บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันพืชยังคงเป็นแหล่งที่มาของสารที่ใช้เป็นตัวยา และสารเคมีเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจากสารต่าง ๆ ดังกล่าวนี้มักมีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน ยากต่อการสังเคราะห์ขึ้นเอง หรือสามารถสังเคราะห์ได้แต่ต้นทุนสูง สารเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ ซึ่งไม่จำเป็นต่อการดำรงอยู่ของพืชโดยตรง แต่มีประโยชน์อย่างมากต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ การนำสารทุติยภูมิมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น นอกจากต้องคำนึงถึงขั้นตอนการสกัด และการแปรรูปที่เหมาะสมแล้ว การสร้างสภาวะให้พืชสามารถผลิตสารได้มากขึ้นยังเป็นสิ่งสำคัญที่ไม่ควรมองข้าม เช่น การปรับปรุงสายพันธุ์ การจัดปลูก การบำรุงรักษา เป็นต้น อย่างไรก็ตามการปลูกเก็บแบบธรรมดา เพื่อปรับปรุงให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นทำได้ยาก เนื่องจากมีข้อจำกัดในด้านการขยายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ ปัญหาความไม่แน่นอนของสภาวะแวดล้อม ตลอดจนต้องใช้พื้นที่มากในการเพาะปลูก นักวิทยาศาสตร์คิดว่าเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชน่าจะแก้ปัญหานี้ได้ จะเห็นได้จากงานวิจัยที่ปรากฏมากขึ้นในเรื่องการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อบางส่วนของพืช เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ งานวิจัยส่วนใหญ่ยังพบว่าปริมาณสารทุติยภูมิที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชนั้นมักมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณสารที่พบในต้นที่ปลูกในธรรมชาติ แม้ว่าจะมีการพยายามคัดเลือก cell line สูตรอาหาร การเติมสารที่เป็น precursor การเติมสารที่เป็น elicitor ตลอดจนการปรับสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสมแล้วก็ตาม (Tabata และคณะ, 1972 และ Yamada และ Hashimoto, 1982)

ในระยะ 6 ปีที่ผ่านมานี้ นักวิทยาศาสตร์ได้พบบทบาทสำคัญยิ่งของรากชนิดหนึ่งคือ hairy root ในการผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่ง hairy root เริ่มเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์มาก่อนหน้านี้ เนื่องจากพบว่ามีกลไกการเกิดคล้ายคลึงกับ crown gall tumorในระยะ 10 ปีหลังนี้ จึงปรากฏงานวิจัยทางด้าน molecular genetics เพื่อหาสาเหตุ และกลไกการเกิด hairy root ขึ้นหลายฉบับ จนเป็นที่แน่ชัดว่า hairy root เป็นผลจากการย้ายยีน T-DNA ของ Ri plasmid ที่อยู่ใน Agrobacterium rhizogenes ภายหลังเกิด infection ระหว่าง A. rhizogenes กับพืชบางชนิด โดยมีกลไกภายในระหว่างการย้ายยีน เทียบเคียง

ได้กับการเกิด crown gall tumor ซึ่งเป็นผลจากการย้ายยีน T-DNA ของ Ti plasmid ใน Agrobacterium tumefaciens ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีมานานแล้ว (Chilton, 1982 และ Huffman และคณะ, 1984) และด้วยคุณสมบัติพิเศษของ hairy rootในการมีศักยภาพต่อการผลิตสารทุติยภูมิ ทำให้ความคาดหวังในการผลิตสารทุติยภูมิขึ้น โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกลับมีแนวทางที่น่าจะเป็นไปได้มากขึ้นกว่าเดิมมาก -ในระยะ 6 ปีมานี้จึงปรากฏผลงานการเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root เพื่อผลิตสารทุติยภูมิมากขึ้นโดยเฉพาะสารประเภทแอลคาลอยด์ซึ่งส่วนใหญ่มีคุณสมบัติทางยา และให้ประโยชน์อย่างมากต่อวงการแพทย์ (Hamill,1986 ; Payne และคณะ, 1987 และ Christen และคณะ, 1989) สารแอลคาลอยด์ประเภท tropane เป็นแอลคาลอยด์ประเภทหนึ่งที่นับว่าให้ประโยชน์สูงต่อวงการแพทย์ กล่าวคือ มีฤทธิ์ไปลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ได้แก่ atropine hyoscyamine และ scopolamine เป็นต้น แอลคาลอยด์ประเภทนี้พบได้ทั่วไปในพืชวงศ์ Solanaceae เช่น Scopolia japonica Atropa belladonna Datura candida Datura stramonium Duboisia leichhardtii เป็นต้น (วันดี กฤษณพันธ์ และนพมาศ สรรพคุณ 2533; Leete, 1979) ซึ่งพืชดังกล่าวเหล่านี้มีรายงานการวิจัย การเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งจากส่วนต่าง ๆ ของต้น และจาก hairy root มาบ้างแล้ว และพบว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ให้ผลในการผลิตสารแอลคาลอยด์ได้ดีกว่าอย่างเห็นได้ชัด (Hamill และคณะ, 1987)

Datura metel Linn. syn. Datura fastuosa Linn(เต็ม สมิตินันท์, 2523; Sastri, 1952) หรือลำโพงกาสลัก เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งในวงศ์ Solanaceae เป็นไม้พุ่ม ใบเป็นรูปสามเหลี่ยมรูปไข่ ฐานของแผ่นใบไม่เท่ากัน ขอบใบหยัก ดอกสีม่วงรูปแตร ผลกลม มีปุ่มแหลม ผลิตแอลคาลอยด์ในกลุ่ม tropane และสามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย จึงเป็นพืชที่น่าสนใจที่จะนำมาวิจัย ในฐานะเป็นพืชสมุนไพรของไทย และให้แอลคาลอยด์ที่สำคัญซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ และขอบเขตของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการชักนำให้เกิด hairy root
2. เพื่อศึกษาการเจริญของ hairy root ในสภาวะต่าง ๆ
3. เพื่อศึกษาผลของการผลิตสารแอลคาลอยด์จาก hairy root

สำรวจเอกสาร

ประวัติการศึกษา hairy root

Hairy root เป็นโรคชนิดหนึ่งในพืชชั้นสูง อ้างถึงครั้งแรกโดย Steward และคณะ ในปี 1900 (อ้างถึงโดย De Cleene และ De Ley, 1981) มีลักษณะเป็นกลุ่มรากเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่ง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Agrobacterium rhizogenes อยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae วงศ์เดียวกับ Agrobacterium tumefaciens และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก มีลักษณะเป็นแท่งสั้น และเคลื่อนที่โดยใช้แฟลคเจลลา (De Ley และคณะ, 1966)

โดยทั่วไป hairy root เกิดขึ้นเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่ จากการสำรวจ host range ของโรคนี้ในปี 1981 โดย De Cleene และ De Ley โดยการชักนำให้เกิด hairy root จากเชื้อ A. rhizogenes สายพันธุ์ TR7 ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 16 ชนิด ไม่พบการเกิด hairy root ในพืชทั้ง 16 ชนิดนี้ แต่ในพืชใบเลี้ยงคู่ 202 ชนิด เกิด hairy root ได้ถึง 37 ชนิด จาก 30 สกุล 15 วงศ์ ต่อมาในปี 1988 Mugnier ได้ทำการสำรวจในลักษณะเดียวกัน โดยใช้ A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 พบว่าสามารถชักนำให้เกิด hairy root ในพืชใบเลี้ยงคู่ 40 ชนิด แต่ไม่ประสบความสำเร็จในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นกัน อย่างไรก็ตามการเกิด hairy root มิได้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชเท่านั้น หากยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีก ได้แก่ สายพันธุ์แบคทีเรีย ดังเห็นได้จากในรายงานของ De Cleene และ De Ley (1981) ซึ่งไม่สามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้ใน Atropa belladonna โดยการใช้ A. rhizogenes สายพันธุ์ TR7 แต่ Mugnier (1988) สามารถชักนำได้ในพืชชนิดเดียวกันนี้โดยการใช้ A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 และจากรายงานของ David และ Tempe (1988) โดยการชักนำให้เกิด hairy root ใน Brassica oleracea L. โดยใช้ A. rhizogenes 5 สายพันธุ์ คือ A4 15834 8196 TR101 และ TR7 พบว่าสายพันธุ์ A4 และ 15834 ซึ่งเป็น agropine type ให้ผลการชักนำดีกว่า 8196 TR101 และ TR7 ซึ่งเป็น mannopine type ในปีถัดมา Brillanceaer , David และ Tempe (1989) ได้ทำการทดลองในทำนองเดียวกันคือ ชักนำให้เกิด hairy root ใน Catharanthus roseus G. Don (แพงพวยฝรั่ง) โดยใช้ A. rhizogenes 5 สายพันธุ์ คือ 8196 TR101 15834 HRI และ A4 พบว่าสายพันธุ์ 15834 ให้ผลการชักนำดีที่สุด รองลงมาคือ HRI และ A4 ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์จัดอยู่ใน agropine type ส่วนสายพันธุ์ 8196

และ TR101 ซึ่งเป็น mannopine type ไม่สามารถชักนำให้เกิด hairy rootได้แต่แสดงผลของการติดเชื้อในลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณนั้นบวมขึ้นจากปกติ นอกจากนี้การเกิด hairy root ยังเกี่ยวข้องกับชนิดของเนื้อไม้ พบว่าไม้เนื้อแข็งค่อนข้างยากต่อการชักนำให้เกิด hairy root อันเนื่องมาจากสารจำพวก phenolic compound ซึ่งออกมาจากรอยตัดตลอดจนอายุและสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ก็มีผลเช่นกัน (Mugnier, 1988)

Hairy root เป็นรากที่มีลักษณะการเจริญบางประการแตกต่างไปจากรากปกติทั่ว ๆ ไป คือ มีสาขามาก สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตและไม่มีทิศทางการเจริญที่แน่นอน (Tanaka และคณะ, 1985 ; Ooms และคณะ, 1985 ; Noda และคณะ, 1987 ; Mugnier, 1988) ในขณะเดียวกัน hairy root ก็ยังคงทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับรากปกติ คือ สามารถดูดอาหารไปเลี้ยงลำต้นได้ตามปกติ โดยจากการทดลองของ Tanaka และคณะ (1985) ได้ชักนำให้เกิด hairy root ในรากสะสมอาหารของ Brassica napus L. ทางด้านตรงข้ามกับด้านที่เกิดยอด หลังเกิด hairy root แล้วพบว่า hairy root สามารถดูดอาหารไปเลี้ยงส่วนยอดให้เจริญได้อย่างเต็มที่เช่นเดียวกับรากปกติ

นอกจากนี้ยังพบเสมอว่า hairy root นั้นสามารถเจริญกลับไปเป็นต้นใหม่ (regeneration) ได้โดยง่าย ดังปรากฏในรายงานการวิจัยดังต่อไปนี้ คือ ในปี 1984 Tepfer พบว่า Hairy root ของยาสูบ และ Convovulus arvensis สามารถเกิดเป็นต้นได้เอง และสามารถชักนำ hairy root ของแครอทให้เกิดต้นโดยผ่าน somatic embryogenesis ได้ transformed plant ที่ได้มีลักษณะโดยทั่วไป คือ รากเจริญได้รวดเร็ว apical dominance ในรากและลำต้นลดลง ใบเป็นคลื่น (wrinkled leaves) สัดส่วนความกว้างต่อความยาวของใบเพิ่มขึ้น ลักษณะที่แตกต่างไปตามชนิด คือ เกิดการแตกแขนงของรากออกมาในลักษณะตั้งฉาก (root plagiotropism) การผลิตเมล็ดลดลงในยาสูบ และแครอท รูปร่างของดอกยาสูบเปลี่ยนไป เป็นต้น อย่างไรก็ตาม transformed plant ของยาสูบและแครอทสามารถให้ลูกหลานในรุ่นต่อๆไปได้ และพบว่าการถ่ายทอดลักษณะที่ผิดปกติเหล่านี้เป็นไปตามกฎของ Mendel

ต่อมาปี 1985 Ooms และคณะสามารถชักนำให้เกิดต้นจาก hairy root ของ Solanum tuberosum cv. Desiree ซึ่งเกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ LBA9402 โดยเลี้ยง hairy root ในอาหารสูตร MS ที่ให้ 2,4-D 0.12 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ

zeatin 2 มิลลิกรัม/ลิตร ในการชักนำให้เกิดแคลลัส และเลี้ยงแคลลัสต่อในอาหารสูตรเดิมที่ให้ BAP 2.25 ไมโครกรัม/ลิตร ร่วมกับ GA_3 10 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส หลังจากขยายพันธุ์โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อระยะหนึ่ง จึงนำต้นที่ได้ปลูกลงดิน พบว่าระยะแรกเจริญได้เร็วกว่าต้นปกติ 3 เดือนต่อมาจึงเจริญได้พอ ๆ กับต้นปกติ transformed plant นี้ ใบมีลักษณะเป็นมันและเป็นคลื่น รากมีสาขามากและมีการตอบสนองต่อแรงดึงดูดของโลกลดลง ลักษณะหัวยาวและมีตามากกว่าปกติ

ปี 1986 Wei, Kamada และ Harada ใช้ A. rhizogenes สายพันธุ์ 15834 ชักนำให้เกิด hairy root จากโปรโตพลาสต์ของ Solanum nigrum L. เกิดการเจริญเป็นแคลลัสได้ในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญ และชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ในอาหารสูตรเดียวกันที่มี zeatin 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเกิดเป็นต้นได้ถึง70 % แต่ยังไม่สามารถปลูกลงดินได้

ปี 1987 Noda และคณะใช้ A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 ชักนำให้เกิด hairy root ใน Armoracia lapathifolia Gilib พบว่า hairy root สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญ หลังจากย้าย hairy root จากที่มืดไปเลี้ยงในที่สว่าง 1 สัปดาห์ transformed plant ที่ได้มีลักษณะใบเป็นคลื่น และหลังจากเลี้ยงลงดินแล้ว 6 เดือน พบลักษณะราก 2 แบบคือ มีเฉพาะรากฝอย และที่มีทั้งรากฝอยและรากสะสมอาหาร นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำชิ้นใบของ transformed plant มาเลี้ยงมีการเจริญของรากที่มีลักษณะเช่นเดียวกับ hairy root และเมื่อนำรากใหม่ที่ได้ไปชักนำให้เกิดเป็นต้น ก็ได้ต้นที่มีลักษณะเช่นเดียวกับ transformed plant เช่นกัน ในปีเดียวกันนี้ Petit และคณะ (1987) ชักนำให้เกิดต้นจาก hairy root ของ Lotus corniculatus ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 8196 และ 15834 พบว่าแสงเป็นปัจจัยสำคัญในการชักนำให้เกิดต้น โดยเมื่อเลี้ยง hairy root ในอาหารสูตร Monier ซึ่งไม่มีสารควบคุมการเจริญ ในที่มีแสงตลอดเวลา พบว่าเกิดยอดได้เอง และหลังจากชักนำรากจากยอดที่ได้ในอาหารสูตรเดิมแล้วสามารถปลูกลงดินได้เช่นเดียวกับพืชปกติ และในปีนี้เช่นกัน Guerche และคณะสามารถชักนำให้เกิดต้นจาก hairy root ของ Brassica napus ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 พบว่าการชักนำให้เกิดต้นขึ้นกับปัจจัย 3 อย่าง คือ ความเข้มข้นของ 2,4-D ช่วงเวลาของการเลี้ยง hairy root ใน pre-culture media ก่อนเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้น และแต่ละ clone ของ hairy root ที่เกิด transformed

plant มีลักษณะใบหงิกงอ และ ลำต้นสั้น และจากการตรวจสอบโครโมโซมพบว่ามีจำนวน 2x=38 เท่ากับต้นปกติ และการถ่ายทอดลักษณะผิดปกติไปยังลูกหลานเป็นไปตามกฎของ Mendel ซึ่งผลงานนี้สนับสนุนผลงานวิจัยของ Tepfer (1984)

ปี 1988 Nakamura และคณะพบว่า hairy root ของ Nicotiana tabaccum var. Samsum ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 สามารถเกิดเป็นต้นได้เองในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญ ได้ transformed plant มีลักษณะลำต้นสั้นและใบเป็นคลื่น สามารถเจริญจนสืบพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไซเลมมีการพัฒนาดีกว่าปกติอีกด้วย ถัดมาในปีเดียวกัน David และ Tempe พบว่า hairy root ของ Brassica oleracea L. var. Botrylis ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 8196 สามารถเกิดเป็นต้นได้เอง ได้ transformed plant ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับต้นที่ได้จาก hairy root ทั่ว ๆ ไป และต้นที่มีลักษณะปกติ เมื่อนำต้นผิดปกติไปปลูกพบว่า 5 เดือนแล้ว ยังไม่ออกดอกและตายในที่สุด และปีเดียวกันนี้เช่นกัน Mugnier พบว่าสามารถชักนำ hairy root ของ Anagallis arvensis และ Antirrhinum majus ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 ให้เกิดเป็นต้นได้เช่นเดียวกันในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญ transformed plant ที่เกิดจาก Anagallis arvensis มีการเจริญเป็นปกติ แต่ไม่ออกดอกในวันยาวซึ่งต่างจากเดิมส่วน transformed plant ของ Antirrhinum majus มีลักษณะใบเป็นคลื่น ปล้องสั้น มีสีเขียวเข้ม

เห็นได้ว่า hairy root สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ง่าย ต่างไปจาก crown gall tumor ที่เกิดจาก A. tumefaciens ซึ่งเกิดต้นได้ค่อนข้างยาก คุณสมบัติข้อนี้ของ hairy root เป็นผลดีต่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป เพราะนอกจากเกิดต้นได้ง่ายแล้วยังสามารถถ่ายทอดลักษณะไปยังลูกหลานได้อีกด้วย ซึ่งต่อไปอาจนำวิธีทางพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ในทำนองเดียวกับ A. tumefaciens ซึ่งมีการทดลองมาก่อนแล้ว โดยการนำเอายีนที่ต้องการมาตัดต่อในบริเวณ T-DNA ของ Ri-plasmid ของ A. rhizogenes แล้วทำให้เกิด transformation ย้ายยีนที่ต้องการนี้เข้าสู่เซลล์พืช และนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้นที่มีลักษณะที่ต้องการและถ่ายทอดลักษณะนั้นไปยังรุ่นต่อไปได้ แม้ที่สุดไม่มีการตัดต่อยีนอื่นเข้าไป แต่หาก hairy root นั้นสามารถเจริญอย่างรวดเร็วและผลิตสารทุติยภูมิสูงกว่าปกติ และสามารถชักนำให้เป็นต้นได้ อาจได้ต้นที่มีคุณสมบัติผลิตสารทุติยภูมิได้สูงเช่นกัน จึงนับได้ว่าคุณสมบัติการเกิดเป็นต้นใหม่ของ hairy root เป็นข้อได้เปรียบที่สำคัญประการหนึ่ง และเป็นสิ่งจูงใจให้นัก

วิทยาศาสตร์หันมาให้ความสนใจศึกษา A. rhizogenes มากขึ้น และพยายามนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในทำนองเดียวกับ A. tumefaciens เนื่องจากได้มีการศึกษาในระดับโมเลกุลแล้วว่า A. rhizogenes และ A. tumefaciens มีความคล้ายคลึงกันมาก (รายละเอียดอยู่ในสาเหตุ และกลไกการเกิด hairy root)

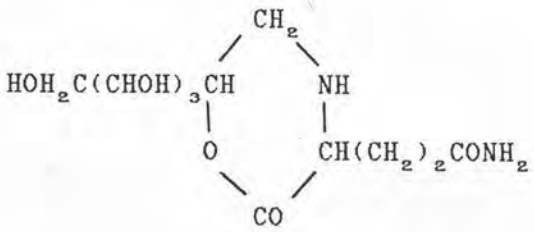
สาเหตุและกลไกการเกิด hairy root

ในระยะ 10 ปีมานี้ นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจศึกษาหาสาเหตุและกลไกการเกิด hairy root มาโดยตลอด ทั้งนี้เพื่อหวังจะนำความเข้าใจที่ได้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทางพันธุวิศวกรรมต่อไป ในทำนองเดียวกับ A. tumefaciens ที่ในปัจจุบันสามารถถูกดัดแปลงให้เป็นพาหะนำยีนที่ต้องการสู่ genome ของพืชเพื่อวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งจากการศึกษามาโดยตลอดนี้พบว่า A. rhizogenes และ A. tumefaciens มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก

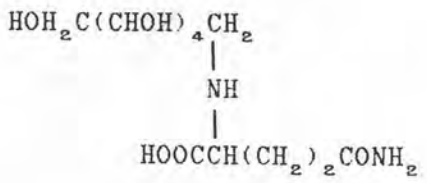
ในปี 1982 Chilton และคณะ พบว่าพืชเกิด hairy root บริเวณที่ติดเชื้อ A. rhizogenes เป็นผลจากการย้ายยีนบางส่วน คือ T-DNA (Transfer-DNA) จากพลาสมิดขนาดใหญ่ คือ Ri plasmid (Root inducing plasmid) เข้าสู่ genome ของพืช โดยเขาได้แยก DNA จากเนื้อเยื่อ hairy root ของแครอทซึ่งเกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 8196 นำไปทำ DNA hybridization กับ DNA ที่แยกจาก Ri plasmid ของ A. rhizogenes สายพันธุ์ 8196 พบการจับคู่ของ DNA จาก Ri plasmid กับ บางส่วนของ DNA ของ hairy root แสดงว่ามี homologous DNA เป็นการพิสูจน์ว่ามี DNA จาก Ri plasmid ย้ายเข้าไปอยู่ใน genomeของพืช และในปีเดียวกันนี้ Willmitzer และคณะ ได้รายงานผลการทดลองที่ได้ผลในทำนองเดียวกันนี้ โดยเขาได้แยก RNA จากเนื้อเยื่อ hairy root ของมันฝรั่งและมะเขือเทศซึ่งเกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 15834 แล้วสร้าง DNA โดยใช้ RNA ที่แยกได้นี้เป็นแม่แบบแล้วใช้เอนไซม์ reverse transcriptase นำไปทำ DNA hybridization กับ DNA จาก Ri plasmid ของ A. rhizogenes สายพันธุ์ 15834 และพบการจับของ DNA ทั้งสองเช่นกัน ทั้งสองการทดลองแสดงถึงผลที่สอดคล้องกัน คือ hairy root เกิดขึ้นจากการย้ายชิ้นส่วนของ T-DNA จาก Ri plasmid ของ A. rhizogenes เข้าสู่ genome พืช

Hairy root นอกจากจะมีการเจริญที่รวดเร็ว แตกสาขาได้มากกว่าปกติแล้วยัง

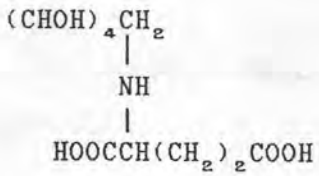
สามารถตรวจพบสารที่เป็น specific compound ด้วย คือสารประเภท opine ซึ่งสามารถพบได้ใน crown gall tumor เช่นกัน แต่แตกต่างกันในชนิดของ opine สำหรับ สารopine ที่พบใน hairy root มี 2 ชนิด ซึ่งแบ่ง A. rhizogenes ออกเป็น 2 กลุ่ม ตามชนิดของ opine คือ กลุ่มที่ 1 จัดเป็น agropine type strain ได้แก่สายพันธุ์ A4 15834 และ HRI เป็นต้น สาร opine ที่สามารถตรวจพบได้คือ agropine mannopine mannopinic acid และ agropinic acid กลุ่มที่ 2 คือ mannopine type strain ได้แก่ สายพันธุ์ 8196 TR7 และ TR101 เป็นต้น สาร opine ที่สามารถตรวจพบได้ คือ mannopine mannopinic acid และ agropinic acid (Petit และคณะ, 1983) สาร opine นี้เป็นแหล่งให้ธาตุคาร์บอนและไนโตรเจนของ Agrobacterium (Guyon และคณะ,1980 ; Ellis และ Murphy, 1981) ซึ่งสร้างขึ้นโดยยีนภายใน T-DNA ดังนั้นการตรวจสอบสาร opine จะได้ผลต้องทำให้ hairy root ปลอดเชื้อ Agrobacterium ก่อนเพื่อป้องกันไม่ให้สาร opine ถูกใช้ไป (Ellis และ Murphy, 1981)



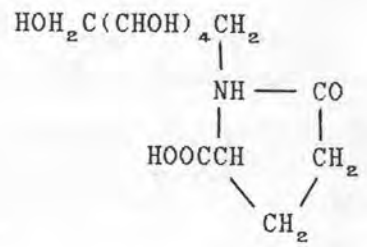
agropine



mannopine



mannopinic acid



agropinic acid

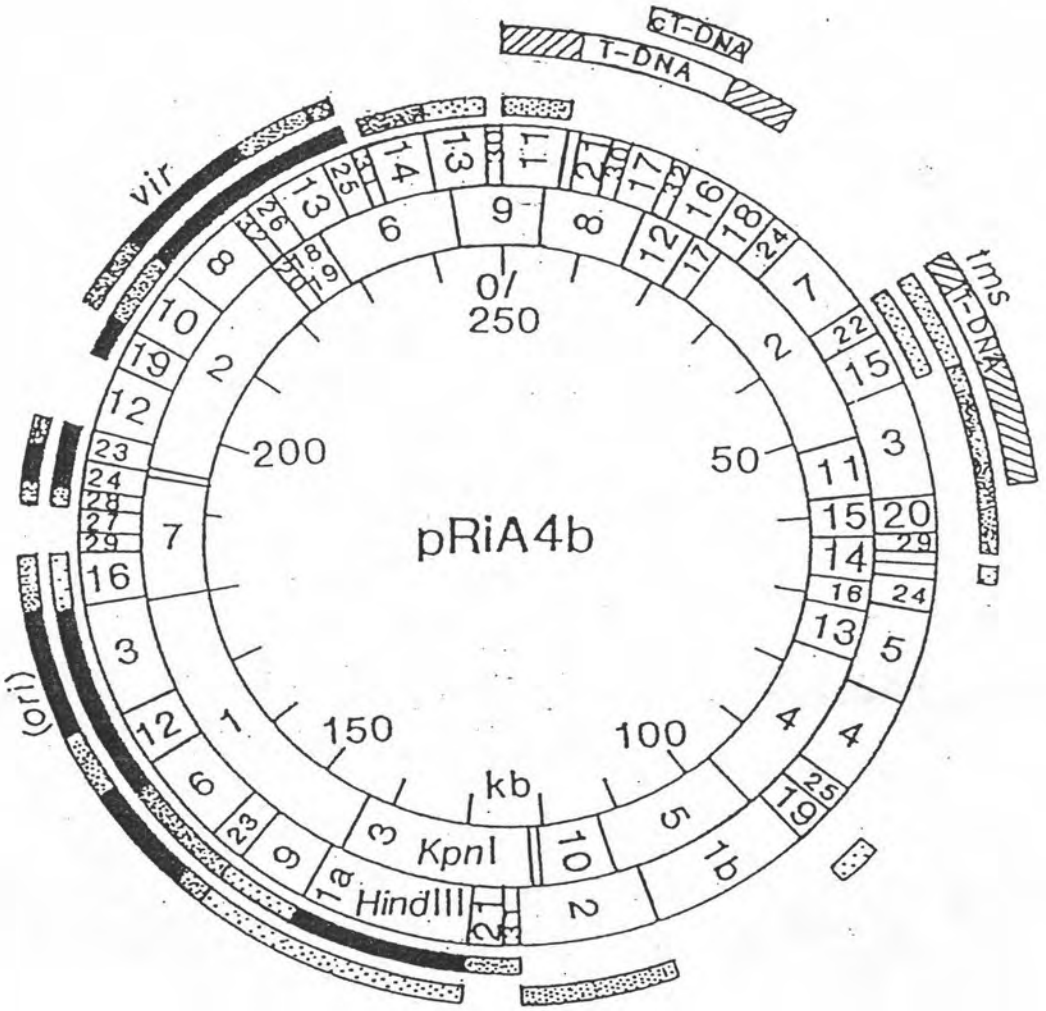
ภาพที่ 1 ชนิดของ opine ที่พบใน hairy root (Petit และคณะ, 1983)

A. rhizogenes agropine type strain และ mannopine type strain มี T-DNA แตกต่างกัน โดยใน agropine type strain มี T-DNA 2 ส่วน อยู่แยกจากกันใน Ri plasmid คือ T_L-DNA หรือ T left DNA และ T_R-DNA หรือ T right DNA 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 ตำแหน่งคือ tms gene ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ auxin ags gene ทำหน้าที่สังเคราะห์ agropine และ man gene ทำหน้าที่สังเคราะห์ mannopine (Huffman และคณะ, 1984 ; Jouanin, 1984) ทั้ง T_L-DNA และ T_R-DNA มีอิสระต่อกันในการชักนำให้เกิด hairy root แต่เมื่อขาด T_L-DNA หรือ T_R-DNA อย่างใดอย่างหนึ่ง พบว่าทำให้ hairy root เจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร ดังที่ Vilaine และ Casse-Delbart ได้ศึกษาไว้ในปี 1987 โดยดัดแปลง 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 Lycopersicum esculatum พบว่าใน N. tabacum เกิด hairy root ได้เมื่อใช้ A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 ที่มีเฉพาะ T_L-DNA ชักนำ แต่น้อยกว่า wild type hairy root ที่ได้เจริญได้ดีและไม่มีทิศทางการเจริญที่แน่นอน เมื่อใช้สายพันธุ์ A4 ที่มีเฉพาะ T_R-DNA พบว่า hairy root เกิดได้น้อยมากหรือไม่เกิดเลย และมีการเจริญได้ไม่ดี สำหรับใน L. esculatum เกิด hairy root ได้น้อยเมื่อใช้ A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 ที่มีเฉพาะ T_L-DNA ชักนำ แต่เมื่อแยก hairy root ที่ได้มาเลี้ยงกลับเจริญได้ดี เมื่อใช้สายพันธุ์ A4 ที่มี เฉพาะ T_R-DNA พบว่า hairy root เกิดได้มากกว่าและสามารถเจริญได้ดี อย่างไรก็ตาม hairy root ที่เกิดขึ้นทั้ง 4 กรณีนี้เจริญได้ไม่ดีเท่าที่เกิดจากสายพันธุ์ A4 wild type ส่วนใน A. rhizogenes mannopine type strain มี T-DNA เพียง 1 แห่ง ซึ่งมียีนที่ homologous กับ T-DNA ของ Ti plasmid ของ A. tumefaciens เพียง 1 ตำแหน่ง คือ man gene ทำหน้าที่สังเคราะห์ mannopine (Lahners , Byrne และ Chilton, 1984)

การเคลื่อนย้าย T-DNA จาก Ri plasmid สู่ genome ของพืช มีกลไกเช่นเดียวกับการเคลื่อนย้าย T-DNA จาก Ti plasmid สู่ genome ของพืช โดยมียีนบริเวณ vir region ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนย้าย vir region ของ Ri plasmid คล้าย

กับของ Ti plasmid โดย vir region ใน A. rhizogenes agropine type strain อยู่ห่างออกไปจาก T-DNA (Huffman และคณะ, 1984 ; Jouanin, 1984) และห่างมากกว่าใน mannopine type strain ซึ่งอยู่ติดกับปลายด้านขวาของ T-DNA (Lahners , 1984) การแสดงออกของยีนใน vir region ถูกกระตุ้นโดยสารพวก phenolic compound ที่เกิดขึ้นในบริเวณบาดแผลของพืช (Stachel, Nester และ Zambryski, 1986) สาร phenolic compound เหล่านี้ ได้แก่ catehol, gallic acid pyrogallic acid, p-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, B-resorcylic acid และ vanillin ซึ่งพบได้ในพืชดอก (Bolton, Nester,และ Gordon,1986) สารดังกล่าวนี้ทำให้ยีนบริเวณ 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 และคณะ, 1987) โดยเริ่มที่ right border ก่อน (Jen และ Chilton, 1986) ดังนั้น right และ left border sequence จะเป็นตัวกำหนดขอบเขต T-DNA แล้วยังเป็น recognition site สำหรับ vir enzyme อีกด้วย

