วารสารผลิตกรรมการเกษตร
JOURNAL OF AGRICULTURAL PRODUCTION

การระบุชนิดของสารกลุ่ม Cannabinoids และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกัญชงและกัญชา โดยโมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์

Identification Types of Cannabinoids and Genetic Relationships in Hemp and Marijuana by SSR Markers

มัลลิกา จินดาซิงห์ และ สุทธิรักษ์ ผลเจริญ*

Manlika Jindasing and Suttirak Plonjarean*

สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร จังหวัดชุมพร 86170

Department of Crop Production Technology, Faculty of Maejo University at Chumphon, Lamae, Chumphon, 86170

* Corresponding author: suttirak3@gmail.com

(Received: 19 October 2021; Revised: 18 January 2022; Accepted: 31 March 2022)

Abstract

The identification types of cannabinoids in hemp and marijuana were analyzed by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC-MS), a method that can identify cannabinoids in hemp and marijuana. It was found that there were 4 types of cannabinoids, namely THC, CBN, CBC, and CBD, and they were statistically and significantly different (P>0.05), in the range of 0.65±0.15 – 6.76±0.21, 0.13±0.12 – 0.52±0.19, 0.00 – 0.29±0.15 and 0.96±0.18 – 3.97±0.18 %, respectively. Marijuana and Pang Thong could produce the highest THC content, Vietnam produced the highest CBN content, Pang Oung produced the highest CBC content and Vietnam produced the highest CBD and CBN content. The identification of DNA fingerprinting in 9 hemp cultivars and 1 marijuana by 11 simple sequence repeat (SSR) markers in the study could be perfectly 100 % detected and differentiated. Furthermore, DNA fingerprinting revealed 41 alleles to be polymorphic. Based on an initial DNA analysis using Unweighted Pair Group Method with Arithmetic

Mean (UPGMA), it revealed that the average number of alleles per SSR locus was 3.73. Similarly, their coefficients varied from 0.05 to 0.83 with an average of 0.44. Consequently, it indicated that there was a very broad genetic base and high genetic variation. As a result of using the SSR-base genetic similarity the UPGMA dendrogram, it was found that cannabinoids in hemp and marijuana can be classified into two distinct groups: Group 1 (Song Kew, Pang Tong, Huay Lang, Marijuana Pang Kae and Vietnam) and Group 2 (Pop Pra, Pang Aug, Mae Tala, and Huay Hoy).

Keywords: cannabinoids, gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS), simple sequence repeat (SSR) marker, hemp

บทคัดย่อ

การระบุชนิดของสารกลุ่ม cannabinoids ในกัญชงและกัญชานี้ ได้ทำการวิเคราะห์โดยเครื่องก๊าซโครมาโท กราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (GC-MS) ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถวิเคราะห์ชนิดของสารกลุ่ม cannabinoids ในกัญชงและกัญชา ได้ โดยพบว่า มีสารกลุ่ม cannabinoids 4 ชนิด ได้แก่ THC, CBN, CBC และ CBD ซึ่งมีปริมาณสารที่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.65±0.15 – 6.76±0.21, 0.13±0.12 – 0.52±0.19, 0.00 – 0.29±0.15 และ 0.96±0.18 – 3.97±0.18 % ตามลำดับ โดยกัญชงและกัญชาสายพันธุ์ปางตองมีสาร THC มากที่สุด พันธุ์เวียดนามมีสาร CBN และ CBD มากที่สุด และพันธุ์ปางอุ๋งมีสาร CBC มากที่สุด การระบุความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกัญชง 9 สายพันธุ์ และกัญชา 1 สายพันธุ์ โดยเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์ จำนวน 11 ไพร์เมอร์ สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกัญชงสูงถึง 100 % ในการศึกษานี้พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างเกิดขึ้นทั้งหมด 41 อัลลีล จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเบื้องต้นโดยใช้วิธี unweighted pair group a arithematic average (UPGMA) จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส SSR เท่ากับ 3.73 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเปลี่ยนแปลงจาก 0.05 ถึง 0.83 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.44 ซึ่งบ่งชี้ว่า มีฐานทางพันธุกรรมที่กว้างมากและมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง จากการใช้ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของฐาน SSR UPGMA dendrogram แสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ที่ศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม ที่มีลักษณะเฉพาะดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์สองแคว ปางตอง ห้วยแล้ง กัญชา ปางแก และเวียดนาม และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์พบพระ ปางอุ๋ง แม่ตะละ และห้วยหอย

