บทที่ 2

หนังสือเอกสาร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) คือ การทำให้เซล เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะพืชเกิดการเจริญเป็นแคลลัส (callus) หรือเป็นอวัยวะเช่น ราก ลำต้น หรือต้นใหม่ (plantlet) ในอาหารสังเคราะห์ และสภาพแวดล้อมที่จัดขึ้นให้เหมาะสม Thomas (1975) ได้กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มตั้งแต่ ค.ศ.1902 โดย Haberlant ได้ทดลองเอาเซล สีเขียวของพืชดอกมาเลี้ยงแต่ไม่สำเร็จ จนต่อมา ค.ศ.1934 White ได้สร้างอาหารและเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะเขือเทศให้อยู่รอดได้เป็นผลสำเร็จ หลังจากนั้นมาได้มีการปรับปรุงวิธีการและอาหารสังเคราะห์โดยนักวิจัยหลายกลุ่มจนสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ 4 แนวทาง (Murashige, 1974) คือ

1. เป็นแหล่งผลิตยารักษาโรค และสารชีวเคมีอื่น ๆ
2. ปรับปรุงพันธุ์พืช
3. ผลิตสายพันธุ์พืชที่ปราศจากโรค
4. ขยายพันธุ์พืชที่ต้องการในจำนวนมาก และใช้เวลารวดเร็วในการคัดเลือกสายพันธุ์

พืชต่าง ๆ หลายชนิดโดยเฉพาะพืชสมุนไพรได้มีบทบาทอย่างกว้างขวางในการสังเคราะห์สารชีวเคมีที่เป็นต้นกำเนิดตัวยาในการผลิตยาและสารอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ ชนิดและคุณภาพของพืชที่นำมาสกัดเพื่อให้ได้ตัวยาชนิดใดชนิดหนึ่งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการด้วยกัน (Dougall, 1979) ปัจจัยแรกได้แก่ ปัญหาที่พืชชนิดที่ต้องการนั้น ๆ จะขึ้นอยู่ได้เฉพาะสภาพดินฟ้าอากาศ และสภาพภูมิศาสตร์อันจำกัด ปัจจัยที่สองคือ ปัญหาการขนส่งพืชจากแหล่งกำเนิดมายังหน่วยผลิตสารอาจทำให้เกิดความเสียหายแก่พืชขณะขนส่ง นอกจากนั้นยังมีปัญหาในแง่แหล่งกำเนิดที่ยาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แก่การเดินทางเข้าไปถึง ความลำบากในการสูดหา หรือเป็นสิ่งที่ต้องห้ามผิดกฎหมาย เช่น ฝิ่น รวมทั้งปริมาณพืชที่ต้องการไม่แน่นอน การนำพืชที่ให้ตัวยามาเลี้ยงในสภาพที่ต่างจากถิ่นที่กำเนิดอาจไม่ประสบผลสำเร็จ ถ้าเลี้ยงในสภาพที่ควบคุมสิ่งแวดล้อมก็จะสิ้นเปลืองสูง เพราะฉะนั้น เทคโนโลยีในด้านการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาจเป็นทางออกที่ดีในการเป็นแหล่งผลิตสารโดยเซลล์พืชในหลอดทดลองแทนที่จะสกัดจากพืชทั้งต้นที่เลี้ยงในธรรมชาติ และเป็นหนทางที่สามารถผลิตเนื้อเยื่อที่สังเคราะห์สารได้โดยไม่จำกัดกับปัจจัยดังกล่าว

Dougall (1979) รายงานว่า ความคิดริเริ่มในการผลิตสารชีวเคมีจากระบบเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ริเริ่มในปี ค.ศ.1950-1955 เนื่องจากความสำเร็จในการเลี้ยงเซลพืชได้ในอาหารเหลวเช่นเดียวกับการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการค้าใช้ในการผลิตสาร เช่น อุตสาหกรรมการผลิต penicillin เป็นต้น ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมานักวิจัยต่าง ๆ ได้ให้ความสนใจกับแนวความคิดที่จะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชเพื่อการผลิตตัวยาที่ต้องการในหลอดทดลองได้โดยมีแนววิจัยต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงวิธีเพิ่มปริมาณที่ผลิตได้ (yield) จากเนื้อเยื่อ การผลิตสารชีวเคมีโดยเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองนั้นสารกลุ่มแรกที่นักวิจัยได้ทำกันส่วนใหญ่ได้แก่ สารกลุ่ม alkaloids West and Mika (1957, อ้างใน Nickell, 1980) เป็นกลุ่มแรกที่รายงานการสังเคราะห์ atropine โดยการเลี้ยง root-callus ของต้น belladona หลังจากนั้นได้มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการผลิตสารชีวเคมีทั้งที่เป็นสมุนไพร และ plant secondary product อื่น ๆ โดยวิธีการผลิตจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งผลจากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีสาร alkaloids มากกว่า 80 ชนิด (ตารางภาคผนวก ก.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ผลิตในหลอดทดลองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้เนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อยังสามารถผลิตสารจำพวก organic acid, enzyme, steroid, allergen steroid และ pigment อีกมาก (Staba, 1980) และขณะนี้รวบรวมได้ว่ามีพืชอย่างน้อย 16 ชนิด ด้วยกันที่สามารถผลิตสารที่เป็นตัวยา และสารชีวเคมีอื่น ๆ ได้ในอัตราที่ใกล้เคียงหรือมากกว่าปริมาณที่พบในต้น (Dougall, 1979) ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผลิตสารตัวยาที่สำคัญได้แก่ การผลิต codeine (ตัวยาระงับไอและแก้ปวด) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของฝิ่น (Papaver somniferum) (Khanna, 1978) และ thebaine (สามารถเปลี่ยนเป็น codeine ได้) จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้น Popy ดอกแดง (Papaver bracteatum) นอกจากนี้ยังมีสารที่ผลิตโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ได้จดทะเบียนลิขสิทธิ์โดยรัฐบาลอเมริกัน คือ สาร diosgenin (U.S. Patent. No.3628287 ปี 1971) (Staba and Kaul, 1971 อ้างใน Misawa, 1980) และสาร allergens (U.S. Patent. No.346074 ปี 1973) (Staba and Shafiee, 1973 อ้างใน Nickell, 1980)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการผลิตสารชีวเคมี Nickell (1980) กล่าวว่ามีความเป็นไปได้ 3 ประการคือ

1. ได้สารชนิดเดียวกับสารในพืชที่ขึ้นในธรรมชาติ ซึ่งอาจมีมากกว่าหรือน้อยกว่าก็ได้
2. ไม่มีการผลิตสารในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. มีการผลิตสารชีวเคมีซึ่งในสภาพธรรมชาติไม่มีการผลิต

ในการผลิตสารชีวเคมีโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสาร คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. ชิ้นส่วนที่นำมาทดลอง

ส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นตัวกำหนดความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงควรมีการคัดเลือกชิ้นส่วนโดยการนำมาเพาะเลี้ยงก่อนใช้ในการทดลอง (Seabrook, 1980) ถึงแม้ว่าทุกส่วนของพืชสามารถชักนำให้เกิดการเจริญและเปลี่ยนแปลงได้ เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (Gamborg, 1975 อ้างในจรรยา, 2527) แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตสารนั้น ชิ้นส่วนของพืชที่เราใช้ในการเพาะเลี้ยงจะเป็นตัวกำหนดการสร้างสาร (Staba, 1977) จากการศึกษาพบว่า เนื้อเยื่อ meristem ที่อยู่ในขณะกำลังแบ่งเซล เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงจะมีการสังเคราะห์สารน้อยมาก (Kurz and Constabel, 1979 B) นอกจากนี้ Staba (1977) กล่าวว่า ถ้าจะให้ผลผลิตสารที่ดีควรใช้เนื้อเยื่อที่มีการสร้างสารสูงมาเพาะเลี้ยงเช่น ในการสังเคราะห์สารพวก reserpine จาก Rauwolfia serpentina พบว่าจะให้ผลผลิตได้ดีเมื่อเลี้ยงแคลลัสจากราก (Mitra และ Kaul, 1964 อ้างใน Staba, 1977) Kurz และ Constabel (1979 B) รายงานว่าการสร้างสารจากหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น จะใช้ส่วนใดของพืชก็ได้ไม่จำเป็นต้องเป็นชิ้นส่วนบริเวณที่สังเคราะห์สารที่ดีในธรรมชาติเท่านั้น แต่ส่วนที่จะนำมาใช้ต้องมี parenchyma cell อยู่ด้วย เช่น ในฝิ่นปริมาณของสาร alkaloid จะมีปริมาณใกล้เคียงกันไม่ว่าจะเลี้ยงแคลลัสจาก ต้นอ่อน (seedling) ราก หรือ stalk capsule (Furaya et al., 1972) พืชคนละสายพันธุ์เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง จะสังเคราะห์สารที่แตกต่างกันออกไป (Kurz และ Constabel, 1979 A) เช่น จากการรายงานของ Kutney et al. (1981) การเพาะเลี้ยงแพงพวยฝรั่งสายพันธุ์ PRL. No.953 ไม่มีการสังเคราะห์สาร vindolin

และ catharenthine สายพันธุ์ 200 GW สามารถสังเคราะห์ catharenthine ได้ ส่วนสายพันธุ์ 943 สามารถสังเคราะห์ vindoline และ ajamalicine ได้

2. อาหารสังเคราะห์พื้นฐาน (Basal medium)

ส่วนประกอบของสารสังเคราะห์พื้นฐานเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่จะนำไปสู่ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Narayanaswamy, 1977) อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปมีด้วยกันหลายสูตร ซึ่งได้รับการพัฒนาจากกลุ่มนักวิจัยหลายกลุ่มเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้เป็นอาหารในการเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้หลากชนิด เช่น สูตรอาหารสังเคราะห์ของ Hilderbrandt et al.,(1946), Nitsch (1951), Murashige and Skoog (1962), White (1963), Gamborg et al., (1968) เป็นต้น อาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ เหล่านี้จะมีองค์ประกอบของอาหารพื้นฐานคล้ายคลึงกัน ซึ่งจะประกอบด้วยเกลือแร่ แหล่งพลังงานให้คาร์บอน วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโตและสารอินทรีย์ (Narayanaswamy, 1977 ; Kurz and Constabel, 1979 B) แต่ในสูตรอาหารที่กล่าวมานี้จะแตกต่างกันในแง่ปริมาณและความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด ซึ่งมีผลทำให้อาหารแต่ละชนิดจะมีความเหมาะสมกับการเจริญของพืชแตกต่างกัน อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส อาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญในระยะต่อไปของแคลลัส หรือไม่เหมาะสมกับการชักนำให้เกิดราก และลำต้น (Narayanaswamy, 1977) แต่โดยทั่วไปอาหารสังเคราะห์แต่ละสูตรจะทำไว้ใช้ได้อย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิด เช่น อาหารสังเคราะห์ของ Gamborg et al.,(1968) และ Shenk and Hildebrandt (1972) จะเป็นสูตรที่ใช้ได้กับพืชทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Narayanaswamy, 1977) สำหรับอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) เป็นสูตรที่ได้รับความนิยมและใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความเข้มข้นของเกลือแร่สูง (Yeoman and Macleod, 1977) สามารถเร่งการเติบโตของเนื้อเยื่อได้ดี มีผู้นำเอาสูตรอาหารสังเคราะห์ของ Murashige and Skoog มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสารชีวเคมีมากมาย เช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นของกวาว (ยงยุทธ ชินหรอุทก, 2527) การเลี้ยงเนื้อเยื่อฝิ่น (Furaya et al., 1972) แต่เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือแร่ในอาหารสังเคราะห์สูงจะทำให้เนื้อเยื่อออกสีน้ำตาล

3. สารควบคุมการเจริญ (Plant growth regulators)

สารควบคุมการเจริญพืชมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานร่วมกันในขบวนการเจริญของพืช การเติบโต การเจริญของเซล เนื้อเยื่อ และการสร้างสารชีวเคมีเป็นผลมาจากการทำงานของสารควบคุมการเจริญ (Seabrook, 1980) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้เกิดแคลลัสในพืชบางชนิดไม่จำเป็นต้องใส่สารควบคุมการเจริญ แต่การใส่สารควบคุมการเจริญจะมีผลดีในแง่ของการเพิ่มอัตราการเติบโต หรือการเกิดรากและลำต้น (Seabrook, 1980) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการสังเคราะห์สารชีวเคมี ชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญมีผลต่อการสังเคราะห์สาร โดยอาจจะเพิ่มหรือลดปริมาณลงก็ได้เช่น จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Dioscorea deltoidea แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่ใส่ 2,4-D 0.1 มก./ลิตร จะผลิตสาร diosgenin มากกว่าไม่ใส่ 2,4-D แต่ถ้าความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้นการผลิตสารจะลดลง (Kaul et al., 1969) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Solanum การใช้ IAA จะเพิ่มการผลิตสาร diosgenin แต่จะยับยั้งการผลิตสาร solasadine (Heble et al., 1971

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อ้างใน Staba, 1977) ปริมาณของสาร serpentine และ ajamalacine การเลี้ยงเนื้อเยื่อ Catharanthus roseus ขึ้นกับชนิดของ auxin คือ เมื่อใช้ 2,4-D จะยับยั้งการสร้าง แต่ใช้ IAA จะเพิ่มการผลิตได้อย่างดี (Zenk et al., 1977) การใช้สารควบคุมการเจริญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผลิตสารชีวเคมี มีเหตุผลอยู่ 3 ประการ (Dougall, 1980)

1. เนื้อเยื่อพืชต้องการสารควบคุมการเจริญสำหรับการเติบโตของแคลลัส

2. ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญในอาหารจะชักนำการเกิดโครงสร้างต่าง ๆ เช่น ราก ลำต้น

3. การสังเคราะห์สารของเนื้อเยื่อพืชมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดอวัยวะ เช่น การผลิตสาร berberline จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Coptis japonica จะต่ำมากถ้าอยู่ในสภาพของแคลลัส แต่จะสูงเมื่อเปลี่ยนสภาพจากแคลลัสเป็นต้นกล้าเล็ก ๆ (plantlet) (Ikuta et al., 1975)

สารควบคุมการเจริญแบ่งออกเป็นหลายกลุ่มคือ auxin, cytokinin, gibberellin, abcissic acid และ ethylene กลุ่มของสารควบคุมการเจริญที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับการเติบโตได้แก่ auxin และ cytokinin (Dougall, 1980 ; Murashige, 1974)

Auxin หน้าที่สำคัญของสารควบคุมการเจริญของกลุ่มนี้คือ ชักนำและช่วยในการเจริญเนื้อเยื่อพืช สาร auxin ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ Indole acetic acid (IAA), α-Napthalene acetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ p-Chlorophenoxy acetic acid (PA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2,4-D เป็น auxin ที่นิยมใช้มากตัวหนึ่ง ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีคือ คงสภาพอยู่ในอาหารสังเคราะห์ได้นาน (Seabrook, 1980) ถ้าใช้ในปริมาณที่น้อยจะส่งเสริมการเจริญและการสร้างสาร แต่ถ้าใช้ในปริมาณสูงจะยับยั้ง (Kurz and Constabel, 1979 A) 2,4-D เป็นปัจจัยตัวหนึ่งที่กำหนดในการสร้างสารชีวเคมี จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่น การผลิตสาร nicotine จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ (Nicotina tabacum) ขึ้นกับความเข้มข้น 2,4-D คือ การเพิ่มความเข้มข้น 2,4-D จะยับยั้งการสร้าง nicotin (Tabata et al., 1971) การผลิตสาร diosgenin จาก Dioscora จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อใส่ 2,4-D แต่จะทำให้การเติบโตของแคลลัสลดลง (Kaul and Staba, 1968)

Cytokinin เป็นสารควบคุมการเจริญที่เป็นปัจจัยอย่างหนึ่งสำหรับส่งเสริมการแบ่งเซลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Skoog, 1955 อ้างใน Thomas, 1975) เช่น ส่งเสริมการแบ่งเซล (metosis) ของเซลยาสูบ (Simard et al., 1977, อ้างใน Staba, 1980) cytokinin ที่ใช้ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจใช้ N^6 furfuryl amino purine (Kinetin), N^6 benzyladenine (BA) cytokinin ต่างชนิดกันจะตอบสนองต่อเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน และปริมาณที่ใช้จะไม่เท่ากันในการทดสอบในพืชชนิดเดียวกัน (Dougall, 1980) เช่น kinetin 1 มก./ลิตร จะเหมาะสมสำหรับการชักนำการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อส่วน hypocotyl ของฝ้าย ส่วน BA 0.5-1 มก./ลิตร จะเหมาะสมสำหรับการ subculture เพื่อรักษาระดับการเจริญ (Price et al., 1977 ; Smith et al., 1977 อ้างใน Dougall, 1980) นอกจากนี้ BA ยังใช้ได้ดีในการกระตุ้นการเกิดอวัยวะต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Donglas fir. (Cheng, 1977) ในแพงพวยฝรั่งพบว่า BA ทำให้ปริมาณการสราง alkaloid สูง แต่แคลลัสไม่เติบโต (Zenk et al., 1977)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การใช้ auxin และ cytokinin พบว่ามีความสัมพันธ์กันในการควบคุมการเจริญและการเติบโตของแคลลัส Skoog and Miller (1957) พบว่าการเกิดเป็นต้น ราก หรือแคลลัสในเนื้อเยื่อ pith ของยาสูบขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ของปริมาณ auxin และ cytokinin ถ้าสัดส่วนของ auxin และ cytokinin ที่เหมาะสมจะทำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ในด้านการสร้างสารของเนื้อเยื่อพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า ทั้งปริมาณ และชนิดของสารที่ผลิตขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของ auxin และ cytokinin Ikuta et al., (1974) รายงานว่าสัดส่วนความเข้มข้น IAA 1 มก./ลิตร และ kinetin 0.1 มก./ลิตร จะชักนำเนื้อเยื่อ Corydalis pallida ให้เกิด plantlet จะทำให้การผลิตสาร protoberberine type alkaloid เพิ่มขึ้นมากกว่าเนื้อเยื่ออยู่ในสภาพของแคลลัส (Ikuta et al., 1974) การผลิตสาร anthraquinones จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ Cassia tora จะมีปริมาณสูงสุดเมื่อสัดส่วนความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 0.022 มก./ลิตร และ kinetinเท่ากับ 2.15 มก./ลิตร (Tabata, 1975)

สารควบคุมการเจริญชนิดอื่น ๆ มีรายงานว่ามีบทบาทต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเช่น Gibberellin กระตุ้นการเกิดแคลลัสและยับยั้งการเกิดลำต้นและรากในยาสูบ (Murashige, 1965) Abscisic acid ในปริมาณที่ต่ำจะกระตุ้นการเติบโตและการแบ่งเซล แต่ปริมาณที่สูงจะยับยั้งในการเพาะเลี้ยง Spinacia oleacea (Neskovic et al., 1977 อ้างใน Dougall, 1980) ethylene จะผลิตขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (La Rue and Gamborg, 1971 อ้างใน Dougall, 1980) และยับยั้งการเจริญของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

chlorophyll ในการเพาะเลี้ยง Spinacia oleracea (Dalton and Street, 1971 อ้างใน Dougall, 1980)

4. แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

แหล่งคาร์บอน เป็นแหล่งพลังงานของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แหล่งคาร์บอนที่ให้การเติบโตที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วไปได้แก่ sucrose หรือ monosaccharide เช่น glucose หรือ fructose (Dougall, 1980) ปริมาณของ sucrose ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไปคือ 2-4 % ในพืชต่างชนิดกันการตอบสนองในการเติบโตต่อแหล่งคาร์บอนจะต่างกันออกไป (Marretzki et al., 1974 อ้างใน Dougall, 1980) Yasuda et al., (1976, อ้างใน Dougall, 1980) รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ sucrose จะทำให้การเติบโตของ Nicotiana tabacum. var. Xanthi ลดลง ความเข้มข้นและชนิดของน้ำตาลจะมีผลต่อการผลิตสารของเนื้อเยื่อด้วยการเพิ่ม sucrose จาก 2 % เป็น 4 % จะเพิ่มการสร้าง polyphenol ในการเพาะเลี้ยง Rosa sp. และพืชตระกูลเมเปิล (Acer pseudoplatanus) (Westcott et al., 1977) Davies (1972) พบว่าในการผลิตสาร phenol ใน Rosa sp. การใช้ glucose จะให้ผลผลิตสูงกว่าใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน การใช้ sucrose 2 % เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง Morina citrifolia จะให้ผลผลิตของสาร anthraquinones สูงกว่าใช้น้ำตาลชนิดอื่น ๆ

5. แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาจใช้ในรูปของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

nitrate ion, ammonium ion หรือ glutamine ซึ่งขึ้นอยู่กับความต้องการของพืชในแต่ละชนิด (Dougall, 1979) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Rosa sp. การผลิตสาร polyphenol จะลดลงเมื่อ NO_3^- ลดลง (Davies, 1972) การลดลงของ urea ในอาหารสังเคราะห์จะทำให้อนุพันธ์ shikonin ลดลงจากการเพาะเลี้ยง Lithospernum erythorhizon แต่จะเพิ่มขึ้นเมื่อ nitrogen ทั้งหมดในอาหารเพิ่มขึ้น (Mizukami et al., 1977)

6. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

pH ที่เหมาะสมทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ช่วง 5-6 อาหารควรจะปรับ pH ก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) (Martin, 1980) Martin and Rose (1975, อ้างใน Martin, 1980) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้น morning glory (Ipomoea sp.) ในระดับ pH ต่าง ๆ คือ 4.8, 5.6, 6.4 และ 7.1 พบว่าถ้าระดับ pH สูงขึ้นความสามารถในการใช้ ammonia เป็นแหล่งไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้น แต่การใช้ nitrate ลดลง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสารพบว่า ปริมาณของสารขึ้นอยู่กับระดับ pH ด้วย เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของแพงพวยฝรั่งสายพันธุ์ PRL No.953 พบว่าการผลิตสาร aspidosperma-type-alkaloids จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับ pH เพิ่มขึ้นคือ ถ้า pH เท่ากับ 5.0 จะสังเคราะห์ alkaloids ได้ 1.7 มก./กรัม น้ำหนักแห้ง แต่ถ้า pH 7.0 จะสังเคราะห์ alkaloids ได้ 3.3 มก./กรัม น้ำหนักแห้ง (Kutney et al., 1981)

7. อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยทั่วไปจะอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในช่วง 25-30 °ซ (Martin, 1980) ในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป (Crew and Staba, 1965 ; Puchan and Martin, 1971 อ้างใน Martin, 1980) เช่น Tulecke and Nickell (1960, อ้างใน Martin, 1980) พบว่า Solium จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 20-21 °ซ และ Rosa sp. จะเจริญได้ดีในช่วง 31-32 °ซ Erikson (1965) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Haplopappus gracilis ที่อุณหภูมิ 30 °ซ จะงอกงามได้รวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงที่ 25 °ซ หลายเท่า Rose and Martin (1975 อ้างใน Martin, 1980) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้น morning glory ในช่วงอุณหภูมิ 15-34 °ซ พบว่าอุณหภูมิช่วง 25-30 °ซ จะให้การเติบโตสูง และการใช้ sucrose และ amino nitrogen จะมีมากที่อุณหภูมิ 30-32 °ซ

8. แสงสว่าง (Light)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ความเข้มของแสง ชนิดของแสง และช่วงการรับแสง มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์สาร (Murashige, 1974) สำหรับการผลิตสารจากเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองมีรายงานว่าแสงสว่างและความมืด เวลาของการให้แสงมีผลต่อการผลิตสาร anthocyanin ของการเพาะเลี้ยงต้น Haplopappus gracilis (Strickland and Sunderland, 1972 อ้างใน Dougall, 1979) ในการสังเคราะห์ flavonoid ของการเพาะเลี้ยงผักชีฝรั่ง (Petroselinum hortense) พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มืดจะชักนำให้เกิดการแบ่งเซลเพิ่มขึ้น แต่จะไม่มีการสร้างสาร (Griesebach and Hahlbrock, 1974 อ้างในยงยุทธ อินทรอุทก, 2527) ในการเติบโตของแคลลัสมีรายงานว่า แสงสีน้ำเงินจะเพิ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเติบโตของแคลลัสใน Pelorgonium zonale (Ward and Vonce, 1968 อ้างใน Seibert and Kadkade, 1980) ในพืช Crepis capilloris การให้แสงสีแดงจะมีผลทำให้เพิ่มการสังเคราะห์ protein และการแบ่งเซล (Hüsemann and Reinert, 1971 อ้างใน Seibert and Kadkade, 1980)

9. ปัจจัยอื่น ๆ (Other factors)

นอกจากที่กล่าวมาแล้วนี้ ยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่อาจมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสาร เช่น ความเข้มข้นของโปตัสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม เหล็ก precursor inositol vitamin คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ออกซิเจน (O_2) และสารบางชนิด เช่น น้ำมะพร้าว yeast extract (Dougall, 1980)

ดังนั้น จะเห็นได้ว่ามีปัจจัยหลายอย่างซึ่งจะนำไปสู่ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้ได้สารชีวเคมี ในการวิจัยเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาครั้งนี้จึงเป็นงานในลักษณะสำรวจปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตสารชีวเคมี โดยเน้นศึกษาปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการเกิดและเติบโตของแคลลัสได้แก่ การเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงให้การเติบโตดี อาหารที่เหมาะสม และอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญของพืชคือ 2,4-D, BA และ Kinetin การหาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับพฤติกรรมและการเติบโตของแคลลัสจำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตสารชีวเคมี การวิเคราะห์สารชีวเคมีภายในแคลลัสเป็นวิธีที่ต้องการอุปกรณ์ที่ดีพอ และปริมาณของแคลลัสก็จะต้องมากพอ ฉะนั้นการวิจัยขั้นนี้จะกระทำในการวิจัยขั้นต่อไป แต่เนื่องจากมีรายงานของ Velikey and Geneat (1972) ว่าสารที่สกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นกัญชามีคุณสมบัติเป็นสาร antimicrobial ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ Bacillus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

megaterium, Staphylococcus aureas และ Escherichia coli ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงนำวิธีการทดสอบสาร antimicrobial โดยวิธีการสังเกต clear zone ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกกว่าในการวิเคราะห์ทางเคมี การวิจัยครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานในการวิจัยในขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved