ผลของการใช้สารกลุ่มไซโตไคนินต่อการเกิดยอดและใบของกัญชาในสภาพปลอดเชื้อ
Effect of Cytokinin on Shoots and Leaves of Cannabis *in vitro*

กษิดิ์เดช อ่อนศรี[1*] จุฑาภัทร์ พรหมชา[1] กัญตนา หลอดทองหลาง[1]
เกศินี ศรีปฐมกุล[1] และ อรพรรณ หัสรังค์[2]
Kasideth Onsri[1*], Juthapat Phromcha[1], Kantana Lodthonglang[1],
Kesinee Sripathomkul[1] and Orapan Hussarang[2]

[1]คณะนวัตกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยรังสิต ตำบลหลักหก อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี
[2]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ตำบลท่าช้าง อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี
[1]Faculty of Agricultural Innovation, Rangsit University, Lak Hok, Mueang Pathum Thani, Pathum Thani
[2]Faculty of Agricultural Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Tachang, Muang, Chanthaburi

*Corresponding author. E-mail: kasideth.o@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

กัญชาเป็นพืชล้มลุกที่ได้รับการยอมรับในการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมาก เนื่องจากช่วยในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้ จึงทำให้กัญชาเป็นพืชที่มีแนวโน้มทางความต้องการเพิ่มมากขึ้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพแต่ความเหมาะสมของฮอร์โมนที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชนั้นมีการตอบสนองแตกต่างกันไป โดยเฉพาะฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินที่มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดชิ้นส่วนใหม่ การทดลองนี้จึงได้ศึกษาการใช้ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน คือ เบนซิลอะดีนีน (6-benzyladenine:BA) และไคเนติน (6-furfurylaminopurine: Kinetin) ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อศึกษาการเกิดยอดและใบของกัญชาในสภาพปลอดเชื้อ ประกอบด้วย 6 หน่วยทดลอง ได้แก่ อาหารแข็งสูตร MS (MS control) เป็นปัจจัยควบคุม อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+kinetin 1.5 mg/l) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+BA 0.25 mg/l) และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมกับ kinetin 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 0.5 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1.5 mg/l) จำนวน 50 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) บันทึกผลเมื่อกัญชามีอายุครบ 8 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าจำนวนยอดที่เกิดใหม่ และจำนวนใบ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดย MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 0.5 mg/l มีการเกิดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 7.56 ยอดต่อต้น และมีการเกิดใบใหม่เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 12.64 ใบต่อต้น ดังนั้นสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางการผลิตกัญชาในสภาพปลอดเชื้อต่อไปได้

คำสำคัญ: ไซโตไคนิน เบนซิลอะดีนีน ไคเนติน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กัญชา

Abstract

Cannabis is an herbaceous plant that is accepted for medical use because it can recover in various conditions. This makes the cannabis to be trend for higher demand. Tissue culture is an efficient cultivation, but the appropriate hormone to promote the growth of explant is different response in each plant. Cytokinin is a plant hormone which is important to induct the new shoot. This experiment aimed to study the effect of cytokinins that were BA and Kinetin in different ratio on MS media to induct the shoot and leaves *in vitro.* This experiment worked for 6 treatments such as only MS (control), MS + 1.5 mg/l Kinetin, MS + 0.25 mg/l BA + 0.5 mg/l Kinetin, MS + 0.25 mg/l BA + 1 mg/l Kintein, and MS + 0.25 mg/l BA + 1.5 mg/l Kinetin. These had total 50 repetitions. The experiment was designed in completely randomized design (CRD). The data were collected on 8th week of shoot and leaves. The result showed that MS + 0.25 mg/l BA + 0.5 mg/l Kinetin had the highest shoot and leaves induction (7.56 shoots/plant and 12.63 leaves/plant, respectively). Therefore, this information can be used for a basic and a guideline for cannabis production in vitro forwardly.

