชัดเจนกว่าสัปดาห์ที่ 1 โดยพบว่า hairy root เจริญได้ดีที่สุดบนสูตรอาหาร B5 สภาพอาหารเหลวและที่มืด ให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) เท่ากับ 3.94 และ 1.89 ตามลำดับ แล้วพบว่า สูตรอาหาร B5 half-strength B5 half-strength MS และ MS เรียงจากน้อยไปหามาก ที่เพาะเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวที่มีแสงและที่มืด ให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) มากกว่าที่เพาะเลี้ยงในสภาพอาหารแข็งที่มีแสงและที่มืด (ตารางที่ 11) อาจเนื่องจาก สูตรอาหาร B5 มีปริมาณความเข้มข้นของอิออนของธาตุ K^+ มาก จึงทำให้ hairy root มีการเจริญได้ดีกว่า ส่วนสูตรอาหาร half-strength ให้การเจริญน้อยกว่าอาจเนื่องมาจากมีปริมาณความเข้มข้นของอิออนของธาตุอาหารน้อยลงจึงทำให้การเจริญของ hairy root ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของรังสิรัตน์ (2535) พบว่า hairy root ของ *Datura metel* Linn. สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารดัดแปลงสูตร B5 ส่วนในสูตรอาหาร half-strength ให้การเจริญน้อยกว่า Kittipongpatana *et al.*, 1998 พบว่า การเจริญของ hairy root ของ *Solanum aviculare* Forst. บนอาหารสูตร B5 ให้ค่า

Dry Growth Index (DGI) ของ hairy root ดีกว่าสูตรอาหาร MS ส่วนสูตรอาหาร half-strength ให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ลดลงทั้ง half-strength MS และ B5 และสภาพอาหารเหลวเป็นสภาพที่ทำให้ hairy root ได้รับปริมาณธาตุอาหารได้ทั่วถึงและสม่ำเสมอกัน (รังสฤษฎ์, 2541) จึงทำให้ hairy root มีการเจริญได้ดีกว่าสภาพอาหารแข็ง ดังนั้นจึงทำให้สูตรอาหารและสภาพอาหารแข็งและเหลวมีความแตกต่างอย่างยิ่งทางสถิติ ส่วนสภาพที่มืดให้การเจริญของ hairy root ดีกว่าที่มีแสงอาจเนื่องจาก hairy root ที่เจริญได้ดีอยู่แล้วและเมื่อมาเจริญในสูตรอาหารต่าง ๆ ซึ่งจากผลการทดลองสูตรอาหารกับสภาพที่มีแสงและที่มืดจากค่า Dry Growth Index (DGI) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ค่า Fresh Growth Index (FGI) มีความแตกต่างอย่างยิ่งทางสถิติ และเลี้ยงบนอาหารแข็งและเหลว จึงทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างการเจริญในที่มีแสงและที่มืดได้ชัดเจนกว่า

นอกจากนี้ยังพบว่า hairy root ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ สามารถเกิด callus และเกิดการ regeneration เป็นต้นได้ โดยสูตรอาหาร MS จะเกิดเป็น callus ได้ดีอาจเนื่องมาจากมีปริมาณความเข้มข้นของอิออนของธาตุ NH_4^+ สูงกว่า จึงเป็นปัจจัยที่ทำให้ hairy root เกิดเป็น callus ได้ ประกอบกับ hairy root มียีนสำหรับสังเคราะห์ออกซินได้เองคือ *tms* 1 และ *tms* 2 (Jouanin, 1984 and Gelvin, 1990) จึงอาจเป็นปัจจัยร่วมทำให้ hairy root ไปเป็น callus ได้ ทั้งที่เลี้ยงในสภาพที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยได้มีงานวิจัยของ รังสิรัตน์ (2535) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง hairy root ของ *Datura metel* Linn. บนสูตรอาหาร MS สามารถชักนำให้ hairy root กลายเป็น callus ได้ และเกิดการ regeneration เป็นต้นได้ มีงานวิจัยของ Tepfer, 1984 ซึ่งสามารถได้ต้นจาก hairy root ของ *Nicotiana sp.* Noda *et al.* (1987) ได้ต้นจาก hairy root ของ *Armoracia lapathifolia* และงานวิจัยของ Yu Mei *et al.* (2001) พบว่า ได้ต้นจาก hairy root ของ *Alhagi pseudoalhagi* โดยลักษณะต้นที่ได้ให้ใบและลำต้นปกติ แต่ระบบรากมีการแตกกิ่งสาขามีทิศทางไม่แน่นอน กว่าระบบรากปกติ

สาเหตุที่ hairy root สามารถเกิดการ regeneration ได้เนื่องจาก เป็นผลจากยีน *rol* A *rol* B และ *rol* C ใน TL-DNA คุณสมบัตินี้นับได้ว่าเป็นข้อได้เปรียบของการนำ *A. rhizogenes* มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ทางพันธุวิศวกรรมเพราะนอกจาก T-DNA จาก Ri plasmid จะเป็นพาหะที่นำยีนใหม่เข้าไปได้เช่นเดียวกับ T-DNA จาก Ti plasmid ของ *A. tumefacience* แล้ว เซลล์ที่ได้รับยีนใหม่ติดไปกับ T-DNA ของ *A. rhizogenes* ยังมีโอกาสเกิด regeneration เป็นต้นได้ (Schmulling, 1988 and Tepfer, 1990)

4. การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ใน hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร และสภาพที่เพาะเลี้ยงต่าง ๆ พบว่า สภาพอาหารที่มืดให้ปริมาณสาร plumbagin สูงกว่าที่มีแสงในทุกสูตรอาหารและสภาพอาหารแข็งและเหลว อาจเนื่องมาจาก enzyme ที่ทำอยู่ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสาร plumbagin สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่ไม่มีแสงหรือมาจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ไม่สามารถเกิดได้เต็มที่เมื่อพืชอยู่ในกระบวนการสังเคราะห์แสง หรือขึ้นกับชนิดของ hairy root ซึ่งพบว่าแม้ hairy root จะเกิดจาก *A. rhizogenes* สายพันธุ์เดียวกัน แต่เกิดจาก explants คนละต้นหรือถึงแม้จะมาจากแหล่งเดียวกันก็ยังเป็นการเกิด infection คนละครั้งด้วย จึงอาจจะทำให้ไปมีผลต่อความสามารถในการสังเคราะห์ plumbagin ที่ไม่เท่ากันก็ได้ และอาจเนื่องจากอาหารที่มี NH_4^+ สูงไม่เหมาะใช้เลี้ยง hairy root เนื่องจากทำให้เซลล์กลายเป็น callus ได้มาก จึงมีผลให้มีการสังเคราะห์ plumbagin ได้น้อยในสูตรที่ใช้อาหาร MS

เมื่อศึกษาปริมาณสาร plumbagin ในรากจากธรรมชาติและรากปกติที่เพาะเลี้ยงเทียบกับ hairy root ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร B5 สภาพอาหารเหลวและที่มืด พบว่าให้ปริมาณสาร plumbagin สูงกว่าในรากปกติที่เพาะเลี้ยง อาจเนื่องจากยีนใน T-DNA ที่เข้าไปอยู่ใน genome ของ hairy root ไปกระตุ้นการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ ทำให้ hairy root สามารถสังเคราะห์ plumbagin ได้ในปริมาณมาก แต่น้อยกว่ารากจากธรรมชาติ ซึ่งอาจเนื่องจาก hairy root ที่เพาะเลี้ยงมีช่วงอายุและปัจจัยในการสร้างและสะสมสารน้อยกว่าในรากจากธรรมชาติได้ (รังสิรัตน์, 2535)

สรุปผลการทดลอง

1. จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์เจตมูลเพลิงแดง (*P. indica* L.) เพื่อให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อผลดังนี้

1.1 อาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 การใช้ตาข้างมาเพาะเลี้ยงให้จำนวนยอดมากกว่าการใช้ชิ้นส่วนตายอด

1.3 การชักนำให้ยอดที่เกิดขึ้นพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ สามารถทำได้โดยย้ายยอดที่ได้จากสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.4 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดของเจตมูลเพลิงแดงเกิดรากได้ดีคือ สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

2. การชักนำให้เกิด hairy root

2.1 การวัดค่า O.D. ที่ 650 นาโนเมตร พบว่า เชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ที่เลี้ยงในช่วงเวลา 10-20 ชั่วโมง เป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด (log phase)

2.2 การชักนำให้เกิด hairy root บนต้น ด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 โดยวิธีการใช้เข็มแทงให้ผลไม่แตกต่างกับการกรีดด้วยมีด เช่นเดียวกัน แต่วิธีการกรีดจะให้ปริมาณ hairy root ต่อชิ้นส่วนพืชมากกว่า

3. การเพาะเลี้ยง hairy root

การเพาะเลี้ยง hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 สูตรอาหารและสภาพที่เพาะเลี้ยงที่ให้ค่า Fresh Growth Index (FGI) และ Dry Growth Index (DGI) ดีที่สุด คือ สูตรอาหาร B5 เลี้ยงในสภาพอาหารเหลวและที่มืด

4. การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin

4.1 สูตรอาหารและสภาพที่เพาะเลี้ยงที่ให้ปริมาณสาร plumbagin ได้ดีที่สุด ที่สกัดจาก hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 คือ สูตรอาหาร B5 เลี้ยงในสภาพอาหารแข็งและที่มืด

4.2 hairy root ที่เกิดจากเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC13332 ให้ปริมาณสาร plumbagin มากกว่ารากปกติที่เพาะเลี้ยง แต่น้อยกว่ารากจากธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

จาริณีย์ อรุณพันธุ์. 2543. การปรับปรุงสูตรอาหารเพื่อเพิ่มการสร้าง plumbagin ในรากเพาะเลี้ยงของเจตมูลเพลิงแดง. โครงงานนักศึกษา. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์. 2539. เภสัชเวทกับตำรายาแผนโบราณ. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพ ฯ. 356 น.

เชวงเกียรติ แสงศิรินาวิน. 2529. สมุนไพรที่มีศักยภาพที่รักษาโรคของช่องปาก. โรงพิมพ์อรุณการพิมพ์, กรุงเทพ ฯ. 103 น.

ธนุสรา วิโนทัย. 2530. ศักยภาพของ *Agrobacterium sp.* ในการเป็นพาหะนำสารพันธุกรรม Ri

plasmid สู่เซลล์รากพืชบางชนิด วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2539. สมุนไพรพื้นบ้าน (1). โรงพิมพ์บริษัทประชาชนจำกัด, กรุงเทพ ฯ. 895 น.

นงลักษณ์ เขียวเล็ก และ อังคณา เลิศสุขประเสริฐ. 2544. การเพิ่มการผลิตสาร plumbagin จากรากเพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้เทคนิคการคัดเลือกพันธุ์ที่ให้ปริมาณสารสำคัญสูง. ภาควิชาเภสัชเวท และเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

บุษบา จินดาวิจักษณ์ และ นิวัติ ชื่นคุณากร. 2543. การศึกษาวิธีการแยก ทดสอบหาประเภทสารและการออกฤทธิ์ต่อสัตว์ทดลองของรากเจตมูลเพลิงแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพ ฯ.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2539. สมุนไพร: แก้ไขปรับปรุงใหม่จากตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร. บริษัท ที. พี. พริ้นท์, กรุงเทพ ฯ. 202 น.

พิบูลย์ เลาหทัย และ ชัยสิทธิ์ รัตนสังวาลย์. 2519. การศึกษาค้นคว้าหาสมุนไพรต้านเชื้อราที่พบในประเทศไทย. 28: 1607 - 1614 น.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 น.

รังสิรัตน์ รัตนโกเมศ. ศึกษาแฮรี่รูทของลำโพงสลักที่เกิดจากอะโกรแบคทีเรียม ไรโซจีเนส. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ ฯ.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2542. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. สำนักพิมพ์อักษรพิทยา, กรุงเทพ ฯ. 880 น.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. สารานุกรมสมุนไพร: รวมหลักเภสัชกรรมไทย. บริษัท โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพ ฯ. 4790 น.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2544. ตลาดสมุนไพร. เอกสารประกอบหลักการผลิตพืชสมุนไพรและการจัดการ. 21 น.

สุปราณี บิลยะหีม และ สุพัตรา แสงทอง. 2542. การศึกษาการสร้างสาร plumbagin โดยรากเพาะเลี้ยงของต้นเจตมูลเพลิงแดง. โครงงานนักศึกษา. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ. 282 น.

อรสา ชูสกุล. 2543. การผลิตพลัมบาจินในเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว (*Plumbago zeylanica* L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ ฯ.

Abrie A.L. and J. van Staden. 2001. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. Plant Growth Regul. 33: 19 - 23.

Ackermann, C. 1977. Pflanzen aus *A. rhizogenes* tumoren aus Nicotiana tabacum. Plant Sci. Lett. 8: 23 - 30.

Ambros, P.F., A. J.K. Matzke and M.A. Matzke. 1986. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosomes by *In situ* hybridization. The EMBO J. 5: 2073 - 2077.

Budavari, S. 1996. Merk Index Twelfth Index. Merck Research Laboratories Dirition of Merck and Co., Inc Whitehouse Station. New York. 7700 p.

Chilton, M.D., D. Tepfer, A. Petit, C. David, F. Casse-Delbart and J. Tempe. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature. 295: 432 - 434.

Christen, P. and others. 1989. High yield production of tropane alkaloids by hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. Plant Cell Rep. 8: 75 - 77.

Cho, HJ., S.K. Farrand, G. R. Noel and J.M. Widholm. 2000. High - efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. Planta. 210: 195 - 204.

Chuakul, W., P Saralamp and P. Supatarawanich. 1994. Pharmacognostic Character of *Plumbago indica* L. Mahidol J. Pharm. Sci. 21: 126 - 132.

de cleen, M. and J. de Lay. 1981. The host range of infectious hairy root. The Botanical Review. 47: 147 - 193.

Crouch, I.J., F. Finnie and Staden J.V. 1990. Studies on the isolation of plumbagin from in vitro and in vivo and vivo grown Drosera species. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 21: 79 - 82.

David, C., A. Petit and J. Tempe. 1988. T-DNA length variability in mannopine hairy root: more than 50 kilobasepairs of pRi T-DNA can integrate in plant cells. Plant Cell Rep. 5: 111 - 114.

David, C. and J. Tempe. 1988. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrylis) by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 7: 88 - 91.

Dinda B., G. Chel and B. Acharit .1994. A dihydroflavonol from *Plumbago indica*. Phytochem. 4: 1083 - 1084.

Dinda, B and G. Chel. 1992. 6-hydroxyplumbagin, a naphthoquinone from *Plumbago rosea*. Phytochem. 31: 3652 - 3653.

Ellis, J.G. and P.J. Murphy. 1981. Four new opines from crown gall tumours: Their detection and properties. Mol. Gen. Genet. 181: 36 - 43.

Flores H.E. and P. Filner. 1985. Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae. 174 - 185 p. In: Neumann K. H., Barz W, Rein - hard E. (eds) Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Springer Verlag, Berlin.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirments of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151 - 158.

Gelvin, S.B. 1990. Crown gall disease and hairy root disease. Plant Physiol. 92: 281 - 285.

Guo, H Z., Chahg R., Yang D. Guo and J. Zheng. 1998. Anthraquinones from hairy root cultures of *Cassia obtusifollia*. Phytochem. 49: 1623 - 1625.

Hartmann, T. and others. 1986. Reinvestigation of the alkaloid composition of *Atropa Belladonna* plants, root cultures, and cell suspension cultures. Planta Medica. 390 - 395.

Heble, M.R., S. Narayanaswamy and M.S. Chadha. 1974. Tissue differentiation and plumbagin synthesis in variant cell strains of *Plumbago zeylanica* L. *in vitro*. Plant Sci lett. 2: 405 - 409.

Huffman, G.A. and others. 1984. Hairy root inducing plasmid: Physical map and homology to tumor inducing plasmids Journal Bacteriol. 157: 269 - 276.

Jouanin, L. 1984. Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. Plasmid. 12: 91 - 102.

Jouanin, L. 1987. Structure of T-DNA in plants regenerate from roots transformed by *Agrobacterium. rhizogenes* strain A4. Mol. Gen. Genet. 206: 387 - 392.

Kanokwaree, K. 1997. The effect of oxygen transfer and gas-phase composition on *Atropa belladonna* hairy root cultures. Thesis submitt for the degree of doctor of philosophy. Deparment of biotechnology. The university of New South Wales. 188 p.

Kittipongpatana, N., R.S. Hock and J.R. Porter. 1998. Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 52: 133-143.

Krishnaswamy, M and K.K. Purushothaman. 1980. Plumbagin: A study of its anticancer, Antibacterial and antifungal properties. Indian J. Exp. Biol. 18: 876 - 877.

Kumar, V., B.Jones and M.R. Davey. 1991. Transformation by *A. rhizogenes* and regeneration of transgenic shoots of the wild soybean *Glycine argyrea*. Plant Cell Rep. 10: 135 - 138.

Lahners, K., M.C. Bryne and M.D. Chilton. 1984. T-DNA fragments of hairy root plasmid pRi8196 are distantly related to octopine and nopaline Ti plasmid T-DNA. Plasmid. 11: 130 - 140.

Momcilovic, I, D. Grubisic, M. Kojic and M. Neskovic. 1997. *A. rhizogenes*-mediated Transformation and plant regeneration of four *Gentiana species*. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 50: 1 - 6

Mugnier, J. 1988. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *A. rhizogenes*. Plant Cell Rep. 7: 9 - 12.

Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with Tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473 - 497.

Nahalka, J, P. Blanarik, G. Peter, E. Matusova, and I. Parlova. 1996. The Chemical / osmotic conditions for growth and plumbagin accumulation of *Drosophyllum lusitanicum* Link. Suspension cultures. Biotechnol. Letters. 18: 1453 - 1458.

Nakamura, T. and others. 1988. Organspecific mRNA in transgenic tobacco plants possessing T - DNA of Ri plasmid. Plant Sci. 56: 213 - 218.

Nakornchai S., S. Anantavara and S. Yodsnaha. 1995. Synergism between tetracycline and naphthoquinone antimalarial drug against chloroquine resistant *P. falciparum*. Mahidol University Annual Research Abstracts. 23: 296 - 297.

Noda, Teruo, N. Tanaka, Y. Mano, S. Nabeshima, H. Ohkawa and C. Matsui. 1987. Regeneration of horseradish hairy roots in *Agrobacterium rhizogenes* infection. Plant Cell Rep. 6: 283 - 286.

Ohara, A. Akasaka Y. Daimon H. and Mii M. 2000. Plant regeneration from hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Crotalaria juncea* L. Plant Cell Rep. 19: 563 - 568.

Oyedapo, O.O. 1996. Studies on bioactivity of the root extract of *Plumbago zeylanica*. International J. of Pharm. 34: 365 - 369.

Oyedapo, O.O. and S. Amos. 1997. Further investigation into the bioactivity of root extract of *Plumbago zeylanica*. Phytotherapy Research. 11: 62 - 66.

Parr, A.J. 1989. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. J Biotech. 10: 1 - 25.

Robins, R.J. and others. 1987. Potential for use of nicotic acid as a selective agent for isolotion of high nicotine production lines of *Nicotiana rustica* hairy root cultures. Plant Cell Rep. 6: 122 - 126.

Savka, M.A., B. Ravillion, G. R. Noel and S. K. Farrand. 1990. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode.The J. Amer. Phytopathol. 80: 503 - 508.

Schmulling, T., J. Schell and A. Spena. 1988. Single genes from *A. rhizogenes* influence plant development. The EMBO J. 7: 2621 - 2629.

Slightom, J.L. 1986. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *A. rhizogenes* agropine type plasmid. The J. of Biol. Chem. 261: 108 - 121.

Srivastava, P.S. 1998. Plant tissue culture and Molecular Biology: Application and Prospects. Narosa Publishing House. New Delhi Madras Bombay Calcutta, London. 811 p.

Stachel, S.E., E.W. Nester and P.C. Zambryski. 1986. A plant cell factor induces *A. tumefaciens* vir gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 379 - 383.

Sunan, N., A. Sirinart and Y. Sudavon. 1995. Synergism between etracycline and naphthoquinone antimalarial drug against chloroquine resistant *P. Falciparum*. Mahidol University Annual Research Abstracts. 23: 296 - 297.

Tanaka, N., M. Hayakawa, Y. Mano, H. Ohkawa and C. Matsui. 1985. Infection of turnip and radish storage root with *A. rhizogenes*. Plant Cell Rep. 4: 74 - 77.

Tanaka, N., T. Misato and M. Takeshi. 1995. Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor*. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 41: 61 - 64.

Taylor, B.H. 1985. Transcription of *A. rhizogenes* A4 T-DNA. Mol. Gen. Genet. 201: 546-553.

Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *A. rhizogenes* sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell. 37: 959 - 967.

Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Physiol. plantarum. 79: 140 - 146

Willmitzer, L., J. Sanchez-Serrano, E. Bushfield and J. Schell. 1982. DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. Mol. Gen. Genet. 186: 16 - 22.

Yamamoto, O. and K. Kamura. 1997. Production of saikosaponin in cultured roots of *Bupleurum falcatum* L. Plant Cult. Tiss. and Biotech. 3: 138 - 144.

Yamanaka, M, K. Ishibashi, K. Shimomura and K. Ishimaru. 1996. Polyacetylene glucosides in hairy root cultures of Lobelia cardinalis. Phytochem. 41: 183 - 185.

Yoshikawa, T and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 6: 449 - 453.

Yu Mei W., J.B. Wang, D. Luo and J.F. JIA. 2001. Regeneration of plants from callus cultures of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on *Alhagi pseudoalhagi*. Cell Research. 11: 279 - 284.

van der Heijden, R, R. Verpoorte, S.S. Hoekstra and J.H. C. Hoge. 1994. Nordamnacanthal, a major anthraquinone from an *Agrobacterium rhizogenes* induced root culture of *Rubia tinctorum*. Plant Physiol. Biochem. 32: 399 - 404.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ตามสัญญาเลขที่ PDF/41/2543

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.
ตามสัญญาเลขที่ PDF/41/2543

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 Title : Plantlets regeneration from various explant parts of *Plumbago indica* L.

Authors : S. Chanprame, S. Chanprame, P. Chantaratin, S. Tatreerod and P. Saralamp

Journal : Plant Cell Tissue and Organ Culture (manuscript preparation)

1.2 Title : Plumbagin Production from Hairy Root Culture of *Plumbago indica* L.

Authors : S. Chanprame, S. Tatreerod S. Chanprame, and P. Saralamp

Journal : Plant Cell Tissue and Organ Culture (manuscript preparation)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงพาณิชย์ : ได้ทราบเทคโนโลยีการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ปริมาณมาก สำหรับเกษตรกรที่สนใจนำไปปลูกเป็นการค้า โดยสามารถติดต่อได้ที่

ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม
ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
โทรศัพท์ 034-281084-5 โทรสาร 034-281086

เชิงสาธารณะ : พัฒนาให้เกิดเครือข่ายความร่วมมือวิจัยพืชเจตมูลเพลิงแดง โดยได้รับทุนวิจัยสนับสนุน "ชุดโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิต และการใช้ประโยชน์เจตมูลเพลิงแดงในเชิงการค้าและอุตสาหกรรม" ซึ่งเป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก สภาวิจัยแห่งชาติ ผ่านสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ระหว่างปี 2545 – 2547 รายละเอียดชุดโครงการวิจัยประกอบไปด้วย โครงการวิจัยย่อย 6 โครงการ ดังนี้ คือ

1.) ชื่อโครงการ : การศึกษาวิธีการปลูกเจตมูลเพลิงแดงเป็นการค้า
นักวิจัย : นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, สุรัตน์วดี จิวะจินดา

2.) ชื่อโครงการ : การรวบรวมและตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน เคมี และพันธุกรรมของเจตมูลเพลิงแดง

นักวิจัย : เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, ชลิดา เล็กสมบูรณ์, เสริมศิริ จันทร์เปรม และ ยิ่งยง ไพสุขสานติวัฒนา

3.) ชื่อโครงการ : การเพิ่มศักยภาพการผลิตสารทุติยภูมิของเจตมูลเพลิงแดงโดยการเพิ่มชุดโครโมโซมและก่อกลายพันธุ์

นักวิจัย : สนธิชัย จันทร์เปรม เสริมศิริ จันทร์เปรม และพีรนุช จอมพุก

4.) ชื่อโครงการ : การเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

นักวิจัย : เสริมศิริ จันทร์เปรม และ สนธิชัย จันทร์เปรม

5.) ชื่อโครงการ : ผลของสารสกัดจากเจตมูลเพลิงแดงต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

นักวิจัย : ชลิดา เล็กสมบูรณ์ อุดม ฟ้ารุ่งสาง และ นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง

6.) ชื่อโครงการ : การเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ

นักวิจัย : รมณีย์ เจริญทรัพย์ และ ศาลักษณ์ พรรณศิริ

เชิงวิชาการ : ได้ใช้โครงการวิจัยดังกล่าว ในการพัฒนาการเรียนการสอน และสร้างนักวิจัยใหม่ดังต่อไปนี้

การเรียนการสอนระดับปริญญาตรี : ใช้ส่วนหนึ่งของงานวิจัยเป็นหัวข้อศึกษาในรายวิชาปัญหาพิเศษของภาควิชาพืชสวน (รายวิชา 007498 : 3 หน่วยกิต)ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.) ชื่อนิสิต : นางสาวสุธิดา ไตรบุตร

ปีการศึกษา : ภาคต้น ปีการศึกษา 2544

หัวข้อปัญหาพิเศษ : ผลของ IBA และ NAA ต่อการเกิดรากของกิ่งปักชำเจตมูลเพลิงแดง

2.) ชื่อนิสิต : นางสาวสุณี พูลทวี

ปีการศึกษา : ภาคต้น ปีการศึกษา 2544

หัวข้อปัญหาพิเศษ : ผลของขนาดรากต่อการขยายพันธุ์โดยวิธีตัดชำรากของเจตมูลเพลิงแดง

3.) ชื่อนิสิต : นายประพิศ มาวัฒนพงศ์

ปีการศึกษา : ภาคปลาย ปีการศึกษา 2545

หัวข้อปัญหาพิเศษ : การตอบสนองของชิ้นส่วนใบของเจตมูลเพลิงแดงต่อ NAA BA และแสง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเรียนการสอนระดับปริญญาโท : ใช้ส่วนหนึ่งของงานวิจัยเป็นหัวข้อศึกษาในรายวิชาปัญหาพิเศษ ปริญญาโทของภาควิชาพืชสวน (รายวิชา 007598 : 3 หน่วยกิต) คือ

1.) ชื่อนิสิต : นางสาวสุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์

ปีการศึกษา : ภาคปลาย ปีการศึกษา 2545

หัวข้อปัญหาพิเศษ : การขยายพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การสร้างนักวิจัยใหม่ ใช้ส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจาก สกว. และโครงการวิจัยต่อเนื่องในชุดโครงการตามรายละเอียดที่กล่าวแล้วเพื่อเป็นหัวข้อวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาของนิสิต 2 คนคือ

1.) ชื่อนิสิต : นางสาวสุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์

หลักสูตร : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชสวน มก.
วท.ม. (เกษตรศาสตร์)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ปีที่คาดว่าจะจบการศึกษา : ปีการศึกษา 2546

2.) ชื่อนิสิต : นางสาวเพชรรัตน์ จันทรทิณ

หลักสูตร : ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มก.
ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ : การผลิตสาร plumbagin โดยการเพาะเลี้ยง hairy root แคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง

ปีที่คาดว่าจะจบการศึกษา : ปีการศึกษา 2547

3. **อื่น ๆ : การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการต่างๆ**

3.1 ชื่อเรื่อง : การชักนำให้เกิด hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* 'K599'

ผู้เสนอผลงาน : สุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์ พร้อมจิต ศรสัมพ์ และเสริมศิริ จันทร์เปรม

การประชุม : การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 2 พฤษภาคม 2545 จ.ขอนแก่น

การตีพิมพ์ : *เรื่องย่อ* เรื่องย่อการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 2 หน้า 91
เรื่องเต็ม วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 33 ฉบับที่ 4-5 (พิเศษ) เดือน กรกฎาคม – ตุลาคม 2545 หน้า 123 - 126

3.2 ชื่อเรื่อง : Hairy Root Induction and Culture of *Plumbago indica* L.

ผู้เสนอผลงาน : S.Tatreerod, P. Saralamp and S. Chanprame

การประชุม : The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. 2003 Chiang Mai, Thailand.

การตีพิมพ์ : *Abstract* : WOCMAP III : Programme and Abstract Book, p. 306
: *Full paper* : Acta Horticulturae 2003 vol.2 (*inpress*)

3.3 ชื่อเรื่อง : High Efficiency System for Micropropagation of *Plumbago indica* L.

ผู้เสนอผลงาน : S. Chanprame, S.Tatreerod, P. Saralamp and S. Chanprame

การประชุม : The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. 2003 Chiang Mai, Thailand.

การตีพิมพ์ : *Abstract* : WOCMAP III : Programme and Abstract Book, p. 263
: *Full paper* : Acta Horticulturae 2003 vol.2 (*inpress*)

3.4 ชื่อเรื่อง : Callus Induction and Culture of Plumbago indica L. for Secondary Metabolite Production

ผู้เสนอผลงาน : P. Chantaratin, S. Chanprame, and S. Chanprame

การประชุม : The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. 2003 Chiang Mai, Thailand.

การตีพิมพ์ : *Abstract* : WOCMAP III : Programme and Abstract Book, p. 58
: *Full paper* : Acta Horticulturae 2003 vol.2 (*inpress*)

สัญญารับทุนอุดหนุนวิจัย มก.
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สัญญานี้ทำขึ้น ณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตั้งอยู่เลขที่ 50 ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่.....เดือน - 9 ก.ย. 2545 พ.ศ. ..... ระหว่าง สถาบันวิจัยและพัฒนา โดย..... ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา ซึ่งต่อไปในสัญญานี้เรียกว่า "ผู้ให้ทุน" ฝ่ายหนึ่งกับ นาง เสริมศิริ จันทร์เปรม หัวหน้าโครงการ สังกัดภาควิชา/ฝ่าย/ศูนย์/สถานีวิจัย ภาควิชาพืชสวน คณะ/สถาบัน/สำนัก เกษตร บ้านเลขที่ 366/2 ~~ถนน~~ หมู่ 2 ตำบล/แขวง คลองถนน อำเภอ/เขต สายไหม จังหวัด กทม. ซึ่งต่อไป ในสัญญานี้เรียกว่า "ผู้รับทุน" อีกฝ่ายหนึ่ง คู่สัญญาได้ตกลงกันดังต่อไปนี้

ข้อ 1. ผู้ให้ทุนตกลงให้ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปี 2545 แก่โครงการวิจัย รหัส 04108063 (45) ประเภท วิจัยและพัฒนา (โครงการวิจัย 3 สพา) ชื่อโครงการวิจัย การเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์เกรนลอยของเจตมูลเทศ (Plumbago indica L.) เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

เป็นจำนวนเงิน 132,000 บาท (หนึ่งแสนสามหมื่นสองพันบาทถ้วน)

ข้อ 2. ผู้ให้ทุนจะจ่ายเงินให้กับผู้รับทุนโดยแบ่งเป็น 2 งวด ดังนี้

งวดที่ 1 (6 เดือน) ร้อยละ 60 ของงบที่ได้รับอนุมัติ ไม่รวมหมวดครุภัณฑ์ ที่ดิน และสิ่งก่อสร้าง หมวดค่าจ้างชั่วคราว และเงินสมทบผู้ประกันตนในส่วนของนายจ้างในหมวดค่าใช้สอย

งวดที่ 2 (6 เดือน) ร้อยละ 40 ของงบที่ได้รับอนุมัติ ไม่รวมหมวดครุภัณฑ์ ที่ดิน และสิ่งก่อสร้าง หมวดค่าจ้างชั่วคราว และเงินสมทบผู้ประกันตนในส่วนของนายจ้างในหมวดค่าใช้สอย

โดยงวดที่ 1 จะจ่ายให้ภายในเวลา 15 วัน นับแต่วันลงนามในสัญญา (หากผู้รับทุนไม่ค้างส่งรายงานผลการวิจัยที่ถึงกำหนดการส่ง) และงวดที่ 2 จ่ายให้ตามกำหนดเวลา เมื่อผู้รับทุนได้ส่งรายงานความก้าวหน้าการดำเนินงานวิจัย (6 เดือน) และรายงานความก้าวหน้าได้ผ่านการตรวจสอบ/ประเมินแล้ว

ข้อ 3. ชื่อหัวหน้าโครงการ ผู้ร่วมวิจัย และรายละเอียดของโครงการวิจัยตามที่ปรากฏแนบท้ายสัญญานี้ ผู้รับทุนจะเปลี่ยนแปลงได้ เมื่อได้รับความเห็นชอบจากผู้ให้ทุน

ข้อ 4. ผู้รับทุนจะปฏิบัติตามหลักเกณฑ์การสนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัย มก. ทั้งนี้ จะถือว่าหลักเกณฑ์ดังกล่าว เป็นส่วนหนึ่งของสัญญา

ข้อ 5. ผู้รับทุนจะดำเนินการวิจัยตามข้อเสนอโครงการวิจัยและแผนการดำเนินงานที่ได้รับอนุมัติให้ปรับเปลี่ยน รวมทั้งข้อเสนอแนะของสถาบันวิจัยและพัฒนา ให้สำเร็จตามเป้าหมายของโครงการ หากเกิดปัญหาอุปสรรค ไม่สามารถทำการวิจัยได้ ผู้รับทุนต้องรายงานให้ผู้ให้ทุนทราบทันที เพื่อพิจารณาหาทางแก้ไข และดำเนินการตามความเหมาะสมต่อไป

ข้อ 6. ครุภัณฑ์ที่ได้รับอนุมัติในโครงการวิจัย เมื่อเสร็จสิ้นการวิจัยแล้ว ผู้รับทุนจะส่งมอบคืนครุภัณฑ์ให้แก่ผู้ให้ทุน เพื่อมอบให้หน่วยงาน (วิทยาเขต/คณะ/สถาบัน/สำนัก/ภาควิชา/ฝ่าย/ศูนย์/สถานีวิจัย) ตามความเหมาะสม เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

ข้อ 7. ผู้รับทุนพร้อมที่จะให้ผู้ให้ทุนหรือผู้แทนของผู้ให้ทุนเข้าเยี่ยมชมการดำเนินงานวิจัย เพื่อเป็นการติดตามประเมินผลโครงการวิจัย ในระยะเวลาที่เหมาะสม และเสนอผลงานวิจัยในการสัมมนาผลการดำเนินงานวิจัยโครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ตามที่ผู้ให้ทุนกำหนด

ข้อ 8. ผู้รับทุนจะต้องส่งรายงานความก้าวหน้า การดำเนินงานวิจัย และรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ดังนี้

8.1 โครงการวิจัยปีเดียว

1) ส่งรายงานความก้าวหน้าการดำเนินงานวิจัย เมื่อดำเนินการวิจัยได้ 6 เดือน

2) ส่งรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภายในเวลา 3 เดือน หลังจากสิ้นสุดการดำเนินงานวิจัย

8.2 โครงการวิจัยต่อเนื่อง

1) ส่งรายงานความก้าวหน้าการดำเนินงานวิจัย เมื่อดำเนินการวิจัยครบทุก 6 เดือน

2) ส่งรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภายในเวลา 3 เดือน หลังจากดำเนินการวิจัยเสร็จสิ้นตลอดโครงการในปีสุดท้าย

8.3 กรณีโครงการวิจัยย่อยภายใต้ชุดโครงการวิจัย ผู้รับทุนจะต้องส่งรายงานความก้าวหน้าการดำเนินงานวิจัยและรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ไปยังผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัย เพื่อรวมชุดส่งสถาบันวิจัยและพัฒนา กรณีส่งแยกโครงการย่อยต้องผ่านความเห็นชอบจากผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัยก่อน

ข้อ 9. ผู้รับทุน จะต้องส่งผลงานวิจัยเสนอตีพิมพ์ในวิทยาสารเกษตรศาสตร์ หรือวารสารต่าง ๆ และเมื่อได้รับการตีพิมพ์ผลงานแล้ว ขอให้สำเนาแจ้งสถาบันวิจัยและพัฒนาทราบด้วย

ข้อ 10. กรรมสิทธิ์ในผลงานวิจัย เป็นของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ส่วนผลประโยชน์ที่จะเกิดจากการขายลิขสิทธิ์หรือถ่ายทอดเทคโนโลยีของผลงานวิจัย ให้เป็นไปตามระเบียบมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ว่าด้วยการจัดสรรผลประโยชน์อันเกิดจากงานวิจัย

ข้อ 11. ในการเผยแพร่ผลงานวิจัยหรือข้อมูล ข่าวสารอันเกี่ยวกับผลงานวิจัยในสิ่งพิมพ์หรือสื่อใด ผู้รับทุนจะต้องระบุข้อความว่า "ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์"

ข้อ 12. ผู้ให้ทุนและผู้รับทุนมีสิทธิ์บอกเลิกสัญญาได้ หากฝ่ายหนึ่งฝ่ายใดมิได้ปฏิบัติหน้าที่ความรับผิดชอบตามที่ระบุไว้ในสัญญา หรือเมื่อผู้ให้ทุนและผู้รับทุนเห็นพ้องต้องกันว่าควรจะยุติการดำเนินงานในโครงการ โดยผู้บอกเลิกสัญญา จะต้องมีหนังสือแจ้งให้อีกฝ่ายหนึ่งทราบพร้อมเหตุผล ทั้งนี้การบอกเลิกสัญญาดังกล่าว จะมีผลหลังจาก 60 วัน นับจากวันที่ฝ่ายหนึ่งฝ่ายใดได้รับหนังสือบอกกล่าว

ข้อ 13. เมื่อมีการบอกเลิกสัญญาตามข้อ 12. ผู้รับทุนจะต้องส่งใบสำคัญคู่จ่าย ซึ่งได้ใช้จ่ายไปไม่เกินวันที่บอกเลิกสัญญา และรายงานผลการวิจัยที่ได้ดำเนินการ พร้อมทั้งคืนเงินวิจัยที่เหลือและครุภัณฑ์ให้แก่ผู้ให้ทุน

ข้อ 14. ผู้รับทุนที่ได้รับงบประมาณหมวดค่าจ้างชั่วคราวต้องปฏิบัติตามพระราชบัญญัติการประกันสังคม พ.ศ. 2533

สัญญานี้ทำขึ้น 2 ฉบับ มีข้อความตรงกัน คู่สัญญาได้อ่านและเข้าใจข้อความในสัญญานี้โดยตลอด จึงได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นสำคัญ และต่างเก็บไว้ฝ่ายละฉบับ

(ลงชื่อ).....ผู้ให้ทุน
(ศาสตราจารย์วิสิต สุขรรณเพลมิลม)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

(ลงชื่อ).....ผู้รับทุน
(นาง เสริมศิริ จันทร์เปรม)
หัวหน้าโครงการวิจัย

(ลงชื่อ).....พยานผู้ให้ทุน
(นางภัทรา ชูวาชีวะมน์)
หัวหน้าฝ่ายวิจัยและประเมินผล

(ลงชื่อ).....พยานผู้รับทุน
(ภาคภูมิ กาญจนพูลศรี)
หัวหน้าภาควิชา/ฝ่าย/ศูนย์/สถานีวิจัย หรือผู้แทน

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. ๒๕๔๖

สัญญารับทุนอุดหนุนวิจัย มก.
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สัญญานี้ทำขึ้น ณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตั้งอยู่เลขที่ 50 ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่.....8.....เดือน.....พ.ค.....พ.ศ. ...2546 ระหว่าง สถาบันวิจัยและพัฒนา โดย....ศาสตราจารย์ รังสิต สุวรรณเขตนิคม.....ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา ซึ่งต่อไปในสัญญานี้เรียกว่า "ผู้ให้ทุน" ฝ่ายหนึ่งกับ ... นาง เสริมศิริ จันทร์เปรม.... ..... หัวหน้าโครงการ สังกัดภาควิชา/ฝ่าย/ศูนย์/สถานีวิจัย...ภาควิชาพืชสวน.....

คณะ/สถาบัน/สำนัก.....คณะ.เกษตร.....บ้านเลขที่..18/4...ถนน.....-.....

ตำบล/แขวง...คลองถนน.....อำเภอ/เขต...สายไหม.....จังหวัด....กทม...10220.....

ซึ่งต่อไป ในสัญญานี้เรียกว่า "ผู้รับทุน" อีกฝ่ายหนึ่ง คู่สัญญาได้ตกลงกันดังต่อไปนี้

ข้อ 1. ผู้ให้ทุนตกลงให้ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปี.....2546..... แก่โครงการวิจัย รหัส....04108063..... ประเภท....โครงการวิจัย 3 สาขา.....

เรื่อง....การเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอย ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เพื่อผลิต .....สารทุติยภูมิ .....

.....

เป็นจำนวนเงิน.....130,000.....บาท (.....หนึ่งแสนสามหมื่นบาทถ้วน.....)

ข้อ 2. ผู้ให้ทุนจะจ่ายเงินให้กับผู้รับทุนโดยแบ่งเป็น 2 งวด ดังนี้

งวดที่ 1 (6 เดือน) ร้อยละ 60 ของงบที่ได้รับอนุมัติ ไม่รวมหมวดครุภัณฑ์ ที่ดิน และสิ่งก่อสร้าง หมวดค่าจ้างชั่วคราว และเงินสมทบผู้ประกันตนในส่วนของนายจ้างในหมวดค่าใช้สอย

งวดที่ 2 (6 เดือน) ร้อยละ 40 ของงบที่ได้รับอนุมัติ ไม่รวมหมวดครุภัณฑ์ ที่ดิน และสิ่งก่อสร้าง หมวดค่าจ้างชั่วคราว และเงินสมทบผู้ประกันตนในส่วนของนายจ้างในหมวดค่าใช้สอย

โดยงวดที่ 1 จะจ่ายให้ภายในเวลา 15 วัน นับแต่วันลงนามในสัญญา (หากผู้รับทุนไม่ค้างส่งรายงานผลการวิจัยที่ถึงกำหนดการส่ง) และงวดที่ 2 จ่ายให้ตามกำหนดเวลา เมื่อผู้รับทุนได้ส่งรายงานความก้าวหน้าการดำเนินงานวิจัย (6 เดือน) และรายงานความก้าวหน้าได้ผ่านการประเมินผลแล้ว

ข้อ 3. ชื่อหัวหน้าโครงการ ผู้ร่วมวิจัย และรายละเอียดของโครงการวิจัยตามที่ปรากฏแนบท้ายสัญญานี้ ผู้รับทุนจะเปลี่ยนแปลงได้ เมื่อได้รับความเห็นชอบจากผู้ให้ทุน

ข้อ 4. ผู้รับทุนจะปฏิบัติตามหลักเกณฑ์การสนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัย มก. ทั้งนี้ จะถือว่าหลักเกณฑ์ดังกล่าว เป็นส่วนหนึ่งของสัญญา

ข้อ 5. ผู้รับทุนจะดำเนินการวิจัยตามข้อเสนอโครงการวิจัยและแผนการดำเนินงานที่ได้รับอนุมัติให้ปรับเปลี่ยน รวมทั้งข้อเสนอแนะของสถาบันวิจัยและพัฒนา ให้สำเร็จตามเป้าหมายของโครงการ หากเกิดปัญหาอุปสรรค ไม่สามารถทำการวิจัยได้ ผู้รับทุนต้องรายงานให้ผู้ให้ทุนทราบทันที เพื่อพิจารณาหาทางแก้ไข และดำเนินการตามความเหมาะสมต่อไป

ข้อ 6. ครุภัณฑ์ที่ได้รับอนุมัติในโครงการวิจัย เมื่อเสร็จสิ้นการวิจัยแล้ว ผู้รับทุนจะส่งมอบคืนครุภัณฑ์ให้แก่ผู้ให้ทุน เพื่อมอบให้หน่วยงาน (ภาควิชา/ฝ่าย/ศูนย์/สถานีวิจัย) ตามความเหมาะสม เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

ข้อ 7. ผู้รับทุนพร้อมที่จะให้ผู้ให้ทุนหรือผู้แทนของผู้ให้ทุนเข้าเยี่ยมชมการดำเนินงานวิจัย เพื่อเป็นการติดตามประเมินผลโครงการวิจัย ในระยะเวลาที่เหมาะสม และเสนอผลงานวิจัยในการสัมมนาผลการดำเนินงานวิจัยโครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ตามที่ผู้ให้ทุนกำหนด

ข้อ 8. ผู้รับทุนจะต้องส่งรายงานความก้าวหน้า และรายงานผลการวิจัยประจำปี รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ดังนี้

8.1 ส่งรายงานความก้าวหน้า เมื่อดำเนินงานวิจัยครบ 6 เดือน นับจากวันลงนามในสัญญา

8.2 โครงการวิจัยต่อเนื่อง ส่งรายงานผลการวิจัยประจำปี ภายใน 15 เดือน หลังจากวันลงนามในสัญญา ทั้งนี้ สามารถส่งสำเนาผลการวิจัยที่ตีพิมพ์ในวิทยาสาร วารสารต่าง ๆ แทนรายงานผลการวิจัยได้

8.3 โครงการวิจัยที่ดำเนินการปีเดียว หรือโครงการวิจัยต่อเนื่อง ซึ่งสิ้นสุดโครงการ ส่งรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภายใน 15 เดือน หลังจากวันลงนามในสัญญา

ข้อ 9. ผู้รับทุน จะต้องส่งผลงานวิจัยเสนอตีพิมพ์ในวิทยาสารเกษตรศาสตร์ หรือวารสารต่าง ๆ และเมื่อได้รับการตีพิมพ์ผลงานแล้ว ขอให้สำเนาแจ้งสถาบันวิจัยและพัฒนาทราบด้วย

ข้อ 10. กรรมสิทธิ์ในผลงานวิจัย เป็นของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ส่วนผลประโยชน์ที่จะเกิดจากการขายลิขสิทธิ์หรือถ่ายทอดเทคโนโลยีของผลงานวิจัย ให้เป็นไปตามระเบียบมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ว่าด้วยการจัดสรรผลประโยชน์อันเกิดจากงานวิจัย

ข้อ 11. ในการเผยแพร่ผลงานวิจัยหรือข้อมูล ข่าวสารอันเกี่ยวกับผลงานวิจัยในสิ่งพิมพ์หรือสื่อใด ผู้รับทุนจะต้องระบุข้อความว่า "ได้รับทุนอุดหนุนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์"

ข้อ 12. ผู้ให้ทุนและผู้รับทุนมีสิทธิ์บอกเลิกสัญญาได้ หากฝ่ายหนึ่งฝ่ายใดมิได้ปฏิบัติหน้าที่ความรับผิดชอบตามที่ระบุไว้ในสัญญา หรือเมื่อผู้ให้ทุนและผู้รับทุนเห็นพ้องต้องกันว่าควรจะยุติการดำเนินงานในโครงการ โดยผู้บอกเลิกสัญญา จะต้องมีหนังสือแจ้งให้อีกฝ่ายหนึ่งทราบพร้อมเหตุผล ทั้งนี้การบอกเลิกสัญญาดังกล่าว จะมีผลหลังจาก 60 วัน นับจากวันที่ฝ่ายหนึ่งฝ่ายใดได้รับหนังสือบอกกล่าว

ข้อ 13. เมื่อมีการบอกเลิกสัญญาตามข้อ 12. ผู้รับทุนจะต้องส่งใบสำคัญคู่จ่าย ซึ่งได้ใช้จ่ายไม่เกินวันที่บอกเลิกสัญญา และรายงานผลการวิจัยที่ได้ดำเนินการ พร้อมทั้งคืนเงินวิจัยที่เหลือและครุภัณฑ์ที่แก่ผู้ให้ทุน

ข้อ 14. ผู้รับทุนที่ได้รับงบประมาณหมวดค่าจ้างชั่วคราวต้องปฏิบัติตามพระราชบัญญัติการประกันสังคม พ.ศ. 2533

สัญญานี้ทำขึ้น 2 ฉบับ มีข้อความตรงกัน คู่สัญญาได้อ่านและเข้าใจข้อความในสัญญานี้โดยตลอด จึงได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นสำคัญ และต่างเก็บไว้ฝ่ายละฉบับ

(ลงชื่อ).....ผู้ให้ทุน

((ศาสตราจารย์รังสิต สุวรรณเขตนิคม))

ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

(ลงชื่อ).....ผู้รับทุน

(นาง เสริมศิริ จันทร์เมรม)

หัวหน้าโครงการวิจัย

(ลงชื่อ).....พยานผู้ให้ทุน

(นางภัทรา ชูชีวัฒน์)

หัวหน้าฝ่ายวิจัยและประเมินผล

(ลงชื่อ).....พยานผู้รับทุน

(นายรวี เสรฐศักดิ์)

หัวหน้าภาควิชา/ฝ่าย/ศูนย์/สถานีวิจัย

สำเนา

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน ☎ 3365-3368

ที่ ศธ 0513.20205/ 01730 **วันที่** 25 กันยายน 2546

เรื่อง ขอส่งผลการจัดสรรงบประมาณ ปี 2547 แก่โครงการวิจัยย่อย ในชุดโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิตและการใช้ประโยชน์เจตมูลเพลิงแดงในเชิงการค้าและอุตสาหกรรม

เรียน ฝ่ายวิจัยและประเมินผล สถาบันวิจัยและพัฒนา

พร้อมบันทึกนี้ ขอส่งผลการจัดสรรงบประมาณ ปี 2547 แก่โครงการวิจัยย่อยใน **ชุดโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิตและการใช้ประโยชน์เจตมูลเพลิงแดงในเชิงการค้าและอุตสาหกรรม** ดังรายละเอียดในแผ่นที่แนบ

จึงมาเพื่อโปรดพิจารณา และขอบคุณเป็นอย่างยิ่งที่ช่วยกรุณาประสานงานในการขอทุนวิจัยชุดโครงนี้การมาโดยตลอด มา ณ โอกาสนี้

(นางนพพร คล้ายพงษ์พันธุ์)

ผู้อำนวยการชุดโครงการฯ

เรียน ดร. เสริมศิริ

เพื่อโปรดทราบ

25 ก.ย. 46

แบบแจ้งหมวดเงินค่าใช้จ่ายโครงการวิจัยทุนอุดหนุน

ชื่อโครงการวิจัย	ผู้อำนวยการชุดโครงการ/หัวหน้าโครงการ	หมวดค่าจ้างชั่วคราว (ระบุวุฒิ จำนวนอัตรา (คน) และระยะเวลาการจ้าง (เดือน...ถึงเดือน...) ภายในปีงบประมาณ	หมวดค่าตอบแทน/ใช้สอย/วัสดุ	หมวดค่าสาธารณูปโภค	หมวดค่าครุภัณฑ์ที่ดินและสิ่งก่อสร้าง (ระบุรายการ และจำนวน)	ค่าตอบแทนนักวิจัย	รวม
ชุดโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิตและการใช้ประโยชน์เจตมูลเพลิงแดงในเชิงการค้าและอุตสาหกรรม	นางนพพร คล้ายพงษ์พันธุ์	-	3,000	-	-	-	3,000
โครงการย่อยที่							
1 : ศึกษาวิธีการปลูกเจตมูลเพลิงแดงเป็นการค้า	นางนพพร คล้ายพงษ์พันธุ์	-	95,000	5,000	-	14,000	114,000
2 : การรวบรวมและตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน เคมี และพันธุกรรมของเจตมูลเพลิงแดง	นายเรวัต เลิศฤทัยโยธิน	-	190,000	10,000	-	13,000	213,000
3 : การเพิ่มศักยภาพการผลิตสารทุติยภูมิของเจตมูลเพลิงแดง โดยการเพิ่มชุดโครโมโซมและการก่อกลายพันธุ์	นายสนธิชัย จันทร์เปรม	-	118,750	6,250	-	13,000	138,000
4 : การเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง	นางเสริมศิริ จันทร์เปรม	-	134,900	7,100	-	13,000	155,000
5 : ผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช	นางสาวชลิดา เล็กสมบูรณ์	-	85,500	4,500	-	14,000	104,000
6 : การเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ	นางสาวรมณีย์ เจริญทรัพย์	-	57,000	3,000	-	13,000	73,000
รวม		-	684,150	35,850	-	80,000	800,000

<u>หมายเหตุ</u> - ค่าจ้างชั่วคราว ขอให้จ้างตามความจำเป็น และกำหนดระยะเวลาการจ้างแน่นอน ภายในปีงบประมาณ

- ค่าครุภัณฑ์ ที่ดิน และสิ่งก่อสร้าง ขอให้สืบราคาที่เป็นปัจจุบันและจัดเตรียมรายละเอียดคุณสมบัติไว้ล่วงหน้า
- ค่าสาธารณูปโภค กำหนดขั้นต่ำ 5 % ของงบวิจัยไม่รวมค่าครุภัณฑ์ ที่ดิน และสิ่งก่อสร้าง และค่าจ้างชั่วคราว
- ค่าตอบแทนนักวิจัยกำหนด 10 % ของงบวิจัยไม่รวมค่าครุภัณฑ์ ที่ดิน และสิ่งก่อสร้าง และค่าจ้างชั่วคราว และให้ตั้งไว้ในงบกลาง

ภาคผนวก

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการต่างๆ

วารสาร

ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร
AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

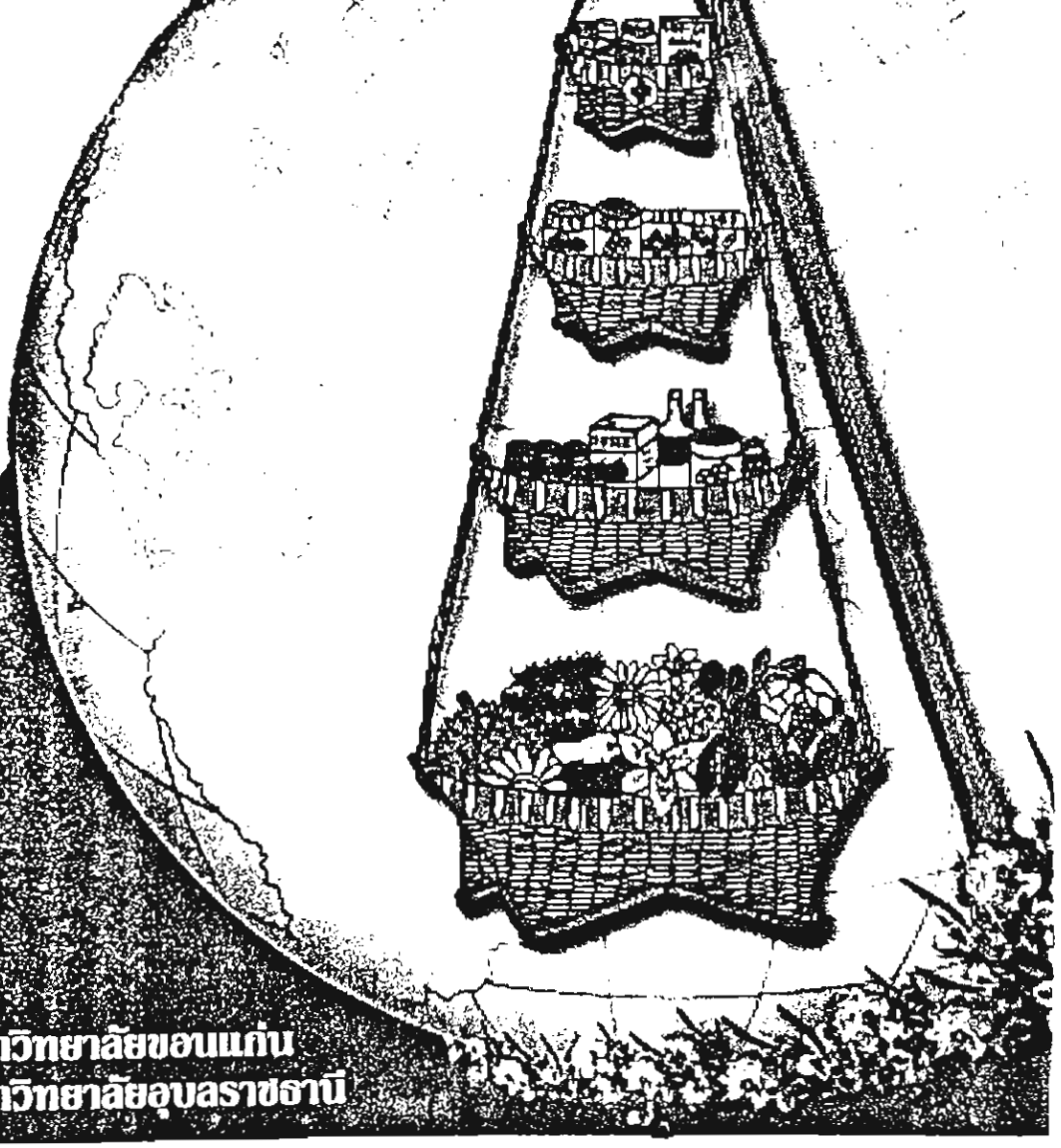
33 ฉบับที่ 4-5 (พิเศษ) กรกฎาคม - ตุลาคม 2545

Vol. 33 No. 4-5 (Supp[illegible])

Second National Horticultural Congress

28 - 30 [illegible]ม 2545

ณ โรงแรมเจริญธานี ปรินซ์ ขอนแก่น



จัดประชุมโดย

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนการประชุมโดย

สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

Agricultural Sci. J. 33 4-5 (Suppl) : 123-126 (2002) ว. วิทย.กษ. 33 4-5 (พิเศษ) : 123-126 (2545)

การชักนำให้เกิด hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* "K599"
Hairy Root Induction in *Plumbago indica* L.via *Agrobacterium rhizogenes* "K599"

สุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์[1] พร้อมจิต ศรลัมพ์[2] และ เสริมศิริ จันทร์เปรม[1]

ABSTRACT

Plumbago indica L. is one of the important medicinal plant of Thailand. At present, there is a few plantation, thus, the produce are still collected from the forest which may lead to be the endanger species. The high potential procedure to conserve this plant species is to produce plumbagin ,the main secondary metabolite, *in vitro*. Hairy root culture is among the *in vitro* culture techniques which have been extensively employed for production of the secondary metabolite produced and accumulated in root part. This experiment is aimed to test the wounding techniques for the infection of *P. indica* with *A rhizogenes* 'K599'. Punch stem with G26½ needle (20 punches/stem) or cut stem lengthwise (3 positions per stem each of 1 cm length) were done prior to 4 days co-cultivated with *Agrobacterium* (which have been cultured 12 hours in YEB at 28°C) . After co-cultivation period, explant were transferred onto MS + 1 g/l cefotaxime for 4 weeks. The percentage of hairy root induced explants demonstrated non-significant difference between those 2 techniques. However, it is noticeable that stem cut method yield higher number of hairy root induced per explant.

Keywords: *Plumbago indica* L., *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root

บทคัดย่อ

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่สำคัญชนิดหนึ่ง ในทางตำราไทยได้ใช้รากมาทำเป็นตัวยาหลายขนานที่สำคัญ จึงทำให้มีการลักลอบขุดเก็บรากจากป่ากันเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจเกิดการสูญพันธุ์และส่งผลกระทบต่อนิเวศวิทยาของป่าได้ จึงควรหาทางอนุรักษ์ซึ่งแนวทางที่เป็นไปได้คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root แล้วชักนำให้ผลิตสารทุติยภูมิ จึงได้ทำการศึกษาเทคนิคการชักนำให้เกิด hairy root โดยการ infect ด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร YEB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วนำมา infect โดยทำบาดแผลที่ลำต้น 2 วิธีคือ การใช้เข็มฉีดยาแทงให้เกิดบาดแผล 20 แผลต่อต้น และการกรีดลำต้นตามแนวยาว 1 ซม. 3 แนวต่อต้น แล้วนำต้นมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม cefotaxime 1 ก./ล. นาน 4 สัปดาห์ เพื่อกำจัดเชื้อ *A. rhizogenes* พบว่าการชักนำให้เกิด hairy root ทั้ง 2 วิธีการมีการเกิด hairy root เฉลี่ย 55 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จากการสังเกตพบว่าการกรีดจะให้ปริมาณ hairy root ต่อต้นมากกว่าการแทงด้วยเข็ม

คำนำ

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่สำคัญชนิดหนึ่งอยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae ในประเทศไทยใช้ส่วนของรากเป็นส่วนประกอบในตำรายาไทยหลายขนานที่สำคัญ โดยใช้เป็นยาขับประจำเดือน ช่วยให้ร่างกายเกิดความอบอุ่น แก้ปอดชื้น กระตุ้นการย่อยอาหาร เป็นต้น (จินดาพร, 2539) สารออกฤทธิ์ที่สำคัญในเจตมูลเพลิงแดงคือ plumbagin ซึ่งพบสะสมอยู่มากในส่วนของราก มีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ รวมทั้งยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Krishnaswamy และ Purushothaman, 1980) ปัจจุบันมีการขุดเก็บรากออกมาจากป่าในแถบต่างๆ ของประเทศไทยเป็นจำนวนมาก ซึ่งในอนาคตอาจเกิดการสูญพันธุ์ได้จึงควรอนุรักษ์ ซึ่งแนวทางที่เป็นไปได้คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ซึ่งเกิดจากการ infect ของเชื้อแบคทีเรีย

[1] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140
[2] ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

Agrobacterium rhizogenes (Tepfer, 1984) แล้วชักนำให้สร้างสารทุติยภูมิในสภาพเพาะเลี้ยง ซึ่งเทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดเช่น แพงพวยฝรั่ง (Pan, 1989) *Gentiana sp.* (Momcilovic และคณะ, 1997) อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนแรกที่จะประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิด hairy root ได้คือ วิธีการทำบาดแผลเพื่อให้เชื้อสามารถ infect พืชได้ ซึ่งมีผู้ทดลองใช้หลายวิธีด้วยกัน (Cho และคณะ, 1999 ; Kanokwaree, 1997) การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบวิธีการทำบาดแผลบนลำต้นแบบต่างๆ ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการ infect ของเชื้อและสร้าง hairy root ขึ้นบนส่วนของลำต้นเจตมูลเพลิงแดง

อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้ต้นเจตมูลเพลิงแดง ที่ได้มาจากสวนยาไทยทองนพคุณ อำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีความสูงของลำต้นประมาณ 4-6 เซนติเมตร และใช้ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ในการศึกษาเทคนิคการชักนำให้เกิด hairy root โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเตรียมเชื้อ *A. rhizogenes*

1.1 วัดค่า O.D. ของเชื้อเพื่อทำ standard growth curve ย้าย single colony ของเชื้อ *A. rhizogenes* มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YEB ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 280 รอบต่อนาที แล้วนำมาวัดค่า O.D. (optical density) ที่ 650 นาโนเมตร ทุก 2 ชั่วโมง ในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง แล้วนำค่า standard growth curve เพื่อหาช่วงระยะการเจริญเติบโตที่เหมาะสมสำหรับการ infect พืชคือช่วง log phase

1.2 นับจำนวนเซลล์ของเชื้อในช่วงระยะการเจริญที่นำมาใช้ นำสารละลายเชื้อที่อยู่ในช่วง log phase ที่จะนำมาใช้ infect มาเจือจางด้วยอาหารเหลวสูตร YEB ให้ได้อัตราส่วน 1:1,000 1:10,000 1:100,000 และ 1:1,000,000 แล้วนำสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยบนอาหารแข็งสูตร YEB ใน plate ขนาด 9 เซนติเมตร ซึ่งเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำ 2 ซ้ำ จากนั้นนับจำนวน colony ของเชื้อและคำนวณจำนวนเชื้อต่อหน่วยปริมาตรเริ่มต้น

2. ศึกษาวิธีการ infect ด้วย *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 นำต้นเจตมูลเพลิงแดงที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความสูงประมาณ 4-6 เซนติเมตร มาชักนำให้เกิด hairy root โดยการ infect เชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ที่เลี้ยงตามวิธีการในข้อ 1.1 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เข้าไปในส่วนของลำต้น โดยใช้วิธีการทำบาดแผล 2 วิธีการ คือ

2.1 ทำบาดแผลโดยการแทงด้วยเข็ม นำปลายเข็มฉีดยาขนาด 26G½ จุ่มสารละลายเชื้อ แล้วนำไปแทงบนลำต้นเจตมูลเพลิงแดงตั้งแต่ข้อที่ 4 จากโคนขึ้นไปเพื่อทำให้เกิดบาดแผล 20 บาดแผลต่อต้น

2.2 ทำบาดแผลโดยการกรีดด้วยใบมีด นำมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมากรีดบนลำต้นให้เป็นแนวยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดตรงบริเวณรอยแผล

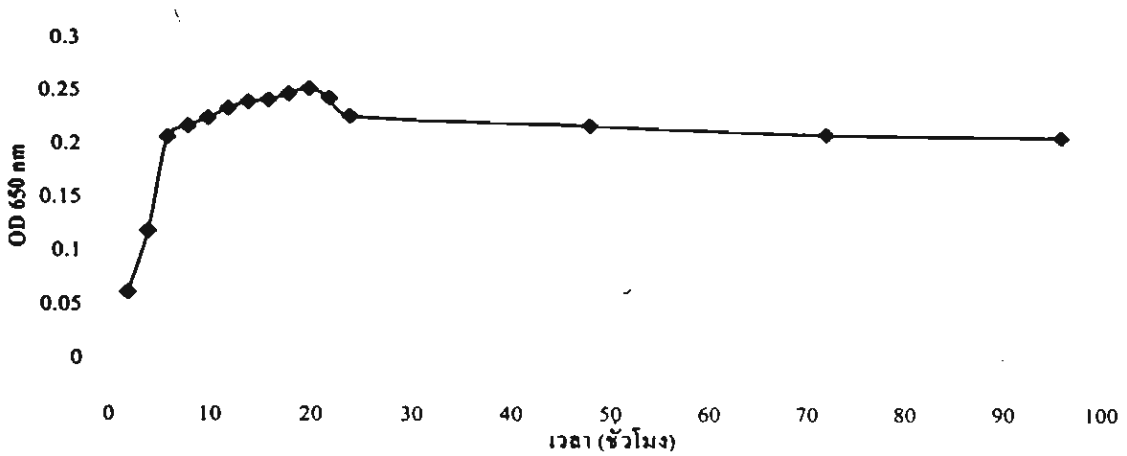
หลังจาก infect แล้วย้ายต้นพืชมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS เลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 28 $\mu mol/m^2/s$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 วัน ก่อนที่จะย้ายลงในอาหารสูตรเดิมที่เติมยาปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และ subculture ใหม่ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อกำจัดเชื้อ *A. rhizogenes*

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยใช้วิธีการละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ต้น และบันทึกผลการทดลองโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นพืชที่เกิด hairy root

ผลและวิจารณ์

การเตรียมเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 โดยการวัดค่า OD เทียบกับการนับจำนวนเซลล์

เมื่อนำค่า OD ที่วัดได้จากระยะเวลาในการเลี้ยงต่างๆ กันมาเขียนกราฟพบว่า ระยะเวลาที่เชื้อมีการเจริญเติบโตแบบ log phase อยู่ในช่วงของการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10-20 ชั่วโมง (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลดังกล่าวการทดลองนี้เลือกใช้ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อที่ 12 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อนำเชื้อในระยะดังกล่าวมานับจำนวนเซลล์ของเชื้อโดยวิธี colony count พบว่า มีความเข้มข้นของเชื้อ 2.1×10^{13} เซลล์ต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 1 การเจริญของเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ในอาหารเหลวสูตร YEB เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และ เขย่าที่ความเร็ว 280 รอบต่อนาที

การเปรียบเทียบวิธีการทำบาดแผลต่อการเกิด hairy root จากการทดลองทำบาดแผลบนลำต้น 2 วิธี แล้ว infect โดยใช้เชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K599 พบว่า วิธีการใช้เข็มแทงและวิธีการกรีดมีเปอร์เซ็นต์ต้นที่เกิด hairy root เฉลี่ย 55 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามจากการสังเกตพบว่า การกรีดด้วยมีดจะให้จำนวน hairy root ต่อต้นมากกว่าใช้เข็มแทง

ตารางที่ 1 การชักนำให้เกิด hairy root บนลำต้นเจตมูลเพลิงแดง โดยเชื้อ *A.rhizogenes* K599 โดยวิธีการทำบาดแผล 2 วิธี

วิธีการทำบาดแผล	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		เฉลี่ย %HR	T-test
	HR	%HR	HR	%HR		
กรีดด้วยมีด	10	50	8	40	55	ns
แทงด้วยเข็ม	10	50	12	60	45	ns

HR = จำนวนชิ้นพืชที่เกิด hairy root จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น 20 ชิ้น ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

สรุป

1. การวัดค่า O.D. ที่ 650 นาโนเมตร พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในช่วงเวลา 8-20 ชั่วโมง เป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด (log phase)

2. การชักนำให้เกิด hairy root บนลำต้น โดยวิธีการใช้เข็มแทงให้ผลไม่แตกต่างกับการกรีดด้วยมีด แต่วิธีการกรีดจะให้ปริมาณ hairy root ต่อชิ้นส่วนพืชมากกว่า

คำนิยม

ขอบคุณ สวทช. ที่ได้ให้การสนับสนุนในส่วนของทุนการศึกษา และขอบคุณ สกว. และ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้การสนับสนุนในส่วนของค่าวัสดุวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์. 2539. เภสัชเวทกับตำรายาแผนโบราณ. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ. 356 น.

Cho, H. J., S. K. Farrand, G. R. Noel and J. M. Widholm. 2000. High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. Planta. 210 : 195-204.

Kanokwaree, K. 1997. The effect of oxygen transfer and gas-phase composition on *Atropa belladonna* hairy root cultures. Thesis submitted for the degree of doctor of philosophy. Deparment of biotechnology. The university of New South Wales. 188 p.

Krishnaswamy M. and K.K. Purushothaman. 1980. Plumbagin : A study of its anticancer, antibacterial & antifungal properties. Indian J. Exp. Biol. 18 : 876-877.

Momcilovic, I., D. Grubisic, M. Kojic and M. Neskovic. 1997. *A. rhizogenes*-mediated Transformation and plant regeneration of four *Gentiana species*. Plant Cell Tiss and Organ Cult. 50 :1-6.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with Tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Parr, A. J. 1989. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. J. Biotech. 10 : 1-25.

Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *A. rhizogenes*'sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell. 37 : 959-967.

The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP III)

From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable Use

3 – 7 February 2003

Chiang Mai, Thailand

Programme and Abstracts

Organized by

ICMAP ISHS IUBS CMU

POSTER

Hairy Root Induction and Culture of *Plumbago indica* L.

S. Tatreerod[1], P. Saralamp[2] and S. Chanprame[1]

[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Khampaeng Saen, Nakorn Pathom 73140, Thailand. (onodie@hotmail.com)
[2]Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Mahidol Uiniversity, Bangkok 10400, Thailand.

Plumbago indica L. is one of the important medicinal plants of Thailand. Plumbagin, he main secondary metabolite in root of this plant is known for its pharmacological properties. In order to obtain good quality of roots, plants must be grown for about 3 years. However, root culture has been reported to be another good source of secondary metabolite production due to its ability to be controlled both in quantity and quality. In this report, *P. indica* L. hairy root induction and culture were elucidated for the purpose of *in vitro* production of plumbagin. The two stem wounding methods, cut 1 cm lengthwise and punch with 26G ½ needle, prior to infected with wild type *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 showed non-significance in number of explants in which hairy root was produced (85 and 70% respectively). The hairy roots were then cultured in both solid and liquid media of MS, B5, half-MS and half-B5 under the light (28 μmol/m^2/s, 16 hr) and dark condition at 23 °C for one month. The results illustrated that all media tested show no significant difference in hairy root fresh growth index (FGI) and dry growth index (DGI). On the other hand, there were significantly difference in the combinatorial treatments of media compositions and conditions and media composition and light conditions. Among all media and culture conditions tested, the treatment using liquid half-B medium culture under light condition yield the highest FGI and DGI.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, culture conditions, media compositions

Hairy Root Induction and Culture of *Plumbago indica* L.

S. Tatreerod[1] P. Saralamp[2] and S. Chanprame[1]

[1] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Khampaeng Saen, Nakorn Pathom 73140, Thailand.
[2] Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, culture conditions, media compositions

Abstract
Plumbago indica L. is one of the important medicinal plants of Thailand. Plumbagin, the main secondary metabolite in root of this plant is known for its pharmacological properties. In order to obtain good quality of roots, plants must be grown for about 3 years. However, root culture has been reported to be another good source of secondary metabolite production due to its ability to be controlled both in quantity and quality. In this report, *P. indica* L. hairy root induction and culture were elucidated for the purpose of in vitro production of plumbagin. The two stem wounding methods, cut 1 cm lengthwise and punch with 26G ½ needle, prior to infected with wild type *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 showed non- significance in number of explants in which hairy root was produced (85 and 70% respectively). The hairy roots were then cultured in both solid and liquid media of MS, B5, half-MS and half-B5 under the light (28μmol/m^2/s, 16 hr) and dark conditions at 23 °C for one month. The results illustrated that all media tested show no significant difference in hairy root fresh growth index (FGI) and dry growth index (DGI). On the other hand, there were significantly difference in the combinatorial treatments of media compositions and conditions and media composition and light conditions. Among all media and culture conditions tested, the treatment using liquid half-B5 medium cultured under light condition yielded the highest FGI and DGI.

INTRODUCTION

Plumbago indica L. is one of the important medicinal plants of Thailand. Plumbagin, the main secondary metabolite in root of this plant is known for its pharmacological properties. Some examples of the usefulness of this compound are anticancer, antimicrobial, and antifertility (Dinda and Chel, 1992; Komaraiah et al., 2002). In order to obtain good quality of roots for medicinal purpose, plants must be grown for about 3 years. However, root culture has been reported to be another good source of secondary metabolite production due to its ability to be controlled both in quantity and quality.

Many studies have been reported on the secondary metabolites production by root culture e.g. Uomori et al. (1974), Wang and Huang (1982) and Yamamoto and Kamura (1997). Root culture obtained from the transformation with *A. rhizogenes*, a Gram-negative bacteria, in which so call "hairy root" have been intensively reported as an alternative for several secondary metabolites production. The advantages of hairy root culture are high capability of biomass production and high stable production of biochemical compounds (Baiza et al., 1999). The successful results of secondary metabolites production by hairy root culture have been reported in many plant species such as *Datura stramonium* (Baiza et al.,1998 and 1999; Sikuli and Demeyer, 1997; Arid

et al.,1988), *Lycopersicon peruvianum* (Banerjee-Chattopadhyay et al., 1985), *Solanum aviculare* (Kittipongpatana et al.,1998), *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez et al., 1999), *Hyssopus officinalis* (Murakami et al., 1998) *Vinca minor* (Tanaka et al., 1995), *Glycyrrhiza glabra* (Toivonen and Rosenqvist, 1995) *Cassia obtusifollia* (Gou et al. 1998) *Panax ginseng* (Yoshikawa and Furuya, 1987) and *Ajuga reptans* (Tanaka and Matsumoto, 1993).

In this report, the establishment and culture methods of hairy root of *P. indica* L. were reported as a part of the study toward the in vitro production of plumbagin via hairy root culture.

MATERIALS AND METHODS

Hairry root induction

The in vitro plantlets of P. indica were used as explants for the transformation with A. rhizogenes strain K599. Two wounding techniques, punch stem with G26½ needle (20 punches/stem) or cut stem lengthwise (3 positions per stem each of 1 cm length) were done prior to infect with A. rhizogenes (which have been cultured in liquid YEB media for 12 hr at 28°C and cell density was 2.1×10^{-3} cells/ml). The co-cultivation period was 4 days in MS media at 28μ mol/m^2/s of 16 hr light, 25±2°C. After co-cultivation, explants were transferred onto MS media + 1 g/l cefotaxime for 4 weeks to eliminate the bacteria. The CDR experimental design with 2 replications, each of 30 explants was employed in this experiment.

Hairy root culture

The hairy root formed on the explants were excised and culture on MS basal media and was then used as explants for medium and culture conditions testing experiment. In this experiment, the initial 0.01g FW of hairy root was subcultured into MS, half-MS, B5 and half B5 medium. The culture conditions tested were, solid and liquid media and dark and light (28μ mol/m^2/s,16 hr). The temperature of the culture room was maintained at 25±2°C. The Fresh Growth Index (FGI) and Dry Growth Index (DGI) were determined in one-month-old hairy root culture. The 4x2 factorial in CRD with 2 replications each of 10 explants was the experimental design for this study.

RESULTS AND DISCUSSION

Hairy root induction

The two wounding techniques employed in this experiment, punch stem with G26½ needle and cut stem lengthwise demonstrated the non-significant result of hairy root induction. The percentages of the explants produced hairy root from these two wounding methods were 85% and 70% respectively (Table 1). However, it was noticeable that the number of hairy root per explant obtained from the cut stem method was higher compared to the punch stem method (data not shown). The susceptibility of plant species to infectious hairy root was reported intensively (de Cleene, 1981). Different strains may result in different infectiousness. The strain DC-AR2 has been reported to be able to infect *Vinca minor* (Tanaka et al., 1995) while the other strains such as ATCC 15834 (Murakami et al.,1998 and Sikuli and Demeyer, 1997) and LBA9402 (Pitta-Alvarez, 1999) were reported successfully infected in *Hyssopus officinalis*, *Datura stramonium* and *Brugmansia candida* respectively. In this report, the result revealed the successful of the infection and transformation of *P. indica* L. plant via *A. rhizogenes* strain K599.

Hairy root culture

The hairy root was cultured for one month on MS, half-MS, B5 and half B5 medium. The culture conditions tested were, solid and liquid media and dark and light (28μ mol/m^2/s,16 hr). It was found that with regardless of treatment combination, there were not significant different in FGI and DGI. On the other hand, there were significantly difference in the combinatorial treatments of media formular and solidify/liquidfy media and media formular and light/dark conditions. Among all media formular and culture conditions tested, the treatment using liquid half-B5 medium cultured under light condition yielded the highest FGI and DGI (Table 2). Liquid culture had been reported to be superior for hair root production in many plants species sush as *Glycyrrhiza* glabra (Toivonen and Rosenqvist, 1995), Datura *stramonium* (Sikuli and Demeyer, 1997), tobacco (Palazon et al., 1997), *Hyssopus officinalis* (Murakami et al., 1998), *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez and Giulietti, 1999). These conditions of culture can be used for large scale production of *P. indica* L. hairy root.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge The Thailand Research Fund for the financial support through the project PDF41/2543. The special thanks would also be for the Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University for funding through the graduate research fund.

LITERATURE CITED

Arid, E.L.H., Hamill, J.D. andRhodes, M.J.C. 1988. Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 15:47-57.

Baiza, A.M., Quiroz, A., Ruiz, J.A., Maldonado-Mendoza, I.E. and Loyola-Vargas, V.M. 1998. Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 54:123-130.

Baiza, A.M., Quiroz-Moreno, A., Ruiz, J.A.and Loyola-Vargas, V.M. 199. Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 59:9-17.

Banerjee-Chattopadhyay, S., Schwemmin, A.M. and Schwemmin, D.J. 1985. a study of karyotypes and their alterations in cultured and Agrobacterium transformed roots of *Lycopersicon peruvianum* Mill. Theor. Appl. Genet. 71:258-262.

Christen, P. 1989. High yield production of tropane alkaloids by hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. Plant Cell Rep. 8: 75-77.

Cho, HJ., S.K. Farrand, G. R. Noel and J.M. Widholm. 2000. High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. Planta. 210: 195-204.

de Cleen, M. and J. de Lay. 1981. The host range of infectious hairy root. The Botanical Review. 47:147-193.

Dinda, B. and G. Chel. 1992. 6-hydroxyplumbagin, a naphthoquinone from *Plumbago rosea*. Phytochem. 31: 3652-3653.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirments of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.

Guo, H Z., R. Chahg, Yang D. Guo and J. Zheng. 1998. Anthraquinones from hairy root cultures of *Cassia obtusifollia*. Phytochem. 49: 1623-1625.

Kittipongpatana, N., R.S. Hock and J.R. Porter. 1998. Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 52:133-143.

Komaraiah, P., Naga Amrutha, R., Kavi Kishor, P.B. and Ramakrishna, S.V. 2002. Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L. Enzyme Microb. Technol. 31:634-639.

Krishnaswamy, M. and K.K. Purushothaman. 1980. Plumbagin: A study of its anticancer, antibacterial and antifungal properties. Indian J. Exp. Biol. 18:876-877.

Murakami. Y., Omoto, T., Asai, I., Shimomura, K.,Yoshihira, K. and Ishimaru, K. 1998. Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 53:75-78.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15:473-497.

Palazon, J., Cusido, R.M, Roig, C. and Pinol, M.T. 1997. Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures. Plant Physiol. Biochem. 35:155-162.

Parr, A.J. 1989. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. J Biotech.10: 1-25.

Pitta-Alvarez, S.I. and Giulietti, A.M. 1999. influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Brugmansia candida* : effect of medium pH and growth phase. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 59:31-38.

Sikuli, N.N. and Demeyer, K. 1997. Influence of the ion-composition of the medium on alkaloid production by 'hairy roots' of *Datura stramonium*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 47: 261-267.

Tanaka, N. and Matsumoto, T. 1993. regenerants from *Ajuga* hairy roots with high productivity of 20-hydroxyecdysone. Plant cell Rep. 13:87-90.

Tanaka, N., T. Misato and M. Takeshi. 1995. Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor*. Plant Cell Tiss.Org. Cult. 41: 61-64.

Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by A. rhizogenes sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell. 37:959-967.

Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Physiol. Plant. 79: 140-146.

Toivonen, L. and H. Rosenqvist. 1995. Establishment and growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41: 249-258.

Uomori, A., Seo, S. and Tomita, Y. 1974. Studies on the constituents in tissue cultures of *Bupleurum falcatum* L. Syoyakugaku Zasshi 28:152-160.

Wang, P.J. and Huang, C.I. 1982. *In* pp 71-72: 5th Plant Tissue Culture. Fujiwara, A. ed. Tokyo, Japan

Yamamoto, O. and K. Kamura. 1997. Production of saikosaponin in cultured roots of *Bupleurum falcatum* L. Plant Tissue Cult. and Biotech. 3:138-144.

Yoshikawa, T and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 6: 449-453.

Tables

Table 1 Percentage of *P. indica* L. explants produced hairy root upon infection of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599.

Wounding method	% of explants produced hairy root		Average (%)
	Rep. 1	Rep.2	
Stem cut	83.33	86.67	85.0 ns
Stem punched	63.33	76.67	69.99 ns

ns = non-significant

Table 2 Growth of *P. indica* L.hairy root in various culture media and culture conditions

Media	Media conditions	Light conditions	Average of total FW (g)	Average of total DW (g)	FGI[1]	DGI[2]
B5	solid	light	0.060	0.009	4.95	3.30
		dark	0.043	0.006	3.26	1.75
	liquid	light	0.116	0.019	10.55	8.40
		dark	0.153	0.022	14.3	10.0
Half-B5	solid	light	0.072	0.010	6.19	3.90
		dark	0.046	0.007	3.58	2.50
	liquid	light	0.174	0.031	16.4	14.50
		dark	0.080	0.014	6.89	6.0
MS	solid	light	0.069	0.008	5.04	3.0
		dark	0.058	0.008	5.89	3.0
	liquid	light	0.064	0.011	9.45	4.50
		dark	0.100	0.017	8.10	7.50
Half-MS	solid	light	0.060	0.009	5.84	3.50
		dark	0.069	0.009	4.77	3.50
	liquid	light	0.105	0.013	5.43	5.50
		dark	0.091	0.016	9.01	7.0

[1]FGI = (final fresh weight-initial fresh weight)/ initial fresh weight
[2]DGI = (final dry weight-initial dry weight)/ initial dry weight

The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP III)

From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable Use

3 – 7 February 2003

Chiang Mai, Thailand

Programme and Abstracts

Organized by

ICMAP ISHS IUBS CMU

High Efficiency System for Micropropagation of *Plumbago indica* L.

S. Chanprame[1], S. Tatreerod[2], P. Saralamp[1] and S. Chanprame[1]

[1]Kasetsart University, Nakorn Pathom, Thailand. (agrsrc@ku.ac.th)
[2]Mahidol University, Thailand.

Different explants of *Plumbago indica* L. were examined for micropropagation efficiency. Apical and lateral bud were cultured in MS medium supplemented with 1-3 mg/l BA. The results demonstrated that media containing 3 mg/l BA yield the highest number of shoots, 89.50 and 201.62 shoots, respectively. Organogenesis directly from leaf surface was achieved by culturing leaves on 1 - 4 mg/l kinetin for one month then transferring to MS medium containing 1- 4 mg/l BA. It was found that the leaves cultured on MS media supplemented with 2 mg/l kinetin then 4 mg/l BA was the best for shoot production which yield 15.42 shoots per explant. MS medium supplemented with 1 mg/l BA was suitable for shoot elongation of shoot obtained from all treatments. The rooting media were also tested for root induction and the results illustrated that MS or half strength MS media were appropriated for used as rooting media. However, roots produced from both media showed morphological different. Plantlets cultured in MS medium had less number of roots but longer in size compared to the ones cultured in half strength MS medium which roots are shot and hairy.

Keyword: organogenesis, plant growth regulators, medicinal plant

High Efficiency System for Micropropagation of *Plumbago indica* L.

S. Chanprame[1], S. Tatreerod[1], P. Saralamp[2] and S. Chanprame[3]
[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Khampaeng Saen, Nakorn Pathom 73140, Thailand.
[2]Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.
[3]Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Khampaeng Saen, Nakorn Pathom 73140, Thailand.

Keywords: organogenesis, plant growth regulators, medicinal plant

Abstract

Different explants of *Plumbago indica* L. were examined for micropropagation efficiency. Apical and lateral bud were cultured in MS medium supplemented with 1-3 mg/l BA. The results demonstrated that media containing 3 mg/l BA yielded the highest number of shoots, 89.50 and 201.62 shoots, respectively. Organogenesis directly from leaf surface was achieved by culturing leaves on 1 - 4 mg/l kinetin for one month then transferring to MS medium containing 1-4 mg/l BA. It was found that the leaves cultured on MS media supplemented with 2 mg/l kinetin then 4 mg/l BA was the best for shoot production which yielded 15.4 shoots per explant. MS medium supplemented with 1 mg/l BA was suitable for shoot elongation of shoot obtained from all treatments. The rooting media were also tested for root induction and the results illustrated that MS or half strength MS media were appropriated for used as rooting media. However, roots produced from both media showed morphological different. Plantlets cultured in MS medium had less number of roots but longer in size compared to the ones cultured in half strength MS medium which roots are shot and hairy.

INTRODUCTION

Plumbago indica L. belongs to family Plumbaginaceae. The roots of this medicinal plant are the main source of plumbagin, which was reported for pharmacological properties such as anticancer, antimicrobial antifertility and insecticide (Krishnaswamy and Purushothaman, 1980; Komaraiah et al., 2002).

Cultivation of the plant for pharmaceutical propose is limited by lacking of genetic diversity due to vegetative propagation habit of the plant. To improve genetic background for breeding program, *in vitro* mutation is a method of choice. Few reports of *in vitro* propagation of the plants in this genus have been reported so far. Rout *et al.* (1999a and b) successfully multiply *Plumbago zeylanica in vitro* while Kumar and Bhavanandan (1988) reported *in vitro* culture of *P. rosea* L. This experiment was conducted to determine the suitable explants media and conditions for *in vitro* propagation of *P. indica* L. The technique will be applied for plant multiplication and breeding in the future.

MATERIALS AND MEDTHODS

Plant materials

Stems of field grown rose-colored leadwort (*Plumbago indica* L.) were collected. After removing of the leave and washing the stems with tap water, the stems were cut into small segments containing 4-5 nodes. Then they were submerged in the solution containing of 0.25 g/l Streptomycin (M&H Manufacturing Co., LTD) and 1.5 g/l Benlate® (Dopont, Thailand Co., LTD) for 1 hr. The treated explants were then

transferred into 70% ethanol for 1 min and then into 20 and 15% Clorox® for 10 and 15 min, respectively. The explants were rinsed three times with sterile water and then were culture on MS (1962) hormone-free medium to get new shoots.

Callus induction from apical and lateral bud

The emerged shoots were aseptically cut into small segments containing one lateral or apical bud and were transferred onto MS basal medium supplemented with 0, 1, 2, 3 and 4 mg/l BA. The experimental design of 2X5 factorial in CRD with 10 replications was used for data analysis.

Shoot development and elongation

The callus and multiple shoots derived from callus induction medium were cut into 2X2 cm/piece and then were transferred onto MS medium supplemented with 0, 1 and 2 mg/l BA for shoot development and elongation.

Organogenesis from leave

The 3rd to 5th leaf below the uppermost leaf from shoots grown on MS hormone-free medium were aseptically cut and transferred onto MS medium supplemented with 0, 1, 2, 3 and 4 mg/l kinetin for one month then they were transferred onto MS supplemented with 0, 1, 2, 3 and 4 mg/l BA.

Root induction

The 1.5-2.0 cm height shoots with 3-4 leaves were transferred onto full strength MS medium plus 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2 mg/l NAA and ½ MS hormone-free medium.

All experiments, the cultures were incubated at 25±1°C with 55 μmol/m^2/s light intensity and 16 hr photoperiod. The explants were transferred onto fresh medium every 4 weeks interval.

RESULTS AND DISCUSSION

Callus shoot induction from apical and lateral bud

All apical and lateral buds, which were cultured on MS medium supplemented with difference concentrations of BA, produced similar calli which were compact-green with brown segmental. When the concentrations of BA were increased, the callus proliferation was increased as well. Concentration of BA that promote callus formation the most was 4 mg/l. The shoot initiation from those calli was also increased with the increment of BA concentrations. However, calli derived from MS plus 3 mg/l BA produced the highest number of small shoots. The average number of shoot initiated from those calli derived from apical bud were 89.50 while 201.62 shoots were regenerated from lateral bud derive-calli. In contrast, the average shoot length and leaf number were decreased when the BA concentrations were increased (Table 1 and Fig 1 and 2). Lateral bud explant processes more ability of shoot and callus production when compare to apical bud explant. It was because of apical bud dominance. BA was reported to induce adventitious bud from lateral bud of *Picea omorika* (Budimir and Vujicic, 1992) and *Cunila galioides* (Fracaro and Echeverrigaray, 2001). Rout *et al.* (1999b) could only induce shoots from lateral bud of *P. zeylanica* cultured on MS medium supplemented with 0.5-1.0 mg/l BA. However, in this experiment, when the concentrations of BA were increased the shoot length and leaf number were decreased. The same effect of BA on

shoot elongation and leaf development was reported by Whiley and Saranah (1985) when they cultured ginger on MS supplemented with high concentrations of BA.

To induce shoot development and elongation, the clumps of initiated shoots derived from MS medium with 3 mg/l BA were cut into the same size and were transferred onto MS medium supplemented with lower concentration of BA. It was found that 1 mg/l BA was the most suitable concentration for shoot elongation and leaf expansion. While MS hormone-free medium could not promote shoot development and caused death of some shoots (Table 2 and Fig 3). It indicates that BA is essential for both shoot induction and development of the genus *Plumbago*.

Organogenesis from leave

The leaves, both abaxial and ad axial, cultured on MS medium supplemented with various concentrations of kinetin for one month. It was found that kinetin could not induce organogenesis from these leaves. However, when they were transferred onto MS plus various concentrations of BA, shoots development via organogenesis was found. Most of the shoots were developed from the leaf surface of the abbatial side without callus formation. It was shown that the leaves cultured on MS + 2 mg/l kinetin and then were transferred onto MS + 4 mg/l was the best combination for shoot initiation from leaf of *Plumbago indica* L. via organogenesis (Table 3 and Fig 4).

Root induction

The elongated shoots with 3-4 leaves were transferred onto full strength MS medium plus 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2 mg/l NAA and ½ MS hormone-free medium for root induction. When the shoots were cultured on MS plus all concentrations of NAA, few and short roots were induced in the company of callus formation at the basal of stem. In MS hormone-free medium, big and long with few hairy roots were produced. On the other hand, it was found that half-strength MS was able to promote root initiation, elongation with a lot of hairy root without callus formation (Fig 5). The efficiency of half-strength MS hormone-free on root induction was reported in many plant species i.e. *Rosa hybrida* (Skirvin and Chu, 1979), *Plumbago zealanica* (Rout *et al.*, 1999a), *Yucca aloifolia* (Atta-alla and van Staden, 1997).

CONCLUSIONS

Plumbago indica L. can be successfully propagated *in vitro* using apical and lateral bud on MS medium plus 3 mg/l BA and leaf explant on MS medium plus 2 mg/l kinetin and then on 4 mg/l BA. This opens the opportunity of using plant tissue culture for plant improvement of this plant species. Plant improvement of this plant species is not a routine because the plant is vegetative propagated and less genetic variation is expected. By using mutagents with callus or other suitable explants, genetic variation and desirable characters especially the plumbagin content can be improved.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge The National Research Council and Kasetsart University Research and Development Institute for the financial support. The special thanks would also be for the Center of Agriculture Biotechnology, Kasetsart University for funding through the graduate research fund.

Literature Cited

Atta-Alla, H. and van Staden, J. 1997. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48:209-212.

Budimir, S. and Vujicic, R. 1992. Benzyl adenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorika* (Pancic) Purk. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31:89-94.

Fracaro, F. and Echeverrigaray, S. 2001. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of South Brazil. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 64:1-4.

Kumar, K.S. and Bhavanandan, K.V. 1988. Micropropagation of *Plumbago rosea* Linn. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 15:257-278.

Komaraiah, P., Amrutha, R.M., Kavi Kishor, P.B. and Ramakrishna, S.V. 2001. Elicitor enhances production of plumbagin in cell suspension culture of *Plumbago rosea* L. Enz. Microb Technol. 31:634-639.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Rout, G.R., Saxena, C., Samantaray, S. and Das, P. 1999a. Rapid clonal propagation of *Plumbago zeylanica* Linn. Plant Growth Regulation 28:1-4.

Rout, G.R., Saxena, C., Samantaray, S. and Das, P. 1999b. Rapid plant regeneration from callus cultures of *Plumbago zeylanica*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56:47-51.

Skirvin, R.M. and Chu, M.C. 1979. *In vitro* propagation of 'Forever Yours' rose. Hort. Sci. 14:608-610.

Whiley, A.W. and Saranah, J.B. 1985. *In vitro* culture of ginger (*Zingiber officinale*). P. 191-192. C.W. Winks. Maroochy Horticultural Research Station Report no. 4 (1984-1985). Queenland, Australia.

Tables

Table 1 Effect of explant and BA concentration on callus production and shoot initiation of *Plumbago indica* L. cultured on MS basal medium.

Explant	BA concentration (mg/l)	Callus proliferation[1]	Average number of shoot	Average shoot length (cm)	Average leaf number/shoot
Apical bud	0	0.00	1.4[c2]	4.15[a]	5.85
	1.0	1.75	42.22[bc]	0.66[b]	3.75
	2.0	1.80	68.90[bc]	0.44[bc]	3.23
	3.0	1.87	89.50[b]	0.43[bc]	3.31
	4.0	2.00	73.67[bc]	0.35[c]	2.37
Lateral bud	0	0.00	1.10[c]	4.29[a]	6.05
	1.0	2.35	66.10[bc]	0.70[b]	3.79
	2.0	2.85	75.00[bc]	0.30[c]	3.68
	3.0	3.20	201.60[a]	0.20[c]	3.23
	4.0	3.33	179.60[a]	0.20[c]	2.94

[1] callus proliferation were scored as the following
0 = no callus production
1 = little callus production (the size is not bigger than 2 cm in diameter)
2 = moderate callus production (the size is between 2-3 cm in diameter)
3 = high callus production (the size is bigger than 3 cm in diameter)

[2] the same letter indicates not significant different by Duncan's New Multiple Range Test

Table 2 Growth and development of *Plumbago indica* L. shoots initiated on MS + 3 mg/l BA after transferring onto MS plus various concentrations of BA.

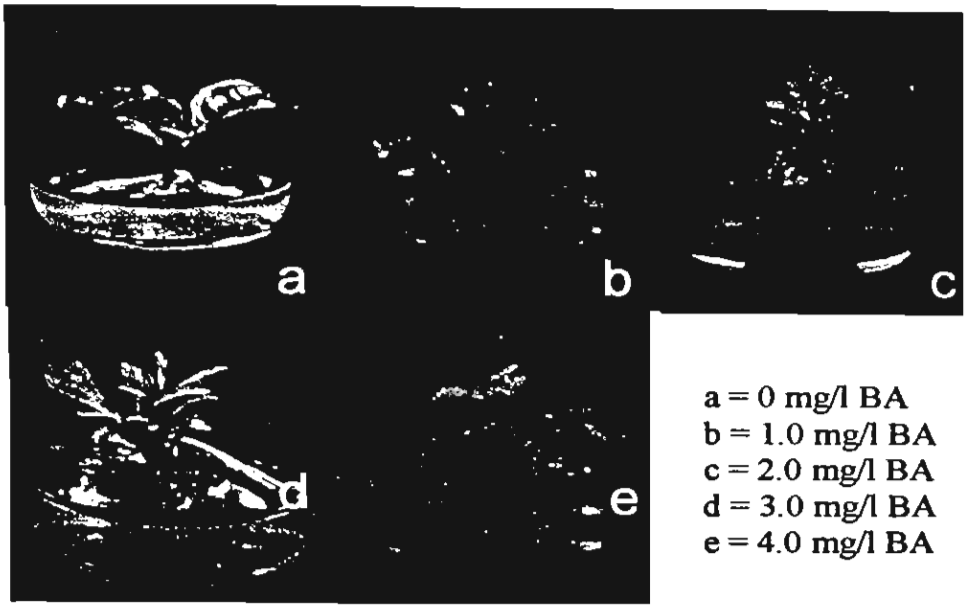
Concentration of BA (mg/l)	Number of elongated shoot	Length of shoot (cm)	Number of leaf
0	0[b]	0[b]	0[b]
1.0	23.8[a]	1.09[a]	3.99[a]
2.0	7.2[b]	1.03[a]	3.67[a]

The same letter indicates not significant different by Duncan's New Multiple Range Test

Table 3 Effect of kinetin and BA concentrations on organogenesis from leave of *Plumbago indica* L.

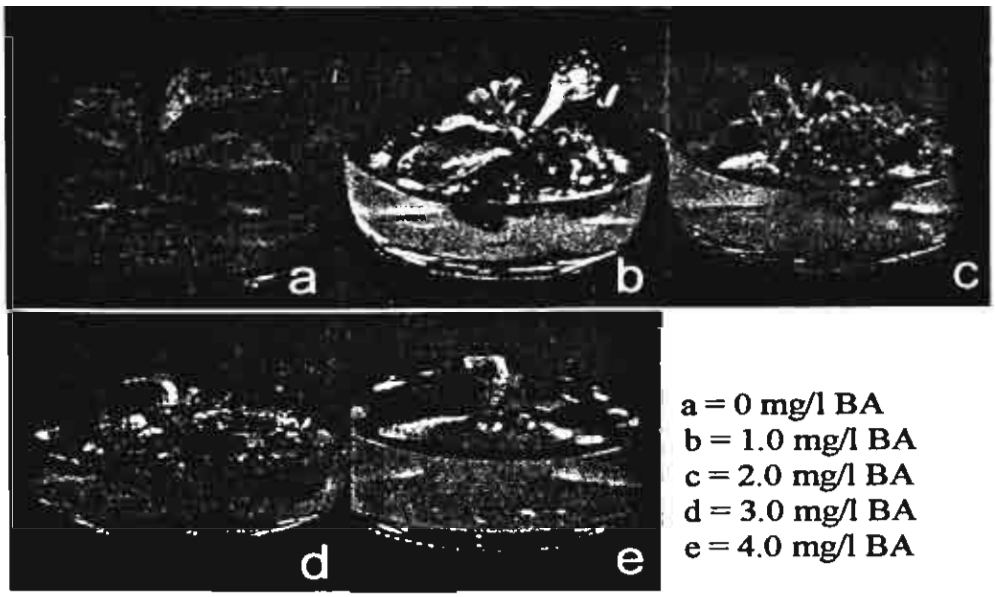
Concentration of Kinetin (mg/l)	Concentration of BA (mg/l)	Average no. of shoot
0	0	0
	1.0	0
	2.0	0
	3.0	1.2
	4.0	1.8
1.0	0	0
	1.0	0
	2.0	4.4
	3.0	5.8
	4.0	6.8
2.0	0	0
	1.0	10.4
	2.0	8.0
	3.0	12.2
	4.0	15.4
3.0	0	0
	1.0	1.6
	2.0	6.2
	3.0	6.4
	4.0	7.0
4.0	0	0
	1.0	1.0
	2.0	3.8
	3.0	3.0
	4.0	3.0

Figures



a = 0 mg/l BA
b = 1.0 mg/l BA
c = 2.0 mg/l BA
d = 3.0 mg/l BA
e = 4.0 mg/l BA

Fig 1 Shoot initiation from apical bud derived-calli on MS medium plus different concentrations of BA.



a = 0 mg/l BA
b = 1.0 mg/l BA
c = 2.0 mg/l BA
d = 3.0 mg/l BA
e = 4.0 mg/l BA

Fig 2 Shoot initiation from lateral bud derived-calli on MS medium plus different concentration of BA.

0 mg/l BA 1.0 mg/l BA 2.0 mg/l BA

Fig 3 Shoot development and elongation on MS medium supplemented with various concentrations of BA

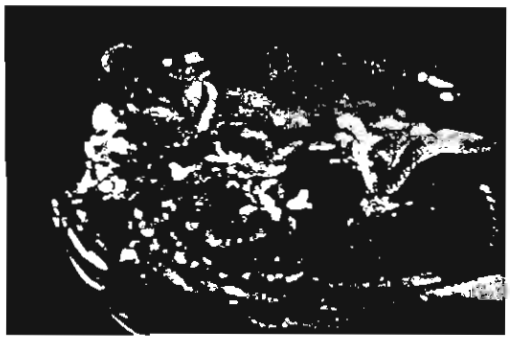


Fig 4 Organogenesis on the leaf surface of *Plumbago indica* L. cultured on MS + 2 mg/l kinetin for one month and then MS + 4 mg/l BA for one month.

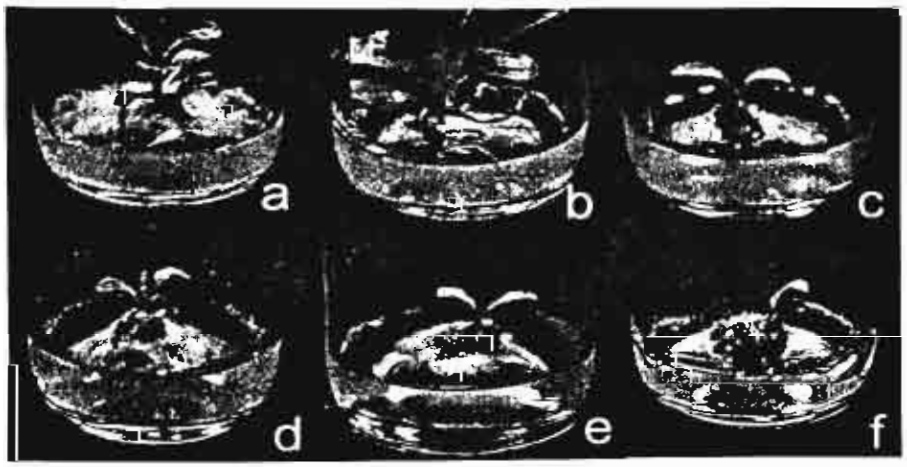


Fig 5 Root induction on ½ MS and MS supplemented with various concentrations of NAA. ½ MS (a), MS hormone-free (b), 0.5 mg/l NAA (c), 1.0 mg/l NAA (d), 1.5 mg/l NAA (e), 2.0 mg/l NAA (f).

The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP III)

From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable Use

3 – 7 February 2003

Chiang Mai, Thailand

Programme and Abstracts

Organized by

ICMAP ISHS IUBS CMU

ORAL

OP02-11

Callus Induction and Culture of *Plumbago indica* L. for Secondary Metabolite Production

P. Chantaratin, S. Chanprame and S. Chanprame

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Nakorn Pathom, 73140 Thailand. (agrsrc@ku.ac.th)

The role of callus and cell suspension in secondary metabolite production has been reported in many plant species. *Plumbago indica* L. is an important medicinal plant of Thailand which roots of this plant is the main source of plumbagin, a naphthoquinone derivative of commercial interest for pharmarcological properties. In order to establish friable callus of *P. indica* L., five different *in vitro* explants, node, internode, petiole, leaf blade and root were tested in modified MS medium supplemented with several types and concentration of auxins and cytokinins. All MS medium in concerted with various auxins and cytokinins yielded small amount of callus. On the other hand, among 22 media of MS salts + B5 vitamin tested, the best media for friable callus production from internode explant was MS + 0.2 mg/l NAA + 0.2 mg/l 2-4,D + 0.5 mg/l kinetin. However, this media is somehow induce root formation in leaf explant. The media containing 0.2 mg/l NAA + 0.4 mg/l 2-4,D + 0.1 or 0.2 mg/l kinetin were among the best media composition for friable callus induction. The MS media containing 0.2 mg/l NAA+ 0.4 mg/l 2-4,D + 0.1 mg/l kinetin was then selected for further tested with *in vitro* petiole, node and root explants. The results demonstrated that these explants could also be able to yield friable callus in the selected medium. All callus obtained from each medium and explants were then subjected to analysis for plumbagin accumulation.

Keywords: plumbagin, *in vitro*, plant growth regulator

Callus Induction and Culture of *Plumbago indica* L. for Secondary Metabolite Production

P. Chuntaratin[1], S. Chanprame[2] and S. Chanprame[3]
[1]Interdisciplininary Graduate Program in Agricultural Biotechnology, Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Khampaeng Saen, Nakhon Pathom 73410, Thailand.
[2]Department of Agronomy, Kasetsart University, Khampaeng Saen, Nakhon Pathom 73410, Thailand.
[3]Department of Horticulture, Kasetsart University, Khampaeng Saen, Nakhon Pathom 73410, Thailand.

Keywords: plumbagin, *in vitro*, plant growth regulator

Abstract

The role of callus and cell suspension in secondary metabolite production has been reported in many plant species. *Plumbago indica* L. is an important medicinal plant of Thailand which roots of this plant is the main source of plumbagin, a naphthoquinone derivative of commercial interest for pharmacological properties. In order to establish friable callus of *Plumbago indica* L., five different *in vitro* explants, node, internode, petiole, leaf blade and root were tested in modified MS medium supplemented with several types and concentrations of auxins and cytokinins. All MS medium in concerted with various auxins and cytokinins yielded small amount of callus. On the other hand, among 22 media of MS salts + B5 vitamins tested, the best plant growth regulator combinations for friable callus production from internode explants was 0.2 mg/l NAA+0.2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l kinetin. However, this media is, some how, induce root formation in leaf explants. The media containing 0.2 mg/l NAA+0.4 mg/l 2,4-D+0.1or 0.2 mg/l kinetin were among the best media composition for friable callus induction, while the media containing BA higher than 0.2 mg/l yielded compact callus. The media containing 0.2 mg/l NAA +0.4 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l kinetin was then tested with petiole, node and root explants and revealed the successful of friable callus induction. For plumbagin analysis, the results demonstrated that high concentration of 2,4-D may limit the plumbagin production. Comparison of BA and kinetin added to media, even though kinetin yield more friable callus than those of BA containing media but the callus accumulated lower level of plumbagin.

INTRODUCTION

Medicinal plants are gaining great interest in pharmaceutical industries for the production of high value secondary compounds (Das and Rout, 2002; Rout *et al.*, 2000). *Plumbago indica* L. is a shrub belonging to the family Plumbaginaceae, whose roots are the main source of plumbagin which is a naphthoquinone derivative of commercial interest for the pharmacological properties such as anticancer, antimicrobial, antifertility and insecticide (Komaraiah *et al.*, 2002). Plumbagin is also found in some species of Droseraceae (Finnie and Stadent, 1993 ; Hook, 2001) and Ebenaceae (Evans *et al.*,1999), aswell.

A major limitation to the therapeutic use of plumbagin is of insufficient supply from natural source and the need for several years to produce quality roots. Thus, many

studies have focused on the production of plumbagin using *in vitro* culture techniques that offer an alternative method for the production of such pharmaceutically important compounds (Nahálka *et al.*1996). Several researchers (Rout *et al.*, 1999; Komaraiah *et al.*, 2001) have reported the production of plumbagin from callus and cell suspension cultures of *Plumbago* species. However, there are still problems in the production of secondary metabolites by cell culture including the instability of cell lines, low yields, slow growth and low level of plumbagin production (Ramachandra Roa and Ravishankar, 2002). Many strategies have been adopted for increasing the accumulation of secondary metabolite in the cultures such as supplementing nutrient media with various plant growth regulators, biosynthesis inducers and culturing differentiated organ cultures, including transformed materials using bacteria; i.e. *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens* (Yeoman and Yeoman, 1996). This work was undertaken to determine the suitable media for inducing *P. indica* callus and *in vitro* production of plumbagin.

MATERIALS AND METHODS

Callus induction and cultures

In vitro cultured leave and internode explants of *P. indica* were placed on MS media supplemented with 0.2 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA), 0.2 mg/l 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3 % sucrose and 0.7 % w/v agar for callus induction (Choosakul, 2000). Cultures were maintained at 25 $\pm$ 2^{0}C under a light intensity of 28 μ mol/m^2/s with 16/8 h light/dark cycle. Callus was then subcultured on to modified MS medium supplemented with several types and concentrations of auxins and cytokinins. The MS salts + B5 vitamins supplemented with two concentrations of 2,4-D (0.1 and 0.4 mg/l), two types of cytokinins (BA or kinetin) each at six concentrations (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5mg/l), and a constant amount of NAA (0.2 mg/l) were also tested. The cultures were grown for four weeks under the culture conditions stated above. Fresh weight (FW) and dry weight (DW) of callus were recorded. Each experiment was replicated five times and the callus from all five replicates of the above treatment combinations were subjected to lyophilization for 96 h at –50 ^{0} C. for plumbagin extraction and analysis. The suitable media were then selected and tested with 3 different explants, petiole, node and root.

Plumbagin extraction and analysis

Sample preparation

Freeze-dried callus tissues of *P. indica* were ground to powder using mortal and pestle. Two hundred milligrams of powder from each treatment was extracted using 8 ml methanol in 50 ml Erlenmeyer flask placed on an orbital shaker at 100 rpm for six hours. The crude extracts were then filtered (Whatman no. 1) and evaporate at 60 ^{0} C until dry. Each sample was redisolved with 100 µl petroleum ether and analyzed by HPLC (Choosakul, 2000).

HPLC analysis

Plumbagin content in samples was determined by HPLC using a Zorbax SB C18 column (4.6x250 mm, 5 µm particle diameter) with the detection at 270 nm. The mobile phase was 60 % methanol: 0.4 % acetic acid (60:40 v/v). The flow rate used was 1.0 ml min^{-1} at 25 ^{0} C. Each injection volume was 10 µl. Quantitative analysis of each sample

were compared with the peak area with standard plumbagin from the Sigma Chemical Company, USA.

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro leaf explants incubated on MS medium without growth regulators, or with only NAA or BA did not produce callus. Roots were formed in medium supplemented with NAA after 2 weeks. Callus induction was observed in leave explant cultured in MS medium supplemented with 2,4-D alone, or with combinations of BA and NAA. However, explants gave small amounts of compact and slow growing callus. Then for the subsequent experiments, callus was initiated from leave and internodes explants using MS salts + B5 vitamins supplemented with various concentrations of BA (0-0.5 mg/l) or kinetin (0-0.5 mg/l) in combination with 2,4-D (0.2-0.4 mg/l) and a constant amount of NAA (0.2 mg/l). The leaf explants enlarged and callus developed on the cut surface after 7-10 days of culture. The internode explants developed friable callus, which covered the entire surface of the explant within 4 weeks. The callus was green at the beginning and turn dark gray after 3-4 weeks. Similar to this reported, previous reported in callus cultures of *Drosophyllum lusitanicum* (Budzianowski *et. al*, 2002) and *P. rosea* (Satheesh Kumar and Bhavanandan, 1988). Callus was established on several media could be divided into two types: compact and friable callus. The friable callus from leaves were obtained form on MS salts + B5 vitamins supplemented with 0.2 mg/l NAA and all various concentrations of kinetin in combination with 2,4-D; or supplemented with 0.2 mg/l NAA+0.2 or 0.4 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l BA. The highest callus fresh and dry weight from leaf developed on MS salts + B5 vitamins supplemented with 0.2 mg/l NAA+0.4 mg/l 2, 4-D+0.2 mg/l BA or 0.2 mg/l kinetin. However, the media containing 0.2mg/l NAA+0.4 mg/l 2,4-D+0.2mg/l BA gave the compact callus. The media containing 0.2 mg/l NAA+0.4 mg/l 2,4-D+0.1 or 0.2 mg/l kinetin were suitable for friable callus induction and they can also be used for callus induction from another types of explants, such as petiole, node and root which yield friable callus with the average FW/DW (g) of 0.286/0.03, 0.273/0.05 and 0.276/0.03 respectively. MS salts + B5 vitamins supplemented with 0.2 mg/l NAA + 0.2 or 0.4 mg/l 2, 4-D+0.5 mg/l kinetin gave the high callus fresh and dry weight from internode explants, and the best medium for friable callus inducing from internode explants was MS salts + B5 vitamins supplemented with NAA (0.2 mg/l) +2,4-D (0.2 mg/l) + kinetin (0.5 mg/l). Some how, this media induced root formation and gave compact callus in leaf explants, which is not suitable for cell suspension culture. (Table 1 and Figure 1,2)

Plumbagin production from the 4-week-old callus cultured on 22 different nutrient media was analyzed using HPLC. The chromatogram of standard plumbagin revealed the retention time of approximately 13:49 min. The calibration curve of standard plumbagin showed linearity of the relationship from 0.001-10 mg/l and the correlation coefficient was 0.99993 (Figure 3,4). The result indicated that the accumulation of plumbagin in *P. indica* L. callus might be effectively modified with auxin and cytokinin supplemented into culture media. In this experiment, increasing of 2,4-D concentration from 0.2 to 0.4 mg/l was observed to decrease the production of plumbagin from both leaf and internode callus. The plant growth regulators concentration were reported to be crucial factor in secondary metabolites production. The type and concentration of auxin, cytokinin or auxin/cytokinin ratio alter dramatically both the growth and compound produce in plant cell culture. 2,4-D has been shown to inhibit the production of secondary metabolites in a large number of plants such as elimination of 2,4-D or replacement of 2,4-D by NAA or indole acetic acid (IAA) has been shown to enhance the production of anthocyanins in

callus cultures of *Populus sp.* and *Daucus carota* (Rajendran *et al.* 1992). The plumbagin content of calli obtained from both leaf and internode explants showed highly significant variation due to the two levels of 2,4-D and the six levels of kinetin or BA supplemented (Table 1). However, the high plumbagin contents tend to be obtained from 0.2 mg/l 2,4-D and 0.4-0.5 mg /l BA which were compact callus. In the case of using kinetin in replacement of BA, the results illustrated the inconsistency of plumbagin production but callus were more friable than the media containing BA (Figure1, 2).

CONCLUSIONS

The friable callus yielded from the media containing kinetin at the concentration of 0.1-0.2 mg/l, while the higher concentration tested, the callus tended to be compact. The concentration of BA higher than 0.1 mg/l also yielded compact callus. However, the analysis of plumbagin production demonstrated that compact callus contained higher plumbagin content than those of friable callus. The callus obtained from media contained 0.2 mg/l 2,4-D also tended to yield higher plumbagin content than the one cultured in higher concentration of 2,4-D.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge The National Research Council and Kasetsart University Research and Development Institute for the financial support. The special thanks would also be for the Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University for funding through the graduate research fund.

Literature Cited

Budzianowski, J., Budzianowska, A. and Kromer, K. 2002. Naphthalene glucoside and other phenolics from the shoot and callus cultures of *Drosophyllum lusitanicum*. Phytochem. 61:421-425.

Choosakul, O. 2000. Plumbagin production in cell suspension cultures of *Plumbago zeylanica* L. M.S. Thesis. Chulalongkorn University, Thailand. P.1-73.

Das, G. and Rout, G.R. 2002. Direct plant regeneration from leaf explants of *Plumbago* species. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 68:311-314.

Evans, P.H., Bowers,W.S., Litaudon, M. and Sevenet, T.1999. Plumbagin from *Diospyros olen*. Molecules: 4, M93.

Finnie, J.F. and Stadent, J. 1993. *Drocera* spp. (Sundew): Micropropagation and the in vitro production of plumbagin. pp.164-177. *In* Bajaj, Y.P.S.(Ed.), Biotechnology in agriculture and forestry, Medical and Aromatic Plants V.Springer, Berlin.

Hook, I.L.I. 2001. Naphthoquinone contents of *in vitro* cultured plants and cell suspensions of *Dionaea muscipula* and *Drosera* species. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 67:281-285.

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

Komaraiah, P., Naga Amrutha, R., Kavi Kishor, P.B. and Ramakrishna, S.V. 2002. Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L. Enzyme Microb. Technol. 31:634-639.

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

Nahálka, J., Blanárik, P. Gemeiner, P., Matúšová E. and Partlová, I. 1996. Production of plumbagin by cell suspension cultures of *Drosophyllum lusitanicum* Link. J.of

Biotechnol. 49:153-161.

Rajendran, L. Ravishankar, G.A.,Venkataraman, L.V.and Prathiba, K.R. 1992. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. as influenced by nutrient stress and osmoticum. Biotechnol. Lett. 14:707-714 cited by Ramachandra Rao, S. and Ravishankar,G.A. 2002.Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Adv. 20:101-153.

Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Adv. 20:101-153.

Rout, G.R., Samantaray, S. and Das, P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology. Adv. 18:91-120.

Rout, G.R., Saxena, C., Samantaray, S. and Das, P. 1999. Rapid plant regeneration from callus cultures of *Plumbago zeylanica*. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 56:47-51.

Satheesh Kumar, K. and Bhavanandan, K.V. 1988. Micropropagation of *Plumbago rosea* Linn. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 15:275-278.

Yeoman, M.M. and Yeoman, C.L. 1996. Manipulating secondary metabolism in culture plant cells. New Phytol. 134:553-596.

Tables

Table 1. Effect of different concentration of BA, kinetin and 2,4-D (mg/l) on callus fresh and dry weight and plumbagin production of *P. indica* cultured in MS salts + B5 vitamins

NAA	2,4-D	BA	kinetin	callus fresh weight (g)		callus dry weight (g)		plumbagin content (μg/gDW)	
				Leaf	Internode	Leaf	Internode	Leaf	Internode
0.2	0.2	0.0	-	0.834±0.296	0.195±0.068	0.069	0.012±0.004	21.01	0.09
		0.1	-	1.389±0.401	0.631±0.148	0.114	0.047±0.013	37.23	0.15
		0.2	-	0.890±0.399	0.577±0.107	0.092	0.048±0.018	23.44	0.24
		0.3	-	0.596±0.155	0.558±0.164	0.066	0.051±0.018	35.28	0.21
		0.4	-	0.407±0.114	0.519±0.072	0.045	0.048±0.004	ND	0.99
		0.5	-	0.531±0.297	0.599±0.134	0.060	0.062±0.017	ND	1.09
0.2	0.4	0.0	-	1.345±0.328	0.185±0.075	0.099	0.011±0.007	2.91	0.17
		0.1	-	1.497±0.296	0.561±0.059	0.111	0.042±0.003	10.44	0.09
		0.2	-	1.621±0.429	0.607±0.179	0.128	0.050±0.014	23.49	0.54
		0.3	-	1.119±0.459	0.561±0.132	0.093	0.045±0.014	20.28	0.52
		0.4	-	0.804±0.433	0.683±0.104	0.085	0.059±0.008	22.46	0.47
		0.5	-	0.835±0.096	0.459±0.061	0.057	0.043±0.006	42.03	0.42
0.2	0.2	-	0.0	0.834±0.296	0.195±0.068	0.069	0.012±0.004	21.01	0.09
		-	0.1	0.974±0.349	0.345±0.065	0.085	0.019±0.004	2.31	0.31
		-	0.2	1.081±0.301	0.506±0.076	0.093	0.034±0.008	20.29	0.44
		-	0.3	0.843±0.444	0.462±0.047	0.092	0.029±0.008	6.68	0.21
		-	0.4	1.118±0.488	0.565±0.148	0.089	0.039±0.013	20.57	0.63
		-	0.5	0.956±0.206	0.689±0.096	0.089	0.055±0.013	35.83	0.00
0.2	0.4	-	0.0	1.345±0.328	0.185±0.075	0.099	0.011±0.007	2.91	0.18
		-	0.1	1.354±0.386	0.429±0.126	0.098	0.029±0.013	8.77	0.59
		-	0.2	1.435±0.384	0.471±0.049	0.106	0.034±0.009	5.42	0.00
		-	0.3	0.948±0.358	0.486±0.035	0.072	0.036±0.005	27.96	0.00
		-	0.4	1.336±0.318	0.375±0.057	0.095	0.025±0.007	5.94	0.43
		-	0.5	1.252±0.506	0.708±0.187	ND	0.056±0.010	ND	0.59

Figures

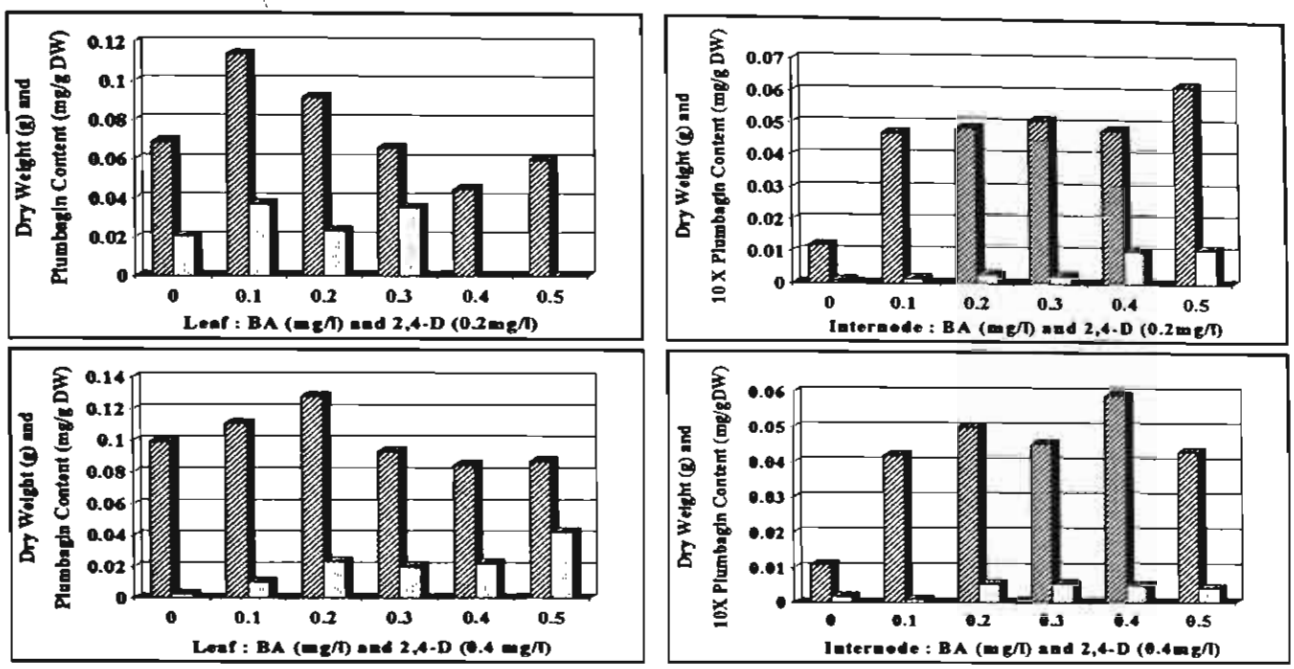


Fig. 1. Effects of BA and 2,4-D on growth of leaf and internode derived callus and plumbagin content of the 4-week-old *P. indica callus*

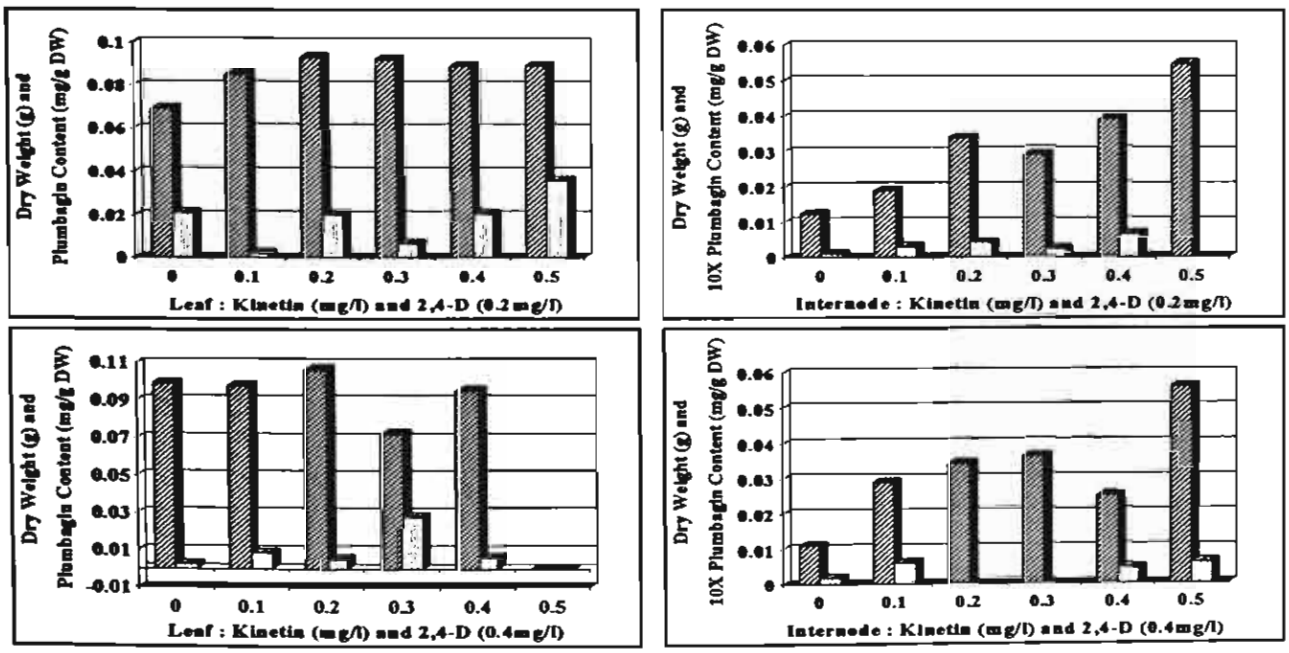


Fig. 2. Effects of kinetin and 2,4-D on growth of leaf and internode derived callus and plumbagin content of the 4-week-old *P. indica callus*

Note: For the internode derived callus, 10 x plumbagin contents were plotted for clearly visible graphs.

Dry Weight plumbagin content

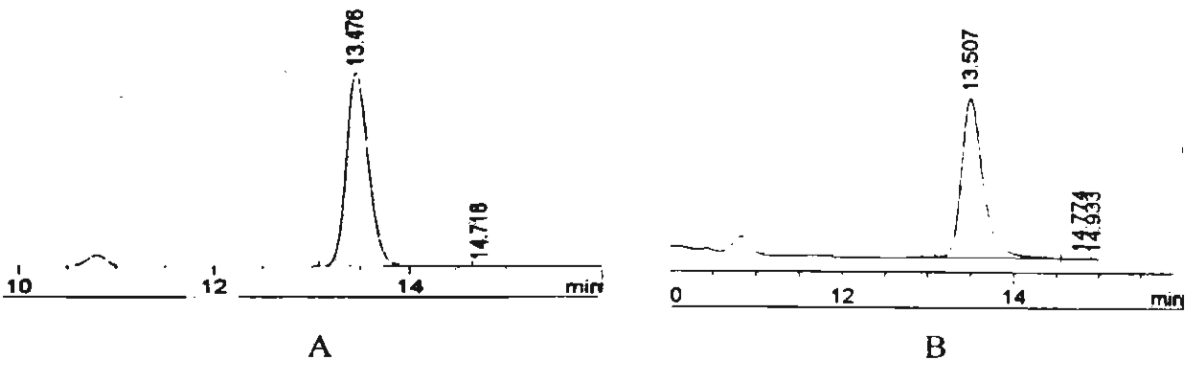


Fig. 3. HPLC chromatogram of standard plumbagin (A, RT=13.476) and plumbagin from callus extract(B, RT=13.507)

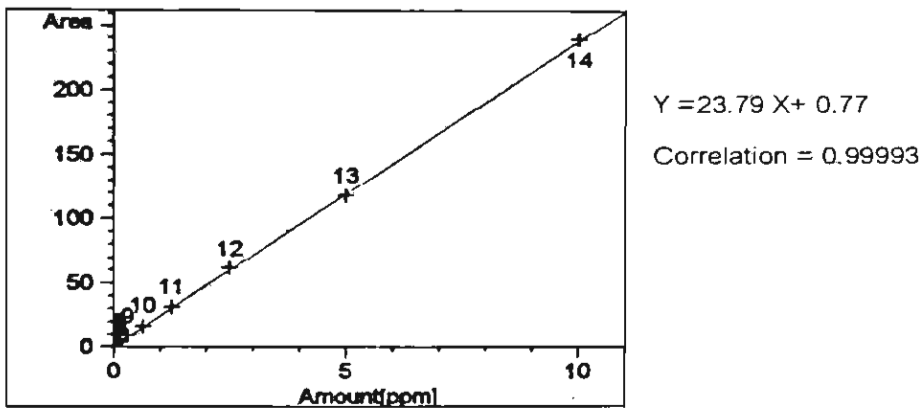


Fig 4. Calibration curve of standard plumbagin by HPLC