การขยายพันธุ์กัญชงโดยการเพาะเนื้อเยื่อเพื่อรองรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ภาณุภรณ์ วงค์ฉายา

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
เมษายน 2568
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การขยายพันธุ์กัญชงโดยการเพาะเนื้อเยื่อเพื่อรองรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ภาณุภรณ์ วงค์ฉายา

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
เมษายน 2568
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

MICROPROPAGATION OF HEMP (*CANNABIS SATIVA* L.) BY TISSUE CULTURE TO SUPPORT INDUSTRIAL PRODUCTION

PANUPHON WONGCHAYA

A Thesis Submitted to University of Phayao
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Science Degree in Biotechnology
April 2025

Copyright 2025 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การขยายพันธุ์กัญชงโดยการเพาะเนื้อเยื่อเพื่อรองรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ของ ภาณุภรณ์ วงค์ฉายา

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

---------- ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์)

---------- ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภัค มหัทธนพรรค)

---------- อาจารย์บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยพะเยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร)

---------- คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก)

เรื่อง: การขยายพันธุ์กัญชงโดยการเพาะเนื้อเยื่อเพื่อรองรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม
ผู้วิจัย: ภาณุภรณ์ วงค์ฉายา, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2567
อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. สุภัค มหัทธนพรรค
คำสำคัญ: กัญชง, การเพิ่มจำนวนยอด, ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว, การปรับสภาพต้นกล้า, การชักนำราก

บทคัดย่อ

กัญชง (*Cannabis sativa* L.) เป็นพืชที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ เนื่องจากมีสารสำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสำคัญอย่าง cannabidiol (CBD) ที่มีมูลค่าสูง ส่งผลให้ปัจจุบันมีการผลิตในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็วจึงเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่ง ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาวิธีการขยายพันธุ์กัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel ซึ่งมีปริมาณ CBD สูงโดยใช้ส่วนตาข้างผ่านวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวตาข้างด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 10 นาที พบว่า มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์น้อยที่สุด (6.67%) ภายในระยะเวลา 7 วัน นอกจากนี้ ส่วนของตาข้างมีการตอบสนองดีที่สุดต่อสูตรอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติมด้วย TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L สูตรอาหารนี้ส่งผลให้มีอัตราการเพิ่มจำนวนยอด 100% จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 4.7±1.57 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และความสูงเฉลี่ยของยอดคือ 2.30±0.42 cm ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นศึกษาสภาวะในการเพิ่มปริมาณต้นกัญชงในไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว พบว่า อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.05 mg/L และให้อาหารทุก 8 ชั่วโมงต่อวัน สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยกัญชงได้ 66.33±2.08 ยอดต่อคู่ขวด และส่งผลให้มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.33±0.31 cm ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ และหลังจากการกระตุ้นการยืดตัวของยอดจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน (ระบบอาหารกึ่งแข็งและระบบ TIB) พบว่า ความสูงเฉลี่ยของยอดทั้ง 2 ระบบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) ในอาหารสูตร MS ที่ผสมด้วยผงถ่าน จากนั้นจุ่มต้นกล้ากัญชงลงในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 1,000 mg/L ที่ผสมกับผงทัลคัมก่อนการย้ายปลูกลงบนวัสดุปลูกที่ประกอบด้วยพีทมอสและขุยมะพร้าวอัตราส่วน 1:1 พบว่า ส่งผลให้มีอัตราการเกิดราก 100% โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนรากเท่ากับ 5.6±1.94 รากต่อต้น ค่าเฉลี่ยความยาวรากเท่ากับ 5.78±1.96 cm และค่าเฉลี่ยความสูงของต้นเท่ากับ 4.32±1.52 cm หลังจากย้ายอนุบาลต้นกัญชงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ลักษณะต้นและปริมาณสาร CBD ของต้นกัญชงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและกิ่งชำไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) การเพิ่มปริมาณต้นกัญชงด้วยการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB สามารถผลิตต้นกัญชงได้มากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารกึ่งแข็ง 4.98 เท่า และสามารถผลิตต้นกัญชงได้มากกว่าวิธีปักชำกิ่ง 194.40 เท่า

Title: MICROPROPAGATION OF HEMP (*CANNABIS SATIVA* L.) BY TISSUE CULTURE TO SUPPORT INDUSTRIAL PRODUCTION

Author: Panuphon Wongchaya, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2024

Advisor: Associate Professor Dr. SUPUK MAHADTANAPUK

Keywords: Hemp, Shoot multiplication, Temporary immersion bioreactor, Acclimatization, Root induction

ABSTRACT

Hemp (*Cannabis sativa* L.) is a plant with several medicinal properties as a result of its numerous bioactive compounds, particularly cannabidiol (CBD), which is highly valued. This attraction has led to the current commercial production of the plant. Therefore, it is of the utmost importance to propagate it in large quantities, free of diseases, and rapidly. Thus, this study aims to establish a protocol for the exponential micropropagation of the high CBD hemp variety Charlotte's Angel by nodal segment via the tissue culture method. Initially, with 10-minute surface sterilization with 0.1% $HgCl_2$, the microbial contamination rate was reduced to its lowest level (6.67%) within 7 days. Additionally, the nodal segments exhibited optimal response to MS media supplemented with 0.5 mg/L TDZ, resulting in a 100% shoot multiplication rate. The average number of shoots per explant was 4.7±1.57, and the average shoot height was 2.30±0.42 cm at 4 weeks. Subsequently, the conditions for increasing the number of hemps in a temporary immersion bioreactor were investigated. The MS liquid medium supplemented with 0.05 mg/L TDZ and fed every 8 hours per day could increase the average number of shoots to 66.33±2.08 shoots per pair of bottles, resulting in an average height of 2.33±0.31 cm at 4 weeks. The average height of shoots in both systems (semi-solid medium and bioreactor system) did not differ statistically ($p<0.05$) in the MS medium supplemented with charcoal after the induction of shoot elongation from different culture systems. Subsequently, dip the hemp seedlings in a 1,000 mg/L IBA solution combined with talcum powder prior to transplanting them onto a growth medium composed of peat moss and coconut coir in a 1:1 ratio. The cultivation resulted in a 100% rooting rate, with an average of 5.6±1.94 roots/explant, an average root length of 5.78±1.96 cm, and an average explant height of 4.32±1.52 cm. Following a 12-week acclimatization of hemp seedlings, it was determined that the traits of the plants and the CBD content in hemp derived from tissue culture and cuttings exhibited no statistically significant differences ($p<0.05$). The TIB system propagation can produce hemp plants 4.98 times more than the semi-solid medium protocol and 194.40 times more than the stem cutting propagation.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจากทุกท่านที่ให้ความกรุณาอย่างสูงในการชี้แนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้าที่เป็นประโยชน์ไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) รหัสโครงการ N23G660004 และบริษัท รุ่งเรืองกัญพาณิชย์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างต้นกัญชงในการทดลองและสนับสนุนทุนบัณฑิตศึกษาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุภัค มหัทธนพรรค อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำ ทั้งด้านการศึกษาตลอดจนการตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเป็นกรรมการสอบที่กรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์และตรวจสอบคุณภาพมาตรฐานผลิตภัณฑ์ทุกท่านที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ใช้สถานที่และเครื่องมือในการค้นคว้าวิจัยจนเกิดวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าของงานวิจัยทุกฉบับที่ข้าพเจ้านำมาใช้ในการประกอบและอ้างอิงในครั้งนี้เป็นอย่างสูง

ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีมาตลอดจนประสบความสำเร็จจนถึงทุกวันนี้ และบุคคลที่ข้าพเจ้ารักที่คอยให้การสนับสนุนช่วยเหลือและให้กำลังใจจนผ่านพ้นอุปสรรค

ภาณุภรณ์ วงค์ฉายา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

ประวัติความเป็นมาโดยย่อ 4

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกัญชง 4

พันธุ์กัญชงในประเทศไทยและต่างประเทศ 6

การใช้ประโยชน์จากกัญชงในปัจจุบัน 8

1. ด้านสิ่งทอ 8

2. ด้านการแพทย์ 8

3. ด้านอาหารมนุษย์ 9

4. ด้านอาหารสัตว์ 9

5. ด้านการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม 10

6. ด้านวัสดุก่อสร้าง 10
7. ด้านการผลิตพลังงานชีวภาพ 10
การเพาะปลูกกัญชงเชิงพาณิชย์ 11
โรคพืชในกัญชง 13
เทคโนโลยีการขยายพันธุ์กัญชงปลอดโรค 15
การขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) 15
ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor; TIB) 16
สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (Plant growth regulators; PGRs) 19
ไทเดียซูรอน (Thidiazuron; TDZ) 20
กรดอินโดล-3-บิวทิริก (Indole 3-butyric acid; IBA) 22
การชักนำให้เกิดราก (Root induction) 22
การปรับสภาพต้นกล้า (Acclimatization) 23
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review) 24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 28
เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี 28
พืชที่ใช้ในการทดสอบ 30
ขั้นตอนและวิธีการวิจัย 30
การทดลองที่ 1 การศึกษาเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวชิ้นส่วนกัญชง 30
การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด 31
การทดลองที่ 3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor; TIB) 31
การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการยืดยาวของยอดกัญชงที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยระบบเพาะเลี้ยงต่างกัน 32
การทดลองที่ 5 การศึกษาความเข้มข้นของ IBA ที่กระตุ้นการเกิดรากและการย้ายอนุบาลต้นกัญชง 32

การวิเคราะห์ทางสถิติ 33
บทที่ 4 ผลการวิจัย 34
การทดลองที่ 1 การศึกษาเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวชิ้นส่วนกัญชง.....34
การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด 36
การทดลองที่ 3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor; TIB).....40
การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการยืดยาวของยอดกัญชงที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยระบบเพาะเลี้ยงต่างกัน 47
การทดลองที่ 5 การเปรียบเทียบสารกระตุ้นการเกิดรากและการย้ายอนุบาลต้นกัญชง.....49
การคิดต้นทุนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน 57
บทที่ 5 บทสรุป 64
สรุปผลการวิจัย 64
อภิปรายผลการวิจัย 65
บรรณานุกรม 71
ภาคผนวก 84
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 85
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลาย 87
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ.....88
ประวัติผู้วิจัย 108

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 พันธุ์กัญชงที่ได้รับการขึ้นทะเบียนพันธุ์ต่อกรมวิชาการเกษตรในประเทศไทย 7
ตารางที่ 2 ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนพืชหลังการฟอกฆ่าเชื้อ 35
ตารางที่ 3 จำนวนยอดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกัญชงบนแต่ละสูตรอาหารในแต่ละสัปดาห์ 37
ตารางที่ 4 ความสูงเฉลี่ยของกัญชงบนแต่ละสูตรอาหารในสัปดาห์ที่ 4 38
ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกัญชงบนอาหารกึ่งแข็ง 38
ตารางที่ 6 จำนวนยอดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกัญชงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวที่ระยะเวลาสัปดาห์ที่ 4 43
ตารางที่ 7 ความสูงเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกัญชงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวที่ระยะเวลาสัปดาห์ที่ 4 45
ตารางที่ 8 ความสูงเฉลี่ยของเนื้อเยื่อกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันที่ 4 สัปดาห์ 47
ตารางที่ 9 ผลความเข้มข้นต่าง ๆ ของ IBA หลังจากการชักนำรากที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ 51
ตารางที่ 10 จำนวนช่อดอกเฉลี่ยและปริมาณสาร CBD จากต้นกัญชงที่มาจากระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 54
ตารางที่ 11 ต้นทุนสารเคมีในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยพะเยา 59
ตารางที่ 12 ค่าใช้จ่ายภาชนะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยพะเยา 61
ตารางที่ 13 ระยะเวลาในการทำปฏิบัติหน้าที่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยพะเยา 61
ตารางที่ 14 ต้นทุนค่าใช้จ่ายโรงงานที่เกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชง มหาวิทยาลัยพะเยาปี 2567 62
ตารางที่ 15 ต้นทุนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงบนอาหารกึ่งแข็งเทียบกับอาหารเหลวในระบบ TIB ของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของมหาวิทยาลัยพะเยา 63

ตารางที่ 16 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog.....85
ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนพืชหลังการฟอกฆ่าเชื้อ.....88
ตารางที่ 18 การวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชหลังการฟอกฆ่าเชื้อ.....89
ตารางที่ 19 การวิเคราะห์จำนวนยอดเฉลี่ยของกัญชงบนแต่ละสูตรอาหารกึ่งแข็งในสัปดาห์ที่ 4.....91
ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ความสูงเฉลี่ยของกัญชงบนแต่ละสูตรอาหารกึ่งแข็งในสัปดาห์ที่ 4 92
ตารางที่ 21 การวิเคราะห์จำนวนยอดเฉลี่ยของกัญชงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว 93
ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความสูงเฉลี่ยของกัญชงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวในสัปดาห์ที่ 4 96
ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ค่าความสูงเฉลี่ยของเนื้อเยื่อกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันที่ 4 สัปดาห์.....99
ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ผลความเข้มข้นต่าง ๆ ของ IBA หลังจากการชักนำรากที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 100
ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ผลของจำนวนช่อดอกเฉลี่ยและปริมาณสาร CBD จากต้นกัญชงที่มาจากระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 103
ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ผลของจำนวนช่อดอกกัญชงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบที่ต่างกัน 103
ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ผลของปริมาณสาร CBD จากต้นกัญชงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบที่ต่างกัน 104
ตารางที่ 28 การวิเคราะห์ผลของลักษณะต้นกัญชงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบที่ต่างกัน..... 105

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะต้นกัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel อายุ 1 เดือน 6

ภาพที่ 2 ลักษณะไตรโคมของกัญชง 12

ภาพที่ 3 อาการของโรคในกัญชงอุตสาหกรรม 14

ภาพที่ 4 หลักการทำงานของไบโอรีแอคเตอร์แบบระบบภาชนะ 2 ชั้น 17

ภาพที่ 5 หลักการทำงานของไบโอรีแอคเตอร์แบบระบบขวดแผด 18

ภาพที่ 6 โครงสร้างโมเลกุลของ TDZ 21

ภาพที่ 7 โครงสร้างโมเลกุลของ IBA 22

ภาพที่ 8 ชิ้นตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 34

ภาพที่ 9 การปนเปื้อนจากเชื้อราของเนื้อเยื่อกัญชงส่วนช่อดอกและตาข้างในขวดเพาะเลี้ยง 35

ภาพที่ 10 การนับจำนวนยอดของเนื้อเยื่อกัญชงในการทดลอง 36

ภาพที่ 11 การสร้างยอดของกัญชงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่างกัน 39

ภาพที่ 12 ลักษณะเนื้อเยื่อกัญชงบนอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L 40

ภาพที่ 13 อุปกรณ์ที่ใช้ในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว 41

ภาพที่ 14 การวัดความสูงของเนื้อเยื่อกัญชงในการทดลอง 42

ภาพที่ 15 ลักษณะเนื้อเยื่อกัญชงเริ่มต้น 42

ภาพที่ 16 ลักษณะเนื้อเยื่อกัญชงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.05 mg/L เพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว 46

ภาพที่ 17 เนื้อเยื่อกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน 48

ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อที่มีการยืดยาวก่อนชุบสารละลาย IBA ผสมผงทัลคัม 49

ภาพที่ 19 การนับจำนวนราก และความยาวรากของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการทดลอง 50

ภาพที่ 20 ลักษณะรากของต้นกัญชงหลังจากจุ่มสารละลาย IBA ความเข้มข้นที่ต่างกัน 50

ภาพที่ 21 ลักษณะต้นกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน.....52
ภาพที่ 22 ลักษณะช่อดอกของต้นกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน.....53
ภาพที่ 23 ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนกิ่งเฉลี่ย และความกว้างของทรงพุ่มเฉลี่ย.....55
ภาพที่ 24 จำนวนต้นกัญชงที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ระบบ TIB และการปักชำกิ่งภายใน 28 สัปดาห์.....56

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศแรกในอาเซียนที่ประกาศให้ใช้กัญชา (Cannabis; *Cannabis sativa* L. subsp. indica) ในทางการแพทย์และสามารถทำวิจัยได้ และประกาศให้กัญชง (Hemp; *Cannabis sativa* L. subsp. sativa) เป็นอุตสาหกรรม (พิพัฒน์ นนทนาธรณ์, 2564) เนื่องจากกัญชงมีปริมาณ THC ต่ำ (ไม่เกินร้อยละ 1.0 ต่อน้ำหนักแห้ง) และมีเส้นใยสูง จึงมีการส่งเสริมให้เป็นพืชเศรษฐกิจของไทยในการผลิตเป็นยาสมุนไพรเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ เช่น *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (ประสาทพร สมิตะมาน และคณะ, 2566) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตเส้นใยกัญชงเชิงอุตสาหกรรมสิ่งทอชุมชนกลุ่มชาติพันธุ์ม้ง (กรองทอง สุดประเสริฐ, 2552; วิมลศิริ ชาวไพร และคณะ, 2562; สุทิน เรืองปานกัน และคณะ, 2565; อรุณวรรณ ตั้งจันทร และคณะ, 2556) มีการพัฒนากัญชงเป็นวัตถุดิบอาหารสำหรับการผลิตอาหารสัตว์ เช่น เลี้ยงไก่ไข่สู่การผลิตไข่ไก่เพื่อสุขภาพในอนาคต (มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี และพิชญา ฉ่ำชื่น, 2562) จากการศึกษา พบว่า กัญชงและกัญชาประกอบด้วยสารสำคัญซึ่งมีมากกว่า 500 ชนิด แบ่งเป็นแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids), เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) (พิพัฒน์ นนทนาธรณ์, 2564) แต่สารที่มีการกล่าวถึงเป็นจำนวนมากจะเป็นสารกลุ่ม Cannabinoids คือ Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) จากสารสำคัญนี้ทำให้มูลค่าตลาดของอุตสาหกรรมกัญชาและกัญชงในประเทศไทยปี 2565 มีมูลค่าสูงถึง 28,055 ล้านบาท โดยแบ่งเป็นผลิตภัณฑ์ต้นน้ำ (ช่อดอกแห้ง ใบแห้ง เมล็ด และส่วนอื่น ๆ) มีมูลค่าตลาด 9,615 ล้านบาท ผลิตภัณฑ์กลางน้ำ (สารสกัดเข้มข้น น้ำมันกัญชาและกัญชง และเส้นใยกัญชง) มีมูลค่าตลาดมากที่สุดถึง 14,690 ล้านบาท และผลิตภัณฑ์ปลายน้ำ (ยารักษาโรคและอาหารเสริม อาหารและเครื่องดื่ม เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลส่วนบุคคล และเครื่องนุ่งห่มและของใช้ส่วนตัว) มีมูลค่าตลาด 3,750 ล้านบาท และคาดการณ์ว่ามูลค่าตลาดของกัญชาและกัญชง ณ ปี 2568 นี้ จะมีมูลค่ามากถึง 42,851 ล้านบาท (ศูนย์พยากรณ์เศรษฐกิจและธุรกิจ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, 2565)

จากมูลค่าทางการตลาดที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นส่งผลให้กัญชงและกัญชานับเป็นพืชเศรษฐกิจใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจ แต่ทั้งนี้ในการผลิตกัญชงในระดับอุตสาหกรรมยังมีปัญหาที่ต้องเร่งวิจัยพัฒนา เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูง จำนวนผลผลิตมาก และมีสารสำคัญปริมาณสูง โดยจะต้องหากระบวนการปลูกที่ทำให้มีการสูญเสียน้อยที่สุดตั้งแต่ต้นทางการผลิต เนื่องจากกัญชงที่ภาคอุตสาหกรรมปลูกเพื่อจำหน่ายช่อดอกนั้นส่วนใหญ่ใช้เมล็ดหรือการปักชำต้นพันธุ์ และต้องผลิตแบบไม่ใช้สารเคมี ทำให้เกิดโรคศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์หรือท่อนพันธุ์และเสี่ยงต่อความแปรปรวนของพันธุกรรมที่อาจส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญในช่อดอกและโรคพืชยังเป็นสาเหตุความเสียหายในการผลิตในภาคอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) เป็นเทคโนโลยีพื้นฐานนิยมใช้ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากวิธีนี้จะสามารถเพิ่มปริมาณพืชได้มากในระยะเวลาอันสั้นแล้ว พืชยังอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและปลอดเชื้อ แก้ไขปัญหาที่พบในการปลูกพืชแบบธรรมชาติ เช่น ลม ฝน แสงแดด เป็นต้น และในกรณีที่นำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์มีความจำเป็นที่ต้องใช้สารสำคัญในพืชที่ปราศจากสารตกค้าง การใช้เทคนิคการขยายพันธุ์แบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Micropropagation) สามารถเพาะพันธุ์กัญชงที่คัดเลือกต้นแม่พันธุ์ (Mother plant) แล้ว เพื่อลดความแปรปรวนในลักษณะที่ไม่ต้องการและสามารถควบคุมคุณลักษณะที่ต้องการให้คงที่ได้ เนื่องจากการผลิตสารสำคัญในกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชงมีความเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมและการจัดการในการปลูกกัญชง ปัจจุบันได้ค้นพบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor; TIB) เป็นระบบที่สามารถนำไปใช้ได้หลายวัตถุประสงค์ ได้แก่ ชักนำให้เกิดต้นกล้า เพิ่มปริมาณต้น และเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ จึงมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ระบบนี้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป ซึ่งปัจจัยดังกล่าว ได้แก่ ปริมาตรอาหาร ปริมาตรภาชนะ จำนวนชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น ปริมาณอากาศภายในระบบ จำนวนครั้งและระยะเวลาที่ได้รับอาหาร จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืชแต่ละสายพันธุ์ มีรายงานวิจัยที่เทียบกับระบบเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและระบบ TIB พบว่า ระบบ TIB สามารถลดขั้นตอนในการทำงาน รวดเร็ว ลดแรงงานคน ประหยัดพื้นที่ เวลา และต้นทุน ซึ่งข้อดี คือ พืชที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบนี้จะเติบโตได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ได้ต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อ ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ต้นกัญชงด้วยการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อในระบบอาหารกึ่งแข็งและ TIB เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของภาคอุตสาหกรรมในการผลิตกัญชงเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวกัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel โดยสาร Mercuric chloride

2. เพื่อหาความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมในอาหารกึ่งแข็งต่อการชักนำให้เกิดยอดกัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel

3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel ในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว

4. เพื่อเปรียบเทียบการยืดยาวของยอดกัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel จากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน

5. เพื่อหาความเข้มข้นของ IBA ที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เกิดรากและการปักชำในการย้ายอนุบาลต้นพันธุ์กัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel

ขอบเขตของการวิจัย

นำกัญชงพันธุ์ทดสอบที่ได้จากการคัดเลือกของบริษัท รุ่งเรืองกัญพาณิชย์ จำกัด คือ พันธุ์ Charlotte's Angel ซึ่งมีลักษณะของต้นที่ดีนำมาทำการขยายพันธุ์โดยการขยายพันธุ์ในระบบอาหารกึ่งแข็งเพื่อศึกษาความเข้มข้นของ Thidiazuron (TDZ) ที่เหมาะสมและขยายพันธุ์โดยใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตต้นพันธุ์ในปริมาณมาก และศึกษาความเข้มข้นของ IBA เพื่อกระตุ้นการเกิดรากในการย้ายอนุบาลและการปักชำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณกัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel ในอาหารกึ่งแข็ง และสภาวะในการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตในภาคอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติความเป็นมาโดยย่อ

ก่อนคริสตศักราชได้มีบันทึกว่าในประเทศจีนมีการปลูกกัญชงเพื่อเป็นพืชใช้ทำเส้นใย โดยในยุคหินพบรอยพิมพ์เส้นใยกัญชงในเครื่องปั้นดินเผาในประเทศจีนและไต้หวันอายุมากกว่า 10,000 ปี อีกทั้งยังใช้เส้นใยแบบเดียวกันทำเสื้อผ้า รองเท้า เชือก และกระดาษ จนถึงช่วงปลายยุคกลางศตวรรษที่ 14 ในประเทศเยอรมันและอิตาลีถูกใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร โดยเติมในพายและ Tortes หรือต้มในซุป (ธมลวรรณ เนื่องกันทา, 2552) กัญชงเป็นพืชดั้งเดิมที่ขึ้นอยู่ในเขตอบอุ่น มีแหล่งกำเนิดในเอเชียกลางและแพร่กระจายไปสู่เอเชียตะวันออก อินเดีย และทวีปยุโรป แต่ละพื้นที่จะมีการใช้งานแตกต่างกัน ทำให้สายพันธุ์ของแต่ละพื้นที่มีลักษณะเฉพาะที่ต่างกันไป เช่น สายพันธุ์จากอินเดียจะมีระดับของ THC สูง สายพันธุ์จากจากยุโรปจะคัดเลือกเมล็ดที่สามารถใช้เป็นอาหารและน้ำมัน สายพันธุ์จากจีนจะมีเส้นใยที่มีคุณภาพสูงและมีระดับของ THC ต่ำ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกัญชง

กัญชง หรือ Hemp (*Cannabis sativa* L. subsp. sativa) จัดเป็นพืชปีเดียวในตระกูล Cannabidacea เช่นเดียวกับกัญชาหรือ Cannabis (*Cannabis sativa* L. subsp. indica) สามารถใช้ปริมาณสาร THC ในการจำแนกออกจากกันได้ โดยกัญชงต้องมีปริมาณ THC ต่ำกว่า 1.0% ต่อน้ำหนักแห้ง เนื่องจากกัญชงและกัญชามีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันเป็นอย่างมากโดยเฉพาะเมื่อต้นยังมีขนาดเล็ก อย่างไรก็ตาม เมื่อต้นมีการเจริญเติบโตจนเต็มที่จะแสดงลักษณะที่แตกต่างกันออกมาตามสายพันธุ์ (ฝ่ายเภสัชกรรม สถาบันยาเสพติดธัญญารักษ์, 2560; วิจิตร วังใน, 2565) โดยต้นกัญชงพันธุ์ Charlotte’s Angel จะมีลักษณะต้นดังภาพที่ 1

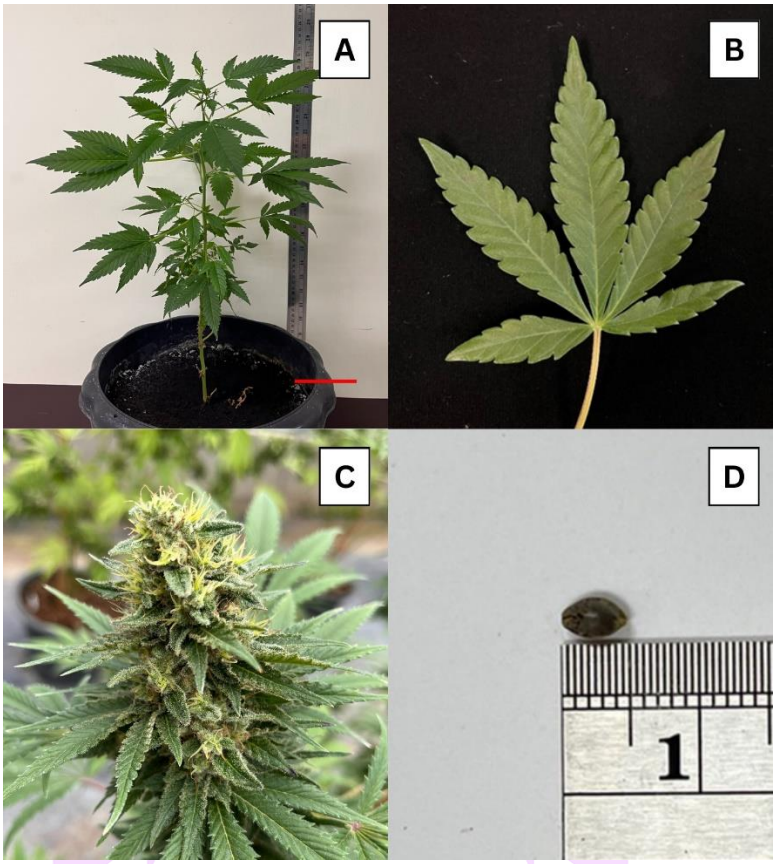
ต้น จัดเป็นพรรณไม้ล้มลุกที่มีอายุเพียงปีเดียว ลำต้นเป็นสีเขียวตั้งตรง มีความสูงได้ประมาณ 1-6 m เริ่มมีการสร้างเนื้อไม้ประมาณ 2-3 สัปดาห์ การเจริญเติบโตของต้นจะช้าในช่วง 6 สัปดาห์แรก หลังจากนั้นจะเพิ่มความสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีความสูงโดยเฉลี่ยประมาณ 3 m มีรากเป็นระบบ

รากแก้วและมีรากแขนงเป็นจำนวนมาก ใช้เวลางอกประมาณ 8-14 วัน และสามารถเก็บเกี่ยวได้เมื่อต้นอายุ 3-4 เดือน

ใบ เป็นใบเดี่ยวและใหญ่ ลักษณะของใบเป็นรูปฝ่ามือ ซึ่งแผ่นใบแก่แยกเป็นแฉกประมาณ 5-7 แฉก ขอบใบจักเป็นฟันเลื่อยและเว้าลึกจนถึงโคนใบ ปลายใบสอบและเรียวแหลม ก้านใบยาวประมาณ 2-7 cm เมื่อมีการสร้างดอกจำนวนแฉกของใบจะลดลงตามลำดับ

ดอก ออกดอกเป็นช่อตามซอกใบและปลายยอด ดอกมีขนาดเล็กสีขาว มีขนาดเส้นผ่าน-ศูนย์กลางประมาณ 2-4 mm ดอกเป็นแบบแยกเพศและอยู่ต่างต้นกัน โดยช่อดอกเพศผู้จะเป็นแบบ panicle ประกอบไปด้วยกลีบเลี้ยง 5 กลีบแยกจากกันเป็นอิสระ มีสีเขียวอมเหลือง มีเกสรเพศผู้ 5 อัน มีระยะเวลาการบานประมาณ 2 เดือน ส่วนดอกเพศเมียจะเกิดตามซอกใบและปลายยอด ในบริเวณช่อดอกจะอัดกันแน่น ช่อดอกจะเป็นแบบ spike ประกอบไปด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียวเข้มหุ้มรังไข่ไว้ภายใน stigma 2 อัน สีน้ำตาลแดง อายุของดอกค่อนข้างสั้นประมาณ 3-4 สัปดาห์ก็จะติดผล

ผล เป็นเมล็ดแห้งสีเทา ลักษณะเป็นรูปไข่ ผิวเรียบเป็นมันและมีลายประสีน้ำตาล เมื่อแห้งจะเป็นสีเทา มีขนาดกว้างเฉลี่ยประมาณ 4.47 mm ยาวประมาณ 5.11 mm และมีความหนาเฉลี่ยประมาณ 3.75 mm ภายในเมล็ดมีอาหารสะสมจำพวกแป้งและไขมันอัดกันแน่น โดยมีน้ำมันประมาณ 29-34% มีไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูงประกอบด้วยกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) 54-60% กรดไลโนเลนิก (Linolenic acid) 15-20% และกรดโอเลอิก (Oleic acid) 11-13%



ภาพที่ 1 ลักษณะต้นกัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel อายุ 1 เดือน (Scale bar = 10 cm) (A) ลักษณะใบกัญชง (B) ลักษณะช่อดอก (C) และลักษณะเมล็ดหรือผลกัญชง (D)

พันธุ์กัญชงในประเทศไทยและต่างประเทศ

ปัจจุบันพันธุ์กัญชงที่มีปริมาณของสาร CBD สูงเป็นที่ต้องการในตลาดโลกมาก จึงเกิดกัญชงพันธุ์ใหม่ขึ้นทุกเดือน ซึ่งแต่ละพันธุ์จะมีรสชาติ กลิ่น และผลข้างเคียงที่แตกต่างกันมาก จึงยกตัวอย่างพันธุ์กัญชงในต่างประเทศที่เป็นที่นิยมทั้งหมด 10 อันดับ (Industrial Hemp Farms, n.d.) ได้แก่

1. Elektra (CBD 16% และ THC 0.3%)
2. Oregon OG (CBD 13% และ THC 0.3%)
3. Special Sauce Premium (CBD 14-19% และ THC 0.3%)
4. Sour Space Candy (CBD 19% และ THC 0.3%)
5. The Wife (CBD 20% และ THC 0.3%)
6. Super Lemon Haze CBD (CBD 14% และ THC 0.3%)

7. ACDC (CBD 20% และ THC 0.3%)
8. Cherry Wine (CBD 18% และ THC 0.3%)
9. Lifter Wine (CBD 16% และ THC 0.3%)
10. T1 Trump Flower (CBD 20% และ THC 0.3%)

ซึ่งในประเทศไทยนั้นกัญชงสามารถขอขึ้นทะเบียนพันธุ์กับกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ เพื่อใช้รับรองลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คุณสมบัติของพันธุ์ และผู้ปรับปรุงพันธุ์ ปัจจุบันพันธุ์กัญชงในไทยที่ได้ขึ้นทะเบียนพันธุ์มีทั้งหมด 8 พันธุ์ ประกอบด้วย 4 พันธุ์ RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ขึ้นทะเบียนในปี 2554 และอีก 4 พันธุ์ RPF5, RPF6, RPF7 และ RPF8 ขึ้นทะเบียนในปี 2564 ทั้ง 8 พันธุ์ขึ้นทะเบียนโดยสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ทำการคัดเลือกพันธุ์ด้วยวิธีการคัดเลือกรวม (Mass selection) ให้มีปริมาณสารเสพติดหรือ THC ต่ำกว่า 0.3% และมี cannabidiol หรือ CBD มากกว่า 2 เท่าของ THC และมีเปอร์เซ็นต์เส้นใยสูง (สริตา ปิ่นมณี, 2564) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 พันธุ์กัญชงที่ได้รับการขึ้นทะเบียนพันธุ์ต่อกรมวิชาการเกษตรในประเทศไทย

พันธุ์	ปริมาณ CBD เฉลี่ย (%)	ปริมาณ THC เฉลี่ย (%)	อัตราส่วน CBD: THC	ปริมาณเส้นใย เฉลี่ย (%)
RPF1	0.805	0.072	11: 1	14.2
RPF2	1.146	0.110	10: 1	13.8
RPF3	0.760	0.101	8: 1	12.9
RPF4	0.600	0.270	2.2: 1	14.7
RPF5	0.244	0.017	14.5: 1	21.7
RPF6	0.428	0.027	15.6: 1	22.8
RPF7	0.349	0.026	13.7: 1	18.9
RPF8	0.408	0.074	5.5: 1	26.1

ที่มา: สริตา ปิ่นมณี (2564)

การเลือกใช้ประโยชน์จากกัญชงทั้ง 8 พันธุ์ให้เหมาะสม

1. พันธุ์ RPF1-8 สามารถปลูกเพื่อผลิตเส้นใย
2. พันธุ์ RPF1-4 สามารถปลูกเพื่อผลิตเมล็ดสำหรับบริโภค
3. พันธุ์ RPF3 หรือ RPF7 ควรปลูกในพื้นที่ราบทั่วไป รองลงมา คือ RPF1 หรือ RPF5
4. การปลูกเพื่อสกัดสารสำคัญสามารถใช้ RPF1-3 จากการนำเศษใบที่เหลือจากการผลิตเมล็ดพันธุ์ได้

การใช้ประโยชน์จากกัญชงในปัจจุบัน

1. ด้านสิ่งทอ

กัญชงเป็นพืชสำคัญที่ช่วยให้สามารถผลิตสิ่งทอคุณภาพสูงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและสามารถผลิตได้ในท้องถิ่น กัญชงแท้จะมีกลุ่มเส้นใยจากใยเปลือกไม้ (Bast fiber) ที่ละเอียด สีอ่อน เป็นมันเงา มีความแข็งแรงจำเพาะสูง ความหนาแน่นต่ำ ประหยัดค่าใช้จ่าย ไม่ต้องขัดสี และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Dhakal & Zhang, 2015) อย่างไรก็ตาม คุณภาพของเส้นใยขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น เทคนิคการปลูก สภาวะการปลูก และการเก็บเกี่ยว (Amaducci et al., 2008; Amaducci et al., 2005; Höppner & Menge-Hartmann, 2007) ด้วยเหตุที่เส้นใยมีความแข็งแรงสูงจึงมักใช้ในอุตสาหกรรมเชือก (Shahzad, 2012) พรม พรมเช็ดเท้า เป็นต้น แต่มีข้อจำกัดในการใช้งานเพราะฟอกสียาก

2. ด้านการแพทย์

กัญชงทางเภสัชกรรมมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายชนิด สารสำคัญหลัก ๆ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) สารแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) มีทั้งสารที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ได้แก่ Tetrahydrocannabinol (THC) เมื่อเข้าสู่สมองจะจับกับ cannabinoid receptors ทำให้เกิดอาการเคลิ้ม บางรายอาจมีการรับรู้ต่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนไป (Radhakrishnan et al., 2014) และไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ได้แก่ Cannabidiol (CBD) เป็นต้น 2) สารเทอร์ปีน (Terpenes) เป็นสารประกอบอะโรมาติก (Aromatic) เป็นสารที่ทำให้มีกลิ่นเฉพาะตัว 3) สารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (พรชัย สินเจริญโภไคย และคณะ, 2564) จากงานวิจัยของ Maiolo et al. (2018) พบว่า ในประเทศจีนมีการใช้น้ำมันจากเมล็ดกัญชงเป็นระยะเวลากว่า 3000 ปี เนื่องด้วยสรรพคุณที่

สามารถลดความเครียด ความวิตกกังวล ความเจ็บปวด และเพิ่มประสิทธิภาพการนอนหลับและระบบการย่อยอาหาร อีกทั้งยังช่วยต้านมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) และปรับระดับคอเลสเตอรอลและความดันโลหิตให้เป็นปกติ (Devi & Khanam, 2019)

3. ด้านอาหารมนุษย์

คุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดกัญชงและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ได้จากกัญชงทำให้ความนิยมในการบริโภคกัญชงเพิ่มมากขึ้น (Andre et al., 2016) ในเอเชียและยุโรปตะวันออก ซึ่งส่วนเมล็ดนั้นเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี ยกตัวอย่างเช่น เมล็ดจำนวน 2-3 ช้อนโต๊ะ ให้ปริมาณโปรตีนประมาณ 11 g ประกอบด้วยเมไธโอนีน (Methionine) ไลซีน (Lysine) และ ซีสเตอีน (Cysteine) (Rehman et al., 2021) อีกทั้งยังประกอบด้วยคุณค่าทางชีวภาพของโปรตีน (Proteins of biological value) ประมาณ 20-25% เทียบเท่ากับไข่ขาว (Mikulec et al., 2019) นอกจากนี้ยังมีปริมาณไขมันประมาณ 25-35% คาร์โบไฮเดรตประมาณ 20-30% เส้นใยอาหารประเภทละลายน้ำไม่ได้ (Insoluble fibers) ประมาณ 10-15% และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น phosphorus, potassium, sodium, magnesium, sulfur, calcium, iron และ zinc (Callaway, 2004; Deferne & Pate, 1996; Galasso et al., 2016)

4. ด้านอาหารสัตว์

เมล็ดกัญชงประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต 32-34% ไขมัน 33-35% โปรตีนรวม 24-25% และ 9-11% อีกทั้งยังประกอบด้วยเยื่อใย วิตามิน และแร่ธาตุ ส่วนน้ำมันเมล็ดกัญชงประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว 75-80% ประกอบด้วยกรดลิโนเลอิก 60% กรดแอลฟาลิโนเลนิก 17-19% (Johnson, 2018) และแหล่งของกรดไขมันโอเมก้า 3 และ 6 (Gakhar et al., 2012) กากเมล็ดกัญชงที่ได้จากการสกัดน้ำมัน (Hempseed oil cake) สามารถนำมาเป็นส่วนผสมเสริมโภชนาการของอาหารสัตว์เพื่อการเลี้ยงแบบปศุสัตว์ได้เนื่องจากมีโปรตีนสูง จึงมีประสิทธิภาพในการเสริมโปรตีนในอาหารสัตว์ ปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหพันธรัฐ (Federal Food and Drug Administration; FDA) ยังไม่ยอมรับให้ใช้ส่วนผสมของกัญชงในสัตว์ ในขณะที่กฎหมายฟาร์มบิล (Farm bill) ปี 2018 อนุญาตให้ปลูกกัญชงในโครงการวิจัยได้ ในประเทศที่สามารถปลูกกัญชงได้ เมล็ดจะถูกนำไปใช้เป็นอาหารให้พลังงานสำหรับโคและสัตว์ปีก นอกจากนี้มักถูกใช้เป็นส่วนผสมของอาหารนกและเหยื่อปลาอีกด้วย

5. ด้านการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม

การปลูกกัญชงมีประโยชน์ในการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ยกตัวอย่างเช่น ฟื้นฟูพื้นที่เกษตรกรรมที่ปนเปื้อนสารเคมีทางการเกษตรมากเกินไปหรือดินที่ใกล้หลุมฝังกลบที่มีสารมลพิษอันตรายชะลงสู่ดิน เนื่องจากกัญชงสามารถมีชีวิตรอดภายใต้สภาพอากาศที่หลากหลาย โดยมีระบบรากที่หยั่งลึกช่วยหยุดการพังทลายของดิน กำจัดสิ่งปนเปื้อน ทำลายเชื้อโรค และเติมอากาศในดิน งานวิจัยของ Angelova et al. (2004) และ Yanchev et al. (2000) รายงานว่า กัญชงสามารถกำจัดโลหะหนักจำนวนมากออกจากดินได้ เนื่องจากระบบรากที่เจริญเติบโตได้ดี

6. ด้านวัสดุก่อสร้าง

การใช้วัสดุจากธรรมชาติถือได้ว่าปลอดภัยต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม วัสดุธรรมชาติสามารถหาได้จากสัตว์หรือพืช เช่น กัญชง ต้นปอ ปอแก้ว ไม้ ไม้ไผ่ เป็นต้น ซึ่งมีจำหน่ายในท้องตลาดและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง วัสดุก่อสร้างชีวมวลจากพืชแสดงถึงการกักเก็บคาร์บอนพร้อมกับพลังงานสะสมต่ำ (Embodied energy) ต้นกัญชงเป็นแหล่งเส้นใยธรรมชาติที่รู้จักกันดี ซึ่งสามารถใช้เป็นวัสดุก่อสร้าง (Hartsel et al., 2016; Kolodziejczyk, 2012) แผ่นฉนวนไฟฟ้า (Insulation mats) วัสดุผสมชีวภาพ (Bio-composite) และคอนกรีต (Ingrao et al., 2015)

7. ด้านการผลิตพลังงานชีวภาพ

มีพืชเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตวัตถุดิบด้านพลังงานชีวภาพได้อย่างยั่งยืน (Amon et al., 2007) ประโยชน์ของกัญชงนอกจากเป็นแหล่งผลิตเส้นใย น้ำมัน และผลิตภัณฑ์ทางโภชนาการ หนึ่งในศักยภาพของการใช้กัญชงในอุตสาหกรรม คือ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (Das et al., 2017) เนื่องจากกัญชงใช้ต้นทุนต่ำแต่ได้มวลชีวภาพมากกว่า (Li et al., 2010) มีคาร์โบไฮเดรตสูงและมีลิกนินค่อนข้างต่ำ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้สำหรับการผลิตพลังงานชีวภาพ (Van der Werf, 2004)

การเพาะปลูกกัญชงเชิงพาณิชย์

การขยายพันธุ์และการเจริญเติบโตของพืช

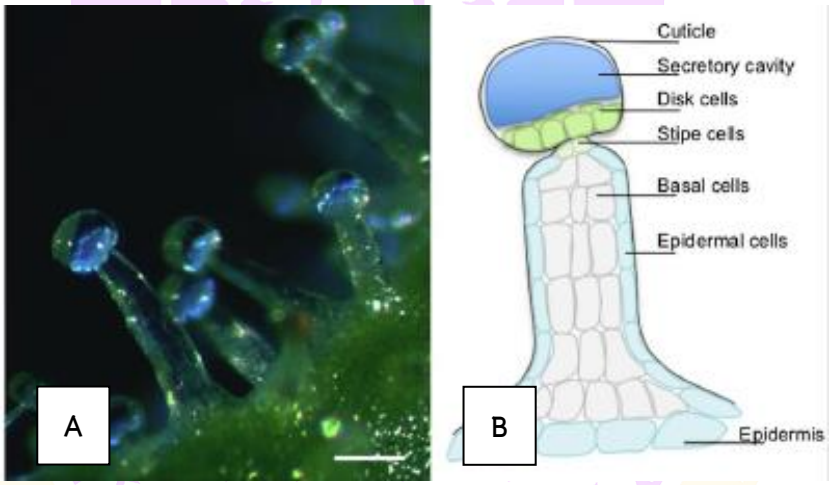
โดยทั่วไปการปักชำแบบไม่ใช้สารเคมีเป็นวิธีมาตรฐานในการขยายพันธุ์กัญชงเชิงพาณิชย์ เพื่อให้แน่ใจว่าจีโนไทป์ที่ต้องการจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในระบบนี้พืชที่มีลักษณะที่พึงประสงค์หรือที่เรียกว่า ต้นแม่ (Mother plants) จะใช้เป็นต้นในการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (โคลน) พืชในช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (Vegetative phase) จะถูกเลี้ยงภายใต้แสงเป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง (ขึ้นกับตารางการผลิตและพันธุกรรมของพืช) เนื่องจากต้นกัญชงต้องการแสงมากกว่าพืชประดับอย่างน้อยสองเท่า (Lata et al., 2016) และการบำรุงรักษาต้นแม่เพื่อตัดกิ่งพันธุ์อาจใช้เวลานานและต้องใช้ทรัพยากรมากทั้งพื้นที่และพลังงาน ต้นแม่สามารถถ่ายทอดโรคไปยังกิ่งพันธุ์ได้ และเมื่อเวลาผ่านไป ต้นแม่อาจสูญเสียความแข็งแรง ซึ่งทำให้คุณภาพลดลง (Punja et al., 2019) การผลิตเมล็ดจะใช้ต้นกัญชงเพศเมียที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการจะมีการใช้ซิลเวอร์ไทโอ-ซัลเฟต (Silver thiosulphate) โดยสารประกอบดังกล่าวทำให้ต้นเพศเมียสร้างละอองเรณูที่มีเพียงโครโมโซม X เท่านั้น (Mohan Ram & Sett, 1982) เพื่อผลิตเมล็ดในการเพาะปลูกและผลิตช่อดอกเพศเมีย (Female inflorescences) ที่มีปริมาณสารสำคัญสูงกว่าดอกเพศผู้ (Male inflorescences) อย่างมาก (Lubell & Brand, 2018)

การปลูกกัญชงในประเทศไทยเพื่อใช้ประโยชน์ด้านเส้นใยหรือเมล็ดจะใช้เวลาประมาณ 150-180 วัน หากเป็นการปลูกเพื่อใช้เส้นใยจะใช้เวลา 80-100 วัน พืชจะไม่แตกกิ่งก้านมาก ทำให้ไม่เสียเวลาในการลิดกิ่งก้านออก และสะดวกต่อการลอกเปลือก แต่หากเป็นการปลูกเพื่อเก็บช่อดอกจะใช้เวลา 100-120 วัน หรือเพื่อเก็บเมล็ดจะต้องใช้เวลา 150-180 วัน

การออกดอก (Flowering)

ในระยะนี้พืชต้องการปริมาณแสงที่น้อยลงกว่าช่วงวิกฤต (Critical period) เพื่อเริ่มพัฒนาตาดอก (Floral primordia) จะเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของช่วงเวลาการให้แสงจากวันยาวไปเป็นวันสั้นหรือจากการได้รับแสง 18-24 ชั่วโมง ไปเป็น 10-13 ชั่วโมง และไม่ได้รับแสงต่อเนื่องอย่างน้อย 12 ชั่วโมง (ใช้เวลา 1-3 เดือน) โดยพันธุ์กัญชงในประเทศไทยช่วงวิกฤต คือ ปริมาณแสงที่เฉลี่ยต่ำกว่า 11-12 ชั่วโมงในแต่ละวัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และภูมิภาค (วิจิตร วังใน, 2565) การผลิตกัญชงเชิงพาณิชย์นั้นอาศัยเพียงการปลูกต้นเพศเมียเพื่อผลิตช่อดอกเท่านั้น ในระยะการสืบพันธุ์ (ระยะออกดอก) เกสรเพศเมีย (Pistils) สีขาวจะเจริญเติบโตบนต้นเพศเมียที่บริเวณข้อของใบที่เจริญเติบโตเต็มที่

และในที่สุดจะพัฒนากลายเป็นช่อดอก ช่อดอกดังกล่าวมีไตรโคมต่อม (Glandular trichomes) ที่พัฒนาเป็นโพรงที่ใช้ในการหลั่งสาร โดยโพรงนี้จะเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นจนถึงสีน้ำตาลเข้มเมื่อช่อดอกโตเต็มที่ (Tanney et al., 2021) ซึ่งอยู่ระหว่างเซลล์แผ่นที่ทำหน้าที่หลั่งสาร (Secretory disk cells) และชั้นคิวติเคิล (Cuticle) ดังภาพที่ 2 โดยในโพรง (Secretory cavity) นี้จะมีการสะสมและเก็บสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ตัวอย่างเช่น แคนนาบินอยด์และเทอร์ปีน ไตรโคมสามารถแบ่งได้ 3 ประเภท ได้แก่ capitate-sessile, capitate-stalked และ bulbous โดยไตรโคมแบบ bulbous จะมีต่อมขนาดเล็กและสั้น ไตรโคมแบบ sessile มีต่อมหัวบนก้านสั้น และไตรโคมแบบ stalked จะมีหัวกลมขนาดใหญ่บนก้านยาว ซึ่งไตรโคมประเภทนี้สามารถผลิตสารแคนนาบิ-นอยด์มากที่สุด (Hammond & Mahlberg, 1973)



ภาพที่ 2 ลักษณะไตรโคมของกัญชง โดยเป็นภาพถ่ายจุลทรรศน์แบบดาร์กฟิลด์ (Dark field micrograph) ของไตรโคมต่อมที่มีก้านยื่นออกมาจากผิวของกลีบเลี้ยง (Calyx epidermis) (A) และโครงสร้างต่อมไทรโคมแบบมีก้าน (B)

ที่มา: Tanney et al. (2021)

การเก็บเกี่ยว การอบแห้ง และการแปรรูป

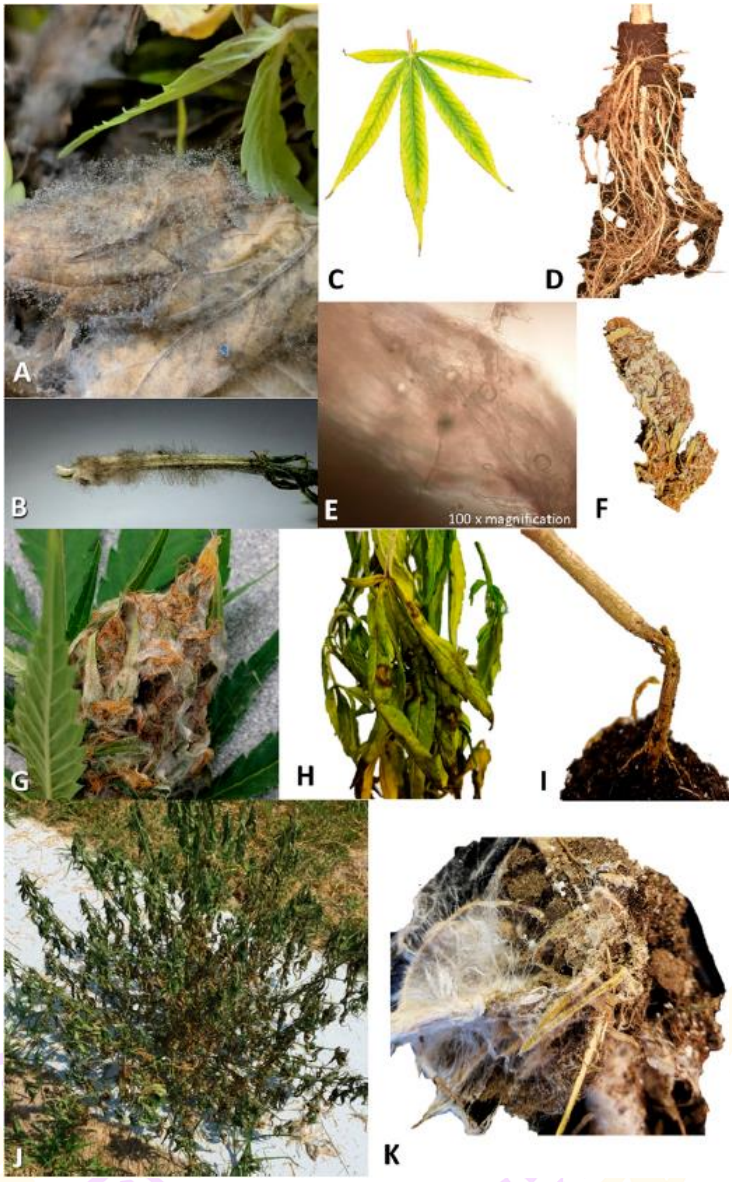
โดยปกติการเก็บเกี่ยวจะเกิดขึ้น 8-10 สัปดาห์ หลังจากเริ่มระยะการออกดอก เมื่อเริ่มมีสัญญาณของการสิ้นสุดการออกดอก ระยะเวลาในการอบแห้ง ระดับความชื้น การเสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และกระบวนการอบแห้งเบื้องต้นนั้นขึ้นอยู่กับผู้ผลิต ช่อดอกกัญชงนี้สามารถขายแบบแห้งหรือผ่านการแปรรูปเพิ่มเติม เช่น น้ำมัน อาหาร เป็นต้น ในการสกัดน้ำมันจากดอกกัญชงแห้ง สามารถใช้ตัวทำละลายหลายชนิด ได้แก่ CO_2 เอธานอล เบนซิน และบิวเทน (Farag, 2014)

โรคพืชในกัญชง

โรคพืช หมายถึง ลักษณะอาการของพืชที่ผิดไปจากปกติ ซึ่งอาจเกิดขึ้นบนส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นพืชหรือตลอดทั้งต้น และรวมไปจนถึงการแห้งตายไปทั้งต้น องค์กรการอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) ได้ให้คำจำกัดความการจัดการโรคพืชไว้ว่า ระบบการเลือกและใช้วิธีการที่เหมาะสมใด ๆ ก็ตามที่ลดความเสียหายของโรคลงได้จนถึงระดับที่พืชสามารถทนอยู่ได้ ในทางปฏิบัติอาจใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่งหรือหลายวิธีร่วมกัน โดยคำนึงถึงประสิทธิภาพสูงสุด การมีผลต่อสภาวะแวดล้อมน้อย และเสียค่าใช้จ่ายต่ำที่สุด (ประสาทพร สมิตะมาน และคณะ, 2556) โรคพืชสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท ได้แก่

1. **โรคที่ติดเชื้อ (Infectious disease)** หมายถึง โรคที่เกิดจากเชื้อที่มีชีวิตเป็นเชื้อก่อโรค พืชจะมีปฏิกิริยาตอบโต้การติดเชื้อและสามารถแพร่ระบาดไปยังต้นอื่น ๆ ได้ หากอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น โรคที่เกิดจากเชื้อรา ไวรัส แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย แมลงและไมโครพลาสมา ดังภาพที่ 3

2. **โรคที่ไม่ติดเชื้อ (Non infectious disease)** หมายถึง โรคที่เกิดจากสาเหตุที่นอกเหนือจากโรคติดเชื้อ โดยจะไม่เกิดระบาดจากต้นที่เป็นมีอาการของโรคไปยังพืชปกติได้ เช่น อาการที่เกิดจากการขาดธาตุอาหารต่าง ๆ ความผิดปกติทางพันธุกรรม เป็นต้น



ภาพที่ 3 อาการของโรคในกัญชงอุตสาหกรรม โรคราเทาที่เกิดจากเส้นใยและสปอร์ของ Botrytis cinerea บนใบ (A) และก้าน (B) ที่เน่าเปื่อย อาการใบเหลือง (C) รากเน่า (D) และ oospores ภายในรากของ Pythium spp. เป็นสาเหตุทำให้รากเน่า (E) เส้นใยเชื้อรา บนช่อดอกแห้ง (F) และช่อดอกสด (G) จุดบนใบที่มีขอบสีเข้ม (H) และโรคแผลเน่าที่ลำต้นที่เกิดจาก Fusarium spp. (I) อาการเหี่ยวเฉา (J) และ เส้นใยเชื้อราและการสร้าง sclerotia บนผิวของราก (K)

ที่มา: Teisson et al. (1996)

เทคโนโลยีการขยายพันธุ์กัญชงปลอดโรค

กัญชงเป็นพืชที่มีโรคพืชที่เป็นสาเหตุสร้างความเสียหายหลายชนิด เช่น โรคเน่าคอดิน (Damping-off) โรคแอนแทรคโนส (Antracnose) โรครากเน่า (Fusarium foot rot, Tropical rot) โรคไหม้ (Blight) โรคราสีเทา (gray mold) โรคใบจุด Xanthomonas โรคจากไวรัส (HSV, AMV) เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้สามารถสร้างความเสียหายตั้งแต่ต้นกล้าจนจึงระยะเก็บเกี่ยว โรคบางชนิดสามารถแพร่ระบาดติดไปกับเมล็ดพันธุ์และท่อนพันธุ์ได้ สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้ปลูกและอุตสาหกรรมการผลิตช่อดอกกัญชงเพื่อจำหน่ายไปใช้ในการแพทย์ เนื่องจากเป็นการผลิตที่หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีป้องกันกำจัด จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในต้นพืชที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์โดยใช้เวลาอันรวดเร็วเมื่อเทียบกับการใช้การขยายพันธุ์โดยใช้หน่อหรือกิ่ง (Ramon et al., 2015; Scherer et al., 2013) พืชยังอยู่ภายใต้สภาพปลอดเชื้อและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และมีลักษณะเหมือนต้นแม่พันธุ์

การขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)

เป็นการนำเอาเซลล์ โพรโทพลาสต์เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะส่วนต่าง ๆ ของพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุม เช่น อุณหภูมิ และแสงสว่าง เป็นต้น (Street, 1977) วิธีนี้ประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก ๆ ได้แก่

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ธราธร ทีรฆฐิติ และคณะ, 2559)

1. การเตรียมอาหาร

การนำธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่พืชต้องการในการเจริญเติบโตมาผสมกับวิตามิน น้ำตาล สารคล้ายฮอร์โมนพืช และน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ สูตรอาหารสังเคราะห์แต่ละสูตรประกอบด้วยสารประกอบต่าง ๆ เป็นจำนวนมากและมีปริมาณน้อย จึงเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) แล้วจึงตวงมาใช้เตรียมอาหารต่อไป

2. การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของพืช

การทำให้ชิ้นส่วนของพืชปลอดเชื้อโดยการใช้สารเคมีหรือความร้อน ซึ่งทำหน้าที่ให้ส่วนประกอบที่สำคัญของจุลินทรีย์เสียไปก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. การเพิ่มปริมาณ

เป็นการนำต้นพืชที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อมาชักนำให้เพิ่มขยายต้นจำนวนมาก โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน

4. การชักนำรากพืช

เป็นการนำต้นพืชที่ได้จากการเพิ่มจำนวนต้น มาชักนำให้เกิดรากในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน

5. การย้ายออกปลูก

เป็นการย้ายต้นพืชออกจากขวดเพาะเลี้ยงสู่สภาพแวดล้อมภายนอก จำเป็นต้องมีการปรับสภาพของต้นพืชให้ทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกเพื่อลดการตายของต้นพืช

ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor; TIB)

เป็นนวัตกรรมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบกึ่งอัตโนมัติที่มีการให้อาหารเหลวในการเพาะเลี้ยงเป็นช่วงเวลาเพื่อไม่ให้ต้นพืชจมอยู่ในอาหารเหลวตลอดเวลา ระบบนี้มีการพัฒนาและใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น (Etienne & Berthouly, 2002) เป็นการขยายพันธุ์พืชที่ปราศจากผลข้างเคียง เช่น อาการฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลว อีกทั้งยังเปลี่ยนอาหารสะดวก รวดเร็ว ลดขั้นตอนของการตัดเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อพืช (Subculture) ลดโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนให้น้อยลง สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนพืชได้เป็นจำนวนมากในเวลาที่รวดเร็ว (เขมณัฏฐ์ ธนกรณ์ไพศาล และคณะ, 2561) ลดต้นทุนการผลิตลง ลดภาชนะและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ลดพื้นที่ห้องเพาะเลี้ยงได้ถึง 80% (นพมณี โทปุญญานนท์ และคณะ, 2549) และสามารถควบคุมคุณภาพพืชให้ได้มาตรฐาน จึงเป็นระบบที่นิยมใช้ในการพัฒนาพืชที่มีศักยภาพเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรม

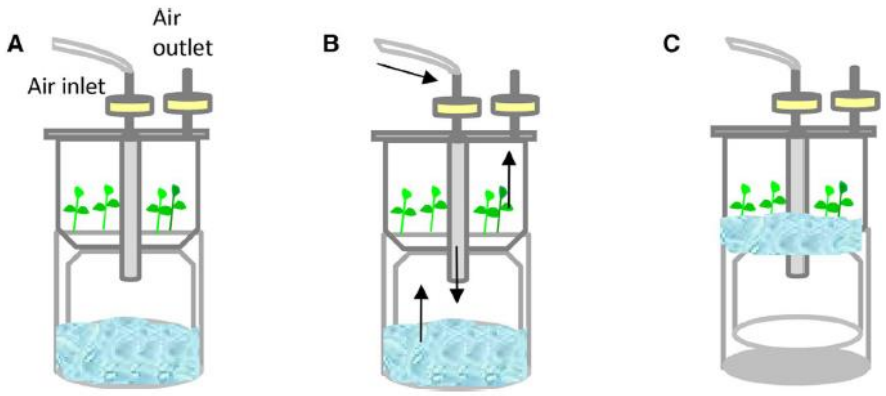
หลักการทำงานเบื้องต้น

มีภาชนะแยกระหว่างอาหารกับชิ้นส่วนของพืชออกเป็น 2 ภาชนะ และเชื่อมด้วยท่อซิลิโคน โดยการให้อาหารแก่ชิ้นส่วนพืชนั้นจะใช้แรงดันอากาศดันอาหารจากภาชนะใส่อาหารไปยังภาชนะเลี้ยงต้นพืชเพื่อให้พืชได้รับอาหารเหลวเพียงชั่วคราว เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดจะใช้แรงดันดันอาหารกลับสู่ภาชนะเก็บอาหารเช่นเดิม ซึ่งสภาพภายในขวดต้องเป็นสภาพที่ปลอดเชื้อ ดังนั้นอากาศที่ผ่านเข้าออกในระบบไบโอรีแอคเตอร์จะถูกกรองด้วยแผ่นกรองอากาศ (Alvard et al., 1993)

ชนิดของระบบไบโอรีแอคเตอร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ปัจจุบันนิยมใช้ 2 แบบ ได้แก่

1. ระบบภาชนะแบบ 2 ชั้น (Alvard et al., 1993)

ระบบนี้จะแบ่งภาชนะออกเป็น 2 ชั้น โดยที่ส่วนบนสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช และส่วนล่างสำหรับใส่อาหารเหลว ทั้งสองส่วนนี้จะเชื่อมกัน เพื่อให้อาหารเหลวสามารถไหลขึ้นไปเลี้ยงต้นพืชที่อยู่ด้านบน โดยอาศัยแรงดันสูงจากแรงลมของปั๊มลม และอาหารเหลวจะไหลกลับด้วยแรงโน้มถ่วง ดังภาพที่ 4



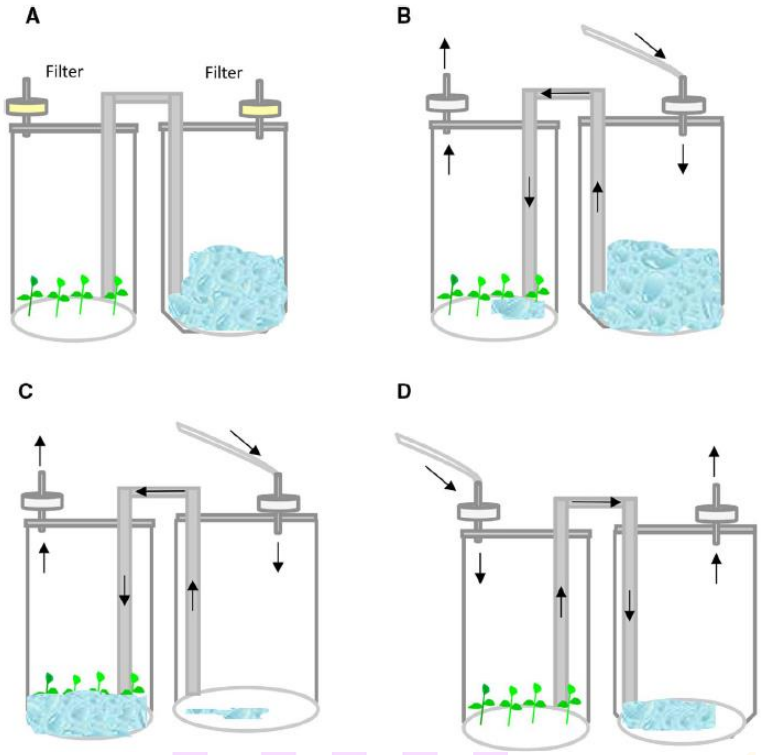
ภาพที่ 4 หลักการทำงานของไบโอรีแอคเตอร์แบบระบบภาชนะ 2 ชั้น ปั๊มลมปิดทำให้อาหารเหลวอยู่ช่องล่าง (A) ปั๊มส่งแรงลมผ่านตัวกรองอากาศทางเข้า (B) แรงดันอากาศที่มากเกินไปจะทำให้อาหารเคลื่อนตัวขึ้นสัมผัสกับพืชและถูกขับออกทางตัวกรองอากาศทางออก (C)

ที่มา: Vidal and Sánchez (2019)

2. ระบบขวดแฝด (Escalona et al., 1999)

ระบบนี้จะมีการแยกขวด 2 ขวดออกจากกัน คือ ขวดอาหารกับขวดต้นพืช ขวดทั้งสองเชื่อมกันด้วยท่อ เพื่อให้อาหารเหลวสามารถไหลขึ้นไปเลี้ยงต้นพืชที่อยู่อีกขวดได้ อาหารจะไหลไปเลี้ยงต้นพืชและไหลกลับด้วยแรงดันสูงจากแรงลมของปั๊มลมอย่างเดียว โดยอากาศที่เข้าออกขวดทั้ง 2 ขวดนั้นจะถูกกรองด้วยแผ่นกรองอากาศ ซึ่งทำหน้าที่กรองเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ไม่ให้เข้าไปปนเปื้อนในขวด

และการเปิดปิดของอากาศที่ช่วยดันอาหารนั้นจะถูกควบคุมด้วยโซลินอยด์วาว์ลที่ควบคุมด้วยตัวควบคุมเวลาอีกทีหนึ่ง (Teisson et al., 1996) ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 หลักการทำงานของไบโอรีแอคเตอร์แบบระบบขวดแฝด อาหารเหลวจะอยู่ในขวดแยกจากภาชนะเพาะเลี้ยงที่บรรจุชิ้นส่วนพืช (A) ปั๊มลมจะดันอากาศผ่านขวดที่บรรจุอาหารเหลว ทำให้อากาศเคลื่อนตัวไปยังภาชนะเพาะเลี้ยง (B) อาหารเหลวสัมผัสกับพืชและมีการไล่อากาศออกทางตัวกรองอากาศทางออก (C) และปั๊มลมจะดันอากาศผ่านภาชนะเพาะเลี้ยง และบังคับให้อากาศเคลื่อนที่ไปยังขวดเปล่า (D)

ที่มา: Vidal and Sánchez (2019)

สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (Plant growth regulators; PGRs)

เป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช (Plant hormones หรือ phytohormones) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชทุกขั้นตอน ปัจจุบันมีการใช้ PGRs เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพืชที่ควบคุมการเปลี่ยนระดับความสมดุลของฮอร์โมนภายใน ทำให้พืชแสดงลักษณะต่าง ๆ ตามที่ต้องการ โดยเป็นสารอินทรีย์ที่สามารถใช้ในปริมาณน้อยหรือความเข้มข้นต่ำ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาภายในพืช (Physiological response) เช่น การออกดอก การติดผล การสุก เป็นต้น และต้องไม่เป็นธาตุอาหารของพืช PGRs สามารถอยู่ในรูปแบบผงละลายน้ำ สารละลายเข้มข้น สารละลายน้ำมัน สารแขวนลอยเข้มข้น ครีม และเม็ด (ทวีศักดิ์ แสงอุดม, 2559) แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ (Singh et al., 2021; ธราธร ทีรฆฐิติ และคณะ, 2559) ดังนี้

1. ออกซิน (Auxins)

มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิดราก การขยายขนาดของใบและผล โดยมีประโยชน์ในการยืดตัวของเซลล์ การแบ่งเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะ เพิ่มการแตกรากพิเศษ (Adventitious root) การข่มไม่ให้ตาข้างเจริญเติบโต (Apical dominance) เพิ่มจำนวนดอกเพศเมียและลดจำนวนดอกเพศผู้ในต้นพืช เป็นต้น สารสังเคราะห์ในกลุ่มออกซินที่ใช้มาก ได้แก่ Napthalene acetic acid (NAA) Indole-3-butyric acid (IBA) 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) เป็นต้น

2. จิบเบอเรลลิน (Gibberellins)

จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของราก ลำต้น ใบ และโคลีโอปไทล์ (Coleoptile) ชักนำให้เกิดดอก จำเป็นต่อการงอกของเมล็ดพืช ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ หยุดการพักตัวเนื่องจากกระตุ้นการสังเคราะห์อะไมเลส (Amylase) และเปลี่ยนเพศดอก

3. ไซโตไคนิน (Cytokinins)

กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์และสร้างอวัยวะ เพิ่มขนาดเซลล์และอวัยวะการเจริญเติบโตของตาข้างและส่วนยอด ช่วยป้องกันการย่อยสลายของสารเมตาบอไลต์ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก ไขมัน และคลอโรฟิลล์ในใบ จึงช่วยป้องกันการแก่ (Senescence) สารสังเคราะห์ในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ 6-benzyl aminopurine (BA) 6-furfuryl aminopurine (Kinetin) เป็นต้น

4. เอทิลีน (Ethylene)

เป็นก๊าซที่จัดเป็นฮอร์โมนพืช มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการงอกของเมล็ด กระตุ้นการเจริญเติบโตของยอดและรากพร้อมทั้งเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะ (Differentiation)

ยับยั้งการเจริญเติบโตของตาข้าง เช่นเดียวกับออกซิน จึงทำให้เกิดการเจริญเติบโตของยอด ยับยั้งการเจริญเติบโตของลำต้นในแนวยาวแต่ในทางกลับกันก็ทำให้ลำต้นเติบโตในแนวขวางซึ่งนำไปสู่การเพิ่มเส้นรอบวงของลำต้น อีกทั้งช่วยกระตุ้นการติดผลและการสุกของผลไม้ที่เก็บเกี่ยวในระยะสุก เช่น กล้วย มะม่วง แตงโม เป็นต้น สารสังเคราะห์ที่สามารถปลดปล่อยหรือสลายตัวได้ก๊าซเอทิลีน เช่น เอทีฟอน (Ethephon) โปรปิลีน (Propylene)

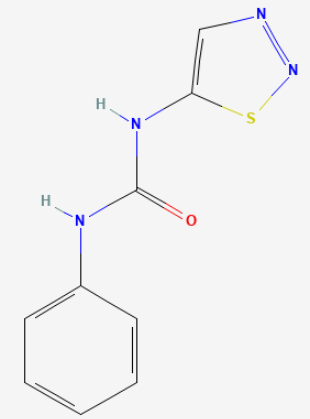
5. กรดแอบซิซิก (Abscisic acid; ABA)

ยับยั้งการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโตของราก ลำต้น ใบ และโคลีโอปไทล์ กระตุ้นการพักตัวของเมล็ดและตาดอกของพืชหลายชนิด ภายใต้สภาวะแห้งแล้ง ABA จะสะสมอยู่ในพืช ส่งผลให้ปากใบปิด และป้องกันการสูญเสียน้ำเพิ่ม เร่งการแก่และการหลุดร่วงของใบ ดอก และผล ชักนำการเก็บโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์ในเมล็ด เป็นต้น

ไทเดียซูรอน (Thidiazuron; TDZ)

สารออกซินที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ TDZ หรือ N-phenyl-1, 2, 3-thidiazole-5ylurea เป็นสารสังเคราะห์กลุ่มไซโตไคนินที่มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน (MW= 220.25 g/mol) มีกลุ่มฟังก์ชันสองกลุ่มในโมเลกุลของ TDZ คือ กลุ่มฟีนิล (Phenyl) และกลุ่มไทไดอะโซล (Thidiazol) ดังภาพที่ 6 หากแทนที่กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งด้วยโมเลกุลวงแหวนอื่นส่งผลให้ค่ากิจกรรมลดลง (Mok et al., 1982) มีคุณสมบัติเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้น้อยแต่ละลายได้ดีในเอทานอลและตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ (Murthy et al., 1998) ปัจจุบันมีการใช้ในพืชสมุนไพรและพืชสวนหลายชนิด พบว่า มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์พืช ชักนำให้เกิดยอดหลายยอด (Multiple shoot) การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (Somatic embryogenesis) ชักนำให้เกิดแคลลัส และการพัฒนาเป็นยอด (Shoot organogenesis) มากกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น โดยมีรายงานว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่า BA ที่ความเข้มข้นเท่ากันในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่ (วราภรณ์ อำพันกาญจน์, 2552) ปัจจุบัน พบการใช้ TDZ ทั้งแบบไม่ใช้และใช้ร่วมสารไซโตไคนินอื่น เช่น BA NAA เป็นต้น เนื่องจาก TDZ ที่มีความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดมากกว่าไซโตไคนินอื่น ๆ ในขณะที่ความเข้มข้นสูงกว่าอาจยับยั้งการยืดยาวของยอด (Huetteman & Preece, 1993) การใช้ TDZ ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของชิ้นส่วนพืช ระยะเวลาที่สัมผัส และชนิดของพืช (Deepa et al., 2018) เช่น TDZ ความเข้มข้น 0.11 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีในโสม

อินเดีย (*Withania somnifera*) แต่ในสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) ความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสม คือ 2.0 mg/L (Fatima et al., 2015; Kumar & Reddy, 2012) อีกทั้ง TDZ มีความเสถียรค่อนข้างสูงในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสามารถชักนำการตอบสนองทางสรีรวิทยาได้แม้เก็บรักษาสารละลายสต็อกเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากพบการเกิดพอลิเมอร์ (Polymerization) ลักษณะนี้ในสารละลายและอาหารเพาะเลี้ยงภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อและการบ่มในห้องเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพจากการใช้ TDZ อาจเป็นผลมาจากการเก็บรักษาโมเลกุล TDZ ให้อยู่ในรูปของพอลิเมอร์สายสั้น และการปลดปล่อยโมเลกุลเหล่านี้ในภายหลังระหว่างช่วงการเพาะเลี้ยง (Murthy et al., 1998)



ภาพที่ 6 โครงสร้างโมเลกุลของ TDZ

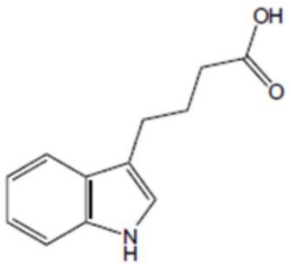
ที่มา: National Center for Biotechnology Information (2024)

นอกจากนี้ Murthy et al. (1998) อธิบายว่า TDZ มีผลต่อเมตาบอลิซึมของไซโตไคนินในเซลล์พืช โดยเปลี่ยนสภาพที่สร้างเนื้อเยื่อที่ต้องการไซโตไคนินเป็นสภาพที่สร้างไซโตไคนินได้ด้วยตนเอง จากการติดตาม TDZ ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีในเนื้อเยื่อ พบว่า TDZ อยู่ในสภาพเดิมนานถึง 48 ชั่วโมง เมตาบอไลต์ที่สำคัญในเซลล์พืช คือ อนุพันธ์ของกลูโคซิล (Glucosyl) ที่แสดงการทำงานคล้ายไซโตไคนินของ TDZ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า TDZ ไม่ได้ถูกเปลี่ยนไปเป็นไซโตไคนินที่เป็น

อนุพันธ์ของอะดีนีน (Adenine) และการที่ยอดที่ได้รับ TDZ นั้นมักไม่ยืดตัว จึงเป็นไปได้ว่า TDZ รบกวนเมตาบอลิซึมของจิบเบอเรลลินด้วย

กรดอินโดล-3-บิวทิริก (Indole 3-butyric acid; IBA)

สารไซโตไคนินที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ IBA เป็นสารสังเคราะห์ในกลุ่มออกซินที่มีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีขาว มีโครงสร้างคล้าย IAA ยกเว้นโซ่ข้าง ซึ่ง IAA มีคาร์บอน 2 ตัวและ IBA มีคาร์บอน 4 ตัว (ภาพที่ 7) จากโครงสร้างที่ใกล้เคียงนี้ส่งผลให้ IBA และ IAA สามารถเปลี่ยนโครงสร้างเป็นอีกสารได้ขึ้นอยู่กับความต้องการในการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชในแต่ละช่วงเวลา (Woodward & Bartel, 2005) อย่างไรก็ตาม พบว่า IBA มีความคงตัวในสารละลายมากกว่า IAA และสามารถกระตุ้นการชักนำให้เกิดรากใหม่ในพืชได้ดีกว่า (Ludwig-Müller, 2000; Nordstrom et al., 1991) นอกจากนี้ IBA ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งออกซินที่สำคัญในการกระตุ้นการยืดตัวของลำต้นในพืช (Yang & Davies, 1999) มักใช้ในการชักนำให้เกิดรากในมะเขือเทศ ถั่ว ดอกทานตะวัน เป็นต้น



ภาพที่ 7 โครงสร้างโมเลกุลของ IBA

ที่มา: Damodaran and Strader (2019)

การชักนำให้เกิดราก (Root induction)

การสร้างรากเป็นระยะการขยายพันธุ์ของพืชที่ถูกควบคุมโดยตัวแปรทางสรีรวิทยา กายวิภาค พันธุกรรม และชีวเคมี รากที่เกิดขึ้นมาเรียกว่า รากพิเศษ (Adventitious roots; ARs) การสร้าง ARs สามารถแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่ 1) พืชส่งสัญญาณกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อ 2) เซลล์

แบ่งตัวและมีการเปลี่ยนแปลง (Differentiation) เพื่อสร้าง AR primordium 3) พัฒนาเป็น Rp (Root-derived cell division and cell expansion) และ 4) เจริญเติบโตเป็น ARs (De Klerk et al., 1999) ซึ่งรากพิเศษนี้สามารถถูกชักนำให้เกิดจากเซลล์พาเรนไคมา (Parenchyma cell) เช่น เซลล์พาเรนคิมา เช่น ไซเลม (Xylem) หรือโฟลเอม (Phloem) หรือจะเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (Meristematic cells) เช่น แคมเบียม (Cambial cells) โดยถูกกระตุ้นด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เช่น IAA IBA NAA เป็นต้น

การปรับสภาพต้นกล้า (Acclimatization)

เป็นวิธีการนำเนื้อเยื่อที่มียอดและรากที่สมบูรณ์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงย้ายไปยังสภาพแวดล้อมธรรมชาติ ต้นพืชจึงจำเป็นต้องปรับตัวเพื่อสามารถรอดชีวิตจากความแตกต่างของสภาพแวดล้อม เนื่องจากสภาวะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออยู่ในสภาวะที่มีการควบคุมทั้งแสง อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีผลกระทบอย่างมากต่อประสิทธิภาพและผลผลิตของพืช ดังนั้นลักษณะของต้นพืชในระบบดังกล่าวจะแตกต่างจากต้นพืชที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติ เช่น ลักษณะใบบางและปราศจากไขเคลือบผิวใบ รากมีลักษณะอ่อนนุ่มและไม่มีขนราก เป็นต้น ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของจีโนมการเปลี่ยนแปลงทางสภาวะแวดล้อมที่เกิดขึ้นบ่อยครั้ง ทำให้พืชต้องพัฒนาระบบเผาผลาญที่มีความยืดหยุ่น (Flexible metabolic) และพันธุกรรม เพื่อรักษาการทำงานของเซลล์ต่อความไม่เสถียรของสิ่งแวดล้อม (Kleine et al., 2021) ซึ่งปกติจะเพิ่มความเข้มข้นแสงและอุณหภูมิให้กับต้นพืชหรือนำภาชนะเพาะเลี้ยงไปวางในโรงเรือนหลังคาพลางแสงแดดที่กันฝนได้และมีการถ่ายเทอากาศดี โดยสภาพแวดล้อมดังกล่าวจะส่งผลให้พืชสร้างไขเคลือบผิวใบขึ้นและสามารถสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น วิธีการก่อนย้ายปลูกต้องล้างวุ้นอาหารที่ติดอยู่บริเวณรากและโคนออกให้หมด เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ที่อาจเกิดการปนเปื้อนได้ นอกจากนี้การใช้เครื่องปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของพืชได้ (สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร, 2557) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตอบสนองที่รวดเร็วแม่นยำ และมีประสิทธิภาพเพื่อให้พืชสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งกระตุ้นเหล่านี้ได้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

การขยายพันธุ์กัญชงด้วยการใช้ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับเพิ่มปริมาณต้นที่ปลอดโรคนั้น พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งเพื่อชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ (Shoot multiplication) นั้นมีรายงานจากหลายงานวิจัยที่ผ่านมา โดยทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณต้นกัญชงแต่ละพันธุ์ ปัจจัยที่ได้ทำการศึกษานั้น ได้แก่ สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน ภาชนะที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยง วิธีการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวเนื้อเยื่อ เป็นต้น เช่น Thacker et al. (2018) ทำการศึกษาฮอร์โมนและปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสในกัญชง 6 พันธุ์ โดยตัดลำต้นขนาด 10-15 cm เพาะเลี้ยงบนอาหาร 3 แบบ คือ 1) อาหาร MS salts ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 µM และ Kinetin ความเข้มข้น 1 µM 2) อาหาร MB5D1K ที่เติมสารละลาย Gamborgs vitamins ปริมาตร 500 µL สารละลาย myo-Inositol ความเข้มข้น 0.05 g/mL 2,4-D ความเข้มข้น 5 µM และ Kinetin ความเข้มข้น 1 µM และ 3) อาหาร MTSU ที่เติม Thiamine ความเข้มข้น 1 mg/100 mL casein ความเข้มข้น 10 mg/100 mL และ nicotinic acid ความเข้มข้น 0.4 mg/100 mL ตามอัตราส่วนความเข้มข้นของ PGRs ที่แตกต่างกันถึง 16 กรรมวิธี พบว่า แคลลัสมีน้ำหนักมากที่สุดเท่ากับ 0.56 g บนอาหาร MB5D1K รองลงมา คือ อาหาร MS salts และอาหาร MTSU ตามลำดับ Wróbel et al. (2020) ประยุกต์วิธีการตัดชำข้อปล้องและปลายยอดสำหรับการสร้างเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็วของกัญชงพันธุ์ Epsilon 68 ที่ใช้สำหรับผลิตเส้นใย อีกทั้งยังอุดมไปด้วย CBD โดยเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ ที่ใช้ไซโตไคนิน (Cytokinin) โดยเพาะเลี้ยงปลายยอดขนาด 0.5 cm ข้อปล้อง และตาข้างขนาด 0.5 cm บนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม PGRs 3 ตัว ได้แก่ 6-Benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 0.5–2.0 mg/L thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.1–0.5 mg/L และ meta-topolin (mT) ความเข้มข้น 0.1–1 mg/L พบว่า อาหาร MS ที่เติม TDZ ให้จำนวนยอดที่สูงที่สุด (2.5±1.25 ยอดต่อ 1 ชิ้นส่วนพืช) มีการตอบสนองการสร้างยอดของชิ้นส่วนพืชสูงสุด (59-70%) และมีการสร้างยอดอย่างน้อย 2 ยอดใหม่ต่อ 1 ชิ้นส่วนพืช ต่างกับอาหารที่เติมด้วย BAP และ mT จากนั้น Stephen et al. (2023) ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณกัญชงพันธุ์ TJ's CBD พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วย Clorox® ความเข้มข้น 20%, 40% และ 60% เป็นเวลา 10 นาทีไม่มีผลต่ออัตราการปนเปื้อนของกัญชง การใช้อาหารเพาะเลี้ยง Murashige & Skoog (MS) และ Linsmaier & Skoog (LS) ส่งผลต่อค่าน้ำหนักสด (0.85±0.10 และ 0.96±0.10 g ตามลำดับ)

ความยาวยอด (7.12±0.67 และ 7.28±0.67 cm ตามลำดับ) จำนวนยอด (3.18±0.30 และ 3.93±0.30 ยอด ตามลำดับ) และคุณภาพดีที่สุด การใช้ sucrose ความเข้มข้น 1.5% และ 3.0% ส่งผลให้ค่าน้ำหนักสด (1.40±0.16 และ 1.25±0.16 g ตามลำดับ) ความยาวยอด (7.00±0.62 และ 7.29±0.62 cm ตามลำดับ) และคุณภาพดีที่สุด การใช้สารทำให้เกิดเจล (Gelling agent) ได้แก่ agar agargellan และ gellan gum ไม่มีผลต่อค่าน้ำหนักสด ความยาวยอด จำนวนยอด และคุณภาพของต้นกัญชง อาหารเพาะเลี้ยงที่มีค่า pH เท่ากับ 5.8 6.0 และ 7.0 ส่งผลให้ค่าน้ำหนักสด ความยาวยอด จำนวนตาข้าง และอัตราการเกิดรากมากที่สุด และการเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 28 และ 26°C ส่งผลให้ค่าน้ำหนักสด ความยาวยอด จำนวนตาข้าง และคุณภาพดีกว่าอุณหภูมิต่ำ การใช้ปลายยอดและตาข้างในการเพิ่มปริมาณมีอัตราการเพิ่มจำนวน (Multiplication rate) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) อีกทั้ง TDZ สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดมากกว่า BA และ 2iP (6-(γ,γ-dimethylallylamino) purine) โดยชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 5.0 µM มีค่าน้ำหนักสดและจำนวนตาข้างมากที่สุดแต่มีความยาวยอดน้อยที่สุด และในการชักนำให้เกิดราก พบว่า NAA ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 µM และ IBA ความเข้มข้น 2.5 µM ส่งผลให้น้ำหนักรากและจำนวนตาข้างมีจำนวนมากที่สุด และ Ioannidis et al. (2022) ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์กัญชง 2 พันธุ์ คือ high cannabidiol (H_CBD) และ high cannabigerol (H_CBG) เพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์ในอาหารกึ่งแข็ง โดยใช้ส่วนข้อปล้องยาวประมาณ 3.5 cm ปัจจัยที่ศึกษา คือ 1) ภาชนะที่มีและไม่มีการให้อากาศ 2) การใช้ indole-3-butyric acid (IBA) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความเข้มข้นที่ต่างกัน (0 2.46 4.92 และ 9.84 µM) การใช้สารละลาย IBA ความเข้มข้นที่ต่างกัน (0 2.46 4.92 และ 9.84 µM) ที่กรองด้วย Syringe filter และการจุ่มลงในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 15 mM 3) ระยะเวลาในการจุ่มในสารละลาย IBA (2 4 และ 6 นาที) เพาะเลี้ยงบนอาหาร ½MS อุณหภูมิ 23±1°C ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง/วัน ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 50 PPFD พบว่า การจุ่มลงในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 15 mM เป็นเวลา 4 นาที สามารถทำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด (H_CBD 9.47 และ H_CBG 7.79 ราก) และการเพาะเลี้ยงในภาชนะที่มีและไม่มีการให้อากาศบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.46 µM และ 4.92 µM ในภาชนะที่ไม่มีการให้อากาศ แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์การเกิดรากที่สูงที่สุด (H_CBD 100% และ H_CBG 95.83%) อีกทั้ง 2 สายพันธุ์ เจริญเติบโตได้ดีในภาชนะที่ไม่มีการให้อากาศ เพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 4.92 µM โดยส่งผลให้มีอัตราการ

