หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

บทวิจารณ์และสรุป

ในงานวิจัยนี้ได้ตั้งเป้าประสงค์ที่จะศึกษาถึงศักยภาพของการผลิตฮอร์โมนลอกคราบจากพืชไข่เน่า (V.glabrata R.Br.) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว ด้วยการแปรผันสูตรอาหารและสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบ

4.1 การเหนี่ยวนำและการเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัส จากส่วนต้น ใบ และเปลือกของพืชไข่เน่า

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชไข่เน่า จากส่วนต้น ใบ และเปลือก ในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm จะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนที่ได้จากต้นและเปลือกจะเกิดเป็นแคลลัสที่มีลักษณะไม่แตกต่างกัน โดยแคลลัสมีสีเหลืองสด ลักษณะจับกันหลวมๆ (friable callus) แม้จะทำการเพาะเลี้ยงตลอดเป็นเวลา 1 ปี ก็ยังคงมีลักษณะเหมือนเดิม สำหรับแคลลัสส่วนใบก็มีลักษณะใกล้เคียงแคลลัสจากส่วนต้นและเปลือก เพียงแต่มีลักษณะนิ่มและอิ่มน้ำมากกว่า สำหรับสารควบคุมการเจริญประเภทออกซิน (auxin) ที่ใช้คือ 2,4-D นั้นมีผลต่อการทำให้เซลล์ยาวขึ้น (cell elongation), การขยายขนาดของเซลล์ (cell enlargement) และการแบ่งตัวของเซลล์ (cell division) ส่วนสารควบคุมการเจริญประเภทไซโตไคนิน (cytokinin) ที่ใช้ คือ BA มีผลต่อการแบ่งเซลล์ (Pierik, 1987) การที่แคลลัสจากส่วนต้นและเปลือก เป็นแบบ friable แสดงว่าปริมาณและอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญ 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm นั้นเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไข่เน่า การที่เลือกใช้ปริมาณนี้ เนื่องจากมีรายงานว่าปริมาณ 2,4-D และ BA ไม่เกิน 3 ppm ให้ผลดีต่อการเหนี่ยวนำและการเจริญของแคลลัสพืชไข่เน่า (ปัทมา, 2533) สำหรับแคลลัสจากส่วนใบมีลักษณะอิ่มน้ำมีความเหลวมากกว่าแคลลัสจากส่วนต้นและเปลือก อาจเนื่องมาจากปริมาณ 2,4-D เท่ากับ 1 ppm นี้น้อยเกินไปไม่เหมาะกับแคลลัสส่วนใบ ทำให้เซลล์เจริญเกาะกลุ่มหนาแน่นน้อยกว่าเซลล์ต้นและเปลือก โดยที่ออกซินถ้ามีมากจะมี

[library stamp]

ผลทำให้แคลลัสมีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่นเป็นก้อนแข็ง (compact callus) (อรดี, 2522)

4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า ส่วนต้น ใบ และเปลือกในอาหารเหลว

การเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนต้น ใบ และเปลือก ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เหมือนในอาหารแข็ง พบว่าเซลล์ต้นและเซลล์เปลือกมีลักษณะเซลล์ดูจากภายนอกคล้ายคลึงกัน คือ มีสีเหลืองสด เปรียบเทียบกับลักษณะของเซลล์จากส่วนใบซึ่งมีสีเหลืองเข้มกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากลักษณะแคลลัสก่อนนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีสีเหลืองเข้มกว่าอยู่แล้ว การเจริญของเซลล์ต้นและเซลล์เปลือกเมื่อเข้าสู่ log phase จนเริ่มเข้าสู่ stationary phase มีความหนาแน่นของเซลล์ดูจากภายนอกใกล้เคียงกันและมากพอสมควร แสดงว่าปริมาณ 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ที่ใช้ในอาหารแข็งยังคงเหมาะสมสำหรับการเจริญในอาหารเหลว เปรียบเทียบกับเซลล์ใบ การเจริญดูจากภายนอกไม่สูงกว่าในเซลล์ต้นและเปลือก อาจเนื่องมาจากปริมาณ 2,4-D ไม่เหมาะสมดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

4.3 เปรียบเทียบวิธีการวัดการเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า

เนื่องจากเซลล์พืชทั่วไปเมื่อเพาะเลี้ยงในลักษณะแขวนลอย มักจะจับรวมกันเป็นกลุ่มเซลล์ต่างไปจากการเจริญแบบเซลล์เดี่ยว ดังนั้นการติดตามการเจริญจะค่อนข้างยุ่งยาก ในงานวิจัยนี้จึงเริ่มต้นด้วยการหาวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการทำการทดลอง วิธีที่นิยมใช้กันอย่างหยาบ ๆ ทั่วไป คือ ค่า Packed Cell Volume (PCV) วิธีที่ละเอียดแต่ยุ่งยากขึ้นไปอีก คือ ค่าน้ำหนักแห้ง (dry weight) หรือในระดับโมเลกุลอาจติดตามการเจริญด้วยการวัดปริมาณโปรตีน (Dixon, 1985)

ในงานวิจัยนี้ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีวัดการเจริญระหว่างวิธีวัด ค่า PCV จากเซลล์แขวนลอย 10 มล. ค่าน้ำหนักแห้งจากเซลล์แขวนลอย 1 กับ 10 มล. และปริมาณโปรตีน 1 กับ 10 มล. ผลการทดลองจะเห็นได้ว่าวิธีวัดการเจริญทุกวิธีที่กล่าวมาแล้วจะได้รูปแบบของการเจริญคล้ายคลึงกัน การวัดค่าน้ำหนักแห้งจากเซลล์แขวนลอย 1 กับ 10 มล.ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นสามารถใช้ค่าน้ำหนักแห้งจากปริมาณเซลล์แขวนลอย

ต่างๆ เพียง 1 มล. แทน 10 มล. ได้ ส่วนการวัดปริมาณโปรตีนจากเซลล์แขวนลอย 1 และ 10 มล. มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการวัดปริมาณโปรตีนจากเซลล์แขวนลอย 1 มล. ไม่สามารถใช้แทน 10 มล. ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้การวัดการเจริญด้วยวิธีหาค่าน้ำหนักแห้งจากเซลล์แขวนลอย 1 มล. เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ทำได้รวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองสารเคมีและสารตัวอย่างมากนัก

4.4 ผลกระทบของความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากส่วนต้นของพืชไข่เน่า โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นต่างกัน พบว่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นระดับต่ำทำให้ระยะ lag phase เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช (Thomas and Davey, 1975) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าสามารถใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นระดับสูงเพื่อลดระยะ lag phase ทำให้เซลล์เจริญเข้าสู่ระยะ log phase จนมีการเจริญสูงสุดได้เร็วขึ้น เพื่อทำการเก็บตัวอย่างได้เร็วขึ้นด้วย โดยระดับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นไม่ควรสูงไปกว่าการใช้ค่าน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 0.005 กรัม ซึ่งเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะ log phase ทันทีจนไม่ปรากฏช่วง lag phase อยู่แล้ว การใช้ระดับความหนาแน่นต่ำไม่ได้ทำให้รูปแบบการเจริญของเซลล์ต้นเปลี่ยนไป เพียงแต่ทำให้ระยะพักตัวของเซลล์นานขึ้น เพราะการแบ่งตัวของเซลล์พืชจะช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ และการเกาะกลุ่มของเซลล์ในระยะเริ่มต้นด้วยประการหนึ่ง (Thomas and Davey, 1975)

4.5 การเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซน และลักษณะเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย จากส่วนต้น ใบ และเปลือกของพืชไข่เน่า ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm (รูปที่ 14, 17 และ 20) จะเห็นได้ว่าเซลล์เปลือกมีการเจริญเร็วกว่าเซลล์ต้น 1 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเซลล์เปลือกเริ่มต้นที่นำมาใช้นั้นอยู่ในช่วงที่เจริญมากกว่าเซลล์เริ่มต้นของส่วนต้นไปเล็กน้อย แต่ลักษณะการเจริญต่อมาก็มีแบบแผนเช่นเดียวกัน สำหรับเซลล์ใบมีการเจริญต่ำกว่าเซลล์ต้นและ

เซลล์เปลือกประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากปริมาณ 2,4-D ที่ใช้ไม่เหมาะสม ดังได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งผลของสารควบคุมการเจริญต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากจะขึ้นกับชนิดของพืชแล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญอีกด้วย (Pierik, 1987)

สำหรับการผลิต เบตา-เอคไดโซน ของเซลล์ต้น ใบ และเปลือก (ตารางที่ 6) เมื่อให้ปริมาณ เบตา-เอคไดโซน ในเซลล์ต้นเป็นปริมาณหลักมีค่าเท่ากับ 1.00 จะเห็นว่าในช่วง log phase นั้น ปริมาณ เบตา-เอคไดโซน ภายในเซลล์ต้นและเปลือกมีค่าใกล้เคียงกัน ปริมาณภายนอกเซลล์ทั้งเซลล์ต้นและเซลล์เปลือกมีค่าต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ เมื่อรวมเป็นปริมาณทั้งหมดจึงมีค่าใกล้เคียงกันโดยที่เซลล์เปลือกมีปริมาณมากกว่าในเซลล์ต้นประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในเซลล์ใบนั้นปริมาณภายในเซลล์มีค่าเพียง 38 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ต้น แต่ปริมาณภายนอกเซลล์ของเซลล์ใบกลับสูงกว่าปริมาณภายนอกเซลล์ของเซลล์ต้นถึง 22 เท่า ซึ่งเมื่อรวมปริมาณทั้งหมดแล้วในช่วง log phase เซลล์ต้นก็ยังผลิต เบตา-เอคไดโซน ได้สูงกว่าเซลล์ใบประมาณ 19 เปอร์เซนต์

ในช่วง stationary phase ปริมาณ เบตา-เอคไดโซน ภายในเซลล์ของเซลล์เปลือกมีมากกว่าเซลล์ต้นประมาณ 42 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณภายนอกเซลล์ทั้งเซลล์ต้นและเซลล์เปลือกมีค่าเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณภายในเซลล์ และค่าน้ำหนักแห้งควบคู่กันไป จะเห็นว่าปริมาณภายนอกเซลล์นั้นส่วนหนึ่งมาจากเซลล์ที่แตกสลายลง ส่วนหนึ่งมาจากการผลิตสารเพิ่มขึ้นของเซลล์ในช่วง stationary phase ซึ่งทำให้ปริมาณรวมทั้งหมดสูงกว่าปริมาณในช่วง log phase โดยปริมาณรวมทั้งหมดของเซลล์เปลือกมากกว่าเซลล์ต้นเล็กน้อย สำหรับปริมาณภายในเซลล์ใบยังคงน้อยกว่าเซลล์ต้นและเปลือก ปริมาณภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นส่วนหนึ่งมาจากการผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ดังเดิม และส่วนหนึ่งมาจากการแตกสลายของเซลล์ด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณรวมทั้งหมด พบว่าเซลล์ใบผลิต เบตา-เอคไดโซน ได้น้อยกว่าเซลล์ต้นประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะส่วนต้น ใบ และเปลือก ของพืชไข่เน่า มีความคล้ายคลึงกัน คือ มีเซลล์รูปร่าง และขนาดต่าง ๆ คละกันไป คือ มีทั้งเซลล์รูปกลม รูปยาว และเซลล์ที่ต่อกันเป็นสายยาว โดยเซลล์รูปกลมมักจะเป็นเซลล์ meristematic ซึ่งมีเป็นส่วนใหญ่ และอาจจะเจริญต่อกันเป็นสายยาว ส่วนเซลล์รูปยาวอาจเป็นเซลล์จำพวก vascular ในช่วง log

phase จะเห็นเซลล์รูปกลมมีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณไม่เกิน 100 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เกาะกันเป็นกลุ่ม โดยภายในเห็นบริเวณที่เป็นนิวเคลียสค่อนข้างชัดเจน เซลล์จึงมีขนาดเล็กกว่าเซลล์เดี่ยวที่ยังไม่ได้แบ่งตัว เมื่อเซลล์แบ่งตัวแล้วอาจเกาะกันเป็นกลุ่มหรือต่อกันเป็นสายดังที่เห็นในเซลล์ใบและเซลล์เปลือก (รูปที่ 18 และ 20) ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์พืชทั่วๆ ไป (Thomas และ Davey, 1975)

ในช่วง stationary phase เซลล์จากส่วนต้น ใบ และเปลือก มีความคล้ายคลึงกัน คือ เซลล์รูปกลม รูปยาว ขนาดต่าง ๆ กัน ตลอดจนเซลล์ที่ต่อกันเป็นสายยังคงมีเช่นเดิม นอกจากนี้มีเซลล์รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดใหญ่ ทั้งนี้เป็นเพราะเซลล์ในช่วง stationary phase มักจะมีลักษณะ expansion นอกจากนี้เซลล์รูปร่างต่าง ๆ พบว่าไซโตพลาสซึมมีการหดตัวทำให้เกิดช่องว่างระหว่างขอบเซลล์มากขึ้น และมีเศษเซลล์จากการแตกสลายของเซลล์บางเซลล์ปรากฏอยู่ ลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะทั่วไปของเซลล์พืชในช่วง stationary phase (Thomas และ Davey, 1975) ลักษณะของเซลล์ทั้ง 3 ส่วน มีความแตกต่างกันชัดเจนตรงที่เซลล์ใบนั้น ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่ต่อกันเป็นสายยาว ในขณะที่เซลล์เปลือกมีบ้างพอสมควร แต่เซลล์ต้นเกือบจะไม่มีเซลล์ที่ต่อกันเป็นสายยาวเลย

4.6 ผลกระทบของสารควบคุมการเจริญต่อการเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm เป็นอาหารสูตรควบคุม เปรียบเทียบกับการแปรผันชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน คือ IAA และ BA 1 กับ 2, 2 กับ 2 และ 2,4-D, IAA และ BA 1, 1 กับ 2 ppm ตามลำดับ (รูปที่ 23-26 และตารางที่ 11) การใช้ IAA ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ppm ขึ้นไป จะไปมีผลยับยั้งทั้งการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ 2,4-D ในอาหารสูตรควบคุม อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญต่อการเจริญของเซลล์นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ตั้งแต่ชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญ ชนิดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และชนิดของพืชนั้น ๆ เอง (Pierik, 1987)

สำหรับการใช้ 2,4-D ให้ผลผลิต เบตา-เอคไดโซน ได้สูงกว่าเมื่อใช้ IAA ซึ่งเป็นออกซินนั้น คล้ายคลึงกับการผลิตสาร diosgenin จากเซลล์ Dioscorea deltoidea (Marshall และ Staba, 1975) ซึ่งการที่ออกซินชนิดหนึ่งจะเพิ่มผลผลิตได้ดีกว่าออกซินอีกชนิดหนึ่งนั้นขึ้นกับชนิดของพืชด้วย ในเซลล์ Papaver bracteatum นั้น IAA เพิ่มผลผลิตสาร thebaine ได้ดีกว่า 2,4-D (Kamimura และ Nishikawa, 1976) การที่ใช้ IAA เท่ากับ 2 ppm ได้ปริมาณ เบตา-เอคไดโซน น้อยกว่า 1 ppm แสดงว่า IAA ไม่ช่วยในการผลิต เบตา-เอคไดโซน ดีเท่า 2,4-D แล้ว ปริมาณ IAA ที่สูงขึ้น ยังมีผลทำให้การผลิต เบตา-เอคไดโซน ลดลง ซึ่งความเข้มข้นของสารพวกออกซินมีผลต่อการผลิตสารจำพวกทุติยภูมิ เช่น เซลล์ของ Nicotianum tabacum ผลิตสารนิโคตินได้น้อยลง เมื่อมีปริมาณของ NAA เพิ่มขึ้น (Pearson, 1978)

4.7 ผลกระทบของชนิดอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า ในอาหารเหลวสูตร B-5 เปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุม คือ 1/2 MS ซึ่งมีปริมาณ 2,4-D และ BA เท่ากัน (รูปที่ 27 และตารางที่ 14) พบว่าการเจริญของเซลล์ต้นในอาหารทั้งสองสูตรไม่ได้แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดใกล้เคียงกัน อาจเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนรวมจากไนเตรทและแอมโมเนียมของอาหารทั้งสองสูตรมีค่าใกล้เคียงกัน โดยอาหารสูตร B-5 มีค่า 26.756 มิลลิโมลต่อลิตร ส่วนอาหารสูตร 1/2 MS มีค่าเท่ากับ 30.008 มิลลิโมลต่อลิตร (Pierik, 1987) และการที่เซลล์ต้นเจริญในอาหารสูตร B-5 เร็วกว่าสูตร 1/2 MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์ อาจเนื่องมาจากสัดส่วนของไนเตรทกับแอมโมเนียม โดยที่อาหารสูตร B-5 มีปริมาณไนเตรทมากกว่าอาหารสูตร 1/2 MS ประมาณ 1 เท่า และมีปริมาณแอมโมเนียมน้อยกว่าประมาณ 5 เท่า ซึ่งพืชส่วนใหญ่มักจะใช้ไนเตรทมากกว่าแอมโมเนียม (Pierik, 1987)

สำหรับการผลิต เบตา-เอคไดโซน ในอาหารสูตร B-5 มากกว่าในอาหารสูตร 1/2 MS เป็นเพราะปริมาณและสัดส่วนของไนเตรทกับแอมโมเนียม มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิ เช่นเซลล์ Lithospermum erythrorhizon พบว่าไนเตรทเพิ่มผลผลิตของสาร shikonin

ในขณะที่แอมโมเนียมให้ผลผลิตลดลงอย่างมากจนถึงขั้นยับยั้งการผลิตได้ (Fujita และคณะ, 1981)

4.8 <u>ผลกระทบของสารตั้งต้นต่อการเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS ที่มีสารตั้งต้นของการผลิตฮอร์โมนลอกคราบ คือ โคเลสเตอรอล 100 มก/ล, สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 มก/ล และกรดเมวาโลนิค 100 มก/ล และในอาหารสูตร B-5 ที่มีโคเลสเตอรอล 100 มก/ล เปรียบเทียบกับในอาหารสูตร 1/2 MS ที่ไม่มีสารตั้งต้นใดๆ เป็นอาหารสูตรควบคุม (รูปที่ 28-33 และตารางที่ 25) พบว่า โคเลสเตอรอล 100 และ 200 มก/ล ทำให้การเจริญของเซลล์ต้นลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุมซึ่งงานวิจัยจำนวนมากพบว่า สารตั้งต้นทำให้การเจริญของเซลล์ลดลง เช่น การเพิ่มผลผลิต seratonin ของ <u>Peganum</u> <u>harmala</u> พบว่า ทริปตามีน 5 มิลลิโมล ทำให้การเจริญลดลง 35 เปอร์เซ็นต์ และถ้าเพิ่มเป็น 10 มิลลิโมลจะยับยั้งการเจริญ (Sasse และคณะ, 1987) โคเลสเตอรอล 90 มก/100 มล ยับยั้งการเจริญของเซลล์ <u>Dioscorea</u> <u>deltoidea</u> เมื่ออายุมากกว่า 21 วัน (Kaul และคณะ,1969) ส่วนสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 และ 200 มก/ล และกรดเมวาโลนิค 100 มก/ล ไม่ทำให้เซลล์ต้นเจริญแตกต่างไปจากอาหารสูตรควบคุมมากนัก สำหรับการเจริญของเซลล์ต้นในอาหารสูตร B-5 ที่มีโคเลสเตตรอล 100 มก/ล มากกว่าการเจริญในอาหารสูตรควบคุมเล็กน้อย เป็นผลมาจากอาหารสูตร B-5 เองดังได้อธิบายมาแล้ว (บทวิจารณ์ข้อ 4.7)

โคเลสเตอรอล 100 และ 200 มก/ล เพิ่มผลผลิตเบตา-เอคไดโซน ได้เล็กน้อยในระยะ log phase แต่ในระยะ stationary phase เกือบไม่มีผลในการเพิ่มระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซน ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนจากโคเลสเตอรอลนั้นต้องผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอนซึ่งบางขั้นตอนก็ไม่ทราบกลไกแน่นอน (รูปที่ 3) ซึ่งการเพิ่มปริมาณโคเลสเตอรรอลอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะชักนำให้เอนไซม์ในขั้นตอนต่างๆ ทำงานมากขึ้น และอาจเป็นเพราะโคเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ได้ไม่เต็มที่ เนื่องจากโคเลส-

เตอรอลละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งการที่สารตั้งต้นใดจะกระตุ้นให้มีการสร้างผลผลิตเพิ่มขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการตั้งแต่ชนิดชิ้นส่วนพืช ชนิดของพืชเอง ตลอดจนอาหารที่ใช้เลี้ยงและสภาวะต่าง ๆ ของการทดลองนั้น ๆ ซึ่งทำให้การใช้สารตั้งต้นมีทั้งที่ประสบความสำเร็จและไม่ประสบความสำเร็จ ดังเช่นการใช้โคเลสเตอรอลสามารถเพิ่มผลผลิตสาร diosgeninของเซลล์ <u>Trigonella</u> <u>foenum-graecum</u> Linn. ได้สูงมาก แต่สารประเภทเดียวกันคือ gitogenin และ tigogenin มีผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (Khanna และคณะ, 1975) เมื่อใช้ ornithine , putrescine และ กรด nicotinic เป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ <u>T. tabacum</u> พบว่า ornithine เท่านั้นที่เพิ่มผลผลิตนิโคตินแต่เป็นปริมาณเพียงเล็กน้อย (Ohta และคณะ, 1978) การใช้โคเลสเตอรอล 100 มก/ล สามารถเพิ่มการผลิตสาร diosgenin จากเซลล์ <u>Dioscorea</u> <u>deltoidea</u> ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Chowdbury และ Chaturvedi, 1979)

สำหรับ สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล เพิ่มผลผลิตเบตา-เอคไดโซน ได้เล็กน้อยในระยะ log phase แต่ในระยะ stationary phase ก็เกือบไม่มีผลในการเพิ่มระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซนเช่นกัน ซึ่งสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับการใช้โคเลสเตอรอล โดยที่สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล ต้องเปลี่ยนมาเป็นโคเลสเตอรอลเสียก่อน จึงจะผ่านเข้าสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์เบตา-เอคไดโซนต่อไป และสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอลละลายน้ำได้เล็กน้อยเช่นกัน

สำหรับกรดเมวาโลนิคก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มระดับเบตา-เอคไดโซนเช่นกัน อาจจะเป็นเพราะวิถีการเปลี่ยนกรดเมวาโลนิคไปเป็น เบตา-เอคไดโซน ต้องผ่านขั้นตอนเพิ่มขึ้นอีกหลายขั้นตอน โดยที่กรดเมวาโลนิคต้องเปลี่ยนเป็นโคเลสเตอรอลเสียก่อนแล้วจึงจะเข้าสู่ขบวนการสังเคราะห์ที่เป็นเบตา-เอคไดโซนต่อไป (รูปที่ 3)

การผลิต เบตา-เอคไดโซน ในอาหารสูตร B-5 เสริมด้วยโคเลสเตอรอล 100 มก/ล มากกว่าในอาหารสูตรควบคุมเล็กน้อย ซึ่งเป็นผลมาจากอาหารสูตร B-5 ดังได้กล่าวมาแล้ว (บทวิจารณ์ข้อ 4.7)

ผลผลิต เบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS และสูตร B-5ที่เสริมด้วยสารตั้งต้นโคเลสเตอรอล หรือสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล หรือ

กรดเมวาโลนิค ก็ตาม มีค่าสูงสุดไม่เกิน 0.050 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพแคลลัส โดยที่เซลล์ต้นให้ผลผลิตมากกว่าเซลล์ใบและเปลือก โดยได้ปริมาณ เบตา-เอคไดโซน สูงสุดเท่ากับ 0.014 กรัมเปอร์เซ็นต์ (ปัทมา, 2533) อย่างไรก็ตามก็ยังน้อยกว่าปริมาณสะสมในส่วนเปลือกจากธรรมชาติซึ่งสูงถึง 1.59 กรัมเปอร์เซ็นต์ (Werawatanametin, 1986) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยโดยทั่วไปที่พบว่าการผลิตสารทุติยภูมิในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งในสภาพแคลลัสและเซลล์แขวนลอยมักจะให้ผลผลิตต่ำกว่าค่าที่มีการผลิตในพืชธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ (Forrest, 1969; Boulanger และคณะ, 1973; Hiraoka และ Tabata, 1974; Ikuta และคณะ, 1974; Jalal และคณะ, 1979; Sejourne และคณะ, 1981) สำหรับรายงานการผลิต เบตา-เอคไดโซนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดอื่นๆ พบว่าแคลลัสจากเมล็ดของพืชในสกุล Acryranthes วงศ์ Amaranthaceae สามารถผลิตเบตา-เอคไดโซนได้แต่มีปริมาณน้อยมากเพียง 0.002 กรัมเปอร์เซ็นต์ (Hikino และคณะ, 1971) แคลลัสจากต้นกล้าของ <u>Trianthema</u> <u>portulacastrum</u> ในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 ppm สามารถผลิตเบตา-เอคไดโซนได้ 0.0349 กรัมเปอร์เซ็นต์ (Ravishhankar, 1979) ปริมาณเบตา-เอคไดโซนที่ผลิตจากพืชเหล่านี้ต่ำกว่าการผลิตจากเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในงานวิจัยนี้ อาจเป็นเพราะสภาวะในการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมประการหนึ่ง และอาจเนื่องมาจากพืชที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงมีผลผลิตต่ำแต่เดิมตามธรรมชาติ ซึ่งโดยทั่วไปการผลิตสารจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะให้ผลผลิตปริมาณสูงเมื่อนำพืชที่ผลิตสารได้ระดับสูงตามธรรมชาติมาเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้พืชที่มีผลผลิตระดับต่ำตามธรรมชาติก็จะได้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่มีผลผลิตต่ำเช่นเดียวกัน ซึ่งรู้จักกันแพร่หลายจากการวิจัยปริมาณสารอัลคาลอยด์ของ <u>Catharanthus</u> <u>roseus</u> (Zenk และคณะ, 1977)

ในงานวิจัยนี้เซลล์เปลือกผลิต เบตา-เอคไดโซนได้สูงกว่าเซลล์ต้นเพียงเล็กน้อยนั้นนอกจากเป็นเพราะส่วนเปลือกมีสารเบตา-เอคไดโซนมากกว่าส่วนต้นตามธรรมชาติแล้ว และจากการศึกษาลักษณะเซลล์ทางกล้องจุลทรรศน์นั้นพบว่า เซลล์ต้นและเซลล์เปลือกไม่แตกต่างกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากแหล่งของเนื้อเยื่อส่วนเปลือกน่าจะเป็นเนื้อเยื่อส่วน epidermal cell ในขณะที่การตัดชิ้นส่วนจากส่วนต้นนั้นเป็นการตัดตามขวางซึ่งส่วนหนึ่งจะได้เนื้อเยื่อชั้น epidermis มาด้วย จึงอาจเป็นไปได้ว่าระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซนจากเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ไม่แตก-

ต่างกันมากนัก แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเบตา-เอคไดโซนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไข่เน่าก็ยังเป็นวิธีที่สะดวกและควบคุมได้ดีกว่าการลอกเปลือกต้นไข่เน่าตามธรรมชาติ ทั้งยังอาจจะได้ผลผลิตมากขึ้นถ้าทดลองใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ (Cell Immobilization) หรือวิธีทางพันธุกรรมต่างๆ มาช่วยในอนาคต

4.9 <u>ความเสถียรของการเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าที่สภาวะเดียวกันเป็นเวลานาน 7 เดือน การเจริญสูงสุดลดลงเล็กน้อยในช่วง 3 เดือนหลัง ซึ่งการเจริญของเซลล์พืชเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลานานอาจลดลงได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ของพืช ชนิดของพืชตลอดจนสภาวะที่ใช้ทดลอง (Peirik, 1987)

สำหรับระดับการผลิต เบตา-เอคไดโซน ในระยะเวลา 7 เดือน มีค่าไม่คงที่แต่ไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงว่าเซลล์ส่วนต้นของพืชไข่เน่ายังคงรักษาระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซนไว้ได้เป็นเวลานานพอสมควร เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเป็นวลานานนั้นทำให้ระดับการผลิตสารทุติยภูมิลดลงได้ อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหรือการเหนี่ยวนำเอนไซม์ในขั้นตอนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิทำงานน้อยลง (Hussey, 1986)

<u>บทสรุป</u>

1. ลักษณะแคลลัสของพืชไข่เน่า จากส่วนต้น ใบ และเปลือก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm คือ มีสีเหลืองสด ลักษณะจับกันแบบหลวม ๆ โดยแคลลัสจากส่วนใบมีสีเข้มกว่าเล็กน้อย และมีลักษณะอิ่มน้ำมากกว่า

2. วิธีวัดการเจริญของเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า โดยการวัดค่า Packed Cell Volume จากตัวอย่าง 10 มล. ค่าน้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีนจากตัวอย่าง 1 และ 10 มล. มีสหสัมพันธ์ซึ่งกันและกันได้รูปแบบการเจริญของเซลล์คล้ายคลึงกัน โดยการวัดค่าน้ำหนักแห้งจากตัวอย่าง 1 มล.สามารถใช้แทนค่าน้ำหนักแห้ง 10 มล. ได้โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณโปรตีนจากตัวอย่าง 1 มล. และ 10 มล. แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นระดับต่ำ ทำให้ระยะ lag phase ของเซลล์พืชไข่เน่าเพิ่มขึ้น

4. ลักษณะเซลล์แขวนลอยส่วนใบของพืชไข่เน่ามีเซลล์ต่อกันเป็นสายยาวเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่เซลล์เปลือกมีมากพอสมควร แต่เซลล์ต้นเกือบจะไม่มีเซลล์ที่ต่อกันเป็นสายยาวเลย

5. เซลล์แขวนลอยส่วนต้นและส่วนเปลือกมีการเจริญใกล้เคียงกัน แต่เซลล์ส่วนใบมีการเจริญต่ำกว่า

6. เซลล์แขวนลอยส่วนต้นและส่วนเปลือกมีการผลิตเบตา-เอคไดโซน ได้ปริมาณใกล้เคียงกัน เซลล์ใบผลิตได้ปริมาณต่ำกว่าเล็กน้อย แต่เซลล์ใบมีการปล่อยเบตา-เอคไดโซนออกมาภายนอกเซลล์มากกว่าเซลล์ต้นและเปลือก

7. การเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้น เมื่อใช้ 2,4-D มีค่าสูงกว่าเมื่อใช้ IAA เป็นสารควบคุมการเจริญ

8. การเจริญและการผลิต เบตา-เอคไดโซน ในอาหารสูตร B-5 สูงกว่าในอาหารสูตร 1/2 MS

9. โคเลสเตอรอลที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มก/ล ทำให้การเจริญของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าลดลง ในขณะที่สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 และ 200 มก/ล และกรดเมวาโลนิค 100 มก/ล ไม่ทำให้การเจริญแตกต่างไปจากเมื่อไม่มีสารตั้งต้นเหล่านี้

10. โคเลสเตอรอล สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มก/ล ทำให้ระดับการผลิตเบตา-เอคไดโซนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่กรดเมวาโลนิค 100 มก/ล ทำให้การผลิตลดลงเล็กน้อย

11. การเจริญสูงสุดของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าลดลงเล็กน้อย เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลา 7 เดือน

12. การติดตามผลการผลิต เบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่าที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลา 7 เดือน มีค่าไม่คงที่แต่ไม่แตกต่างกันมากนัก