บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยการแปรในการเลี้ยงเนื้อเยื่อระย่อมเลือกทำในรูปแคลลัสซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ยังไม่มีพัฒนาการไปเป็นต้นหรืออวัยวะที่สมบูรณ์ (unorganized tissue) โดยอาศัยหลักการที่ว่าเนื้อเยื่อของพืชมักประกอบด้วยเซลล์ที่แตกต่างๆ กัน heterogeneous tissue) แต่มาอยู่รวมกันเพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่างรูปแบบทางพันธุกรรมอาจเหมือนกันหรือไม่เหมือนกัน รวมทั้งการแสดงออกของยีนก็ไม่เท่ากัน เซลล์ที่ยีนมีศักยภาพทางพันธุกรรมสูงกว่า (high genetic potential) ย่อมมีโอกาสแสดงออกเหนือเซลล์อื่นๆ หากเซลล์เหล่านั้นมิได้อยู่บริเวณจุดเจริญด้วยแล้วโอกาสดังกล่าวก็ยิ่งน้อยลงไปเป็นลำดับ เนื่องจากเนื้อเยื่อแคลลัสมีจุดเจริญมากกว่าต้นพืชตามธรรมชาติเพราะสามารถเจริญออกไปได้ทุกทิศทาง ต่างกับต้นพืชที่มีจุดเจริญน้อยกว่า ดังนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงในรูปแคลลัสย่อมเป็นการเปิดโอกาสให้เซลล์หลายประเภทได้แสดงออก เพื่อตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมได้ทัดเทียมกัน ผลที่ตามมาก็คือมีโอกาสเกิดการแปรในด้านต่างๆมากขึ้น (Murashige,1974,Vajrabhaya และ Vajrabhaya,1974;Vajrabhaya, 1977)

การทดลองนี้เลือกใช้ส่วนของปล้องจากลำต้นอ่อนที่เจริญมาจากการปักชำราก ทั้งนี้เพราะเนื้อเยื่อบริเวณลำต้นตรงปล้องสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ง่ายกว่าส่วนอื่น แม้ว่าตามธรรมชาติระย่อมเก็บสะสมแอลคาลอยด์ไว้ที่เปลือกรากมากที่สุด (Woodson,1957)แต่มิได้หมายความว่าส่วนของพืชที่สร้างแอลคาลอยด์สูงจะอยู่ที่บริเวณเซลล์ของรากด้วย เมื่อเราพิจารณาองค์ประกอบของอาหารทั้ง 3 สูตรระหว่าง MSK,MSO และ LSW(ตารางที่ 1)พบว่าความแตกต่างของสูตร MSK จาก 2 สูตรหลังอยู่ที่ปริมาณของธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) และธาตุอาหารรอง (Micronutrient) ซึ่งมีปริมาณเป็นครึ่งส่วนของสองสูตรหลังจากพิจารณาเฉพาะแหล่งไนโตรเจนที่มีสัดส่วนสูงกว่าธาตุอื่นๆ ตามสูตรทั้งในรูป NH_4^+ และ NO_3^- อาจเป็นไปตามข้อสังเกตของ Seabrook(1980)ที่พบว่าการมี NH_4^+ ในอาหารมากเกินไปทำให้พืชนำไปใช้ไม่ได้ หรือไปยับยั้งการเจริญในอาหารที่มี NO_3^- เป็นแหล่งไนโตรเจนอยู่ก่อน

แล้วซึ่งพบใน Haplopappus gracillis (Dougall,1980) ดังนั้นหากข้อสังเกตดังกล่าวถูกต้องสูตร MSK จึงเหมาะสมกว่าอีกสองสูตร นอกจากนี้ yeast extract ที่ปรากฏในสูตร MSO อาจมีผลต่อเรื่องนี้ด้วยเพราะพบบ่อยว่าสารจำพวก natural complex เช่น น้ำมะพร้าว, peptone, yeast extract และ protein hydrolysate ส่วนมากเราควบคุมคุณภาพให้คงที่ไม่ค่อยได้ การนำมาใช้ต่างกาละเทศะกันอาจมีผลต่อการทดลอง (Seabrook, 1980)

ผลการคัดแยกเนื้อเยื่อโดยวิธีการสังเกตสีของแคลลัสเป็นเกณฑ์ นับว่าสะดวกต่อการแยกเนื้อเยื่อที่ต่างกันออกจากกัน และด้วยการทำซ้ำหลายๆ ครั้งไม่ช้าก็จะได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ ในการวิจัยนี้สามารถจำแนกกลุ่มของเนื้อเยื่อด้วยวิธีนี้ออกได้เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มสีขาวแกมน้ำตาล (BW) กลุ่มสีเขียว (G) กลุ่มสีเขียวอ่อน(PG) กลุ่มสิเขียวแกมแดง(RG) กลุ่มสีขาวแกมแดง(RW) และกลุ่มสีขาวแกมเทา(GrW) ห้ากลุ่มแรกเป็นแคลลัสที่เจริญในที่สว่างช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ส่วนกลุ่มหลังสุดเป็นกลุ่มที่เจริญในที่มืดตลอด การทดลองนี้เห็นได้ชัดว่าเนื้อเยื่อบางกลุ่ม เช่น แคลลัสที่สร้างรงควัตถุสีแดงเข้ม เมื่อแยกมาเลี้ยงให้บริสุทธิ์ในอาหารสูตรเดิม พบว่าไม่สามารถเจริญโดยลำพังได้ แม้ว่าธาตุอาหารไวตามินและฮอร์โมนมีอยู่อย่างเพียงพอก็ตาม จำเป็นต้องมีเนื้อเยื่ออื่นเจริญควบคู่ไปด้วยกัน เช่น เนื้อเยื่อสีขาวหรือสีเขียว แสดงว่าเนื้อเยื่อกลุ่มนี้อาจไม่สามารถสังเคราะห์สารบางอย่างที่จำเป็นต่อการเจริญได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยเนื้อเยื่ออื่น อย่างไรก็ดีเมื่อนำแคลลัสที่มีเซลล์สีแดงมาทดสอบแอลคาลอยด์โดยวิธีบดเซลล์พบว่าแคลลัสกลุ่มนี้มีปริมาณแอลคาลอยด์สูงกว่ากลุ่มอื่นมาก จึงน่าสนใจที่ว่าจะหาวิธีอย่างไรที่จะขยายปริมาณแคลลัสกลุ่มนี้ให้ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจต้องมีการวิเคราะห์ธาตุอาหารตลอดจนสารอินทรีย์อื่นๆ ในเนื้อเยื่อกลุ่มนี้เทียบกับกลุ่มที่มีการเจริญรวดเร็วซึ่งน่าจะเป็นวิถีทางหนึ่งที่จะเลี้ยงและคัดเลือกเซลล์ของระย่อมที่มีศักยภาพในการผลิตแอลคาลอยด์สูงกว่าธรรมชาติในอนาคต ยิ่งกว่านั้นยังสังเกตพบว่าการเกิดเนื้อเยื่อกลุ่มที่มีเซลล์สีแดงเข้มนั้นเจริญได้ดีและรวดเร็วเมื่อลองให้ได้รับอุณหภูมิต่ำประมาณ 20-22 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่างวันละ 16 ชั่วโมงต่อวันจากหลอด Gro-lux ความเข้มแสง 1,500 lux และพบว่าหากเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิต่ำเท่ากันก็จะไม่เกิดผู้วิจัยเคยลองย้ายแคลลัสกลุ่ม GrW ทั้งหมดไปเลี้ยงในสภาพได้รับแสง

16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าสายพันธุ์ RV1-GrW, RV2-GrW และ RV3-GrW เกิดเนื้อเซลล์สีแดงเข้มได้ในสัปดาห์ที่ 3 ในปริมาณไม่มากนัก และค่อยๆ หายไปเมื่อย้ายกลับไปเลี้ยงในที่มืดตามเดิม

เนื้อเยื่อบางกลุ่มที่คัดแยกบ่อยครั้งพบว่าสีของแคลลัสไม่ค่อยคงที่ เช่น มักพบเนื้อเยื่อ PG แทรกในเนื้อเยื่อ BW หรือกลับกัน ทั้งนี้เพราะเราคัดแยกในระดับแคลลัส มิใช่ระดับเซลล์ซึ่งความบริสุทธิ์มีน้อยกว่า ดังนั้นการเกิดเนื้อเยื่อแปลกปลอมขึ้นมาจึงยังคงมีอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับข้อสังเกตของ Zenk และคณะ(1977) ที่พบว่าแคลลัสที่เป็นเนื้อเดียวกันเมื่อเลี้ยงไปมักเกิดบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อแปลกปลอมขึ้นมาได้ จากการศึกษาการแปรหางสัณฐานพบว่าส่วนใหญ่แคลลัสที่แยกได้มีลักษณะฟูและอ่อนนุ่มจัดเป็น loose callus มีเพียงกลุ่ม G เท่านั้นที่มีลักษณะพื้นผิวอัดแน่น ลักษณะแบบ granular ซึ่งจัดเป็น compact callus เมื่อนำแคลลัสทั้งสองแบบมาเลี้ยงในอาหารเหลวแบบเซลล์แขวนลอยและศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์พบว่าพวกที่เป็น loose callus เซลล์มีรูปร่างยาวมีแวคคูโอลใหญ่ ส่วนพวก compact callus นั้น เซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลมและมีนิวเคลียสใหญ่

การพบเซลล์สองประเภทคือ เซลล์รูปร่างยาวและเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลมนั้นพบเสมอในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เซลล์ที่รูปร่างยาวโดยมากมักเป็นเซลล์ polyploid (Yeomann และ Street,1973) และพบอีกว่าเซลล์ดังกล่าวจะมีมากขึ้นถ้าใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นพวก organic nitrogen เช่น พวก casein hydrolysate,uria หรือ cysteine เป็นต้น แต่เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นไนเตรทเพียงอย่างเดียวมักได้เซลล์ที่มีรูปร่างกลม อย่างไรก็ตาม หากเติมฮอร์โมนพวก 2,4-D,NAA หรือ IAA โอกาสที่จะได้เซลล์ polyploid หรือเกิดมิวเตชั่นได้เอง ในขณะแบ่งเซลล์ย่อมสูงตามไปด้วย (Vajrabhaya และ Vajrabhaya,1974;Vajrabhaya,1977)

การวิจัยนี้ชักนำจากเนื้อเยื่อบริเวณเซลล์จากปล้อง ซึ่งเป็นเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเนื้อเยื่อถาวรแล้วจึงไม่ homogeneous เซลล์เหล่านี้อาจมีเซลล์ที่เกิดมิวเตชั่นไปก่อนแล้ว หรือมาเกิดในขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จึงทำให้มีโอกาสได้เซลล์แปลกๆ ขึ้นอีกทั้งเซลล์สีแดงที่พบแทรกอยู่ในกลุ่ม RG และ RW อาจเป็น secretory cell หรือ specialized parenchyma ก็ได้ (Yoder และ Mahlberg,1976)

การศึกษาการแปรของรูปแบบการเจริญพบว่าเจริญสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 5 หรือ 6 ซึ่งคลาดเคลื่อนกับการทดลองของ Ohta และ Yatazawa (1979) ที่พบว่าการเจริญสูงสุดอยู่ที่สัปดาห์ที่ 4 max.GI ที่มากที่สุดเป็นของกลุ่ม BW ประมาณ 63.09(FW) และประมาณ 63.87(DW)นับว่ามากกว่าที่ Ohta และ Yatazawa(1979) เคยวัดได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้นเช่นเดียวกันได้ค่าสูงสุดประมาณ 40 (FW) และ 25 (DW) ตามลำดับ จากรูปแบบการแปรของการเจริญจึงเป็นมูลเหตุให้ตัดสินใจใช้แคลลัสอายุ 4 สัปดาห์มาเลี้ยงในอาหารสูตร AP อีก 2 สัปดาห์ก่อนนำไปตรวจสอบแอลคาลอยด์ เพราะมีรายงานว่าการสร้างสารผลิตภัณฑ์ขั้นที่สอง โดยมากเกิดในช่วง log phase (Zenk และคณะ,1977) หรือช่วงรอยต่อกับ stationary phase (Linsey และ Yeoman,1983)

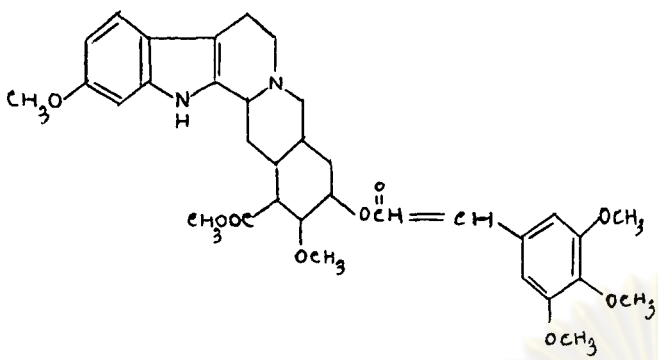
การตรวจสอบแอลคาลอยด์โดยวิธีบดเซลล์ตามวิธีของ Ogino และคณะ (1978) นับว่าสะดวกและรวดเร็วมาก ทำให้ทราบได้โดยทันทีว่าสายพันธุ์ใดมีหรือไม่มีแอลคาลอยด์ สามารถเลือกขยายปริมาณเฉพาะสายพันธุ์ที่มีแอลคาลอยด์เท่านั้น เป็นที่สังเกตว่ากลุ่มเซลล์ที่มีแอลคาลอยด์สูงมักพบเซลล์ที่มีสีแดงปนอยู่ด้วย ได้แก่ กลุ่ม RG และ RW หรือแม้แต่กลุ่ม GrW-สายพันธุ์ RV1-GrW RV2-GrW และ RV5-GrW ซึ่งเคยนำมาไว้ที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และพบภายหลังว่าสร้างเซลล์สีแดงได้ ปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจตั้งสมมุติฐานได้ว่าเมื่อมีเซลล์สีแดงเข้มเกิดขึ้นในแคลลัสก็สามารถสร้างแอลคาลอยด์ขึ้นมาได้เอง หรือเป็นตัวรับมาจากเซลล์อื่นในรูป end product หรือไม่ก็ intermediate product แล้วมาถูกเปลี่ยนเป็นขั้นสุดท้ายเพื่อสะสมที่เซลล์ดังกล่าว เซลล์สีแดงเข้มนี้อาจเป็น 'alkaloid cells' ตามข้อเสนอของ Neumann และคณะ(1983) ซึ่งเขาได้ตรวจสอบการสะสมของอินโดลแอลคาลอยด์ในเซลล์แขวนลอยของแพงพวยฝรั่ง (Catharanthus roseus G.Don) โดยได้ตั้งหลักการที่สอดคล้องกับ Yoder และ Mahlberg (1976) ที่ว่าพืชธรรมชาติมักสะสมแอลคาลอยด์ไว้ในเซลล์พิเศษ เช่น laticifer, secretory cell, specialized parenchyma เป็นต้น ดังนั้นเนื้อเยื่อที่เจริญในหลอดแก้วก็น่าจะมีพฤติกรรม

คล้ายกัน เขาพบว่าเซลล์ที่มีแอลคาลอยด์สามารถเรืองแสงได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบเรืองแสง พบว่าบางเซลล์จากบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีปรากฏการณ์นี้ และ เมื่อตรวจสอบโดยใช้สารที่ทำปฏิกิริยากับแอลคาลอยด์ ซึ่งใช้ Munier's alkaloid reagent พบว่าเซลล์ดังกล่าวลดการเรืองแสงลงพร้อมๆ กับเกิดการตกตะกอนของแอลคาลอยด์ภายในแวคคูโอล และจากการตรวจสอบสภาพ pH ของแวคคูโอลพบว่าเซลล์ดังกล่าวมี pH ต่ำกว่าเซลล์อื่นๆ เขาได้ตั้งสมมุติฐานว่า การสะสมแอลคาลอยด์เกิดภายในแวคคูโอล โดยขบวนการ protonation เพื่อดักจับแอลคาลอยด์จากนั้นจึงส่งผ่านไปสร้าง salt form หรือไม่ก็จับกับสารอินทรีย์อื่นแล้วสะสมภายในเซลล์นั้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแพงพวยฝรั่งกับระย่อมนับว่าเป็นพืชที่ใกล้เคียงกัน เพราะจัดอยู่ในวงศ์ Apocynaceae เหมือนกัน อีกทั้งแพงพวยฝรั่งสามารถสร้างอินโดลแอลคาลอยด์ได้อีกด้วย รอโวลเฟียแอลคาลอยด์บางชนิด เช่น ajmaline และ serpentine พบว่าเป็นแอลคาลอยด์หลักของพืชชนิดนี้ด้วย (Zenk และคณะ, 1977; Stockight และ Soll, 1980; Constable และคณะ, 1981; Kutney และคณะ,1983;Neumann และคณะ,1983) ดังนั้นพฤติกรรมในการสร้างแอลคาลอยด์อาจเป็นไปในลักษณะคล้ายกันได้ จากการตรวจสอบเอกสารเกี่ยวกับรอโวลเฟียแอลคาลอยด์ไม่เคยมีรายงานว่า มีแอลคาลอยด์ชนิดใดที่มีสีแดงเข้มส่วนใหญ่แอลคาลอยด์เหล่านี้มีสีออกขาว(off-white),ขาว(white), นวล (cream) และ เหลือง (yellow) เป็นต้น เมื่อละลายใน organic solvent มักจะไม่มีสี ดังนั้น สีแดงเข้มของเซลล์คงจะไม่ใช่สีของแอลคาลอยด์ แต่อาจเป็นสารที่ bound อยู่กับรอโวลเฟียแอลคาลอยด์ก็เป็นได้ อย่างไรก็ดีเราสามารถใช้เซลล์สีแดงเข้มนี้เป็นเครื่องชี้บอกความเกี่ยวพันกับการมีแอลคาลอยด์ได้

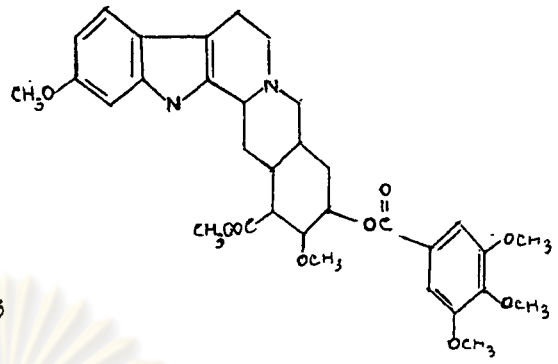
ผลการเตรียมสารสกัดแอลคาลอยด์ในแคลลัสและราก พบว่าเปอร์เซนต์เฉลี่ยที่ได้จากรากทั้ง 7 พันธุ์มีการแปรเกิดขึ้นซึ่งสอดคล้องกับที่ Vollosovich และคณะ(1977)รายงานไว้คืออยู่ในช่วงระหว่าง 0.8-1.5% เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดแอลคาลอยด์จากรากพันธุ์ RV1 RV2 มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ RV3 และ RV4 (เมื่อพิจารณาแผนภูมิที่ 6,7) เมื่อพิจารณาแหล่งที่เก็บประกอบกัน พบว่าอยู่ในเขตแลตติจูดสูงหรือที่ระดับความสูงเหนือระดับน้ำทะเลมาก อาจเป็นไปได้ว่าสภาพแวดล้อมของบริเวณนั้นโดยเฉพาะอิทธิพลของอุณหภูมิมีผลต่อการเพิ่มการผลิตแอลคาลอยด์ ซึ่งความคาดหมายนี้สอดคล้องกับที่

ศศิธร วสุวัต เคยคาดหมายไว้เนื่องจากได้เคยตรวจสอบปริมาณแอลคาลอยด์จากรากระย่อมที่เก็บจากที่ต่างๆ ในประเทศไทย พบว่าพันธุ์ที่นำมาจากภาคเหนือหรือภูเขาสูงๆ พบว่ามีปริมาณแอลคาลอยด์สูงกว่าที่อื่นๆ นอกจากนี้เมื่อนำเอากรณีเซลล์สีแดงเข้มที่เกิดขึ้นในแคลลัสเมื่อได้รับอุณหภูมิเย็นมาพิจารณาประกอบกัน ยิ่งทำให้ข้อคาดหมายนั้นน่าจะมีทางเป็นไปได้ เมื่อเปรียบเทียบการตรวจแอลคาลอยด์ในแคลลัสที่จำแนกออก 37 สายพันธุ์นั้น พบว่ามีเพียง 14 สายพันธุ์เท่านั้นที่พบแอลคาลอยด์ สายพันธุ์ที่ให้แอลคาลอยด์สูงสุด คือ RV1-RG RV2-RG และ RV6-RG สายพันธุ์ที่พบปริมาณรองลงมาได้แก่RV1-RW RV4-RG RV5-RG และ RV7-RG (ตารางที่ 14)เห็นได้ชัดว่ากลุ่มเซลล์ที่มีแอลคาลอยด์สูงได้แก่กลุ่ม RG ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีเซลล์สีแดงเข้มปนอยู่ด้วย ส่วนสายพันธุ์ที่พบแอลคาลอยด์ปานกลางได้แก่ RV1-GrW RV2-GrW RV2-RW และ RV5-RW สายพันธุ์ที่ตรวจพบบ้างคือ RV3-GrW RV5-GrW และ RV6-GrW แต่เมื่อศึกษาแอลคาลอยด์ด้วยวิธี TLC นั้น จำเป็นต้องใช้เนื้อเยื่อแคลลัสในปริมาณค่อนข้างสูง แต่จากการวิจัยนี้พบว่าสายพันธุ์ที่มีแอลคาลอยด์สูงมีอัตราการเจริญต่ำมาก ไม่สามารถขยายปริมาณให้มากๆในเวลาอันจำกัด จึงได้เลือกเลี้ยงสายพันธุ์อื่นที่มีแอลคาลอยด์บ้างและมีการเจริญดีกว่าแทน คือกลุ่ม RW และ GrW ส่วนกลุ่ม RG นำมาสกัดเพียงสายพันธุ์เดียวคือ RV5-RG ดังนั้น ผลการวิเคราะห์ของแอลคาลอยด์ในสายพันธุ์ต่างๆ ของแคลลัสจึงต่ำกว่าที่พบในรากมาก

การแยกสารสกัดแอลคาลอยด์โดยวิธี TLC ในครั้งนี้นับว่าประสบความสำเร็จพอควร เนื่องจากพบแอลคาลอยด์หลักถึง 4 ชนิด คือ ajmaline corynanthine rescinnamine และ yohimbine แอลคาลอยด์ที่พบมากที่สุด คือ ajmaline ซึ่งสอดคล้องกับที่มีผู้ทดลองไว้ (Vollosovich และคณะ, 1977, 1978; Ohta และ Yatazawa,1979;Heble และคณะ, 1983) สำหรับ corynanthine ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์หลักชนิดหนึ่ง แต่ไม่พบในรากพันธุ์ RV1, RV2 และ RV5 เข้าใจว่าคงสืบเนื่องจากขบวนการสกัดมากกว่าจึงเกิดการสูญหายไป rescinnamine ที่พบในพันธุ์ RV1-RW นับว่าน่าสนใจมาก เพราะเป็นแอลคาลอยด์ที่มีความสำคัญทัดเทียมกับ reserpine อีกทั้งมีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกับ reserpine มาก

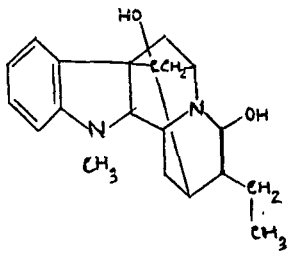


rescinnamine

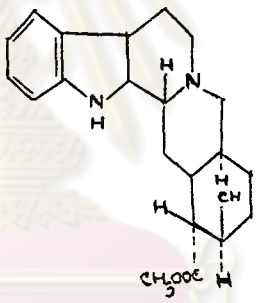


reserpine

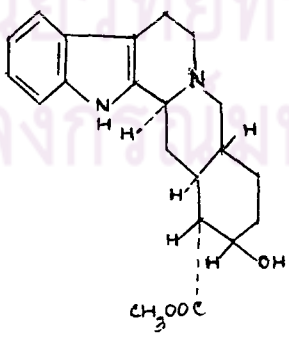
ภาพที่ 29 โครงสร้างทางเคมีของ rescinnamineและ reserpine



ajmaline



corynanthine



yohimbine

ภาพที่ 30 โครงสร้างของ ajmaline,corynanthine และ yohimbine

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อย่างไรก็ดีการตรวจสอบในเชิงคุณภาพโดยวิธี TLC มีปัญหาอยู่บ้าง เช่น ระบบตัวทำละลาย เพราะมีเพียงไม่กี่ระบบที่ได้ผล ทำให้ข้อมูลด้านค่า hRf ของตัวอย่างในแต่ละระบบไม่สมบูรณ์พอ ค่าที่ได้ไม่ค่อยตรงกับที่อ้างอิงไว้ (Court และ Habib, 1973; Court และ Timmins, 1975) สีของการเรืองแสงให้ผลดีเฉพาะแสง UV ช่วงคลื่น 366 นาโนเมตร เพราะให้สีหลายระดับในย่านสีเขียว ฟ้า และ ม่วง ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบยืนยันชนิดได้ ส่วนช่วงคลื่น 254 นาโนเมตร ให้สีน้ำตาลเกือบทั้งหมด เพราะจุดทึบแสงจึงไม่ให้รายละเอียดต่อการตรวจสอบชนิดได้มากนัก นับว่าขัดกับที่ Court และ Habib(1973) และ Cieri(1983) ได้รายงานไว้ ที่น่าสนใจคือจุดเรืองแสงเป็นสี intense blue violet ซึ่งพบในสายพันธุ์ RV2-RW RV1-GrW RV1-GrW RV2-GrW และ RV5-GrW คาดว่าอาจเป็น serpentine เนื่องจากเป็นแอลคาลอยด์เพียงชนิดเดียวที่มีสีเรืองแสงเช่นนี้ตามที่มีรายงานไว้สารทำปฏิกิริยาให้สีที่ให้ผลดีคือ ferric chloride-perchloric acid เนื่องจากให้สีได้หลายสีหลายระดับความเข้ม และมีความคงตัวพอที่จะบันทึกสีก่อนที่จะจางลงไป ส่วน ceric sulphate-sulphuric acid และ ammonium vanadate ให้ผลรองลงมา แต่พบว่าสีจางเร็วมากภายใน 1 นาที Dragendorff's reagent ไม่สู้จะมีประโยชน์ต่อการตัดสินชนิด เพราะให้สีเพียงสีเดียว คือ ส้มแกมแดง สามารถบอกได้เพียงว่าสารนั้นๆ เป็นแอลคาลอยด์หรือไม่เท่านั้น ผู้วิจัยเคยนำแผ่น TLC ที่เกิดสีกับ ferric chloride-perchloric acid มาทำให้แห้งยิ่งขึ้นด้วยการอบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-10 นาที ทำให้สีเกิดดีขึ้น แต่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส ในเวลาเท่ากันตามคำแนะนำของ Court และ Iwu(1980) กลับพบว่าสีจางเร็วขึ้นพร้อมกับเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มจนหมด นอกจากนี้พบว่าหากนำแผ่น TLC ที่เกิดสีแล้วนี้ไปเก็บไว้ใน desiccatorนั้นไปเก็บในที่มืดก็จะสามารถชะลอการจางออกไปได้ 4-5 วัน นับว่าเป็นประโยชน์ต่อกรณีที่ต้องตรวจสอบชนิดเป็นจำนวนมาก หากสีจางช้าก็สามารถเก็บรายละเอียดได้หมด ปฏิกิริยาได้ผลดีเฉพาะ ajmaline และ Yohimbine แอลคาลอยด์อื่นยังมีปัญหาในการตัดสินระดับสี ทำให้มีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย จึงจำต้องอาศัยข้อมูลอื่นๆ มาสนับสนุนเพิ่มเติมอีก เช่น การเรืองแสงภายใต้แสง UV การดูดกลืนแสง UV และค่า hRf เป็นต้น (ตารางที่ 18-28) จึงจะตัดสินชนิดได้.

จากการตรวจสอบปริมาณพบว่า แอลคาลอยด์ชนิดที่สำคัญในแคลลัสยังมีปริมาณต่ำกว่าในรากทั้งหมดพบว่าแคลลัสสายพันธุ์ RV5-RG มีปริมาณสูงสุด คือ 0.057 % นับว่ามากกว่าที่ Ohta และ Yatazawa (1979) ตรวจพบ ajmaline ในแคลลัสของลำต้นได้ประมาณ 0.001-0.010 % เท่านั้น และมากกว่าที่ Stockight และคณะ (1981) เคยทำได้คือเพียง 0.007 % และยังมากกว่าที่ Heble (1983) ทำได้คือ 0.016 % ด้วย ส่วนปริมาณของ yohimbine ที่พบสูงสุด 0.009 % ในสายพันธุ์ RV5-RW ก็นับว่ามากกว่าที่ Stockight และคณะ (1981)เคยได้คือ <0.001% กรณีของ rescinnamine กับ corynanthine ยังไม่อาจเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนๆ เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อนโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อของระย่อมเลย ครั้งนี้จึงนับเป็นครั้งแรกที่พบ

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป

1 ปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะแก่การเจริญของเซลล์สีแดงเข้ม เพื่อสามารถแยกมาเลี้ยงเป็นอิสระจากเนื้อเยื่ออื่น อาจเป็นหนทางหนึ่งที่ช่วยให้แยกสายพันธุ์เซลล์ของระย่อมที่มีแอลคาลอยด์สูงมาเลี้ยง หรือปรับปรุงการผลิตในรูป fermentor ต่อไปในอนาคตแทนการเก็บรากระย่อมจากธรรมชาติมาสกัด

2 น่าสนใจศึกษาว่าสารสีแดงเข้มนั้นคือสารประเภทใด มีความเกี่ยวพันอย่างไรกับขบวนการสังเคราะห์ของรอไวเลเฟียในระย่อม โดยอาศัยเทคนิคการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช

3 การพบแอลคาลอยด์หลักอีก 2 ชนิด คือ corynanthine และ rescinnamine นอกเหนือจากพบ ajmaline และ yohimbine ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์ที่พบมากตรงกับงานวิจัยของผู้อื่น นับว่าเป็นสิ่งที่น่าสนใจต่อการสร้างสายพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์ใหม่ที่มีแอลคาลอยด์หลักทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วย

4 ศึกษาสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้เซลล์ หรือกลุ่มเซลล์ที่มีศักยภาพในการผลิตแอลคาลอยด์ควบคู่กับการเจริญสูงสุด