รอดชีวิตสูงถึง 95% นอกจากนี้มีรายงานวิจัยที่ทำการชักนำให้เกิดยอดด้วยการใช้ชิ้นส่วนช่อดอกที่โตเต็มวัยและยังไม่โตเต็มวัย โดยเลือกกัญชงที่มีปริมาณสาร THC สูงทั้งหมด 3 พันธุ์ เก็บเกี่ยวตอนที่ต้นมีระยะ 2-3 สัปดาห์หลังออกดอก เพาะเลี้ยงในอาหาร MS vitamins ผสมกับซูโครส 3% Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้น 1 µM PhytaGel 2.2 g^{-1} และเติม TDZ ที่มีความเข้มข้น 0-10 µM จากนั้นชักนำรากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS salts and vitamins ที่เติมซูโครส 3% activated charcoal 0.03% agar 0.8% kinetin ความเข้มข้น 1.86 µM และ NAA ความเข้มข้น 0.54 µM พบว่า ที่ TDZ ความเข้มข้น 10 µM สามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนช่อดอกได้มากที่สุด คือ 4-5 ยอด (Piunno et al., 2019) นอกจากนี้ การประยุกต์ใช้ระบบ TIB ในการเพิ่มปริมาณต้นกัญชงยังมีรายงานวิจัยค่อนข้างน้อย เช่น Rico et al. (2022) ทำการขยายพันธุ์กัญชงจากตาข้างทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่ Beatriz Mati และ Moniek จากสำนักงานพันธุ์พืชของสหภาพยุโรป (Community Plant Variety Office; CPVO) โดยศึกษาผลของ 1) ความถี่ในการให้อาหาร (3 หรือ 6 ครั้ง/วัน) 2) ชนิดของชิ้นส่วนพืช (ยอดหรือต้น) 3) จำนวนชิ้นส่วนพืช (8 10 และ 16 ชิ้น) 4) ธาตุอาหาร (อาหาร MS-½N, β-A และ β-B ที่เติม mT ความเข้มข้น 2 µM) 5) ปริมาณ sucrose (2 0.5 และ 0%) 6) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (4 และ 6 สัปดาห์) และ 7) ชนิดของไบโอรีแอคเตอร์ (ยี่ห้อ RITA® และ Plantform™) จากนั้นบันทึกผล 1) จำนวนยอดที่ยาวกว่า 15 mm 2) สัมประสิทธิ์การเพิ่มจำนวนยอดแบบทวีคูณ 3) ความยาวยอด และ 4) ร้อยละการเกิดยอด บันทึกผลเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดจำนวน 8 ชิ้น ในไบโอรีแอคเตอร์ของ RITA® หรือ 24 ชิ้น ในไบโอรีแอคเตอร์ของ Plantform™ ให้อาหารเป็นเวลา 1 นาที ทั้งหมด 3 ครั้ง/วัน (ทุก 8 ชั่วโมง) ในอาหาร β-A (ไม่มีวิตามิน) ที่เสริมด้วย mT ความเข้มข้น 2 µM และ sucrose 0.5% และ subculture ทุก ๆ 4 สัปดาห์ ให้ผลการทดลองทุกอย่างดีที่สุดในทั้ง 3 พันธุ์ หลังจากทำการชักนำให้เกิดยอดในกัญชงแล้วจึงต้องชักนำรากและปรับสภาพให้ต้นกัญชงสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกได้ โดย McLeod et al. (2022) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการออกรากของกิ่งชำกัญชงพันธุ์ I3 โดยศึกษาปัจจัยที่ผลต่อการออกราก 2 ปัจจัย คือ สภาพแวดล้อมในการขยายพันธุ์ ได้แก่ โรงเรือนที่มีการพ่นละอองน้ำเป็นระยะ (พ่นทุก 45 นาที เป็นเวลา 12 วินาที) และโดมที่มีการควบคุมความชื้น (ไม่มีการระบายอากาศเป็นเวลา 1-5 วัน จากนั้นเปิดระบายอากาศ 25% ในวันที่ 6-10 ระบายอากาศ 50% ในวันที่ 11-15 และระบายอากาศ 100% ในวันที่ 16) รูปแบบต่าง ๆ ของ IBA (การใช้ผงทัลคัมร่วมด้วยและสารละลาย) และความเข้มข้นของ IBA (0 3,000 และ

8,000 mg/L) พบว่า สภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อการออกราก และรากมีอัตราการตอบสนองได้ดีที่สุดที่ IBA ความเข้มข้น 3,000 mg/L ที่เติมผงทัลคัม (97% และ 89% ตามลำดับ) และรากมีการตอบสนองและมีคุณภาพลดลงเมื่อใช้ IBA ความเข้มข้น 8,000 mg/L ทั้ง 2 สภาพแวดล้อม

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์

1.1 เครื่องเขย่าหรือ Shaker (ยี่ห้อ N-BIOTEK, NB-205VL)

1.2 ตู้ถ่ายเชื้อหรือ Laminar Air Flow (ยี่ห้อ LaboGene, SCANLAF)

1.3 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง หรือ Analytical balance (ยี่ห้อ Sartorius, Practum 224-1S)

1.4 หม้อนึ่งความดันไอหรือ Autoclave (ยี่ห้อ Systec, VE-55)

1.5 เครื่องให้ความร้อนหรือ Hot Plate (ยี่ห้อ PHILIPS, HD4911)

1.6 ขวดดูแรนขนาด 250 1,000 และ 2,000 ml (ยี่ห้อ Duran)

1.7 ปิเปตแบบอัติโนมัติและทิปหรือ Autopipette and Pipette Tip (ยี่ห้อ ONiLAB, MicroPette plus)

1.8 บีกเกอร์หรือ Glass Beaker (ยี่ห้อ Duran)

1.9 จานเพาะเชื้อหรือ Petri Dish (ยี่ห้อ Duran)

1.10 ปากคีบหรือ Forceps (ยี่ห้อ Mira)

1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์หรือ Alcohol Burner

1.12 ขวดแก้วขนาด 8 oz.

1.13 ด้ามมีดผ่าตัดหรือ Scalpel Handle (ยี่ห้อ Mira)

1.14 ใบมีดผ่าตัดหรือ Blades Surgical (ยี่ห้อ Feather)

1.14 ขวดแก้วไบโอรีแอคเตอร์คู่ (ยี่ห้อ Duran)

1.15 เครื่องวัด pH หรือ pH meter (ยี่ห้อ SI Analytics, Lab 855)

1.16 แผ่นกรองอากาศชนิด polytetrafluoroethylene (PTFE) ขนาด 50 mm ขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน หรือ Filter Membrane (ยี่ห้อ AXIVA)

2. สารเคมี

2.1 Ethanol 95%

2.2 น้ำปราศจากไอออนหรือ Deionized Water

2.3 วุ้นหรือ Agar (ยี่ห้อ Himedia)

2.4 Mercury II Chloride หรือ $HgCl_2$ (ยี่ห้อ Q RëC)

2.5 Potassium Nitrate หรือ KNO_3 (ยี่ห้อ Himedia)

2.6 Ammonium Nitrate หรือ NH_4NO_3 (ยี่ห้อ Himedia)

2.7 Calcium Chloride หรือ $CaCl_2$ (ยี่ห้อ Himedia)

2.8 Magnesium Sulfate หรือ $MgSO_4$ (ยี่ห้อ Himedia)

2.9 Sucrose (ยี่ห้อ Himedia)

2.10 Potassium Dihydrogen Phosphate หรือ KH_2PO_4 (ยี่ห้อ Himedia)

2.11 Boric acid หรือ H_3BO_3 (ยี่ห้อ Himedia)

2.12 Manganese Sulfate หรือ $MnSO_4$ (ยี่ห้อ Himedia)

2.13 Zinc Sulfate หรือ $ZnSO_4$ (ยี่ห้อ Himedia)

2.14 Potassium Iodine หรือ KI (ยี่ห้อ Himedia)

2.15 Sodium Molybdate หรือ Na_2MoO_4 (ยี่ห้อ Himedia)

2.16 Copper II Sulphate หรือ $CuSO_4$ (ยี่ห้อ Himedia)

2.17 Myo-Inositol (ยี่ห้อ Himedia)

2.18 Cobalt II Chloride หรือ $CoCl_2$ (ยี่ห้อ Himedia)

2.19 Sodium Ethylenediaminetetraacetate หรือ Na_2EDTA (ยี่ห้อ Himedia)

2.20 Ferrous Sulfate หรือ $FeSO_4$ (ยี่ห้อ Himedia)

2.21 Glycine (ยี่ห้อ Himedia)

2.22 Nicotinic acid (ยี่ห้อ Himedia)

2.23 Pyridoxine Hydrochloride (ยี่ห้อ Himedia)

2.24 Thiamine Hydrochloride (ยี่ห้อ Himedia)

2.25 Thidiazuron หรือ TDZ (ยี่ห้อ HiMedia)

2.26 Sodium Hydroxide หรือ NaOH (ยี่ห้อ Himedia)

2.27 Indole-3-Butyric Acid หรือ IBA (ยี่ห้อ Loba Chemie)

2.28 ผงทัลคัมหรือ Talc powder

พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ในการวิจัยนี้ใช้ต้นแม่กัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel ที่ผ่านการคัดเลือกโดยภาคอุตสาหกรรมที่ร่วมทำการวิจัย คือ บริษัท รุ่งเรืองกัญพาณิชย์ จำกัด ซึ่งเป็นกัญชงที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ ไม่เป็นโรค โดยปลูกในวัสดุปลูก ได้แก่ ขุยมะพร้าว พีทมอส และเพอร์ไรท์ เป็นอัตราส่วน 1:1:0.5 (w/w) ซึ่งอยู่ในห้องควบคุมสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิเท่ากับ 25±2°C ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน และความเข้มแสง 2,520 flux (ในระยะการเจริญเติบโตของใบและกิ่งหรือ vegetative phase) ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ ช่อดอก ตาข้าง และยอด โดยทำการตัดกิ่งจากต้นแม่ด้วยกรรไกร และตัดใบที่ใกล้ชิ้นส่วนพืชที่ต้องการใช้ออก เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อจากความเสียหายในการฟอกฆ่าเชื้อที่มากเกินไป

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวชิ้นส่วนกัญชง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญของกัญชง 3 ชนิด ได้แก่ ดอก ยอด และตาข้าง ที่ผ่านการคัดเลือกโดยภาคอุตสาหกรรมที่ร่วมทำการวิจัย ทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำสะอาดที่ผสมน้ำยาล้างจานจำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 30 นาที เมื่อทำความสะอาดเรียบร้อยแล้วทำการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวด้วยเมอร์คิวรี (II) คลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 5 7 และ 10 นาที จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ทั้งหมด 3 ครั้ง ซับให้แห้งบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นวางบนอาหารในขวดแก้วขนาด 8 oz. ที่มีอาหารสังเคราะห์ MS (Murashige & Skoog, 1962) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 5.6-5.8 ปรับด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N โดยมีการผสมซูโครส 3% และวุ้น (Agar) 0.85% เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2°C ทำ 3 ซ้ำต่อ 1 กรรมวิธี และ 1 ซ้ำจะมีทั้งหมด 10 ชิ้นส่วนพืช จากนั้นบันทึกร้อยละการปนเปื้อนเป็นระยะเวลา 7 วัน

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยกำหนดความเข้มข้นของ TDZ แตกต่างกัน ได้แก่ 0 0.05 0.10 0.50 และ 1.00 mg/L เติมในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 5.6-5.8 ปรับด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2°C ใน 1 ชุดการทดลองประกอบด้วย 1 ชิ้นส่วนพืช ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง ทั้งหมด 10 ซ้ำ ต่อ 1 กรรมวิธี ทำการเปลี่ยนสารละลายอาหารใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์ และทำการบันทึกจำนวนยอดทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor; TIB)

การทดลองนี้วางแผนแบบ 5*3 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) โดยการนำชิ้นส่วนของกัญชงเขย่าในขวดชมพู่ขนาด 250 ml ที่บรรจุอาหารเหลวที่ต้องการทดสอบเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เพื่อเพิ่มจำนวนโดยคัดต้นพันธุ์ที่ไม่มีเชื้อจำพวกเชื้อจุลินทรีย์ endophytic ในลำต้น เพื่อเตรียมเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบขวดคู่ต่อไป เมื่อได้ต้นพันธุ์ที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แล้ว จะทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบขวดคู่ (TIB) โดยใช้ขวด Laboratory Bottle (Schott Duran, Germany) ขนาด 2 L จำนวน 2 ขวด (สำหรับเนื้อเยื่อ 1 ขวด และสำหรับอาหาร 1 ขวด) ซึ่งควบคุมการทำงานผ่านคอมพิวเตอร์โปรแกรม controller v.0

นำเนื้อเยื่อของกัญชงลงเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมีช่วงเวลาในการให้สารละลายอาหารเท่ากัน คือ 1 นาที ใช้สูตรอาหารเหมือนกับการทดลองบนอาหารแข็ง คือ อาหารเหลว MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 0 0.05 0.10 0.50 และ 1.00 mg/L และความถี่ในการให้อาหาร 2 ครั้ง/วัน (ทุก 12 ชั่วโมง) 3 ครั้ง/วัน (ทุก 8 ชั่วโมง) และ 6 ครั้ง/วัน (ทุก 4 ชั่วโมง) ประยุกต์จากวิธีของ (Rico et al., 2022) และใช้อาหารเหลวปริมาตร 250 ml โดยในการทดลองนี้จะให้ชิ้นส่วนยอดเริ่มต้นจำนวน 10 ยอดต่อชุดเพาะเลี้ยงเป็น 1 ซ้ำ และความสูงเริ่มต้นประมาณ 1 cm โดยเลือกชิ้นเนื้อเยื่อขนาดและจำนวนใบใกล้เคียงกัน เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแล้วไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกการทดลอง (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ)

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนพืชจำนวน 10 ชิ้น ในขวดแก้วไบโอรีแอคเตอร์คู่ และใช้แผ่นกรองอากาศชนิด polytetrafluoroethylene (PTFE) ขนาด 50 ml ขนาดรูพรุน 0.2 µm อาหารและอุปกรณ์ทั้งหมดจะต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้งาน เมื่อจัดเตรียมทั้งเนื้อเยื่อและอุปกรณ์เรียบร้อยแล้ว จึงตั้งเวลาในเครื่องควบคุมเวลา (Timer) เพื่อกำหนดความถี่ในการให้อาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสงสว่าง 18 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ในแต่ละชุดการทดลอง โดยนับจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช จำนวนใบ และความยาวของ ชิ้นส่วนพืชทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นพืชเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดรากต่อไป

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการยืดยาวของยอดกัญชงที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยระบบเพาะเลี้ยงต่างกัน

ขั้นตอนหลังจากการเพิ่มปริมาณจำนวนยอดแล้วจึงทำการยืดยอดนำเนื้อเยื่อกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน 2 ระบบ คือ บนอาหารกึ่งแข็งและในอาหารเหลวจากระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว ใช้ชิ้นส่วนยอดขนาดเท่ากันความยาวประมาณ 1 cm (ความสูงเริ่มต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 95%) จำนวน 1 ยอด/ขวด เป็น 1 ซ้ำ กรรมวิธีละ 20 ซ้ำ กระตุ้นให้เกิดการยืดยาวของยอดด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ผสมผงถ่าน (Activated carbon) ความเข้มข้น 1 g/L และไม่เติมสารคล้ายฮอร์โมน เพื่อให้ยอดมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ และความสม่ำเสมอของยอดจะทำให้ดำเนินงานขั้นตอนต่อไปได้ง่ายขึ้น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสงสว่าง 18 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกความสูงของแต่ละต้น เมื่อครบ 4 สัปดาห์ (วัดความสูงเนื้อเยื่อก่อนเปลี่ยนอาหาร) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติทดสอบ Independent t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 5 การศึกษาความเข้มข้นของ IBA ที่กระตุ้นการเกิดรากและการย้ายอนุบาลต้นกัญชง

นำต้นกัญชงที่ผ่านการกระตุ้นการยืดยาวยอดจากการเพาะเนื้อเยื่อบนอาหาร MS ที่ผสมผงถ่านและไม่เติมสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมน ศึกษาผลของสารกระตุ้นการเกิดรากและการปรับสภาพต้นก่อนย้ายปลูก (Acclimatization) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เริ่มจากการย้ายอนุบาลต้นกัญชงตัดยอดกัญชงอายุประมาณ 4 สัปดาห์ มีความยาวประมาณ 2 cm (ทำการวัดความสูงก่อนย้ายชำ) จากนั้นนำต้นกัญชงชุบสารละลาย IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมผงทัลคัม (สารละลาย IBA ปริมาตร 1 ml ต่อผงทัลคัม 0.7 g) แบ่งเป็น 4 กรรมวิธี ได้แก่

1) ผงทัลคัมที่ผสมน้ำ (Control) 2) ผงทัลคัมที่ผสม IBA ความเข้มข้น 1,000 mg/L 3) ผงทัลคัมที่ผสม IBA ความเข้มข้น 1,500 mg/L และ 4) ผงทัลคัมที่ผสม IBA ความเข้มข้น 2,000 mg/L ปักชำในวัสดุปลูก คือ พีทมอสกับขุยมะพร้าว (แช่น้ำ 1 คืน) ซึ่งมีอัตราส่วน 1:1 (วัสดุทุกอย่างผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) หุ้มด้วยพลาสติกเจาะรูเพื่อรักษาความชื้น ทำการทดลองทั้งหมด 20 ซ้ำ ต่อ 1 กรรมวิธี เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2°C และให้แสงสว่าง 18 ชั่วโมงต่อวัน โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์การออกราก จำนวนราก ความยาวราก และความสูงต้นเมื่อครบ 4 สัปดาห์

หลังจากทำการปรับสภาพต้นเรียบร้อยแล้ว ทำการย้ายต้นที่รอดชีวิตลงกระถางขนาด 20 นิ้ว บันทึกจำนวนวันที่แตกยอดใหม่และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังสูตรคำนวณนี้

$$\text{อัตราการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เหลือรอด}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

เมื่อต้นพันธุ์กัญชงปรับตัวได้ดีจึงทำการสุ่มต้นไปย้ายปลูกในกระถางในโรงเรือนและทำการบำรุงรักษาต้นพันธุ์ตามปกติ บันทึกอัตราการรอดตายของต้นพันธุ์ที่ได้ ลักษณะต้นกัญชง เช่น ความสูงต้น จำนวนกิ่ง และความกว้างของทรงพุ่ม และเปรียบเทียบจำนวนช่อดอกและวิเคราะห์ปริมาณ CBD ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) เมื่ออายุครบ 4 เดือน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

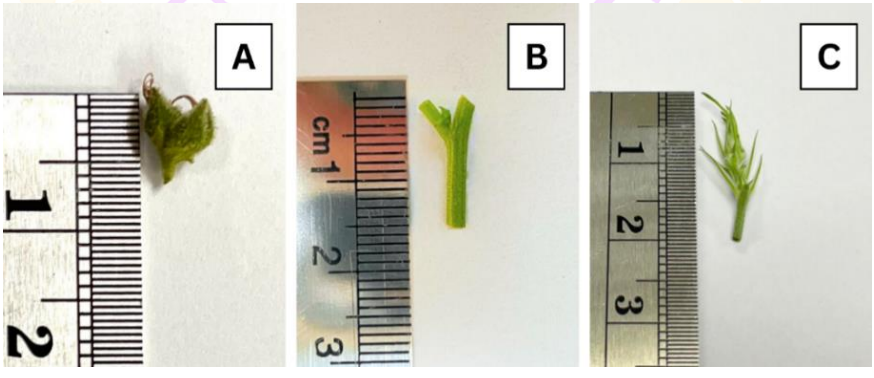
การทดลองประกอบด้วยการศึกษาเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อจำนวน 9 กรรมวิธี ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ จำนวน 5 กรรมวิธี สภาวะที่เหมาะสมในระบบ TIB จำนวน 15 กรรมวิธี และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IBA จำนวน 4 กรรมวิธี จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและตรวจสอบความแตกต่าง โดยหาค่า Analysis of variance (ANOVA) โดยใช้ Duncan ‘s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวชิ้นส่วนกัญชง

จากการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อฟอกฆ่าเชื้อใน $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 5 7 และ 10 นาที การทดลองนี้ใช้เนื้อเยื่อเจริญของกัญชงทั้งหมด 3 ส่วน คือ ดอก ข้อที่มีตาข้าง และยอด (ภาพที่ 8) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากการคัดเลือกของภาคเอกชนที่ร่วมทำการวิจัย จากข้อมูลตารางที่ 2 อัตราการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนพืชหลังการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างที่ฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที เกิดการปนเปื้อนน้อยที่สุด (6.67%) และมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุดเท่ากับ 27.78% โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการทดลองอื่น นอกจากนี้ชิ้นส่วนดอกมีอัตราการปนเปื้อนมากที่สุด (83.33-100%) จากการฟอกด้วยสารละลาย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% พบว่า เมื่อใช้เวลามากขึ้นเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนจุลินทรีย์จะน้อยลง ส่วนมากจะเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียซึ่งส่งผลให้เนื้อเยื่อตาย (ภาพที่ 9) และพบว่า ในช่อดอกมีการปนเปื้อนมากที่สุด เนื่องจากมีลักษณะเป็นแบบ spike ประกอบไปด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียวเข้มหุ้มรังไข่ไว้ภายใน stigma 2 อัน ในขณะเดียวกันหากใช้ความเข้มข้นของสาร Mercuric chloride สูงและระยะเวลานานเนื้อเยื่อจะมีสีน้ำตาลดังภาพที่ 9

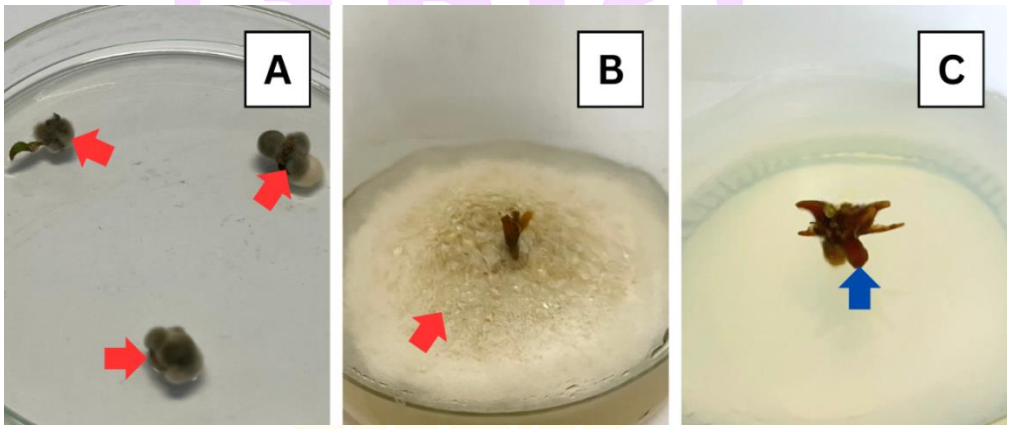


ภาพที่ 8 ชิ้นตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ช่อดอก (A) ข้อลำต้นที่มีตาข้าง (B) และยอด (C)

ตารางที่ 2 ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนพืชหลังการฟอกฆ่าเชื้อ

การทดลอง	ชิ้นส่วนพืช	เวลา (นาที)	อัตราการปนเปื้อนในชิ้นส่วนพืช (%)	อัตราการรอดชีวิต (%)
1	ช่อดอก	5	100.00^{f}	0.00^{d}
2		7	96.67^{f}	0.00^{d}
3		10	83.33^{e}	1.11^{d}
4	ปลายยอด	5	63.33^{d}	15.56^{bc}
5		7	33.33^{c}	14.44^{c}
6		10	26.67^{bc}	15.56^{bc}
7	ข้อลำต้นที่มีตาข้าง	5	56.67^{d}	14.44^{c}
8		7	16.67^{ab}	20.00^{b}
9		10	6.67^{a}	27.78^{a}

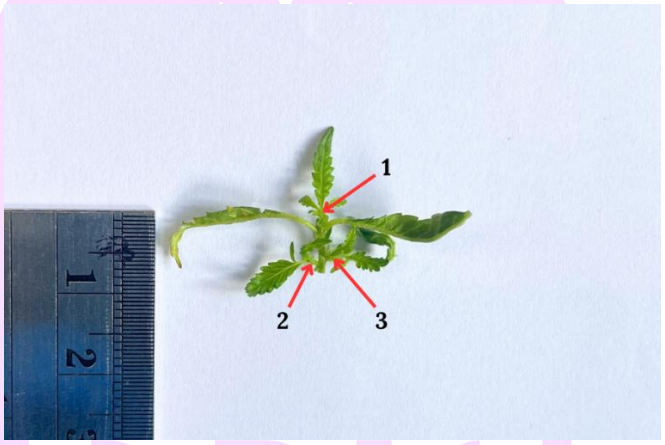
หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 9 การปนเปื้อนจากเชื้อราของเนื้อเยื่อกัญชงส่วนช่อดอกและตาข้างในขวดเพาะเลี้ยง (A, B) และเนื้อเยื่อส่วนตาข้างที่มีสีน้ำตาล (C)

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อแล้วนั้น จึงนำชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อจากการทดลองที่ 1 ทดสอบหาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกัญชงให้เพียงพอต่อการทดลองบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ที่ต่างกันทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทั้งนี้ได้ทำการวัดผลการทดลองโดยนับจำนวนยอดของเนื้อเยื่อกัญชงดังภาพที่ 10 และลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อทุกสัปดาห์



ภาพที่ 10 การนับจำนวนยอดของเนื้อเยื่อกัญชงในการทดลอง
(หมายเลข 1 2 และ 3 หมายถึง ยอดที่ 1 2 และ 3)

จากการทดลอง พบว่า จากตารางที่ 3 ที่ระยะเวลาสัปดาห์ที่ 4 สูตรอาหารที่ทำให้เนื้อเยื่อกัญชงส่วนตาข้างเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ทำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นยอด คือ สูตรที่ 3 อาหาร MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L เป็นอาหารสูตรที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 12) มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 4.7±1.57 ยอด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Control) ที่มีจำนวนยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 2.1±0.32 ยอด ทำให้เห็นว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05) ดังตารางที่ 3 และจากการบันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพบว่า มีการเจริญเติบโตที่ปกติ ใบเขียว และลำต้นตรง ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 3 จำนวนยอดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกัญชงบนแต่ละสูตรอาหารในแต่ละสัปดาห์

การทดลอง	สูตรอาหาร	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)			
		สัปดาห์ที่			
		1	2	3	4
1	MS + TDZ 0 mg/L	1.3±0.48^{c}	1.6±0.52^{c}	1.9±0.57^{c}	2.1±0.32^{d}
2	MS + TDZ 0.05 mg/L	1.2±0.42^{c}	2.0±0.67^{bc}	2.4±0.52^{bc}	2.5±0.71^{cd}
3	MS + TDZ 0.10 mg/L	1.8±0.42^{ab}	3.4±0.70^{a}	3.7±0.68^{a}	3.8±0.63^{b}
4	MS + TDZ 0.50 mg/L	2.2±0.63^{a}	3.9±1.10^{a}	4.4±1.35^{a}	4.7±1.57^{a}
5	MS + TDZ 1.00 mg/L	1.6±0.52^{bc}	2.6±0.70^{b}	2.9±1.00^{b}	3.2±0.92^{bc}

หมายเหตุ: เนื้อเยื่อกัญชงเริ่มต้น 1 ชิ้นต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง

อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละคอลัมน์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการศึกษาความสูงของกัญชงในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า อาหารสูตรที่ 3 คือ อาหาร MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L ส่งผลให้เนื้อเยื่อกัญชงมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 2.30±0.42 cm มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05) รองลงมา คือ อาหาร MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 0 และ 0.10 mg/L (2.02±0.32 และ 2.11±0.29 cm ตามลำดับ)

ตารางที่ 4 ความสูงเฉลี่ยของกัญชงบนแต่ละสูตรอาหารในสัปดาห์ที่ 4

การทดลอง	สูตรอาหาร	ความสูงเริ่มต้น^{ns} (cm)	ความสูงเฉลี่ย (cm)
1	MS + TDZ 0 mg/L	1.5	2.02±0.32^{ab}
2	MS + TDZ 0.05 mg/L	1.5	1.93±0.33^{b}
3	MS + TDZ 0.10 mg/L	1.5	2.11±0.29^{ab}
4	MS + TDZ 0.50 mg/L	1.5	2.30±0.42^{a}
5	MS + TDZ 1.00 mg/L	1.5	1.88±0.17^{b}

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละคอลัมน์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกัญชงบนอาหารกึ่งแข็ง

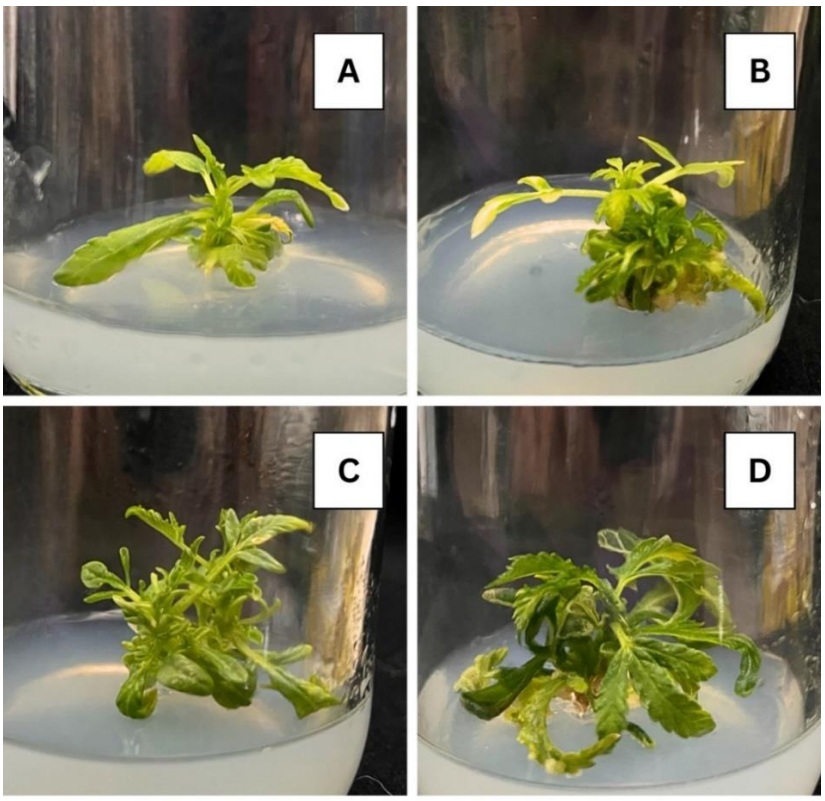
การทดลอง	สูตรอาหาร	ลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ
1	MS + TDZ 0 mg/L	- มีการเพิ่มขึ้นของยอดน้อยมาก - เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตปกติ ใบไม่หงิกงอ
2	MS + TDZ 0.05 mg/L	- มีการเพิ่มขึ้นของยอดน้อย - เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตปกติ ใบไม่หงิกงอ
3	MS + TDZ 0.10 mg/L	- มีการเพิ่มขึ้นของยอดมาก - เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตปกติ ใบไม่หงิกงอ - โคนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัส
4	MS + TDZ 0.50 mg/L	- มีการเพิ่มขึ้นของยอดมาก - เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตปกติ ใบไม่หงิกงอ - โคนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัส - มีการเพิ่มขึ้นของยอดมาก

ตารางที่ 5 (ต่อ)

การทดลอง	สูตรอาหาร	ลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ
5	MS + TDZ 1.00 mg/L	- เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตปกติ ใบไม่หงิกงอ - โคนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัส

การศึกษาการสร้างยอดของกัญชงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมและเติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอิโอ (Olympus SZ61) กำลังขยาย 0.6x ด้วยโปรแกรม EPview พบว่า ตาข้างกัญชงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม TDZ มีการเพิ่มจำนวนยอด (Shoot multiplication) ต่างจากอาหารสูตร MS ไม่เติม TDZ ที่ไม่มีการสร้าง Multiple shoot ดังภาพที่ 11

ภาพที่ 11 การสร้างยอดของกัญชงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ TDZ ความเข้มข้น 0 (A) และ 0.5 mg/L (B) อายุ 1 สัปดาห์ (Scale bar = 1 mm)



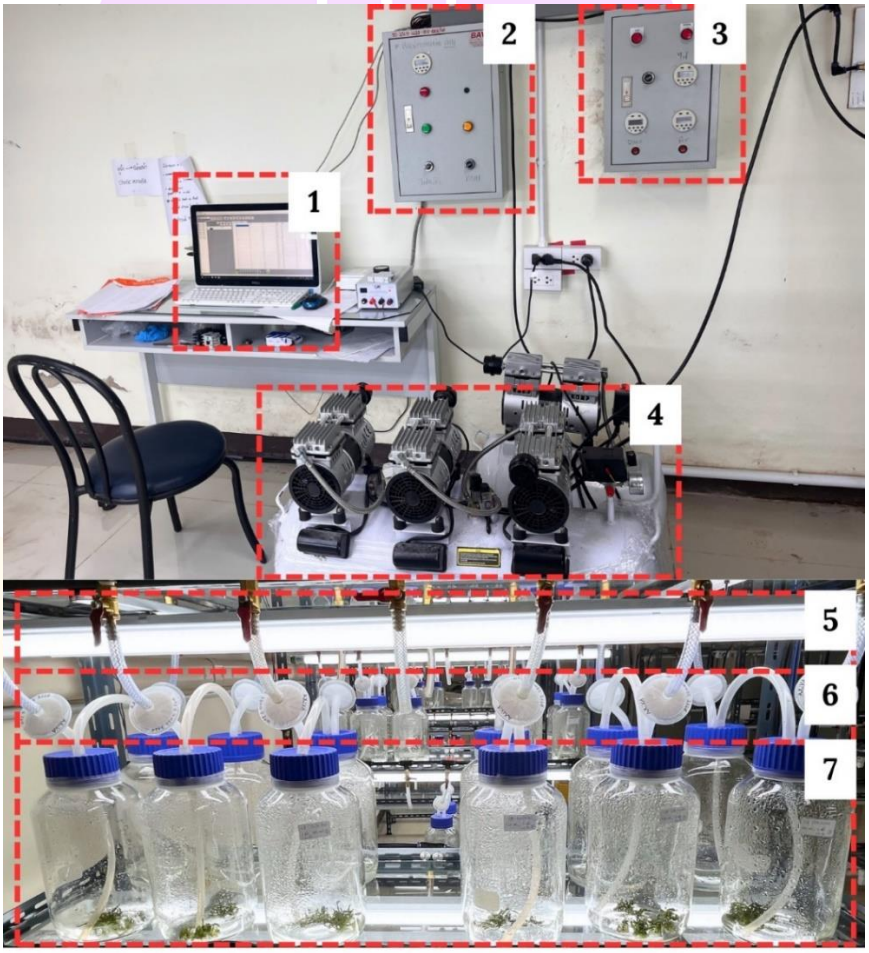
ภาพที่ 12 ลักษณะเนื้อเยื่อกัญชงบนอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L ที่ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยอดมากที่สุดสัปดาห์ที่ 1-4 (A-D)

การทดลองที่ 3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor; TIB)

การทดลองศึกษาสภาวะในการเพิ่มปริมาณยอดใน TIB โดยกำหนด 2 ปัจจัย คือ สูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหาร โดยตัวระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบ TIB จะใช้ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 2 L จำนวน 2 ขวด (สำหรับเนื้อเยื่อ 1 ขวด และสำหรับอาหาร 1 ขวด) ซึ่งควบคุมการทำงานผ่านคอมพิวเตอร์โปรแกรม controller v.0 ในการควบคุมการทำงานของปั๊มลมเพื่อให้อากาศผ่านตัวกรองอากาศ จากนั้นจะดันอาหารจากขวดอาหารไปยังขวดเนื้อเยื่อพืช (อาหารไหลไปและกลับ) โดยมีการกำหนดระยะเวลาและจำนวนครั้งในการได้รับอาหารของพืชแตกต่างกัน ทำให้พืชไม่จมในอาหารเหลวตลอดเวลา โดยเลือกช่องที่จะให้ทำงานและตั้งเวลาในการทำงานตามที่ต้องการ

จากนั้นคอมพิวเตอร์จะสั่งงานผ่านตู้ควบคุมให้ปั๊มลมทำงานเพื่อปล่อยลมเพื่อดันอาหารไป-กลับตามระยะเวลาที่กำหนด อุปกรณ์ที่ใช้ในระบบนี้ดังภาพที่ 13

หลังจากการเพาะเลี้ยงในกรรมวิธีต่าง ๆ ทำการบันทึกจำนวนยอด (นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นมาจากเนื้อเยื่อ) และความสูงของลำต้น (วัดความสูงจากฐานลำต้นถึงจุดสูงสุดของยอด) ดังภาพที่ 10 และ 14 โดยเลือกชิ้นเนื้อเยื่อขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแล้วไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกการทดลอง ตัวอย่างดังภาพที่ 15



ภาพที่ 13 อุปกรณ์ที่ใช้ในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว โดยหมายเลข 1 คือ ระบบคอมพิวเตอร์ 2 คือ ตู้ควบคุมระบบปั๊มอากาศ 3 คือ ตู้ควบคุมระบบไฟ 4 คือ ปั๊มลม 5 คือ หลอดไฟ 6 คือ ตัวกรองอากาศ และ 7 คือ ขวดไบโอรีแอคเตอร์ที่บรรจุเนื้อเยื่อพืชและอาหาร

ภาพที่ 14 การวัดความสูงของเนื้อเยื่อกัญชงในการทดลอง

ภาพที่ 15 ลักษณะเนื้อเยื่อกัญชงเริ่มต้น

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า ในสัปดาห์ที่ 4 การทดลองที่ 5 ซึ่งใช้สูตรอาหาร MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.05 mg/L มีความถี่ในการให้อาหาร 3 ครั้ง/วัน (ทุก ๆ 8 ชั่วโมง) ทำให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดเฉลี่ยของกัญชงมากที่สุดเฉลี่ย 66.33±2.08 ยอด (ภาพที่ 16) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับการทดลองอื่น ๆ รองลงมา คือ การทดลองที่

11 ที่ใช้สูตรอาหาร MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.50 mg/L มีความถี่ในการให้อาหาร 3 ครั้ง/วัน (ทุก ๆ 8 ชั่วโมง) มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 58.33±1.53 ยอด และการทดลองที่ 8 ที่ใช้สูตรอาหาร MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.10 mg/L มีความถี่ในการให้อาหาร 3 ครั้ง/วัน (ทุก ๆ 8 ชั่วโมง) มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 55.00±1.00 ยอด ตามลำดับ โดยเนื้อเยื่อกัญชงมีลักษณะการเจริญเติบโตปกติ มีการเพิ่มขึ้นของยอดที่แน่นเป็นกระจุก ใบและลำต้นมีสีเขียวดังภาพที่ 16

เมื่อนำจำนวนยอดเฉลี่ยจากตารางที่ 6 ไปวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรทั้ง 2 ตัว (สูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหาร) พบว่า ทั้งสูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอด (sig. <0.001 และ sig. <0.001 ตามลำดับ) และยังมีผลร่วมกันระหว่างสูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหารส่งผลต่อจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 95% (sig. <0.001)

ตารางที่ 6 จำนวนยอดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกัญชงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวที่ระยะเวลาสัปดาห์ที่ 4

การทดลอง	สูตรอาหาร	ความถี่ในการให้อาหาร (ครั้ง/วัน)	จำนวนยอดเฉลี่ยเริ่มต้น^{ns}	จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย
1	MS+TDZ 0 mg/L	2	10	45.00±1.00^{efghk}
2		3	10	51.00±2.65^{d}
3		6	10	43.00±2.65^{hk}
4	MS+TDZ 0.05 mg/L	2	10	47.33±1.53^{de}
5		3	10	66.33±2.08^{a}
6		6	10	46.00±1.73^{efgh}
7	MS+TDZ 0.10 mg/L	2	10	48.33±1.53^{de}
8		3	10	55.00±1.00^{c}
9		6	10	44.33±2.52^{fghk}

ตารางที่ 6 (ต่อ)

การทดลอง	สูตรอาหาร	ความถี่ในการให้อาหาร (ครั้ง/วัน)	จำนวนยอดเฉลี่ยเริ่มต้น^{ns}	จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย
10	MS+TDZ 0.50 mg/L	2	10	44.00±1.00^{fghk}
11		3	10	58.33±1.53^{b}
12		6	10	47.33±1.53^{de}
13	MS+TDZ 1.00 mg/L	2	10	43.33±2.31^{ghk}
14		3	10	46.67±0.58^{efg}
15		6	10	42.33±2.52^{k}

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละคอลัมน์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

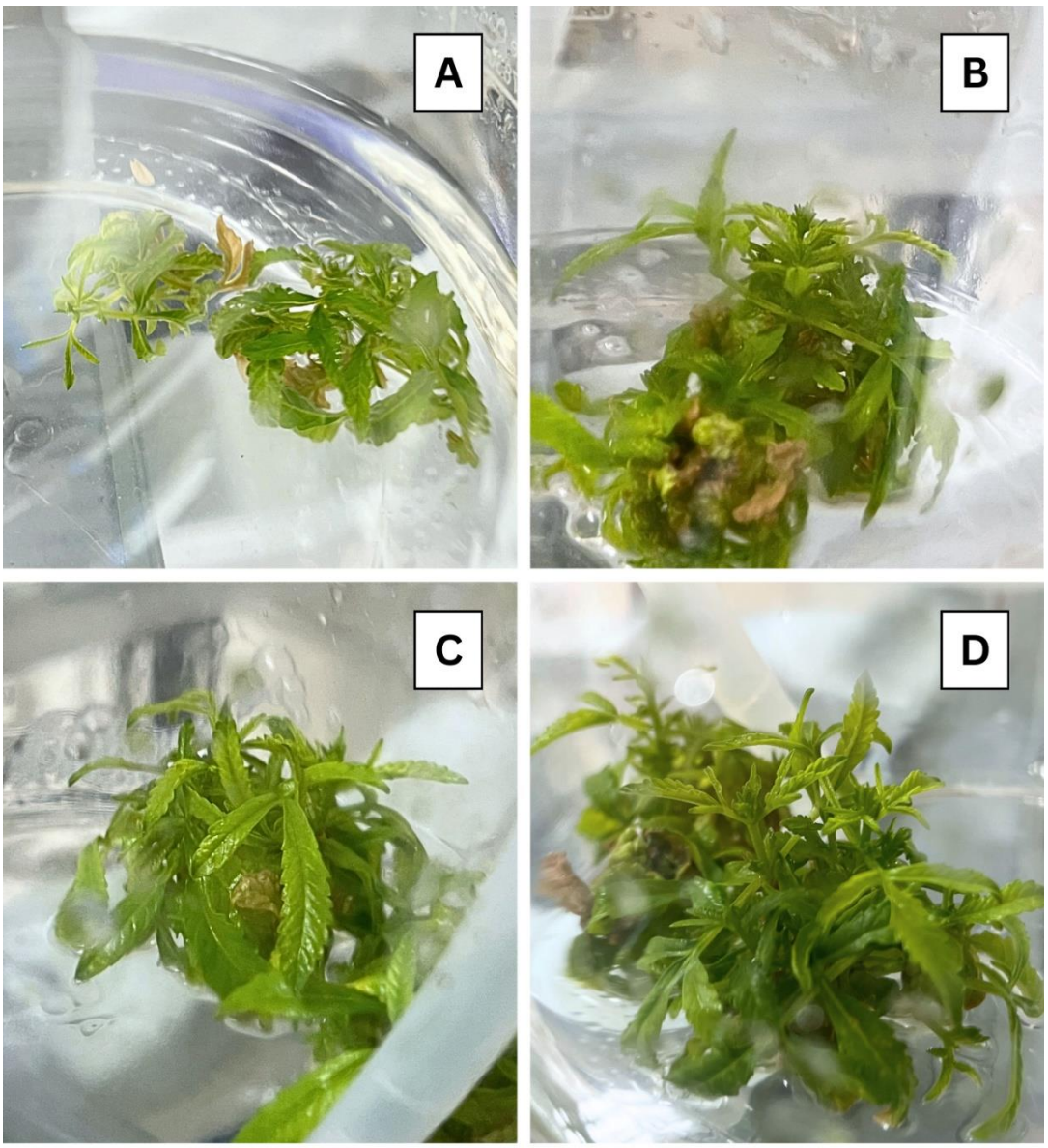
จากข้อมูลตารางที่ 7 พบว่า ในสัปดาห์ที่ 4 การทดลองที่ 5 ซึ่งใช้สูตรอาหาร MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.05 mg/L มีความถี่ในการให้อาหาร 3 ครั้ง/วัน (ทุก ๆ 8 ชั่วโมง) ทำให้ค่าเฉลี่ยความสูงของกัญชงมากที่สุดเฉลี่ย 2.33±0.31 cm (ภาพที่ 16) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับการทดลองอื่น ๆ รองลงมา คือ การทดลองที่ 8 ที่ใช้สูตรอาหาร MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.10 mg/L มีความถี่ในการให้อาหาร 3 ครั้ง/วัน (ทุก ๆ 8 ชั่วโมง) มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 2.10±0.10 cm และการทดลองที่ 15 ที่ใช้สูตรอาหาร MS ผสม TDZ ความเข้มข้น 1.00 mg/L มีความถี่ในการให้อาหาร 6 ครั้ง/วัน (ทุก ๆ 4 ชั่วโมง) มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 2.03±0.15 cm ตามลำดับ โดยเนื้อเยื่อกัญชงมีลักษณะการเจริญเติบโตปกติ มีการเพิ่มขึ้นของยอดที่แน่นเป็นกระจุก ใบและลำต้นมีสีเขียว

เมื่อนำความสูงเฉลี่ยจากตารางที่ 7 ไปวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรทั้ง 2 ตัว (สูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหาร) พบว่า ทั้งสูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหารที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของความสูง (sig. =0.115 และ sig. =0.616 ตามลำดับ) และยังมีผลร่วมกันระหว่างสูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหารไม่ส่งผลต่อความสูงที่เพิ่มขึ้น (sig. =0.997)

ตารางที่ 7 ความสูงเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกัญชงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวที่ระยะเวลาสัปดาห์ที่ 4

การทดลอง	สูตรอาหาร	ความถี่ในการให้อาหาร (ครั้ง/วัน)	ความสูงเฉลี่ยเริ่มต้น^{ns} (cm)	ความสูงเฉลี่ย (cm)
1	MS+TDZ 0 mg/L	2	1.10	1.47 ± 0.25^{efg}
2		3	1.10	1.40 ± 0.17^{fg}
3		6	1.10	1.50 ± 0.10^{efg}
4	MS+TDZ 0.05 mg/L	2	1.03	1.67 ± 0.06^{def}
5		3	1.07	2.33 ± 0.31^{a}
6		6	1.10	1.50 ± 0.20^{efg}
7	MS+TDZ 0.10 mg/L	2	1.00	1.73 ± 0.31^{cdef}
8		3	1.07	2.10 ± 0.10^{ab}
9		6	1.00	1.77 ± 0.06^{cde}
10	MS+TDZ 0.50 mg/L	2	1.03	1.43 ± 0.21^{efg}
11		3	1.10	1.97 ± 0.06^{bcd}
12		6	1.10	1.73 ± 0.15^{cdef}
13	MS+TDZ 1.00 mg/L	2	1.03	1.27 ± 0.21^{g}
14		3	1.00	1.73 ± 0.12^{cdef}
15		6	1.07	2.03 ± 0.15^{abc}

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละคอลัมน์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ ns = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 16 ลักษณะเนื้อเยื่อกัญชงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.05 mg/L เพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว โดยให้ปริมาตรอาหาร 250 ml และมีความถี่ในการให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน ที่ระยะเวลา 1-4 สัปดาห์ (A-D)

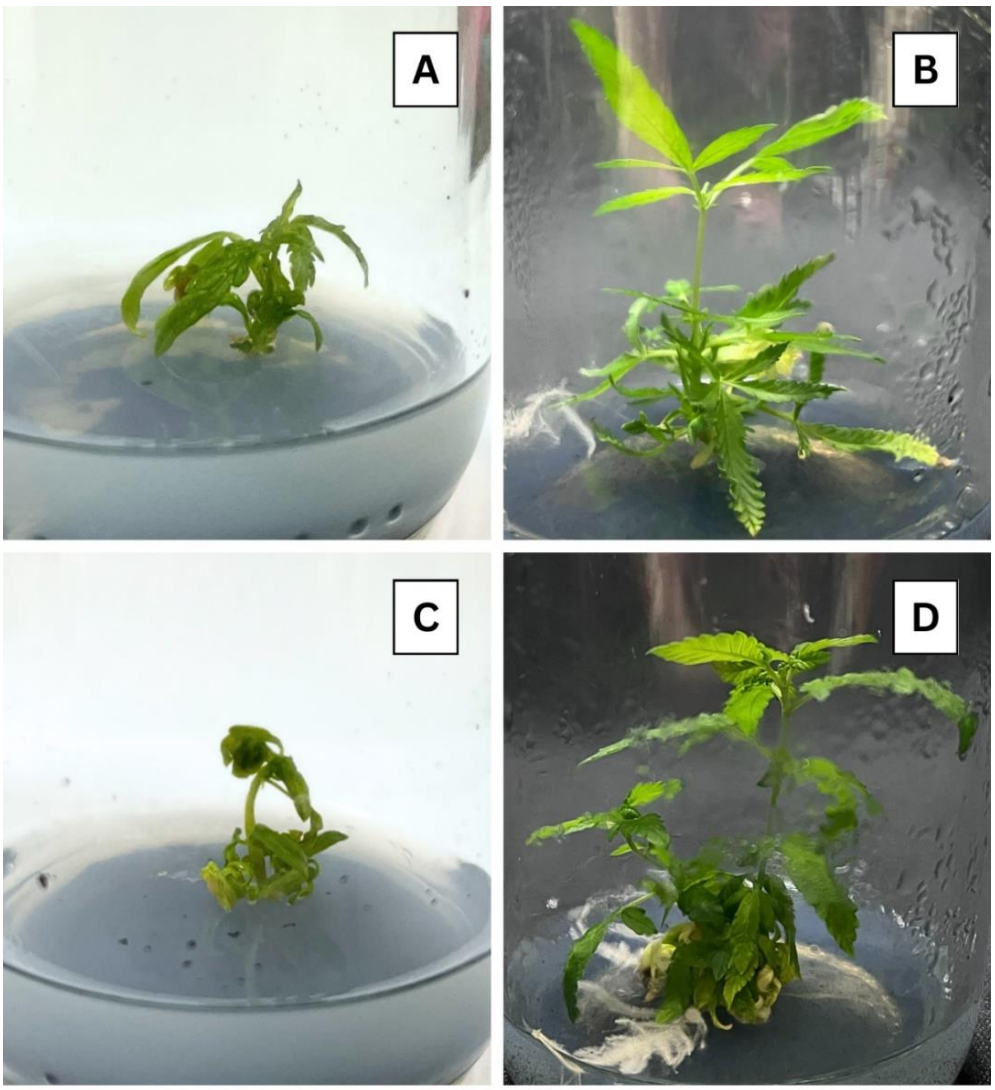
การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการยืดยาวของยอดกัญชงที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยระบบเพาะเลี้ยงต่างกัน

การศึกษาการกระตุ้นการยืดยาวของยอดจากระบบอาหารกึ่งแข็งและระบบ TIB จากข้อมูลการทดลองเปรียบเทียบการยืดยาวของกัญชง (ตารางที่ 8) พบว่า ค่าความสูงเฉลี่ยของแต่ละระบบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 95% โดยที่สัปดาห์ที่ 4 ค่าความสูงเฉลี่ยของระบบอาหารกึ่งแข็งเท่ากับ 3.64±0.37 cm ซึ่งระบบ TIB ที่มีค่าความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 3.60±0.24 cm ดังภาพที่ 17 ลักษณะต้นกัญชงที่มีการยืดยาวมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ ลำต้นและใบมีสีเขียวและไม่หงิกงอ

ตารางที่ 8 ความสูงเฉลี่ยของเนื้อเยื่อกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันที่ 4 สัปดาห์

การทดลอง	ระบบเพาะเลี้ยง	ความสูงเริ่มต้น (cm)	ความสูงเฉลี่ย (cm)
1	ระบบอาหารกึ่งแข็ง	1.16±0.12	3.64±0.37
2	ระบบ TIB	1.09±0.12	3.60±0.24
T-test		ns	ns

หมายเหตุ: ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 17 เนื้อเยื่อกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ได้แก่ เนื้อเยื่อจากอาหารกึ่งแข็งสัปดาห์ที่ 0 และ 4 (A,B) และระบบ TIB บนอาหารกึ่งแข็งสัปดาห์ที่ 0 และ 4 (C,D)

การทดลองที่ 5 การเปรียบเทียบสารกระตุ้นการเกิดรากและการย้ายอนุบาลต้นกัญชง

นำเนื้อเยื่อที่ได้จากการยืดยาวในอาหารสูตร MS ที่เติมผงถ่านเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกระตุ้นการเกิดรากหรือ IBA โดยนำต้นที่มีการยืดยาวประมาณ 2 cm โดยความสูงเริ่มต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 18) ออกปลูกเพื่อศึกษาความสามารถในการปรับสภาพของต้นพันธุ์ตลอดจนลักษณะการเจริญเติบโตของกล้าที่ผลิต

ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อที่มีการยืดยาวก่อนชุบสารละลาย IBA ผสมผงทัลคัม

บันทึกจำนวนราก ความยาวราก ความสูงต้น (ภาพที่ 19) และอัตราการรอดชีวิตจากการทดลองที่ 4 มาชุบสารละลาย IBA ที่ความเข้มข้นต่างกันผสมด้วยผงทัลคัม (สารละลาย IBA 1 ml ผสมผงทัลคัม 0.7 g) จากการทดลอง พบว่า เมื่อเทียบชุดควบคุมที่ไม่มี IBA ผสมผงทัลคัมเทียบกับชุดการทดลองที่มี IBA ความเข้มข้น 1,000 mg/L (ภาพที่ 20) มีจำนวนราก (5.6±1.95 ราก) ความยาวรากเฉลี่ย (5.78±1.96 cm) ความสูงต้นเฉลี่ย (4.32±1.52 cm) และอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด (100%) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการใช้ IBA ความเข้มข้น 1,500 mg/L (ตารางที่ 9) อย่างไรก็ตาม การใช้ IBA ที่ความเข้มข้น 2,000 mg/L ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตลดลงถึง 40% อีกทั้งจำนวนราก ความยาวรากเฉลี่ย และความสูงต้นเฉลี่ยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ภาพที่ 19 การนับจำนวนราก และความยาวรากของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการทดลอง (หมายเลย 1 2 และ 3 หมายถึงรากที่ 1 2 และ 3)

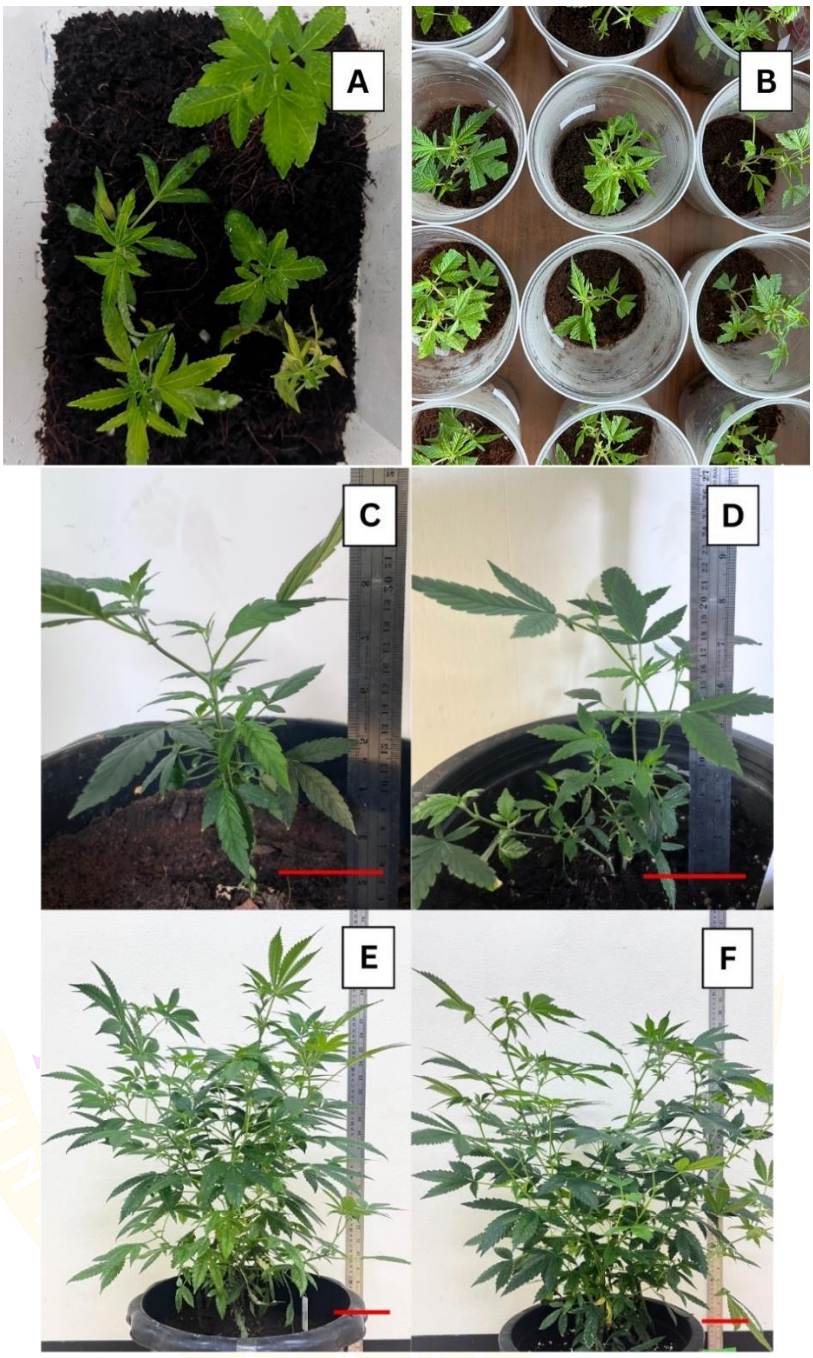
ภาพที่ 20 ลักษณะรากของต้นกัญชงหลังจากจุ่มสารละลาย IBA ความเข้มข้นที่ต่างกัน ได้แก่ IBA ความเข้มข้น 0 mg/L (A) และ 1,000 mg/L (B) อายุ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 9 ผลความเข้มข้นต่าง ๆ ของ IBA หลังจากการชักนำรากที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

การทดลอง	ความเข้มข้นของ IBA (mg/L)	จำนวนราก	ความยาวรากเฉลี่ย (cm)	ความสูงเฉลี่ย (cm)	เปอร์เซ็นต์การออกราก
1	0	1.8±0.84[b]	3.86±1.56[b]	2.68±0.35[b]	20
2	1000	5.6±1.95[a]	5.78±1.96[a]	4.32±1.52[a]	100
3	1500	5.4±1.14[a]	3.42±0.89[b]	4.14±0.71[a]	100
4	2000	3.2±1.30[b]	3.20±1.06[b]	3.40±0.83[ab]	40

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละคอลัมน์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

นำต้นกล้าที่มีรากสมบูรณ์แล้วออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างระมัดระวัง จากนั้นย้ายต้นกัญชงลงในกระถางขนาด 3 นิ้วที่มีวัสดุปลูก คือ พีทมอส: ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1 ให้แสงสว่างด้วยหลอด LED daylight อุณหภูมิ 1,500 K ความเข้มแสง 1,050 lm ทำการบำรุงรักษาต้นโดยให้ปุ๋ยและน้ำตามปกติเป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นย้ายต้นกัญชงลงในกระถางขนาด 20 นิ้ว เพื่อให้ต้นเจริญเติบโตในระยะทำต้น กิ่ง และใบ (Vegetative stage) (ภาพที่ 21) เป็นระยะเวลา 3 เดือน และให้ต้นกัญชงเจริญเติบโตในระยะทำดอก (Reproductive stage) (ภาพที่ 22) เป็นระยะเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 21 ลักษณะต้นกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (A) กิ่งชำจากต้นแม่ (B) หลังจากกระตุ้นให้เกิดรากอายุ 1 เดือน ลักษณะต้นกัญชงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (C) และกิ่งชำ (D) หลังจากย้ายกระถางอายุ 1 เดือน (Scale bar = 5 cm) และต้นกัญชงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (E) และกิ่งชำ (F) หลังจากย้ายกระถางอายุ 3 เดือน (Scale bar = 10 cm)

ภาพที่ 22 ลักษณะช่อดอกของต้นกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (A) และจากกิ่งชำ (B) (Scale bar = 1 cm) และลักษณะต้นกัญชงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ซ้าย) และกิ่งชำที่เกิดช่อดอก (ขวา) อายุ 4 เดือน (C) (Scale bar = 10 cm)

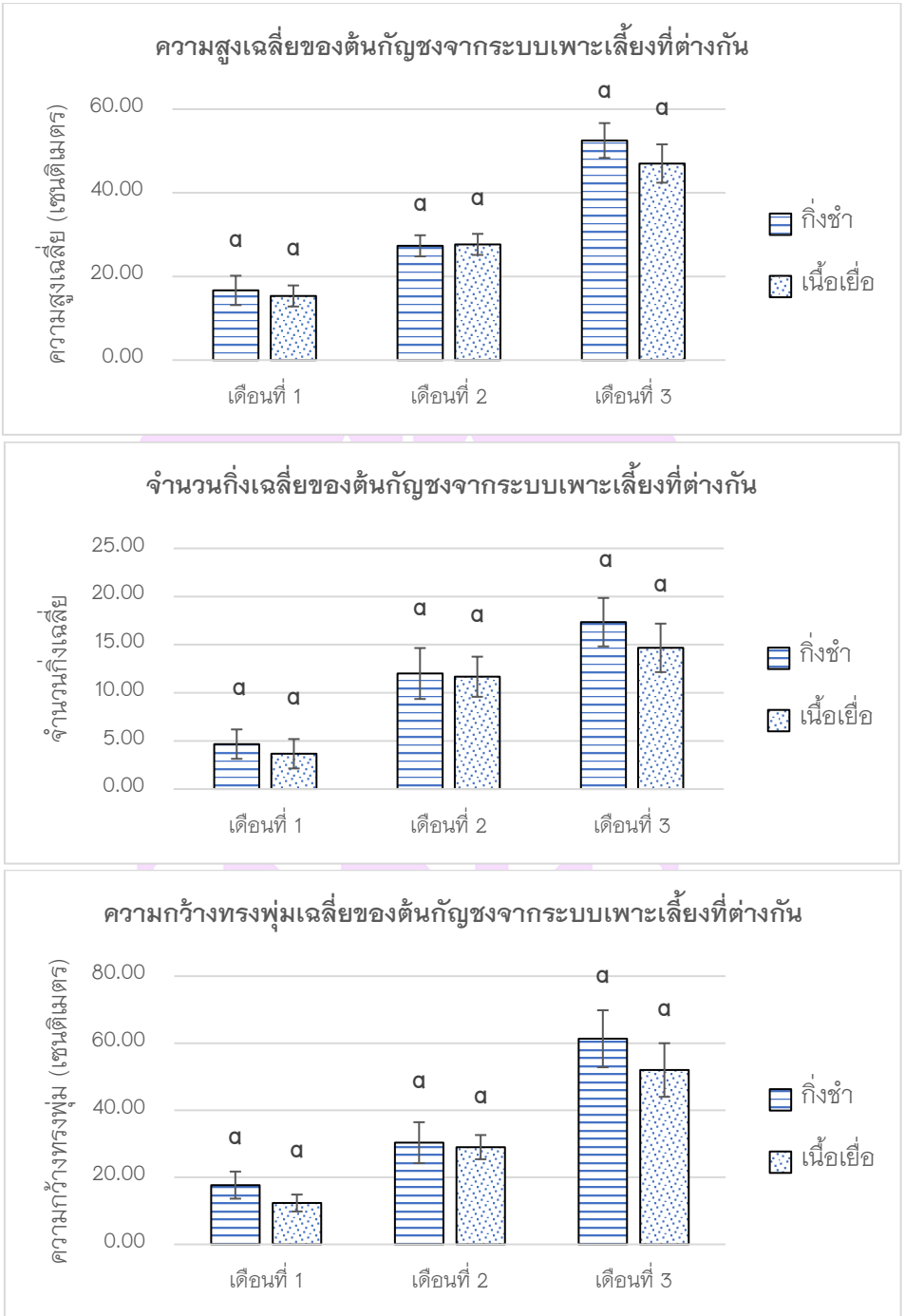
จากการศึกษาลักษณะต้นกัญชงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบที่ต่างกัน พบว่า ต้นที่ได้จากการปักชำกิ่งและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีความสูงต้น จำนวนกิ่ง ความกว้างทรงพุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังภาพที่ 23 โดยต้นที่ได้จากการปักชำกิ่งนั้นเกิดยอดใหม่เร็วกว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ 7 และ 10 วัน ตามลำดับ และมีอัตราการรอดชีวิต

เท่ากับ 100% เมื่อครบ 16 สัปดาห์ จึงทำการนับจำนวนช่อดอกและสุ่มตัวอย่างช่อดอกนำไปวิเคราะห์สาร CBD พบว่า จำนวนช่อดอกของต้นกัญชงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารกึ่งแข็งและระบบ TIB ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ ปริมาณ CBD ของต้นกัญชงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารกึ่งแข็งและระบบ TIB มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 จำนวนช่อดอกเฉลี่ยและปริมาณสาร CBD จากต้นกัญชงที่มาจากระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

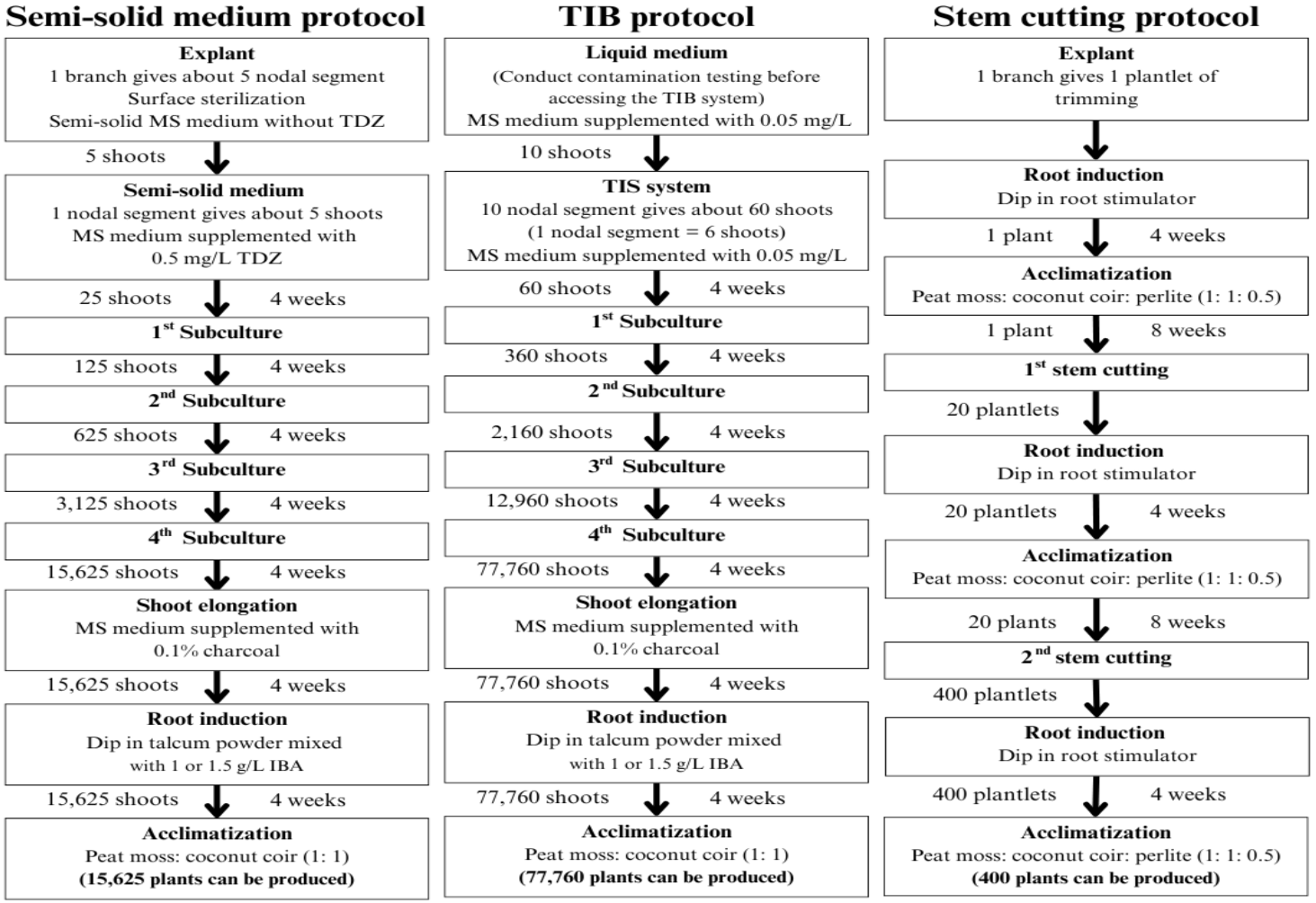
การทดลอง	ระบบเพาะเลี้ยง	จำนวนช่อดอกเฉลี่ย	ปริมาณสาร CBD (%)
1	การปักชำกิ่ง	14.67±2.08	17.0±1.00
2	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	11.00±2.00	16.0±1.00
	T-test	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 23 ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนกิ่งเฉลี่ย และความกว้างของทรงพุ่มเฉลี่ยของต้นกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของแต่ละกราฟและแต่ละเดือน



ภาพที่ 24 จำนวนต้นกัญชงที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ระบบ TIB และการปักชำกิ่งภายใน 28 สัปดาห์

วิธีการขยายพันธุ์กัญชงพันธุ์ Charlotte's Angel ในงานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี โดยจะแสดงการเปรียบเทียบระหว่างระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ระบบ TIB และระบบปักชำกิ่งในระยะเวลา 28 สัปดาห์ (ภาพที่ 24) วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นจะเริ่มจากการคัดเลือกต้นแม่พันธุ์ การฟอกฆ่าเชื้อ การเพิ่มปริมาณยอด การชักนำให้เกิดราก และการปรับสภาพต้นกล้าให้เจริญเติบโตเป็นต้นกัญชง วิธีนี้สามารถผลิตต้นกัญชงได้ประมาณ 15,625 ต้น (ส่วนตาข้าง 1 ชิ้น สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ประมาณ 5 ยอด ภายในเวลา 4 สัปดาห์ ทำการแบ่งเนื้อเยื่อจำนวน 4 ครั้ง จากนั้นทำการยืดยอดและปรับสภาพต้นกัญชงจะสามารถผลิตต้นกัญชงได้ทั้งหมด 15,625 ต้น) วิธีการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB เริ่มจากการเลือกชิ้นส่วนพืชเพื่อเขย่าในอาหารเหลว การเพิ่มปริมาณยอด การกระตุ้นให้ยืดยาว การชักนำให้เกิดราก และการปรับสภาพต้นกล้าให้เจริญเติบโตเป็นต้นกัญชง วิธีนี้จะสามารถผลิตต้นกัญชงได้ประมาณ 466,560 ต้น (ส่วนตาข้าง 10 ชิ้น สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ประมาณ 60 ยอด ภายในเวลา 4 สัปดาห์ ทำการแบ่งเนื้อเยื่อจำนวน 4 ครั้ง จากนั้นทำการยืดยอดและปรับสภาพต้นกัญชงจะสามารถผลิตต้นกัญชงได้ทั้งหมด 77,760 ต้น) และวิธีการปักชำจะเริ่มจากการคัดเลือกต้นแม่พันธุ์ การชักนำให้เกิดรากและการปรับสภาพต้นกล้าให้เจริญเติบโตเป็นต้นกัญชง วิธีนี้จะสามารถผลิตต้นกัญชงได้ประมาณ 400 ต้น (1 ต้นสามารถปักชำกิ่งและผลิตต้นกัญชงได้ 20 ต้น ภายใน 12 สัปดาห์ เมื่อทำการปักชำกิ่งรอบที่ 2 จะสามารถผลิตต้นกัญชงได้ทั้งหมด 400 ต้น) ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงที่สามารถผลิตต้นกัญชงได้มากที่สุด คือ การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่สามารถผลิตต้นกัญชงได้มากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารกึ่งแข็ง 4.98 เท่า และสามารถผลิตต้นกัญชงได้มากกว่าวิธีปักชำกิ่ง 194.40 เท่า

การคิดต้นทุนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน

ทั้งนี้ได้ทำการการคิดต้นทุนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพิ่มเติม โดยประยุกต์จากพิมพ์แข สนิทวงศ์ ณ อยุธยา (2513) ซึ่งมีส่วนประกอบของต้นทุนในการผลิตต้นกัญชงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนี้

1. **วัตถุดิบทางตรง (Direct raw material)** วัตถุดิบทั้งหมดที่เกี่ยวกับการผลิตโดยตรง ซึ่งจะมีความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงโดยตรงกับปริมาณการผลิต ได้แก่ วัตถุดิบในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งต้นทุนของสารเคมีในการทำอาหารเป็นต้นทุนที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยต้นทุนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชง พบว่า

ต้นทุนอาหาร MS แบบอาหารกึ่งแข็งมีต้นทุนต่ออาหารอยู่ที่ 48.78 บาท/L ส่วนอาหารสูตร MS แบบอาหารเหลวในระบบไบโอรีแอคเตอร์ (TIB) มีต้นทุนต่ออาหารอยู่ที่ 31.61 บาท/L ดังแสดงในตารางที่ 11 และค่าภาชนะบรรจุหีบห่อ หมายถึง ต้นทุนจากการจัดหาหรือซื้อมาซึ่งภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ค่าขวดเพาะ ค่าถุงร้อน ค่ายางรัดถุง ค่าถุงเพาะกล้า เป็นต้น ดังตารางที่ 12

2. **ค่าแรงงานตรง (Direct labour)** ได้แก่ ค่าแรงรายวันของพนักงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตต้นกัญชง ส่วนใหญ่จะเป็นค่าแรงพนักงานที่ทำการถ่ายขวดเนื้อเยื่อ ค่าแรงทางตรงนี้จะเพิ่มขึ้นหรือลดลงโดยมีความสัมพันธ์กับการผลิตที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นและลดลง ในการวิเคราะห์ต้นทุนสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงต้องคำนึงถึงเรื่องของต้นทุนด้านแรงงานที่ใช้ รวมถึงจำนวนคนที่ใช้ในการดำเนินงานต่าง ๆ เพื่อจะได้ใช้เป็นแนวทางในการปรับวิธีการดำเนินงานในแต่ละขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชง โดยได้บันทึกระยะเวลาในการปฏิบัติงานในแต่ละขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งสองระบบในการเตรียมอาหาร 2 L พบว่า ระบบอาหารกึ่งแข็งใช้ระยะเวลาในการปฏิบัติงาน 450 นาที ส่วนการปฏิบัติงานในการใช้อาหารเหลวระบบ TIB ใช้เวลาเพียง 140 นาที จะสังเกตได้ว่า การใช้อาหารเหลวในระบบ TIB สามารถประหยัดเวลาในการเตรียมอาหารได้ถึง 4 เท่า และประหยัดเวลาในการเพาะเลี้ยงได้ถึง 10 เท่า ซึ่งโดยรวมสามารถประหยัดระยะเวลาในการทำปฏิบัติหน้าที่ได้ถึง 3.21 เท่า ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยพะเยาเท่านั้น ซึ่งข้อมูลนี้อาจใช้เป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ดังแสดงในตารางที่ 13

3. **ค่าใช้จ่ายโรงงาน (Factory overhead)** ค่าใช้จ่ายโรงงาน ได้แก่ ต้นทุนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนอกเหนือจากวัตถุดิบทางตรง และค่าแรงทางตรง เช่น เงินเดือนและค่าแรงที่ไม่ใช่พนักงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโดยตรง ค่าน้ำ ค่าไฟฟ้า ค่าเชื้อเพลิง วัสดุสิ้นเปลือง สารเคมีและสารฆ่าเชื้อโรค ค่าซ่อมแซมบำรุงรักษาต่าง ๆ เครื่องมือ เครื่องใช้ และอุปกรณ์ ค่าเสื่อมราคาสินทรัพย์ถาวร และค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มหาวิทยาลัยพะเยาปี 2567 ประกอบไปด้วยค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ที่เป็นค่าใช้จ่ายดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 11 ต้นทุนสารเคมีในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยพะเยา

สารเคมี	ราคา (บาท)	ปริมาณ (กรัม)	ราคา (บาท/g)	ปริมาณสารที่ใช้ทำ Stock 1 L (g)	ต้นทุน Stock 1 L (บาท)	รวมต้นทุน Stock 1 L (บาท)	ปริมาตร Stock ที่ใช้ทำอาหาร 1 L (ml หรือ g)	ปริมาตรอาหารที่ได้ (Lอาหาร/ Stock 1 L)	ต้นทุนสารที่ใช้ (บาท/L)
Stock 1									
Ammonium Nitrate	1,800	500	3.60	33	118.80				
Potassium Nitrate	455	500	0.91	38	34.58				
Calcium Chloride	385	500	0.77	8.8	6.78	169.24	50	20	8.46
Magnesium Sulfate	525	500	1.05	7.4	7.77				
Potassium Phosphate	385	1000	0.39	3.4	1.31				
Stock 2									
Boric Acid	350	500	0.70	0.62	0.434				
Manganese Sulphate	676	500	1.35	2.23	3.011				
Zinc Sulfate	450	500	0.90	0.86	0.774	5.02	10	100	0.05
Potassium Iodide	2,100	500	4.20	0.08	0.336				
Sodium Molybdate	4,420	500	8.84	0.025	0.221				
Sodium Molybdate	4,420	500	8.84	0.025	0.221				

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Cobalt (II) Chloride	3,250	500	6.50	0.0025	0.016				
Copper (II) Sulfate	494	500	0.99	0.0025	0.0025				
Stock 3									
Disodium EDTA	675	500	1.35	3.725	5.0288	7.93	10	100	0.08
Ferrous Sulfate	520	500	1.04	2.785	2.8964				
Stock 4									
Glycine	1,170	500	2.34	2.785	6.517				
Nicotinic Acid	520	100	5.20	0.2	1.040	11.47	10	100	0.11
Pyridoxin	1,196	25	47.84	0.05	2.392				
Thiamine HCL	1,235	50	24.70	0.05	1.235				
Myo-Inositol	715	25	28.60	0.01	0.286				
Sucrose	27	1000	0.03				30	1	0.9
Agar	1,010	500	2.02				8.5	1	17.17
TDZ	2,750	250 mg	11 บาท/mg	0.5 mg	22	22	1	1	22
ต้นทุนอาหารกึ่งแข็ง (1 L)									**48.78**
ต้นทุนอาหารเหลว (1 L)									**31.61**

ตารางที่ 12 ค่าใช้จ่ายภาชนะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยพะเยา

รายละเอียด	ราคา	หน่วย
กระดาษ Label	40	บาท/12 แผ่น
ขวดแก้วขนาด 8 oz. พร้อมฝา	35	บาท/ขวด
ดินเพาะกล้า	20	บาท/ถุง
ถุงร้อนขนาด 12*18 นิ้ว	95	บาท/กิโลกรัม
ยางรัดถุง	20	บาท/ขีด

ตารางที่ 13 ระยะเวลาในการทำปฏิบัติหน้าที่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยพะเยา

รายละเอียด	อาหารกึ่งแข็ง ปริมาตร 1 L (นาที)	อาหารเหลวระบบ TIB ปริมาตร 1 L (นาที)
ชั่งสาร	5	5
เตรียมอาหาร	10	10
ต้มอาหาร	10	0
ปรับ pH	5	5
เทอาหารใส่ขวดพร้อมปิดฝา	40	10
นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ	10	10
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือนำต้นกล้าออกอนุบาล	300	30
ทำความสะอาดห้อง	20	20
รดน้ำต้นพันธุ์	20	20
ตรวจเช็ค stock และเตรียม stock	20	20
วางแผนการทำงาน การจัดซื้อสารเคมี	10	10
สรุปเวลาในการทำงาน (นาที/คน)	**450**	**140**

ตารางที่ 14 ต้นทุนค่าใช้จ่ายโรงงานที่เกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชง มหาวิทยาลัยพะเยาปี 2567

รายละเอียด	ราคา	หน่วย
ค่าเสื่อมราคาชั้นวางขวดเพาะเลี้ยง	10,000	บาท/ชั้น/ปี
ค่าเสื่อมราคาขวด 8 ออนซ์	2	บาท/ขวด/ปี
ค่าเสื่อมราคาระบบไบโอรีแอคเตอร์	200,000	บาท/ชุด/ปี
ค่าไฟฟ้า ชั้นเพาะเลี้ยง	7,200	บาท/ชั้น/ปี
ค่าไฟฟ้าระบบทำความเย็น	240,000	บาท/ห้อง/ปี
ค่าไฟฟ้าจากการปฏิบัติงาน	36,000	บาท/ห้อง/ปี
ค่าน้ำ	6,000	บาท/ห้อง/ปี
สารฟอกฆ่าเชื้อ	500	บาท/ปี
สารทำความสะอาดห้องเพาะเลี้ยง	21,600	บาท/ห้อง/ปี
ค่าเสื่อมเครื่องมือตู้เขี่ยเชื้อ	80,000	บาท/ตู้/ปี
ค่าเสื่อมอุปกรณ์ อื่นๆ	10,000	บาท/ห้อง/ปี
ค่าซ่อมแซมบำรุงรักษาต่าง ๆ เครื่องมือ	5,000	บาท/ห้อง/ปี
ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ	10,000	บาท/ปี
รวมค่าใช้จ่าย	626,302	บาท/ห้อง/ปี

สรุปต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชง

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงใช้ระยะเวลา 3-4 เดือน (ตั้งแต่การเพิ่มปริมาณต้นจนถึงการอนุบาลต้น) ถึงพร้อมที่จะจำหน่าย ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวมีต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ว่าจะเป็นวัตถุดิบ ค่าแรง รวมถึงเครื่องมือต่าง ๆ ที่มีการเสื่อมตามกาลเวลา ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของมหาวิทยาลัยพะเยาจึงได้รวบรวมข้อมูลต้นทุนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงดังกล่าวเทียบกับผลผลิตที่เกิดขึ้นในแต่ละระบบ คือ อาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวในระบบ TIB ไว้เพื่อใช้ในการคำนวนหาต้นทุนที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนถึงปลูกพร้อมจำหน่าย โดยพบว่าต้นพันธุ์ที่ผลิตได้ในระบบอาหารกึ่งแข็งมีต้นทุนอยู่ที่ 16.03 บาท/ต้น และในระบบ TIB มีต้นทุนอยู่ที่ 9.81 บาท/ต้น ดังตารางที่ 15 ซึ่งกิ่งของกัญชงพันธุ์ Charlotte’s Angel มีราคาประมาณ 100-200 บาท (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2565)

ตารางที่ 15 ต้นทุนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงบนอาหารกึ่งแข็งเทียบกับอาหารเหลวในระบบ TIB ของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชงของมหาวิทยาลัยพะเยา

หน่วย	อาหารกึ่งแข็ง	รายละเอียด	TIB	หน่วย
L	1	อาหาร	1	L
ขวด	40	ได้อาหาร	4	คู่ขวด
ต้น/ขวด	4.7	จำนวนต้นที่ได้/ขวด	66.33	ต้น/คู่ขวด
ต้น/L	188	จำนวนต้นที่ได้/L	265.32	ต้น/L
L/ตารางเมตร	5.78	ปริมาตรอาหารที่ใช้/ตารางเมตร	16.12	L/ตารางเมตร
ขวด/ตารางเมตร	231.2	จำนวนขวดที่ใช้/ตารางเมตร	64.48	คู่ขวด/ตารางเมตร
ต้น/ตารางเมตร	1,156	จำนวนต้นที่ได้/ตารางเมตร	4,276.96	ต้น/ตารางเมตร
บาท/L	48.78	ต้นทุนอาหาร/L	31.61	บาท/L
บาท/ตารางเมตร	281.95	ต้นทุนอาหารทั้งหมด/ตารางเมตร	509.55	บาท/ตารางเมตร
บาท/ต้น	0.259	ต้นทุนค่าอาหาร	0.119	บาท/ต้น
บาท/ต้น	3.87	ต้นทุนค่าไฟฟ้า	1.61	บาท/ต้น
บาท/ต้น	3.81	ต้นทุนค่าแรงงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	1.59	บาท/ต้น
บาท/ต้น	3.15	ต้นทุนค่าแรงงานเพาะปลูก	3.15	บาท/ต้น
บาท/ต้น	0.70	ต้นทุนค่าวัสดุเพาะปลูก	0.70	บาท/ต้น
บาท/ต้น	0.50	ต้นทุนค่าอนุบาลต้นพันธุ์	0.50	บาท/ต้น
บาท/ต้น	2.74	ต้นทุนค่าเสื่อมราคาระบบ	1.14	บาท/ต้น
บาท/ต้น	**16.03**	**ต้นทุนรวม/ต้น**	**9.81**	**บาท/ต้น**

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเวลาการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวเนื้อเยื่อเจริญของกัญชง ได้แก่ ดอก ยอด และตาข้าง ด้วยสารละลาย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า เนื้อเยื่อส่วนตาข้างที่ฟอกฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 10 นาที มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์น้อยที่สุดเท่ากับ 6.67% และการฟอกฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 10 นาที แสดงให้เห็นถึงการเกิดเนื้อเยื่อสีน้ำตาลมากกว่าการฟอกฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 5 และ 7 นาที เมื่อระยะเวลาผ่านไป 7 วัน และการศึกษาความเข้มข้นของ TDZ ที่แตกต่างกันทั้งหมด 5 กรรมวิธี หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สรุปได้ว่า สัปดาห์ที่ 4 อาหาร MS ที่ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L ส่งผลให้เนื้อเยื่อส่วนตาข้างของกัญชงมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 4.7±1.57 ยอด และมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.30±0.42 cm และอาหาร MS ที่ไม่เติม TDZ ส่งผลให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 2.1±0.32 ยอด และอาหาร MS ที่ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.05 และ 1 mg/L ส่งผลให้มีความสูงน้อยที่สุดเท่ากับ 1.93±0.33 และ 1.88±0.17 cm ตามลำดับ จากข้อมูลจำนวนยอดนั้นแสดงให้เห็นจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TDZ ยกเว้น TDZ ความเข้มข้น 1.0 mg/L ที่ส่งผลให้จำนวนยอดน้อยลง และลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อนั้น พบว่า มีการเจริญเติบโตที่ปกติ ลำต้นและใบเป็นสีเขียว

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดใน TIB โดยศึกษาทั้งหมด 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ TDZ ทั้งหมด 5 กรรมวิธีและความถี่ในการให้อาหารทั้งหมด 3 กรรมวิธี พบว่า จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สูตรอาหาร MS ที่ผสม TDZ ความเข้มข้น 0.05 mg/L มีความถี่ในการให้อาหาร 3 ครั้ง/วัน (ทุก 8 ชั่วโมง) และใช้ปริมาตรอาหาร 250 ml ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดเฉลี่ยของกัญชงมากที่สุดเฉลี่ย 66.33±2.08 ยอด/คู่ขวด เมื่อนำข้อมูลจำนวนยอดเฉลี่ยวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรทั้ง 2 ปัจจัย พบว่า สูตรอาหาร (sig. <0.001) และความถี่ในการให้อาหาร (sig. <0.001) ที่แตกต่างกันมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอด และผลร่วมกันระหว่างสูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหารส่งผลต่อจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ (sig. <0.001) อีกทั้งสูตรอาหารดังกล่าวยังส่งผลให้เนื้อเยื่อมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 2.33±0.31 cm เมื่อนำข้อมูลความสูงเฉลี่ยวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรทั้ง 2 ตัว พบว่าทั้งสูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหารที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของความสูง (sig. =0.115 และ sig. =0.616 ตามลำดับ) และผลร่วมกันระหว่างตัวแปรทั้ง 2 ปัจจัยไม่ส่งผลต่อความสูงที่เพิ่มขึ้น (sig. =0.997)

การศึกษาการยืดยาวของยอดกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวใน TIB พบว่า ความสูงของเนื้อเยื่อไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) จากนั้นศึกษาความเข้มข้นของ IBA ทั้งหมด 4 กรรมวิธีในการกระตุ้นการเกิดราก พบว่า การนำเนื้อเยื่อกัญชงจุ่มสารละลาย IBA ความเข้มข้น 1,000 mg/L ที่ผสมผงทัลคัม ทำให้เกิดจำนวนราก (5.6±1.95 ราก) ความยาวรากเฉลี่ย (5.78±1.96 cm) ความสูงต้นเฉลี่ย (4.32±1.52 cm) และอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด (100%) และจากข้อมูลที่ได้นั้นแสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้สารละลาย IBA ความเข้มข้นที่สูงมาก (2,000 mg/L) ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลงเท่ากับ 40% เมื่อนำต้นกล้ากัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน (ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและระบบปักชำกิ่ง) ย้ายอนุบาลและปรับสภาพแล้ว พบว่า ลักษณะต้นกัญชงและปริมาณ CBD ของต้นกัญชงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและกิ่งชำไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

อภิปรายผลการวิจัย

การฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวเนื้อเยื่อเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยการใช้สารฆ่าเชื้อที่อาจเป็นพิษต่อพืช เช่น $HgCl_2$, alcohol, sodium/calcium hypochlorite, hydrogen peroxide, silver nitrate, antibiotic (ธราธร ทีรฆฐิติ และคณะ, 2559) ซึ่งงานวิจัยนี้จะใช้สารฟอกฆ่าเชื้อ คือ $HgCl_2$ และกำหนดเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อที่ 5-10 นาที แสดงให้เห็นว่า เมื่อระยะเวลาการฟอกฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์จะลดลง งานวิจัยที่ผ่านมารายงานการใช้ $HgCl_2$ ในพืชหลายชนิด เช่น Yadav et al. (2021) รายงานว่า เวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อกล้วย (*Musa paradisiaca* L.) ด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 8 นาที พบว่า อัตราการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เท่ากับ 32.24% เมื่อครบ 10 วัน และมีอัตราการรอดชีวิตที่ 67.73% เมื่อครบ 25 วัน สอดคล้องกับ Hashim et al. (2021) ที่บ่งชี้ว่า อัตราการปนเปื้อนเกี่ยวข้องกับ

ระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ *Clinacanthus nutans* ด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อหลายชนิด ได้แก่ $HgCl_2$ NaOCl ความเข้มข้น 10% Thiophanatemethyl และ Pyroligneous acid พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.2% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีอัตราการปนเปื้อนน้อยที่สุด (3.33%) และมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด (96.67%) ในทางตรงกันข้าม การใช้ $HgCl_2$ ที่ความเข้มข้นสูงเกินไปทำให้เนื้อเยื่อเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช และตาย เนื่องจากสารฟอกฆ่าเชื้อเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อด้วยการทำลายเยื่อหุ้มและผนังเซลล์ของพืช (Dinçer & Dündar, 2023) ส่งผลให้สูญเสียน้ำใน cell sap ซึ่งอาจส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อราในเนื้อเยื่อที่มากเกินไปและกลายเป็นเชื้อก่อโรคหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร ส่งผลให้เนื้อเยื่อตายเนื่องจากการปนเปื้อนจากเชื้อรา (Redlin & Carris, 1997) นอกจากนี้ Gu et al. (2022) แสดงให้เห็นว่า การฟอกฆ่าเชื้อ *Cnidoscolus aconitifolius* ด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 10-15 นาที มีอัตราการรอดชีวิตตั้งแต่ 42.2-44.4%

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนกัญชง พบว่า การใช้อาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L สามารถเพิ่มปริมาณยอดกัญชงได้มากที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานโดย Wróbel et al. (2020) ที่พบว่า การใช้ข้อของกัญชงพันธุ์ Epsilon 68 เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1-0.5 mg/L สามารถกระตุ้นให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดประมาณ 1.3±0.72 ยอด/ต้น และแสดงให้เห็นว่าการใช้ TDZ มีประสิทธิภาพมากกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น นอกจากนี้ Mubi et al. (2020) ทำการศึกษาการขยายพันธุ์ของกัญชงพันธุ์ MX-CBD-11 และ MX-CBD-707 โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม PGRs หลายชนิด พบว่า กัญชงทั้ง 2 พันธุ์ตอบสนองได้ดีในอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 และ 0.44 g/L ซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 2.43±0.20 และ 2.67±0.30 ยอด/ต้น ตามลำดับ ที่ 52 วัน ซึ่งโดยทั่วไปไซโตไคนินเป็นตัวควบคุมการเจริญเติบโตที่สำคัญในการแบ่งเซลล์และพัฒนาการในพืช รวมถึงการที่ตายอดข่มไม่ให้ตาข้างเจริญเติบโต (Apical dominance) ดังนั้นการใช้ TDZ จึงสามารถส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการงอกของยอด การสร้างแคลลัส การยืดของยอด เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาบ่งชี้ว่าการใช้ TDZ สามารถยับยั้งเอนไซม์ cytokinin oxidase ที่มีหน้าที่สลายไซโตไคนินธรรมชาติเพื่อรักษาสมดุลของฮอร์โมนภายในพืช (Guo et al., 2011) เมื่อเอนไซม์นี้ถูกสลายไปทำให้เกิดการสังเคราะห์หรือการสะสมของ endogenous cytokinin ในเนื้อเยื่อได้ (Murthy et al., 1998) และทำให้ endogenous cytokinin-ribosides ในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น ส่งผลให้

เกิดการเพิ่มจำนวนยอด โดยทั่วไปการใช้ TDZ ในความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำสามารถกระตุ้นการสร้างยอดได้ อย่างไรก็ตามการใช้ TDZ ในความเข้มข้นที่มากเกินไปอาจยับยั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Apical meristem) ซึ่งอยู่ที่ปลายยอดและราก ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ ขึ้นกับชนิดพืช ประเภทของชิ้นส่วนพืช และระยะเวลาที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับสารควบคุมการเจริญเติบโต (Li et al., 2022) นอกจากนี้ยังพบการใช้ TDZ สำหรับการชักนำให้เกิดยอดในพืชชนิดอื่นอีกด้วย อาทิเช่น ดอกรานังคูลัส (*Ranunculus wallichianus*) ที่พบว่า การใช้อาหาร ½MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 mg/L ทำให้เกิดอัตราการผลิตยอดมากที่สุดเท่ากับ 78% และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 4.2±0.28 ยอด/ชิ้นส่วน (Srinivasan et al., 2021) และกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส (*Phalaenopsis*) ที่มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 4.54 µM (Li et al., 2022)

การขยายพันธุ์พืชแบบไบโอรีแอคเตอร์เป็นระบบที่มีสภาพแวดล้อมแบบปิดและปลอดเชื้อ ซึ่งใช้อาหารเหลวหรือระบบการไหลเข้าออกของของเหลวหรืออากาศ โดยได้รับการออกแบบเพื่อสามารถติดตามและควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ อาทิเช่น การกวน การให้อากาศ อุณหภูมิ และค่า pH (Leathers et al., 1995) ในบรรดาระบบไบโอรีแอคเตอร์ประเภทต่าง ๆ พบว่า ระบบ TIB เหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดยอด ส่วนระบบการจมแบบต่อเนื่อง (Continuous immersion systems) พบว่า ไม่เหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างหรือยอดพิเศษ (Adventitious shoots) เนื่องจากระบบเหล่านี้ทำให้เกิดการขาดอากาศและภาวะเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำ (Hyperhydricity) ในยอดที่เกิดขึ้นใหม่ (Chakrabarty et al., 2003; Etienne & Berthouly, 2002) งานวิจัยนี้จึงได้ประยุกต์ใช้ระบบ TIB ในการชักนำให้เกิดยอดในกัญชงโดยควบคุมปัจจัยทั้งหมด 2 ตัว คือ สูตรอาหารและความถี่ในการให้อาหาร พบว่า ในอาหารเหลวการใช้สูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.05 mg/L ส่งผลให้กัญชงมีการตอบสนองดีที่สุดทั้งจำนวนยอดเฉลี่ยและความสูงของต้นกัญชง ผลการทดลองนี้สอดคล้องตาม George (1996) ที่รายงานว่า ไซโตไคนินความเข้มข้นที่สูงเกินไปจะผลิตยอดที่มีความฉ่ำน้ำและใบมีลักษณะที่ผิดปกติ ในขณะที่ในอาหารกึ่งแข็งการใช้สูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L กลับส่งผลให้เนื้อเยื่อมีการตอบสนองได้ดี เนื่องจากการดูดซับเกลือและสารประกอบอินทรีย์ เช่น วิตามิน น้ำตาล และ PGRs มีความแตกต่างกันระหว่างอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลว โดยอาหารกึ่งแข็งทำหน้าที่เป็นแหล่งกักเก็บไซโตไคนินที่มีการปล่อยสารประกอบไปยังยอดอย่างช้า ๆ แต่ต่อเนื่อง (Feito et al., 2001) ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชใน

ระบบ TIB มีการดูดซับสารอาหารจากอาหารเหลวได้อย่างทั่วถึง ในขณะที่ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งจะดูดซับสารอาหารเพียงบริเวณที่สัมผัสกับอาหารเท่านั้น (Teisson & Alvard, 1995)

สำหรับความถี่ในการให้อาหารถือว่าเป็นหนึ่งในพารามิเตอร์ที่สำคัญสำหรับ TIB และจำเป็นต้องปรับให้เหมาะสำหรับแต่ละสายพันธุ์และจีโนไทป์ ซึ่งงานวิจัยนี้ความถี่ที่ทำให้เนื้อเยื่อกัญชงมีการตอบสนองทั้งจำนวนยอดเฉลี่ยและความสูงของต้นกัญชงดีที่สุด คือ การให้อาหารทุก ๆ 8 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับ Rico et al. (2022) ที่รายงานว่าการให้อาหารทุก ๆ 8 ชั่วโมงและให้เนื้อเยื่อสัมผัสอาหารนาน 1 นาที ส่งผลให้เกิดค่าสัมประสิทธิ์การเกิดยอดของกัญชงทั้ง 3 พันธุ์มากที่สุดและได้ยอดที่แข็งแรง อีกทั้ง Gonzalez et al. (2012) รายงานว่า หากความถี่ในการให้อาหารที่ต่ำเกินไปจะส่งผลให้อัตราการเกิดยอดต่ำเนื่องจากปริมาณสารอาหารที่ลดลง ในทางตรงกันข้ามการให้อาหารที่ถี่เกินไปจะทำให้อาหารเพาะเลี้ยงสัมผัสกับเนื้อเยื่อมากขึ้น ส่งผลให้ยอดมีโอกาสฉ่ำน้ำมากขึ้น นอกจากนี้การปรับความถี่ในการให้อาหารที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีเนื่องจากมีการใช้แรงดันอากาศผลักอาหาร ดังนั้นเนื้อเยื่อจึงสัมผัสทั้งอาหารและอากาศ (แววดาว หมื่นสำราญ และนพมณี โทปุญญานนท์, 2555) และเกิดการถ่ายเทของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และเอทิลีนในขวดเพาะเลี้ยง (ถูกดันออกจากขวด) ทำให้การเพาะเลี้ยงพืชในระบบ TIB มีก๊าซ CO_2 และเอทิลีนสะสมในขวดเพาะเลี้ยงน้อยกว่าอาหารกึ่งแข็ง (Roels et al., 2006; Ziv, 2005) ดังรายงานในกล้วย (*Musa* sp.) ที่มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเมื่อให้อาหารทุก 6 ชั่วโมง (24.2±1.0 ยอด/ชิ้นส่วนพืช) ซึ่งมีจำนวนยอดมากกว่าการให้อาหารทุก 4 และ 12 ชั่วโมง (16.6±1.0 และ 18.6±0.6 ยอด/ชิ้นส่วนพืช) (Uma et al., 2021) ในต้นนกคุ้มไฟ (*Anoectochilus burmanicus*) ที่รายงานว่า เมื่อลดความถี่ในการให้อาหารจากทุก 6 ชั่วโมงเป็นทุก 12 ชั่วโมง โดยใช้ระยะเวลาการให้อาหารเท่ากัน พบว่า จำนวนยอดและความยาวยอดมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น (อริสรา ติ๊บปะละวงศ์ และปวีณา ภูมิสุทธาผล, 2566) และใน *Corema album* ที่พบว่า การให้อาหารทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 นาที มีอัตราการเกิดยอด (50%) และจำนวนยอดมากที่สุด (11.6±1.3 ยอด/ชิ้นส่วน) มากกว่าการให้อาหารทุก 6 และ 8 ชั่วโมง (Alves et al., 2021)

การศึกษาการกระตุ้นให้เกิดรากในกัญชง เริ่มจากการกระตุ้นให้เกิดการยืดยาวของยอดโดยมีการใช้ผงถ่านที่นิยมใช้กันทั่วไปเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการดูดซับสารที่ไม่พึงประสงค์หรือการปล่อยสารที่ส่งเสริมการเติบโต (Peck & Cumming, 1986) นอกจากนี้พบว่าการเติมผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้ยอดและรากเจริญเติบโตและมีการพัฒนาเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและส่งผลให้มี

ค่าน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นตามด้วย สอดคล้องกับ McLeod et al. (2022) ที่รายงานว่า การใช้ IBA ความเข้มข้น 3000 mg/L ที่มีการผสมผงทัลคัมส่งผลให้กิ่งชำของกัญชงพันธุ์ I3 มีการสร้างรากมากที่สุดเท่ากับ 89-97% และมีความยาวเฉลี่ยของรากเท่ากับ 0.72 cm ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ IBA นอกจากนี้ Ioannidis et al. (2022) พบว่า การจุ่มกัญชงในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 15 mM ส่งผลให้มีจำนวนรากโดยเฉลี่ยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับวิธีที่ IBA ผ่านกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อและ IBA ที่ผ่านการกรอง (Syringe filter-sterilization) งานวิจัยของ Kumar et al. (2023) ได้ประเมินผลของ IBA ต่อ rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*) และค้นพบว่า IBA มีคุณสมบัติเร่งกิจกรรมไฮโดรไลซิส (Hydrolytic activity) จึงส่งเสริมการสร้างแคลลัสและการเปลี่ยนเซลล์เจริญเป็น root primordium เนื่องจากการใช้ IBA จากภายนอก (Exogenous IBA) กระตุ้นให้ความเข้มข้นของออกซินภายในชิ้นส่วนพืชเพิ่มขึ้น ส่งผลให้แบ่งเซลล์ได้ดีขึ้นและการสร้างรากใหม่หลายรากจากบริเวณต้นกำเนิดของราก นอกจากรายงานข้างต้นที่กล่าวมายังพบการใช้ IBA ในพืชหลายชนิด อาทิเช่น Ixora (*Ixora coccinea*) (Saudagar et al., 2021) และพริกไทยเสฉวน (*Zanthoxylum beecheyanum* K. Koch) ที่พบรากพิเศษ (Adventitious roots; ARs) จากการใช้ IBA จากภายนอก ผลการทดลองระบุว่า IBA ความเข้มข้น 1,500-2,500 mg/kg สามารถกระตุ้นการพัฒนาของรากในกิ่งชำได้สำเร็จ นอกจากนี้ การใช้วิธีการนี้ให้ผลดีที่สุดในด้านเปอร์เซ็นต์การสร้างราก ความยาวราก จำนวนราก และทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก (El-Banna et al., 2023) เมื่อใช้ร่วมกับผงทัลคัมที่มีคุณสมบัติเฉื่อยทางเคมีและมีหน้าที่เป็นตัวพาหะ (Carrier) ซึ่งต้องมีความสามารถในการกักเก็บน้ำสูง ส่งผลให้สามารถลดความเสี่ยงของการสลายตัวของสารคล้ายฮอร์โมนพืชจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม (แสงแดดและความชื้น) มีการควบคุม pH ที่ดี ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ใช้งานง่าย และมีต้นทุนต่ำ (Novinscak & Filion, 2020) ของการกระตุ้นด้วย IBA ต่อการสร้างและพัฒนาของรากพิเศษขึ้นอยู่กับการเคลื่อนย้าย (Translocation) และการเคลื่อนที่ของน้ำตาลไปยังฐานของกิ่งปักชำ รวมถึงการกระตุ้นการสังเคราะห์ DNA RNA และโปรตีนสำหรับการแบ่งเซลล์ (Haissig, 1974) อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ของพืชที่แตกต่างกันส่งผลให้มีการตอบสนองต่อความเข้มข้นของออกซินที่ต่างกันด้วย

เมื่อเปรียบเทียบวิธีในการผลิตต้นกัญชงด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารกึ่งแข็ง อาหารเหลวระบบ TIB และการปักชำกิ่ง พบว่า การเพิ่มปริมาณต้นกัญชงในระบบ TIB สามารถผลิตต้นกัญชงได้มากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารกึ่งแข็งและการปักชำกิ่ง 4.98 และ

194.40 เท่า ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่า การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบ TIB นั้น ชิ้นส่วนพืชจะสัมผัสกับอาหารเหลวและอากาศสลับกัน ทำให้เนื้อเยื่อพืชได้สารอาหารเพียงพอและไม่เกิดอาการฉ่ำน้ำอันเป็นสาเหตุให้เนื้อเยื่อเสียหาย อีกทั้งเมื่อกำหนดระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารอย่างเหมาะสมจะส่งผลให้พืชเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วอีกด้วย (นนท์ ปิ่นเงิน และพูนพัฒน์ พูนน้อย, 2562) นอกจากนี้ Lubell-Brand et al. (2021) รายงานว่า การขยายพันธุ์ด้วยการตัดยอด (Retip propagation) สามารถผลิตกัญชงมากกว่าการขยายพันธุ์ด้วยการชำกิ่งถึง 9 เท่าในพื้นที่ 1 cm^2 โดยทุก 2 สัปดาห์ ต้นแม่พันธุ์จะให้กิ่งชำประมาณ 50-60 กิ่ง และมีอัตราการเกิดรากประมาณ 80% ซึ่งการขยายพันธุ์ด้วยการปักชำกิ่งผลิตกัญชงได้ 200 ต้นภายใน 10 สัปดาห์ ในขณะเดียวกันการขยายพันธุ์ด้วยการตัดยอดสามารถรองรับต้นกัญชงที่ใช้ในการตัดยอดได้ 67 ต้นในพื้นที่ 1 cm^2 และสามารถผลิตต้นกัญชงได้ประมาณ 1,800 ต้น ด้านต้นทุนสำหรับการเพิ่มปริมาณต้นกัญชงด้วยระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน พบว่า ต้นกัญชงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งจะมีต้นทุนเท่ากับ 16.03 บาท/ต้น และระบบ TIB จะมีต้นทุนเท่ากับ 9.81 บาท/ต้น เนื่องจากระบบ TIB ลดกระบวนการในการปักชิ้นส่วนพืชลงในอาหารกึ่งแข็ง ทำให้ประหยัดเวลาและแรงงานกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง (Lyam et al., 2012)

บรรณานุกรม

Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: Effects of temporary immersion of explants. *Plant cell, tissue and organ culture, 32*, 55-60.

Alves, V., Pinto, R., Debiasi, C., Santos, M. C., Gonçalves, J. C., & Domingues, J. (2021). Micropropagation of *Corema album* from adult plants in semisolid medium and temporary immersion bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 145*, 641-648.

Amaducci, S., Colauzzi, M., Zatta, A., & Venturi, G. (2008). Flowering dynamics in monoecious and dioecious hemp genotypes. *Journal of Industrial hemp, 13*(1), 5-19.

Amaducci, S., Pelatti, F., & Bonatti, P. (2005). Fibre development in hemp as affected by agrotechnique: preliminary results of a microscopic study. *Journal of Industrial hemp, 10*, 31-48.

Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Zollitsch, W., Mayer, K., & Gruber, L. (2007). Biogas production from maize and dairy cattle manure—influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, Ecosystems & Environment, 118*, 173-182.

Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in plant science, 7*, 19.

Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V., & Ivanov, K. (2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial crops and products, 19*(3), 197-205.

Callaway, J. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica, 140*, 65-72.

Chakrabarty, D., Hahn, E., Yoon, Y., & Paek, K. (2003). Micropropagation of apple

rootstock M. 9 EMLA using bioreactor. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 78*(5), 605-609.

Damodaran, S., & Strader, L. C. (2019). Indole 3-butyric acid metabolism and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science, 10*, 851.

Das, L., Liu, E., Saeed, A., Williams, D. W., Hu, H., Li, C., Ray, A. E., & Shi, J. (2017). Industrial hemp as a potential bioenergy crop in comparison with kenaf, switchgrass and biomass sorghum. *Bioresource technology, 244*, 641-649.

De Klerk, G.-J., Van Der Krieken, W., & de Jong, J. C. (1999). Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 35*, 189-199.

Deepa, A., Anju, M., & Dennis Thomas, T. (2018). The applications of TDZ in medicinal plant tissue culture. In N. Ahmad & M. Faisal (Eds.), *Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator* (pp. 297-316). Springer.

Deferne, J.-L., & Pate, D. W. (1996). Hemp seed oil: A source of valuable essential fatty acids. *Journal of the International Hemp Association, 3*, 4-7.

Devi, V., & Khanam, S. (2019). Comparative study of different extraction processes for hemp (*Cannabis sativa*) seed oil considering physical, chemical and industrial-scale economic aspects. *Journal of Cleaner Production, 207*, 645-657.

Dhakal, H. N., & Zhang, Z. (2015). The use of hemp fibres as reinforcements in composites. In *Biofiber reinforcements in composite materials* (pp. 86-103). Elsevier.

Dinçer, D., & Dündar, H. (2023). The use of fungicides and antibiotics in in vitro sterilization of ornamental plants. In A. Biçen (Ed.), *New Frontiers in Architecture, Planning and Design* (pp. 31-44). Duvar Yayınları.

El-Banna, M. F., Farag, N. B. B., Massoud, H. Y., & Kasem, M. M. (2023). Exogenous IBA stimulated adventitious root formation of *Zanthoxylum beecheyanum* K. Koch stem cutting: Histo-physiological and phytohormonal investigation. *Plant*

Physiology and Biochemistry, 197, 107639.

Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y., & Borroto, C. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant cell reports, 18*, 743-748.

Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture, 69*, 215-231.

Farag, S. (2014). *Cannabinoids production in Cannabis sativa L.: An in vitro approach* [Doctoral dissertation, Technical University Dortmund]. Dortmund.

Fatima, N., Ahmad, N., Ahmad, I., & Anis, M. (2015). Interactive effects of growth regulators, carbon sources, pH on plant regeneration and assessment of genetic fidelity using single primer amplification reaction (SPARS) techniques in *Withania somnifera* L. *Applied biochemistry and biotechnology, 177*, 118-136.

Feito, I., González, A., Centeno, M. L., Fernández, B., & Rodríguez, A. (2001). Transport and distribution of benzyladenine in *Actinidia deliciosa* explants cultured in liquid and solid media. *Plant Physiology and Biochemistry, 39*(10), 909-916.

Gakhar, N., Goldberg, E., Jing, M., Gibson, R., & House, J. (2012). Effect of feeding hemp seed and hemp seed oil on laying hen performance and egg yolk fatty acid content: Evidence of their safety and efficacy for laying hen diets. *Poultry Science, 91*(3), 701-711.

Galasso, I., Russo, R., Mapelli, S., Ponzoni, E., Brambilla, I. M., Battelli, G., & Reggiani, R. (2016). Variability in seed traits in a collection of *Cannabis sativa* L. genotypes. *Frontiers in plant science, 7*, 688.

George, E. F. (1996). *Plant propagation by tissue culture. Part* 2: *in practice*. Exegetics Ltd.

Gonzalez, J. A., Konishi, Y., Bruno, M., Valoy, M., & Prado, F. E. (2012). Interrelationships among seed yield, total protein and amino acid composition of ten quinoa (*Chenopodium quinoa*) cultivars from two different agroecological regions.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(6), 1222-1229.

Gu, M., Li, Y., Jiang, H., Zhang, S., Que, Q., Chen, X., & Zhou, W. (2022). Efficient in vitro sterilization and propagation from stem segment explants of *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst, a multipurpose woody plant. *Plants, 11*(15), 1937.

Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L., & Wei, Y. (2011). Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology, 10*(45), 8984-9000.

Haissig, B. (1974). Metabolism during adventitious root primordium initiation and development. *New Zealand Journal of Forestry Science, 4*(2), 324-337.

Hammond, C. T., & Mahlberg, P. G. (1973). Morphology of glandular hairs of *Cannabis sativa* from scanning electron microscopy. *American Journal of Botany, 60*, 524-528.

Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B., & Makriyannis, A. (2016). Chapter 53 - Cannabis sativa and hemp. In R. C. Gupta (Ed.), *Nutraceuticals.* Academic Press.

Hashim, S. N., Ghazali, S. Z., Sidik, N. J., Chia-Chay, T., & Saleh, A. (2021). Surface sterilization method for reducing contamination of *Clinacanthus nutans* nodal explants intended for in-vitro culture. *E3S Web of Conferences, 306*, 01004.

Höppner, F., & Menge-Hartmann, U. (2007). Yield and quality of fibre and oil of fourteen hemp cultivars in Northern Germany at two harvest dates. *The Eigenfactor Metrics, 57*, 219-232.

Huetteman, C. A., & Preece, J. E. (1993). TDZ: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant cell, tissue and organ culture, 33*, 105-119.

Industrial Hemp Farms. (n.d.). *The Best CBD Hemp Flower Strains to Buy.* https://industrialhempfarms.com/hemp-strains/.

Ingrao, C., Giudice, A. L., Bacenetti, J., Tricase, C., Dotelli, G., Fiala, M., Siracusa, V., & Mbohwa, C. (2015). Energy and environmental assessment of industrial hemp for building applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 51*,

29-42.

Ioannidis, K., Tomprou, I., & Mitsis, V. (2022). An Alternative In Vitro Propagation Protocol of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) Presenting Efficient Rooting, for Commercial Production. *Plants, 1333*(11), 1-17.

Johnson, R. (2018). *Hemp as an agricultural commodity.* https://sgp.fas.org/crs/misc/RL32725.pdf.

Kleine, T., Nägele, T., Neuhaus, H. E., Schmitz-Linneweber, C., Fernie, A. R., Geigenberger, P., Grimm, B., Kaufmann, K., Klipp, E., Meurer, J., Mohlmann, T., Muhlhaus, T., Naranjo, B., Nickelsen, J., Richter, A., Ruwe, H., Schroda, M., Schwenkert, S., Trentmann, O., Willmund, F., Zoschke, R., & Leister, D. (2021). Acclimation in plants – the Green Hub consortium. *The Plant Journal, 106*, 23-40.

Kolodziejczyk, P., Ozimek, L., & Kozlowska, J. (2012). The application of flax and hemp seeds in food, animal feed and cosmetics production. In R. M. Kozlowski (Ed.), *Handbook of natural fibres* (pp. 329-366). Elsevier.

Kumar, K. A., Sreenivas, M., Cheena, J., Vidya, G., & Kumar, S. P. (2023). Effect of different concentrations of auxin hormone (IBA) upon promoting root development of stem cuttings in the 'Scented Geranium', *Pelargonium graveolens* L. *International Journal of Environment and Climate Change, 13*(11), 2863-2869.

Kumar, N., & Reddy, M. P. (2012). Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas:* a candidate biodiesel plant. *Industrial crops and products, 39*, 62-68.

Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2016). In vitro mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 3*(1), 18-26.

Leathers, R., Smith, M., & Aitken-Christie, J. (1995). Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism. In J. Aitken-Christie, T. Kozai, &

M. A. L. Smith (Eds.), *Automation and environmental control in plant tissue culture* (pp. 187-214). Springer.

Li, S.-Y., Stuart, J. D., Li, Y., & Parnas, R. S. (2010). The feasibility of converting *Cannabis sativa* L. oil into biodiesel. *Bioresource technology, 101*(21), 8457-8460.

Li, Y.-Y., Hao, Z.-G., Miao, S., Zhang, X., Li, J.-Q., Guo, S.-X., & Lee, Y.-I. (2022). Profiles of cytokinins metabolic genes and endogenous cytokinins dynamics during shoot multiplication in vitro of *Phalaenopsis*. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(7), 3755.

Lubell-Brand, J. D., Kurtz, L. E., & Brand, M. H. (2021). An in vitro–ex vitro micropropagation system for hemp. *HortTechnology, 31*(2), 199-207.

Lubell, J. D., & Brand, M. H. (2018). Foliar sprays of silver thiosulfate produce male flowers on female hemp plants. *HortTechnology, 28*(6), 743-747.

Ludwig-Müller, J. (2000). Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation, 32*, 219-230.

Lyam, P. T., Musa, M., Jamaleddine, Z., Okere, U. A., & Odofin, W. T. (2012). Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) potential in meeting crop production demand in Nigeria. *Journal of Biology and Life Sciences, 3*(1), 66-86.

Maiolo, S. A., Fan, P., & Bobrovskaya, L. (2018). Bioactive constituents from cinnamon, hemp seed and polygonum cuspidatum protect against H_2O_2 but not rotenone toxicity in a cellular model of Parkinson's disease. *Journal of traditional and complementary medicine, 8*(3), 420-427.

McLeod, A., Vining, K., Hoskins, T., & Contreras, R. (2022). Impact of indole-3-butyric acid concentration and formulation and propagation environment on rooting success of 'I3'hemp by stem cuttings. *HortTechnology, 32*(3), 321-324.

Mikulec, A., Kowalski, S., Sabat, R., Skoczylas, Ł., Tabaszewska, M., & Wywrocka-Gurgul, A. (2019). Hemp flour as a valuable component for enriching physicochemical and antioxidant properties of wheat bread. *LWT - Food Science and*

Technology, 102, 164-172.

Mohan Ram, H., & Sett, R. (1982). Induction of fertile male flowers in genetically female *Cannabis sativa* plants by silver nitrate and silver thiosulphate anionic complex. *Theoretical and Applied Genetics, 62*, 369-375.

Mok, M. C., Mok, D. W. S., Armstrong, D. J., Shudo, K., Isogai, Y., & Okamoto, T. (1982). Cytokinin activity of Nphenyl-N'-l,2 ,3 -thidiazol-5 -ylurea (TDZ). *Phytochemistry, 21*, 1509-1511.

Mubi, S. M., Svetik, S., Flajšman, M., & Murovec, J. (2020). In vitro tissue culture and genetic analysis of two high-CBD medical cannabis (*Cannabis sativa* L.) breeding lines. *Genetika, 52*(3), 925-941.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum, 15*(3), 473-497.

Murthy, B., Murch, S., & Saxena, P. K. (1998). Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 34*, 267-275.

National Center for Biotechnology Information. (2024). *Thidiazuron.* https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thidiazuron.

Nordstrom, A.-C., Jacobs, F. A., & Eliasson, L. (1991). Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3 -butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant physiology, 96*(3), 856-861.

Novinscak, A., & Filion, M. (2020). Long term comparison of talc-and peat-based phytobeneficial *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas synxantha* bioformulations for promoting plant growth. *Frontiers in Sustainable Food Systems, 4*, 602911.

Peck, D. E., & Cumming, B. G. (1986). Beneficial effects of activated charcoal on bulblet production in tissue cultures of *Muscari armeniacum*. *Plant cell, tissue and*

organ culture, 6, 9-14.

Piunno, K. F., Golenia, G., Boudko, E. A., Downey, C., & Jones, A. M. P. (2019). Regeneration of shoots from immature and mature inflorescences of *Cannabis sativa*. *Canadian Journal of Plant Science, 99*(4), 556-559.

Punja, Z. K., Collyer, D., Scott, C., Lung, S., Holmes, J., & Sutton, D. (2019). Pathogens and molds affecting production and quality of *Cannabis sativa* L. *Frontiers in plant science, 10*, 1120.

Radhakrishnan, R., Wilkinson, S. T., & D'Souza, D. C. (2014). Gone to pot–a review of the association between cannabis and psychosis. *Frontiers in psychiatry, 5*, 54.

Ramon, F. S., Daniel, F. H., Antônio, C. G., Dorival, A. S., Douglas, A. S., & Miguel, P. G. (2015). Effects of immersion system and gibberellic acid on the growth and acclimatization of micropropagated pineapple. *Crop Breeding and Applied Biotechnology, 15*, 66-71.

Redlin, S. C., & Carris, L. M. (1997). Endophytic fungi in grasses and woody plants, systematics, ecology and evolution. *Forest Science, 43*(3), 458-459.

Rehman, M., Fahad, S., Du, G., Cheng, X., Yang, Y., Tang, K., Liu, L., Liu, F.-H., & Deng, G. (2021). Evaluation of hemp (*Cannabis sativa* L.) as an industrial crop: a review. *Environmental Science and Pollution Research, 28*(38), 52832-52843.

Rico, S., Garrido, J., Sánchez, C., Ferreiro-Vera, C., Codesido, V., & Vidal, N. (2022). A temporary immersion system to improve *Cannabis sativa* micropropagation. *Frontiers in plant science, 13*, 895971.

Roels, S., Noceda, C., Escalona, M., Sandoval, J., Canal, M., Rodriguez, R., & Debergh, P. (2006). The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (Musa AAB) shoot proliferation and quality. *Plant cell, tissue and organ culture, 84*, 155-163.

Saudagar, A. R., Khobragade, H. M., Thakre, S. A., Bagde, E., Borkar, G. V., & Mane, A. G. (2021). Effect of IBA and types of cuttings on rooting of Ixora. *International*

Journal of Chemical Studies, 9(1), 2594-2596.

Scherer, R. F., Garcia, A. C., de Freitas Fraga, H. P., Dal Vesco, L. L., Steinmacher, D. A., & Guerra, M. P. (2013). Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. comosus). *Scientia Horticulturae, 151*, 38-45.

Shahzad, A. (2012). Hemp fiber and its composites–a review. *Journal of composite materials, 46*(8), 973-986.

Singh, V., Patel, R., Kumar, S., Sahu, M. P., & Ahirwal, A. (2021). Plant growth regulators and their use in plant growth and development. *Agriculture and Environment, 2*(4), 26-28.

Srinivasan, P., Raja, H. D., & Tamilvanan, R. (2021). Effect of coconut water and cytokinins on rapid micropropagation of *Ranunculus wallichianus* Wight & Arnn—a rare and endemic medicinal plant of the Western Ghats, India. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 57*, 365-371.

Stephen, C., Zayas, V. A., & Galic, A. (2023). Micropropagation of Hemp (*Cannabis sativa* L.). *HORTSCIENCE, 58*(3), 307-316.

Street, H. E. (1977). *Plant Cell and Tissue Culture: Principle and Application*. Ohio State University Press.

Tanney, C. A., Backer, R., Geitmann, A., & Smith, D. L. (2021). Cannabis glandular trichomes: A cellular metabolite factory. *Frontiers in plant science, 12*, 721986.

Teisson, C., & Alvard, D. (1995). A New Concept of Plant in Vitro Cultivation Liquid Medium: Temporary Immersion. In M. Terzi, R. Celia, & A. Falavigna (Eds.), *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology* (pp. 105-110). Kluwer.

Teisson, C., Alvard, D., Berthouly, B., Cote, F., Escalant, J., Etienne, H. a., & Lartaud, M. (1996). Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Horticulturae, 440*(1), 521-526.

Thacker, X., Thomas, K., Fuller, M., Smith, S., & DuBois, J. (2018). Determination of

optimal hormone and mineral salts levels in tissue culture media for callus induction and growth of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Agricultural Sciences, 9*(10), 1250-1268.

Uma, S., Karthic, R., Kalpana, S., Backiyarani, S., & Saraswathi, M. S. (2021). A novel temporary immersion bioreactor system for large scale multiplication of banana (Rasthali AAB—Silk). *Scientific Reports, 11*(1), 20371.

Van der Werf, H. M. (2004). Life cycle analysis of field production of fibre hemp, the effect of production practices on environmental impacts. *Euphytica, 140*(1), 13-23.

Vidal, N., & Sánchez, C. (2019). Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. *Engineering in Life Sciences, 19*(12), 896-915.

Woodward, A. W., & Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany, 95*, 707-735.

Wróbel, T., Dreger, M., Wielgus, K., & Słomski, R. (2020). Modified nodal cuttings and shoot tips protocol for rapid regeneration of *Cannabis sativa* L. *Journal of Natural Fibers, 19*(2), 536-545.

Yadav, A., Prasad, Y., Kumar, M., Pandey, S., Maurya, R., & Pandey, P. (2021). Effects of Mercuric chloride and Ethanol for surface sterilization under in vitro plant growth in banana (*Musa paradisiaca* L.) variety “Udhayam”. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 10*(1), 2281-2283.

Yanchev, I., Jalnov, I., & Terziev, I. (2000). Hemps (*Canabis sativa* L.) capacities for restricting the heavy metal soil pollution. *Plant Science, 37*, 532-537.

Yang, T., & Davies, P. J. (1999). Promotion of stem elongation by indole-3-butyric acid in intact plants of *Pisum sativum* L. *Plant Growth Regulation, 27*, 157-160.

Ziv, M. (2005). Simple bioreactor for mass propagation plant. *Plant cell, tissue and organ culture, 81*, 277-283.

กรองทอง สุดประเสริฐ. (2552). ผู้หญิงม้งค้าผ้าใยกัญชง: จากหมู่บ้านสู่เศรษฐกิจบนบาทวิถี. *วารสาร*

สังคมศาสตร์, *21*(2), 13-35.

เขมณัฏฐ์ ธนกรณ์ไพศาล, ดวงพร เปรมจิต, ศิริพงษ์ เปรมจิต, และอนุพันธ์ กงบังเกิด. (2561). *การขยายพันธุ์กล้วยน้ำว้ามะลิอ่องโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (TIB)*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ทวีศักดิ์ แสงอุดม. (2559). *สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และแนวทางการใช้กับไม้ผล* (พิมพ์ครั้งที่ 1). สถาบันวิจัยพืชสวน.

ธมลวรรณ เนื่องกันทา. (2552). *ศักยภาพการผลิตพืชกัญชงบนพื้นที่สูงในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย* [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยแม่โจ้]. เชียงใหม่.

ธราธร ทีรฆฐิติ, อรนุช ลีลาพร, ยินดี ชาญวิวัฒนา, และลิขิต มณีสินธุ์. (2559). *คู่มือส่งเสริมการเรียนรู้ด้านพืช "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ดอกไม้ประดับ"* (พิมพ์ครั้งที่ 2). สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

นนท์ ปิ่นเงิน, และพูนพัฒน์ พูนน้อย. (2562). การพัฒนาราสป์เบอร์รีพายสำหรับควบคุมระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว. *วิศวกรรมสารเกษมบัณฑิต*, *9*(3), 141-156.

นพมณี โทปุญญานนท์, รังสิมา อัมพวัน, และพรศักดิ์ บุญมณี. (2549). *วธ: สนับสนุนผลงานวิจัยไม้ดอกเพื่อการส่งออก*. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ประสาทพร สมิตะมาน, ชาตรี สิทธิกุล, นุชนารถ จงเลขา, นิตยา สุวรรณรัตน์, ภมรทิพย์ อักษรทอง, และสมบัติ ศรีชูวงศ์. (2556). *โรคพืชวิทยา (Plant Pathology)*. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ฝ่ายเภสัชกรรม สถาบันยาเสพติดธัญญารักษ์. (2560). *กัญชง*. http://www.pmnidat.go.th/thai/downloads/text/T01-60.pdf.

พรชัย สินเจริญโภไคย, ตีญานี สาหัด, พราว ศุภจริยาวัตร, ศรายุธ ระดาพงษ์, เสกรชตกร บัวเบา, พิเชฐ บัญญัติ, ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์, และณฐภัทร หาญกิจ. (2564). การศึกษาฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดช่อดอกกัญชาเพศเมียพันธุ์ไทยต่อเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*, *63*(3), 467-477.

พิพัฒน์ นนทนาธรณ์. (2564). เศรษฐกิจกัญชา: ที่มาและที่ไป. *วารสารสมาคมนักวิจัย*, *26*(2), 102-112.

พิมพ์แข สนิทวงศ์ ณ อยุธยา. (2513). *การบัญชีเบื้องต้น*. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี, และพิชญา ฉ่ำชื่น. (2562). กัญชง: วัตถุดิบอาหารแห่งอนาคตสำหรับการเลี้ยงไก่ไข่สู่การผลิตไข่ไก่เพื่อสุขภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*, *39*(5), 481-495.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. (2565). *มทส. เปิดขายต้นกล้ากัญชงลูกผสม Charlotte's Angel ปรับสายพันธุ์ที่เหมาะสภาพอากาศของไทย ต้านโรค และให้สารสำคัญ CBD สูง*. https://www.sut.ac.th/news/detail/2/news20220627.

วราภรณ์ อำพันกาญจน์. (2552). บทบาทของ Thidiazuron ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา*, *4*(2), 123-135.

วิจิตร วังใน. (2565). กัญชง: พืชดึกดำบรรพ์อเนกประสงค์. *ข่าวสมาคมพืชสวน*, *37*(1), 5-13.

วิมลศิริ ชาวไพร, สิราวรรณ มาน้อย, สุณัฐฐา ไม้ขนุน, และกัสมา กาซ้อน. (2562). การพัฒนาและออกแบบผลิตภัณฑ์จากผ้าทอใยกัญชงของบ้านพญาเลาอู ตำบลตับเต่า อำเภอเทิง จังหวัดเชียงราย. *วารสารบัญชีปริทัศน์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย*, *4*(1), 63-73.

แววดาว หมื่นสำราญ, และนพมณี โทปุญญานนท์. (2555). การขยายพันธุ์อเมซอน (*Echinodorus* sp.) ด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว. *วารสารวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมการเกษตร*, *43*(1), 69-78.

ศูนย์พยากรณ์เศรษฐกิจและธุรกิจ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. (2565). *การประเมินมูลค่าตลาดของอุตสาหกรรมกัญชา-กัญชง*. https://cebf.utcc.ac.th/upload/analysis_file/file_689d21y2022.pdf.

สริตา ปิ่นมณี. (2564). *ขึ้นทะเบียนพันธุ์กัญชง (Hemp) สำคัญอย่างไร?*. https://www.hrdi.or.th/Articles/Detail/1482.

สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร. (2557). *คู่มือการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช*. https://www.viangtan-sao.go.th/viangtan_new/images/km/สป/นิติการ/12-07.pdf.

สุทิน เรืองปานกัน, ทรงคุณ จันทจร, และระพีพันธ์ ศิริสัมพันธ์. (2565). การศึกษาภูมิปัญญาในการผลิตเส้นใยกัญชงเชิงอุตสาหกรรมสิ่งทอชุมชน. *วารสารวิจัยธรรมศึกษา*, *5*(2), 17-27.

อริสรา ติ๊บปะละวงศ์, และปวีณา ภูมิสุทธาผล. (2566). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและระบบไบ

โอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวต่อการเพิ่มปริมาณยอดและการชักนำให้ออกรากของนกคุ้มไฟในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ*, *6*(3), 19-29.

อรุณวรรณ ตั้งจันทร, เกษร ธิตะจารี, และนิรัช สุดสังข์. (2556). การพัฒนาผลิตภัณฑ์เคหะสิ่งทอจากผ้าปักชาวเขาเผ่าม้ง จังหวัดเพชรบูรณ์. *วารสารวิชาการ ศิลปะสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*, *4*(2), 55-67.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. อาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 16 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog

Stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (mg/L)	ปริมาตรที่ใช้ (ml/L)
Stock 1	NH_4NO_3	1,650	
	KNO_3	1,900	
	$CaCl_2.2H_2O$	440	50
	$MgSo_4.7H_2O$	370	
	KH_2PO_4	170	
Stock 2	H_3BO_3	6.2	
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3	
	$ZnSO_4.7H_2O$	10.93	
	KI	0.83	10
	$Na_2.MoO_4.2H_2O$	0.25	
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025	
Stock 3	Na_2-EDTA	37.25	10
	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	
Stock 4	Glycine	2	
	Nicotinic acid	0.5	
	Pyridoxine-HCl	0.5	
	Thiamine-HCl	0.1	10
	Myoinocitol	100	

ผสมสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ทั้ง 4 ชนิด (ดังตารางที่ 15) และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้เข้ากัน เติมน้ำตาลซูโครส 30 g คนสารละลายจนกระทั่งน้ำตาลละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 1 L และปรับ pH ประมาณ 5.6-5.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N เติมวุ้น 8.5 g นำไปหลอมให้วุ้นละลายบน Hot plate และแบ่งอาหารลงในภาชนะที่ใชเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15-20 นาที แลวทิ้งไวใหเย็นลงเมื่อวุ้นแข็งตัวจึงนำไปใชได้

2. อาหารเหลว MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ

ผสมสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ทั้ง 4 ชนิด (ดังตารางที่ 15) และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้เข้ากัน เติมน้ำตาลซูโครส 30 g คนสารละลายจนกระทั่งน้ำตาลละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 1 L และปรับ pH ประมาณ 5.6-5.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N และแบ่งอาหารลงในภาชนะที่ใชเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15-20 นาที

3. อาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติมผงถ่าน

ผสมสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ทั้ง 4 ชนิด (ดังตารางที่ 15) ให้เข้ากัน เติมน้ำตาลซูโครส 30 g คนสารละลายจนกระทั่งน้ำตาลละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 1 L และปรับ pH ประมาณ 5.6-5.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N เติมวุ้น 8.5 g นำไปหลอมให้วุ้นละลายบน Hot plate และแบ่งอาหารลงในภาชนะที่ใชเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นเติมผงถ่าน 1 g/L นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15-20 นาที แลวทิ้งไวใหเย็นลงเมื่อวุ้นแข็งตัวจึงนำไปใชได้ (ก่อนจะทิ้งไว้ให้เย็นควรเขย่าเพื่อป้องกันการตกตะกอนของผงถ่าน)

ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย TDZ เข้มข้น (Stock solution)

ละลายผง TDZ จำนวน 50 mg ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N เมื่อละลายจนใสแล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย Distilled water จะได้สารละลาย TDZ ความเข้มข้น 1.0 mg/ml เมื่อนำไปใช้จึงต้องคำนวณ ดังสมการต่อไปนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดย N_1 = ความเข้มข้นของ Stock solution

V_1 = ปริมาตรที่ต้องการจาก Stock solution

N_2 = ความเข้มข้นของ TDZ ที่ต้องการเตรียม

V_2 = ปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียม

ตัวอย่าง ต้องการเตรียม TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L ในอาหารปริมาตร 1 L โดยใช้สารละลาย TDZ ความเข้มข้น 1.0 mg/ml สามารถแทนค่าในสมการ ดังนี้

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$V_1 = (N_2V_2)/N_1$

V_1 = (0.5 mg/L x 1 L)/1.0 mg/ml

V_1 = 0.5 ml

ดังนั้น ต้องดูด TDZ จาก Stock solution ปริมาตร 0.5 ml เพื่อเตรียมอาหาร 1 L จะได้อาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L

2. สารละลาย IBA เข้มข้น (Stock solution)

ละลายผง IBA จำนวน 0.04 g หรือ 40 mg ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N เมื่อละลายจนใสแล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 20 ml ด้วย Distilled water จะได้สารละลาย IBA เข้มข้น 2,000 mg/L เมื่อนำไปใช้จึงต้องคำนวณดังสมการที่ได้กล่าวมาข้างต้น

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนพืชหลังการฟอกฆ่าเชื้อ

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29096.3	8	3637.037	70.143	0
Within Groups	933.333	18	51.852		
Total	30029.63	26			

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
9	3	6.6667					
8	3	16.6667	16.6667				
6	3		26.6667	26.6667			
5	3			33.3333			
7	3				56.6667		
4	3				63.3333		
3	3					83.3333	
2	3						96.6667
1	3						100
Sig.		0.106	0.106	0.272	0.272	1	0.578

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Descriptives

Treatment	N	Mean	Std. Deviation
1	3	100	0
2	3	96.6667	5.7735
3	3	83.3333	5.7735
4	3	63.3333	15.27525
5	3	33.3333	5.7735
6	3	26.6667	5.7735
7	3	56.6667	5.7735
8	3	16.6667	5.7735
9	3	6.6667	5.7735
Total	27	53.7037	33.98508

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชหลังการฟอกฆ่าเชื้อ

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2270.234	8	283.779	45.954	0.000
Within Groups	111.156	18	6.175		
Total	2381.389	26			

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	0.0000			
2	3	0.0000			
3	3	1.1100			
7	3		14.4433		
5	3		14.4467		
6	3		15.5533	15.5533	
4	3		15.5567	15.5567	
8	3			20.0000	
9	3				27.7800
Sig.		0.612	0.621	0.051	1.000

Descriptives

Treatment	N	Mean	Std. Deviation
1	3	0.0000	0.00000
2	3	0.0000	0.00000
3	3	1.1100	1.92258
4	3	15.5567	1.92835
5	3	14.4467	3.85093
6	3	15.5533	3.85093
7	3	14.4433	1.92835
8	3	20.0000	3.33000
9	3	27.7800	1.92258
Total	27	12.0989	9.57037

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์จำนวนยอดเฉลี่ยของกัญชงบนแต่ละสูตรอาหารกึ่งแข็งในสัปดาห์ที่ 4

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42.92	4	10.73	12.477	0
Within Groups	38.7	45	0.86		
Total	81.62	49			

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	10	2.1			
2	10	2.5	2.5		
5	10		3.2	3.2	
3	10			3.8	
4	10				4.7
Sig.		0.34	0.098	0.155	1

Descriptives

Treatment	N	Mean	Std. Deviation
1	10	2.1	0.316
2	10	2.5	0.707
3	10	3.8	0.632
4	10	4.7	1.567
5	10	3.2	0.919
Total	50	3.26	1.291

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ความสูงเฉลี่ยของกัญชงบนแต่ละสูตรอาหารกึ่งแข็งในสัปดาห์ที่ 4

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.103	4	0.276	2.732	0.041
Within Groups	4.542	45	0.101		
Total	5.645	49			

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
T1	10	1.88	
T0.05	10	1.93	
T0	10	2.02	2.02
T0.1	10	2.11	2.11
T0.5	10		2.3
Sig.		0.147	0.068

Descriptives

Treatment	N	Mean	Std. Deviation
T0	10	2.02	0.3225
T0.05	10	1.93	0.3335
T0.1	10	2.11	0.2923
T0.5	10	2.3	0.419
T1	10	1.88	0.1687
Total	50	2.048	0.3394

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์จำนวนยอดเฉลี่ยของกัญชงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1861.111	14	132.937	38.347	0
Within Groups	104	30	3.467		
Total	1965.111	44			

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1861.111a	14	132.937	38.347	0
Intercept	106093.9	1	106093.9	30604.01	0
medium	438.222	4	109.556	31.603	0
feed	1082.178	2	541.089	156.083	0
medium * feed	340.711	8	42.589	12.285	0
Error	104	30	3.467		
Total	108059	45			
Corrected Total	1965.111	44			

ตารางที่ 21 (ต่อ)

Duncan

Treatment	N	Subset								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
15	3	42.33								
3	3	43	43							
13	3	43.33	43.33	43.33						
10	3	44	44	44	44					
9	3	44.33	44.33	44.33	44.33					
1	3	45	45	45	45	45				
6	3		46	46	46	46				
14	3			46.67	46.67	46.67				
4	3				47.33	47.33				
12	3				47.33	47.33				
7	3					48.33	48.33			
2	3						51			
8	3							55		
11	3								58.33	
5	3									66.33
Sig.		0.133	0.091	0.061	0.064	0.061	0.09	1	1	1

ตารางที่ 21 (ต่อ)

Descriptive Statistics

medium	feed	Mean	Std. Deviation	N
0	2	45	1	3
	3	51	2.646	3
	6	43	2.646	3
	Total	46.33	4.093	9
0.05	2	47.33	1.528	3
	3	66.33	2.082	3
	6	46	1.732	3
	Total	53.22	9.972	9
0.1	2	48.33	1.528	3
	3	55	1	3
	6	44.33	2.517	3
	Total	49.22	4.919	9
0.5	2	44	1	3
	3	58.33	1.528	3
	6	47.33	1.528	3
	Total	49.89	6.604	9
1	2	43.33	2.309	3
	3	46.67	0.577	3
	6	42.33	2.517	3
	Total	44.11	2.619	9
Total	2	45.6	2.384	15
	3	55.47	7.08	15
	6	44.6	2.694	15
	Total	48.56	6.683	45

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความสูงเฉลี่ยของกัญชงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวในสัปดาห์ที่ 4

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.703	14	0.265	7.988	0
Within Groups	0.993	30	0.033		
Total	4.696	44			

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.190a	14	0.085	0.727	0.732
Intercept	131.414	1	131.414	1124.26	0
medium	0.95	4	0.237	2.031	0.115
feed	0.115	2	0.058	0.492	0.616
medium * feed	0.125	8	0.016	0.134	0.997
Error	3.507	30	0.117		
Total	136.11	45			
Corrected Total	4.696	44			

ตารางที่ 22 (ต่อ)

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
13	3	1.2667						
2	3	1.4	1.4					
10	3	1.4333	1.4333	1.4333				
1	3	1.4667	1.4667	1.4667				
3	3	1.5	1.5	1.5				
6	3	1.5	1.5	1.5				
4	3		1.6667	1.6667	1.6667			
12	3		1.7333	1.7333	1.7333	1.7333		
7	3		1.7333	1.7333	1.7333	1.7333		
14	3		1.7333	1.7333	1.7333	1.7333		
9	3			1.7667	1.7667	1.7667		
11	3				1.9667	1.9667	1.9667	
15	3					2.0333	2.0333	2.0333
8	3						2.1	2.1
5	3							2.3333
Sig.		0.177	0.063	0.063	0.084	0.084	0.405	0.065

ตารางที่ 22 (ต่อ)

Descriptives

Treatment	N	Mean	Std. Deviation
1	3	1.4667	0.25166
2	3	1.4	0.17321
3	3	1.5	0.1
4	3	1.6667	0.05774
5	3	2.3333	0.30551
6	3	1.5	0.2
7	3	1.7333	0.30551
8	3	2.1	0.1
9	3	1.7667	0.05774
10	3	1.4333	0.20817
11	3	1.9667	0.05774
12	3	1.7333	0.15275
13	3	1.2667	0.20817
14	3	1.7333	0.11547
15	3	2.0333	0.15275
Total	45	1.7089	0.32671

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ค่าความสูงเฉลี่ยของเนื้อเยื่อกัญชงจากระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันที่ 4 สัปดาห์

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
สูง_4w	Equal variances assumed	11.102	0.002	0.407	38	0.686
	Equal variances not assumed			0.407	33.088	0.687

Group Statistics

	กลุ่ม	N	Mean	Std. Deviation
สูง_4w	solid	20	3.635	0.366
	bio	20	3.595	0.2438

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ผลความเข้มข้นต่าง ๆ ของ IBA หลังจากการชักนำรากที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
จำนวนราก	Between Groups	50	3	16.667	8.889	0.001
	Within Groups	30	16	1.875		
	Total	80	19			
ความยาวราก	Between Groups	20.737	3	6.912	3.379	0.044
	Within Groups	32.728	16	2.046		
	Total	53.465	19			
ความสูงต้น	Between Groups	8.457	3	2.819	3.096	0.057
	Within Groups	14.568	16	0.911		
	Total	23.025	19			

จำนวนราก

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
IBA0	20	1.8	
IBA2000	20	3.2	
IBA1500	20		5.4
IBA1000	20		5.6
Sig.		0.126	0.82

ตารางที่ 24 (ต่อ)

ความยาวราก

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
IBA2000	5	3.2	
IBA1500	5	3.42	
IBA0	5	3.86	
IBA1000	5		5.78
Sig.		0.5	1

ความสูงต้น

Duncan

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
IBA0	5	2.68	
IBA2000	5	3.4	3.4
IBA1500	5		4.14
IBA1000	5		4.32
Sig.		0.25	0.167

ตารางที่ 24 (ต่อ)

Descriptives

	Treatment	N	Mean	Std. Deviation
จำนวนราก	IBA0	5	1.8	0.837
	IBA1000	5	5.6	1.949
	IBA1500	5	5.4	1.14
	IBA2000	5	3.2	1.304
	Total	20	4	2.052
ความยาวราก	IBA0	5	3.86	1.5614
	IBA1000	5	5.78	1.9588
	IBA1500	5	3.42	0.8899
	IBA2000	5	3.2	1.0559
	Total	20	4.065	1.6775
ความสูงต้น	IBA0	5	2.68	0.3493
	IBA1000	5	4.32	1.5238
	IBA1500	5	4.14	0.7127
	IBA2000	5	3.4	0.8307
	Total	20	3.635	1.1008

ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ผลของจำนวนช่อดอกเฉลี่ยและปริมาณสาร CBD จากต้นกัญชงที่มาจากระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
จำนวนช่อดอก	Equal variances assumed	0.073	0.801	2.200	4	0.093
	Equal variances not assumed			2.200	3.994	0.093

Group Statistics

Treatment		N	Mean	Std. Deviation
จำนวนช่อดอก	กิ่ง	3	14.6667	2.08167
	เนื้อเยื่อ	3	11.0000	2.00000

ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ผลของจำนวนช่อดอกกัญชงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบที่ต่างกัน

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
จำนวนช่อดอก	Equal variances assumed	0.073	0.801	2.200	4	0.093
	Equal variances not assumed			2.200	3.994	0.093

ตารางที่ 26 (ต่อ)

Group Statistics

	กลุ่ม	N	Mean	Std. Deviation
จำนวน	ปักชำ	3	14.6667	2.08167
ช่อดอก	เนื้อเยื่อ	3	11.0000	2.00000

ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ผลของปริมาณสาร CBD จากต้นกัญชงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบที่ต่างกัน

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
CBD	Equal variances assumed	0.000	1.000	1.225	4	0.288
	Equal variances not assumed			1.225	4.000	0.288

Group Statistics

	กลุ่ม	N	Mean	Std. Deviation
CBD	ปักชำ	3	17.0000	1.00000
	เนื้อเยื่อ	3	16.0000	1.00000

ตารางที่ 28 การวิเคราะห์ผลของลักษณะต้นกัญชงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบที่ต่างกัน ความกว้างทรงพุ่ม

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	**Sig.**	**t**	**df**	**Sig. (2-tailed)**
พุ่ม1	Equal variances assumed	0.685	0.454	1.940	4	0.124
	Equal variances not assumed			1.940	3.348	0.138
พุ่ม2	Equal variances assumed	0.945	0.386	0.326	4	0.761
	Equal variances not assumed			0.326	3.242	0.765
พุ่ม3	Equal variances assumed	0.014	0.913	1.385	4	0.238
	Equal variances not assumed			1.385	3.985	0.239

Group Statistics

	กลุ่ม	**N**	**Mean**	**Std. Deviation**
พุ่ม1	ปักชำ	3	17.6667	4.04145
	เนื้อเยื่อ	3	12.3333	2.51661
พุ่ม2	ปักชำ	3	30.3333	6.11010
	เนื้อเยื่อ	3	29.0000	3.60555
พุ่ม3	ปักชำ	3	61.3333	8.50490
	เนื้อเยื่อ	3	52.0000	8.00000

ตารางที่ 28 (ต่อ)

ความสูงต้น

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	**Sig.**	**t**	**df**	**Sig. (2-tailed)**
สูง1	Equal variances assumed	0.269	0.632	0.535	4	0.621
	Equal variances not assumed			0.535	3.625	0.624
สูง2	Equal variances assumed	0.000	1.000	-0.162	4	0.879
	Equal variances not assumed			-0.162	4.000	0.879
สูง3	Equal variances assumed	0.021	0.892	-1.212	4	0.292
	Equal variances not assumed			-1.212	3.964	0.293

Group Statistics

	กลุ่ม	**N**	**Mean**	**Std. Deviation**
สูง1	ปักชำ	3	16.6667	3.51188
	เนื้อเยื่อ	3	15.3333	2.51661
สูง2	ปักชำ	3	27.3333	2.51661
	เนื้อเยื่อ	3	27.6667	2.51661
สูง3	ปักชำ	3	46.6667	4.16333
	เนื้อเยื่อ	3	51.0000	4.58258

ตารางที่ 28 (ต่อ)

จำนวนกิ่ง

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
กิ่ง1	Equal variances assumed	0.000	1.000	0.802	4	0.468
	Equal variances not assumed			0.802	4.000	0.468
กิ่ง2	Equal variances assumed	0.348	0.587	0.171	4	0.872
	Equal variances not assumed			0.171	3.790	0.873
กิ่ง3	Equal variances assumed	0.000	1.000	1.298	4	0.264
	Equal variances not assumed			1.298	4.000	0.264

Group Statistics

	กลุ่ม	N	Mean	Std. Deviation
กิ่ง1	ปักชำ	3	4.6667	1.52753
	เนื้อเยื่อ	3	3.6667	1.52753
กิ่ง2	ปักชำ	3	12.0000	2.64575
	เนื้อเยื่อ	3	11.6667	2.08167
กิ่ง3	ปักชำ	3	17.3333	2.51661
	เนื้อเยื่อ	3	14.6667	2.51661

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ภาณุภรณ์ วงค์ฉายา
วัน เดือน ปี เกิด	25 กันยายน 2540
สถานที่เกิด	แพร่
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต ระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่ปัจจุบัน	16/1 ม.1 ต.ทุ่งโฮ้ง อ.เมือง จ.แพร่
ผลงานตีพิมพ์	Wongchaya, P., Bansra, T., & Mahadtanapuk, S. (2025). Rapid Micro-Propagation of Disease-Free Hemp (Cannabis sativa L.) to Improve Industrial Production. Trends in Sciences, 22(1), 9057.