P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (มกราคม-กุมภาพันธ์ 2566) หน้า [73-84]

การระบุชนิดของพืชสกุลกัญชาโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

DNA Markers Assisted Type Determination of *Cannabis* sp.

ชุติมา แก้วพิบูลย์[1,*], ณวงศ์ บุนนาค[2], อับดุลวาหาบ สาแล๊ะ[3]
[1]*สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210*
[2]*สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ สงขลา 90000*
[3]*สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ภูเก็ต 83000*
Chutima Kaewpiboon[1,*], Nawong Boonnak[2], Abdulwahab Salae[3]
[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung 93210*
[2]*Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla 90000*
[3]*Department of Science and Mathematics, Faculty of Science, Phuket Rajabhat University, Phuket 83000*
Received 20 December 2022; Received in revised 14 February 2023; Accpted 21 February 2023

บทคัดย่อ

พืชสกุลกัญชา มีสารออกฤทธิ์หลักกลุ่มแคนนาบินอยด์ ได้แก่ เตตร้าไฮโดรแคนนาบินอล (tetra-9-Tetrahydrocannabinol; THC) และแคนนาบิไดออล (Cannabidiol; CBD) ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตามปริมาณสาร THC และ CBD ดังนั้นงานวิจัยนี้นำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ระบุกลุ่มของพืชสกุลกัญชาสายพันธุ์หางกระรอกภูพาน พบว่าจัดอยู่ในแบบที่ 2 (type 2) คือมียีนที่สังเคราะห์สารทั้ง THC และ CBD จากนั้นนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส จากชิ้นส่วนใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดพืชสกุลกัญชาบนอาหารสังเคราะห์สูตรของ Murashige and Skoog (MS) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นส่วนของใบในสภาพปลอดเชื้อไปชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญกลุ่มออกซินชนิด 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และที่ความเข้มข้น 2,4-D 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้แคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีสีเขียวและเป็นชนิดเกาะกันแน่น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสามารถระบุชนิดของพืชสกุลกัญชา และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับการขยายพันธุ์ และการผลิตสารทุติยภูมิ

คำสำคัญ: กัญชา; แคลลัส; เตตร้าไฮโดรแคนนาบินอล; แคนนาบิไดออล

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** chutima.k@tsu.ac.th
doi:

Abstract

Cannabis sp. has the main active ingredient in the cannabinoids, i.e. tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). It was grouped by the content of THC and CBD. This research used molecular techniques to classify group of the Thai stick "Phuphan" as type 2 because the genes that synthesize both THC and CBD were found. Then the leaves explant was used to induce callus. The leaves obtained from seed tissue culture on Murashige and Skoog (MS) for 4 weeks were induced callus formation in MS with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at concentrations of 0.5, 1.0, and 2.0 mg/L for 4 weeks. The results showed that all experiments could induce callus, and at the concentration 1.0 mg/L 2,4-D the largest callus, green color and compact callus was produced. Therefore, the data of this research can be used as information for the production of secondary metabolites.

Keywords: *Cannabis* sp.; Callus culture; Tetrahydrocannabinol; Cannabidiol

1. บทนำ

ปัจจุบันพืชสกุลกัญชาจัดเป็นสมุนไพรควบคุม สำหรับใช้รักษาโรคอย่างหลากหลาย เช่น ระงับปวด คลายกล้ามเนื้อ เพิ่มความอยากอาหาร รักษาอาการนอนไม่หลับ ลดการอาเจียน และลดอาการชักได้ [1] ซึ่งเป็นผลจากสารออกฤทธิ์กลุ่มแคนนาบินอยด์ที่พบในพืชสกุลกัญชามากกว่า 100 ชนิด โดยมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เตตร้าไฮโดรแคนนาบินอล (tetra-9-Tetrahydrocannabinol; THC) แคนนาบินอล (Cannabinol; CBN) และแคนนาบิไดออล (Cannabidiol; CBD) เป็นต้น [2] แต่อย่างไรก็ตามสารสำคัญดังกล่าวจะมีปริมาณแตกต่างกัน ซึ่งแปรผันตามปัจจัยต่างๆ เช่น สายพันธุ์ปลูก สภาพแวดล้อมของพื้นที่ปลูก และฤดูกาล [3] ดังนั้นจึงใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อผลิตสารสำคัญทดแทนจากการเพาะปลูกพืชตามธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์พืชมียีนครบถ้วน สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการชีวสังเคราะห์ต่างๆ และสร้างสารสำคัญได้เช่นเดียวกับพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งข้อดีของการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช คือ สามารถผลิตสารอย่างต่อเนื่อง สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในการผลิต ปราศจากเชื้อก่อโรคพืช และไม่มีปัจจัยการผลิตอันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง อีกทั้งขั้นตอนการสกัด และแยกสารให้บริสุทธิ์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชนั้นง่ายกว่าการสกัดจากชิ้นส่วนพืชอื่นๆ ในธรรมชาติ [4] ปัจจุบันมีการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชหลายชนิด เช่น องุ่น [5] ฟ้าทะลายโจร [6] และ บัวบก [7] เป็นต้น นอกจากนี้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์จากพืชสกุลกัญชา 3 สายพันธุ์ พบว่าสามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุดจากใบเลี้ยง [8] ทั้งนี้สายพันธุ์ของพืชสกุลกัญชา สามารถแบ่งกลุ่มตามปริมาณการสะสมของสารกลุ่มแคนาบินอยด์ 2 ชนิด คือ THC และ CBD สามารถจำแนกกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ แบบที่ 1 (type I) กัญชาที่ให้สาร THC สูง มากกว่าร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก แบบที่ 2 (type II) กัญชาที่ให้สาร THC มากกว่าร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก และ CBD มากกว่าร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และแบบที่ 3 (type III) กัญชาที่ให้สาร CBD สูงมากกว่าร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก [9] ซึ่งกลุ่มของสายพันธุ์ส่งผลโดยตรงต่อสัดส่วนของสารแคนนาบินอยด์ชนิด

THC และ CBD และประสิทธิภาพในการรักษาโรค ซึ่งการสังเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ เกิดจากการควบคุมในระดับยีนที่สังเคราะห์สาร THC (THCA synthase) และ CBD (CBDA synthase) [9] จึงทำให้สามารถจัดจำแนกกลุ่มของพืชสกุลกัญชาตามปริมาณการสะสมของสารกลุ่มแคนาบินอยด์ได้ [10,11]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจการระบุสายพันธุ์พืชสกุลกัญชาในระดับโมเลกุล เพื่อนำมาชักนำให้เกิดแคลลัส ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของเซลล์พืชเพาะเลี้ยง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD เพื่อนำข้อข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ สำหรับต่อยอดในการขยายพันธุ์ และผลิตสารทุติยภูมิ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช

2. อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 เก็บตัวอย่างพืชสกุลกัญชา

เก็บตัวอย่างพืชสกุลกัญชาสายพันธุ์หางกระรอกภูพาน สายพันธุ์ควบคุมเชิงบวก (positive control) แบบที่ 2 (type II) คือ สายพันธุ์หางกระรอกภูพาน เอสที 1 และแบบที่ 3 (type III) กัญชาที่ให้สาร CBD สายพันธุ์ ชาล็อต แองเจิ้ล (Charlotte's angle) จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยเลือกเก็บใบจากส่วนยอดของพืชที่อายุประมาณ 3 สัปดาห์

2.2 จำแนกสายพันธุ์พืชสกุลกัญชาในระดับโมเลกุลของยีนสังเคราะห์สาร THC และCBD

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนด้วยวิธี Doyle and Doyle (1987) [12] ของตัวอย่างพืชสกุลกัญชา แล้วจึงนำมาปรับความเข้มข้น 30 นาโนกรัม เพื่อทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ของยีน THCA synthase [13] และ CBDA synthase [14] (Table 1) ด้วยวิธีการพีซีอาร์ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร และ PCR master mix (dNTP (2 มิลลิโมลาร์) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร MgCl2 (50 มิลลิโมลาร์) 0.8 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยารอบแรก 94 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบที่ 2-30 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้วุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TAE ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที และย้อมดีเอ็นเอด้วยสี SYBR™ Gold Gel Stain จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยเปรียบเทียบขนาดของยีน เพื่อจัดจำแนกกลุ่มของพืชสกุลกัญชา

Table 1 Information of primers *THCA synthase* และ *CBDA synthase* genes used in this study.

Target genes	Primer names	Directions	Sequences (5' to 3')	Product lengths (bp)	References
CBDAS	CBDAS_F	Forward	AAGAAAGTTGGCTTGCAG	1080	[13]
	CBDAS_R	Reverse	ATCCAGTTTAGATGCTTTTCGT		
THCAS	THCAS_F	Forward	CCTGAATTCGACAATACAAAATCTTAGATTCAT	589	[14]
	THCAS_R	Reverse	ACTGAATATAGTAGACTTTGATGGGACAGCAACC		

2.3 วิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ชนิด THC และ CBD ด้วยเทคนิค HPLC

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ นำสารสกัดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วย Membrane Filter 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายที่ได้ใส่ขวดที่มีฝาปิด แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLCโดยใช้ Mobile phase ดังนี้ กรดฟอร์มิกร้อยละ 0.1 และ กรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ โดยปิเปตกรดฟอร์มิก ร้อยละ 0.1 ด้วยอัตราการไหลที่มีผลต่อการแยกของที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 5 ไมโครเมตร (150 X 4.6 mm) ซึ่งมีการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร THC และ CBD รวม

2.4 เพาะเลี้ยงเซลล์พืชสกุลกัญชา

2.4.1 ฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงเมล็ดกัญชา

นำเมล็ดกัญชาล้างทำความสะอาด ด้วยน้ำสะอาดโดยปล่อยให้น้ำไหลผ่านนาน 15 นาที นำมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายเอธิล แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตามด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรพร้อมกับหยด Tween 20 3 หยด เป็นเวลา 15 นาที โดยทำการทดลองละ 3 ซ้ำ แต่ละชุดการทดลองมี 9 เมล็ด จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที หลังจากฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำเมล็ดไปเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) [15] ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

2.4.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส

นำใบแท้ตำแหน่งใบแรกของต้นที่งอกในสภาพปลอดเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการทดลองมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัวอย่าง โดยปลูกในสภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน วางเลี้ยง 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ ร้อยละการเกิดแคลลัส ลักษณะของแคลลัสและสีของแคลลัส

2.5 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนด้วยวิธี Doyle and Doyle (1987) [12] ของตัวอย่างต้นแม่ และเซลล์แคลลัสเพาะเลี้ยง จากนั้นปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 30 นาโนกรัม เพื่อทำปฏิกิริยา RAPD กับไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ที่มีขนาด 10 เบส จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ OPA-05 OPA-09 OPA-10 OPB-02 และOPH-17 ด้วยวิธีการพีซีอาร์ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร และ PCR master mix (dNTP (2 มิลลิโมลาร์) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 มิลลิโมลาร์) 0.8ไมโครลิตร TaqDNA polymerase

(5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยารอบแรก 94 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบที่ 2-30 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้วุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TAE ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที และย้อมดีเอ็นเอด้วยสี SYBR™ Gold Gel Stain เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ จากต้นแม่ และเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อประเมินเสถียรภาพทางพันธุกรรม

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิต

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 เก็บตัวอย่างพืชสกุลกัญชา

นำตัวอย่างใบอ่อนของพืชที่อายุประมาณ 3 สัปดาห์ ของพืชสกุลกัญชาสายพันธุ์หางกระรอกภูพานและสายพันธุ์ ชาล็อต แองเจิ้ล (Charlotte's angle) มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ

(A) (B)

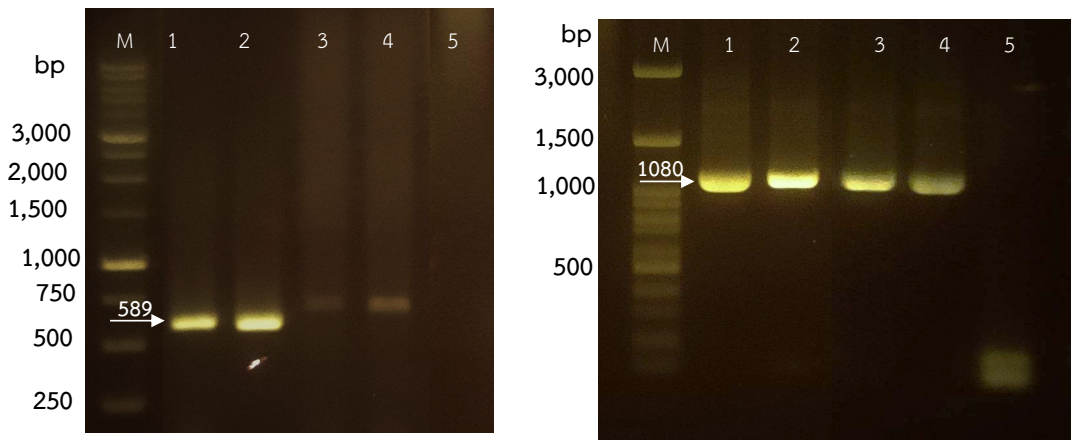
Figure 1 Characteristics of *Cannabis* sp. leaves (A) Thai stick "Phuphan" (B) Charlotte's angel.

พบว่าสายพันธุ์หางกระรอกภูพาน (A) เป็นใบเดี่ยว เล็ก แคบ และยาว แตกออกเป็นแฉก 5 แฉก แต่ละแฉกเป็นรูปยาวรีปลาย และ โคนสอบ ขอบใบทุกแฉกเป็นหยักแบบฟันเลื่อย ขนาดกว้างประมาณ 0.3-1.5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 6-10 เซนติเมตร จากรายงานการวิจัย พบว่ากัญชาไทยสายพันธุ์หางกระรอก (Thai stick) เป็นสายพันธุ์แท้ดั้งเดิมขึ้นอยู่ตามธรรมชาติบนเทือกเขาภูพาน จังหวัดสกลนคร มีลักษณะใบยาว 12 เซนติเมตร ก้านใบ 1-2 เซนติเมตร ใบย่อย 3-9 แฉกรูปหอก กว้าง 0.2-1.3 เซนติเมตร [15] และสัณฐานวิทยาของใบของสายพันธุ์ Charlotte's angle (B) ใบเดี่ยว ใบใหญ่ เรียงชิดกัน แตกออกเป็น 5 แฉก แต่ละแฉก

เป็นโคนและปลายสอบ ขอบใบทุกแฉกเป็นหยักแบบฟันเลื่อย ขนาดกว้างประมาณ 3-4 เซนติเมตร และยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร จากรายงานการวิจัยสายพันธุ์ Charlotte's angel มีลักษณะใบเดี่ยวรูปฝ่ามือแผ่นใบเป็นแฉก 5-11 แฉก ขอบใบจักรเป็นฟันเลื่อย [16] จากข้อมูลสัณฐานวิทยาของใบสามารถจำแนกสายพันธุ์หางกระรอกภูพาน ออกจากสายพันธุ์ Charlotte's angel ซึ่งสายพันธุ์ Charlotte's angel ซึ่งจัดเป็นกลุ่ม CBD dominant (Type3)

3.2 จำแนกสายพันธุ์พืชสกุลกัญชาโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีนสังเคราะห์สาร THC และ CBD

สามารถจำแนกกลุ่มสายพันธุ์พืชสกุลกัญชาด้วยยีนที่สังเคราะห์สาร THC (THCA synthase) และ CBD (CBDA synthase) ซึ่งทำให้การสังเคราะห์สาร THC และ CBD ได้ต่างกัน จากตรวจสอบยีนสังเคราะห์สาร THC และ CBD โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ THCA synthase และ CBDA synthase ในพืชสกุลกัญชาสายพันธุ์หางกระรอกภูพาน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณให้แถบดีเอ็นเอได้เหมือนกับสายพันธุ์ positive control ที่มีการสังเคราะห์ CBD และ THC ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 559 bp และ 1080 bp ตามลำดับ (Figure 2) ดังนั้นจึงสามารถระบุชนิดของพืชสกุลกัญชาสายพันธุ์หางกระรองภูพานได้เป็นแบบที่ 2 คือ กัญชาที่ให้สารTHC มากกว่าร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก และ CBD มากกว่าร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร พบว่ากัญชาพันธุ์หางกระรอกภูพานจัดเป็นแบบที่ 2 [15]



(A) (B)

Figure 2 PCR results for (A) active *THCAS* band (B) active *CBDAS* band
Lane M : DNA ladder (A) 1 kbp (B) 3,000 bp, 1 : *Cannabis* sp. Thai stick "Phuphan ST1", 2 : *Cannabis* sp. Thai stick "Phuphan", 3 : *Cannabis* sp. "Charlotte's angel" (1) 4: *Cannabis* sp. "Charlotte's angel" (2), 5 : Negative control

3.3 วิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ชนิด THC และ CBD ด้วยเทคนิค HPLC

จากโครมาโทแกรมการแยกสารด้วยเทคนิค HPLC พบสารแคนนาบินอยด์กลุ่ม total CBD ประกอบด้วยสาร CBDA และ CBD ในพืชสกุลกัญชาสายพันธุ์ Charlotte's angel (Figure 3A) พบว่ามีปริมาณ total CBD และtotal THC เท่ากับร้อยละ 7.53 และ 2.53 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งจากสัดส่วนของ THC:CBD จัดเป็น

แบบที่ 3 (type III) หรือกัญชาที่ให้สาร CBD สูงมากกว่าร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก (Table 2) และในสายพันธุ์หางกระรอกภูพาน จะพบสารแคนนาบินอยด์ทั้งกลุ่ม total CBD และ total THC เท่ากับร้อยละ 0.50 และ 1.01 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งจัดเป็นแบบที่ 2 (type II) คือ กัญชาที่ให้สารTHC มากกว่าร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก และ CBD มากกว่าร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก (Table 2) ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณสอดคล้องกันกับการแสดงออกของยีนสังเคราะห์สาร THC และ CBD

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจยืนยันสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ได้มีการระบุในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 425 และ 427 (พ.ศ. 2564) ให้ใช้เครื่องมือที่อาศัยหลักการโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) เนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน มีความจำเพาะ และความไวสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นผลรวมในรูปของ total THC (THCA และ THC) และ total CBD (CBDA และ CBD) ซึ่งใช้คอลัมน์ในการแยกสารเป็นประเภท C18 stationary phase เนื่องจากสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic นอกจากนี้สามารถแยก อนุพันธ์ในรูปกรดและกลางได้ เนื่องจากไม่มีการให้ความร้อนสูง THCA และ CBDA จึงไม่เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปอื่น

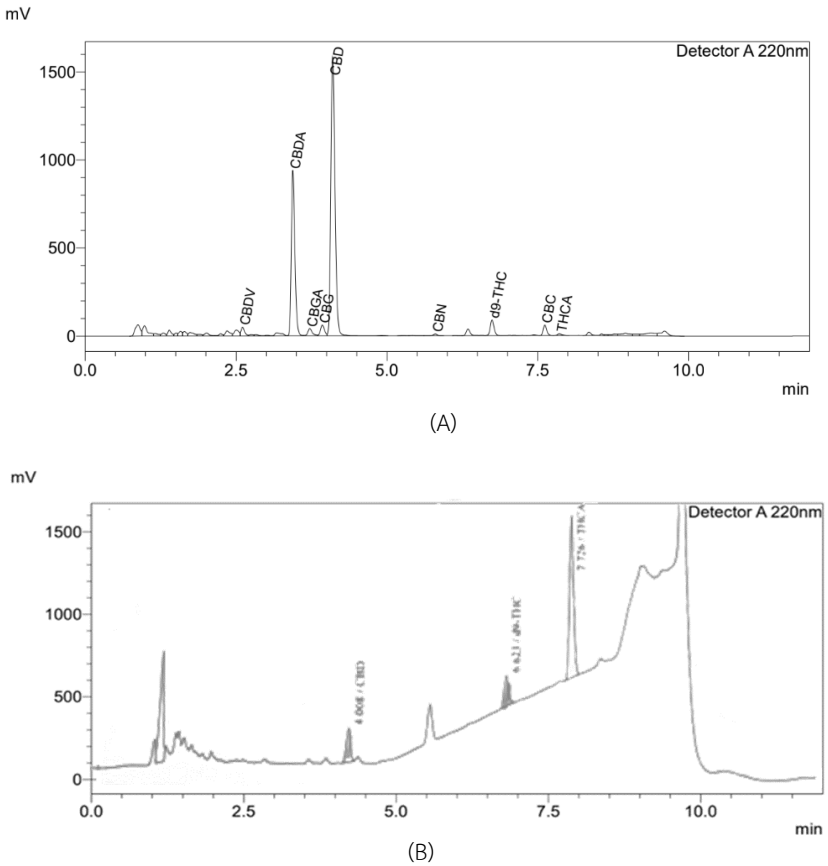


Figure 3 HPLC-UV chromatogram of (A) *Cannabis sp.* "Charlotte's angel" detection at 220 nm. The compounds elute in the following order: CBD-acid (tR: 3.442 min), CBD (tR: 4.100 min), CBN (tR: 5.801 min), THC (tR: 6.741 min), THC-acid A (tR: 7.858 min) (B) *Cannabis* sp. Thai stick "Phuphan"

Table 2 Total THC and CBD contents (%w/w), ratio content of THC:CBD and type of *Cannabis* sp.

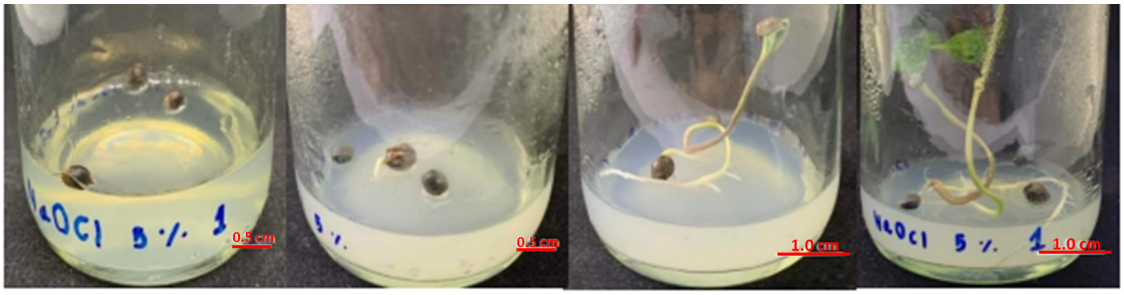
Cultivars	Total THC (%w/w)	Total CBD (%w/w)	Types
Cannabis sp. Thai stick "Phuphan"	1.01	0.50	II
Cannabis sp. "Charlotte's angel"	2.87	7.53	III

3.4 เพาะเลี้ยงเซลล์พืชสกุลกัญชา

นำเมล็ดพันธุ์ของสายพันธุ์หางกระรอกภูพานมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมีขั้นตอน ดังนี้

3.4.1 ฟอกฆ่าเชื้อและการงอกของเมล็ดกัญชา

นำเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์หางกระรอกภูพาน มาฟอกฆ่าเชื้อ พบว่าให้เมล็ดปลอดเชื้อร้อยละ 100 และมีร้อยละการงอก ร้อยละ 66 ที่ระยะเวลา 20 วัน โดยที่เมล็ดจะเริ่มงอกที่ระยะเวลา 5 วัน (Figure 3B) เกิดใบเลี้ยงที่ระยะเวลา 10 วัน (Figure 3C) และเกิดใบแท้ที่ระยะเวลา 20 วัน (Figure 3D) บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร ½ MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน.



(A) (B) (C) (D)

Figure 3 Process of germination and seedling development of *Cannabis* sp. (A) 0 (B) 5 (C) 15 (D) 20 days on ½ MS at temperature 25±2 °C for 16 hours/day Bar represents 0.5 cm.

3.4.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส

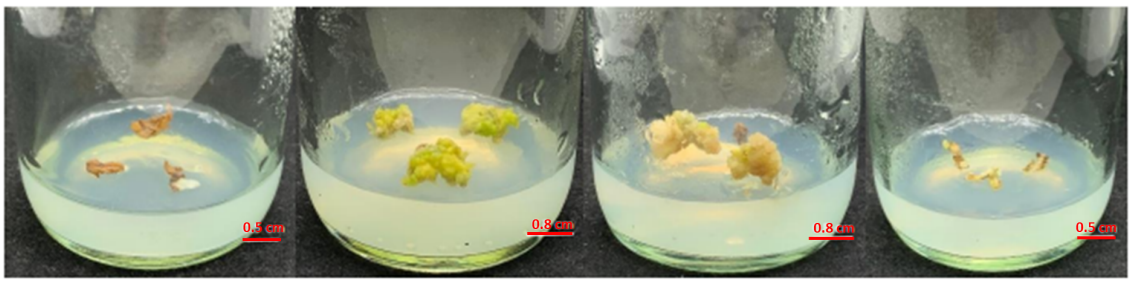
จากการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบแท้ในสภาพปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ชนิด 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในสูตรอาหารที่มีการเติม 2,4-D สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ร้อยละ 100 (Table 2) แคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดใหญ่ มีสีเขียว และสีครีม และมีลักษณะแบบเกาะกันแน่น (compact callus) และเป็นแบบร่วนซุย (friable callus) ตามลำดับ (Figure 4) จากรายงานการ

วิจัย พบว่าแคลลัสที่มีสีเขียว และเป็นแบบเกาะกันแน่น เป็นลักษณะที่เหมาะแก่การพัฒนาเป็นต้นใหม่ [17] และแคลลัสที่มีลักษณะร่วนซุย เป็นสีครีม ซึ่งเป็นแคลลัสที่มีลักษณะที่ดี และมีความเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ แขวนลอย เนื่องจากเป็นแคลลัสที่มีการเจริญเติบโต และสามารถเพิ่มปริมาณได้ มีการเกาะกลุ่มที่ไม่อัดแน่น จึงน่าจะสามารถกระจายตัวได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และไม่มีการเกิดอวัยวะอื่นๆ เช่น ยอด หรือราก [18] ดังนั้นจากข้อมูลนี้สามารถเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช

Table 2 Effect of 2,4-D on callus induction from leaf explant of *Cannabis* sp. after 4 week culture

Plant growth regulator 2,4-D (mg/L)	Callus induction (%)	Size of callus (cm)	Types of callus	Color of callus
0	0.00	0.00	-	-
0.5	100.00	0.50±0.03[a]	compact	Greenish
1.0	100.00	0.64±0.04[a]	friable	creamnish
2.0	100.00	0.20±0.01[b]	friable	Brownish

The values are mean ± standard deviation (n=3). [a-b]Means within each column followed by different letters are significantly different ($p<0.05$)



(A) (B) (C) (D)

Figure 4 Appearance of callus induced from *Cannabis* sp. leaves on MS with 2,4-D (A) 0 (B) 0.5 (C) 1.0 and (D) 2.0 mg/L, respectively after 4 weeks. Bar represents 0.5 cm.

2.4 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD

เพื่อยืนยันว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจะไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม เมื่อเทียบกับรุ่นพ่อแม่ จึงตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแคลลัสพืชสกุลกัญชา จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทียบกับต้นแม่ด้วยเครื่องหมาย RAPD ด้วยไพรเมอร์ต่างๆ โดยหลังทำปฏิกิริยา PCR แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส พบว่าไพรเมอร์ OPA-05 OPA-09 และ OPB-02 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชสกุลกัญชาได้ แต่ไพรเมอร์ OPA-10 และOPH-17 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphism สามารถแยกความแตกต่างของพืชสกุลกัญชาได้ดีที่สุด และเมื่อทดสอบความแปรปรวนระหว่างต้นแม่พันธุ์ และแคลลัส พบแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความเหมือนกัน และสม่ำเสมอที่สุด โดยแถบดีเอ็นเอเป็นลักษณะ monomorphism ทั้งหมด (Figure 5) สอดคล้องกับรายงานว่าการใช้เครื่องหมาย RAPD สามารถตรวจสอบเสถียรภาพของพันธุกรรมในพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ [19] ดังนั้นจากการตรวจสอบไม่พบการความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากแคลลัสหรือโซมาติกเอ็มบริโอเหล่านี้

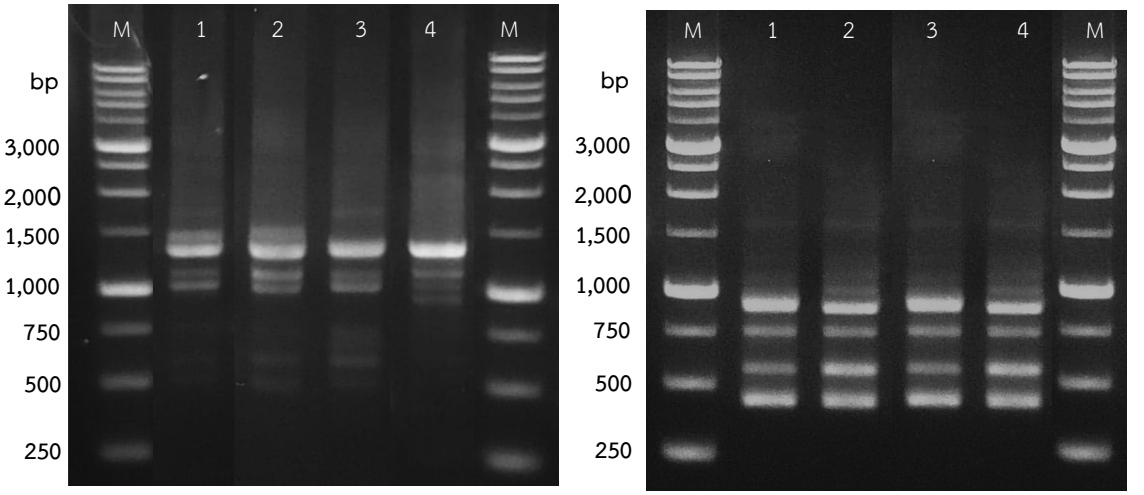


Figure 5 Result of gel electrophoresis of PCR products obtained by using (A OPA-10, B OPH-17) RAPD primer Lane M: marker, 1: *Cannabis* sp. Thai stick “Phuphan”, *2-4 callus of Cannabis* sp. Thai stick “Phuphan”

4. สรุป

การระบุสายพันธุ์พืชสกุลกัญชา โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีนสังเคราะห์สาร THC และCBD สามารถระบุกลุ่มสายพันธุ์หางกระรอกภูพานได้ ซึ่งจัดอยู่ในแบบที่ 2 (type II) กัญชาที่ให้สาร THC และ CBD (THC : CBD = 1 : 1) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร THC และ CBD ด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญชนิด 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแคลลัสที่ได้เหมาะต่อการขยายพันธุ์ และเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ ตามลำดับ นอกจากนี้แคลลัสที่ได้ ไม่พบการความแปรปรวนทางพันธุกรรม

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยทักษิณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประเภททุนพัฒนาแผนงานริเริ่มสำคัญ (Flagship) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566

6. References

[1] Russo EB., 2008, Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. Ther Clin Risk Manag. 4(1): 245-59.

[2] Atakan Z., 2012. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. Ther Adv Psychopharmacol. 2(6): 241–254.

[3] Stéphane, F. F. Y. , Jules, B. K. J. , Batiha, G. E. , Ali, I., & Bruno, L. N., 2021. Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. Nat Med Plants. intechopen. 98602

[4] Dias, M.I., Sousa, M.J., Alves, R.C., and Ferreira, I.C.F.R., 2016, Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. Ind. Crops Prod.. 82: 9-22.

[5] Saw, N.M.M.T., Riedel, H., Cai, Z., Kütük, O., and Smetanska, I., 2012, Stimulation of anthocyanin synthesis in grape (*Vitis vinifera*) cell cultures by pulsed electric fields and ethephon. Plant Cell Tissue Organ Cult.. 108(1): 47-54.

[6] Erly Marwani, D.P., Karlina Wardhani, and Rizkita Esyanti, 2015, Development of hairy root culture of *Andrographis paniculata for in vitro* adrographollide Pproduction. J. Med. Biol. Eng. 4(6): 446-450.

[7] Loc, N.H. and Nhat, N.T.D., 2013, Production of asiaticoside from centella (Centella asiatica L. Urban) cells in bioreactor. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 3(10): 806-810.

[8] Wielgus, K., Luwanska, A., Lassocinski, W., and Kaczmarek, Z., 2008. Estimation of Cannabis sativa L. Tissue Culture Conditions Essential for Callus Induction and Plant Regeneration. J. Nat. Fibers. 5(3): 199-207.

[9] Staginnus C., Zörntlein S., de Meijer E., 2014. A PCR marker linked to a THCA synthase polymorphism is a reliable tool to discriminate potentially THC-rich plants of *Cannabis sativa* L. J. Forensic Sci. 59:919–926.

[10] Pacifico D., Miselli F., Micheler M., Carboni A., Ranalli P., Mandolino G., 2006. Genet-

ics and marker-assisted selection of the chemotype in *Cannabis sativa* L. Mol. Breed. 17:257–268.

[11] Meijer E.P.M., Hammond K.M., Sutton A., 2009. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (IV): Cannabinoid-free plants. Euphytica. 168:98–112.

[12] Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987 .A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin, 19(1), 11-15.

[13] Yamamuro, T., Segawa, H., Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Kanamori, T., & Iwata, Y. T., 2021. Rapid identification of drug-type and fiber-type cannabis by allele specific duplex PCR. Forensic Sci. Int. 318: 110634.

[14] Welling, M.T., Liu, L., Shapter, T. Raymond, C.A. and King G.J., 2016. Characterisation of cannabinoid composition in a diverse *Cannabis sativa* L. germplasm collection. Euphytica. 208, 463–475.

[15] Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.

[16] Pussapaphan, N. and Busabong, W. (2022) Cannabis in the traditional Southern Thai medical recipe. Asian J Trad Inno Arts and Textiles. 1(2): 31-60.

[17] Kumar, K.R., Singh, K.P., Raju, D.V.S., Bhatia, R. and Panwar, S., 2019. Influence of genotypes, growth regulators and basal media on direct differentiation of shoot buds from leaf segments of marigold (*Tagetes* spp.). Indian J. Exp. Biol. 57(1): 30-39.

[18] Srirat, P., Prammanee, S., Sirisansaneeyakul, S., Parakulsuksatid P. and Vanichsriratana, W. 2017. Callus Induction of *Curcuma longa* L. and Effect of Precursor Addition on Curcuminoids Production. SDU Res. J. 10 (2): 115-132.

[19] Thawaro, S. and Te-chato, S. 2009. Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated *in vitro.* Sci Asia, 35(2): 142-149.