บทที่ 1

บทนำ

กวาวเครือขาว (Pueraria mirifica Airy Shaw & Suvatabandhu) เป็นพืชสมุนไพร อยู่ในวงศ์ Leguminosae (Papilionoideae,tribe Phaseoleae) เป็นไม้หายากมีแหล่งกำเนิดตามป่าผลัดใบ บริเวณภาคเหนือของประเทศไทย กวาวเครือขาวจะขึ้นตามขอบป่า ในบริเวณที่สูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 300-800 เมตร มักพบบริเวณพื้นที่ลาดชัน ดินมีหินและกรวดปน กวาวเครือขาวมีลักษณะเป็นไม้เลื้อยเนื้อแข็ง (woody climber) อายุยืน ใบเป็นแบบก้านละ 3 ใบ (pinnately trifoliolate) ดอกแบบช่อรวมยาวประมาณ 30 ซม. แขนงแตกจากบริเวณช่อดอก ก้านดอกสั้น ดอกสีฟ้าอมม่วง 2-3 ดอกต่อข้อ เมื่อต้นแก่ให้ฝักสีน้ำตาล มีเมล็ด 2-5 เมล็ดต่อฝัก เมล็ดขนาดความยาวประมาณ 2-5 มม. เมล็ดแก่จะมีลายสีเขียวปนม่วงหรือสีน้ำตาลปนม่วง มีรากสะสมอาหารแบบกลมและเรียวเล็ก (Vander Maesen,1985)

ปัจจุบันสภาพป่าได้ถูกทำลายลงอย่างรวดเร็ว ทั้งการทำลายโดยธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า ซึ่งมักจะเกิดในฤดูร้อน ในช่วงการออกดอกและติดฝัก การทำลายโดยมนุษย์ที่นำพื้นที่ป่ามาใช้ทำเกษตรกรรมและรีสอร์ท ทำให้กวาวเครือขาว ซึ่งมีอยู่ในป่าทางภาคเหนือของประเทศไทยเพียงแห่งเดียว ได้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว

คุณค่าทางด้านการแพทย์ มีการนำสารสกัดหัวกวาวเครือขาวมาใช้รับประทานในหมู่สตรีภาคเหนือ ทำให้สภาพร่างกายคล้ายหญิงสาว โดยมีผลต่อการบำรุงกำลังและทำให้ผิวพรรณเต่งตึง นอกจากนี้บางคนยังเชื่อว่าเป็นยาอายุวัฒนะ มีรายงานการทดสอบสารฤทธิ์เอสโตรเจนจากพืชสกุลนี้ ในสัตว์ทดลองหลายชนิด ซึ่งศึกษาถึงระดับสารที่เหมาะสมในการใช้งานกับสัตว์ชนิดต่าง ๆ ทั้งผลในด้านการเจริญ พัฒนาขึ้นและยับยั้งการเจริญ เช่น การคุมกำเนิดสัตว์ (Smitasiri et al.,1986) และอาจพัฒนาเป็นยาคุมกำเนิดสำหรับคนได้ นอกจากนี้ยังอาจพัฒนาในการผลิตเป็นเครื่องสำอางค์อีกด้วย จากรายงานการทดลองจะเห็นว่า มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์จากกวาวเครือขาวได้อย่าง

กว้างขวางในอนาคต

การเพิ่มจำนวนกวาวเครือขาว จึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรชนิดนี้ แต่การขยายพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม เช่น การตัดชำ มักมีข้อจำกัด เนื่องจากขยายพันธุ์ได้ช้าและใช้เวลานาน โดยทั่วไปแล้วการตัดชำไม้เนื้อแข็งจะเกิดรากได้ค่อนข้างยาก ทั้ง ๆ ที่มีการทดลองหาเงื่อนไขในการเจริญหลายแบบและใช้สารเร่งการเจริญเติบโต สำหรับการชักนำให้เกิดรากในช่วงกว้าง (Mascarenhas et al.,1987) การทดลองที่ทำกับต้นไม้ในเขตร้อน จะค่อนข้างมีข้อจำกัดมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นไม้ในเขตหนาว (Lee and Rao,1981; Mascarenhas et al., 1989)

ลักษณะพันธุกรรมของพืช พื้นที่สำหรับการเพาะปลูกและความแปรปรวนของภาวะแวดล้อม ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการเพิ่มจำนวนกวาวเครือขาวทั้งสิ้น จึงมีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยพัฒนาผลผลิตจากพืชที่พบในป่า ทั้งในด้านการปรับปรุงทางพันธุกรรม และวิธีการเพาะเลี้ยง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ผลผลิตดีปริมาณสูงในระยะเวลาสั้น ซึ่งจะลดค่าใช้จ่าย ในด้านแรงงาน พื้นที่ และอัตราเสี่ยงต่อการเจริญของพืชในภาวะแวดล้อมธรรมชาติซึ่งมีความแปรปรวนสูง อีกทั้งยังสามารถพัฒนาลักษณะทางพันธุกรรมให้เหมาะสมต่อระบบการผลิตแบบอุตสาหกรรม

<u>การขยายพันธุ์พืชในระดับเล็ก (micropropagation)</u>

การขยายพันธุ์ในระดับเล็ก (Micropropagation) เป็นการเพิ่มจำนวนต้นที่มีลักษณะเหมือนต้นพันธุ์ทุกประการ โดยอาศัยหลายวิธีประกอบกัน รวมทั้งอาศัยเนื้อเยื่อและชนิดเซลล์เริ่มต้นที่แตกต่าง อยู่ในช่วงตั้งแต่ ส่วนเหนือใบเลี้ยง (cotyledons) เนื้อเยื่อเจริญส่วนที่ไม่ใช่การสืบพันธุ์ (vegetative meristem) ถึงเนื้อเยื่อส่วนที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ (reproductive tissue) ซึ่งสามารถถูกชักนำให้เปลี่ยนแปลงเป็นต้นพืชใหม่ โดยผ่านวิถีออร์แกนโนเจเนซิส (organogenesis) หรือ เอมบริโอเจเนซิส (embryogenesis) เนื้อเยื่อเริ่มต้นอาจได้จากพืชต้นอ่อนหรือพืชที่ต้นเจริญเต็มที่หรือช่วงอายุต่าง ๆ ระหว่าง 2 ช่วงนี้ พืชต้นอ่อนจะเป็นที่นิยมนำมาใช้มากกว่าเพราะง่ายต่อการ

ขยายพันธุ์ เนื่องจากมีความพร้อมที่จะพัฒนาในอาหารและวิธีการที่เหมาะสม (Aitken-Christie and Connett,1992)

การเกิดออร์แกโนเจเนซิส แตกต่างจากเอมบริโอเจเนซิส คือเป็นการชักนำให้เกิดยอดข้าง (axillary shoot) หรือ ยอดส่วนปลาย (adventitious shoot) แล้วนำมาชักนำให้เกิดรากตาม ก่อนเป็นต้นอ่อนโดยสมบูรณ์ ในขณะที่ embryogenesis จะเกิดทั้งยอดและราก(somatic embryos) พร้อมกัน และงอกเป็นต้นใหม่

ในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพืช 3 รูปแบบดังต่อไปนี้

1. ชิ้นส่วน ---> แคลลัส ---> เมอริสเทมอยด์ ---> ยอดและราก ---> ต้นอ่อน พืชตัวอย่าง
   (explant) (callus) (meristemoids) (shoot & root) (plantlets)
2. ชิ้นส่วน ---> แคลลัส ---> เซลล์ ---> เอมบริออยด์/เอมบริโอส --->ต้นอ่อน พืชตัวอย่าง
   (explant) (callus) (cell) (embryoid/embryos) (plantlets)
3. ชิ้นส่วน ---> ตาข้าง ---> เพิ่มจำนวนยอด ---> ราก ---> ต้นอ่อน พืชตัวอย่าง
   (explant) (axillary buds) (multiple shoot) (root) (plantlets)

รูปแบบแรกนี้ จะขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อพืช ในการตอบสนองต่ออาหาร เงื่อนไขในการเลี้ยง และช่วงเวลาในการเลี้ยงแคลลัสซึ่งในไม้เนื้อแข็งจะตอบสนองต่อสารอาหาร และสารเร่งการเจริญต่ำกว่า พืชใบเลี้ยงคู่ที่เป็นไม้เนื้ออ่อน

รูปแบบที่ 2 การเกิดต้นอ่อนโดยไม่อาศัยเพศจะเกิดได้ง่ายในพืชบางชนิด ในขณะที่พืชชนิดอื่น ๆ จะเกิดได้ไม่แน่นอน เกิดในลักษณะผิดปรกติหรือไม่เกิดเลย มีไม้เนื้อแข็งไม่กี่ชนิดที่สามารถเกิด asexual embryos (embryoids) และพัฒนาเป็นต้นพืช

รูปแบบที่ 3 เป็นวิธีที่ใช้ในการผลิตต้นอ่อน ซึ่งเสี่ยงต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยกว่าวิธีอื่นๆ โดยอัตราการเพิ่มจำนวนจะขึ้นกับคุณภาพของตาข้าง (Rao and

Lee,1986) และเป็นรูปแบบที่ใช้ในการผลิตต้นอ่อนจากไม้เนื้อแข็งมากที่สุด แต่อาจจะมีการปรับขั้นตอนที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิด (Thorpe and Kumer,1991)

การเลือกใช้อาหารพื้นฐาน ขึ้นอยู่กับชนิดพืชไม้เนื้อแข็งว่าจะใช้อาหารที่มีแร่ธาตุในปริมาณสูง (high salt) ได้แก่อาหารสูตร SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) อาหารสูตร MS (Murashige and skoog,1962) หรือจะใช้อาหารที่มีแร่ธาตุในปริมาณต่ำ (low salt) ได้แก่ อาหารสูตร GD (Gresshoff and Doy,1972), อาหารสูตรสำหรับไม้เนื้อแข็ง (WPM) (Lloyd and McCown,1980) และอาหารสูตรแร่ธาตุในปริมาณสูงที่ลดระดับความเข้มข้นลง

Lloyd และ McCown (1980) พบว่า เนื้อเยื่อพืชไม้เนื้อแข็งเจริญได้ดีในอาหารที่มีแร่ธาตุต่ำ การเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดและระยะของการเปลี่ยนแปลงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพืช

การชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง ชิ้นส่วนพืชที่ทำการทดลอง ชนิดและระดับไซโตไคนินจะมีความสำคัญมากกว่าองค์ประกอบของธาตุอาหาร แต่สำหรับการชักนำให้เกิดการยืดตัวของยอด (shoot elongation) และการเพิ่มจำนวนยอด (shoot multiplication) และการชักนำให้เกิดราก พบว่าธาตุอาหารจะมีผลต่ออัตราการเจริญและคุณภาพของยอด (Aitken-Christie and Connett,1992)

โดยทั่วไปการชักนำให้เกิดยอดจะใช้ไซโตไคนิน ชนิด benzylaminopurine (BAP) ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.5-5.0 มก.ต่อลิตร (2.2-22 ไมโครโมล) ที่ระดับ BAP สูง เช่นที่ 5 มก.ต่อลิตร จะมีผลให้ตายอดเกิดได้ดี และต้องใช้เวลานานในการชักนำให้เกิดการยืดตัวของยอด ที่ความเข้มข้นต่ำ เช่นที่ 0.5 มก.ต่อลิตร จะให้ยอดที่มีการพัฒนาได้รวดเร็วกว่า ในบางกรณีอาจมีการใช้ไซโตไคนินหลายชนิดร่วมกันในการชักนำให้เกิดยอด ส่วนสารเร่งการเจริญเติบโตพืชชนิดอื่นเช่น จิบเบอเรลลิน และออกซินมักไม่จำเป็นต่อการชักนำให้เกิดยอดมากนัก แต่บางครั้งการเติมออกซิน ที่ความเข้มข้นต่ำประมาณ 0.05-0.5 มก.ต่อลิตร (0.27-2.7ไมโครโมล) อาจมีส่วนช่วยชักนำให้เกิดยอดได้บ้าง

การชักนำให้เกิดรากจะใช้ออกซิน ชนิด อินโดลบิวทิริก แอซิด (IBA) หรือแนบทาลีน อะซิติก แอซิด (NAA) หรือทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้น IBA ในช่วง

0.1-5.0 มก.ต่อลิตร (0.49-24.6 ไมโครโมล) และความเข้มข้น NAA ในช่วง 0.1-5.0 มก.ต่อลิตร (0.53-26.8 ไมโครโมล)

การชักนำให้เกิดรากจากยอดของพืชต้นอ่อนมักจะไม่มีปัญหามากนัก เมื่อนำออกสู่สภาพแวดล้อมจะมีอัตราการรอดประมาณร้อยละ 70-80 (Mohammed and Vidaver, 1988)

การขยายพันธุ์พืชโดยชักนำให้เกิด ออร์แกโนเจเนซิส จากเนื้อเยื่อพืชไม้เนื้อแข็งและนำไปปลูกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ พบว่ามีการเจริญเติบโตเหมือนการงอกจากเมล็ดปกติและในบางกรณีเจริญได้ดีกว่า (Thorpe et al.,1991; Khuspe et al., 1987) และมีลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) ที่เหมือนกัน (Chalupa,1987)

การนำต้นอ่อนที่ได้จากการชักนำผ่าน โซมาติก เอมบริโอ (somatic embryos) ของพืชไม้เนื้อแข็งไปปลูกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ ยังไม่มีการทดสอบและประเมินค่าการทดลองที่แน่นอน จึงยังไม่มีการผลิตเป็นการค้าเหมือนการขยายพันธุ์แบบออร์แกโนเจเนซิส

<u>เอมบริโอเจเนซิส (Embryogenesis)</u>

มีรายงานการขยายพันธุ์พืชป่าผ่านระบบโซมาติค เอมบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis) จากส่วนไฮโปคอทิลของ <u>Liguidambar styraciflua</u> (Sommer and Brown,1980) หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาเทคนิคสำหรับไม้เนื้อแข็ง เช่น พวกสน ได้แก่ <u>Picea abies</u> (von Arnold and Hakman, 1986) <u>Picea mariena</u> (Tautorus et al.,1990)

BAP และ 2,4-D มักจะใช้เติมในอาหาร ระดับความเข้มข้นของ BAP ในช่วง 0.5-5.0 มก.ต่อลิตร (2.22-22.2 ไมโครโมล) และระดับความเข้มข้นของ BAP ใน 1.0-10.0 มก.ต่อลิตร (4.5-45 ไมโครโมล) (Hakman and von arnold,1985; Gupta and Durzan,1987; Merkle and Sommer,1986) แต่ก็มีบางรายงานการทดลองที่ไม่ใช่ออกซินร่วมกับ BAP ในพืช <u>Abies</u> spp. (Norgaard and Krogstrup, 1991)

มีรายงานการทดลองซึ่งใช้ แอบไซซิค แอซิด (ABA) ชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นอ่อน (Hakman and Von Arnold,1985; Robert et al.,1990; Joy et al.,1991) ซึ่งจำเป็นสำหรับการงอกเป็นต้นต่อไป

รายงานการทำเมล็ดพืชเทียมของไม้เนื้อแข็ง พบว่ามีอัตราการงอกเพียงร้อยละ 1-2 (Gupta and Duzan,1991)

การเลี้ยงรากพืช (Root Cuture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากจะใช้ในการเพิ่มจำนวนต้นเพื่อนำไปปลูกในสภาพธรรมชาติแล้ว ยังใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ต้องการจากพืชชั้นสูงโดยตรง ในพืชหลายชนิดพบว่า วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้สารทุติยภูมิที่มากกว่าหรือเท่ากับพืชที่ได้จากธรรมชาติ (Dougall,1981) โดยใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่า เช่น ผลผลิต ชิโคนิน (shikonin) จากพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการสะสมชิโคนินมากกว่าในรากธรรมชาติถึง 10 เท่า ในระยะแรกเป็นการสกัดสารจากแคลลัสซึ่งเป็นเซลล์พืชที่เจริญไม่เป็นระเบียบ (disorganized cell) เช่น การผลิตไอโซฟลาโวนอยด์ จากแคลลัสของ Pueraria lobata (Takeya and Itokawa,1982) การผลิตกินซีโนไซด์ (ginsenoside) จากแคลลัสของ Panax ginseng (Furuya et al.,1984)

กระบวนการผลิตสารประกอบจากเนื้อเยื่อพืช ต้องอาศัยการสังเคราะห์หลายวิถีเมตาโบลิซึม (metabolic pathway) เช่น ชีวสังเคราะห์สารประกอบอะโรมาติค (aromatic compound) กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) จะใช้ทั้งวิธีชิคิมิค แอซิด (shikimic acid pathway) และวิถี อะซิติค แอซิด (acetic acid pathway) (Hinderrer,1988)

มีรายงานการทดลองที่แสดงให้เห็นถึง เนื้อเยื่อส่วนต่างๆของพืชมีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิเช่น Atropa beladona จะให้ผลผลิตของโทรเปนอัลคาลอยด์ไฮโอสไซยามิน (tropane alkaloid hyoscyamin) ในแคลลัสซึ่งเปลี่ยนแปลงเป็นรากแล้ว แต่จะไม่ให้ผลผลิตนี้ในแคลลัสปกติ (Flores et al.,1987) และพบปริมาณไฮโอสไซยามิน (hyoscyamine) และสโคโปลามิน (scopolamine) มาก ในแคลลัสที่เกิดการ

เปลี่ยนแปลงมากขึ้น ตามลำดับ การเจริญเติบโตเป็นต้นของ Datura innoxia (Hiroka,1974) มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและชีวเคมีจากเซลล์พืชที่เป็นระเบียบ (organized cell) เจริญไปเป็นเซลล์ที่ไม่เป็นระเบียบ (disorganized cell) เป็นการแสดงให้เห็นว่า การพัฒนารูปร่างมีผลต่อวิถีต่าง ๆ รวมทั้งการผลิตสารทุติยภูมิ (Sings and Flores,1990) การเลี้ยงรากพืช (root culture) รากที่เลี้ยงจะให้โครงสร้างเหมือนกับรากที่ติดกับต้นพืช แต่จะไม่มีการเจริญด้านข้าง (secondary growth) การชักนำให้เกิดการเจริญ (ทั้งกว้างและยาว) ของรากจากเมล็ด ซึ่งมีจุดกำเนิดจากเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย (apical meristem) ซึ่งเป็นการเจริญในระยะแรก (primary growth) ส่วนความหนาของรากซึ่งเกิดจาก วาสคิวลา แคมเบียม (vascular cambium) เป็นการเจริญในระยะที่สอง (secondary growth) สารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน จากภายนอกจะทำให้เกิดการเรียงตัวใหม่ของเซลล์คอร์ติคอล (cortical cells) ที่ขยายตัวด้านยาวมาเป็นการขยายด้านรัศมีโดยออกซินและไซโตไคนิน มีผลในการควบคุมเนื้อเยื่อเจริญในบริเวณปลาย ซึ่งเป็นตัวกำหนดรูปแบบของท่อลำเลียงในราก (Torrey and Wallace,1975)

ระบบการเลี้ยงรากพืช รากจะสามารถสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่จำเป็นสำหรับการเจริญและพัฒนาได้ เช่น สารเร่งการเจริญเติบโต (ออกซิน จิบเบอเรลลิก แอซิด ไซโตไคนิน แอบไซซิก แอซิด และเอธิลีน) มีบางรายงานการทดลองพบว่าจะต้องกระตุ้นการเลี้ยงรากโดยเติมออกซินและไซโตไคนิน ในความเข้มข้นต่ำ (Terry,1987)

มีการเลี้ยงรากพืชไม้เนื้อแข็ง เพื่อผลิตสารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น Acer rubrum, Allocasuarina decaisneana, Alnus rubra, Casuarina cunninghamiana, Myrica gale และ Quercus rubra ซึ่งพยายามปรับปรุงสารอาหารและสารเร่งการเจริญเติบโตให้เหมาะสม แต่พบว่าการเลี้ยงรากพืชไม้เนื้อแข็งมักจะขาดผลผลิตจากการสังเคราะห์แสง ซึ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของเนื้อเยื่อเจริญของรากที่ไม่ได้เจริญรวมกับต้นพืช (Terry,1987)

การถ่ายโอนรหัสพันธุกรรม (T-DNA) จาก Ri พลาสมิด (Ri-plasmid) ของ Agrobacterium rhizogenes น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยให้ การเลี้ยงรากพืชไม้เนื้อแข็งมีลักษณะที่ดีขึ้น ซึ่งพบว่ามีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นในการเลี้ยงรากฝอย

(hairy root) ของ Hyoscyamus muticus เพื่อผลิตสารโทรเปนอัลคาลอยด์ (tropane alkaloids) (Crossway et al.,1986) และการเลี้ยงรากที่ได้รับการถ่ายโอนรหัสพันธุกรรม (excised transformed roots) ของ Ambrosia,Bidens, Rudbeckia และ Tagetes ซึ่งสังเคราะห์ ซัสควิเทอเปนแลคโตน (Sesquiterpene lactones) และโพลีอเซททีลีน (polyacetylene) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ต่อต้านแบคทีเรียเชื้อราและไส้เดือนฝอย (Terry,1987)

Agrobacterium rhizogenes เป็นแบคทีเรียซึ่งมีพลาสมิดที่ชักนำให้เกิดราก เมื่อเข้าไปอยู่ในยอดหรือรากของพืชหลายชนิด โดยจะส่งผ่านสารพันธุกรรมที่มีผลชักนำให้เกิดรากซึ่งอยู่บนชิ้นส่วนของ ที ดีเอนเอ (T-DNA, transferred DNA) ของ อาร์ไอ พลาสมิด (Ri plasmid, root inducing plasmid) เมื่อผ่านเข้าสู่เซลล์พืชจะย้ายเข้าสู่จีโนมิก ดีเอ็นเอ ของเซลล์พืชและอยู่รวมกัน (Braun and wood,1976; Parson et al.,1986)

Tepfer (Oome et al.,1987)ได้กล่าวว่าอาร์ไอ ทีดีเอ็นเอ (Ri T-DNA) ที่เข้าไปอยู่ในพืชไม่จำเป็นต้องเป็นอันตรายต่อพืช อาจจะรวมกับดีเอ็นเอพืช และถ่ายทอดระบบการเกิดราก ซึ่งมีรายงานการทดลองกับพืชหลายชนิดรวมทั้งพืชไม้เนื้อแข็ง เช่น แอปเปิ้ล (Otten et al.,1981)

หลังจากพืชได้รับ Agrobacterium rhizogenes และย้ายลงในอาหารเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย พืชจะชักนำให้เกิดรากจำนวนมากใน 2-3 สัปดาห์ซึ่งเป็นผลจากการควบคุมของกลุ่มยีน ที่ชักนำให้เกิดราก คือ ที ดีเอ็นเอ จาก อาร์ไอ พลาสมิด โดยกลุ่มยีนจะถอดรหัส การสังเคราะห์ กรดอินโดลอะซิติก ซึ่งชักนำให้เกิดรากแขนงในพืช

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของพืชในสกุล Pueraria พบว่ามีสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ ในกลุ่มไอโซฟลาโวน (isoflavones)และคูเมสเทน (cumestans) มีสมบัติคล้ายเอสโตรเจน (Kashemsanta et al.,1963) เนื่องจาก ไอโซฟลาโวนสามารถที่จะเลียนแบบ สเตอโรอิดอล นิวเคลียส (steroidal nucleus) ของเอสโตรเจน ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศหญิงในธรรมชาติ (Williams and Harborne,1989) Pueraria mirifica นอกจากจะพบสารไอโซฟลาโวนอยด์แล้วยังเป็นพืชชนิดเดียวในสกุลนี้ที่ให้สารประกอบเอสโตรเจนในรากคือ มิโรเอสทอล (miro-estrol) (Cain,

1960) บีตา-สิโตเสตอรอล (β -sitosterol) สติกเมอสเตอรอล (stigmasterol) (มานิดา,2514) มิโรเอสทอลมีลักษณะโครงสร้างคล้าย ไอโซฟลาโวน ไดไซน์ (isoflavone daidzein,7,4'- dihydroxy isoflavones) จากสารประกอบเอสโตรเจนนี้ส่งผลให้ Pueraria mirifica ให้ฤทธิ์เอสโตรเจนสูงกว่าพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน

ในส่วนของขั้นตอนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ชนิดที่ใกล้เคียงกับที่พบในพืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการศึกษารายละเอียดในการสังเคราะห์สาร ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) พบว่าสารชนิดนี้เกิดจากวงอะโรมาติกของสองระบบ (วง A,B) ซึ่งได้จากการสังเคราะห์สารวิถีที่แตกต่างกัน วง B ได้จากวิถีชิคิเมท (shikimate pathway) ผ่านฟีนิลอลานีน (phenylalanine) และถูกเปลี่ยนแปลงเป็นคูมาริลโคเอ (4-Coumaryl-CoA) ส่วนวง A เกิดจากการรวมตัวแบบหัวต่อหางของอะซิเตท (acetate) 3 หน่วยซึ่งเปลี่ยนมาจาก มาโลนิลโคเอ (malonyl CoA) มาต่อกับคูมาริลโคเอได้สารฟลาโวนอยด์ มีโครงสร้าง 15 คาร์บอน ไอโซฟลาโวนอยด์จะเกิดจากการเคลื่อนย้ายหมู่เอริล (aryl) ภายในโมเลกุลของวง B จากตำแหน่ง 2 ไป 3 ระหว่างการเกิดปฏิกิริยาจะชักนำให้เกิดพันธะคู่ ดังนั้นฟลาวาโนน (flavanone) ก็จะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นไอโซฟลาโวน (isoflavone) ซึ่งจะเป็นสารเริ่มต้นของไอโซฟลาโวนอยด์ต่อไป

เอนไซม์คาร์โคน ซินเทส (Chalcone synthase) เป็นเอนไซม์ตัวสำคัญในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เพราะทำให้ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) เปลี่ยนเป็นแขนงของฟลาโวนอยด์ (flavonoid branch) (Berlin,1986)

ระยะเวลาการรับแสงมีผลชักนำการทำงานของเอนไซม์ ที่สังเคราะห์ฟลาโวน (flavone) และฟลาโว (flavol) โดยจะส่งผลต่อการสะสมสารฟลาโวนอยด์ (Hinderer, 1988) และพบการทำงานของเอนไซม์ในลักษณะใกล้เคียงกันในการสังเคราะห์ไฟโตอะเล็กซิน (phytoalexin) จากไอโซฟลาโวนอยด์ในภาวะเครียดต่อสภาพแวดล้อมของเซลล์ถั่ว (Harry,1984) พบว่า ภาวะขาดน้ำของเซลล์ถั่วเหลืองจะเปลี่ยน naringenin เป็น apigenin (flavonoid branch) ขณะที่เมื่อให้สาร elicitor แก่เซลล์ เซลล์จะเปลี่ยน maringenin เป็น genistein(isoflavonoid

branch) (Berlin,1986) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม้เนื้อแข็งมักพบสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compound) ซึ่งจะเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืช ทำให้เนื้อเยื่อไม่พัฒนา สามารถช่วยโดยการ เปลี่ยนอาหารใหม่ ใช้อาหารเหลว เติมสารแอนตี้ออกซิแดนท์ (antioxidants) เติมสารดูดสารประกอบฟีโนลิก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มืดอาจมีส่วนช่วยลดสารประกอบฟีโนลิก เนื่องจากแสงมีส่วนช่วยทำให้เกิดออกซิเดชั่นของฟีนอล (Bhojwani and Razdan,1983)

ปัจจุบันแหล่งกำเนิดกวาวขาวในธรรมชาติมีลดน้อยลง เนื่องจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งเป็นบริเวณที่เคยพบการกระจายตัวของพืชชนิดนี้ได้ถูกทำลายลงอย่างรวดเร็ว งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการขยายพันธุ์พืชและเพิ่มการผลิตสารฤทธิ์เอสโตรเจน โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้มีการเจริญเติบโตได้ครบวงจรชีวิต ซึ่งจะเป็นการขยายจำนวนต้นพืชในห้องทดลองสำหรับการเพาะปลูกพืชเชิงพาณิชย์ต่อไป และเพื่อพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากในห้องทดลองซึ่งจะเป็นจุดเบื้องต้นต่อการนำไปใช้ในการผลิตเนื้อเยื่อรากในระดับอุตสาหกรรม ทั้ง 2 เป้าหมายนี้ย่อมส่งผลต่อเนื่องในเชิงบวกต่อการศึกษา และพัฒนาการผลิตสารประกอบที่มีคุณค่าทางเภสัชวิทยาจากพืชชนิดนี้

<u>การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง</u>

โครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin-layer Chromatrography หรือ TLC) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กับอย่างกว้างขวาง เหมาะสำหรับใช้แยกสารปริมาณน้อย ๆ ออกจากกันเพราะสามารถทำได้สะดวก รวดเร็วและประหยัด เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารในระหว่างเฟส (phase) 2 ชนิด ซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันคือ เฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สารจะเคลื่อนที่บนเฟสคงที่โดยการพาของเฟสเคลื่อนที่ (development) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารไม่เท่ากัน ขึ้นกับปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสารกับเฟสคงที่และระหว่างสารกับเฟสเคลื่อนที่ (นันทวัน,2534) เปรียบเทียบอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้นของสาร เราสามารถวัดระยะทางที่สารนั้น ๆ เคลื่อนที่ไปจากจุดเริ่มต้นกับ

ระยะทางที่ตัวชะเคลื่อนที่ไป (solvent front) มาคำนวณหาค่าคงที่ซึ่งเรียกว่า R_f (relative fraction) ซึ่งเป็นค่าคงที่ใช้เป็นสมบัติเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิดในระบบที่ทำการทดลอง

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}$$

ใช้วิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบางเพื่อเปรียบเทียบสารเคมีที่ผลิตจากพืช ในสภาพปลอดเชื้อและสภาพแวดล้อมภายนอก เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตทุติยภูมิต่อไป

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อศึกษาระบบนิเวศน์ของกวาวเครือขาว สำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเพาะปลูกพืชชนิดนี้ ในเชิงพาณิชย์
2. เพื่อศึกษาการเจริญและการขยายพันธุ์ของกวาวเครือขาว ในเรือนเพาะชำ สำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการศึกษาอุปสรรคและปัญหาของการขยายพันธุ์โดยวิธีไม่อาศัยเพศของพืชชนิดนี้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลนำร่องสำหรับการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป
3. เพื่อหาชนิดของอาหารและภาวะที่เหมาะสม ต่อการขยายพันธุ์กวาวเครือขาว ในสภาพปลอดเชื้อและพัฒนาการเพาะเลี้ยงรากพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ขั้นตอนการวิจัย

1. ศึกษาชนิดของอาหารและภาวะที่เหมาะสม ในการเลี้ยงและชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของกวาวเครือขาว
2. ศึกษาชนิดของอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อทิศทางการเจริญของแคลลัส
3. ศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารและสารเร่งการเจริญเติบโต ในการชักนำให้เกิดยอดและการยืดตัวของยอด ของเนื้อเยื่อส่วนข้อและยอด
4. ศึกษาชนิดของอาหารและภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากจากส่วนยอดของพืช
5. ศึกษาการชักนำให้เกิดรากโดย Agrobacterium rhizogenes
6. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงรากพืชแบบแขวนลอย
7. ศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงต้นกวาวเครือขาว
8. ศึกษาการขยายพันธุ์กวาวเครือขาวในสภาพแวดล้อมภายนอก
9. ตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดพืชด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง