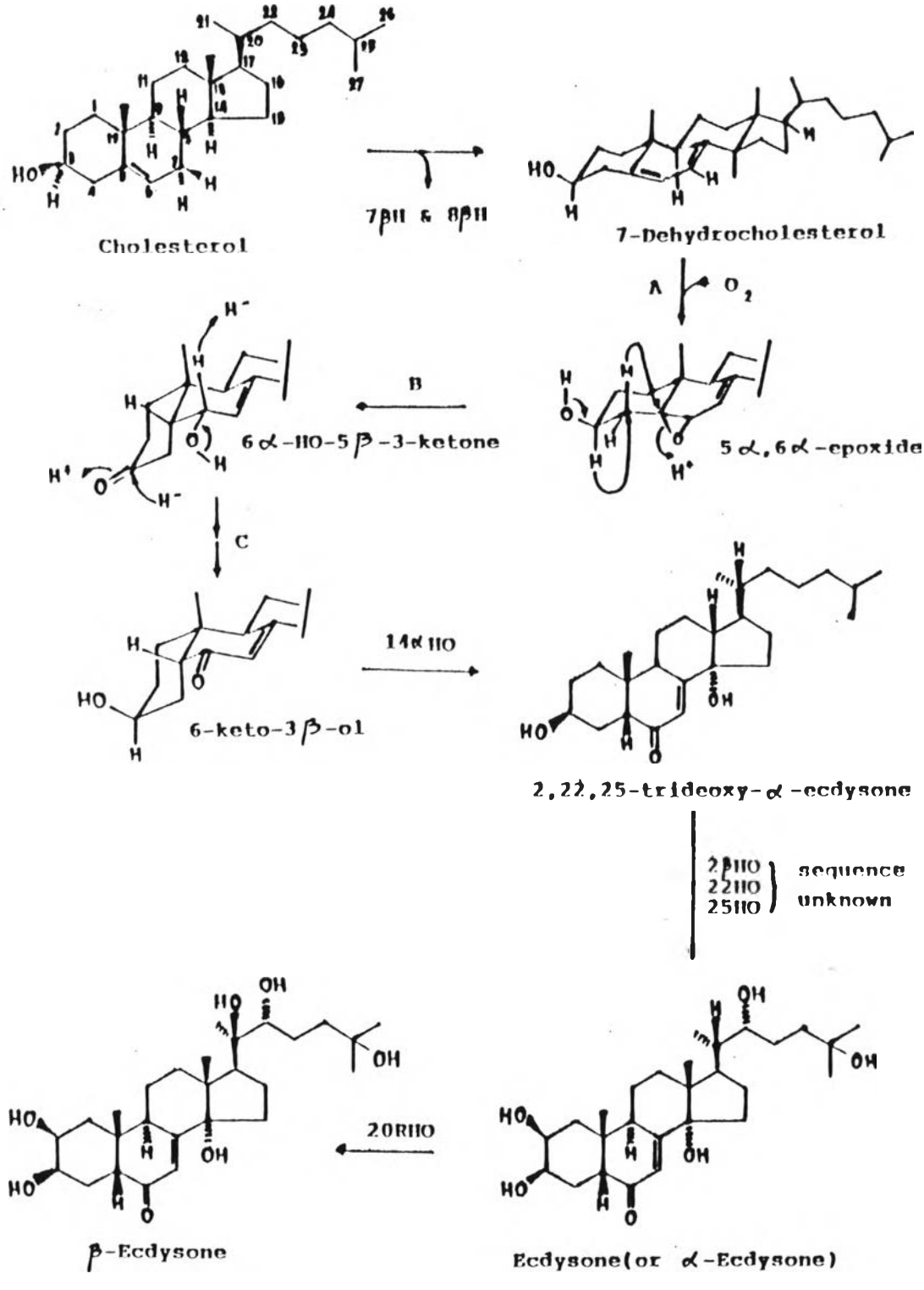
บทที่ 1

บทนำ

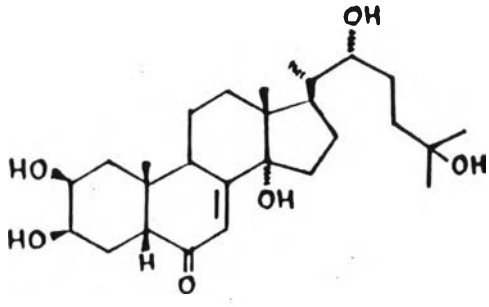
ฮอร์โมนลอกคราบหรือเอคไดโซน (ecdysone) เป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการลอกคราบและการเปลี่ยนแปลงตัวอ่อนของสัตว์พวกอาร์โธรพอด (arthropod) สร้างจากต่อมโพรโธแรคซิค (prothoracic gland) เมื่อได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนสมอง (Gilbert,1971) โดยใช้โคเลสเตอรอล (cholesterol) หรือ7-ดีไฮโดรโคเลสเตอรอล(7-dehydrocholesterol) เป็นสารตั้งต้น (Nakanishi, 1971) (ภาพที่ 1) ถ้าสัตว์ขาดเอคไดโซนจะไม่สามารถสร้างดักแด้ (pupal diapause) เพื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเต็มที่ได้ (Meola และ Gray,1984) ฮอร์โมนลอกคราบในกลุ่มเอคไดโซนมีหลายชนิดที่น่าสนใจและพบมากในธรรมชาติ คือ เบตา-เอคไดโซน (beta-ecdysone) หรือ 20-ไฮดรอกซีเอคไดโซน (20-hydroxyecdysone) และแอลฟา-เอคไดโซน (alpha-ecdysone) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.

<u>การค้นพบฮอร์โมนลอกคราบ</u>

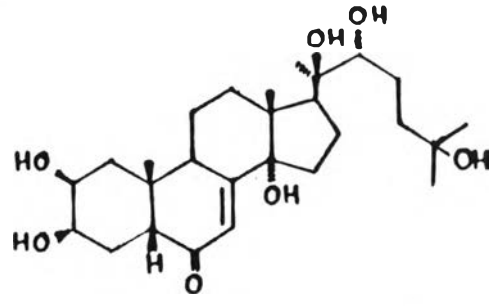
ฮอร์โมนลอกคราบชนิดแรกแยกได้ในปี ค.ศ. 1954 โดย Butenandt และ Karlson แยกแอลฟา-เอคไดโซน 25 มิลลิกรัมจากดักแด้ (silkworm pupae) ของหนอนไหม (<u>Bombyx mori</u>) 500 กิโลกรัม ต่อมาในปี ค.ศ.1956 Karlson ก็สามารถแยกฮอร์โมนลอกคราบจากสัตว์ได้เป็นชนิดที่ 2 คือ เบตา-เอคไดโซนจากดักแด้ของหนอนไหม Slama และคณะ (1974) แยกฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดนี้จากหนอนใบยาสูบ (<u>Manduca sexta</u>) และทำการทดลอง พบว่ามีคุณสมบัติในการลอกคราบเมื่อศึกษาโดยวิธี Calliphora Test ในปี ค.ศ.1967 Thompson และคณะแยก 20,26-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน (20,26-dihydroxyecdysone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนลอกคราบอีกชนิดหนึ่งจากหนอนใบยาสูบ ได้มีการศึกษาฮอร์โมนลอกคราบในแมลงเรื่อยมา นอกจากนี้ยังตรวจพบฮอร์โมนลอกคราบนี้ในสัตว์จำพวกครัสตาเซียนด้วย เช่นในปี ค.ศ.1968 Horn และคณะ สามารถแยกครัสท์เอคไดโซน (crustecdysone) ออกจากของเสียของกุ้งฝอย (<u>Jasus lalandei</u>) ซึ่งต่อมาพิสูจน์ได้ว่าสารนี้คือ เบตา-เอคไดโซนนั่นเอง และแยกแคลลินเอคไดโซน เอ



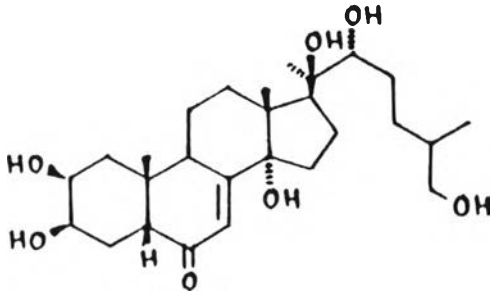
ภาพที่ 1 ขบวนการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนจากโคเลสเตอรอลในพืช ที่น่าเป็นไปได้ (Goodwin และ Mercer, 1983)



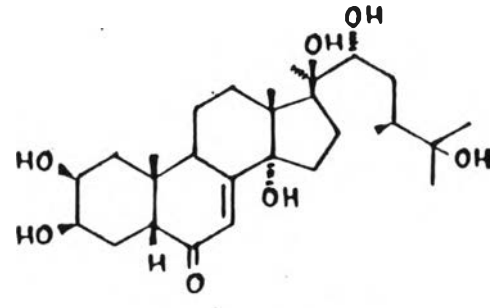
α-ECDYSONE



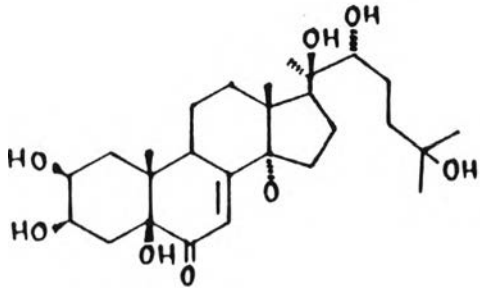
β-ECDYSONE



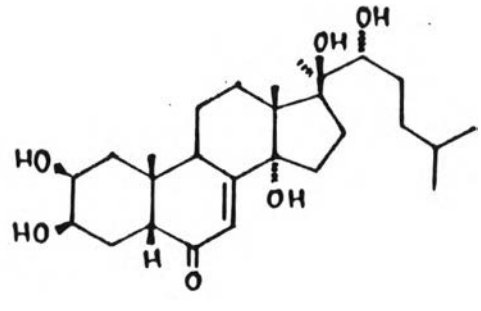
INOKOSTERONE



MAKISTERONE A



POLYPODINE B



PONASTERONE A

ภาพที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของฮอร์โมนลอกคราบบางชนิด

(Wilson และคณะ, 1982b)

(callinecdysone A)และแคลลินเอคไดโซน บี(callinecdysone B) จากปูทะเล Callinectes sapidus ซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้ายกับอิโนโคสเตอโรน (inokosterone) และมาคิสเตอโรน เอ (makisterone A) (Faux และคณะ,1967)

นอกจากจะพบในสัตว์พวกอาร์โธพอดและครัสตาเซียนแล้ว ยังพบฮอร์โมนลอกคราบในพืชอีกด้วย เช่นเฟิร์น Blechnum amabile เฟิร์น Pteridium aquilinum Podocarpus elatus Taxus baccata Vitex megapotanica (Hikano และ Takamoto, 1974) การค้นพบฮอร์โมนลอกคราบในพืชครั้งแรก เริ่มจากในปี ค.ศ.1966 Nakanishi และคณะ สามารถแยกไพแนสเตอโรน เอ (ponasterone A) จากพืช Podocarpus nakii ได้ Galbraith และHorn (1966) แยกเบตา-เอคไดโซนออกจากเปลือกของ P. elatus Takemoto และคณะ (1967) แยกเบตา-เอคไดโซน และ อิโนโคสเตอโรน จาก Achyranthus fauriei ได้ในปีต่อมา มีรายงานการพบเบตา-เอคไดโซน และไพลีโพดีน บี (polypodine B) ใน Polypodium vulgare (Jizba และคณะ,1967) ไซแอสเตอโรน(cyasterone) และ เบตา-เอคไดโซน ใน Ajuga decumbens A. incisa A. nipponensis และแยกเบตา-เอคไดโซนจาก Trillium smallii T. tschnoskii Stachyurus praecox และ Polypodium japonicum (Imai และคณะ,1969)

สำหรับพืชในสกุล Vitex ซึ่งอยู่ในวงศ์ Verbenaceae ได้เริ่มมีการศึกษามาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1967 โดยพบเบตา-เอคไดโซนจาก Vitex megapotamica ต่อมาพบใน V. rehmanni V. serti (Rimpler, 1972) Werawattanametin และคณะ (1972) แยกเบตา-เอคไดโซนออกจากส่วนเปลือกของต้นไข่เน่า V. glabrata ได้ 1.57% ของน้ำหนักแห้ง Chaiwatcharakool(1986) พบว่าผลของต้นไข่เน่ามีระดับของเบตา-เอคไดโซนสูงเพียง 2.2896×10^{-3} เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง

หน้าที่ของฮอร์โมนลอกคราบต่อพืชยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าปริมาณฮอร์โมนลอกคราบในพืช (phytoecdysone) มักจะมีสูงกว่าในสัตว์ (zooecdysone) มาก คือค่าเฉลี่ยในสัตว์ประมาณ 10^{-9}-10^{-5} เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ในพืชบางชนิดมีมากถึง 2 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง (Hikino,1974; 1976)

มีการศึกษาผลของสารในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ ที่มีต่อการลอกคราบและการเจริญ

เต็บโตของกุ้งชนิดต่างๆ พบว่าสารในกลุ่มฮอร์โมนลอกคราบที่ได้จากพืชสามารถชักนำให้เกิดการลอกคราบในสัตว์พวกอาร์โธรพอด เช่น Armadillidium vulgare Oronectes sauborni Penaeus japonica กุ้ง Procambarus simulans ที่ตัดก้านตาออก และ Uca pugilator (Lowe และคณะ, 1968 ; Kanazawa ,1972 ; Krishnalumaran,1972 ; Gilgan, 1975;1976) ปริมาณและรูปของฮอร์โมนลอกคราบที่ใช้แตกต่างกันไปตั้งแต่ 0.5- 5.0% และเชื่อว่าการชักนำการลอกคราบของฮอร์โมนน่าจะอยู่ในระยะ early premolt พัฒนัญญาและคณะ (2528) ใช้เบตา-เอคไดโซนที่สกัดจากต้นไข่เน่า ความเข้มข้น 2.3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหารเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกราม 100 กรัม พบว่าฮอร์โมนนี้จะกระตุ้นการเจริญของลูกกุ้งก้ามกรามอย่างมีนัยสำคัญ

มีการศึกษาและรายงานว่า สารในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นการลอกคราบในแมลงและกุ้งสูง และมีศักยภาพในการสร้างโปรตีนในแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Otaka และคณะ,1968 ; Ogawa และคณะ,1977) Baldaia (1984) ทดลองเด็ดก้านตาและฉีดเบตา-เอคไดโซนสังเคราะห์เข้าไปในกุ้ง Palaemon serratus พบว่าฮอร์โมนที่ฉีดเข้าไปจะมีผลต่อการสะสมของแคลเซียมที่ใช้สร้างชั้นเปลือกนอก (cuticle) นอกจากนี้ยังมีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ (tissue differentiation) และการสร้างชั้นเปลือกนอก (cuticle deposition) ในระหว่างการลอกคราบของพวกอาร์โธรพอด (Gilbert และ King,1973) นอกจากนี้มีรายงานอีกหลายเรื่องที่แสดงว่าสารในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์จะไปช่วยควบคุมการพัฒนาของไข่แมลง การสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน (vitellogenin) (Hagedorn และ Kunkel, 1979 ; Bownes, 1982 ; Redfern, 1982) การสังเคราะห์ตัวอสุจิ (spermatogenesis) (Dumer,1980) ขั้นตอนการพัฒนาของเนื้อเยื่อภายใน (internal tissue) การเกิดสีของตัวอ่อน (preecdysial larval tanning) (Robert และคณะ, 1982) การสร้างดักแด้ (diapause) (Bradfield และ Dunlinger,1980) ในระดับโมเลกุลพบว่าสารในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์กระตุ้นการสร้าง poly(A)RNAs และ mRNAs เพิ่มการสร้างไลโซโซม (lysosomes) (Radford,1971) เพิ่มการสร้างโคเลสเตอรอลเป็นสามเท่าในปู (Cancer antennarius) (Watson,1985) มีรายงานว่าฮอร์โมนกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างฟีโรโมน (sex pheromone)ในแมลง โดยทำการศึกษาในเห็บ (Hyalomma dromedarii) พบว่าถ้าให้สารเบตา-เอคไดโซนต่อตัวอ่อนในระดับ 10-20 μg จะเร่ง

การลอกคราบ แต่ถ้าให้สูงกว่า 20 ug พบว่าความสามารถในการสืบพันธุ์ของทั้ง 2 เพศ ลดลงอย่างมาก (Khalil และคณะ, 1984)

ในปี ค.ศ.1970 Koreeda และคณะ ได้สกัดอะจูกาแลคโตน (ajugalactone) จากพืช Ajuga documbens และทำการทดลอง พบว่าสารในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ชนิดนี้ สามารถยับยั้งการทำงานของโพแนสเตอโรน เอ ได้ จึงทำให้เป้าหมายการใช้ประโยชน์ในด้านการเป็นสารยับยั้งการลอกคราบได้รับความสนใจมากขึ้น พบว่า โพแนสเตอโรน เอ ซายแอสเตอโรน (cyasterone) และเบตา-เอคไดโซน ยับยั้งการเจริญเติบโต และ การลอกคราบของตัวอ่อน Pectinophora gossypiella ในขณะที่อะจูกาแลคโตน ไม่มีผลยับยั้งในแมลงดังกล่าว ทำให้มีผู้ตั้งสมมุติฐานว่าสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ที่สังเคราะห์ในพืชนั้น อาจทำหน้าที่ส่วนหนึ่งในการป้องกันการทำลายพืชจากศัตรูจำพวกแมลงด้วย (Jones, 1978)

ประโยชน์ของฮอร์โมนลอกคราบ

จากความสำคัญมากมายของสารกลุ่มเตอรอยด์ต่อสัตว์พวกอาร์โธรพอดและครัสตาเซียน ดังกล่าวแล้วข้างต้น ทำให้มีการศึกษาการใช้ประโยชน์ของเอคไดโซนกันอย่างกว้างขวาง เช่น ในแง่ของการใช้เป็นยาฆ่าแมลง ผลปรากฏว่าสารในกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์นี้มีฤทธิ์ในการต่อต้านแมลงมากกว่ายาฆ่าแมลงที่สังเคราะห์ขึ้น คือมีความจำเพาะต่อแมลงสูง และแมลงไม่สามารถปรับตัวเพื่อต่อต้านยาได้ จึงมีการตื่นตัวและคาดคะเนกับสารกำจัดแมลงในกลุ่มฮอร์โมนที่ได้จากแมลงว่าน่าจะเป็นความหวังยุคที่ 3 ของยาฆ่าแมลงต่อจาก D.D.T. (William,1967) มีการใช้สารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์เป็นสารฆ่าหอย (molluscicides) หอยในดินนี้เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ เช่นหอยทาก (Biomphalaria globosus) เพราะมีข้อดีที่ไม่ต้องใช้ในปริมาณมาก และไม่มีพิษตกค้างต่อคนและสัตว์ การใช้ฮอร์โมนลอกคราบจะให้ราคาที่ถูกลงและให้ผลที่ดีกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์ (Kloos และMcGullough,1982)

จากคุณประโยชน์ดังที่กล่าวมา จึงได้มีการพยายามผลิตสารนี้ให้เพียงพอแก่ความต้องการ และเนื่องจากการสะสมของฮอร์โมนลอกคราบมีในพืชสูงมาก ดังนั้นแนวโน้มการผลิตจึงมุ่งไปที่การใช้พืชเป็นแหล่งวัตถุดิบเป็นสำคัญ Hikino และคณะ(1971) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดของพืชในสกุล Achyranthes วงศ์ Amaranthaceae พบว่าแคลลัสของพืชชนิดนี้สามารถสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนและอินโดสเตอโรนได้ แต่ปริมาณต่ำมาก (0.002 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง) แคลลัสจากต้นกล้าของ Triathema

portulacastrum ในอาหาร MS ที่เสริม 2,4-D 2 มก./ล.สามารถผลิตเบตา-เอคไดโซน ได้เช่นกัน (0.0349 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง) (Ravishankar, 1979)

จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าต้นไข่เน่าเป็นพืชพื้นเมืองของไทยที่มีการสะสมของเบตา-เอคไดโซนในปริมาณที่สูงมาก จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นแหล่งผลิตเบตา-เอคไดโซน อย่างไรก็ตามเนื่องจากการสะสมของฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซน พบส่วนใหญ่ในเปลือกของต้นไข่เน่า ซึ่งการลอกส่วนเปลือกจะมีผลทำให้ต้นแคระแกร็นและตายไปได้ในที่สุด อีกประการหนึ่งไม้ชนิดนี้เจริญเติบโตช้า จึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนลอกคราบ โดยการลงทุนปลูกและบำรุงรักษาซึ่งยุ่งยากและใช้ต้นทุนสูง ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงถูกนำมาใช้เพื่อการผลิตสาร ซึ่งอาจจะเป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเบตา-เอคไดโซน โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแคลลัสของต้นไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.) โดยเริ่มตั้งแต่ศึกษาระดับของการสังเคราะห์ฮอร์โมนในส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า และคัดเลือกส่วนของพืชที่เหมาะสมต่อการผลิตฮอร์โมนจาก 3 ส่วนคือ ชิ้นส่วนของใบ ชั้นของอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้น ทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโต วิธีสกัด และวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนในแคลลัสแต่ละส่วน และผลของปัจจัยต่างๆต่อการผลิตฮอร์โมนลอกคราบของแคลลัส เปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในพืชธรรมชาติ

ขั้นตอนการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของต้นไข่เน่า คือ ชิ้นส่วนของใบ ชั้นของอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้น บนอาหารแข็งสูตรของ Murashige and Skoog (MS,1962)

2. ศึกษาปัจจัยและองค์ประกอบที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS

3. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์และวัดปริมาณของฮอร์โมนลอกคราบ ในส่วนต่างๆ ของต้นไข่เน่า โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) และ High performance liquid chromatography (HPLC)

4. ศึกษาเปรียบเทียบระดับของฮอร์โมนลอกคราบ ในส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อต้น

ไข่เน่าที่เจริญอยู่ในธรรมชาติ เช่น ชั้นส่วนของใบ ชั้นของอีพิเดอร์มิส และส่วนของต้น

5. ศึกษาวิธีการตรวจหาและวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนลอกคราบในแคลลัส โดยใช้เทคนิค TLC และ HPLC

6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มการผลิตเบตา-เอคไดโซนด้วยแคลลัสส่วนที่คัดเลือกแล้ว