อย่างไรก็ตามขนาดความยาวของ T-DNA ที่เข้าสอดแทรกใน genome ของพืชก็ไม่มีขนาดที่แน่นอน อันอาจเนื่องมาจากการเกิด deletion ระหว่างการเข้าสอดแทรกนั้นเอง โดยในปี 1987 Jouanin และคณะ ได้วิเคราะห์ DNA ที่แยกมาจากแต่ละ line ของ hairy root ของพืช 3 ชนิด คือ Nicotiana plumbaginifolia Nicotiana tabacum และ Brassica napus ที่เกิดจากการติดเชื้อ A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 พบว่า T_L-DNA ในพืชทั้ง 3 ชนิดมีความยาวค่อนข้างคงที่คือ 19-20 kb และT_R-DNA มีความยาวไม่แน่นอนคือ 0-28 kb ทั้งนี้ N. tabacum จะมี T_L-DNA และ T_R-DNA ที่สั้นกว่าพืชอีก 2 ชนิด อย่างไรก็ตามทั้ง T_L-DNA และ T_R-DNA ในแต่ละ line ของ hairy root ในพืชต่างชนิดกันก็มีขนาดไม่เท่ากันเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบการเชื่อมกันของ T_L-DNA และ T_R-DNA ในบาง line ของ hairy root ในพืชทั้ง 3 ชนิด ซึ่งเป็นไปได้ว่า T_L-DNA บังเอิญเข้าไปพร้อมกับ T_R-DNA และเชื่อมติดกันก่อนสอดแทรกเข้าสู่ genome พืช ในปีต่อมา David, Petit,และ Tempe พบว่า T-DNA แต่ละ hairy root line จากแคลลัสต้นเดียวกันที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 8196 มีขนาดไม่เท่ากัน ซึ่งยืนยันว่า นอกจากความ



ภาพที่ 2 แผนที่ยีนของ Ri plasmid (pRiA4b)

(Huffman และคณะ , 1984)

ยาว T-DNA ที่สอดแทรกมีขนาดไม่แน่นอนแล้ว ชนิดของพืชที่เป็น host ยังไม่สามารถใช้เป็นตัวกำหนดความยาว T-DNA ได้เช่นกัน นอกจากนี้จำนวนชุด T-DNA ที่เข้าไปก็มีจำนวนไม่แน่นอนเช่นกัน โดยจากการศึกษาของ Ambros, Matzke, และ Matzke ในปี 1986 พบ T-DNA จำนวน 1-2 ชุดใน hairy root ของ Crepis capillaris ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 8196 และจากการศึกษาของ Jouanin และคณะในปี 1987 ได้ผลในทำนองเดียวกันโดยศึกษาจาก hairy root line ต่าง ๆ ของพืช 3 ชนิด ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 พบ T_L-DNA จำนวน 1-2 ชุด และ T_R-DNA จำนวน 0-1 ชุด ใน hairy root line ต่างๆ ของ Nicotiana plumbaginifolia , T_L-DNA จำนวน 3 ชุด และ T_R-DNA 1 ชุด ใน hairy root ของ Nicotiana tabaccum และ T_L-DNA จำนวน 3-4 ชุด และ T_R-DNA 1-4 ชุดใน hairy root line ต่าง ๆ ของ Brassica napus

ปี 1986 Ambros, Matzke,และ Matzke ยังพบอีกด้วยว่า T-DNA ไม่มีตำแหน่งสอดแทรกที่แน่นอนใน genome พืช โดยเขาได้ศึกษาตำแหน่งของ T-DNA บน โครโมโซมของ hairy root line ต่างๆ ของ Crepis capillaris ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 8196 โดยวิธี In situ hybridization พบว่าไม่มีตำแหน่งสอดแทรกเฉพาะของ T-DNA บนโครโมโซมของ hairy root สามารถพบได้ทั้ง T-DNA 1 ชุด บนโครโมโซมใดโครโมโซมหนึ่ง หรือ T-DNA 2 ชุด บนโครโมโซมต่างแท่งในเซลล์เดียวกัน หรือ T-DNA 2 ชุด บนโครโมโซมแท่งเดียวกัน โดยโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่มีเปอร์เซนต์การสอดแทรกสูงกว่าขนาดเล็ก

การแสดงออกของยีน ใน T-DNA ซึ่งมีผลต่อการเกิด hairy root

1 การแสดงออกของยีน ใน T_R-DNA

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าใน T_R-DNA ของ A. rhizogenes มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ auxin คือ tms gene (ซึ่ง homologous กับ T_R-DNA ของ A. tumefaciens) อย่างไรก็ตาม tms gene นี้ยังแบ่งออกเป็น 2 ตำแหน่ง คือ tms-1 gene และ tms-2 gene ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในการสังเคราะห์ auxin โดย tms-1 gene code ให้เอนไซม์ tryptophan monooxygenase ทำหน้าที่เปลี่ยน tryphophan เป็น indole-3-acetamide (Onckelen และคณะ, 1985 และ Thomashow และคณะ, 1986) และ tms-2 gene

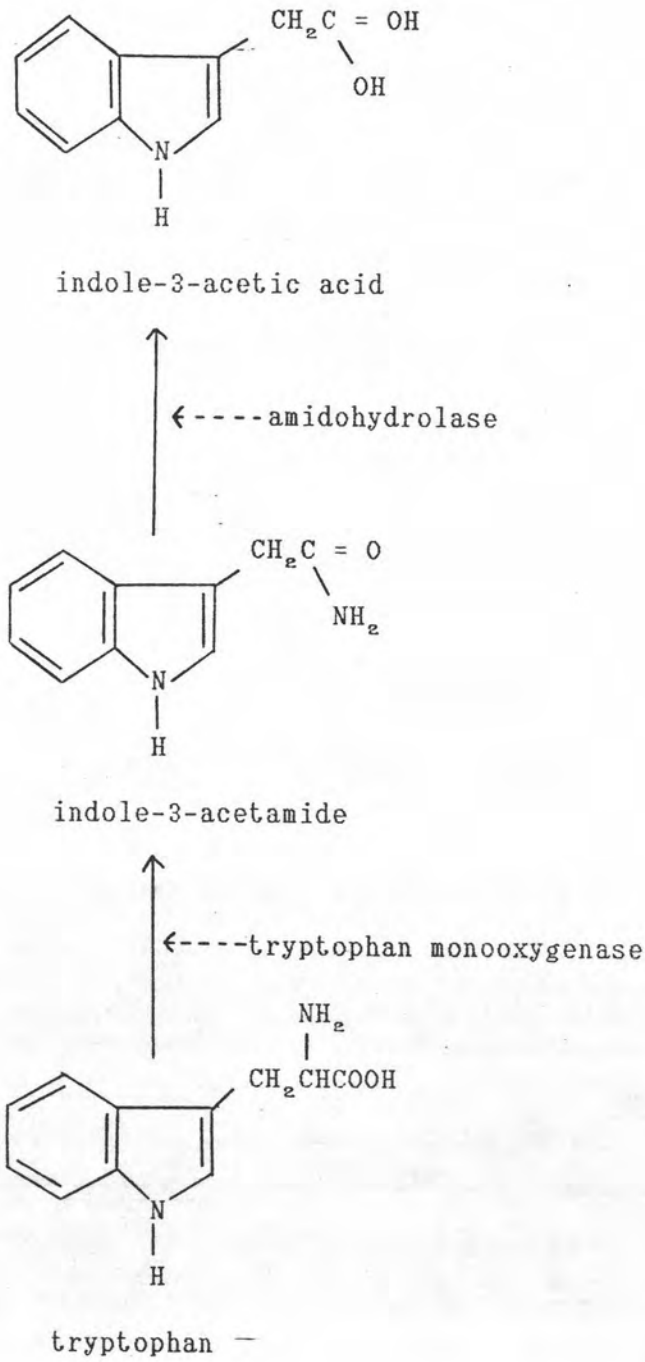
code ให้เอนไซม์ amidohydrolase ทำหน้าที่เปลี่ยน indole-3-acetamide ไปเป็น indole-3-acetic acid (Schroder และคณะ, 1984 ; Thomashow, Reeves, และ Thomashow,1984) ดังแสดงในภาพที่ 3

Auxin ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนใน T_R-DNA นี้ จึงเป็นสาเหตุหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงของสรีระของพืช ณ บริเวณที่พืชได้รับ T_R-DNA จาก A. rhizogenes ทำให้เกิด hairy root ขึ้น ณ บริเวณนั้น ขณะเดียวกันยีนใน T_R-DNA ก็มีความสำคัญต่อการเกิด hairy root ด้วย ดังที่เห็นได้จาก A. rhizogenes พวก mannopine type ซึ่งมีเพียง T_R-DNA เท่านั้นแต่สามารถชักนำให้เกิด hairy root ได้เช่นกัน นอกจากนี้การทดลองของ Vilaine และ Casse-Delbert ปี 1987 ยังชี้ให้เห็นว่า T_R-DNA และ T_L-DNA มีอิสระต่อกันในการชักนำให้เกิด hairy root

2. การแสดงออกของยีนใน T_L-DNA

T_L-DNA มียีนที่มีความสำคัญต่อการเกิด hairy root 4 ตำแหน่งคือ rol A rol B rol C และ rol D ซึ่งมีขนาด 0.65 kb 1.05 kb 0.85 kb และ 1.25 kb ตามลำดับ (Taylor และคณะ, 1985) โดยยีนทั้ง 4 มีการแสดงออกถึงความแรงในการชักนำให้เกิด hairy root ต่างกัน (White และคณะ, 1985, Spena และคณะ, 1987) นอกจากยีนใน T_L-DNA จะมีผลต่อการชักนำให้เกิด hairy root แล้ว ยังมีผลต่อลักษณะของ transformed plant ที่เกิดจาก hairy root อีกด้วย โดยการศึกษาของ Schmulling และคณะ ปี 1988 ใน transformed plant ของยาสูบที่เกิดจาก hairy root ที่ถูกชักนำโดย A. rhizogenes ซึ่งมีการรวมกันของยีน rol A rol B และ rol C แบบต่าง ๆ กัน พบว่า transformed plant ที่มีเฉพาะยีน rol A ใบมีรูปร่างเปลี่ยนแปลง ยอดเกสรตัวเมีย และดอกขนาดใหญ่ขึ้น seed capsule ใหญ่ขึ้น และปล้องสั้น transformed plant ที่มีเฉพาะยีน rol B ใบมีรูปร่างเปลี่ยนแปลง ยอดเกสรตัวเมียและดอกใหญ่ขึ้น เกิด adventitious root บนลำต้น และละอองเกสรน้อยลง transformed plant ที่มีเฉพาะยีน rol C ใบมีรูปร่างเปลี่ยนแปลง ดอกเล็กลง seed capsule เล็ก ละอองเกสรน้อยลง และปล้องสั้น transformed plant ที่มีทั้ง rol A rol B และ rol C ใบมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปมาก ดอกและ seed capsule เล็กมาก และปล้องสั้น และ transformed plant ที่มี rol AB rol BC และ rol AC มี

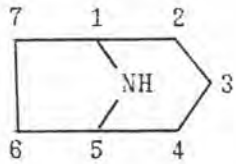
ลักษณะที่ผิดปกติต่างกันไปแต่ไม่รุนแรงเท่า transformed plant ที่มีทั้ง rol A rol B และ rol C



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์ indole-3-acetic acid โดยยีน tms-1 และ tms-2 (Thomashow และคณะ, 1986)

ธรรมชาติทางเคมี และคุณสมบัติโดยทั่วไปของ Tropane alkaloid

แอลคาลอยด์ในกลุ่ม tropane มีโครงสร้างทางเคมีซับซ้อนจัดเป็น heterocyclic alkaloid คือมีไนโตรเจนอยู่ใน ring มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น tropane ring(ภาพที่ 4) พบได้ในพืชวงศ์ Solanaceae เช่น Atropa belladonna Duboisia spp. Hyoscyamus spp. และ Datura spp. เป็นต้น (Leete, 1979)



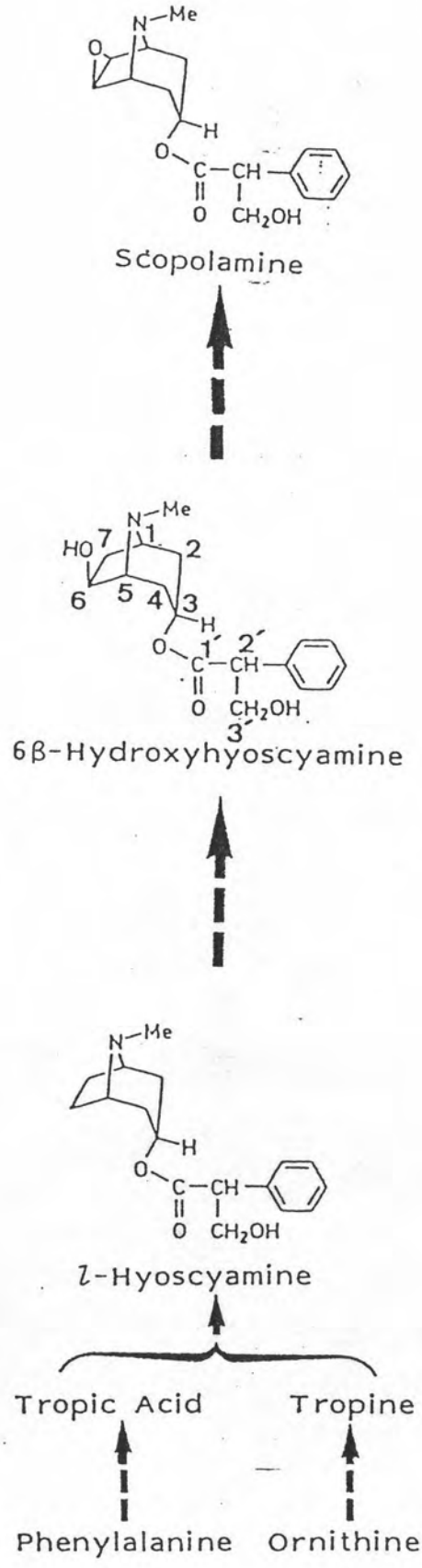
ภาพที่ 4 Tropane ring

(Leete, 1979)

กระบวนการชีวสังเคราะห์ของ tropane alkaloidเริ่มจากกรดอะมิโน 2 ชนิดคือ ornithine ซึ่งเปลี่ยนไปเป็น tropine และ phenylalanine ซึ่งเปลี่ยนไปเป็น tropic acid ทั้ง tropine และ tropic acid จึงเข้ารวมตัวกันกลายเป็น hyoscyamine จากนั้น hyoscyamine บางส่วนจะถูกเปลี่ยนไปเป็น 6β-Hydroxylase (Hashimoto and yamada, 1986) และ 6β-Hydroxyhyoscyamine บางส่วนจะถูกเปลี่ยนไปเป็น scopolamine โดยขบวนการ dehydrogenation ในที่สุด (Hashimoto และคณะ, 1987) ดังแสดงในภาพที่ 5

สำหรับ hyoscyamine นั้นยังมีอีกรูปหนึ่งในรูปของ atropine ซึ่งเป็น racemic form ของ hyoscyamine (Leete, 1979) แอลคาลอยด์ที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็น hyoscyamine ซึ่งเป็น l-isomer ส่วน atropine เป็น dl-isomer ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการสกัดแอลคาลอยด์จากพืช อย่างไรก็ตามทั้งhyoscyamine atropine และscopolamine ต่างเป็นแอลลอยด์ที่เป็นที่รู้จักและมีความสำคัญต่อวงการแพทย์ โดยแอลคาลอยด์ทั้ง3 ชนิด ต่างมีฤทธิ์เป็น parasympatholytic agent มีผลลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งใช้ในยารักษาแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้ และยังใช้เป็นยาขยายม่านตา ใช้ในกรณีโรคม่านตาอักเสบ และใช้ในการตรวจตา (วันดี กฤษณพันธ์ และ นพมาศ สรรพคุณ,2533)

018036



ภาพที่ 5 กระบวนการชีวสังเคราะห์ของ Tropane alkaloid

(Hashimoto และ Yamada , 1986)

ประวัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสาร Tropane alkaloid

ดังที่กล่าวมาแล้วว่า hyoscyamine atropine และ scopolamine เป็นแอลคาลอยด์ ในกลุ่ม tropane ที่มีความสำคัญในวงการแพทย์ และพบได้ในพืชวงศ์ Solanaceae บางชนิด จึงได้มีการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อผลิตแอลคาลอยด์ดังกล่าวมาตลอด แม้ว่ายังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร แต่ก็ทำให้ทราบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อการสังเคราะห์แอลคาลอยด์ของเนื้อเยื่อ ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อไป เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมในอนาคตดังเช่น ในปี 1972 Tabata และคณะ ศึกษาการผลิต hyoscyamine และ scopolamine ในเนื้อเยื่อแคลลัสของ Scopolia japonica พบว่าการนำ precursor ของกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ hyoscyamine และ scopolamine คือ tropic acid มาเติมในอาหาร สามารถเพิ่มปริมาณแอลคาลอยด์ได้สูงขึ้นถึง 0.12% DW แต่ยังมีปริมาณน้อยกว่าใน intact plant และมีผลทำให้การเจริญของเนื้อเยื่อลดลง

ปี 1974 Hiraoka และ Tabataศึกษาปริมาณ hyoscyamine และ scopolamine ที่พบในระหว่างการเกิด organogenesis และระหว่างการเจริญไปเป็นต้นของ Datura innoxia พบว่าปริมาณแอลคาลอยด์ต่างกันไปในแต่ละระยะ โดยพบน้อยที่สุดใน unorganized callus (0.01% DW) และค่อยๆ เพิ่มปริมาณขึ้นเมื่อพัฒนาไปเป็นยอดและราก จนเป็นต้นที่โตเต็มที่ (0.03% DW) ตามลำดับ โดยในช่วงแรกของการเจริญก่อนการเกิดรากจากยอด พบได้เพียง hyoscyamine หลังจากระยะดังกล่าวจนถึงขั้นพัฒนาไปเป็นต้นที่โตเต็มที่ จึงพบทั้ง hyoscyamine และ scopolamine แสดงถึงปฏิกิริยาทางเคมีของ hyoscyamine ไปเป็น scopolamine เกี่ยวข้องกับการเกิดรากด้วย

ปี 1978 Eapen และคณะศึกษาปริมาณ tropane alkaloid 3 ชนิดคือ tropine (tropic acid) atropine และ scopolamine ใน transformed plant ซึ่งมีจำนวนชุดโครโมโซมต่างกัน คือ 2X 3X และ 4X ซึ่งเกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสของ Atropa belladonna พบว่าปริมาณแอลคาลอยด์สูงขึ้นตามจำนวนชุดโครโมโซม สนับสนุนความคิดที่กล่าวว่ากระบวนการชีวสังเคราะห์ของแอลคาลอยด์ถูกควบคุมโดยยีนหลายยีน (polygenic control)

ปี 1982 Yamada และ Hashimoto ศึกษาปริมาณ tropane alkaloid ในแคลลัสของ Atropa belladonna Datura stramonium และ Hyoscyamus niger พบแอลคาลอยด์ดังกล่าวเฉพาะในแคลลัสของ H. niger เท่านั้น ซึ่งมีปริมาณน้อยมาก โดย

แคลลัสซึ่งเลี้ยงในที่สว่างมีปริมาณ hyoscyamine เพียง 0.02% DW และแคลลัสซึ่งเลี้ยงในที่มืด มีเพียง 0.015% DW และพบว่ายิ่งมีปริมาณน้อยลงอีกเมื่อเลี้ยงในลักษณะของ suspension culture โดยเมื่อเลี้ยงในที่สว่างมี hyoscyamine เพียง 0.007% DW และในที่มืดมีเพียง 0.01% DW

ปี 1983 Hashimoto และ Yamada ศึกษาปริมาณ tropane alkaloid ใน root culture และ suspension culture ของ Hyoscyamus niger พบว่า root culture มีปริมาณแอลคาลอยด์รวมมากกว่า suspension culture โดยใน root culture มีปริมาณ 0.12-0.3% DW และใน suspension culture มีเพียง 0.003-0.005% DW แต่มีปริมาณ hyoscyamine ใกล้เคียงกันคือ 0.04-0.08% DW

ปี 1984 Yamada และ Endo ศึกษาปริมาณ tropane alkaloid ในเนื้อเยื่อของ Duboisia leichhardtii ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งเติม hyoscyamine 1mM พบว่าการเติม hyoscyamine ช่วยให้เนื้อเยื่อสามารถสังเคราะห์แอลคาลอยด์ได้ดีขึ้น 2-4 เท่า โดยพบปริมาณแอลคาลอยด์ในแคลลัสที่มียอดเกิดแล้ว มากกว่าในราก และแคลลัสธรรมดาตามลำดับ

ปี 1985 Endo และ Yamada ศึกษาผลของ aeration ที่มีต่อปริมาณ tropane alkaloid ใน root culture ของ Duboisia leichhardtii โดยใช้อาหารเหลว 25 มิลลิลิตร ต่อจำนวนรากเริ่มต้น 0.20 กรัม ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 300 100 และ 50 มิลลิลิตร และในหลอดทดลอง พบว่าปริมาณแอลคาลอยด์ขึ้นอยู่กับขนาดของภาชนะที่ใช้ ภาชนะใหญ่จะทำให้รากผลิตแอลคาลอยด์ได้สูงขึ้น เนื่องจากมี aeration ดี

ปี 1986 Hartmann และคณะ ศึกษาปริมาณ tropane alkaloid ใน root culture และ suspension culture ของ Atropa belladonna พบว่าใน root culture มีปริมาณแอลคาลอยด์มากกว่าใน suspension culture และรากของ intact plant มีปริมาณแอลคาลอยด์มากกว่าใน root culture

จากการทดลองดังที่กล่าวมาแสดงให้เห็นถึงปัจจัยต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์แอลคาลอยด์ในเนื้อเยื่อ ซึ่งได้แก่ precursor ชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง จำนวนชุดของโครโมโซมชนิดพืช สภาวะแสง และ aeration เป็นต้น

มาในช่วงปี 1986-1987 นี้เอง นักวิทยาศาสตร์ได้พบคุณสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของ hairy root ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อพิเศษได้จากการย้ายยีนจาก A. rhizogenes เข้าสู่ genome พืช (รายละเอียดในเรื่องกลไกการเกิด hairy root) อันเป็นพัฒนาการที่สำคัญของระบบ

การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ ที่อาจนำไปสู่การจัดการในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต (Hamill และคณะ, 1987) ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

ประวัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อ 'hairy root' เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

การศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root เพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารทุติยภูมิที่ได้จาก hairy root มีปริมาณมากกว่าในรากปกติ แต่ทั้งนี้ส่วนประกอบของอาหาร เช่น ปริมาณและสัดส่วนของธาตุอาหาร หรือ น้ำตาล(sucrose) ตลอดจนอายุของ hairy root สภาวะของแสง มีผลต่อปริมาณสารเช่นกัน หากแต่แตกต่างกันไปตามชนิดพืช ดังปรากฏในรายงานการวิจัยตั้งแต่ปี 1986 เป็นต้นมาดังนี้

ปี 1986 Hamill และคณะพบว่า hairy root อายุต่างกันมีปริมาณสารทุติยภูมิไม่เท่ากัน โดยศึกษาใน hairy root ของ Beta vulgaris และ Nicotiana rustica ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร B5 ปราศจากฮอร์โมน พบว่า hairy root ของ B. vulgaris อายุ 7 วัน มีปริมาณ betaxanthin (minor pigment) และ betacyanin (minor pigment) น้อยกว่าใน hairy root อายุ 17 วัน ประมาณสองเท่า และสำหรับใน hairy root ของ N. rustica พบว่าเมื่อ hairy root อายุ 6 วัน มีปริมาณ nicotine (major alkaloid) มากกว่า hairy root อายุ 12 วัน เล็กน้อย และมี anatabine (major alkaloid) น้อยกว่า hairy root อายุ 12 วัน ประมาณสามเท่า และ hairy root เมื่ออายุ 12 วัน ปริมาณ nicotine และ anatabine เท่ากับเมื่ออายุ 16 วัน ทั้งนี้ทั้ง hairy root ของ B. vulgaris และ N. rustica ต่างมีปริมาณสารมากกว่าในรากปกติทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ nicotine และ anatabine ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย

ต่อมาในปีเดียวกัน Kamada และคณะ (1986) ได้รายงานปริมาณแอลคาลอยด์ใน hairy root ของ Atropa belladonna ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร MS ปราศจากฮอร์โมน พบว่า atropine (major alkaloid) ของ hairy root อายุ 4 สัปดาห์มีปริมาณ 0.37% DW ขณะที่ในรากปกติของต้นอายุ 1 ปี และต้นกล้ามีปริมาณเพียง 0.34% DW และ 0.03% DW ตามลำดับ และ scopolamine (minor alkaloid) ของ hairy root อายุ 4 สัปดาห์ มีปริมาณ 0.024% DW ขณะที่ในรากปกติของต้นอายุ 1 ปี และต้นกล้ามีปริมาณเพียง 0.008% DW และน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ ตามลำดับ

ปี 1987 Payne และคณะ ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาล sucrose และ สารอาหาร phosphate กับ nitrate ที่มีปริมาณ hyoscyamine (atropine) ใน hairy root ของ Datura stramonium ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร B5 พบว่าการใช้ sucrose ทำให้การเจริญของ hairy root และปริมาณ hyoscyamine ดีกว่าการใช้ glucose โดยทั้งนี้จากการเปรียบเทียบปริมาณ sucrose ตั้งแต่ 1 2 3 5 7 และ 10% พบว่าปริมาณ sucrose 5% เหมาะสมต่อการเจริญของ hairy root และให้ปริมาณ hyoscyamine สูงที่สุด และอาหารเต็มสูตรตามสูตร B5 ให้การเจริญ และปริมาณ hyoscyamine ของ hairy root สูงกว่าอาหารครึ่งสูตร และ 1/4 สูตร ตามลำดับ โดยมีปริมาณ phosphate และ nitrate ที่เหมาะสมอยู่ในระดับ 0.1-0.5 mM และ 10-20 mM ตามลำดับ โดยเฉพาะ nitrate ค่อนข้างมีผลต่อปริมาณ hyoscyamine มาก โดย nitrate ยิ่งมากยิ่งทำให้ปริมาณ hyoscyamine ลดลงมาก นอกจากนี้ยังพบว่า hairy root ของ D. stramonium ไม่เหมาะจะนำไปเลี้ยงในที่มืด ทั้งนี้พบว่าทำให้การเจริญลดลงเล็กน้อย แต่ทำให้ปริมาณ hyoscyamine ลดลงถึง 70%

ต่อมาในปีเดียวกัน Yoshikawa และ Furuya (1987) ศึกษาปริมาณแอลคาลอยด์จาก hairy root ของโสม (Panax ginseng) ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร MS ปราศจากฮอร์โมน พบว่า hairy root ของโสมเจริญได้ช้ากว่า hairy root ของพืชชนิดอื่น แต่อย่างไรก็ตามก็ยังสามารถเจริญ และแตกสาขาได้ดีกว่ารากปกติ 2.44 เท่า และ มีปริมาณแอลคาลอยด์ saponin และ ginsenosides มากกว่าในรากปกติ 1.78 เท่า แต่เมื่อเติมฮอร์โมน IBA และ kinetin ลงในอาหารด้วย จะช่วยให้การเจริญ และปริมาณแอลคาลอยด์ของ hairy root สูงขึ้นกว่าเดิม 2.02 และ 2.80 เท่าตามลำดับ

ถัดมาในปีเดียวกันนี้ Robin และคณะ (1987) ศึกษาการเติม selective agent เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ hairy root ของ Nicotiana rustica ที่มี nicotine สูง พบว่าการเติม nicotinic acid 2.45 mM ลงในอาหารสูตร B5 ทำให้การเจริญของ hairy root ลดลง หากแต่มีผลดีต่อการผลิตแอลคาลอยด์ของ hairy root โดยทำให้ nicotine anatabine nornicotine และ anabasine เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด

ปี 1988 Parr และคณะ ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาล sucrose และสัดส่วนของ nitrate และ phosphate ที่มีต่อปริมาณแอลคาลอยด์ ajmalicine และ serpentine ใน hairy root ของแพงพวยฝรั่ง (Catharanthus roseus) ในอาหารครึ่งสูตร B5 อายุ 28 วัน พบว่าน้ำตาล sucrose ในปริมาณมากทำให้การเจริญของ hairy root ลด

ลง แต่มีผลต่อการผลิตแอลคาลอยด์ของ hairy root โดยเมื่อเติม sucrose 7% ในอาหารครึ่งสูตร B5 ซึ่งมี nitrate 15 mM และ phosphate 0.55 mM ให้ปริมาณ ajmalicine ถึง 123 ± 26 ไมโครกรัม/กรัม FW และ serpentine 63 ± 19 ไมโครกรัม/กรัม FW ขณะที่เมื่อเติม sucrose 3% ให้ปริมาณ ajmalicine เพียง 41 ± 6 ไมโครกรัม/กรัม FW และ serpentine เพียง 14 ± 4 ไมโครกรัม/กรัม FW แต่ให้การเจริญของ hairy root ดีกว่าเมื่อเติม sucrose 7% ถึง 2.2 เท่า และเมื่อศึกษาสัดส่วนของ nitrate ต่อ phosphate ที่เหมาะสมในอาหารครึ่งสูตร B5 ที่มีน้ำตาล sucrose 3% พบว่า nitrate 15 mM และ phosphate 0.1 mM สามารถทำให้ปริมาณ ajmalicine สูงถึง 165 ± 63 ไมโครกรัม/กรัม FW และ serpentine 50 ± 7 ไมโครกรัม/กรัม FW การทดลองของ Parr และคณะนี้จึงสนับสนุนการทดลองของ Payne และคณะ (1987) ซึ่งกล่าวไว้ว่าปริมาณน้ำตาล sucrose และสัดส่วนของ nitrate ต่อ phosphate มีความสำคัญต่อการผลิตแอลคาลอยด์ของ hairy root

ต่อมาในปีเดียวกัน Jaziri และคณะ (1988) พบว่าปริมาณแอลคาลอยด์ที่ได้จาก hairy root ของ Datura stramonium แต่ละ line มีปริมาณไม่เท่ากัน (1 line มาจากต้นกล้า 1 ต้น) โดยพบ scopolamine ตั้งแต่ 0-0.56% DW และ hyoscyamine 0% DW ทุก line นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาล sucrose มีผลต่อการเจริญและปริมาณแอลคาลอยด์ใน hairy root โดยน้ำตาลsucrose 2% ทำให้การเจริญและปริมาณ scopolamine ลดลงกว่าเมื่อใช้น้ำตาล sucrose 3%

ปี 1989 Mano, Ohkawa และ Yamada ศึกษา hairy root จำนวน 45 clone (1 clone มาจาก 1 root meristem)ของ Duboisia leichharcltii พบว่ามีความแตกต่างกันในด้านอัตราการเจริญ และปริมาณแอลคาลอยด์ โดยพบว่า clone ที่ให้ปริมาณแอลคาลอยด์สูงสุดมีปริมาณ scopolamine (major alkaloid) สูงถึง 1.8% DW และพบว่าส่วนประกอบของอาหารเป็นสิ่งสำคัญที่สามารถทำให้การเจริญ และปริมาณแอลคาลอยด์เพิ่มขึ้นหรือลดลง โดยจากการศึกษาในอาหาร 16 สูตร พบว่าอาหารสูตร HF (modified Heller's) เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแอลคาลอยด์ของ hairy root ของ D. leichhardtii

ต่อมาในปีเดียวกัน Christen และคณะ (1989) ศึกษาปริมาณแอลคาลอยด์ที่พบใน hairy root ของ ลูกผสม Datura candida ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS อายุ 1 เดือน พบว่ามี scopolamine 0.57% DW และ hyoscyamine 0.11% DW ซึ่งมากกว่าในรากปกติ

จากต้นที่มีอายุ 5 เดือน ซึ่งมี scopolamine อยู่เพียง 0.22% และ hyoscyamine 0.038% DW

จากการทดลองที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า hairy root มีประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิค่อนข้างสูง แต่ทั้งนี้ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิได้อีกโดยการปรับปัจจัยต่าง ๆ ให้อยู่ในความเหมาะสมได้แก่ อายุ ปริมาณน้ำตาลในอาหาร ปริมาณ nitrate และ phosphate การใส่ฮอร์โมน การใส่สารตั้งต้น การเลือกสายพันธุ์ hairy root การเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม จึงเป็นความหวังว่าในอนาคตอันใกล้นี้อาจจะมีการผลิตสารทุติยภูมิขึ้นในระดับอุตสาหกรรม โดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพิเศษ คือ hairy root นี้ได้สำเร็จอันจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อวงการแพทย์

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

1. ได้เทคนิคที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด hairy root
2. ได้ทราบถึงการเจริญของ hairy root ในสภาวะต่างๆ
3. ได้ทราบถึงความแตกต่างของปริมาณแอลคาลอยด์ของ hairy root เมื่อเลี้ยงในสภาวะต่างๆกัน และเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อชนิดอื่น