Keywords: Cytokinins, Benzyladenine, Kinetin, Tissue culture, Cannabis

บทนำ

กัญชาเป็นพืชที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับวิถีชีวิตมนุษย์ในแง่ของการใช้ประโยชน์จากส่วนต่าง ๆ ของต้นกัญชามาเป็นเวลานาน โดยมีการใช้ประโยชน์จากกัญชามายาวนานกว่า 4,000 ปี เช่น เป็นอาหารคนหรือสัตว์ ใช้เป็นสิ่งเสพติดเพื่อการผ่อนคลาย หรือใช้ทำอุปกรณ์ต่าง ๆ เช่น เชือกหรือเสื้อผ้า เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำกัญชามาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์อย่างต่อเนื่อง (ระพีพงศ์ สุพรรณไชยมาตย์ และ โชษิตา ภาวสุทธิไพศิฐ, 2561) กัญชา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. จัดเป็นพืชในวงศ์ Cannabaceae เป็นพืชล้มลุกอายุปีเดียว ดอกแยกเพศต่างต้น (deoecious) แต่อาจพบที่เป็นแบบดอกแยกเพศร่วมต้น (monoecious) ได้ กัญชาพบอยู่ในเขตภูมิอากาศอบอุ่นในหลายทวีปทั่วโลก เช่น เอเชีย อเมริกาใต้ และตะวันออกกลาง กัญชาจัดเป็นพืชล้มลุกและมีอายุเพียงปีเดียว สามารถเจริญเติบโตจนมีความสูงได้ประมาณ 1 - 3 เมตร ลักษณะลำต้นมีขนาดเล็ก ตั้งตรง เป็นเหลี่ยม หลังจากออกดอกแล้วจะหยุดการเจริญเติบโตทางลำต้น (ชยันต์ พิเชียรสุนทร, 2561) การขยายพันธุ์กัญชาแบบใช้เมล็ดได้สนับสนุนความต้องการของภาคการเกษตรและส่งเสริมการพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ แต่ด้วยแนวปฏิบัติด้านพืชสวนสมัยใหม่สำหรับอุตสาหกรรมกัญชา วิธีการตัดชิ้นส่วนจากต้นหรือการโคลนนิ่งแบบดั้งเดิมและการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของพืชที่มีมูลค่าสูง ได้กลายเป็น

แนวทางปฏิบัติกันโดยทั่วไป โดยการขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนต่าง ๆ จากลำต้น มีจุดประสงค์เพื่อรักษาความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมและลักษณะที่เหมือนกัน โดยการโคลนนิ่งแบบดั้งเดิมเป็นการตัดก้านจากต้นแม่พันธุ์ที่แข็งแรงและการเตรียมสภาพแวดล้อมเพื่อการทำรากสำหรับต้นโคลนที่เพิ่งตัดใหม่ (Adhikary et al., 2021) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อ คือการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์และควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสงและความชื้น ชิ้นส่วนเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาได้หลายรูปแบบ เช่น สามารถพัฒนาเป็นแคลลัส (callus formation) แล้วพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ หรือชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงพัฒนาเป็นอวัยวะ (organogenesis) จากนั้นจึงพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์หรือมีการพัฒนาเป็นคัพภะ ก่อนแล้วพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อเมื่อตัดแบ่งเป็นชิ้นๆ แล้วทำการเปลี่ยนอาหาร เนื้อเยื้อดังกล่าวยังคงมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด สุดท้ายจะได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนกันจำนวนมาก (อรดี สหวัชรินทร์, 2539) ด้วยความนิยมและประโยชน์ที่แพร่หลายของกัญชา ทำให้กัญชาเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในภูมิภาคต่างๆทั่วโลก สำหรับประเทศไทยนั้นเป็นชาติแรกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีการอนุญาตให้ศึกษาและวิจัยกัญชาเพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ จากการแก้ไขเพิ่มเติมพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ซึ่งมีผลให้สามารถนำกัญชาไปทำการศึกษาวิจัยเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ได้ เนื่องจากกัญชาเป็นพืชที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ (อารีญา กฤดาตระกูล, 2561) ซึ่งในปัจจุบันใช้ประมวลกฎหมายยาเสพติด พ.ศ. ๒๕๖๔ ได้ยกเลิกพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ.๒๕๒๒ แล้วแต่ก็สามารถนำกัญชาไปทำการศึกษาวิจัยเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ได้ (กฎกระทรวง เรื่อง การขออนุญาตและการอนุญาตฯ, 2564) การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกัญชาจึงมีความสำคัญต่อวงการการแพทย์เป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะการศึกษาสาระสำคัญที่มีอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของต้นกัญชา ยกตัวอย่างเช่น ดอก ใบ โดยสารสำคัญที่พบในกัญชาและเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย ได้แก่ delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) (ระพีพงศ์ สุพรรณไชยมาตย์ และโชษิตา ภาวสุทธิไพศิฐ, 2561) สารออกฤทธิ์สำคัญ delta-9-tetra-hydrocannabinol (THC) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อจิตประสาท และสาร cannabidiol (CBD) ที่ไม่มีฤทธิ์ต่อจิตประสาท กัญชาไทยจะมี THC มากกว่า CBD โดยจากการวิเคราะห์ใบกัญชาแห้งสายพันธุ์ไทยมีปริมาณ THC โดยเฉลี่ยเท่ากับ 1–2 มิลลิกรัม/ใบ ส่วนใบกัญชาใบสดจะมี THCA ที่ไม่มีฤทธิ์เมาเป็นส่วนใหญ่แต่เมื่อถูกแสงหรือความร้อนจะทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงจาก THCA เป็น THC สารสำคัญดังกล่าว ถูกใช้เพื่อรักษาในหลากหลายอาการ สามารถช่วยเยียวยาและบรรเทาความเจ็บป่วยหรือความผิดปกติทางร่างกายและจิตใจ เช่น อาการเจ็บปวด โรคความดันในลูกตา ต้อหิน อาการคลื่นไส้ โรคหอบหืด โรคซึมเศร้า โรคนอนไม่หลับ และโรคเกี่ยวกับเส้นประสาท เป็นต้น (Adhikary et al., 2021)

อาหารเพาะสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นสิ่งสำคัญ โดยสูตรอาหารที่นิยมใช้กันคือ MS (Murashige and Skoog) โดยมีส่วนช่วยในการงอกของส่วนต่าง ๆ และการฟื้นฟูต้นเป็นอย่างดี เนื่องจากมีระดับไนโตรเจนที่สูงทั้งในรูปของไนเตรตและในรูปของแอมโมเนียมที่มีอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนเตรตค่อนข้างสูง (Phillips & Garda, 2019) สารในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยธาตุอาหาร

หลักและธาตุอาหารรองที่จำเป็นทั้งหมดที่พืชต้องการ เช่น วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) และคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีสารอินทรีย์อื่น ๆ เป็นสารเติมแต่งเสริม (Shahzad et al., 2017) หนึ่งในสารสำคัญที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือฮอร์โมน ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สังเคราะห์ได้ตามธรรมชาติในพืชชั้นสูงและสังเคราะห์ขึ้นโดยมนุษย์ มีความสำคัญคือมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช และเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างหรือสังเคราะห์ขึ้น รวมถึงฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นหรือยับยั้งหรือเปลี่ยนแปลงกระบวนทางชีววิทยาของพืช โดยมีส่วนร่วมในกระบวนการพัฒนาของต้นพืชให้เป็นปกติ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของส่วนเนื้อเยื่อพืชให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์จำเป็นต้องได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ครบถ้วน สารควบคุมการเจริญเติบโต แบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน เอทิลีน และสารปลดปล่อยเอทิลีน (พีรเดช ทองอำไพ, 2537) ไซโตไคนินถูกสังเคราะห์ขึ้นที่บริเวณปลายรากและจะถูกส่งไปที่บริเวณยอดพืช ในแง่ของคุณสมบัติ ไซโตไคนินมีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์ ควบคุมการสร้างอวัยวะ และกระตุ้นการแตกตาข้าง โดยช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว และเร่งให้เนื้อเยื่อพืชเจริญไปเป็นยอดและต้น จึงมีประโยชน์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินที่พบในพืชได้แก่ zeatin ส่วนชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมนุษย์ได้แก่ BA และ Kinetin เป็นต้น (Phillips and Garda, 2019) ดังนั้นการศึกษาทดลองครั้งนี้เพื่อหาปริมาณการใช้ BA และ Kinetin ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาต่อเกิดยอดและใบของกัญชาในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางในการใช้สารกลุ่มไซโตไคนินในการควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมบนอาหารสูตร MS สำหรับการผลิตต้นกัญชาด้วยวิธีการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมการทดลอง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดต้นกัญชา ใช้อาหารสูตร MS ผสมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช กลุ่ม Cytokinin ชนิด 6-benzyladenine (BA) กับ 6-furfurylaminopurine (kinetin) โดยมีส่วนผสมของ Murashige & Skoog basal medium with vitamins M519 หรือ (MS) 2.21 กรัม น้ำตาลทราย 15 กรัม และผงวุ้น 3.5 กรัม ต่อน้ำ 500 มิลลิลิตร คนให้ MS สำเร็จรูปกับน้ำตาลทรายละลายเข้ากันแล้วนำไปปรับค่า pH เป็น 5.8 หลังจากนั้นนำมาต้มให้เดือดแล้วจึงใส่ผงวุ้นแล้วคนต่อจนผงวุ้นละลายใส นำไปเติม BA และ kinetin ตามหน่วยทดลองต่าง ๆ ทิ้งไว้ให้หายเดือดแล้วตักใส่ขวดแก้วขวดละ 20 มิลลิลิตรต่อขวด ปิดฝาแล้วนำไปเข้าตู้นึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำร้อนแรงดันสูง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำเป็น 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

การเตรียมพืชทดลอง เก็บตัวอย่างต้นกัญชาจากสถานีทดลองกัญชาทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต โดยการตัดยอดบนสุดที่มีตาข้างจำนวน 4 ตาข้างและมีความยาวของแต่ละยอดขนาด

3 – 4 เซนติเมตร จากต้นกัญชาที่มีอายุประมาณ 1 เดือน เลือกต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์และแข็งแรง จำนวน 300 ยอด มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นผสมกับ Haiter® จำนวน 2 รอบ คือ น้ำกลั่นผสมกับ Haiter® ที่ความเข้มข้น 10% นาน 15 นาที และน้ำกลั่นผสมกับ Haiter® ที่ความเข้มข้น 5% นาน15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้ออีก นาน 15 นาที หลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อยอดต้นกัญชา นำยอดต้นกัญชามาเพาะเลี้ยงในขวดแก้วที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MS ตามหน่วยทดลองต่าง ๆ จำนวน 1 ยอดต่อ 1 ขวด หลังจากนั้นนำไปวางบนชั้นในห้องปรับสภาพที่อุณหภูมิ 25 - 27 องศาเซลเซียส และเปิดไฟ LED สีขาว 18 วัตต์ ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นระยะเวลา16 ชั่วโมงต่อวัน

2. การวางแผนและการบันทึกผลการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) ดัดแปลงตามวิธีการของ Pierik et al. (1979) โดยใช้ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA และ kinetin ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อศึกษาการเกิดยอดและใบของกัญชาในสภาพปลอดเชื้อ ประกอบด้วย 6 หน่วยทดลอง ได้แก่ อาหารแข็งสูตร MS (MS control) เป็นปัจจัยควบคุม อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+kinetin 1.5 mg/l) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+BA 0.25 mg/l) และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมกับ kinetin 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 0.5 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1.5 mg/l) จำนวนหน่วยทดลองละ 50 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด หลังจากที่ยอดต้นกัญชามีการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ บันทึกผลการทดลองจำนวนยอด/ต้น และจำนวนใบ/ต้นเมื่อกัญชามีอายุครบ 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan’s multiple range test

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาทดลองการใช้ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน คือ BAและkinetinในอัตราส่วนที่แตกต่างกันบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อศึกษาการเกิดยอดและใบของกัญชาในสภาพปลอดเชื้อ จำนวน 6 หน่วยทดลอง ได้แก่ อาหารแข็งสูตร MS (MS control) เป็นปัจจัยควบคุม อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+kinetin 1.5 mg/l) อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+BA 0.25 mg/l) และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมกับ kinetin 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 0.5 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1.5 mg/l) บันทึกผลการทดลองจำนวนยอดและจำนวนใบเมื่อกัญชามีอายุครบ 8 สัปดาห์ พบว่า จำนวนยอดของกัญชาที่เกิดใหม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาบนอาหารแข็งสูตร MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 0.5 mg/l มีจำนวนยอดมากที่สุดเท่ากับ 7.56 ยอด/ต้น รองลงมาได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาอาหารแข็งสูตร MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin

1.5 mg/l, MS+kinetin 1.5 mg/l และ MS+BA 0.25 mg/l โดยมีค่าเท่ากับ 5.82, 5.76, 5.58 และ 5.54 ยอด/ต้น ตามลำดับ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาบนอาหารแข็งสูตร MS control มีจำนวนยอดน้อยที่สุดเท่ากับ 4.06 ยอด/ต้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนยอดและจำนวนใบใหม่ของกัญชาที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ ของแต่ละความเข้มข้นเมื่อกัญชามีอายุครบ 8 สัปดาห์

Treatment	No. of shoots (shoots/plant)	No. of leaves (leaves/plant)
MS control	4.06 ± 1.99 c1/	6.54 ± 2.79 c1/
MS+kinetin 1.5 mg/l	5.58 ± 3.18 bc	8.68 ± 5.65 bc
MS+BA 0.25 mg/l	5.54 ± 2.47 bc	8.64 ± 5.35 bc
MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 0.5 mg/l	7.56 ± 4.00 a	12.64 ± 6.34 a
MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1 mg/l	5.82 ± 2.46 b	9.66 ± 5.46 b
MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1.5 mg/l	5.76 ± 3.22 b	9.32 ± 4.75 bc
F-test	**	**
C.V. (%)	15.77	16.02

หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าทางสถิติ
** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์
MS control = อาหารแข็งสูตร MS (ปัจจัยควบคุม),
MS+kinetin 1.5 mg/l = อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
MS+BA 0.25 mg/l = อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 0.5 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin
1.5 mg/l = อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรผสมกับ kinetin 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนจำนวนใบของกัญชาที่เกิดใหม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาบนอาหารแข็งสูตร MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 0.5 mg/l มีจำนวนใบมากที่สุดเท่ากับ 12.64 ใบ/ต้น รองลงมาได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาอาหารแข็งสูตร MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1 mg/l, MS+BA 0.25 mg/l + kinetin 1.5 mg/l, MS+kinetin 1.5 mg/l และ MS+BA 0.25 mg/l โดยมีค่าเท่ากับ 9.66, 9.32, 8.68 และ 8.64 ใบ/ต้น ตามลำดับ และการเพาะ

เลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาบนอาหารแข็งสูตร MS (ปัจจัยควบคุม) มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 6.54 ใบ/ต้น (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ BA ต่อการชักนำการเกิดยอดกัญชากับ MS control พบว่า BA มีประสิทธิภาพในการชักนำการเกิดยอดกัญชาใหม่ได้ สอดคล้องกับงานทดลองของ Movahedi et al. (2015) ซึ่งทดลองกระตุ้นการเกิดยอดจากแคลลัสของกัญชาพบว่าอาหาร MS ที่เติม IBA ร่วมกับ BA กระตุ้นให้แคลลัสของกัญชาเกิดยอดได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร MS ที่เติม IBA ร่วมกับไซโตไคนินชนิดอื่นได้แก่ TDZ ทั้งนี้เนื่องด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินมีบทบาทการแบ่งเซลล์ (Pierik, 1989) พืชจึงได้รับสารกระตุ้นในการเจริญเติบโต ทำให้มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น อีกทั้งสารกลุ่มไซโตไคนิน เป็นสารที่มีบทบาทในการส่งเสริมการขยายขนาดของเซลล์อีกด้วย (Letham, 1974)

สรุปผลและเสนอแนะ

การใช้สารกลุ่มไซโตไคนินต่อการเกิดยอดและใบของกัญชาในสภาพปลอดเชื้อของสูตรอาหาร MS เติม BA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรผสมกับ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 7.56 ยอดต่อต้น และมีการเกิดใบใหม่เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 12.64 ใบต่อต้น ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ดังนั้นสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางการผลิตกัญชาในสภาพปลอดเชื้อต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

กฎกระทรวง เรื่อง การขออนุญาตและการอนุญาตผลิต นำเข้า ส่งออก จำหน่าย หรือมีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท ๕ เฉพาะกัญชา พ.ศ. 2564. (2564, 26 พฤศจิกายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 138. ตอนที่ 79ก. หน้า 1-38.

ชยันต์ พิเชียรสุนทร. (2561). *การวิจัยและพัฒนาสารสกัดกัญชาและกัญชงทางการแพทย์เพื่อการพัฒนาประเทศ* [รายงานผลการวิจัย]. สถาบันวิจัยและพัฒนา, องค์การเภสัชกรรม.

ณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย. (2539). *ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง*[วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต]. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พีรเดช ทองอำไพ. (2537). *ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 4). วิชัยการพิมพ์.

ระพีพงศ์ สุพรรณไชยมาตย์ และโชษิตา ภาวสุทธิไพศิฐ. (2561). ประโยชน์และโทษที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้กัญชาในทางการแพทย์และการเปิดเสรีการใช้กัญชา. *วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข, 12*(1), 71-94. อรดี สหวัชรินทร์. (2539). *เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาซีเยาะห์ คาเรง, นูรียานี ยามา และสุภาวดี รามสูตร. (2557). ประสิทธิภาพของ BA และ NAA ต่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้หางช้างในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 1*(2),19-22.

อารีญา กฤดาตระกูล. (2561). *การศึกษาการใช้พืชกัญชาทางด้านการแพทย์ของสหพันธรัฐรัสเซียและประเทศไทย* [วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต]. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

Adhikary, D., Kulkarni, M., Mezawy, A. E., Mobini, S., Elhiti, M., Gjuric, R., Ray, A., Polowick,P., Slaski, J. J., Jones, M. P., & Bhowmik, P. (2021). Medical Cannabis and Industrial Hemp Tissue Culture: Present Status and Future Potential. *Frontiers in Plant Science, 12,* 1-22.

Letham, D. S. (1974). Regulators of cell division in plant tissues. *Planta, 118*(4), 361–364.

Movahedi, M., Ghasemi-Omran, V., & Torabi, S. (2015). The effect of different concentrations of TDZ and BA on in vitro regeneration of Iranian cannabis *(Cannabis sativa)* using cotyledon and epicotyl explants. *Journal of Plant Molecular Breeding, 3*(2), 20-27.

Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 55*(3), 242–257.

Pierik, R. L. M. (1989). In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers.

Pierik, R. L. M., Leeuwen, P. V.,& Rigter, G. C. C. M. (1979). Regeneration of leaf explants of *Anthurium andraeanum Lind. in vitro. Netherlands Journal of Agricultural Science, 27*(3), 221–226.

Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R., Yadav, V., Upadhyay, A., & Ahmad, Z. (2017). Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. *Plant Biotechnology: Principles and Applications, 5*(1), 1-36.