บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกส่วนต่าง ๆ ของต้นกัญชาที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การนำส่วนของกัญชาซึ่งได้แก่ ลำต้นส่วนยอด ใบส่วนยอด และก้านใบส่วนยอด มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ของ Murashige and Skoog (1962) ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D : BA เท่ากับ 2:2 มก./ลิตร พบว่าใบส่วนยอดของกัญชาสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และการเติบโตของแคลลัสดีกว่าส่วนลำต้นและก้านใบส่วนยอดของกัญชา โดยให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่า (ตารางที่ 3) คือ ใบส่วนยอดให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 100 % ซึ่งสูงกว่าส่วนของลำต้นส่วนยอดและก้านใบส่วนยอดที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 71.4 % และ 87.5 % ตามลำดับ ในด้านขนาดของแคลลัสใบส่วนยอดจะให้แคลลัส 4 ขนาดคือ แคลลัสขนาดใหญ่มากมีน้ำหนักมากกว่า 501 มิลลิกรัมขึ้นไป (ขนาด ก.) แคลลัสขนาดใหญ่น้ำหนัก 351-500 มิลลิกรัม (ขนาด ข.) แคลลัสขนาดปานกลางน้ำหนัก 151-350 มิลลิกรัม (ขนาด ค.) แคลลัสขนาดเล็กน้ำหนักน้อยกว่า 150 มิลลิกรัม (ขนาด ง.) (รูปที่ 2) ใบส่วนยอดจะให้เปอร์เซ็นต์ขนาดแคลลัสที่ใหญ่สูงกว่าลำต้นส่วนยอดและก้านใบส่วนยอด ซึ่งไม่ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่มากเลย นอกจากนี้ ยังพบว่าส่วนของเนื้อเยื่อใบส่วนยอดมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (contaminate) น้อยกว่าเนื้อเยื่อส่วนลำต้นและก้านใบปลายยอด (ตารางที่ 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และการเติบโตของแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของต้นกัญชา ในอาหารสังเคราะห์ของ Murashige and Skoog (1962) เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ 5 สัปดาห์

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ลำต้นส่วนยอด		ก้านใบ		ใบส่วนยอด	
	ควบคุม	2,4-D : BA 2:2 (มก./ลิตร)	ควบคุม	2,4-D : BA 2:2 (มก./ลิตร)	ควบคุม	2,4-D : BA 2:2 (มก./ลิตร)
การเกิดแคลลัส	76.9	71.4	20	87.5	0	100
การติดเชื้อ	56.7	53.3	50	46.7	15	8.3
การตายนิ่ง	53.9	78.6	45.8	68.8	52.4	81.8
ขนาดแคลลัส						
ก. ขนาดใหญ่มาก	0	0	0	0	0	9.9
ข. ขนาดใหญ่	0	0	0	18.8	0	9.9
ค. ขนาดปานปานกลาง	0	21.4	0	25	0	45.5
ง. ขนาดเล็ก	76.9	50	20	43.8	0	36.4

หมายเหตุ.- แคลลัสขนาด ก. มีน้ำหนักมากกว่า 501 มิลลิกรัม แคลลัสขนาด ค. มีน้ำหนัก 151-350 มิลลิกรัม
แคลลัสขนาด ข. มีน้ำหนัก 351-500 มิลลิกรัม แคลลัสขนาด ง. มีน้ำหนักน้อยกว่า 150 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 2 แสดงขนาดของแคลลัสที่ได้จากใบส่วนยอดของกัญชา เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ของ Murashige and Skoog (1962) อายุ 5 สัปดาห์

ขนาด ก. น้ำหนักมากกว่า 501 มิลลิกรัม

ขนาด ข. น้ำหนัก 351-500 มิลลิกรัม

ขนาด ค. น้ำหนัก 151-350 มิลลิกรัม

ขนาด ง. น้ำหนักน้อยกว่า 150 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การศึกษาความเข้มข้นของอาหาร (Media strength) ของ Murashige Skoog (MS) (1962) ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบส่วนยอดของกัญชา

จากการนำเอาใบส่วนยอดของกัญชามาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ของ MS แบบความเข้มข้นเต็มสูตร (Full strength) และแบบความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (Half strength) ที่มีสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ 6 Benzyl amino purine (BA) 2:2 มก./ลิตร พบว่าความเข้มข้นของอาหารมีผลต่อการเจริญของแคลลัสจากใบส่วนยอดของกัญชา 3 ประการ คือ

1. ขนาดแคลลัส เนื้อเยื่อใบส่วนยอดที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แบบความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง จะให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่มีขนาดใหญ่มากกว่า เนื้อเยื่อใบส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แบบความเข้มข้นเต็มสูตรคือ อาหารสังเคราะห์แบบ Half strength จะให้แคลลัสส่วนใหญ่จะมีขนาดปานกลางคือ 65 % ส่วนแคลลัสขนาดเล็กมีเพียง 5 % สำหรับอาหารสังเคราะห์แบบ Full strength จะให้แคลลัสส่วนใหญ่ขนาดปานกลาง 45.5 % แต่เปอร์เซ็นต์ยังต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร Half strength ซึ่งให้ถึง 65 % ส่วนแคลลัสขนาดเล็กมี 36.4 % (ตารางที่ 4)

2. การตายนิ่ง (รูปที่ 3) อาหารสังเคราะห์แบบ Half strength ช่วยลดเปอร์เซ็นต์การตายนิ่งของเนื้อเยื่อคือ เนื้อเยื่อใบส่วนยอดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แบบ Half strength มีเปอร์เซ็นต์การตายนิ่ง 30 % ขณะเดียวกันเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แบบ Full strength มีเปอร์เซ็นต์การตายนิ่งถึง 81 % (ตารางที่ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ความเขียวสดของเนื้อเยื่อใบ เนื้อเยื่อใบส่วนยอดของกัญชาที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แบบ Half strength จะมีความเขียวสดกว่าเนื้อเยื่อใบส่วนยอดที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แบบ Full strength

นอกจากนี้ ยังพบว่าอีกว่า สารควบคุมการเจริญจำเป็นต่อการเกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบส่วนยอดของกัญชาคือ ในอาหารสังเคราะห์ทั้งแบบ Half strength และ Full strength เมื่อไม่มีสารควบคุมการเจริญจะไม่เกิดแคลลัส (ตารางที่ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส การตายนิ่ง และขนาดแคลลัสของเนื้อเยื่อใบส่วนยอดของกัญชา เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ของ Murashige and Skoog แบบความเข้มข้นเต็มสูตร และความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 5 สัปดาห์

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง		ความเข้มข้นเต็มสูตร	
	ควบคุม	2,4-D : BA 2:2 (มก./ลิตร)	ควบคุม	2,4-D : BA 2:2 (มก./ลิตร)
การเกิดแคลลัส	0	94.7	0	100
การตายนิ่ง	1.3	30	22.4	81.8
ขนาดแคลลัส				
ก. ขนาดใหญ่มาก	0	10	0	9.9
ข. ขนาดใหญ่	0	15	0	9.9
ค. ขนาดปานกลาง	0	65	0	45.5
ง. ขนาดเล็ก	0	5	0	36.4

หมายเหตุ.- เลขเปอร์เซ็นต์วัดเฉลี่ยจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ 15-25 ขวดต่อ 1 treatment

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 3 แสดงลักษณะของการตายนิ่งของแคลลัส เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสปกติ เลี้ยงได้ครบ 5 สัปดาห์ในอาหาร Murashige and Skoog (1962) แบบความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (Half strength) ที่มีสารควบคุมการเจริญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

3.1 ผลของ 2,4-D, BA และ Kinetin

จากการนำใบส่วนยอดกัญชาเลี้ยงในอาหาร MS แบบ Half strength ซึ่งมีความเข้มข้นของ 2,4-D, BA และ Kinetin เท่ากับ 0.1, 2, 4, 8 และ 10 มก./ลิตร พบว่าความเข้มข้นของ 2,4-D ช่วง 0.01-4 มก./ลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดี แคลลัสมีลักษณะอวบน้ำและร่วน ขนาดไม่โตเมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มเป็น 8 และ 10 มก./ลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะต่ำมาก แคลลัสขนาดเล็กมากและเนื้อแน่น ส่วนผลของ BA หรือ Kinetin ต่อการเกิดแคลลัส พบว่าเกิดแคลลัสช่วงความเข้มข้น 0.01-4 มก./ลิตร สามารถชักนำเกิดแคลลัสได้ แต่ไม่ดีเท่า 2,4-D เมื่อเพิ่มความเข้มข้น BA หรือ Kinetin เป็น 8 และ 10 มก./ลิตร พบว่าไม่เกิดแคลลัส

เมื่อนำ 2,4-D มาใช้ร่วมกับ BA หรือ Kinetin พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะสูง และแคลลัสที่ได้จะมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อใช้ 2,4-D, BA หรือ Kinetin อย่างเดียว ดังนั้น การวิจัยนี้จึงเลือกสัดส่วนความเข้มข้น 2,4-D : BA หรือ 2,4-D : Kinetin ช่วง 0.5-5 มก./ลิตร เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสของใบกัญชา

3.2 ผลของความเข้มข้น 2,4-D : BA

จากการนำใบส่วนยอดของกัญชามาเพาะเลี้ยงในอาหาร Murashige and Skoog แบบ Half strength ซึ่งมีสัดส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D : BA ต่าง ๆ กัน พบว่าเนื้อเยื่อใบส่วนยอดกัญชาทุก combinations สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ซึ่งจะมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อยู่ 4 ขนาดคือ ขนาดใหญ่มาก น้ำหนักเฉลี่ย 632.5 มิลลิกรัม ขนาดใหญ่ น้ำหนักเฉลี่ย 428.2 มิลลิกรัม ขนาดปานกลาง น้ำหนักเฉลี่ย 190.3 มิลลิกรัม ขนาดเล็ก น้ำหนักเฉลี่ย 100.4 มิลลิกรัม การเกิดแคลลัสจะปรากฏให้เห็นในปลายสัปดาห์ที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในทุก combinations จะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3, 4 (ตารางที่ 5) (ตารางที่ 6) (ตารางที่ 7) การตายนิ่งจะเริ่มปรากฏให้เห็นในสัปดาห์ที่ 3 (ตารางที่ 5) (ตารางที่ 6) (ตารางที่ 7) ซึ่งจะเกิดกับเนื้อเยื่อที่ไม่เกิดแคลลัส และเนื้อเยื่อที่มีแคลลัสขนาดเล็ก

การเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของ 2,4-D เมื่อใช้ร่วมกับ BA ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะสูงใน combination ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำคือ 0.5 มก./ลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสถึง 100 % การเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2 มก./ลิตร (ตารางที่ 6) และ 5 มก./ลิตร (ตารางที่ 7) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง นอกจากนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การตายนิ่งเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 8) คือ ใน combination ที่มีความเข้มข้น BA เท่ากับ 2 มก./ลิตร เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ (0.5 มก./ลิตร) มีเปอร์เซ็นต์การตายนิ่งเท่ากับ 17.9 % และเพิ่มขึ้นเป็น 39.3 % และ 46.7 % เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2 และ 5 มก./ลิตร ตามลำดับ

ผลของ 2,4-D เมื่อใช้ร่วมกับ BA ต่อขนาดแคลลัสพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D ทำให้ขนาดแคลลัสขนาดใหญ่ลดลง (ตารางที่ 8) เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ 5 สัปดาห์ จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ เท่ากับ 0.5 มก./ลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่มาก และขนาดใหญ่สูง และเมื่อความเข้มข้น 2,4-D เพิ่มขึ้นเป็น 2 มก./ลิตร และ 5 มก./ลิตร เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่มากและขนาดใหญ่ลดลง (ตารางที่ 8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลของความเข้มข้น BA เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสของใบส่วนยอดของกัญชา พบว่าใน combinations ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นต่ำเท่ากับ 0.5 มก./ลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสคือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 100 % ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในสัปดาห์ที่ 1 จะเพิ่มตามความเข้มข้นของ BA (ตารางที่ 5) เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้นเป็น 2 มก./ลิตร (ตารางที่ 6) และ 5 มก./ลิตร (ตารางที่ 7) การเพิ่มความเข้มข้น BA มีแนวโน้มทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง และเปอร์-เซ็นต์การเกิดแคลลัสในสัปดาห์ที่ 1 ลดลง เมื่อความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 2 มก./ลิตร (ตารางที่ 6)

ผลของ BA เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ต่อขนาดแคลลัสและการตายนิ่ง พบว่าความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 2 มก./ลิตร จะให้แคลลัสขนาดใหญ่กว่า ความเข้มข้น BA เท่ากับ 0.5 และ 5 มก./ลิตร (ตารางที่ 8) การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ทำให้เปอร์เซ็นต์การตายนิ่งของแคลลัสและเนื้อเยื่อใบส่วนยอดเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 8) คือ เมื่อความเข้มข้นของ BA ต่ำ เท่ากับ 0.5 มก./ลิตร จะให้การตายนิ่งเท่ากับ 14.3 % และเพิ่มเป็น 39.3 % และ 42.4 % เมื่อเพิ่มความเข้มข้น BA เป็น 2 และ 5 มก./ลิตร (ตารางที่ 6)

เป็นที่น่าสังเกตว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในสัดส่วนที่มี 2,4-มีผลทำให้การขยายขนาดของใบและเส้นใบเพิ่มขึ้น

จากอิทธิพลของ 2,4-D และ BA ที่กล่าวมา สัดส่วนที่ทำให้เนื้อเยื่อใบส่วนยอดเจริญได้ดีที่สุด น่าจะเป็น 0.5 : 2 มก./ลิตร เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเกิดแคลลัส 100 % และเปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่สูง คือ ให้ขนาดใหญ่มาก น้ำหนักเฉลี่ย 532 มิลลิกรัม เท่ากับ 17.9 % ขนาดใหญ่น้ำหนักเฉลี่ย 367 มิลลิกรัม เท่ากับ 46.4 % และมีเปอร์เซ็นต์การตายนี้งต่ำกว่าสัดส่วนอื่น ๆ (ตารางที่ 8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงจากใบกัญชาในสัปดาห์ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร **Murashige and Skoog** แบบ **Half strength** ที่มีความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 0.5 มก./ลิตร และเท่ากับ 0.5, 2 และ 5 มก./ลิตร

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ความเข้มข้น 2,4-D : AB (มก./ลิตร)														
	0.5:5					0.5:2					0.5:5				
	สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
การเกิดแคลลัส	7.4	37.0	92.6	100.0	100.0	46.9	59.4	80.0	100.0	100.0	74.1	100.0	100.0	100.0	100.0
การตายนิ่ง	0	0	14.8	18.5	0	0	0	0	10.7	17.9	0	0	0	7.7	38.5
ขนาดแคลลัส															
ก. ขนาดใหญ่มาก	0	0	0	0	7.4	0	0	0	17.2	17.9	0	0	0	30.8	42.3
ข. ขนาดใหญ่	0	0	0	11.1	11.1	0	6.3	23.3	48.3	46.4	0	0	15.4	11.5	0
ค. ขนาดปานกลาง	0	14.8	33.3	37.0	29.6	0	15.6	36.7	13.8	17.9	0	48.1	50.0	37.7	57.7
ง. ขนาดเล็ก	7.4	22.2	59.3	51.9	51.9	46.9	37.5	20.0	20.7	17.9	74.1	51.9	34.6	0	0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงจากใบของกัญชาในสัปดาห์ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร Murashige and Skoog แบบ Half strength ที่มีความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 2 มก./ลิตร และ BA เท่ากับ 0.5, 2 และ 5 มก./ลิตร

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ความเข้มข้น 2,4-D : BA (มก./ลิตร)														
	2:0.5					2:2					2:5				
	สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
ร เกิดแคลลัส	54.1	94.3	94.3	97.1	97.1	6.9	53.6	75.0	95	94.7	37.1	69.7	81.8	87.9	87.9
ร ตายนิ่ง	0	0	0	2.9	14.3	0	0	3.6	25	39.3	0	0	6.1	27.3	42.4
าคแคลลัส															
ก. ขนาดใหญ่มาก	0	0	5.7	5.7	8.6	0	0	7.9	10	10.0	0	0	21.2	21.2	21.2
ข. ขนาดใหญ่	0	11.4	8.6	8.6	11.4	0	3.6	7.1	15	15.0	0	24.2	3.0	3.0	3.0
ค. ขนาดปานกลาง	0	57.1	57.1	57.1	51.4	0	10.7	50.0	65	65.0	0	15.1	27.3	27.3	27.3
ง. ขนาดเล็ก	54.1	27.7	27.7	27.7	27.7	6.9	39.3	10.0	5	5.0	37.1	30.3	33.3	33.3	33.3

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เรางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงจากใบกัญชาในสัปดาห์ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร **Murashige and Skoog** แบบ **Half strength** ที่มีความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 5 มก./ลิตร และ BA เท่ากับ 0.5, 2 และ 5 มก./ลิตร

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ความเข้มข้น 2,4-D : BA (มก./ลิตร)														
	5:05					5:2					5:5				
	สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
เ เกิดแคลลัส	0	80.8	84.6	88	88	45.7	78.8	78.8	83.9	83.3	25	64.7	82.4	82.4	82.4
เ ตายนิ่ง	0	0	11.5	32	40	0	0	15.2	32.3	46.7	0	2.8	26.5	44.1	58.8
าดแคลลัส															
ก. ขนาดใหญ่มาก	0	0	0	24	24	0	0	0	6.5	6.7	0	0	0	8.8	8.8
ข. ขนาดใหญ่	0	0	19.2	8	8	0	12.1	18.2	16.1	16.7	0	14.7	20.6	11.8	11.8
ค. ขนาดปานกลาง	0	19.2	34.6	24	24	0	54.5	51.5	48.4	46.7	0	14.7	35.3	35.3	12.0
ง. ขนาดเล็ก	0	61.5	30.8	32	32	45.7	12.1	9.1	12.9	13.3	25	35.3	26.5	26.5	9.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัส และการตายนิ่งของแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงใบกัญชา เมื่อเลี้ยงได้ 5 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์ **Murashige and Skoog** แบบ **Half strength** ที่มีความเข้มข้น 2,4-D ; BA ต่างกัน

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ความเข้มข้น 2,4-D : BA (มก./ลิตร)								
	0.5:5	0.5:2	0.5:5	2:0.5	2:2	2:5	5:0.5	5:2	5:5
การเกิดแคลลัส	100.0	100.0	100.0	97.1	94.7	87.9	88	83.3	82.4
การตายนิ่ง	18.5	17.9	38.5	14.5	39.3	42.4	40	46.7	58.8
ขนาดแคลลัส									
ก. ขนาดใหญ่มาก	7.4	17.9	42.3	8.6	10.0	21.2	24	6.7	8.8
ข. ขนาดใหญ่	11.1	46.4	0	11.4	15.0	3.0	8	16.7	11.8
ค. ขนาดปานกลาง	25.9	17.9	57.7	51.4	65.0	27.3	24	46.7	35.3
ง. ขนาดเล็ก	51.9	0	0	27.7	5.0	42.4	32	13.3	26.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

จากการนำใบส่วนยอดของกัญชาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS แบบ Half strength ซึ่งมีสัดส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D : Kinetin ต่าง ๆ กัน พบว่าทุก combinations สามารถชักนำเนื้อเยื่อใบส่วนยอดของกัญชาให้เกิดแคลลัสได้ซึ่งมี 4 ขนาดคือ ขนาดใหญ่มาก น้ำหนักเฉลี่ย 620.7 มิลลิกรัม ขนาดใหญ่น้ำหนักเฉลี่ย 435.6 มิลลิกรัม ขนาดปานกลาง 180.2 มิลลิกรัม ขนาดเล็กน้ำหนักเฉลี่ย 98.7 มิลลิกรัม การเกิดแคลลัสจะปรากฏให้เห็นในปลายสัปดาห์ที่ 1 และจะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4-5 (ตารางที่ 9) (ตารางที่ 10) (ตารางที่ 11) การตายนึ่งจะเริ่มปรากฏให้เห็นในสัปดาห์ที่ 2 (ตารางที่ 9) (ตารางที่ 10) (ตารางที่ 11)

การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ 2,4-D เมื่อใช้ร่วมกับ Kinetin ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสพบว่าเหมือนกับผลของ 2,4-D เมื่อใช้ร่วมกับ BA คือ การเพิ่ม 2,4-D มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลงคือ ใน combination ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ (0.5 มก./ลิตร) เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะสูงเท่ากับ 79.2 % และ 100 % (ตารางที่ 9) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2 มก./ลิตร (ตารางที่ 10) และ 5 มก./ลิตร (ตารางที่ 11) เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลง

ผลของ 2,4-D เมื่อใช้ร่วมกับ Kinetin ต่อการตายนึ่งพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การตายนึ่งเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 11) เช่นเดียวกับการเพิ่ม 2,4-D เมื่อใช้ร่วมกับ BA

สารควบคุมการเจริญ 2,4-D จำเป็นต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อกัญชา และในปริมาณที่ต่ำ คือ 0.5 มก./ลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสขนาดใหญ่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เมื่อใช้ร่วมกับ Kinetin จะมีแนวโน้มคล้ายกับ 2,4-D ใน BA คือ การเพิ่มความเข้มข้น 2,4-D ทำให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่ลดลง ซึ่งเห็นได้จากเมื่อเพาะเลี้ยงใบส่วนยอดกัญชาได้ 5 สัปดาห์ ใน combination ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ (0.5 มก./ลิตร) เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่มาก และขนาดใหญ่จะสูง และเปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดปานกลางสูงมาก (ตารางที่ 9) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2 มก./ลิตร (ตารางที่ 10) เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่ไม่มี เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดกลางลดลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 5 มก./ลิตร (ตารางที่ 11) เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดปานกลางและขนาดใหญ่ลดลง

ผลของความเข้มข้น Kinetin เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ต่อขนาดแคลลัส พบว่าที่ความเข้มข้นของ Kinetin ต่ำ (0.5 มก./ลิตร) จะให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่มีขนาดใหญ่สูงกว่าความเข้มข้นของ Kinetin เท่ากับ 2 และ 5 มก./ลิตร (ตารางที่ 12)

ผลของ Kinetin เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสพบว่า ใน combination ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 2 มก./ลิตร การเพิ่ม Kinetin มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลงคือ เมื่อความเข้มข้นของ Kinetin เท่ากับ 0.5 มก./ลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 80 % แต่เมื่อความเข้มข้นของ Kinetin เป็น 2 และ 5 มก./ลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลงเป็น 50 % และ 47.8 % (ตารางที่ 10) ส่วนใน combination ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำคือ 0.5 มก./ลิตร เมื่อความเข้มข้นของ Kinetin เท่ากับ 2 มก./ลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำกว่า ความเข้มข้นของ Kinetin เท่ากับ 0.5 และ 5 มก./ลิตร (ตารางที่ 9) แต่ใน combination ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เท่ากับ 5 มก./ลิตร เมื่อความเข้มข้นของ Kinetin เท่ากับ 2 มก./ลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่า 0.5 และ 5 มก./ลิตร (ตารางที่ 11) คือ ความเข้มข้น Kinetin เท่ากับ 2 มก./ลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเท่ากับ 85 % ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดสูงกว่า Kinetin 0.5 และ 5 มก./ลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 39.5 % และ 42.1 % (ตารางที่ 9) ตามลำดับ

ดังนั้น จากผลของ Kinetin เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่กล่าวมาเป็นที่น่าสังเกตว่าที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ (0.5 มก./ลิตร) กลาง (2 มก./ลิตร) และสูง (5 มก./ลิตร) ความเข้มข้นของ Kinetin ที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสแต่ละ range ไม่เท่ากัน จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ คือ 0.5 มก./ลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของ Kinetin ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส แต่มีผลต่อขนาดแคลลัสคือ การเพิ่มความเข้มข้นของ Kinetin ทำให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่ลดลง ใน combination ที่ 2,4-D ความเข้มข้นกลาง (2 มก./ลิตร) และสูง (5 มก./ลิตร) การเพิ่ม Kinetin จะยับยั้งการเกิดแคลลัส

นอกจากนี้ ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ Kinetin เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D มีผลต่อการขยายขนาดของใบและก้านใบเหมือนกับ BA ที่ใช้ร่วมกับ 2,4-D คือ ทำให้ใบและเส้นใบขยายขนาดใหญ่ขึ้น

เป็นที่น่าสังเกตว่าใน combination ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำคือ 0.5 มก./ลิตร และที่ความเข้มข้นของ Kinetin สูงคือ 5 มก./ลิตร พบว่าแคลลัสที่มีขนาดใหญ่มากจะเกิดราก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากอิทธิพลของ 2,4-D และ Kinetin ที่กล่าวมานี้พบว่าสัดส่วนความเข้มข้น 0.5 : 0.5 มก./ลิตร เป็นสัดส่วนที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนความเข้มข้นอื่น ๆ คือ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงคือ 100 % เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสขนาดใหญ่มากสูงคือ 35.7 % และมีเปอร์เซ็นต์การตายนิ่งต่ำคือ 10.7 %

ผลของความเข้มข้นของ Kinetin เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ต่อการตายนิ่งของแคลลัสพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ Kinetin มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การตายนิ่งเพิ่มขึ้นคือ เมื่อความเข้มข้นของ Kinetin เท่ากับ 0.5 มก./ลิตร เปอร์เซ็นต์การตายนิ่งจะต่ำคือ 10.7 % เมื่อความเข้มข้นของ Kinetin เพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 5 มก./ลิตร เปอร์เซ็นต์การตายนิ่งจะเพิ่มขึ้นเป็น 37.5 % และ 70.8 % (ตารางที่ 12)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการเติบโตของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากใบกัญชาในสัปดาห์ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร **Murashige and Skoog** แบบ **Half strength** ที่มีความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 0.5 มก./ลิตร และ **Kinetin** เท่ากับ 0.5, 2 และ 5 มก./ลิตร

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ความเข้มข้น 2,4-D : Kinetin มก./ลิตร														
	0.5:5					0.5:2					0.5:5				
	สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
การเกิดแคลลัส	0	66.7	96.6	100	100	48.1	80	79.2	79.2	79.2	19.2	100	100	100	100
การตายนิ่ง	0	0	6.9	10.7	0	0	0	12.5	29.2	37.5	0	8.3	0	50	70.8
ขนาดแคลลัส															
ก. ขนาดใหญ่มาก	0	0	0	13.8	35.7	0	0	0	0	8.3	0	0	0	8.3	8.3
ข. ขนาดใหญ่	0	0	13.8	13.8	7.1	0	0	8.3	8.3	0	0	0	8.3	8.3	8.3
ค. ขนาดปานกลาง	0	53.3	87.8	72.4	57.1	0	16	50.0	54.2	54.2	0	29.2	50.0	5.8	45.8
ง. ขนาดเล็ก	0	13.3	0	0	0	48.1	64	20.8	16.7	19.2	19.2	70.8	41.7	37.5	37.5

ก. แคลลัสขนาดใหญ่มาก น้ำหนัก 501 มิลลิกรัมขึ้นไป ค. แคลลัสขนาดปานกลาง น้ำหนัก 151-350 มิลลิกรัมขึ้นไป

ข. แคลลัสขนาดใหญ่ น้ำหนัก 351-500 มิลลิกรัมขึ้นไป ง. แคลลัสขนาดเล็ก น้ำหนักต่ำกว่า 150 มิลลิกรัมลงมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงจากใบกัญชาในสัปดาห์ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร Murashige and Skoog แบบ Half strength ที่มีความเข้มข้น 2,4- เท่ากับ 2 มก./ลิตร และ Kinetin เท่ากับ 0.5, 2 และ 5 มก./ลิตร

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ความเข้มข้น 2,4-D : Kinetin มก./ลิตร														
	2:0.5					2:2					2:5				
	สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
การเกิดแคลลัส	0	19.2	68	80	80	0	17.2	24.1	39.1	50.0	8	29.2	39.1	47.8	47.8
การตายนิ่ง	0	0	4	8	24	0	0	6.9	10.7	21.4	0	8.3	21.7	30.4	39.1
ขนาดแคลลัส															
ก. ขนาดใหญ่มาก	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ข. ขนาดใหญ่	0	0	0	12	12	0	0	0	0	14.3	0	0	0	0	17.4
ค. ขนาดปานกลาง	0	0	12	24	32	0	0	0	10.7	21.4	0	0	8.7	13.0	13.0
ง. ขนาดเล็ก	0	19.2	52	44	36	0	17.2	24.1	28.6	14.3	8	29.2	26.1	34.8	17.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 11 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงจากใบของกัญชาในสัปดาห์ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร **Murashige and Skoog** แบบ **Half strength** ที่มีความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 5 มก./ลิตร และ **Kinetin** ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 2 และ 5 มก./ลิตร

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ความเข้มข้น 2,4-D : Kinetin (มก./ลิตร)														
	5:0.5					5:2					5:5				
	สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่					สัปดาห์ที่				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
การเกิดแคลลัส	0	0	35.7	35.7	36.3	0	33.3	72.7	85	85	0	21.7	47.6	47.6	21.1
การตายนิ่ง	0	0	14.3	25.0	32.1	0	0	13.6	35	45	0	0	9.5	28.5	47.4
ขนาดแคลลัส															
ก. ขนาดใหญ่มาก	0	0	0	0	7.1	0	0	0	0	35	0	0	0	0	10.5
ข. ขนาดใหญ่	0	0	0	0	7.1	0	0	0	25	5	0	0	0	9.5	0
ค. ขนาดปานกลาง	0	0	0	7.1	3.6	0	0	18.2	30	20	0	0	4.8	9.5	0
ง. ขนาดเล็ก	0	0	10.7	28.6	21.4	0	33.3	54.5	25	25	0	21.7	42.9	28.6	31.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัส และการตายนิ่งของแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงใบกัญชา เมื่อเลี้ยงได้ 5 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์ **Murashige and Skoog** แบบ **Half strength** ที่มีความเข้มข้น 2,4-D : **Kinetin** ต่างกัน

ลักษณะที่สังเกต เปอร์เซ็นต์	ความเข้มข้น 2,4-D : Kinetin (มก./ลิตร)								
	0.5:5	0.5:2	0.5:5	2.0:5	2:2	2:5	5:0.5	5:2	5:5
การเกิดแคลลัส	100	79.2	100	80	50.0	47.8	39.3	85	42.1
การตายนิ่ง	10.7	35.5	70.8	24	21.4	39.1	32.1	45	47.4
ขนาดแคลลัส									
ก. ขนาดใหญ่มาก	35.7	8.3	8.3	0	0	0	7.1	35	10.5
ข. ขนาดใหญ่	7.1	0	8.3	12	14.3	17.4	7.1	5	0
ค. ขนาดปานกลาง	57.1	54.2	45.8	32	21.4	13.0	3.6	20	0
ง. ขนาดเล็ก	0	16.7	33.3	36	14.3	17.4	21.43	25	31.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ผลของการเคลื่อนย้ายแคลลัสลงในอาหารใหม่ (Subculture) ที่มีต่อการเติบโตของแคลลัส

จากการนำแคลลัส 2 ขนาดคือ ขนาดใหญ่มาก น้ำหนักเฉลี่ย 632.5 มิลลิกรัม และขนาดปานกลาง น้ำหนักเฉลี่ย 190.3 มิลลิกรัม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากใบส่วนยอดของกัญชาอายุ 35 วัน มาเลี้ยงต่อ (subculture) ในอาหารใหม่ชนิดเดียวกันด้วยความเข้มข้นของ 2,4-D : BA เท่ากับ 0.5 : 5 มก./ลิตร เหมือนเดิม พบว่าการเพิ่มขนาดแคลลัสจะปรากฏให้เห็นในสัปดาห์ที่ 1 ขนาดแคลลัสจะเพิ่มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 และจะชะงักการเติบโตในสัปดาห์ที่ 4 น้ำหนักของแคลลัสเริ่มต้นเมื่อเริ่ม subculture เฉลี่ยเท่ากับ 152 มิลลิกรัม ทุก treatment

ผลของการ subculture ของแคลลัสขนาดใหญ่มาก พบว่าเมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ จะได้แคลลัส 3 ขนาดคือ ขนาดใหญ่ (L) น้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 610 มิลลิกรัม ขนาดกลาง (M) น้ำหนักเฉลี่ย 310 มิลลิกรัม ขนาดเล็ก (S) น้ำหนักเฉลี่ย 175 มิลลิกรัม ขนาดของแคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่จะให้ขนาดกลาง (M) เท่ากับ 46.4 % รองลงมาคือ ขนาดเล็ก (S) เท่ากับ 39.3 % และขนาดใหญ่เท่ากับ 14.3 % (ตารางที่ 2) แคลลัสจะมีลักษณะเนื้อแน่น (firm) และสีเหลืองเข้มกว่าแคลลัสเริ่มต้น (รูปที่ 4)

ผลของการ subculture ของแคลลัสขนาดปานกลางพบว่า ส่วนใหญ่ให้แคลลัสขนาดเล็ก (S) คือ 43.3 % รองลงมาคือ แคลลัสที่ไม่เพิ่มขนาด 30 % และแคลลัสขนาดกลาง (M) 26.7 % แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะอวบน้ำ สีเหลือง (รูปที่ 5)

การเปรียบเทียบการ subculture ของแคลลัสขนาดใหญ่มาก และขนาดปานกลาง พบว่าในแคลลัสที่มีขนาดใหญ่มากจะให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสขนาดใหญ่ สูงกว่าการใช้แคลลัสขนาดปานกลางคือ ให้แคลลัสขนาด L ซึ่งมีขนาดเป็น 4 เท่าของแคลลัสเริ่มแรก 14.3 % สำหรับแคลลัสขนาดปานกลางไม่ให้แคลลัสขนาด L เลย แต่ส่วนใหญ่จะให้ขนาด S เท่ากับ 43.2 % (ตารางที่ 13)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นที่น่าสังเกตว่า แนวโน้มของแคลลัสขนาดใหญ่เมื่อ subculture มีโอกาสให้แคลลัสขนาดใหญ่ได้ในขณะที่การ subculture แคลลัสขนาดกลางจะไม่ให้แคลลัสขนาดใหญ่เลย

จะเห็นได้ว่า Cell line ที่มีศักยภาพในการเติบโตที่ดีซึ่งจะให้แคลลัสที่เกิดใหม่ที่ดี อัตราการเติบโตที่ดีด้วย ซึ่งจะได้อธิบายในหัวข้ออภิปรายผลต่อไป

ผลของ subculture ของแคลลัสที่ตายนิ่ง พบว่าแคลลัสที่ตายนิ่งไม่มีการเติบโตของแคลลัส และเป็นสีน้ำตาลดำเข้ม (รูปที่ 6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 13 แสดงเปอร์เซ็นต์ขนาดแคลลัสต่าง ๆ เมื่อ subculture ในอาหาร Murashige and Skoog แบบ Half strength ที่มีสัดส่วนความเข้มข้น 2,4-D : BA เท่ากับ 0.5 : 5 มก./ลิตร เลี้ยงได้ 4 สัปดาห์

ขนาดของแคลลัสที่ใช้	เปอร์เซ็นต์ของขนาดแคลลัสที่เกิดจากการ subculture			
	ขนาด L	ขนาด M	ขนาด S	ไม่เพิ่มขนาด*
ขนาดใหญ่มาก**	14.3	46.4	39.3	0
ขนาดปานกลาง***	0	26.7	43.3	30
แคลลัสที่ตายนิ่ง	0	0	0	100

หมายเหตุ.- น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสเริ่ม subculture เท่ากับ 152 มิลลิกรัม เปอร์เซ็นต์ที่ได้คิดจากจำนวน 15-30 ขวด

*ไม่เพิ่มขนาด มีทั้งแคลลัสที่ตายและยังมีชีวิตอยู่

**น้ำหนักเฉลี่ย 632.5 มิลลิกรัม

***น้ำหนักเฉลี่ย 190.3 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 4 แสดงการเติบโตของแคลลัสขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการ subculture จากแคลลัสขนาดใหญ่มาก เมื่อ 4 สัปดาห์ ในอาหาร Murashige and Skoog (Half strength) ที่มี 2,4-D : BA เท่ากับ 0.5 : 5 มก./ลิตร

ขวด A_1 เป็นแคลลัสที่ไม่ได้ subculture คงเลี้ยงในอาหารเก่า

ขวด A_2-A_4 เป็นแคลลัสที่เติบโตได้ขนาด S, L และ M ตามลำดับ หลังจากการ subculture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 5 แสดงการเติบโตของแคลลัสขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการ subculture จากแคลลัสขนาดปานกลาง เมื่อ 4 สัปดาห์ ใน MS media ที่มี 2,4-D : BA เท่ากับ 0.5 : 5 มก./ลิตร

ขวด $ก_1$ เป็นแคลลัสที่ไม่ได้ subculture คงเลี้ยงในอาหารเก่า

ขวด $ก_2$-$ก_4$ เป็นแคลลัสที่มีขนาด s และไม่เติบโตตามลำดับ หลัง subculture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 6 แสดงลักษณะการไม่เติบโตของแคลลัสที่ได้จากการ subculture จากแคลลัสที่ตายนิ่ง เมื่อ 4 สัปดาห์ ใน MS media ที่มี 2,4-D : BA เท่ากับ 0.5 : 5 มก./ลิตร

J_1 เป็นแคลลัสที่ไม่ได้ subculture คงเลี้ยงในอาหารเก่า

J_2-J_4 เป็นแคลลัสที่ subculture แต่ไม่เติบโต

การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ Antimicrobial จากเนื้อเยื่อแคลลัสที่ได้จากใบส่วนยอดกัญชา

การทดสอบครั้งที่ 1

จากการนำแคลลัสที่ได้จากใบส่วนยอดของกัญชาอายุ 60 วัน ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Nutrient agar) ซึ่ง spread plate ด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgalis*, *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp. พบว่าไม่ปรากฏ clear zone กับเชื้อที่ทดสอบ ดังตารางที่ 14 แต่ปรากฏว่าเกิด clear zone กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายรา (รูปที่ 7) ซึ่งเชื้อ (unknown) นี้เกิดจากการติดเชื้อ (contaminate) ของอาหารเลี้ยงเชื้อขณะทดลอง

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบสาร Antimicrobial จากเนื้อเยื่อแคลลัสในส่วนยอดของกัญชากับเชื้อ microbial ชนิดต่าง ๆ

เชื้อที่ทดสอบ	ผลการทดลอง
Bacillus megaterium	-
Escherichia coli	-
Pseudomonas aeruginosa	-
Candida albicans	-
Micrococcus luteus	-
Proteus vulgalis	-
Aspergillus niger	-
Penicillium sp.	-
Unknown	+

\- ไม่เกิด clear zone

\+ เกิด clear zone

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดสอบครั้งที่ 2

จากการนำเอา callus ที่ได้จากใบส่วนยอดกัญชาอายุ 60 วัน น้ำหนัก 2 กรัม มาบดแล้วเอากระดาษกรอง ϕ 0.5 ซม. จุ่มลงใน callus ที่บดแล้ววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ spread plate ด้วยเชื้อ <u>Bacillus</u> <u>megaterium</u>พบว่าไม่ปรากฏ clear zone การเลือกเชื้อ <u>B.megaterium</u> ชนิดเดียวมาทดสอบเพื่อเป็น preliminary experiment เนื่องจาก Veliky and Genest (1972) รายงานว่าเชื้อชนิดนี้ตอบสนองต่อสาร antimicrobial ที่ผลิตจากแคลลัสของกัญชาได้ดีที่สุด ดังนั้นถ้าเชื้อนี้ไม่เกิด clear zone กับแคลลัสที่นำมาบดก็อาจจะไม่ต้องทดสอบกับเชื้อชนิดอื่น แต่ถ้ามีการทดสอบครั้งต่อไปควรทดสอบกับเชื้อ microbial หลาย ๆ เชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 7 แสดงการเกิด clear zone ของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากใบกัญชาที่มีอายุ 60 วัน กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง (unknown) ที่เกิดจากการติดเชื้อ (contaminate)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved