อภินันทนาการ

สำนักงานสนุน

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
ผลของการเหนี่ยวนำการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระและสารเรสเวอราทรอล ในรากลอยของถั่วลิสงต่อการป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจาก สารกำจัดวัชพืชพาราควอต

โดย ผศ.ดร. อภินันท์ ลิ้มมงคล

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 06 ส.ค. 2564
เลขทะเบียน 1034124
เลขเรียกหนังสือ อ TP 159 .A5 อ257ร 2562

เมษายน พ.ศ. 2562

สัญญาเลขที่ R2561B028

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
ผลของการเหนี่ยวนำการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระและสารเรสเวอราทรอล ในรากลอยของถั่วลิสงต่อการป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจาก สารกำจัดวัชพืชพาราควอต

ผู้วิจัย
ผศ.ดร. อภินันท์ ลิ้มมงคล
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
ประจำปีงบประมาณ 2561

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 ที่ให้การสนับสนุนทุนในการดำเนินโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ และห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกทั้งอุปกรณ์การวิจัยรวมทั้งห้องปฏิบัติการในการทำงานวิจัย นิสิตระดับปริญญาตรีและบัณฑิตศึกษาทุกคน ที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้ และทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้เป็นอย่างดี

ผศ.ดร. อภินันท์ ลิ้มมงคล
วันที่ 1 เมษายน 2562

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ไทย)	5
Abstract	6
Executive Summary	7
บทนำ	8
เนื้อหาการวิจัย	13
การดำเนินการวิจัย	14
ผลการดำเนินการวิจัย	18
สรุปผลการวิจัย	30
เอกสารอ้างอิง	32
Outout ที่ได้จากการวิจัย	34

มหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการ: ผลของการเหนี่ยวนำการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระและสารเรสเวอราทรอลในรากลอยของถั่วลิสงต่อการป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจากสารกำจัดวัชพืชพาราควอต

บทคัดย่อ

พืชมีกลไกที่หลากหลายในการป้องกันตนเองจากภาวะคุกคามที่เกิดจากกระบวนการเครียดออกซิเดชัน งานวิจัยนี้ได้นำเสนอแผนภาพกลไกการป้องกันตนเองของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นแตกต่างกัน ได้แก่ พาราควอต เมทิลจัสโมเนต และ ไซโคลเดรกซ์ทริน กระบวนการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกันส่งผลให้เกิดการกระตุ้นภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์พืช ทำให้พืชมีกลไกการตอบสนองการกระตุ้นที่แตกต่างกันเพื่อจะสามารถอยู่รอดจากภาวะคุกคามออกซิเดชันที่เกิดขึ้นได้ จากผลการศึกษา พบว่ากลไกการกระตุ้นรากลอยด้วยพาราควอตก่อนเติมตัวกระตุ้นร่วมเมทิลจัสโมเนตและไซโคลเดรกซ์ทริน สามารถกระตุ้นกระบวนการป้องกันตัวเองด้วยกลไกการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด รากลอยมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างสารกลุ่มสตีลบีน ซึ่งสอดคล้องการผลการเพิ่มระดับของสารกลุ่มสตีลบีน การเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่ระบบเอนไซม์ และการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของยีนที่แสดงออกให้โปรตีนป้องกันตนเอง (PR) ในพืช งานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า การกระตุ้นร่วมของสารเมทิลจัสโมเนตและไซโคลเดรกซ์ทรินร่วมกับพาราควอต ส่งผลกระตุ้นให้พืชสร้างกลไกต่างๆ เพื่อใช้ในกระบวนการป้องกันตนเองของพืช โดยกลไกดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ที่ทำลายพิษอนุมูลอิสระ ทำให้พืชสามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ยังส่งเสริมให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตนเองในพืชด้วย

Title: **Protective effect of induced antioxidant compound and resveratrol in peanut hairy root culture against paraquat-induced oxidative stress**

ABSTRACT

Plant cells have a variety of defense mechanisms to alleviate the deleterious effects of oxidative stress. The present work elucidated a schematic diagram of the proposed pathway of peanut hairy root tissue treated with different elicitors; paraquat (PQ), methyl jasmonate (MeJA), and cyclodextrin (CD). The different elicitation approaches could provoke intrinsic stress in plant cells and might activate a distinct response pathway, allowing plants to overcome the deleterious effects of oxidative stress. Among all strategies, hairy root culture pretreated with PQ followed by application of MeJA plus CD showed an extensive induction of antioxidant defense mechanisms. The expression of the antioxidant enzyme genes and stilbene-synthesized enzyme genes were up-regulated in accordance with the dramatic increase in the production of stilbene compounds. The non-enzymatic antioxidant substances exhibited a highly enhanced capability. The pathogenesis-related protein (PR) genes were also highly up-regulated. In summary, we demonstrated that the interplay among MeJA plus CD and PQ may activate a complex signaling network to regulate plant defense mechanisms involving the up-regulation of detoxifying enzymes, induction of free-radical scavengers and overexpression of genes associated with plant defense pathways.

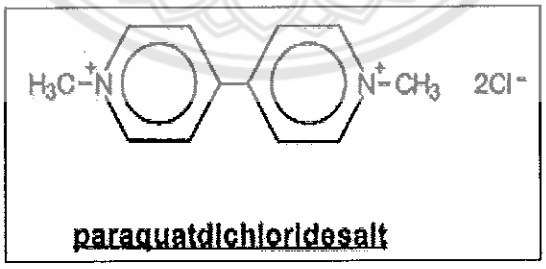
Executive Summary

สารเคมีกำจัดวัชพืชเป็นหนึ่งในปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลทำให้เกิดสภาวะเครียดในพืช โดยในปัจจุบันเกษตรกรในประเทศไทยมีแนวโน้มในการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชเพิ่มจำนวนมากขึ้น เนื่องจากภาคเกษตรกรรมมีแรงงานลดลง จึงจำเป็นต้องนำสารเคมีเข้ามาทดแทนมากขึ้น และผู้ผลิตมีการพัฒนาสารเคมีเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดวัชพืชที่เฉพาะเจาะจงตามวัตถุประสงค์ของผู้ใช้ออกมาจำหน่ายในท้องตลาดเพิ่มมากขึ้น หนึ่งในสารเคมีที่เกษตรกรนิยมใช้ คือ พาราควอต (PQ) เป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชในกลุ่ม dipyridil สาร PQ เป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชที่มีฤทธิ์กว้าง ทำให้มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน สาร PQ จะอยู่ในรูปประจุสองบวก ซึ่งสามารถเคลื่อนผ่านตัวขนส่งเข้าไปในเซลล์พืช กลไกการออกฤทธิ์ของPQ เกิดขึ้นโดยการเข้าไปขัดขวางการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนในพืช ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้น สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ออร์กาเนลของพืชถูกทำลายและเกิดการตายของเซลล์พืชในที่สุด เนื่องจากสาร PQ เหนี่ยวนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระขึ้นในพืช ดังนั้นการที่พืชจะสามารถป้องกันตัวเองให้อยู่รอดได้เมื่อพืชได้รับภาวะเครียดจากการกระตุ้นด้วยสารเคมี PQ คือ การมีระบบสารต้านอนุมูลอิสระ ขึ้นมาป้องกันตัวเอง โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระหลากหลายรูปแบบ ได้แก่ การใช้ระบบเอนไซม์ที่ช่วยทำลายสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ นอกจากนี้การที่พืชได้รับหรือสามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์พืชได้ ก็จะช่วยทำให้พืชสามารถต้านทานต่อภาวะเครียดต่างๆ ได้ดี กลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ที่สำคัญตัวหนึ่ง คือ สาร resveratrol เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองให้ปลอดภัยจากสถานการณ์ที่เป็นอันตรายต่อพืช การศึกษากระบวนการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืช สามารถนำเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารที่สนใจ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประโยชน์ในการนำมาผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากสามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างรวดเร็วและสามารถควบคุมการผลิตสารที่ต้องการในสภาวะควบคุมในห้องทดลอง

จากผลการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ และการเปรียบเทียบกับปริมาณสาร resveratrol อนุพันธ์ของ resveratrol รวมทั้งการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า รากลอยเพาะเลี้ยงที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ จะมีกลไกในการตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชั่น และป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมที่มากระตุ้น เช่น pathogens แสง หรืออนุมูลอิสระ ที่แตกต่างกัน โดยพืชอาจใช้ระบบกลไกการป้องกันตัวเองที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาที่ได้รับการกระตุ้น โดยระบบกลไกการป้องกันตัวเอง ได้แก่ การสร้างสารทุติยภูมิเพื่อต้านอนุมูลอิสระ การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองของพืชต่อสิ่งเร้า เพื่อให้ตนเองนั้นอยู่รอดจากสภาวะต่าง ๆ ที่ได้รับอย่างเหมาะสม ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการเลือกใช้ชนิดของตัวกระตุ้นในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชต่อไป และพัฒนาไปใช้ในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมต่อไป

บทนำ

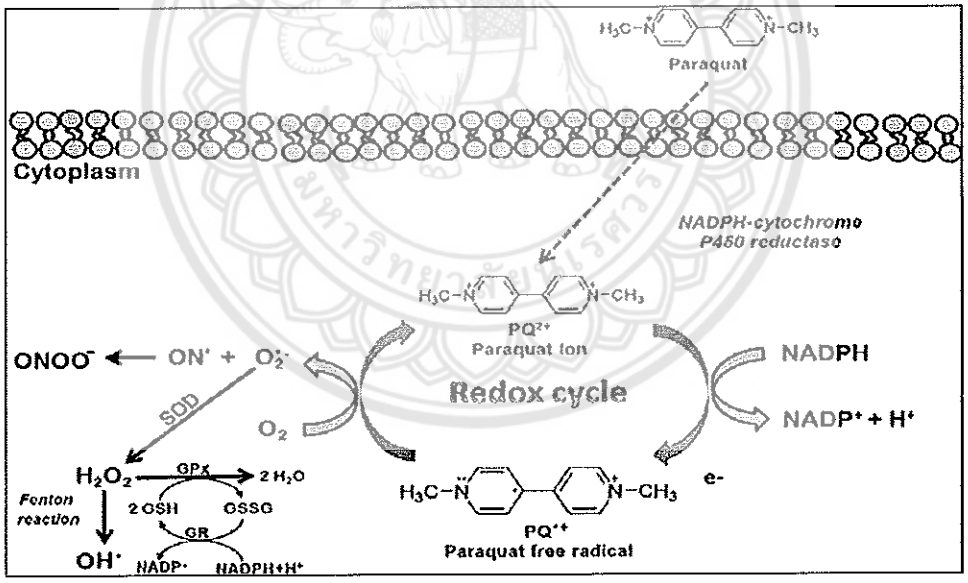
ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกผลิตผลทางการเกษตรที่สำคัญของโลก โดยปัจจุบันเกษตรกรได้มีการนำสารเคมีทางการเกษตรมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อให้ได้ผลิตผลทางการเกษตรที่ปลอดจากศัตรูพืชและเพิ่มปริมาณของสินค้าส่งออกทางการเกษตร พาราควอต (paraquat) เป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชประเภทไม่เลือกทำลาย (non-selective herbicides) เริ่มถูกนำมาใช้ตั้งแต่ ค.ศ.1962 ในประเทศอังกฤษ โดยพาราควอตจะผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชทางการสัมผัสและสามารถซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้อย่างรวดเร็ว ออกฤทธิ์เร็ว เกษตรกรมักใช้พาราควอตในการควบคุมวัชพืชก่อนหรือหลังการปลูกพืช เพื่อลดการแข่งขันในด้านแสงสว่าง การใช้น้ำ และธาตุอาหาร โดยพาราควอตมีผลทำให้ส่วนของพืชที่สัมผัสกับสารพาราควอตแสดงอาการเหลืองซีดและแห้งตาย โครงสร้างพาราควอตมีทั้งในรูปที่เป็นประจุบวกสอง มีชื่อทางเคมีว่า 1,1'-dimethyl-4,4'- bipyridinium ($C_{12}H_{14}N_2$ น้ำหนักโมเลกุล 186.3) และในรูปที่รวมกับคลอไรด์ มีชื่อทางเคมีว่า 1,1-dimethyl-4, 4'-- bipyridinium dicholoride ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$ น้ำหนักโมเลกุล 257.2) (รูปที่ 1) คุณสมบัติทางกายภาพของพาราควอต เป็นสารที่ไม่ระเหย มีค่าความดันไอ 1×104 Pa มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีมาก และละลายในอะซิโตนได้เล็กน้อย พาราควอตมีคุณสมบัติในการกัดกร่อนโลหะและมีความเสถียรในสารละลายกรดหรือสารละลายที่เป็นกลาง พาราควอตสามารถถูกสลายตัวได้โดยแสง UV (Sorolla et al., 2012) และจุลินทรีย์ในดิน (Ismail et al., 2011) สำหรับความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ (Yang and Tiffany-Castiglioni, 2005) (Houzé et al., 1990) พาราควอตจะมีผลต่ออวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกายที่สัมผัส เช่น ตา จมูก ปาก ผิวหนัง ปอด หัวใจ ไต สมอง และอวัยวะอื่น ๆ ภายหลังจากได้รับพิษจากพาราควอต 24 ชั่วโมง อาจจะส่งผลให้ไตวายและระบบทางเดินหายใจล้มเหลว การเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อปอดจะทำให้เกิดพิษเฉียบพลันและสาเหตุของการตายได้ (R.J. et al., 2008) กลไกการออกฤทธิ์ของพาราควอตเกิดขึ้นโดยการเข้าไปขัดขวางการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนในสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้น (Bus and Gibson, 1984)



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของพาราควอต

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสารที่มีโมเลกุลหรืออะตอมซึ่งมีอิเล็กตรอนอยู่เพียง 1 ตัวในวงโคจรรอบนอกสุด โดยปกติแล้วโครงสร้างโมเลกุลทั่วไปจะมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ อนุมูลอิสระที่พบบ่อย ได้แก่ hydroxyl free radical ($OH^{\cdot}$), superoxide radical ($O^{2-\cdot}$) การมีอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่มีผลทำให้โมเลกุลไม่

เสถียร และมีปฏิกิริยาว่องไวมาก สามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับโมเลกุลอื่นได้ง่าย เพื่อดึงเอาอิเล็กตรอนหนึ่งตัวจากโมเลกุลหรือสารเหล่านั้นมาเข้าคู่กับอิเลคตรอนเดิม ทำให้สารมีความคงตัวและเสถียรมากขึ้น อนุมูลอิสระสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลได้ทุกประเภท ได้แก่ ลิพิด โปรตีน เอนไซม์ ดีเอ็นเอ มีผลทำให้เซลล์เมมเบรนและเนื้อเยื่อต่างๆ ถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Davies, 1995) สารอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้จากการสลายตัวของโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นโดยพลังงานภายนอก เช่น รังสีต่างๆ ความร้อนจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ หรือจากสารเคมีบางชนิดที่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์แล้วมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นอนุพันธุ์ที่มีฤทธิ์ว่องไวขึ้น ได้แก่ nitrosamines, aflatoxines, quinones, polycyclic hydrocarbon, paraquat กลไกการออกฤทธิ์ของพาราควอตเกิดขึ้นโดยการเข้าไปขัดขวางการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนในพืช ทั้งนี้สารพาราควอตมีค่าศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ (redox potential) เท่ากับ -446 mV ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระในระบบได้ โดยพาราควอตสามารถรับอิเลคตรอนจากโมเลกุลอื่นและเปลี่ยนจากรูปจากประจุสองบวกเป็นอนุมูลอิสระประจุหนึ่งบวกได้ และพาราควอตในรูปอนุมูลอิสระประจุหนึ่งบวกสามารถส่งถ่ายอิเลคตรอนต่อไปให้กับโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้เกิดอนุมูล superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) ขึ้น (รูปที่ 2) สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ออร์กาเนลของพืชถูกทำลายและเกิดการตายของเซลล์พืชในที่สุด (Babbs et al., 1989)

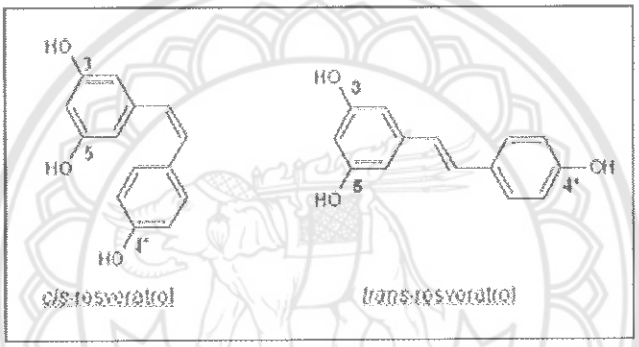


รูปที่ 2 กลไกการกระตุ้นและกำจัดสารอนุมูลอิสระโดยสารเคมีพาราควอต
(Free Radic Res. 2014; 48(6): 623-40 doi: 10.3109/10715762.2014.899694)

สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ เพื่อป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ในภาวะปกติสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์

จะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระ โดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล ระบบการต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน $O_2^{\cdot-}$ เป็น H_2O_2 ส่วนเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ทำหน้าที่เปลี่ยนโมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ (รูปที่ 2) (Choi et al., 2004) จากรายงานการวิจัยของ Popova และคณะ (Popova et al., 2003) พบว่าเมื่อให้สาร methyl jasmonate (MeJA) กับต้นกล้าข้าวบาร์เลย์ก่อนฉีดสารพาราควอต จะสามารถช่วยลดการทำลายของพาราควอตต่อต้นกล้าข้าวบาร์เลย์ได้ โดย MeJA จะช่วยป้องกันกระบวนการกระตุ้นภาวะเครียดออกซิเดชันในพืชจากพาราควอตได้ การศึกษาของ Sun และคณะ (Sun et al., 2013) พบว่า MeJA มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดทางกายภาพของพืช โดย MeJA จะช่วยลดการเกิดสารอนุมูลอิสระผ่านกระบวนการเพิ่มการแสดงออกยีนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ SOD, POD, PPO, CAT และมีผลทำให้ต้นกล้วยสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* ได้ นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ที่ไม่ใช่ระบบเอนไซม์ (Niki, 2010) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน เช่น การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) การเสริมฤทธิ์ (synergism) การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) และการจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) สารส่วนใหญ่มีโครงสร้างอยู่ในกลุ่มของโพลีฟีนอล (Rice-Evans et al., 1997) ซึ่งเป็นสารที่สังเคราะห์โดยพืช (phytochemical) ประกอบด้วย bioflavonoids ได้แก่ anthocyanins, flavonoids, isoflavonoids, stilbenes ทั้งนี้สารกลุ่ม stilbenes ที่สำคัญและได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน คือ trans-resveratrol ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติที่ดีต่อสุขภาพคือ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านมะเร็ง ลดความเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน สามารถช่วยลดการเกิด oxidation ของ low-density lipoprotein (LDL) cholesterol ซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ (Petrovski et al., 2011) จากรายงานการวิจัย (Kang et al., 2010) พบว่า resveratrol ที่มีอยู่มากในถั่วลิสงงอกเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันได้ดี และสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ Kim และคณะ (Kim, et al 2013) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีในรากของถั่วลิสงพันธุ์ต่างๆ ของเวียดนาม โดยทำการสกัดรากถั่วลิสงด้วยสารละลาย methanol จากนั้นนำสารสกัดมาแยกด้วยวิธี silica gel solid phase extraction โดยทำการชะสารสกัดจากคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆ กัน เช่น hexane, chloroform, ethyl acetate และ methanol นำสารสกัดที่แยกได้แต่ละ fraction ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำสารที่แยกได้จากคอลัมน์ไปตรวจสอบด้วย NMR spectroscopic analysis พบว่าประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ ursolic acid, kaempferol, β-sitosterol 3-O-β-D-glucopyranoside, resveratrol, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบแต่ละชนิดที่แยกได้ พบว่า สาร resveratrol และ quercetin-3-O-β-D- glucopyranoside มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

resveratrol จัดอยู่ในกลุ่มของสาร stilbenes ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรแมติก มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สาร resveratrol พบได้ในพืชบางชนิด เช่น จากผิวองุ่นแดง ถั่วลิสง กระบวนการสังเคราะห์สาร resveratrol ในพืช เกิดจากการรวมตัวของโมเลกุล coumaroyl-CoA จำนวน 1 โมเลกุล กับ malonyl-CoA จำนวน 3 โมเลกุล โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ resveratrol synthase เอนไซม์ resveratrol synthase เป็นเอนไซม์ที่จะแสดงออกในสภาวะที่ถูกกระตุ้น เช่น ภาวะที่พืชเกิดความเครียด ดังนั้นสาร resveratrol จึงเป็นสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมา (phytoalexin) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันตนเองในภาวะที่พืชได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น สารเคมี รังสี UV การเกิดบาดแผลในพืช หรือภาวะที่พืชถูกรุกรานโดยจุลชีพต่างๆ (Hasan et al., 2013) สาร resveratrol ในธรรมชาติพบได้ 2 รูปแบบ คือ cis-resveratrol และ trans-resveratrol (รูปที่ 3) โดยรูปแบบที่เป็นสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive form) คือ trans-resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihydroxystilbene)



รูปที่ 3 resveratrol 2 รูปแบบ คือ cis-resveratrol และ trans-resveratrol

การเพาะเลี้ยงรากลอย (hairy root culture) เป็นกระบวนการหนึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อพืชให้มีปริมาณมากตามความต้องการ การเพาะเลี้ยงรากลอยเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์สำคัญในพืช (Shanks and Morgan, 1999) การชักนำให้เกิดรากลอยในพืชทำได้โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ อาศัยในดิน และสามารถทำให้เกิดโรคปุ่มปม หรือ รากลอยในพืชได้ กระบวนการเริ่มต้นทำโดยทำให้เกิดบาดแผลในเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้พืชหลั่งสารเคมี acetosyringone ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเกิดการตอบสนอง และบุกรุกเข้าไปในเซลล์พืชในบริเวณที่เกิดบาดแผล โดย *A. rhizogenes* จะถ่ายโอนยีนบริเวณ T-DNA ของแบคทีเรียเข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืช ซึ่งยีนที่นำเข้าไปจะทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการชีวสังเคราะห์ของฮอร์โมนพืชในกลุ่ม auxin และ cytokinin ทำให้รากที่ได้รับการถ่ายโอนยีนบริเวณดังกล่าวจาก *A. rhizogenes* มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้ฮอร์โมนจากภายนอกไปกระตุ้นการเจริญของรากที่ได้รับการถ่ายโอนยีนดังกล่าว (Nilsson and Olsson, 1997) ทั้งนี้บริเวณ T-DNA ของ *A. rhizogenes* ที่นำเข้าสู่พืช จะมียีนบริเวณ root locus 4 ตำแหน่ง คือ rol A, rol B, rol C และ rol D

โดยยีนทั้ง 4 มีการแสดงออกถึงความรุนแรงในการชักนำให้เกิดรากลอยต่างกัน ทำให้พืชมีลักษณะการแสดงออกของฟีโนไทป์หลายลักษณะ (Spena et al., 1987) ได้แก่ การเกิดรากฝอยจำนวนมาก การเปลี่ยนแปลงการออกดอก จำนวนข้อและปล้องสั้นลง เป็นต้น Medina-Bolivar และคณะ (Medina-Bolivar et al., 2007) ได้ทำการศึกษาการผลิตสาร resveratrol โดยเพาะเลี้ยงรากลอยจากต้นถั่วลิสง และพบว่าสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรากลอยที่ถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น sodium acetate สามารถผลิตสาร resveratrol เพิ่มขึ้นจากเดิม 60 เท่า นอกจากนี้ยังสามารถพบสารสำคัญอื่นๆ ในกลุ่ม stilbene ในสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงรากลอยด้วย นอกจากนี้ในปี 2014 Nopo-Olazaba และคณะ (Nopo-Olazabal et al., 2014) ได้ทำการกระตุ้นรากลอยขององุ่น (*Vitis rotundifolia*) ด้วย 100 µM methyl jasmonate และ H_2O_2 เป็นระยะเวลา 96 ชม. ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบสารในกลุ่ม stilbene ได้แก่ resveratrol, piceid และ ε-viniferin ในปริมาณสูงที่สุดในอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยภายหลังการกระตุ้นเป็นเวลา 18 ชม. ซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบโดยวิธี ABTS และ DPPH ในปี 2013 Prabhu และคณะ (Prabhu et al., 2013) ได้รายงานการนำสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงรากลอยของถั่วลิสงไปใช้ศึกษาการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดที่มีองค์ประกอบของ resveratrol และสารสำคัญอื่นๆ ในกลุ่ม stilbene มีประสิทธิภาพในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ประสาทที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร H_2O_2 ที่มีฤทธิ์ออกซิไดซ์และทำลายเซลล์ได้ Ismail และคณะ (Ismail and Theodor, 2013) ได้นำรากลอยของต้น *Brassica Juncea L.* (Indian mustard) มาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาผลกระทบของโลหะหนักสังกะสีและนิกเกิ้ลที่มีผลกระตุ้นภาวะเครียดในพืช พบว่ารากลอยที่ถูกกระตุ้นด้วยสังกะสีและนิกเกิ้ลที่ความเข้มข้นสูงถึง 5000 ppm จะสามารถกระตุ้นระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยตรวจพบค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPOD ในระดับที่สูงขึ้นกว่าภาวะปกติ

เนื้อหาการวิจัย

งานวิจัยนี้ จะทำการวิจัยโดยแบ่งเนื้อหาเป็นสามส่วน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. เพาะเลี้ยงรากลอยของถั่วลิสงสายพันธ์กาฬสินธุ์2 ในห้องปฏิบัติการ (รากลอยถั่วลิสงเป็นผลผลิตที่ได้จากโครงการ "การเหนี่ยวนำและการเพาะเลี้ยงรากลอยจากถั่วลิสงงอกเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ" ซึ่งผ่านการพิจารณารับรองจาก คณะกรรมการเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพของมหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ใบรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ 58-33 ลงวันที่ 28 สิงหาคม 2558)

2. ทำการกระตุ้นรากลอยของถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้น methyl jasmonate ร่วมกับ cyclodextrin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำให้รากลอยสร้างสาร resveratrol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ก่อนเติมสารกำจัดวัชพืชพาราควอตความเข้มข้นต่างๆ

3. ศึกษาผลการป้องกันรากลอยจากความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชพาราควอตในรากลอยที่ถูกกระตุ้นเปรียบเทียบกับรากลอยปกติที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น โดยตรวจสอบปริมาณสาร resveratrol ที่สร้างขึ้นในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธี HPLC และศึกษาการแสดงออกของยีน antioxidant enzyme จำนวน 3 ชนิด คือ ยีนของเอนไซม์ superoxidie dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) และ catalase ด้วยวิธี real time PCR

การดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงรากลอย (hairy root)

นำรากลอยของถั่วลิสงสายพันธุ์กาฬสินธุ์2 ในห้องปฏิบัติการ (รากลอยถั่วลิสงเป็นผลผลิตที่ได้จากโครงการ "การเหนี่ยวนำและการเพาะเลี้ยงรากลอยจากถั่วลิสงงอกเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ" ซึ่งผ่านการพิจารณารับรองจาก คณะกรรมการเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพของมหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ใบรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ 58-33 ลงวันที่ 28 สิงหาคม 2558) มาทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารแข็ง ½ MS สภาพการเลี้ยงในที่มืด เพื่อเพิ่มปริมาณรากลอยให้ได้จำนวนมาก

2. การกระตุ้นรากลอยของถั่วลิสงให้ผลิตสาร resveratrol ก่อนการเติมพาราควอต

การจำลองสภาวะเครียดต่างๆ ในพืช สามารถกระตุ้นรากลอยของถั่วลิสงให้ผลิตสาร resveratrol ในปริมาณที่แตกต่างจากสภาวะปกติได้ การทดสอบการกระตุ้นสามารถทำได้โดยตัดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อบริเวณปลายรากลอย น้ำหนักเริ่มต้น 0.5 กรัม แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ชุด ชุดแรก คือ ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น และชุดที่สอง คือชุดที่เติมสารกระตุ้น ได้แก่ methyl jasmonate, cyclodextrin ในอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมสารเคมีกำจัดวัชพืชพาราควอต ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลาอีก 24 ชม. ทำการเก็บส่วนของรากลอยรวมทั้งอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงรากลอยที่ถูกกระตุ้น เพื่อนำไปสกัดสารและตรวจสอบปริมาณสาร resveratrol ที่รากลอยของถั่วลิสงผลิตขึ้น

3. การสกัดสารจากอาหารเพาะเลี้ยงรากและเนื้อเยื่อราก

การสกัดสารสำคัญจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย ทำได้โดยนำอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยมาสกัดโดยวิธี partition กับ สาร ethyl acetate ทำการแยกชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่ได้มา จากนั้นทำให้แห้งด้วยวิธี rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้สารสกัดสำหรับนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การสกัดสารสำคัญจากเนื้อเยื่อรากลอย ทำโดยบดเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว ด้วย ethyl acetate จากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วนสารละลาย และนำสารละลายที่ได้มาทำให้แห้ง ด้วยวิธี rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้สารสกัดสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

4. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี ABTS method

เตรียมสารละลาย 7 mM ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt, บริษัท Sigma-Aldrich) ปริมาตร 5 ml เติม 88 µl ของสารละลาย 140 mM Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ใน เก็บไว้ในความมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จะได้สารละลาย ABTS radical นำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น จนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น OD 734 nm. = 0.70 ± 0.02 ทำการเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลาย Trolox โดยเตรียมสารละลาย ABTS radical ปริมาตร 1 ml จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน Trolox [(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-

tetramethylchromane-2-carboxylic acid, บริษัท Sigma-Aldrich] เตรียม standard solution โดยละลาย Trolox ใน Ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mM ปริมาตร 10 ul ลงในแต่ละหลอด ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ที่เวลา 6 นาที เปรียบเทียบกับหลอด Control

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทำโดยนำสารสกัดทำปฏิกิริยากับสารละลาย ABTS radical ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งแสดงค่าเป็น TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) มีหน่วยเป็น µmole Trolox ต่อ 1 g สารทดสอบ

5. การตรวจสอบปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds)

เตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารมาตรฐาน Gallic acid [3,4,5-Trihydroxybenzoic acid,บริษัท Sigma-Aldrich] โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid (standard solution) โดยละลาย Gallic acid ใน น้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml ในหลอดทดลอง 6 หลอด ทำปฏิกิริยาโดยเติมสารปริมาตร 10 µl ผสมกับ สารละลาย Folin reagent ปริมาตร 50 µl และสารละลาย sodium carbonate (20% w/v) จำนวน 50 µl เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ml ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm เปรียบเทียบกับหลอด Blank เขียนกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ Gallic acid

การหาปริมาณ total phenolics ของสารสกัดทำได้โดยผสมสารสกัดกับ Folin reagent และสารละลาย sodium carbonate (20% w/v) เช่นเดียวกับการเตรียมสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวัดหาปริมาณสารประกอบ phenolics จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ gallic acid และค่าดูดกลืนแสง และแสดงในหน่วย gallic acid equivalents (GAE) mg/g

6. การวิเคราะห์ปริมาณ resveratrol ด้วยวิธี HPLC method

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ resveratrol จากสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยและเนื้อเยื่อรากลอย โดยทำการฉีดสารมาตรฐานโดยใช้ reverse phase column Luna 5 um C18 100A size 250x4.6 mm (Phenomenex/USA) ที่ต่อกับ security guard cartridges holder ตัวทำละลายที่ใช้เป็นระบบ gradient solvent system ใช้ flow rate 1 ml/min ตรวจสอบผลด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 306 nm ฉีดสารมาตรฐานและสารตัวอย่างปริมาตร 20 µl เตรียม standard resveratrol จากสารมาตรฐาน resveratrol ความเข้มข้นต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย condition เดียวกันกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ วาดกราฟมาตรฐานระหว่างค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟและปริมาณสารมาตรฐาน resveratrol

7. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนเอนไซม์ SOD, GPX และ catalase

7.1 การสกัด RNA

นำเนื้อเยื่อพืชประมาณ 50 mg มาบดด้วย liquid nitrogen ในโกร่ง mortar และทำการสกัด RNA ด้วยชุดสกัดอาร์เอนเอสำเร็จรูป (Total RNA Extraction Kit (Plant) : RBCBioscience) และนำไปวัดปริมาณความเข้มข้นของ total RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop โดยใช้ RNase Free water เป็น blank จากนั้นเก็บตัวอย่าง RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้นำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

7.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

นำ total RNA ความเข้มข้น 1 µg มาใช้เป็น template ในการสังเคราะห์ cDNA โดยทำการผสม RNA ความเข้มข้น 1 µg กับ primer (Oligo dT18) 100 pmole ปริมาตร 1 µl ให้เข้ากันจากนั้นนำไปให้ความร้อน (incubate) ที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายไปยัง AccuPower® RT PreMix tube (BioNEER) และเติม DEPC-DW จนปริมาตรครบ 20 µl นำไปสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ด้วยเครื่อง thermocycler โดยกำหนดให้มีสภาวะการทำงานดังนี้ ในช่วงแรกจะใช้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที (cDNA synthesis) และยับยั้งการทำงานของ RTase ในช่วงที่สองโดยใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป

7.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิค real-time PCR

นำ cDNA มาใช้เป็น template ในการทำ real-time PCR 10 µl ประกอบด้วย

2x – qPCR	5	µl
cDNA	0.5	µl
primer – forward	0.5	µl
primer – reverse	0.5	µl
DW	3.5	µl

โดย primer ที่ทำการทดสอบมี 4 คู่ ดังนี้

Name	Sequence
P-SOD131-F	5'- GCGGAGTAGCTTGTGGGATT-3'
P-SOD131-R	5'- ACCAAACAACGGAAAGGGGT-3'
P-GPX116-F	5'- CTCTCTCGGCCTTATCAGCG -3'
P-GPX116-R	5'- CTGGCCATGGTGTGATCTGT -3'
P-catalase70-F	5'- TTACACCCGGGAGGGTAACT -3'
P-catalase70-R	5'- TCATCCCATCGCGAACCAAA -3'
Act119-F	5'- CCTGGAATCCATGAAACCACA-3'
Act119-R	5'- TCAGCAATGCCTGGGAACAT-3'

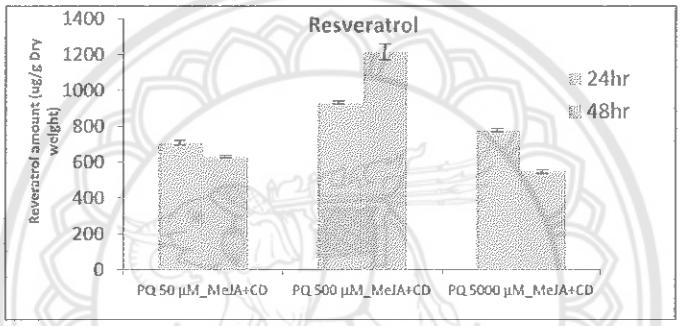
นำปฏิกิริยาใส่ในเครื่อง real-time PCR แล้วตั้งอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที 1 รอบ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที, 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วินาที และ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่ 60 ถึง 94 องศาเซลเซียส โดยให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นที่ละ 1 องศาเซลเซียสต่อวินาที เพื่อให้เครื่องวิเคราะห์ melting curve ซึ่งวิเคราะห์ไปเพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ (PCR product) ที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี real-time PCR เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลงนำข้อมูลค่า Ct ที่เครื่องวิเคราะห์ได้มาคำนวณหาปริมาณแบบสัมพัทธ์ (relative quantification) เป็นวิธีการเปรียบเทียบโดยการหาอัตราส่วนการแสดงออกของยีนที่สนใจต่อการแสดงออกของยีนอ้างอิง (ใช้ actin_119 เป็นยีนอ้างอิง)

ผลการดำเนินการวิจัย

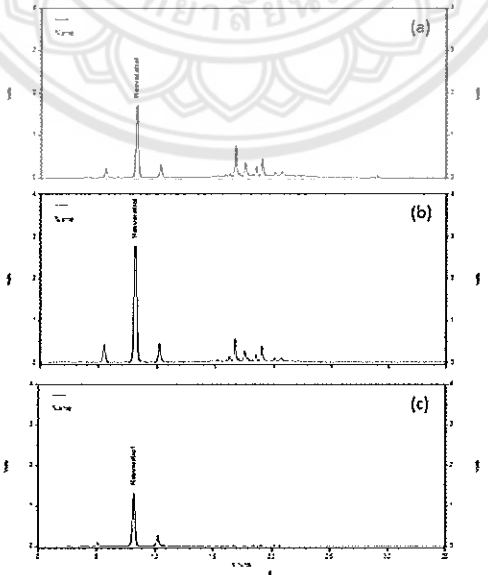
1. ผลการศึกษาตัวกระตุ้นรากลอยของถั่วลิสง (K-K599)

1.1 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ paraquat (PQ)

ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PQ สำหรับใช้ในการกระตุ้นร่วมกับ MeJA และ CD โดยใช้ความเข้มข้นคือ 50 µM, 500 µM และ 5000 µM กระตุ้นร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM และ CD ความเข้มข้น 6. 87 mM เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชม. พบว่า PQ ความเข้มข้น 500 µM ที่กระตุ้นร่วมกับ MeJA และ CD ให้ปริมาณ resveratrol สูงสุด (รูปที่ 1) และผลโครมาโตแกรมของ HPLC แสดงดังรูปที่ 2 นอกจากนี้ความเข้มข้น 500 µM ยังไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อรากลอย ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการกระตุ้นรากลอยต่อไป คือ 500 µM PQ ร่วมกับ 100 µM MeJA และ 6. 87 mM CD



รูปที่ 1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PQ สำหรับกระตุ้นปริมาณสาร resveratrol

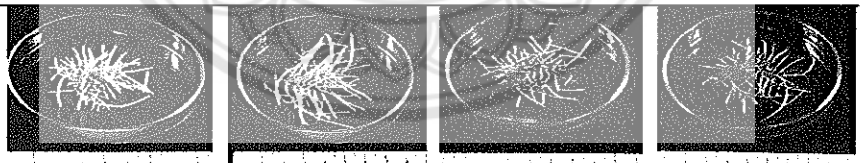
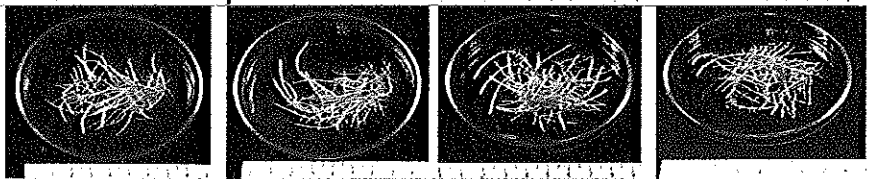
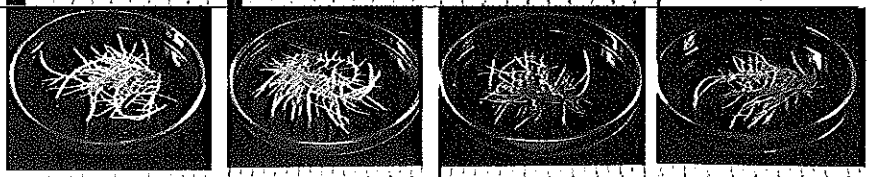
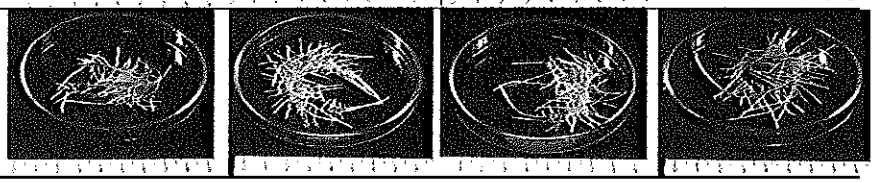


รูปที่ 2 โครมาโตแกรม HPLC ของสาร resveratrol ที่ถูกกระตุ้นด้วย (a) 50 µM PQ ร่วมกับ 100 µM MeJA และ 6.78 mM CD (b) 500 µM PQ ร่วมกับ 100 µM MeJA และ 6.87 mM CD (c) 5000 µM PQ ร่วมกับ 100 µM MeJA และ 6.78 mM CD

1.2 การทดสอบตัวกระตุ้น PQ ร่วมกับ MeJA และ CD

การศึกษาตัวกระตุ้น PQ เป็นการจำลองการสร้างสภาวะเครียด โดยการกระตุ้นรากลอยด้วยยากำจัดวัชพืช PQ ก่อนหรือหลังการกระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD โดยแบ่งการทดลองเป็นชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น และชุดที่เติมสารกระตุ้น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย PQ ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย PQ ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนจากนั้นจึงเติม MeJA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ CD ความเข้มข้น 6. 87 มิลลิโมลาร์ และกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย MeJA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ CD ความเข้มข้น 6.78 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อน จากนั้นจึงเติม PQ ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อรากลอยที่ถูกกระตุ้นด้วย PQ เพียงอย่างเดียว มีลักษณะที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ คือ ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบเนื้อเยื่อมีลักษณะสีขาวซีด และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น เนื้อเยื่อจะถูกทำลายเพิ่มมากขึ้น โดยมีลักษณะช้ำและอวบน้ำ (ตาราง 1) ในขณะที่อาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่มีตัวกระตุ้น PQ เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 3) กลับมีสีที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม พบว่า สีของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยกลุ่มอื่นๆ มีสีเข้มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของตัวกระตุ้นและช่วงระยะเวลาในการกระตุ้น โดยกลุ่มที่กระตุ้นด้วย PQ ก่อนและตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD มีสีเหลืองเข้มมากกว่ากลุ่มอื่นๆ เมื่อกระตุ้นที่ระยะเวลา 120 และ 192 ชั่วโมง

ตาราง 1 ลักษณะรากลอย (K-K599) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย (PQ), (MeJA ร่วมกับ CD), (PQ และ MeJA ร่วมกับ CD) และ (MeJA ร่วมกับ CD และ PQ) เป็นระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง

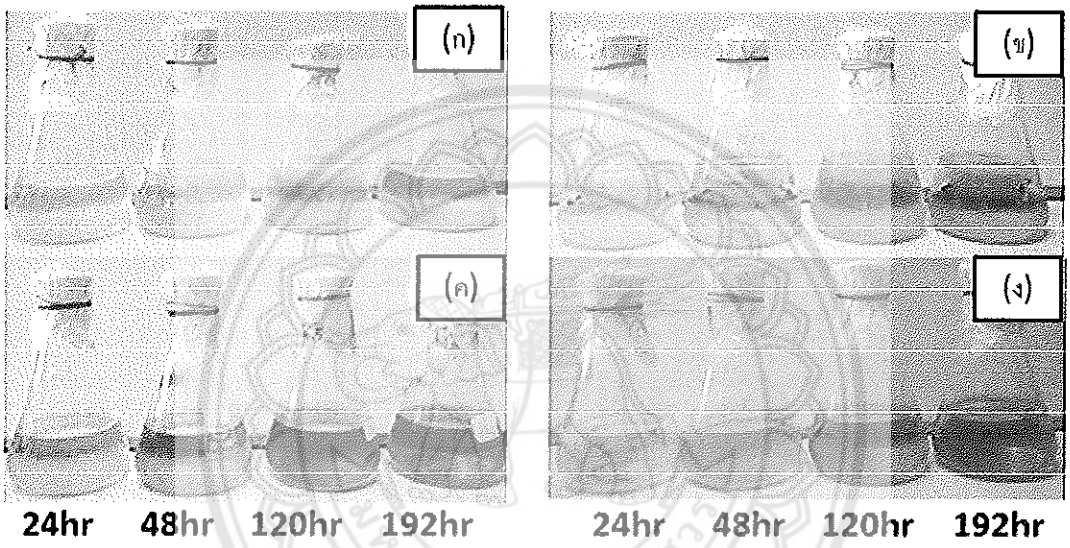
ตัวกระตุ้น	ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	120 ชั่วโมง	192 ชั่วโมง
PQ				
MeJA + CD				
PQ_(MeJA +CD)				
(MeJA + CD)_PQ				

หมายเหตุ: PQ = กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยพาราควอต

MeJA+CD = กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ β-CD

PQ_(MeJA+CD) = กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย PQ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อน หลังจากนั้นจึงเติม MeJA ร่วมกับ β-CD

(MeJA+CD)_PQ = กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ β-CD ระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อน หลังจากนั้นจึงเติม PQ



รูปที่ 3 ลักษณะสีของอาหารที่ใช้เลี้ยงรากลอยเมื่อถูกกระตุ้นเป็นระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง ด้วยตัวกระตุ้น (ก) PQ (ข) MeJA ร่วมกับ CD (ค) PQ ก่อนกระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD (ง) MeJA ร่วมกับ CD ก่อนกระตุ้นด้วย PQ

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากระบบที่กระตุ้นด้วย PQ ร่วมกับ MeJA และ CD

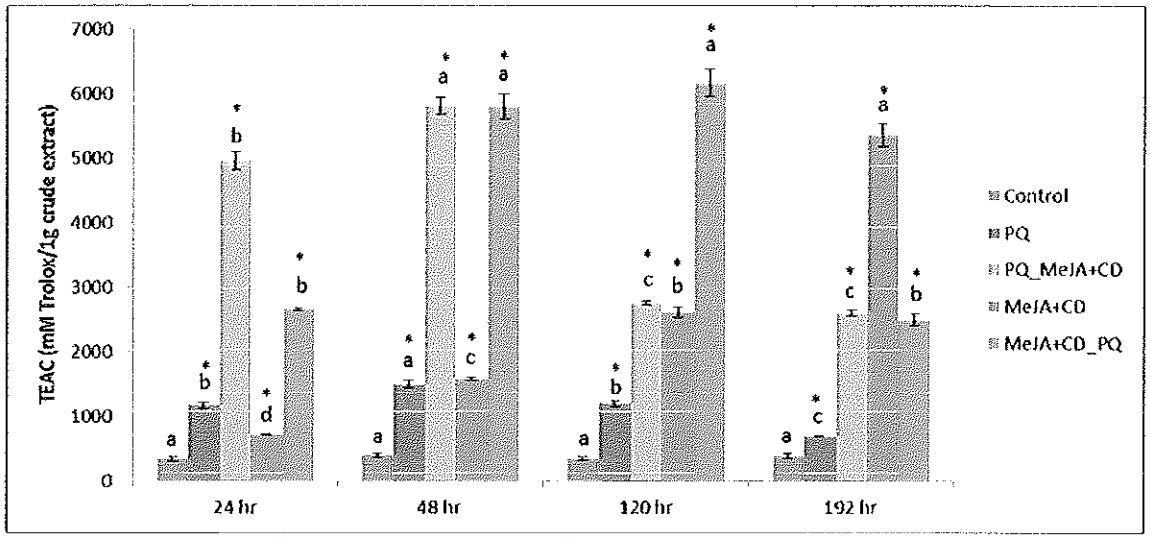
ผลการศึกษาสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของทุกกลุ่มการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นและแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกช่วงเวลาของการกระตุ้น โดยกลุ่มที่กระตุ้นด้วย PQ เพียงอย่างเดียว เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ 1493.95±56.39 มิลลิโมลาร์ Trolox ต่อกรัมสารสกัด กลุ่มการกระตุ้นด้วย PQ ก่อน MeJA ร่วมกับ CD พบว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากทั้งในช่วงระยะเวลาการกระตุ้น 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 4956.83±136.71 มิลลิโมลาร์ Trolox ต่อกรัมสารสกัด และ 5808.30±131.03 มิลลิโมลาร์ Trolox ต่อกรัมสารสกัด คิดเป็น 14.74 เท่า และ 14.79 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ สำหรับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD โดยที่ไม่มีสาร PQ พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระภายหลังการกระตุ้นเป็นเวลา 192 ชั่วโมง โดยมีค่า TEAC เท่ากับ

5346.81±173.34 มิลลิโมลาร์ Trolox ต่อกรัมสารสกัด คิดเป็น 14.08 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มสุดท้ายที่ถูกกระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD ก่อนเติม PQ พบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก ทั้งในช่วงระยะเวลาการกระตุ้น 48 และ 120 ชั่วโมง โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 5795.30±192.73 มิลลิโมลาร์ Trolox ต่อกรัมสารสกัด และ 6159.28±208.88 มิลลิโมลาร์ Trolox ต่อกรัมสารสกัด คิดเป็น 14.76 เท่า และ 17.86 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 4)

ตาราง 2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง K-K599 ด้วยวิธี ABTS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย (PQ), (PQ และ MeJA ร่วมกับ CD), (MeJA ร่วมกับ CD) และ (MeJA ร่วมกับ CD และ PQ) เป็นระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง ตามลำดับ

ตัวกระตุ้น	Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) *มิลลิโมลาร์* Trolox *ต่อกรัมสารสกัด*			
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	120 ชั่วโมง	192 ชั่วโมง
Control	336.34±43.68^{a}	392.67±33.11^{a}	345.00±24.20^{a}	379.67±36.97^{a}
PQ	1163.76±40.55^{b*} (> 3.46 เท่า)	1493.95±56.39^{a*} (> 3.80 เท่า)	1194.96±40.74^{b*} (> 3.46 เท่า)	693.18±4.65^{c*} (> 1.83 เท่า)
PQ_MeJA+ β-CD	4956.83±136.71^{b*} (> 14.74 เท่า)	5808.30±131.03^{a*} (> 14.79 เท่า)	2752.30±36.32^{c*} (> 7.98 เท่า)	2596.31±47.03^{c*} (> 6.84 เท่า)
MeJA+β-CD	719.18±8.38^{d*} (> 2.14 เท่า)	1579.75±20.93^{c*} (> 4.02 เท่า)	2609.31±77.79^{b*} (> 7.56 เท่า)	5346.81±173.34^{a*} (> 14.08 เท่า)
MeJA+β-CD _PQ	2650.91±20.27^{b*} (> 7.88 เท่า)	5795.30±192.73^{a*} (> 14.76 เท่า)	6159.28±208.88^{a*} (> 17.86 เท่า)	2494.91±84.61^{b*} (> 6.57 เท่า)

ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard error of the mean (SEM) (n=3) a, b, c และ d มีนัยความสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ทำการกระตุ้นต่างกัน (แถว) และ * มีนัยความสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (คอลัมน์) (>,< มากกว่า หรือ น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)



รูปที่ 4 กราฟแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย K-K599 ด้วยวิธี ABTS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย (PQ) (PQ และ MeJA ร่วมกับ CD) (MeJA ร่วมกับ CD) และ (MeJA ร่วมกับ CD และ PQ) เป็นระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง ตามลำดับ (a, b, c และ d มีนัยความสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ทำการกระตุ้นต่างกัน และ * มีนัยความสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) (n=3)

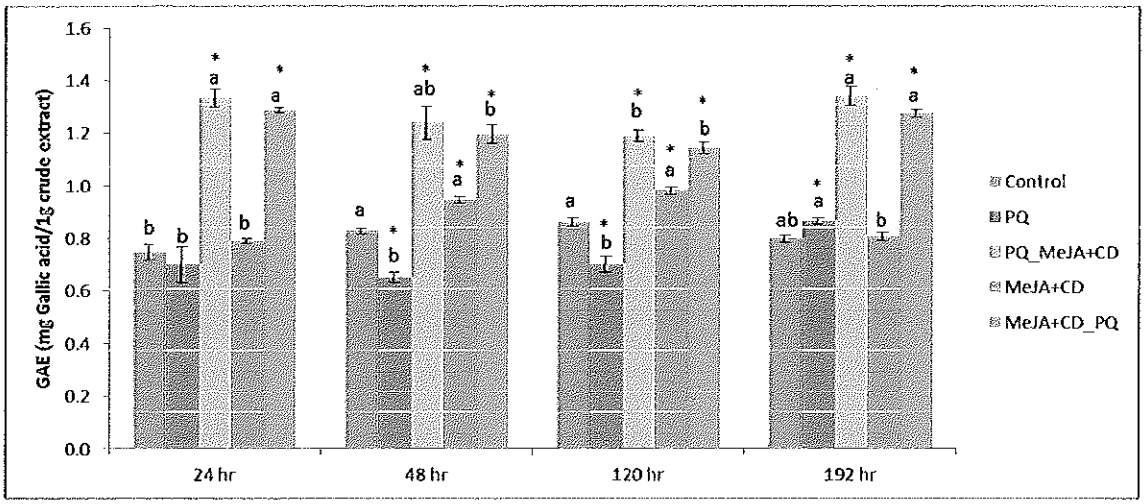
3. ผลการตรวจสอบปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ในสารสกัดหยาบจากอาหารที่ใช้เลี้ยงรากลอย

ผลการศึกษา พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่มีปริมาณสารฟีโนลิกสูงที่สุดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสองระบบคือ ระบบที่กระตุ้นด้วย PQ ก่อนแล้วเติม MeJA ร่วมกับ CD สามารถกระตุ้นให้รากลอยปล่อยสารฟีโนลิกออกมาได้สูงที่สุด ที่ระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง สามารถวัดค่า GAE ได้ 1.33±0.03 มิลลิกรัม Gallic ต่อกรัมสารสกัด 1.24±0.06 มิลลิกรัม Gallic ต่อกรัมสารสกัด 1.19±0.02 มิลลิกรัม Gallic ต่อกรัมสารสกัด และ 1.34±0.04 มิลลิกรัม Gallic ต่อกรัมสารสกัด คิดเป็น 1.77 เท่า 1.49 เท่า 1.38 เท่า และ 1.68 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และระบบที่กระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD ก่อนเติม PQ เป็นระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง สามารถวัดค่า GAE ได้ 1.29±0.01 04 มิลลิกรัม Gallic ต่อกรัมสารสกัด 1.20±0.04 04 มิลลิกรัม Gallic ต่อกรัมสารสกัด 1.14±0.02 04 มิลลิกรัม Gallic ต่อกรัมสารสกัด และ 1.28±0.01 04 มิลลิกรัม Gallic ต่อกรัมสารสกัด คิดเป็น 1.72 เท่า 1.45 เท่า 1.33 เท่า และ 1.60 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ ระบบที่กระตุ้นด้วย PQ เพียงอย่างเดียว และระบบที่กระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD เพียงอย่างเดียว จะมีปริมาณสารฟีโนลิกใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 5)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงรากลอยถั่วลิสง K-K599 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย (PQ) (PQ และ MeJA ร่วมกับ CD) (MeJA ร่วมกับ CD) และ (MeJA ร่วมกับ CD และ PQ) เป็นระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง ตามลำดับ

ตัวกระตุ้น	Gallic acid equivalent (GAE) *มิลลิกรัม* Gallic *ต่อกรัมสารสกัด*			
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	120 ชั่วโมง	192 ชั่วโมง
Control	0.75±0.03^{b}	0.83±0.01^{a}	0.86±0.02^{a}	0.80±0.01^{ab}
PQ	0.70±0.07^{b} (< 1.07 เท่า)	0.65±0.02^{b*} (< 1.28 เท่า)	0.70±0.03^{b*} (< 1.23 เท่า)	0.87±0.01^{a*} (> 1.09 เท่า)
PQ_MeJA+CD	1.33±0.03^{a*} (> 1.77 เท่า)	1.24±0.06^{ab*} (> 1.49 เท่า)	1.19±0.02^{b*} (> 1.38 เท่า)	1.34±0.04^{a*} (> 1.68 เท่า)
MeJA+CD	0.79±0.01^{b} (> 1.05 เท่า)	0.95±0.01^{a*} (> 1.14 เท่า)	0.98±0.02^{a*} (> 1.14 เท่า)	0.81±0.01^{b} (> 1.01 เท่า)
MeJA+CD _PQ	1.29±0.01^{a*} (> 1.72 เท่า)	1.20±0.04^{b*} (> 1.45 เท่า)	1.14±0.02^{b*} (> 1.33 เท่า)	1.28±0.01^{a*} (> 1.60 เท่า)

ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard error of the mean (SEM) (n=3) a, b, c และ d มีนัยความสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ทำการกระตุ้นต่างกัน (แถว) และ * มีนัยความสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (คอลัมน์) (>,< มากกว่า หรือ น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

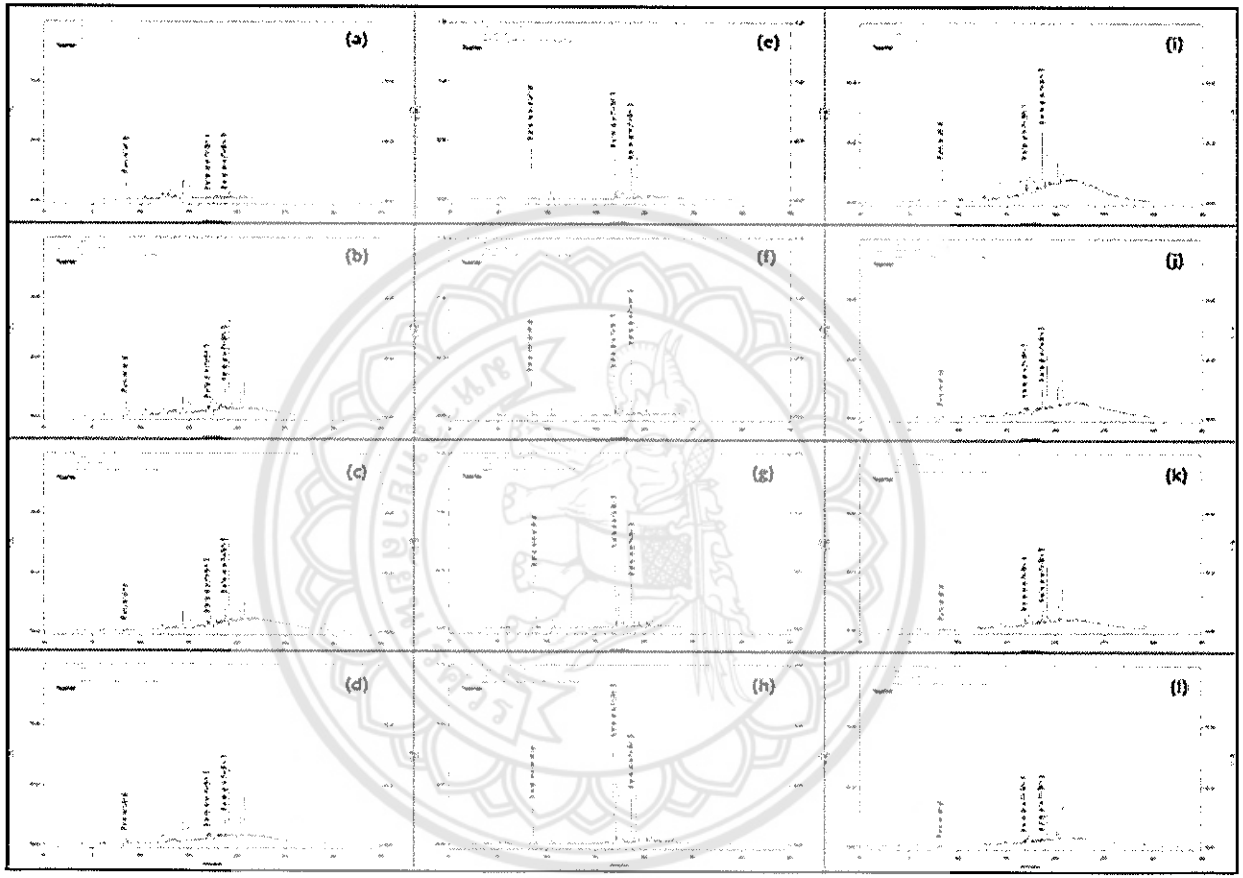


รูปที่ 5 ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงรากลอยถั่วลิสง K-K599 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย (PQ) (PQ และ MeJA ร่วมกับ CD) (MeJA ร่วมกับ CD) และ (MeJA ร่วมกับ CD และ PQ) เป็นระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง ตามลำดับ (a, b, cและ d มีนัยความสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ทำการกระตุ้นต่างกัน และ * มีนัยความสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) (n=3)

4. **ผลโครมาโตแกรม ของสารสกัดจากรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย ด้วยเครื่อง** High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

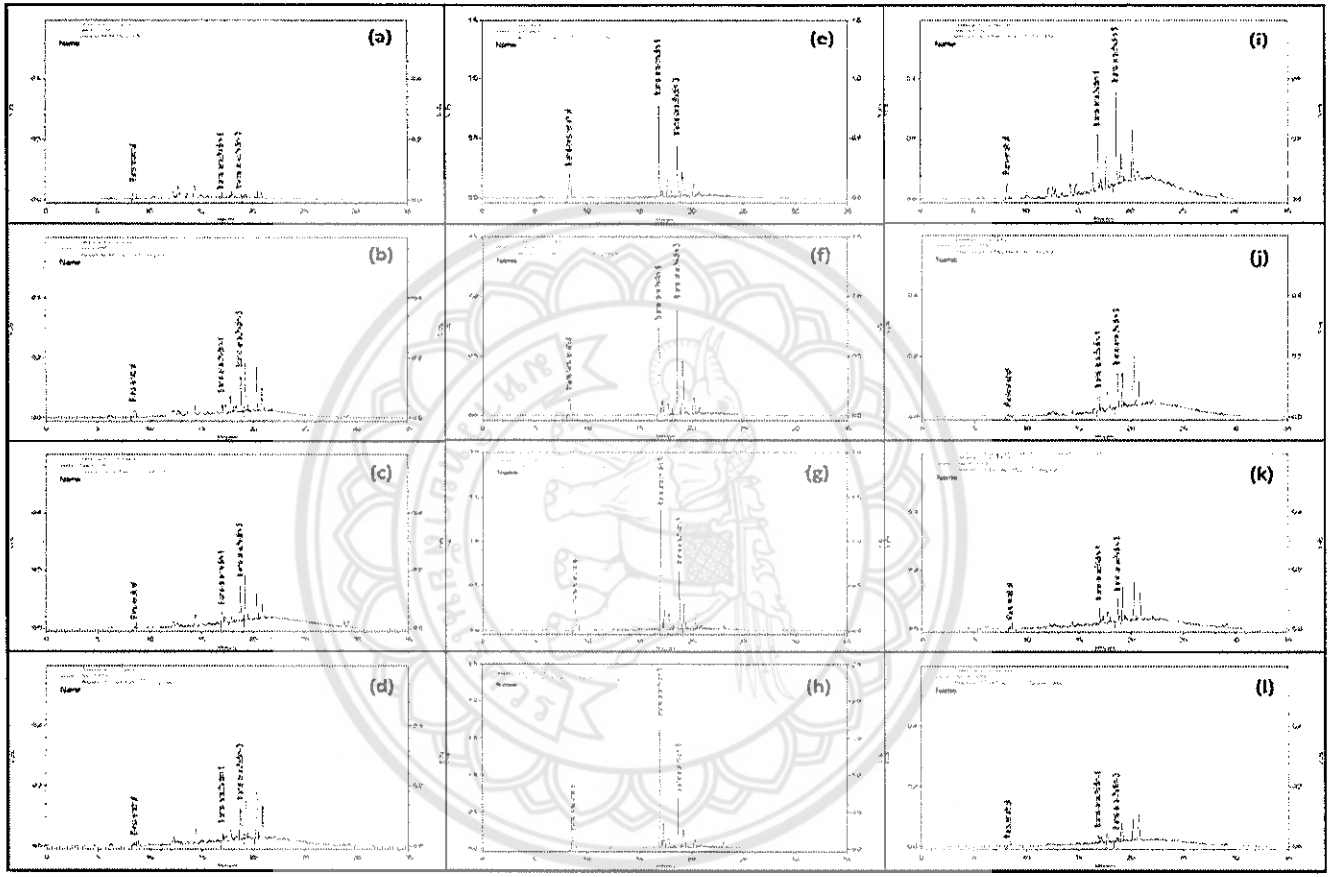
องค์ประกอบของสารสกัดจากรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยสามารถตรวจสอบได้ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจสอบสารกลุ่มอนุพันธ์ของ resveratrol โดยเปรียบเทียบเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (retention time) กับสารมาตรฐาน resveratrol, trans-arachidin-1, trans-arachidin-3

ผลการศึกษาโครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย ในระบบที่กระตุ้นด้วย PQ ร่วมกับ MeJA และ CD เปรียบเทียบกับกลุ่ม control โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ทุกกลุ่มตัวกระตุ้นมีโครมาโตแกรมที่ตรงกับสาร resveratrol และยังพบสารที่เป็นอนุพันธ์ของ resveratrol โดยกลุ่มที่กระตุ้นด้วย PQ ก่อน แล้วเติม MeJA ร่วมกับ CD เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงพบปริมาณ resveratrol สูงที่สุด ส่วนกลุ่มถูกกระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD ก่อนแล้วจึงเติม PQ และกลุ่ม MeJA ร่วมกับ CD พบว่ามีอนุพันธ์ของ resveratrol สูงที่สุด ได้แก่ trans-arachidin-1, trans-arachidin-3 ในขณะกลุ่มที่กระตุ้นด้วย PQ เพียงอย่างเดียว จะพบเพียงโครมาโตแกรมของสาร resveratrol และไม่พบกลุ่มสารที่เป็นอนุพันธ์ของ resveratrol (รูปที่ 6-7)



รูปที่ 6 ผล HPLC โครมาโตแกรม (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 306 nm) ของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น และเวลา ดังนี้ (a)-(d) คือ การกระตุ้นด้วย MeJA+CD โดยที่ (a) 24 ชม. (b) 48 ชม. (c) 120 ชม. (d) 192 ชม.; (e)-(h) คือ การกระตุ้นด้วย PQ_MeJA+CD โดยที่ (e) 24 ชม. (f) 48 ชม. (g) 120 ชม. (h) 192 ชม.; (i)-(l) คือ การกระตุ้นด้วย MeJA+CD_PQ โดยที่ (i) 24 ชม. (j) 48 ชม. (k) 120 ชม. (l) 192 ชม

10534724
06 มิ.ย. 2567
วิทยาศาสตร์
๑๖ มิถุนายน ๒๕๖๗



รูปที่ 7 ผล HPLC โครมาโตแกรม (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm) ของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น และเวลา ดังนี้ (a)-(d) คือ การกระตุ้นด้วย MeJA+CD โดยที่ (a) 24 ชม. (b) 48 ชม. (c) 120 ชม. (d) 192 ชม.; (e)-(h) คือ การกระตุ้นด้วย PQ_MeJA+CD โดยที่ (e) 24 ชม. (f) 48 ชม. (g) 120 ชม. (h) 192 ชม.; (i)-(l) คือ การกระตุ้นด้วย MeJA+CD_PQ โดยที่ (i) 24 ชม. (j) 48 ชม. (k) 120 ชม. (l) 192 ชม

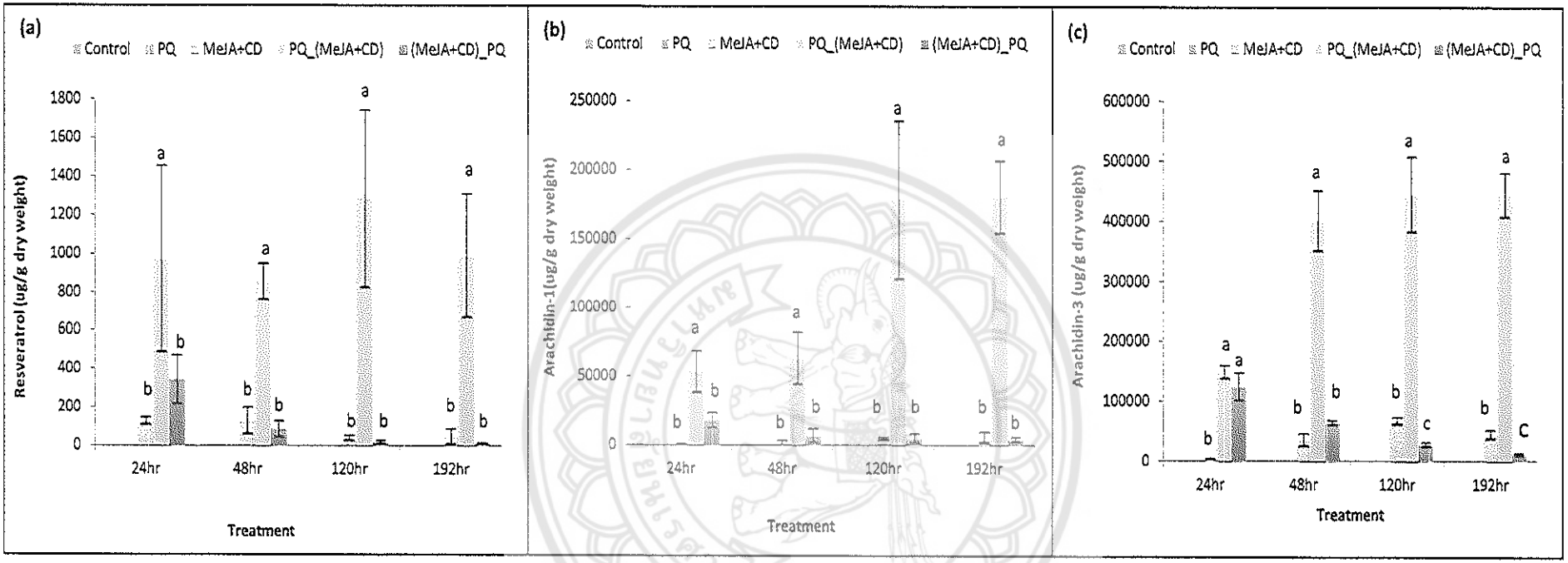
5. ผลการตรวจสอบปริมาณสาร resveratrol และอนุพันธ์ของ resveratrol

การเพาะเลี้ยงรากลอยโดยใช้ระบบที่กระตุ้นด้วย PQ ร่วมกับ MeJA และ CD จะทำการตรวจสอบปริมาณสารสำคัญในสารสกัดที่ช่วงระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง (รูปที่ 8) ผลการทดสอบพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่กระตุ้นด้วย PQ นั้นไม่สามารถตรวจสอบสาร resveratrol และสารในกลุ่มอนุพันธ์ของ resveratrol ตัวอื่นๆ ได้

อาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่กระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงมีสาร resveratrol เท่ากับ 127.36 ± 69.36 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 8a) ซึ่งมีปริมาณสูงสุดแต่ไม่แตกต่างจากปริมาณสารที่ตรวจสอบได้ที่ระยะเวลาอื่น

อาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่กระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD ก่อนเติม PQ พบว่ามีการปล่อยสาร resveratrol และอนุพันธ์ของ resveratrol ออกมาสู่อาหารในปริมาณสูงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และมีปริมาณลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไปถึง 192 ชั่วโมงโดยที่ resvertrol มีค่าสูงสุดเท่ากับ 343.63 ± 124.31 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 8a) สาร trans-arachidin-1 มีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 17,918.56 ± 5,191.48ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 8b) และ trans-arachidin-3 มีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 124,089.17 ± 21,884.71 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 8c)

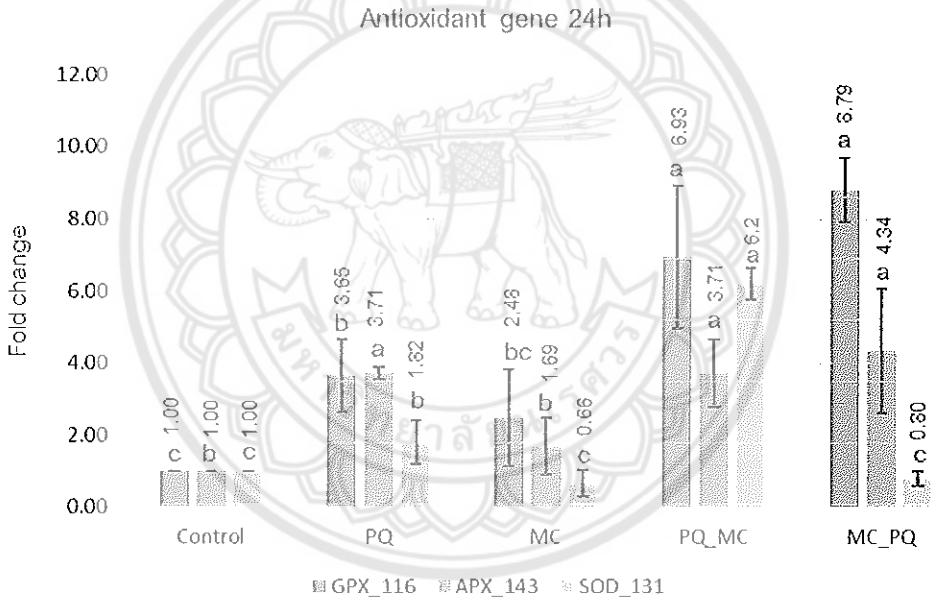
อาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ถูกกระตุ้นด้วย PQ ก่อนแล้วเติม MeJA ร่วมกับ CD พบว่ามีปริมาณ resveratrol สูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวกระตุ้นกลุ่มอื่น โดยปริมาณสาร resveratrol เท่ากับ 1,285.67 ± 458.75 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 8a) เมื่อถูกกระตุ้นเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ในขณะที่ trans-arachidin-1 มีปริมาณสูงที่สุด 180,132.75 ± 26,054.85 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลาการกระตุ้น 192 ชั่วโมง (รูปที่ 8b) และ trans-arachidin-3 มีปริมาณสูงที่สุด 444,212.59 ± 61,947.38 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลาการกระตุ้น 120 ชั่วโมง (รูปที่ 8c)



รูปที่ 8 ปริมาณสาร a) resveratrol, b) trans-arachidin-1, และ c) trans- arachidin-3 จากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย เมื่อถูกกระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD และ PQ เป็นระยะเวลา 24, 48, 120 และ 192 ชั่วโมง ตามลำดับ ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard error of the mean (SEM) (n=3) a, b, c และ d มีนัยความสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ทำการกระตุ้นต่างกัน

6. ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสง

การแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า รากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงที่ถูกกระตุ้นด้วย MC_PQ มีการแสดงออกของยีน GPX สูงที่สุด คิดเป็น 8.79±0.89 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น รองลงมาเป็น รากลอยที่ถูกกระตุ้นด้วย PQ_MC และ PQ คิดเป็น 6.93±1.98 และ 3.65±1.02 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีน APX ในรากลอยที่ถูกกระตุ้นด้วย MC_PQ สูงที่สุด เท่ากับ 4.34±1.71 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม รองลงมาเป็นรากลอยที่ถูกกระตุ้นด้วย PQ_MC และ PQ ซึ่งมีการแสดงออกใกล้เคียงกัน คิดเป็น 3.71±0.94 และ 3.71±0.16 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ และนอกจากนี้ตัวอย่างรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงที่ถูกกระตุ้นด้วย PQ_MC มีการแสดงออกของยีน SOD สูงที่สุด เท่ากับ 6.20±0.43 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ในรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติจะเปรียบเทียบค่าแสดงออกของยีนของแต่ละตัวกระตุ้น โดยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$

สรุปผลงานวิจัย

พืชเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการปรับตัวเปลี่ยนแปลงให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยปัจจัยที่มีผลกระทบต่อพืชสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็นปัจจัยทางชีวภาพ (biotic stress) ได้แก่จุลินทรีย์หรือแมลงที่ก่อให้เกิดโรคหรือความเสียหายในพืช และปัจจัยทางกายภาพ (abiotic stress) ได้แก่ สภาพอากาศ แสง อุณหภูมิ ดิน น้ำ มลพิษต่างๆ ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อสภาวะเครียด (stress) ในพืช พืชจะมีกลไกในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งกระตุ้นและกลไกการตอบสนองในพืชแต่ละชนิด การเพาะเลี้ยงรากลอย (hairy root culture) เป็นทางเลือกหนึ่งในการผลิตสารทุติยภูมิที่ต้องการจากพืช โดยรากที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถเจริญเติบโตแตกแขนงได้อย่างรวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้สารเร่งการเจริญเติบโตของราก นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารกระตุ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการเพาะเลี้ยงรากลอยได้ด้วย

จากการศึกษาการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงด้วยตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ ในระยะเวลา 24, 48, 120 และ192 ชั่วโมง และตรวจสอบฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด รวมทั้งปริมาณสาร resveratrol และอนุพันธ์ของ resveratrol ที่ได้จากผล HPLC และ การแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ พบว่า

รากลอยเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (กลุ่มควบคุม) จากข้อมูลการตรวจสอบปริมาณ resveratrol และอนุพันธ์ของ resveratrol รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไม่พบสาร resveratrol อนุพันธ์ของ resveratrol และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทุกช่วงเวลาของการกระตุ้น การที่รากลอยไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น รากลอยจะไม่สร้างสารทุติยภูมิหรือสร้างโปรตีน มาตอบสนองในการดำรงชีวิต เนื่องจากไม่มีตัวกระตุ้นทำให้รากลอยนั้นเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น

รากลอยเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PQ จากข้อมูลผลการตรวจสอบปริมาณ resveratrol อนุพันธ์ของ resveratrol และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไม่พบสาร resveratrol และอนุพันธ์ของ resveratrol ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้มีการตรวจสอบ พบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าไม่แตกต่างกันในทุกช่วงเวลาที่ได้ทำการศึกษา ยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ยีน APX มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด รองลงมาเป็น GPX และ SOD ดังนั้นการที่รากลอยได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น PQ จะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งรากลอยจะมีกลไกการกระตุ้นการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อลดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

รากลอยเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย MeJA และ CD ผลการตรวจสอบปริมาณ resveratrol อนุพันธ์ของ resveratrol และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีปริมาณ resveratrol ที่สูงในช่วง 48 ชั่วโมง และปริมาณอนุพันธ์ของ resveratrol จะพบสูงที่สุดในช่วง 120 ชั่วโมง แต่มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PQ_(MeJA+CD) และ (MeJA+CD)_PQ สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้มีการตรวจสอบ พบว่า มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นที่ยาวนานขึ้น และยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ยีน GPX มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด รองลงมาเป็น APX และ SOD

ดังนั้นการที่รากลอยได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น MeJA และ CD ซึ่ง MeJA เป็นตัวแทนของการถูกกระตุ้นด้วย pathogen และ CD เป็นทั้งตัวกระตุ้นและมีสมบัติในการกักเก็บการไว้ในตัวเองเพื่อป้องกันการย่อยสลายจากภายนอก เมื่อรากลอยได้รับตัวกระตุ้นจะส่งผลทำให้รากลอยนั้นเกิดภาวะออกซิชั่นขึ้น (Oxidative stress) เนื่องจากมีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นมากภายในเซลล์ ซึ่งรากลอยจะกระตุ้นกลไกการทำงานของกระบวนการต่างๆ เพื่อปกป้องตัวเองจากตัวกระตุ้นที่ได้รับ และเมื่อระยะเวลาที่ทำการกระตุ้นนานขึ้น รากลอยจะใช้กลไกของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เข้ามารักษาสมดุลของเซลล์

รากลอยเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PQ_(MeJA+CD) ผลการตรวจสอบปริมาณ resveratrol อนุพันธ์ของ resveratrol และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีปริมาณ resveratrol และอนุพันธ์ของ resveratrol เพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นที่ยาวนานขึ้น และเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นอื่น ๆ สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้มีการตรวจสอบ พบว่า มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นที่ยาวนานขึ้น และยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ยีน GPX มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด รองลงมาเป็น SOD และ APX ดังนั้นการที่รากลอยได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น PQ_(MeJA+CD) ซึ่งกระตุ้นด้วย PQ ก่อน โดย PQ เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ ส่งผลให้รากลอยเกิดภาวะออกซิเดชั่นขึ้น และเมื่อเติม MeJA+CD ไปกระตุ้นรากลอยจะยิ่งส่งผลทำให้รากลอยนั้นเกิดภาวะออกซิเดชั่นมากขึ้น เนื่องจากสารทั้งสองตัว เป็นตัวแทนของการถูกกระตุ้นด้วย pathogen รากลอยจึงกระตุ้นกลไกการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำหน้าที่ในการปกป้องพืชเมื่อมีสิ่งเร้ามากระตุ้นเพื่อเข้ามากำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรกที่ได้รับการกระตุ้น และเมื่อระยะเวลาที่ทำการกระตุ้นนานขึ้น รากลอยจะปรับมาใช้กลไกของการสร้างสารทุติยภูมิและสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแทนการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่ลดบทบาทลงเมื่อระยะเวลาที่กระตุ้นนานขึ้น

รากลอยเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย (MeJA+CD)_PQ ผลการตรวจสอบปริมาณ resveratrol อนุพันธ์ของ resveratrol และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีปริมาณ resveratrol และอนุพันธ์ของ resveratrol สูงที่สุดที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงและมีปริมาณลดลงเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นที่ยาวนานขึ้น แต่มีปริมาณสารน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น PQ_(MeJA+CD) สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้มีการตรวจสอบ พบว่า มีค่าสูงที่สุดที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน และมีค่าคงที่เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นที่ยาวนานขึ้น และยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ยีน GPX มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด ซึ่งเป็นยีนที่พบสูงที่สุดในการกระตุ้นด้วย (MeJA+CD)_PQ เมื่อเทียบกับรากลอยที่ถูกตัวกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นชนิดอื่น ๆ รองลงมาเป็น APX และ SOD ดังนั้นการที่รากลอยได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น (MeJA+CD)_PQ ซึ่งการกระตุ้นด้วย MeJA+CD ก่อน MeJA+CD เป็นตัวแทนของการถูกกระตุ้นด้วย pathogen จะทำหน้าที่กระตุ้นให้รากลอยเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นในช่วงแรก และเมื่อเติม PQ ไปเหนี่ยวนำให้รากลอยเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์ จะส่งผลให้รากลอยนั้นเกิดภาวะออกซิเดชั่นเพิ่มขึ้นจากเดิม โดยในช่วง 24 ชั่วโมงแรกรากลอยมีการกระตุ้นกลไกการสร้างสารทุติยภูมิและสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลเพื่อปกป้องตัวเองจากภาวะเครียดออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ สังเกตได้จากปริมาณของสาร resveratrol อนุพันธ์ของ resveratrol ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

Babbs, C.F., Pham, J. a, Coolbaugh, R.C., 1989. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. Plant Physiol. 90, 1267–1270. https://doi.org/10.1104/pp.90.4.1267

Bus, J.S., Gibson, J.E., 1984. Paraquat: Model for oxidant-initiated toxicity. Environ. Health Perspect. https://doi.org/10.1289/ehp.845537

Choi, D.G., Yoo, N.H., Yu, C.Y., de Los Reyes, B., Yun, S.J., 2004. The activities of antioxidant enzymes in response to oxidative stresses and hormones in paraquat-tolerant Rehmannia glutinosa plants. J. Biochem. Mol. Biol. 37, 618–624. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2004.37.5.618

Davies, K.J., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Biochem. Soc. Symp. 61, 1–31. https://doi.org/10.1042/bss0610001

Hasan, M.M., Cha, M., Bajpai, V.K., Baek, K.H., 2013. Production of a major stilbene phytoalexin, resveratrol in peanut (Arachis hypogaea) and peanut products: A mini review. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. https://doi.org/10.1007/s11157-012-9294-7

Houzé, P., Baud, F.J., Mouy, R., Bismuth, C., Bourdon, R., Scherrmann, J.M., 1990. Toxicokinetics of paraquat in humans. Hum. Exp. Toxicol. 9, 5–12. https://doi.org/10.1177/096032719000900103

Ismail, A.M., Theodor, P.A., 2013. EFFECTS OF ZINC AND NICKEL ON ANTIOXIDATIVE ENZYME ACTIVITIES OF HAIRY ROOTS OF BRASSICA JUNCEA L . CZERN (INDIAN MUSTARD). Int. J. Bio-Technology Res. 3, 53–60.

Ismail, B.S., Sameni, M., Halimah, M., 2011. Kinetics of the microbial degradation of 2,4-d and 14C-labeled paraquat in two types of tropical agricultural soil. World Appl. Sci. J. 14, 324–333.

Kang, H., Kim, J., Park, K., Kang, J., 2010. Resveratrol content and nutritional components in peanut sprouts. korean Soc. food Reserv. 17, 384–390.

Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A.M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S.F., Bennett, S., Dolan, M.C., 2007. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. Phytochemistry 68, 1992–2003. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.039

Niki, E., 2010. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. Free Radic. Biol. Med. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016

Nilsson, O., Olsson, O., 1997. Getting to the root: The role of the Agrobacterium rhizogenes rol genes in the formation of hairy roots. Physiol. Plant. 100, 463–473. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000307.x

Nopo-Olazabal, C., Condori, J., Nopo-Olazabal, L., Medina-Bolivar, F., 2014. Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of Vitis rotundifolia treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide. Plant Physiol. Biochem. 74, 50–69.

https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.035

Petrovski, G., Gurusamy, N., Das, D.K., 2011. Resveratrol in cardiovascular health and disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1215, 22–33. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05843.x

Popova, L., Ananieva, E., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V., Stoinova, Z., 2003. Salicylic acid - and methyl jasmonate - induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulg. J. Plant Physiol 133–152.

R.J., D.-O., J.A., D., A., S.-N., F., R., M.L., B., F., C., 2008. Paraquat poisonings: Mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. Crit. Rev. Toxicol. 38, 13–71. https://doi.org/10.1080/10408440701669959

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 2, 152–159. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2

Shanks, J. V., Morgan, J., 1999. Plant "hairy root" culture. Curr. Opin. Biotechnol. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80026-3

Sorolla, M.G., Dalida, M.L., Khemthong, P., Grisdanurak, N., 2012. Photocatalytic degradation of paraquat using nano-sized Cu-TiO2/SBA-15 under UV and visible light. J. Environ. Sci. (China) 24, 1125–1132. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60874-7

Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C., Schell, J.S., Kayani, W.K., 1987. Independent and synergistic activity of rol A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. EMBO J. 6, 3891–3899.

Sun, D., Lu, X., Hu, Y., Li, W., Hong, K., Mo, Y., Cahill, D.M., Xie, J., 2013. Methyl jasmonate induced defense responses increase resistance to Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4 in banana. Sci. Hortic. (Amsterdam). 164, 484–491. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.011

Yang, W., Tiffany-Castiglioni, E., 2005. The bipyridyl herbicide paraquat produces oxidative stress-mediated toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: relevance to the dopaminergic pathogenesis. J. Toxicol. Environ. Health. A 68, 1939–1961. https://doi.org/10.1080/15287390500226987

Output ที่ได้จากงานวิจัย

1. เอกสารตอบรับการตีพิมพ์จาก วารสารวิชาการนานาชาติ Phytochemistry

Research title: "Methyl jasmonate and cyclodextrin-mediated defense mechanism and protective effect in response to paraquat-induced stress in peanut hairy root"