บทที่ 1

บทนำ

ในรอบสามทศวรรษที่แล้วมาวิทยาการ และเทคโนโลยีสมัยใหม่ในหลายๆ สาขาเจริญก้าวหน้าขึ้นอย่างรวดเร็ว ช่วยยกระดับการค้นคว้า และวิจัยในสิ่งที่เป็นประโยชน์แก่มนุษยชาติมากขึ้น เทคโนโลยีชีวภาพ(bio-technology) เป็นสิ่งหนึ่งที่มีมากต่องานทางด้านพฤกษศาสตร์ หลายด้าน อาทิเช่น วิทยาการของการเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืช (plant tissue and cell culture) ช่วยพัฒนาการผลิตสารเคมีจากพืชสมุนไพรด้วยระบบใหม่ ด้วยการควบคุมให้เนื้อเยื่อหรือเซลล์ผลิตตัวยาขึ้นมาภายในหลอดแก้วให้มากกว่า เมื่อเทียบกับความสามารถเดิมของพืชนั้น นับเป็นการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นซึ่งระบบนี้มีข้อได้เปรียบกว่าการผลิตตัวยาจากสมุนไพรด้วยวิธีเดิมอยู่หลายประการ ประการแรก พืชได้รับการเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ และมีความแปรปรวนน้อยกว่าสภาพธรรมชาติ อีกทั้งอยู่ในสภาพปลอดจากจุลินทรีย์ที่อาจมาทำลายกลไกการทำงานทางสรีรวิทยาและชีวเคมีได้ ประการที่สอง สารผลิตภัณฑ์ ขั้นที่สอง (secondary product) จากพืชมักพบว่าเก็บอยู่ในเซลล์หรือ ออแกนเนลพิเศษ เช่น resin duct,laticifer,secretory cells เป็นต้น ซึ่งโดยปกติพบในเนื้อเยื่อไม่มากนัก หากว่าเซลล์หรือออแกนเนลเหล่านี้เป็นที่ผลิต สารเคมีดังกล่าว อาศัยเทคนิคการเลี้ยงเซลล์มีทางเป็นไปได้ที่สามารถเลี้ยงให้ได้แต่เซลล์หรือออแกนเนลพิเศษล้วนๆ ดังนั้นจึงมีโอกาสผลิตสารเคมีดังกล่าวได้มากกว่า ยิ่งกว่านั้นถ้าเราทราบแน่ชัดถึงปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ของสารที่ต้องการ เราอาจเติมสารเริ่มต้นของขบวนการผลิตทางชีวเคมีลงในอาหารเลี้ยง ก็น่าจะเป็นการช่วยเร่งการผลิตอีกทางหนึ่งด้วย ประการที่สาม เราสามารถทำให้เกิดการแปร หรือ มิวเตชั่นได้ง่ายกว่าพืชตามธรรมชาติเพราะเป็นการเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือเซลล์ล้วนๆ มิได้มีโครงสร้างอื่นๆ มาเกี่ยวข้องหรือบดบัง จึงกระทำได้โดยตรง นอกจากนี้เรายังมีเทคนิคการรวมโปรโตปลาส (protoplast fusion) เพื่อให้ได้

พืชพันธุ์ใหม่โดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นกัน อนึ่งเซลล์พืชยังมีคุณสมบัติพิเศษคือมี totipotency* จึงเป็นการง่ายที่จะได้ต้นที่เกิดลักษณะใหม่เป็นจำนวนมาก ประการที่สี่ โดยระบบการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะช่วยลดภาระของการลงทุน ลดเนื้อที่การเพาะปลูกในขณะที่เพิ่มผลผลิตต่อหน่วยเนื้อที่ ลดภาระการดูแลรักษาและค่าใช้จ่ายอื่นๆ นับเป็นการส่งผลตอบแทนที่สูงกว่าวิธีเดิม ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

ระย่อมเป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญทางยามาก เนื่องจากมีรอโวลเฟียแอลคาลอยด์ (Rauwolfia alkaloid) ที่สามารถรักษาโรคความดันโลหิตสูงได้ ซึ่งยังเป็นที่นิยมใช้ทั่วไปทั้งตำรับยาแผนโบราณและปัจจุบัน แหล่งต้วยาได้จากการสกัดเปลือกของรากแห้ง ซึ่งในทางปฏิบัติจำต้องใช้รากสดจำนวนมาก ปริมาณระย่อมในธรรมชาติปัจจุบันลดลงอย่างมากเนื่องจากเรายังนิยมขุดจากป่ามากกว่าเก็บเกี่ยวจากการเพาะปลูก ป่าของไทยถูกทำลายลงเรื่อยๆ ไม่ว่าจะเป็นการบุกรุกวนอุทยานแห่งชาติ หรือ ป่าสงวนแห่งชาติเพื่อเปลี่ยนพื้นที่มาเป็นพื้นที่กสิกรรม ทั้งเลื่อนลอยและถาวร การปศุสัตว์ การชลประทาน เขื่อนผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยพลังน้ำ อ่างเก็บน้ำ เป็นต้น ซึ่งแต่ละโครงการล้วนแล้วแต่ต้องทำลายสภาพป่าเป็นบริเวณกว้าง

นอกจากนี้การขยายพันธุ์ของระย่อมค่อนข้างยากและใช้เวลา เนื่องจากเป็นพืชที่ไม่ใคร่ติดเมล็ด ทั้งยังมีอัตราการงอกของเมล็ดที่ต่ำ (Woodson,1957) ซึ่งเข้าใจว่าเกิดจากการฝ่อของการพัฒนาเซลล์ ในขบวนการ megasporogenesis ภายใน embryo sac (เรณู ดำรงธรรม,2509)การขยายพันธุ์โดยวิธีอื่น ๆ เช่น การชำรากชำกิ่งให้ผลไม่แน่นอนและไม่สม่ำเสมอแม้จะนำฮอร์โมนมาช่วยการออกรากให้ได้มากขึ้นแต่ก็ต้องใช้เวลาดูแลรักษาไปอีกหลายปีจนกว่าจะได้ขนาดรากที่ต้องการจึงขุดออกไปใช้ได้ อีกประการหนึ่ง ฤดูการเติบโตของระย่อมก็มีเฉพาะฤดูฝนและตอนต้นฤดูหนาวเท่านั้น เมื่อย่างเข้าฤดูแล้งต้นจะทิ้งใบหมดเหลือแต่ตอลำต้น จึงเป็นการยากที่จะหาระย่อมในระยะนี้

จากสาเหตุที่สำคัญดังกล่าวจึงเป็นแนวทางให้ผู้วิจัยสนใจนำระย่อมมา

---

*totipotency :ความสามารถที่แต่ละเซลล์เจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ต่างจากเซลล์สัตว์ที่ขาดคุณสมบัตินี้

ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อในรูปแคลลัส โดยศึกษาในด้านการแปรของเนื้อเยื่อที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะการแปรเป็นสิ่งสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะดีมีผลผลิตสูง ซึ่งในด้านการแปรนี้นิยมศึกษาในพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Apocynaceae ,Rubiaceae ,Rutaceae และ Solanaceae เป็นส่วนใหญ่ แต่จากการสำรวจเอกสารของระย่อมกลับพบว่ามีการศึกษาด้านนี้น้อยจึงเห็นเป็นการสมควรที่จะได้ศึกษาอย่างยิ่ง ผลของการวิจัยครั้งนี้คาดว่าสามารถนำไปสู่การค้นคว้าวิจัยระดับสูงต่อไปได้.

วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแปรของเนื้อเยื่อแคลลัสทางสัณฐานวิทยา บางประการ เช่น สี ลักษณะพื้นผิว และลักษณะเซลล์ในเนื้อเยื่อแคลลัส

2. เพื่อศึกษาการแปรในรูปแบบการเจริญ และรูปแบบการผลิตรอโวลเพียแอลคาลอยด์ของเนื้อเยื่อแคลลัส

3. หากได้สายพันธุ์ของเนื้อเยื่อแคลลัสที่สร้างรอโวลเพียแอลคาลอยด์ในปริมาณสูงก็จะได้คัดเลือกซ้ำและเก็บไว้สำหรับงานวิจัยอื่นต่อไป.

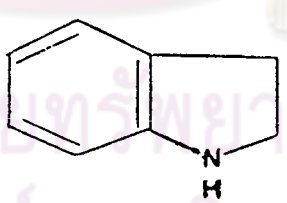
การสำรวจเอกสาร

พันธุ์ไม้ในสกุลระย่อม (Rauwolfia) เป็นที่รู้จักแพร่หลายมาเป็นเวลานาน จากหลักฐานในดัชนีคิวเวนซิส (Index Kewensis)(Woodson,1957) พบว่าเขตร้อนมีระย่อมไม่น้อยกว่า 175 ชนิด ประเทศไทยพบอยู่ 7 ชนิด (Pichon,1957;กสิน สุวัตะพันธุ์,2508) ได้แก่ Rauwolfia cambodiana Piere & Pitard, R.densiflora (ThW) Benth. ex Hook., R. membranifolia Kerr.,R. ophiorhizoides (Kurz) Ken, R. perakensis King & Gamble, R. serpentina Benth. และ R. sumatrana (Miq) Jack ชนิดที่ดูจะมีบทบาทมากที่สุดคือ R. serpentina Benth. มีชื่อสามัญว่าระย่อม(ภาพที่ 1) อยู่ในวงศ์ Apocynaceae จัดเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ประเภทไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 20-30 เซ็นติเมตรลำต้นชลูดไม่ใคร่แตกกิ่งก้าน มียางสีขาวรูปใบคล้ายใบหอก แต่ส่วนโคนใบเรียวยาวออกดอกเป็นช่อมีลักษณะเป็นหลอดหลาย ๆ อันรวมอยู่ด้วยกัน กลีบดอกผายออก

เป็นรูปแตร สีขาวอมชมพู ผลเป็นผลแฝดมีสีเขียวกลม เมื่อแก่จึงเปลี่ยนเป็นดำ อมม่วง รากฝอยมีน้อย ลักษณะของรากบิดไปบิดมาและมีรอยย่น ปลายยาวและสอบเข้าคล้ายงู จึงได้ชื่อว่า serpentina พรรณไม้นี้ชอบขึ้นภายใต้ร่มเงาไม้อื่น พบทั้งป่าดิบชื้นและป่าดิบแล้ง กสิน สุวตะพันธุ์, 2508)

ธรรมชาติทางเคมีของรอโวลเฟียแอลคาลอยด์ :

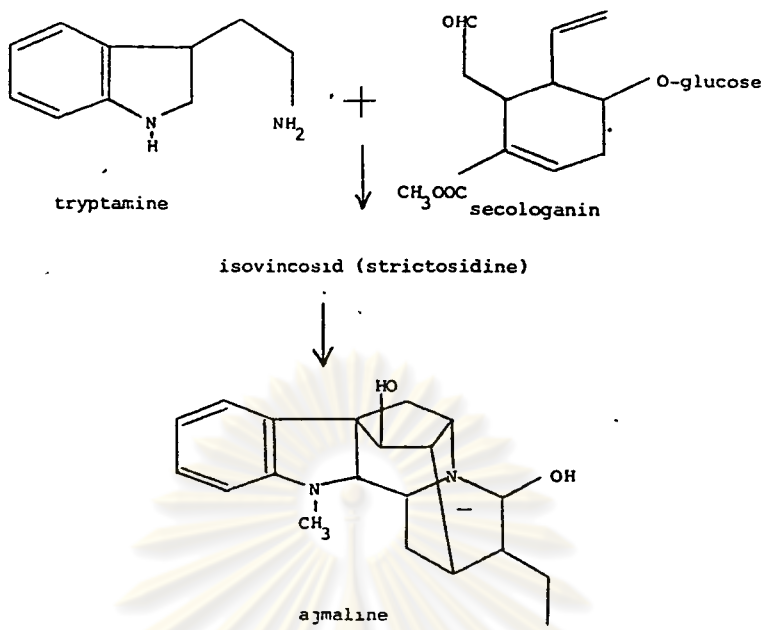
เป็นสารเคมีจำพวกเบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (nitrogenous base compound)ซึ่งมีโครงสร้างเป็น heterocyclic ring ที่ซับซ้อน จัดอยู่ในประเภทอินโดลแอลคาลอยด์ที่มี indole skeleton เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในโมเลกุล (ภาพที่ 1) มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีใน organic acid มีความไวต่อแสงสว่างเนื่องจากเกิดปฏิกิริยา photooxidation ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนไปจากเดิม นอกจากนี้ ยังสลายตัวเมื่อได้รับอุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน ดังนั้นโดยทั่วไปจึงมักเก็บแอลคาลอยด์ประเภทนี้ไว้ในขวดสีชา และนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำจะสามารถชลอการเสื่อมไปได้ระยะหนึ่ง (Pelletier,1973;Staba,1980)



ภาพที่ 1 : Indole skeleton

จากการศึกษาปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ (Staba,1980) พบว่าอินโดลแอลคาลอยด์เกิดจาก tryptophan derived tryptamine ทำปฏิกิริยากับ monotepenoid precursor ดังตัวอย่างในภาพที่ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 : ปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ของ ajmaline

จากรูปที่ 2 tryptamine ซึ่งเป็น amine ที่เกิดจากกรดอะมิโน tryptophan ทำปฏิกิริยากับ secologanin ซึ่งเป็น monoterpenoid จำพวก corynanthe type ได้เป็น isovincosid ซึ่งเป็น intermediate ที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็น ajmaline ในที่สุด (Staba,1980)

รอโวลเฟียแอลคาลอยด์นอกจากจะมีในระย่อมทุกชนิดแล้ว ยังพบในพืชสกุลอื่นด้วย เช่น สกุลพญาสัตบรรณ(Alstonia) สกุลแพงพวย(Catharanthus) หรือต่างวงศ์ เช่น สกุล Corynanthe สกุล Mitragyna ในวงศ์ Rubiaceae แอลคาลอยด์ดังกล่าวมีอยู่หลายชนิด อาทิเช่น ajmalinea,ajmalicine,corynanthine, rescinnamine, reserpiline,reserpine,reseroinaine serpentine,serpentinine,yohimbine รวมทั้งอนุพันธ์ต่างๆอีกหลายชนิด ส่วนใหญ่แอลคาลอยด์ กลุ่มนี้มีบทบาทในการรักษาโรคความดันโลหิต การเต้นของหัวใจ ตลอดจนระบบการหมุนเวียนของโลหิต ซึ่งเป็นโรคที่เป็นกันมากในประเทศไทยปัจจุบัน (อติเรก ณ ถลาง[1], อนุวัตร ลิ้มสุวรรณ[2])

---

1 : ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติเรก ณ ถลาง ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 : ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อนุวัตร ลิ้มสุวรรณ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

ประวัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อของระย่อม (Rauwolfia serpentina Benth.)

ในปี 1962 Babcock และ Carew แห่งมหาวิทยาลัยไอโอวาทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Apocynaceae หลายชนิดรวมทั้งระย่อมด้วยโดยนำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อแล้วเพาะในสภาพปลอดเชื้อจนงอกเป็นต้นกล้า แล้วย้ายกลับทั้งต้นมาเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของ White(1954) ที่เติม 2,4-D(3) 6 มก./ล และน้ำมะพร้าว 15% เก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 26±0.5 องศาเซลเซียส เมื่อเริ่มเกิดแคลลัสจึงเปลี่ยนอาหารเป็นสูตรดัดแปลงของ Lin และ Staba (1961)ที่ลด 2,4-Dลงเหลือ 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% เลี้ยงต่อไปในสภาพแวดล้อมเดิม พบว่าเกิดแคลลัสได้น้อย และอัตราการเจริญช้าไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์แอลคาลอยด์ได้ นอกจากนี้ยังมีปัญหาในการเพาะต้นกล้าด้วยเพราะเมล็ดงอกยาก มีเปลือกแข็งจึงต้องกระเทาะเปลือกออกบ้างจึงจะงอกได้ ต่อมาในปี 1973 Yoshikawa และคณะแห่งบริษัท Sankyo - dasei kogyo จำกัด ได้เลี้ยงแคลลัสในอาหาร สูตร MS(4) ที่มี IAA(5)0.1 มก./ล และ kinetin 0.2 มก./ล ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน นำยอดใหม่ที่เกิดในหลอดแก้วไปวิเคราะห์ พบว่าได้สารสกัดแอลคาลอยด์(6) ประมาณ 0.034% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งนับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับมาตรฐานของสารสกัดแอลคาลอยด์ รากระย่อมซึ่งอยู่ระหว่าง 0.8 - 1.5% ของน้ำหนักแห้ง (Vollosovich,1977)

ในปี 1977 Nikolaewaและ Vollosovich จากสถาบัน Leningrad of Chemical and Pharmaceutical Institute ได้ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญในกลุ่ม auxin ที่มีผลต่อการสะสมของมวลชีวภาพและแอลคาลอยด์ของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าอัตราการเจริญและปริมาณแอลคาลอยด์ที่ถูกสร้างขึ้นอยู่กับชนิด และความเข้มข้นของ auxin ที่ใช้ คือ ถ้าใช้ NAA (7)1 มก./ล จะลดการสังเคราะห์แอลคาลอยด์อย่างเด่นชัด ใน

---

3 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid

4 Murashige and Skoog (1962)

5 Indole acetic acid

6 crude alkaloid

7 1-Napthalene acetic acid

ขณะที่ 2,4-D ที่ความเข้มข้นเดียวกันยับยั้งการสังเคราะห์โดยสิ้นเชิง และยังพบว่า NAA ที่ความเข้มข้น 0.01- 0.05 มก/ล เพิ่มการสังเคราะห์แอลคาลอยด์ก็ได้ นอกจากนี้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวยังเจริญได้เองโดยมิต้องใส่สารควบคุมการเจริญ ต่อมาในปีเดียวกัน Nikolaewa และคณะได้ตรวจสอบการสะสมของมวลชีวภาพและแอลคาลอยด์สอบการสะสมของมวลชีวภาพ และแอลคาลอยด์โดยระบบ dynamic ในอาหารเหลวที่เลี้ยงมานาน 40 วัน พบว่าการสะสมสูงสุดของทั้งสองอย่างไม่ขึ้นกับสายพันธุ์ที่นำมาเลี้ยง ขนาดของชิ้นส่วนพืชที่ใช้เลี้ยงไม่มีผลต่ออัตราการเจริญ แต่จะมีผลโดยตรงต่อการกระตุ้นให้สร้างแอลคาลอยด์และเพิ่มมวลชีวภาพ จากการทดลองครั้งนี้เขาพบว่าสายพันธุ์ M2 เสียความสามารถดังกล่าวไปเมื่อมีการเปลี่ยนอาหาร ทำนองเดียวกับสายพันธุ์ RS/NUK ที่ลดการสังเคราะห์ลง สายพันธุ์ A พบว่าให้ผลผลิตของมวลชีวภาพและแอลคาลอยด์สูงสุด

ปีต่อมา Nikolaewa และคณะศึกษาการเจริญของเนื้อเยื่อในอาหารเหลวเพื่อคัดเลือกกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่เป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous suspensioned cells) โดยย้ายจากกลุ่มเซลล์ที่มีความละเอียดอยู่เดิม และแยกจาก กันง่าย ผลจากการตรวจสอบเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ต่างกันในด้านความละเอียด พบว่าไม่สัมพันธ์กับปริมาณแอลคาลอยด์ ต่อมาในปี 1979 Ohta และ Yalazawa จากมหาวิทยาลัย Nagoya ศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อแคลลัสต่อสารควบคุมการเจริญ ได้แก่ 2,4-D และ kinetin (8) ตลอดจนสารอินทรีย์อื่น ๆ เช่น yeast extract casein hydrolysate kinetin ตลอดจนสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น yeast casein hydrolysate และ peptone โดยการเลี้ยงแคลลัสจากชิ้นส่วนของราก และลำต้นจากต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ ลงในอาหารสูตร MS นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 สัปดาห์เพื่อชักนำแคลลัส พบว่าการเจริญของแคลลัสจะดีที่สุดเมื่อใช้ 2,4-D 1 มก./ล. รวมกับ kinetin

---

8 : 6-Furfurylamino purine

0.5 มก./ล และ yeast extract 0.1-0.2% ส่วน casein hydrolysate และ peptone ให้ผลรองลงมาสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมนี้การเจริญจะเร่มคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป แคลลัสที่ชักนำจากลำต้นมีดัชนีของการเจริญ (growth index)(9)ประมาณ 40 ส่วน แคลลัสที่ชักนำจากรากมีค่าดัชนีการเจริญประมาณ 15 จากการตรวจสอบแอลคาลอยด์และสเตอรอลโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) พบว่าแคลลัสทั้งสองกลุ่มสร้าง ajmaline และ unkhown alkaloid อีก 2-3 ชนิด ปริมาณ ajmaline อยู่ระหว่าง 0.01-0.02 % และ 0.01-0.02 % ตามลำดับ ผลของการวิจัยครั้งนี้นับว่าขัดกับผลของนักวิจัยชาวรัสเซีย 2 คนคือ Nikolaewaและ Vollosovich (1977) ที่กล่าวว่า 2,4-D ความเข้มข้น 1 มก./ล จะยับยั้งการสังเคราะห์โดยสิ้นเชิง

ในปีเดียวกันนี้ Vollosovich และคณะได้ศึกษาหาสัดส่วนที่เหมาะสมขององค์ประกอบของธาตุหลัก ที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตแอลคาลอยด์จากสายพันธุ์ A พบว่าปริมาณธาตุหลักที่เหมาะสม (มก./ล) เป็นดังนี้ KNO_3 1100, $(NH_4)_2SO_4$ 300, NH_4NO_3 500 $MgSO_4.7H_2O$ 500 $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ 900 NH_4HPO_4 600 $(NH_4)_2HPO_4$ 100 และ KCl 70 มก./ล ตามลำดับ จากสัดส่วนนี้กระตุ้นการเจริญได้ 1.3 - 2.0 เท่า ปริมาณแอลคาลอยด์เพิ่มขึ้น 1.2 - 1.8 เท่า ในปี 1980 Puchinina และคณะจากสถาบันเดียวกันกับ Vollosovich ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคและสัณฐานวิทยาในเนื้อเยื่อระย่อมสายพันธุ์ A พบว่าประกอบด้วย เซลล์พาเรนไคมา ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 30-120 ไมครอน และมีผลึกของแคลเซียมออกซาเลทและเซลล์ secretory เซลล์ระบบท่อลำเลียงและเม็ดแป้งที่ไม่มีลักษณะของก้นหอย เส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 30-120 ไมครอน และมี ผลึกของแคลเซี่ยมออกซาเลท และเซลล์ secretory เซลล์ระบบท่อลำเลียง และเม็ดแป้งที่ไม่มีลักษณะของ

---

9 : ค่าวัดการเจริญเป็นจำนวนเท่าใช้เปรียบเทียบการเจริญที่ต่างกันระหว่างกลุ่มต่อกลุ่ม

ก้นหอย เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-20 ไมครอน นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่ออายุตั้งแต่ 15 วันขึ้นไปจึงจะมีผลึกดังกล่าว หลังจากนั้นในปี 1981 Puchinina และ Vollosovich ได้นำเซลล์สายพันธุ์ A มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่อุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน แล้ววัดการเจริญพร้อมกับวิเคราะห์ทางเคมี พบว่าการเพิ่มฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ ช่วยกระตุ้นการสร้างอินโดลแอลคาลอยด์ ส่วนแมกนีเซียมซัลเฟตได้มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอลคาลอยด์ในอาหารที่มีฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์สูง แต่หากฟอสฟอรัสลดต่ำลง แมกนีเซียมจะช่วยเพิ่มแอลคาลอยด์ ในปีเดียวกันนี้ Stöckight และคณะจากมหาวิทยาลัย Ludwig-Maximilian ได้เลี้ยงเซลล์แขวนลอยที่ชักนำจากเมล็ดของระย่อมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงเลี้ยงในอาหารสูตร AP(10)ซึ่งใช้กระตุ้นการสร้างแอลคาลอยด์เป็นเวลา 13 วันจากนั้นจึงมาตรวจการสร้างแอลคาลอยด์ พบว่าเซลล์แขวนลอยทั้งสองสายพันธุ์สร้างอินโดลแอลคาลอยด์รวมทั้งหมด 12 ชนิด ในกลุ่ม ajmaline sarpagineheteroyohimbine และyohimbine type แอลคาลอยด์ที่พบมากที่สุดคือ Vomilenineในความเข้มข้น 0.2 % ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม ajmaline typeนับว่ามากกว่าที่พบเป็น minor productใน Rauwolfia vomitoriaตามธรรมชาติถึง 5 เท่า โดยที่แอลคาลอยด์นี้ไม่เคยปรากฏใน R.serpentinaเลย แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตร AP ที่สภาพแวดล้อมดังกล่าวนี้ ทำให้แอลคาลอยด์ที่พบอยู่น้อยตามธรรมชาติกลับกลายมาเป็น major product ได้ และสร้างในพืชที่ไม่เคยพบมาก่อนก็ได้ ส่วน ajmaline และ reserpine พบประมาณ 0.007 % แอลคาลอยด์อื่น ๆ พบในปริมาณน้อยมาก

ต่อมาในปี 1983 Heble และคณะจาก Bhabah Atomic Research Centerทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อจากยอด Atropa belladonna และระย่อม ซึ่งใช้ชิ้นส่วนของข้อที่โตเต็มที่จากต้นที่เลี้ยงในแปลงทดลองนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MF ที่มี MAA 0.1มก./ล และ BAP(11) 1 มก./ล บนอาหารวุ้น

---

10 : Alkaloid production medium (Zenk etal,1977)

11 : 6-Benzylaninopurine

และในอาหารเหลว เลี้ยงในที่สว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิ 25+2 องศาเซลเซียส พบว่าเกิดยอดใหม่หลายยอด การเจริญจะถึงระดับสูงสุดใน 4 สัปดาห์ ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Ohta และYatazawa (1979) นอกจากนี้น้ำหนักแห้งยังเพิ่มเป็น 11เท่าจากเดิม หลังจากวิเคราะห์แอลคาลอยด์ในยอดใหม่พบว่าได้ major product 3 ชนิดและ 1ใน 3 ชนิดนี้ ajmaline ความเข้มข้น 0.016 %ซึ่งนับว่าอยู่ในช่วงที่ Ohta และ Yatazawa เคยทำได้หลังจากนั้นเล็กน้อย Plitzner และ Stockight จากมหาวิทยาลัย Munchenได้เลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตร LS(12)ในที่มีอุณหภูมิ 25+1 องศาเซ็ลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมากรองโดยการsuction แล้วทำให้แห้งโดยไนโตรเจนเหลวเก็บที -26 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแยกสกัดเอนไซม์ พบว่าได้เอนไซม์ชนิดหนึ่งให้ชื่อ polyneuridine aldehyde esterase (PNA-esterase) ซึ่งมีความจำเพาะสูงในการเร่งการเปลี่ยน monoterpenoid ที่มีโมเลกุล C10 ไปเป็น C9 ระหว่างปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์แอลคาลอยด์ชนิด ajmaline และ sarpagine type ได้สารใหม่คือ 16-espillosimine ซึ่งเป็นสาร intermediate ที่เปลี่ยนไปเป็นแอลคาลอยด์ทั้งสองแบบ

หลังจากนั้นในปีรุ่งขึ้น Schiibel และ Stockightได้ทดลองเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตร APเป็นเวลา 18 วัน โดยใช้สภาพแวดล้อมเดียวกันกับ Pliztner และ Stockight(1983) จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบแอลคาลอยด์ พบว่าได้ชนิดใหม่มีชื่อว่า raucaffricine จัดอยู่ในประเภท glycoal-kaloid ได้ปริมาณ 0.5 ก/ล หรือ 1.57% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งนับว่ามากกว่าที่พบในธรรมชาติ คือ Rauwolfia caffra ถึง 6.4 เท่า คุณสมบัติพิเศษของแอลคาลอยด์นี้ คือ เป็น hydrophillic compound ซึ่งต่างจากรอไวเพียแอลคาลอยด์ที่มักจะเป็น hydrophobic compound นอกจากนี้แอลคาลอยด์ชนิดนี้ยังเป็น substrate ที่ดีของเอนไซม์ raucaffricine glycosidase ที่จะมาเปลี่ยนให้เป็น vomilenine ได้ (Stockight และคณะเคยพบเมื่อปี 1981) ซึ่ง vomilenine ก็มีความสำคัญในการเป็นแหล่งการสังเคราะห์ที่ดีของแอลคาลอยด์อื่น ๆ ด้วย

---

12 : Linsmaier and Skoog (1965)

กล่าวโดยสรุปความมุ่งหมายของนักวิจัยในการตรวจสอบรอโรล เฟีย แอลคาลอยด์จากกระย่อม โดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ว่าในแนวใดก็ตามก็เพื่อบรรลุวัตถุประสงค์เดียวกันคือ หาวิธีที่จะผลิตให้ได้ชนิดที่สำคัญ ๆ ในปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับความสามารถเดิมตามธรรมชาติ แต่ถึงกระนั้นการที่เนื้อเยื่อใดๆ จะผลิตแอลคาลอยด์ออกมาได้มากหรือไม่นั้น ย่อมขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเนื้อเยื่อเองและสภาพแวดล้อมที่มีอิทธิพลเช่นกัน ซึ่งย่อมส่งผลต่อขีดความสามารถในการผลิตไม่เท่ากัน มากบ้าง น้อยบ้าง หรือไม่ผลิตเลย ซึ่งถือได้ว่าเกิดการแปร – (variation) ในกลุ่มเซลล์ของเนื้อเยื่อระหว่างการเลี้ยง (Vajrabaya, 1977,Mein 1983) อาศัยหลักการและความเข้าใจที่ว่าเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงในหลอดแก้ว มักประกอบด้วยเซลล์ที่มี genotype ต่างกันหรืออาจเหมือนกันได้ แต่การแสดงออกของยีนต่างกันจึงจะเป็นเนื้อเยื่อ heterogenous (Murashige & Nakano,1967;Murashige,1974) ฉะนั้นจึงเป็นไปได้ที่ เราจะคัดเลือกหาสายพันธุ์เซลล์ (cell line) ที่มีลักษณะเฉพาะอย่างเพื่อการผลิตสารเคมีที่มีประสิทธิภาพดังที่ต้องการได้ (Widholm,1980;Watanabe และคณะ, 1982)

การแปรที่เกิดขึ้นในหลอดแก้วระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แต่เดิมมีความเชื่อกันว่าพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์ โดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเหมือนต้นต่อเดิมทุกประการ ไม่ว่าจะเป็นรูปร่าง ขนาด ผลผลิต หรือลักษณะอื่นใด ต่อมาเมื่องานวิจัยในด้านนี้เจริญมากขึ้น ทำให้ความเชื่อดังกล่าวลดลง เนื่องจากมีผู้วิจัยหลายท่านพบว่า การขยายพันธุ์โดยวิธีนี้มีโอกาสเกิดการแปรขึ้นได้ (Murashige และ Nakano,1967, Vajrabhaya และ Vajrabhaya,1974; Meins,1983) โดยเฉพาะ Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1974) เป็นกลุ่มแรกที่ได้รายงานถึงการแปรของ phenotype ในกล้วยไม้สกุล Dendrobium ซึ่งขยายพันธุ์จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ และได้ติดตามผลที่เกิดขึ้นต่อเนื่องถึงสามฤดู ส่วนใหญ่เห็นชัดจากลักษณะของดอกที่เปลี่ยนไป

การแปรอาจเกิดได้ในระดับเซลล์แคลลัส และต้นที่เจริญมาจากขบวนการสร้างอวัยวะ (organogenesis) และขบวนการสร้างเอมบริโอ(embryogenesis)(Meins และ Binns,1979 Binns,1981,Constantin,1981, Tran Thanh Van,1981; Meins,1983; Maliga,1984) สาเหตุของการแปรอาจมาจากมิวเตชั่นที่เกิดได้เอง หรือ เกิดจากการชักนำ (spontaneous or induced mutation) โดยเกิดที่โครงสร้างของ DNA ตรงตำแหน่งที่ทำหน้าที่เป็นยีนบนโครโมโซมในนิวเคลียส (Henke,1981;Maliga,1984) หรือภายนอกนิวเคลียสซึ่งเป็น DNA ที่พบอิสระภายในคลอโรพลาสท์และไมโตคอนเดรีย (Levings และ Pring,1977, Iwai และคณะ,1980; Pring และคณะ, 1981) นอกจากนี้การแปรยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย (Vajrabhaya และ Vajrabhaya,1974; Vajrabhaya,1977) มิวเตชั่นที่เกิดได้เองในหลอดแก้วอาจเกิดในอัตราที่สูงหรือต่ำก็ได้ ทั้งนี้แล้วแต่ชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อด้วยไม่ว่าจะเป็นแบบ homogeneous หรือ heterogeneous tissue

การแปรที่เกิดในเซลล์ทั่วไปภายในหลอดแก้วได้เอง โดยปราศจากการชักนำเรียกว่า somaclonal variation (Larkin และ Scowcroft, 1980,1984) ปัจจุบันมีการศึกษากันมากโดยเฉพาะในพืชเศรษฐกิจ เพราะนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพ แต่อันที่จริงแล้วปรากฏการณ์นี้ได้มีการบันทึกไว้มากว่าสองทศวรรษจากการเลี้ยงแคลลัส (Reisch,1984) การแปรของโครโมโซมเป็นมิวเตชั่นที่พบบ่อยที่สุดไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (Chromosomal change) หรือความผิดปกติของโครโมโซม (chromosomal abnormalities)(Mitra และ Steward,1961; Fox,1963;Murashige และ Nakano,1967; Heinz และคณะ,1969;Syono และ Furuya,1972; Singh และ Harvey,1975; Singh และคณะ,1975) Vajrabhaya ในปี 1977 และ Constantin ในปี 1981 เสนอว่า องค์ประกอบของอาหารโดยเฉพาะ auxin ที่มีความแรง เช่น 2,4-D และ/หรือสารอินทรีย์ที่ซับซ้อน (organic complex) เช่น น้ำมะพร้าว, yeast extract, protein hydrolysate เป็นต้น มักเป็นมิวตาเจน กระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ ซึ่งส่งผลต่อขบวนการสองขบวนการ คือ dedifferentiation และ redif-

ferentiation ของเซลล์ ผลคือมีโอกาสได้เซลล์ที่เป็น aneuploid หรือ polyploid ซึ่งมักจะทำให้สูญเสียคุณสมบัติ totipotency อีกด้วยนอกจากนี้ อายุของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ระยะเวลาของการย้ายเนื้อเยื่อ ช่วงเวลาการได้รับแสง ความเข้มของแสง ความหนาแน่นของเซลล์ สภาพของอาหาร แข็งหรือเหลว และองค์ประกอบของแก๊ซในบรรยากาศของหลอดแก้ว จัดเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ และช่วยเสริมศักยภาพทางพันธุกรรมของเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมต่างกันให้แสดงออกได้ไม่เท่ากันมากบ้าง น้อยบ้าง หรือไม่แสดงออก ดังนั้นจึงมีเซลล์ที่มีโครโมโซมเพียงบางชุดเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ดีเหนือเซลล์อื่นๆทั้งหมด ผลที่ติดตามมาจากการเกิดมิวเตชั่นก็คือได้สายพันธุ์ที่มีการแปรในลักษณะต่าง ๆ ทั้งที่เป็นประโยชน์และไม่เป็นประโยชน์ ในด้านแรกได้ช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณลักษณะพิเศษให้ผลผลิตสูง คุณภาพดี โตเร็ว ทนทานหรือต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญ(Constantin,1981;Meins,1983; Kriskorina และคณะ,1984;Maliga,1984;Reisch,1984) นอกจากนี้อาศัยคุณสมบัติ totipotency เราสามารถทำให้เซลล์ที่เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากกลายเป็นต้นที่สมบูรณ์พร้อมด้วยคุณลักษณะพิเศษตรงตามที่ต้องการเป็นปริมาณมากด้วย (Vajrabhaya,1977)ในด้านที่ไม่เป็นประโยชน์คือ อาจได้ต้นที่ด้อยคุณลักษณะ โตช้า ผลผลิตต่ำ เป็นหมัน หรือ ผิดปกติ หากเราตั้งเป้าหมายในการขยายพันธุ์เป็นปริมาณมาก การเกิดมิวเตชั่นในลักษณะหลังย่อมทำให้เกิดความเสียหายต่อจำนวนการผลิตทั้งหมด (Constantin,1981; Oono,1983)ตัวอย่างการคัดเลือกมิวแตนโดยมากมุ่งสู่การหาสายพันธุ์ที่ต้านทาน(resistance) หรือสายพันธุ์ที่ทนทาน (tolerance) เช่น ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ยาปราบวัชพืช กรดอะมิโนและ analogs ความร้อนและความหนาวเย็น หรือทนทานต่อสภาพดินเค็ม ดินเป็นกรด สภาพการขาดน้ำ และโรคต่างๆ (Widholm,1980: Maliga,1984)

ในด้านการแปรในการสร้างสารผลิตภัณฑ์ขั้นที่สอง (secondary product) กำลังเป็นที่สนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากมิวเตชั่นที่เกิดได้เอง (Tabata,1977;Zenk และคณะ,1977;Yamada และ Hashimoto,1982;Widholn,1977,1980;Meins,1983; Neumann และ Zenk,1984 เนื่องจากการแปรของ phenotypeในด้านนี้มีแบบต่างๆมากมาย ซึ่งมองเห็นความแตกต่างได้ด้วยสายตา ตัวอย่างเช่นความแตกต่างในด้านการ

สร้างรงควัตถุ ซึ่งอาจเนื่องมาจากขบวนการชีวสังเคราะห์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง เช่น สีของคลอโรฟิลล์ เป็นต้น ดังนั้นวิธีการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีจึงนับเป็นวิธีหนึ่งที่ง่ายและสะดวกต่อการคัดเลือกสายพันธุ์ของเซลล์ในหลอดแก้ว

Chaleff และ Torrey ในปี 1981 ได้อ้างถึงรายงานของ Eichenberger ที่ทำในปี 1951 เกี่ยวกับการแปรของสีในเซลล์ของแครอท พบว่าสายพันธุ์ของเซลล์ที่มีสีส้มมักเป็นกลุ่มที่มีแคโรทีนสูงซึ่งต่อมาได้มีผู้ศึกษาการแปรของสีที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์แครอทมากมาย แต่ยังไม่มีหลักฐานใดที่ยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงมีผลมาจากการควบคุมทางพันธุกรรม การคัดเลือกโดยวิธีสังเกตรงควัตถุนี้เป็นที่นิยมกันมาก เช่น สาร shikonin ซึ่งมีสีแดงจากการเลี้ยงเซลล์ของ Lithospermun erythrohizon ในทำนองเดียวกับการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ที่มีสารผลิตภัณฑ์ขั้นที่สองซึ่งมีความสัมพันธ์กับสารชนิดอื่นที่มีสีในขบวนการชีวสังเคราะห์ นับเป็นอีกวิธีอาจทำได้เช่นกัน Chaleff และ Torrey ในปี 1981 ได้อ้างถึงรายงานของ Koblitz และคณะ ในปี 1975 ที่คัดเลือกเซลล์ของ Macleaya microcarpa ซึ่งมีแอลคาลอยด์สูงโดยอาศัยเครื่องสังเกต ที่เป็นเซลล์ซึ่งมีสารสีเหลืองที่มิใช่แอลคาลอยด์ แต่เจริญปนกับเซลล์ที่มีแอลคาลอยด์ โดยพบว่าการคัดเลือกแคลลัสในลักษณะนี้จะได้กลุ่มเซลล์ที่มีแอลคาลอยด์สูง

อย่างไรก็ตามการคัดเลือกกลุ่มเซลล์ที่มีสารผลิตภัณฑ์ขั้นที่สองซึ่งไร้สีหรือลักษณะอื่น ๆ ใดที่ปรากฏแก่สายตาก็อาจทำได้เช่นกันแต่พบว่าต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูงมากในการคัดเลือก ตัวอย่างเช่น การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ของแพงพวยฝรั่ง (Catharthus roseus) ที่มี ajmalicine และ serpentine ที่สูง ตามวิธีของ Zenk และคณะ (1977) นั้น หรือการคัดเลือกเซลล์ของยาสูบตามวิธีของ Tabata และคณะ (1978) ซึ่งต้องวิเคราะห์ถึง 1,000 Clone เพียงเพื่อให้ได้ clone เดียว