บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. การคัดเลือกส่วนต่าง ๆ ของต้นกัญชาที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การวิจัยพบว่าชิ้นส่วนใบส่วนยอด ลำต้นส่วนยอด และก้านใบส่วนยอด สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารสังเคราะห์ **Murashige and Skoog (MS)** ซึ่งสอดคล้องกับ **Murashige** (1974), **Gamborg** (1975, อ้างในจรรยา ฤทธิ์-ลอย , 2527) รายงานว่า ทุกส่วนของพืชสามารถชักนำให้เกิดการเจริญและเปลี่ยนแปลงได้เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม มีพืชหลายชนิดที่ส่วนต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารสังเคราะห์ แต่ปริมาณการเกิดแคล-ลัส และการเติบโตของแคลลัสอาจไม่เท่ากันเช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่อ **Arachis hypogea L.** สายพันธุ์ TMV_2 พบว่าส่วนต่าง ๆ ของ **seedling** คือ **epicotyl, hypocotyl, leaves** และ **cotyledon** สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ชิ้นส่วนของใบ และ **hypocotyl** จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าส่วนอื่น ๆ **(Narasihulu and Reddy,** 1983) พรรณี ไชยทวี และจิตรีบุล พุ่มศิริ (2528) เลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนของ ใบเลี้ยง ยอดอ่อน ลำต้น **epicotyl** และ **hypocotyl** จาก **seedling** ของส้มโอพันธุ์ขาวทองดี ในอาหารสังเคราะห์สูตร **MS** พบว่า ทุกส่วนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ใบเลี้ยงเกิดแคลลัสได้รวดเร็ว และมีปริมาณสูงกว่าส่วนอื่น ๆ เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้พบว่า ใบส่วนยอดกัญชา เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร **MS** มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และเปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่สูงกว่าลำต้น และก้านใบส่วนยอด

นอกจากนี้ยังพบว่า เนื้อเยื่อใบส่วนยอดมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงกว่าส่วนลำต้น และก้านใบ ทำให้เนื้อเยื่อใบกัญชามีโอกาสที่จะเจริญในอาหารสังเคราห์ได้มากกว่าลำต้นและก้านใบ ยงยุทธ อินทรอุทก (2527) พบว่าลำต้นของกวาวเครือขาว จะมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงกว่าใบ แสดงว่าในแต่ละชิ้นส่วนของพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อจาก microorganism ไม่เหมือนกัน ซึ่งเกิดจากลักษณะโครงสร้างของส่วนต่าง ๆ ของพืชมีความยากง่ายต่อการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อที่ผิวไม่เหมือนกัน ดังนั้น การเลือกชิ้นส่วนของพืชที่มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงเท่ากับการลดปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากเหตุผลดังกล่าวมานี้ การวิจัยจึงเลือกชิ้นส่วนของใบส่วนยอดของกัญชา มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจากการรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีการใช้ชิ้นส่วนของใบเป็นชิ้นส่วนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ แพงพวยฝรั่ง (จรรยา ฤทธิ์ลอย, 2527) ไผ่สีสุก (นิ่มนวล วาสนา และคณะ, 2528) Nicotiana tabacum. (Murashige, 1974) Saintpaulia ionantha (Kukulezenka et al., 1972 อ้างใน Murashige, 1974)

2. การศึกษาความเข้มข้นของอาหาร (media strength) ของ Murasige and Skoog (MS) (1962) ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงใบส่วนยอดของกัญชา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบส่วนยอดกัญชาในอาหารสังเคราะห์ MS แบบความเข้มข้นเต็มสูตร (Full strength) และความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (Half strength) พบว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Half strength ของ MS มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อดีกว่า Full strength คือ ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่สูงกว่า ซึ่งในลักษณะเดียวกันนี้ Engvild (1972) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ carnation ในอาหาร Half strength ของ MS เนื้อเยื่อจะเจริญเติบโตดีกว่า Full strength Minocha and Mehra (1974)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Neomamilaria profilera Miller ด้วยความเข้มข้นของ mineral salt เท่ากับ 20 % ของความเข้มข้นปกติ เนื้อเยื่อสามารถเจริญได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของ mineral salt เท่ากับ 40 % ของความเข้มข้นปกติ จะทำให้ได้เนื้อเยื่อที่มีน้ำหนักสดสูงสุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 200 % จะทำให้ yield ลดลง

นอกจากนี้การวิจัยยังพบว่า เนื้อเยื่อใบกัญชาเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Half strength ของ MS จะมีความเขียวสดของใบสูง และเปอร์เซ็นต์การตายนิ่งของเนื้อเยื่อจะต่ำกว่า Full strength ซึ่งเช่นเดียวกับในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ peperomia (วินิจ จีระประพันธุ์กุล, 2527)และ carnation (Engvild, 1972) ในอาหาร Half strength ของ MS จะช่วยลดการตายของเนื้อเยื่อ และมีการเติบโตของแคลลัสได้ดีกว่า Full strength ดังนั้น การวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นของอาหารแบบ Half strength ของ MS ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบส่วนยอดของกัญชา

เป็นที่น่าสังเกตว่าอาหาร 67-V medium ซึ่ง Veliky and Genest (1972) ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ seedling ของกัญชาซึ่งให้ผลการเติบโตที่ดีนั้น เมื่อเทียบความเข้มข้นของ mineral salt ของ MS half strength แล้ว พบว่าจะมีความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกัน (ภาคผนวก ค.)

3. ผลของความเข้มข้น 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) 6 Benzylaminopurine (BA) และ Kinetin ต่อการเกิดแคลลัสของใบส่วนยอดของกัญชา

การวิจัยนี้พบว่า การนำใบกัญชาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ Murashige and Skoog (MS) ทั้งแบบ Half strength และ Full strength ซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญ ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เมื่อเติมสารควบคุมการเจริญคือ 2,4-D กับ BA หรือ Kinetin พบว่าทุกสัดส่วนความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และได้แคลลัสซึ่งมีขนาดต่าง ๆ กัน แสดงว่าสารควบคุมการเจริญจำเป็นต่อการเกิดแคลลัสและการเติบโตของแคลลัส การพบว่าสารควบคุมการเจริญจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองนั้น Skoog and Miller (1957) รายงานว่าสัดส่วนและความเข้มข้นของ auxin และ cytokinin มีความจำเป็นต่อการ growth และ differentiation ของเนื้อเยื่อยาสูบ ในพืชชนิดอื่น ๆ ก็เช่นเดียวกันคือ potato (Okazawa et al., 1967, begonia (Fonesbech, 1974) และ Asperagas plumosus (Fonnesbech et al., 1977)

3.1 ผลของความเข้มข้น 2,4-D : BA

การวิจัยนี้พบว่าทุกสัดส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D : BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ การเติบโตในด้านการเกิดแคลลัสและการเพิ่มขนาดของแคลลัสจะเริ่มในสัปดาห์ที่ 1 และจะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 และคงที่ในเวลาต่อมาทั้งในด้านเปอร์เซ็นต์การเกิดและการเพิ่มขนาดของแคลลัส การตายนิ่งของเนื้อเยื่อจะเริ่มปรากฏให้เห็นในสัปดาห์ที่ 3 และเปอร์เซ็นต์การตายนิ่งจะเพิ่มขึ้นในเวลาต่อมาซึ่งปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นทำนองเดียวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ carnation โดยมี IAA : BA เป็นสารควบคุมการเจริญ (Engvild, 1972)

จากการวิจัยนี้พบว่า สัดส่วนความเข้มข้น 2,4-D : BA ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ คือ 0.5 มก./ลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูงคือ 100 % แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2 และ 5 มก./ลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลง แสดงว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลงเช่นเดียวกับ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน hypocotyl ของ Helianthus annuus L. (Greco et al., 1984)

ผลของความเข้มข้นของ 2,4-D เมื่อใช้ร่วมกับ BA ต่อขนาดแคลลัสพบว่าที่ความเข้มข้น 2,4-D ต่ำคือ 0.5 มก./ลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่สูงกว่าเมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 2 และ 5 มก./ลิตร แสดงว่าความเข้มข้น 2,4-D ต่ำ จะส่งเสริมการเติบโตโดยให้แคลลัสขนาดใหญ่ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D มีผลทำให้ยับยั้งการเติบโตของแคลลัส อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 0.5 มก./ลิตร เป็นช่วงที่ส่งเสริมการเติบโตของแคลลัสของใบกัญชาได้ดีที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D ทำให้มีผลยับยั้งการเติบโตของแคลลัสซึ่งเช่นเดียวกับ Flores et al., (1982) รายงานว่า ช่วงความเข้มข้นของ 0.1-1 มก./ลิตร ของ 2,4-D จะส่งเสริมการเติบโตเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองของ Amarathus sp. ได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้น 2,4-D เกิน 1 มก./ลิตร น้ำหนักสดของแคลลัสจะลดลง ในพืชชนิดอื่น ๆ ก็เช่นเดียวกัน เช่น tobacco (0.02-0.2 มก./ลิตร) (Skoog, 1944 ; Lee, 1972) sunflower (10^{-10} มก./ลิตร) (Hidebrant and Riker, 1974) maize (4 มก./ลิตร) (Sheridan, 1975) แพงพวยฝรั่ง (1.5-3.5 มก./ลิตร) (ขรรยา ฤทธิ์ลอย, 2527)

จะเห็นได้ว่า การกระตุ้นการเกิดแคลลัส โดยใช้ 2,4-D จะมีช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดไม่เท่ากัน หรือในพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ต่างชิ้นส่วน (organ) ก็จะไม่เท่ากันด้วย การเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D มีผลทำให้เนื้อเยื่อกัญชาตายนิ่งเพิ่มขึ้น ซึ่งไม่พบรายงานว่า 2,4-D

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีผลทำให้เกิดการตายนึ่งของเนื้อเยื่อพืชจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง แต่พบใน auxin ชนิดอื่นคือ IAA และ NAA การเพิ่มความเข้มข้นทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ (Engvild, 1972)

จากการวิจัยพบว่าในสัดส่วนความเข้มข้นที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2 และ 5 มก./ลิตร พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ BA มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง แสดงว่าความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้นจะยับยั้งการเกิดแคลลัส ซึ่งเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต้นของ Rape (Kartha et al., 1974) แต่การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ที่ 2,4-D ต่ำไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสนั้น อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของ 2,4-D ซึ่งมีผลต่อการชักนำการเกิดแคลลัส (Murashige, 1974) ซึ่งตามรายงานของ Perez-Benmudez et al.,(1983) เลี้ยงเนื้อเยื่อ Digitalis obscura L. พบว่า auxin ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ที่ใช้ชักนำการเกิดแคลลัสจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับ BA

จากการวิจัยพบว่า เมื่อความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 2 มก./ลิตร ในสัดส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D ต่าง ๆ กันคือ 0.5, 2 และ 5 มก./ลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่กว่าความเข้มข้น BA 0.5 และ 5 มก./ลิตร เมื่อเทียบกับสัดส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากัน แสดงว่าความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 2 มก./ลิตร จะเป็นช่วงความเข้มข้นที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสขนาดใหญ่สูงสุด ถ้าความเข้มข้นต่ำหรือสูงไปจากนี้จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ต่ำ ซึ่งทำนองเดียวกับ Carnation (Engvild, 1972) ส่วนผลของความเข้มข้นของ BA มีผลทำให้การตายนึ่งของเนื้อเยื่อใบกัญชาเพิ่มขึ้น ซึ่งผลของความเข้มข้น BA ในสัดส่วนความเข้มข้นกับ 2,4-D มีผลทำให้เกิดการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตายนึ่งของเนื้อเยื่อไม่พบรายงานโดยตรง แต่พบว่าเมื่อใช้ BA ร่วมกับ IAA หรือ NAA มีผลทำให้เกิดการตาย (necrosis) ของเนื้อเยื่อ Carnation (Engvild, 1972)

เป็นที่น่าสังเกตว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ BA มีผลต่อการขยายขนาดของใบและเส้นใบของกัญชา ซึ่งผลที่ได้นี้เป็นสมบัติอย่างหนึ่งของ cytokinin ซึ่งจะส่งเสริมการขยายขนาดของใบพืช (Miller, 1956) ซึ่งพบในพืช (intract plant) ส่วนในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง Greco et al. (1984) รายงานว่า การเพิ่ม BA มีผลต่อการขยายขนาดของใบและเส้นใบของ Sulflower เช่นกัน ดังนั้น จากผลวิจัยที่กล่าวมาจะเห็นว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำ คือ 0.5 มก./ลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นดีที่สุดสำหรับส่งเสริมการเกิด และการเติบโตของแคลลัสเนื้อเยื่อใบกัญชา ซึ่งความเข้มข้นของ 2,4-D ช่วงนี้พบว่าเป็นช่วงที่เหมาะสมกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดเช่น แพงพวยฝรั่ง (จรรยา ฤทธิ์ลอย, 2527) tobacco (Murashige and Skoog, 1962) Digilalis obscura L. (Perez-Bermudez et al., 1983)

ส่วนผลความเข้มข้นของ BA นั้น พบว่า ความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 2 มก./ลิตร จะเป็นช่วงความเข้มข้นที่ดีที่สุดสำหรับการเติบโตของเนื้อเยื่อใบกัญชา นั่นคือ สัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาคือ 2,4-D: BA เท่ากับ 0.5 : 2 มก./ลิตร ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและเปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่สูง และมีเปอร์เซ็นต์การตายนึ่งต่ำเมื่อเทียบกับสัดส่วนความเข้มข้นอื่น ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 ผลของความเข้มข้น 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D): Kinetin

การวิจัยพบว่า ผลของความเข้มข้น 2,4-D : Kinetin ต่อการเติบโตแคลลัสของใบกัญชาคล้ายกับผลของ 2,4-D : BA คือ ทุกสัดส่วนความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และมีขนาดต่าง ๆ ซึ่งเมื่อเทียบแคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงด้วย 2,4-D : BA น้ำหนักสดใกล้เคียงกัน แต่ในสัดส่วนความเข้มข้น 2,4-D : Kinetin จะเกิดการตายนึ่งเร็วกว่า

ผลของความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้ร่วมกับ Kinetin จะคล้ายกับผลของความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้ร่วมกับ BA คือ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมการเติบโตของแคลลัส แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้นจะยับยั้งการเติบโตของแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การตายนึ่งเพิ่มขึ้นซึ่งเช่นเดียวกับ Lee (1972) รายงานว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ เมื่อใช้ Kinetin 0.45 มก./ลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ (0.0221-0.221 มก./ลิตร) จะส่งเสริมการเติบโตของเนื้อเยื่อ แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2.21-22.1 มก./ลิตร จะยับยั้งการเติบโตของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ Veliky et al., (1969) พบว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Red kidney bean การใช้ 2,4-D 0.2 มก./ลิตร จะให้ growth ที่ดีกว่า ความเข้มข้น 1.5 มก./ลิตร เมื่อใช้ร่วมกับ Kinetin 0.2 มก./ลิตร จากที่กล่าวมานี้แสดงว่า 2,4-D ที่ใช้ร่วมกับ Kinetin สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกัญชาที่เหมาะสมที่สุดจะเป็นความเข้มข้นต่ำ

ผลของความเข้มข้น Kinetin เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสพบว่า ช่วงความเข้มข้นของ Kinetin ที่จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ 2,4-D คือ ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(0.5 มก./ลิตร) ช่วงความเข้มข้นของ Kinetin ที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงจะเป็น 0.5 และ 5 มก./ลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 2 และ 5 มก./ลิตร ความเข้มข้นของ Kinetin ที่ให้เปอร์เซ็นต์สูง คือ 2 มก./ลิตร ซึ่งเช่นเดียวกับ Okazawa et al., (1967) พบว่าความเข้มข้นของ Kinetin สำหรับการเติบโตสูงสุดของการเลี้ยงเนื้อเยื่อมันฝรั่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของ auxin คือ (NAA และ IAA) ถ้าความเข้มข้นของ Kinetin เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นสำหรับการเติบโตสูงสุดของเนื้อเยื่อของ NAA และ IAA จะเพิ่มตามด้วย

การเพิ่มความเข้มข้นของ Kinetin เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D จะให้ผลคล้ายกับการเพิ่ม BA เมื่อใช้ร่วม 2,4-D คือ ทำให้ใบและเส้นใบขยายขนาดเพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การตายนิ่งเพิ่มขึ้น

จากที่กล่าวมานี้ จะเห็นว่าสัดส่วนความเข้มข้นระหว่าง 2,4-D : Kinetin ที่ต่ำ คือ 0.5 : 0.5 มก./ลิตร จะเป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกัญชาในสูตรอาหาร MS แบบ Half strength ซึ่งสัดส่วนนี้ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และแคลลัสขนาดใหญ่สูง เปอร์เซ็นต์การตายนิ่งต่ำ ซึ่งมีพืชหลายชนิดที่เจริญได้ดีในสัดส่วน 2,4-D : Kinetin ที่ต่ำคือ Red kidney bean (0.2 : 0.2 มก./ลิตร) (Veliky et al., 1969) Seedling ของกัญชา (1.5 : 0.2 มก./ลิตร) (Veliky and Genest, 1972)

เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของเนื้อเยื่อกัญชา ที่มีสัดส่วนความเข้มข้น 2,4-D : BA กับ 2,4-D : Kinetin จะพบว่าจะมีแนวโน้มในการควบคุมการเจริญของเนื้อเยื่อกัญชาคล้ายกัน แคลลัสที่ได้จะมีความใกล้เคียงกันในแง่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำหนักสดและลักษณะของแคลลัส ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้เท่ากัน มีข้อแตกต่างกันคือ ความเข้มข้นของ BA (2 มก./ลิตร) ที่ใช้ในการส่งเสริมการเติบโตสูงสุดจะสูงกว่าของ Kinetin (0.5 มก./ลิตร)

4. ผลของการเคลื่อนย้ายแคลลัสในอาหารใหม่ (subculture) ที่มีต่อการเติบโตของแคลลัสใบกัญชา

เมื่อนำแคลลัส 2 ขนาด คือ แคลลัสขนาดใหญ่มาก และขนาดปานกลางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกัญชา อายุ 35 วัน มา subculture ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D : BA เท่ากับ 0.5 : 5 มก./ลิตร เหมือนเดิม พบว่าแคลลัสจะเพิ่มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Price et al., (1977) พบว่าการ subculture แคลลัสของ cotton จะทำให้แคลลัสเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีน้ำหนักสดเพิ่มจาก 200 มิลลิกรัม เป็น 3 กรัม ในเวลา 21 วัน นอกจากนี้การวิจัยพบว่าหลังจาก subculture ได้ 4 สัปดาห์ การเติบโตของแคลลัสจะชงักซึ่งอาจเนื่องมาจาก สารอาหารเหลือน้อยเนื่องจากถูกใช้ไปในการเติบโต และอีกประการหนึ่งอาจมีการสะสม metabolite ของแคลลัสทำให้เป็นพิษต่อแคลลัส (Yeoman and Macleod, 1977)

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่า แนวโน้มของแคลลัสขนาดใหญ่ เมื่อนำมา subculture จะให้แคลลัสขนาดใหญ่ (L.) ได้ ขณะที่การ subculture ของแคลลัสขนาดปานกลางจะไม่ให้แคลลัสขนาดใหญ่เลย ดังนั้น จะเห็นว่า cell line ที่มีศักยภาพในการเติบโตดีจะให้แคลลัสที่เกิดใหม่มีอัตราการเติบโตที่ดีด้วย จากคุณสมบัติของ cell line ของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองซึ่งมีศักยภาพต่าง ๆ กันนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการคัดเลือก cell line เพื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น Widholm (1980) ได้รายงานว่าการคัดเลือก cell line ที่เหมาะสมเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตสารให้ได้ผลผลิตสูงเช่น การคัดเลือก cell line ที่มีการผลิต pigment สูงโดยวิธีการสังเกตด้วยตา (Visual selection) ซึ่งกระทำโดยการสังเกตคัดเลือก cell line ที่มีการสร้างสาร pigment สูง แล้วแยกออกมาเลี้ยงในอาหารใหม่ (subculture) จนกระทั่งได้ cell line ที่บริสุทธิ์ในการผลิต pigment ที่ต้องการสูง ซึ่งวิธีการนี้ได้ถูกนำมาใช้โดย Eichenberger (1951, อ้างใน Widholm, 1980) คัดเลือก cell line ของ Daucus carota ซึ่งผลิต caratene สูง นอกจากนี้ การคัดเลือก cell line ที่ผลิต alkaloid สูง ก็มีวิธีการที่เหมาะสมคือ การวิเคราะห์สารเคมี (Chemical analysis selection) ซึ่ง Zenk et al. (1977) อ้างใน (Widholm, 1980) ได้ใช้ในการคัดเลือก cell line ของแพงพวยฝรั่งที่มีการผลิตสาร serpentine และ ajmalicine ได้สูงกว่าปกติ สำหรับการคัดเลือก cell line ที่มีศักยภาพในการเติบโต และ differentiation สูงนั้น Greef and Jacobs (1979) ได้รายงานว่าการคัดเลือก cell line ของ sugarbeet ที่มีความสามารถในการ regenerate สูงนั้น พิจารณาจากลักษณะการเติบโตของแคลลัสและความสามารถในการ regenerate สูง

การศึกษาการเคลื่อนย้ายแคลลัสลงในอาหารใหม่นี้จะเป็นพื้นฐานการวิจัยขั้นต่อไปในการคัดเลือกแคลลัสที่เติบโตดีและรวดเร็ว ซึ่งเราควรจะได้มีการตรวจสอบดูว่า callus line ที่เติบโตได้ดีจะมีการผลิตสารได้ดีหรือไม่ หรือ callus line ที่ผลิตสารได้ดีแต่การเติบโตไม่ดี ควรจะมีการศึกษาที่จะปรับปรุงให้มีการเติบโตได้ดี ซึ่งควรจะได้มีการกระทำในการวิจัยขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ antimicrobial จากเนื้อเยื่อแคลลัสที่ได้จากใบส่วนยอดกัญชา

การวิจัยทดสอบสาร antimicrobial โดยการใช้แคลลัสอายุ 60 วัน วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (nutrient agar) ที่ spread plate ด้วยเชื้อ Bacillus megaterium, Aspergillus niger, Escherchia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Micrococcus luteus, Proteus vugalis และ Penicillum spp. พบว่าไม่เกิด clear zone กับเชื้อที่ทดสอบ แต่ปรากฏว่าเกิด clear zone กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายราซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ (contaminate) ในขณะทดลองในการวิจัยครั้งแรกไม่เกิด clear zone สันนิษฐานว่าอาจเกิดมาจากสารภายในแคลลัสแพร่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้น้อย เนื่องจากมีพื้นที่ผิวแคลลัสสัมผัสกับผิวอาหารน้อย หรืออาหารมีความแข็งมาก เนื่องจาก ปริมาตรของวุ้นสูง จึงได้ทำการทดลองซ้ำโดยใช้แคลลัส 2 กรัม มาบดแล้วใช้ Blank paper disc ϕ 0.5 มม. จุ่มลงในแคลลัสที่บด แล้ววางลงบนจานอาหารที่ spread plate ด้วยเชื้อ B.megaterium ซึ่ง Veliky and Genest (1972) ได้รายงานว่า ตอบสนองต่อสารที่ได้จากเนื้อเยื่อกัญชาดีที่สุด แต่ปรากฏว่าไม่เกิด clear zone เช่นกัน ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าสารที่มีในแคลลัสมีปริมาณที่น้อยเกินไปจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ หรืออาจไม่มีการสร้างสาร antimicrobial โดยทั่วไปความเข้มข้นของสาร antibiotic ที่ใช้ทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์สำคัญมาก ซึ่ง Mitscher et al. (1972) กล่าวว่าความเข้มข้นของสาร antibiotic ที่ใช้ต้านเภสัชนั้น เมื่อนำมาทดสอบใช้ความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 10 μg/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับสารที่สกัดจากพืช เมื่อนำมาทดสอบจะใช้ปริมาณความเข้มข้น 100-1000 µg/ml ซึ่งสกัดมาจากส่วนของพืช 500 กรัม (น้ำหนักแห้ง) Veliky and Genest (1972) ได้ทดสอบฤทธิ์ของ antimicrobial ของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงจากกัญชาพันธุ์ B-7 hybrid ปรากฏว่าต้องใช้แคลลัสที่มีน้ำหนักแห้ง 10 กรัม นำมาสกัดให้มีปริมาตร 1 มิลลิกรัม

กัญชามีสารที่น่าสนใจหลายอย่าง กลุ่มที่สำคัญได้แก่ Cannabinoids ซึ่งประกอบด้วย Tetrahydrocannabinal (THC), Cannabinal, Cannabidiol เป็นต้น ในการวิเคราะห์ต้องใช้วิธีการแยกสารต่าง ๆ ทางเคมี แต่เนื่องจาก Veliky and Genest (1972) ได้รายงานว่าแคลลัสของกัญชามีสารที่มีฤทธิ์เป็น antimicrobial ด้วย จึงได้ทดสอบคุณสมบัติทางด้าน antimicrobial แทนการวิเคราะห์สารอื่น ๆ โดยใช้วิธี bioassay ซึ่งง่ายกว่า ในการทดสอบการผลิตของเนื้อเยื่อจำเป็นต้องใช้วิธีเคมี ซึ่งต้องใช้ปริมาณแคลลัสมากซึ่งจะได้กระทำในการวิจัยครั้งต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved