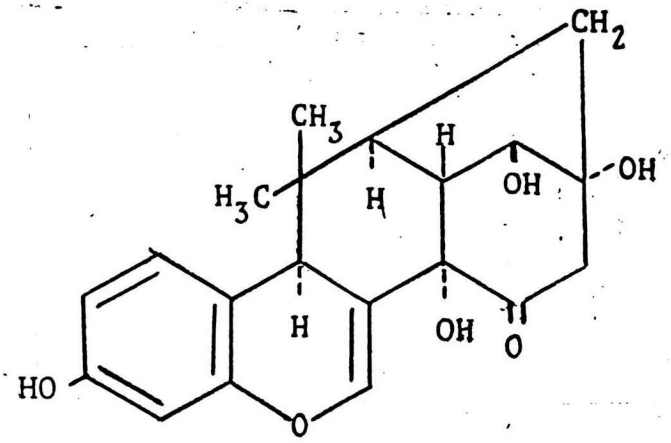
บทที่ 1

บทนำ

กวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu) เป็นพืชสมุนไพรอยู่ในวงศ์ Leguminosae พบการกระจายในป่าภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทย ลักษณะเป็นไม้เลื้อยเนื้อแข็ง อายุยืน เลื้อยพันตามต้นไม้ใหญ่ ใบเป็นใบประกอบแบบมีใบย่อยสามใบ มีรากสะสมอาหารอยู่ใต้ดิน ดอกเป็นดอกช่อ ยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ก้านดอกสั้น ดอกขนาดเล็กสีม่วง กวาวเครือขาวจะให้ดอกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคม ในระยะที่กวาวเครือขาวออกดอกจะทิ้งใบจนหมดต้น ฝักจะแก่ในช่วงปลายเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน ฝักแก่มีสีน้ำตาล ภายในมีเมล็ดเดี่ยว 2-5 เมล็ด เมื่อถึงต้นเดือนพฤษภาคม จะเริ่มแตกยอดและผลิใบใหม่ เมื่อถึงฤดูหนาวในช่วงต้นเดือนพฤศจิกายน กวาวเครือขาวจะหยุดการเจริญเติบโต และสะสมสารอาหารไว้ในรากสะสมอาหารซึ่งมีลักษณะกลมป้อมคล้ายหัวมันแกว นอกจากกวาวเครือขาวแล้ว ยังสามารถพบพืชในตระกูลใกล้เคียงกันคือ กวาวแดง (*Butea superba* Roxb.) ซึ่งมีรากสะสมอาหารใต้ดินเช่นเดียวกับกวาวเครือขาว แต่ลักษณะจะเป็นรูปเรียวยาว คล้ายหัวมันสำปะหลัง ในรากสะสมอาหารทั้งกวาวแดงและกวาวเครือขาว มีสารสะสมหลายชนิด ในกวาวแดงจะพบสารประกอบพวกสเตอรอยด์ เช่น แคมเพสเทอรอล (campesterol) , สติกมาสเทอรอล (stigmasterol) , ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (flavonoid glycosides) (ธนาธิป รักศิลป์, 2538) ส่วนกวาวเครือขาวจะพบสารประกอบในกลุ่มไอโซฟลาโวน (isoflavones) และคูเมสแทน (coumestans) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายเอสโตรเจน (Kashemsanta et al., 1963) เช่น miroestrol, daidzein, genistein, puerarin, coumestrol, mirificin, stigmasterol และ β-sitosterol (มานิดา หโยดม, 2514; Oshima et al., 1988) ยังได้มีการนำสาร miroestrol จากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวมาทดสอบพบว่า miroestrol ในปริมาณเท่ากันกับเอสโตรเจนจากมนุษย์จะก่อให้เกิดผลสองเท่าในหนูทดลอง (รวีวรรณ พิเศษปกาสิต, 2518) แต่เมื่อนำ miroestrol ที่สกัดได้มาทดสอบกับคนไข้ในประเทศอังกฤษ ปรากฏว่าเกิดผลข้างเคียง คนไข้มีอาการปวดศีรษะ ท้องเสีย เต้านมขยายขนาด และอาเจียน ถึงแม้จะลดปริมาณของ miroestrol แล้ว ผลข้างเคียงก็ยังคงมีอยู่ (Fairly, 1970) แต่เมื่อใช้สารสกัดจากราก (crude extract) กลับได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (Sukhavachana, 1941) (สูตรโครงสร้างในรูปที่ 1) นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาฤทธิ์ของกวาวเครือขาวที่มีต่อสัตว์ทดลองหลายชนิด เช่น ผลต่อการคุมกำเนิดหนู นกกระทา (Smitasiri et al., 1986)



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ Miroestrol (มานิดา, 2514)

จะเห็นได้ว่ามีความสนใจในพืชสมุนไพรชนิดนี้มานานแล้ว ทางภาคเหนือของไทยได้มีการนำรากกวาวมาบดเป็นผงผสมกับน้ำผึ้งรับประทานในหมู่สตรี มีผลทำให้ผิวพรรณเต่งตึง และบำรุงร่างกาย Ingham Tahara และ Dziedzic (1986) รายงานว่ามีการใช้กวาวเป็นยามานานแล้วในอินเดีย ไทย พม่า จีน ญี่ปุ่น บางรายงานกล่าวถึงสรรพคุณของกวาวเครือขาวว่า สามารถกระตุ้นให้เต้านมขยายขนาด ชักนำให้หญิงอายุ 60-80 ปี กลับมีประจำเดือนใหม่ ทำให้ผมงอกขึ้นมาใหม่ และเปลี่ยนสีผมจากสีเทาเป็นสีดำ นอกจากนั้นยังทำให้ร่างกายแข็งแรงและลดอาการปวดข้อ (Phya Winij Wanandorn, 1933; Jones and Pope, 1961) แต่พบว่ายังมีความเสี่ยงสูง เนื่องจากการได้รับยาเกินขนาด หรือนำพืชมาผิดชนิด จึงได้มีการวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อหาแนวโน้มในการพัฒนากวาวเครือขาวสำหรับมนุษย์ แต่ในปัจจุบันกวาวเครือขาวในสภาพธรรมชาติมีจำนวนลดลงตามพื้นที่ป่าที่ลดลง ซึ่งเกิดจากการถางป่าเพื่อการเกษตรและการขาดความรู้และใส่ใจในการอนุรักษ์ จึงควรมีวิธีขยายพันธุ์กวาวเครือขาว สำหรับตอบสนองความต้องการทางเภสัชกรรม แต่เมื่อพิจารณาวิธีการขยายพันธุ์แบบดั้งเดิมเช่น การตัดชำ มักมีข้อจำกัด เนื่องจากขยายพันธุ์ได้จำนวนน้อย และใช้เวลานาน (Apavatjrut, Kaosa-ard and Paratasilpin, 1988) นอกจากนั้นไม้เนื้อแข็งจะเกิดรากได้ค่อนข้างยากทั้งๆที่มีการใช้สารเร่งการเจริญเติบโต (Mascarenhas et al., 1989) การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดมักเกิดอุปสรรคเช่นเดียวกับพืชเมืองหนาวบางชนิด เช่น *Madhuca longifolia* var. *latifolia* ซึ่งเกิดโรคและแมลงทำลาย เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำและไม่แน่นอน (Rout and Das, 1993) หรือ *Quercus acutissima* ซึ่งจำนวนเมล็ดมีน้อย (Kim et al., 1994) นอกจากนั้นยังไม่สามารถควบคุมการแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variability) ที่ไม่ต้องการได้ ดังนั้นวิธีการขยายพันธุ์พืชผ่านทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจสำหรับการขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ให้ได้ปริมาณมากในเวลาสั้น ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย รวมถึงสามารถควบคุมและคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ (Aitken- Christie and Connett, 1992) รวมทั้งกำจัดปัญหาในการนำพืชผิดชนิดมาผลิตยาสมุนไพรได้อีกด้วย

การขยายพันธุ์พืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการที่ใช้กันแพร่หลาย ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ใช้ส่วนต่างๆเป็นชิ้นส่วน (explant) เริ่มต้นในการทดลอง เช่น ข้อ ใบ ยอด ตาข้าง เมล็ด ไฮโปคอททิล (hypocotyl) กลีบดอก ละอองเกสรตัวผู้ หรือแม้แต่ราก พืชแต่ละชนิดจะมีชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ต่างๆกัน โดยเฉพาะไม้เนื้อแข็ง ซึ่งมีอัตราการขยายพันธุ์ต่ำ (Merkle, 1995) ใน *Lonicera japonica* ซึ่งเป็นไม้ประดับเมืองหนาวที่เป็นไม้เนื้อแข็งจะใช้แคลลัสที่กระตุ้นได้จากส่วนใบและราก (Georges, Chenieux and Ochatt, 1993) ส่วน European Spindle Tree จะใช้ zygotic embryo (Bonneau, Beranger-Novat and Monin, 1994) หรือ *Aesculus hippocastanum* จะใช้ก้านของอับละอองเรณู (anther filament) (Jorgensen,1989, 1991) นอกจากนั้นอายุของชิ้นเนื้อเยื่อก็มีผลต่อความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วย ในพืชไม้เนื้อแข็งพบว่าเนื้อเยื่อที่ได้จากต้นอ่อนหรือเมล็ดจะง่ายต่อการขยายพันธุ์และเกิดการปนเปื้อนน้อยกว่าเนื้อเยื่อที่ได้จากต้นโตเต็มวัย (Aitken-Christie and Connett, 1992) ใน white spruce พบว่าต้นอ่อนที่มีอายุ 7 - 8 วันเท่านั้น ที่สามารถใช้เป็นชิ้นเนื้อเยื่อสำหรับกระตุ้นให้เกิดต้นใหม่ได้ (Toivonen and Kartha, 1988) ส่วน Wirjodarmodjo, Poernomo และ Adiningrat (1988) รายงานว่า ในไม้สัก ถ้าใช้ตาที่เจริญเต็มที่จะต้องทำลายระยะพักตัวของตาด้วยไซโตไคนินเสียก่อน แต่ถ้าใช้ตาอ่อนไม่ต้องใช้ไซโตไคนิน ในพืชตระกูลถั่วเนื้อแข็งพบว่าระยะของการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อมีผลต่อความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) (Arrillaga, Tobolski and Merkle, 1994)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชก็มีส่วนสำคัญในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเช่นเดียวกัน กลุ่มที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมีสองกลุ่มคือ ออกซิน (auxin) เช่น 2,4-D , IAA , NAA , IBA เป็นต้น และไซโตไคนิน (cytokinin) เช่น BAP, adenine, kinetin, zeatin เป็นต้น พืชแต่ละชนิดจะมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน เช่น ในการกระตุ้นพืชพวกจิมโนสเปิร์ม จำพวกแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) หรือไม้สนเมืองหนาวให้เกิดต้นใหม่ จะใช้ 2,4-D มากที่สุด ส่วน BAP จะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดออร์แกโนเจนนิซิส (organogenesis) ในพืชตระกูลถั่ว รองลงมาคือ kinetin zeatin และ adenine ตามลำดับ (Shiva Prakash, Deepak and Neera, 1994) TDZ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ไซโตไคนิน มักจะใช้สำหรับกระตุ้นให้เกิดการเติบโตขยายจำนวนของตาข้างในเนื้อเยื่อไม้เนื้อแข็ง (Huetteman and Preece, 1993) ในพืชตระกูล *Vitis* Matsuta และ Hirabayashi (1989) (อ้างถึงใน Arrillaga และคณะ , 1994) พบว่าจะเกิด

เอมบริโอเจนิก แคลลัส (embryogenic callus) ได้โดยเติม 2,4-D แต่เมื่อต้องการกระตุ้นให้เอมบริโอเจนิก แคลลัสนี้เกิดโซมาติกเอมบริโอ จะต้องย้ายแคลลัสลงในอาหารใหม่ที่ไม่มี2,4-D ส่วนในจามจุรี (*Albizzia lebbeck* L.)ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่เป็นไม้ยืนต้น พบว่าถ้าไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารที่เลี้ยงจะเกิดเอมบริโอเจนนิซิส แต่ถ้าใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตจะเกิดออร์แกโนเจนนิซิสแทน (Gharyal and Maheshwari, 1981)

ในการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีสองวิธีที่แตกต่างกันคือโซมาติกเอมบริโอเจนนิซิส และออร์แกโนเจนนิซิส โดยมีรูปแบบต่างกันดังนี้

Somatic embryogenesis เป็นการเกิดต้นแบบ bipolar

explant ⟶ callus ⟶ embryoid ⟶ plantlets

Organogenesis เป็นการเกิดต้นแบบ unipolar

explant ⟶ axillary bud, adventitious bud ⟶ multiple shoots ⟶ roots ⟶ plantlets

โซมาติกเอมบริโอเจนนิซิส มีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเทียบกับการขยายพันธุ์โดยวิธีอื่น คือมีอัตราการขยายพันธุ์สูงมาก มีศักยภาพในการที่จะพัฒนาให้เลี้ยงใน liquid culture มีความสม่ำเสมอในการผลิตเมล็ดพันธุ์ในรูปเมล็ดเทียม รวมถึงค่าใช้จ่ายต่อหน่วยที่ถูกกว่า (Merkle, 1995)

แต่เมื่อพิจารณาเนื้อเยื่อพืชไม้เนื้อแข็งซึ่งโดยปกติยากต่อการขยายพันธุ์โดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่ออยู่แล้ว (Rout and Das, 1993) การขยายพันธุ์ผ่านทางวิธีโซมาติก เอมบริโอเจนนิซิสจึงยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น อัตรารอดในการออกปลูกยังคงต่ำ ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดโซมาติกเอมบริโอจากต้นที่โตเต็มที่แล้วได้ นอกจากนั้นการเกิดต้นพืชผ่านทางโซมาติกเอมบริโอยังมีอัตราต่ำ (Merkle, 1995) แต่มีรายงานว่าในพืชไม้เนื้อแข็งจะประสบผลสำเร็จทางด้านออร์แกโนเจนนิสมากกว่า Thorpe, Harry และ Kumar (1991) รายงานว่ามีการขยายพันธุ์พืชไม้เนื้อแข็งจำพวกสน (Conifer) , Triploid Aspen และ Long Leaf Pine สำเร็จได้โดยผ่านทางวิธีออร์แกโนเจนนิซิส Aitken-Christie และ Connett (1992) ยังกล่าวว่าออร์แกโนเจนนิซิสเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ได้ผลดีสำหรับไม้ป่าเนื่องจากมีความเสี่ยงต่อความไม่เสถียรทางพันธุกรรมต่ำ (Rao and Lee, 1986)

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นอกจากอาหารสูตรมาตรฐานและสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้ว ยังพบว่าสารอินทรีย์เสริมที่เติมลงไปในอาหาร เช่น กลูตามีน (glutamine) กล้วยหอม มันฝรั่ง ปุ๋ยปลา น้ำมะพร้าว ฯลฯ มีส่วนช่วยให้เกิดการเกิดต้นใหม่ดีขึ้น สิวลัย สุเภากิจ (2536) รายงานว่า การเติมกล้วยหอมหรือมันฝรั่งลงในอาหารสูตรดัดแปลง SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) สำหรับเลี้ยงต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวาย จะทำให้เจริญเติบโตดีขึ้นถึงสามเท่า ส่วนในข้าวพันธุ์ กข.23 พบว่าถ้าเติมเนื้อมะเขือเทศและปุ๋ยปลาลงในอาหารสูตร MN6 จะชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้มากกว่าเดิม (สุดารัตน์ นิติวัฒนะ, 2536) ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของแปะก๊วย ในอาหารสูตร BN (Bourgin and Nitsch medium) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ใส่น้ำมะพร้าวพบว่าจะเกิดเอมบริโอ 165-1900 เอมบริโอต่อลิตร (Laurain, Chenieux and Tremouillaux-Guiller,1993) Siemens และคณะ (1993) รายงานว่าในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Arabidopsis thaliana* ใน Nitsch medium ที่เติมน้ำมะพร้าวจะกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ดีที่สุด ในพริกไทยพบว่าการใช้น้ำมะพร้าวร่วมกับ 2,4-D จะชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอได้โดยตรง (Binzel et al., 1996) ยังมีรายงานว่าเมื่อเลี้ยงแคลลัสของพืชตระกูลส้ม (*Citrus*) สามสปีชีส์ (species) ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมน้ำส้ม 10% (v/v) จะทำให้เกิดการเจริญเติบโตดีขึ้น (Duran-Vila, Ortega and Navarro, 1989) ในพืชตระกูลกล้วยไม้หลายชนิดได้เติมสารอินทรีย์เสริมลงในอาหารเพื่อใช้ในการเพาะเมล็ด Meyer (1945) ใช้น้ำมะเขือเทศเติมลงในอาหารสูตร Knudson เพื่อเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Cattleya, Oncidium, Epidendrum* ฯลฯ พบว่าได้ผลดี Vacin และ Went (1949) เติมน้ำมะเขือเทศลงในอาหารสำหรับเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* มีผลทำให้ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดดีขึ้นกว่าเดิม

สำหรับในเนื้อเยื่อพืชไม้เนื้อแข็ง การศึกษาเกี่ยวกับสารอินทรีย์เสริมยังคงอยู่ในวงจำกัด รวมถึงการใช้สารอินทรีย์เสริมเพื่อชักนำให้เกิดต้นใหม่ หรือใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรมาตรฐาน ดังนั้นคาดว่าการใช้สารอินทรีย์เสริมอาจเป็นแนวทางที่น่าสนใจในการพัฒนาสูตรอาหาร สำหรับไม้เนื้อแข็งได้ต่อไป

การปลูกพืชในแปลงปลูกเป็นอีกหนทางหนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการกวาวเครือขาวในปริมาณมาก ในพืชไม้เนื้อแข็งบางประเภท เช่น สัก ยูคาลิปตัส ได้มีการนำต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาทดลองปลูกในแปลงทดลอง พบว่ามีอัตราการรอดสูง รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตและให้ดอกรวดเร็วกว่าต้นตามสภาพธรรมชาติ (Mascarenhas et al., 1987) การปลูกพืชในแปลงปลูกยังเป็นการทดสอบลักษณะบางประการของต้นพืชที่ไม่สามารถแสดงออกได้ในหลอดแก้ว เช่นการเกิดดอก การเกิดผล หรือการเกิดรากสะสมอาหาร Merkle (1995) กล่าวว่า

ยังมีความจำเป็นที่ต้องทดลองปลูกพืชในสถานที่จริงเพื่อทดสอบ clone ของพืชนั้นในแปลงปลูก และคัดเลือกลักษณะที่ต้องการสำหรับใช้ประโยชน์ต่อไป

สำหรับกวาวเครือขาว ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ของไทย ได้มีการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับสารอาหารและเงื่อนไขที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์โดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (กนกพร สมพรไพลิน, 2538) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์กวาวเครือขาวให้ได้ผลผลิตมากกว่าเดิมเพื่อเพิ่มจำนวนสำหรับการอนุรักษ์ และใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม นอกจากนั้นยังมุ่งศึกษาในด้านปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมสารทุติยภูมิของพืชชนิดนี้ในแปลงทดลองเทียบกับธรรมชาติ เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นในการเพาะปลูก เพื่อประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรมและเชิงพาณิชย์ต่อไป

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

1. เพื่อพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ และการเกิดต้นอ่อนโดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของกวาวเครือขาว
2. เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการสะสมสารภายในรากสะสมอาหารของพืชที่เลี้ยงในแปลงทดลอง สำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปลูกพืชชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสารที่สะสมภายในรากสะสมอาหารที่ได้จากพืชในแปลงปลูกกับรากสะสมอาหารธรรมชาติ