คำสำคัญ: แคนนาบินอยด์ ก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี โมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์ กัญชง

คำนำ

กัญชงจัดเป็นพืชเส้นใยที่มีความสำคัญ 1 ใน 13 ของโลก (Cherney and Small, 2016) และจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศ มีประโยชน์ในการผลิตปัจจัยสี่ของมนุษย์ เช่น สามารถนำไปถักทอเสื้อผ้า เชือก กระสอบ ทำกระดาษ หรือเครื่องใช้ต่าง ๆ เมล็ดสามารถนำมาเป็นอาหารคนสัตว์เลี้ยง และยังให้น้ำมัน โปรตีน ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นน้ำมันซักแห้ง สบู่ เครื่องสำอาง หรือแม้กระทั่งเป็นน้ำมันเชื้อเพลิง (De Zeeuw *et al*., 1972)

กัญชงและกัญชาสามารถสังเคราะห์สารที่เรียกว่า cannabinoids ชนิดต่าง ๆ ที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน ได้แก่ 1) tetrahydrocannabinol (THC) ประกอบด้วยสารสองชนิดที่เป็น isomer กัน คือ Delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9-THC) มีฤทธิ์ทางด้านจิตใจ ทำให้เกิดอารมณ์เคลิบเคลิ้มและเป็นสุข ถ้าเสพโดยการสูบจะออกฤทธิ์แรงกว่าการรับประทาน และ Delta-8-tetrahydrocannabinol (Δ^8-THC) ไม่มีฤทธิ์ต่อจิตใจจึงไม่จัดเป็นสารเสพติด ทำให้เกิดอารมณ์เคลิบเคลิ้ม (Devane, 1992) 2) cannabidiol (CBD) 3) cannabinol (CBN) เป็นสารที่ได้จากการออกซิเดชันของ Delta-9-tetrahydrocannabinol มีฤทธิ์ทำให้เกิดการเสพติด 4) cannabicyclol (CBC) 5) cannabichromine (CBCh) 6) cannabinolic acid (CBNA) มีฤทธิ์ทำให้จิตใจสงบจัดเป็นยานอนหลับ 7) cannabichromenic acid (CBCHA) และ 8) cannabidivarol (Hazekamp *et al*., 2004) โดยปริมาณของสารแต่ละพันธุ์จะแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อม เช่น ภูมิอากาศ ดิน น้ำ และอื่น ๆ (Etienne *et al*., 2003)

เดิมกัญชงจัดเป็นพืชเสพติดประเภทที่ 5 เนื่องจากมีสารเสพติดประเภท tetrahydrocannabinol (THC) มากกว่า 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่สามารถปลูกได้ ปัจจุบันมีการปลดล็อกแต่กัญชงยังจัดอยู่ในยาเสพติดให้โทษประเภท 5 ซึ่งมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 29 มกราคม พ.ศ. 2564 ดังนั้น การปลูกจึงต้องขออนุญาตจากกระทรวงสาธารณสุขเสียก่อน โดยทำตามกฎกระทรวง การขออนุญาตและการอนุญาตผลิต นำเข้า ส่งออก จำหน่าย หรือมีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 การศึกษาค้นคว้าวิจัยต้องดำเนินการให้ถูกต้องตามกฎหมาย ในการศึกษาค้นคว้าวิจัยต้องขออนุญาตพิเศษ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาข้อมูลด้านต่าง ๆ ทั้งทางด้านเขตกรรมและข้อมูลเชิงปริมาณและคุณภาพในด้านสารเคมี น้ำมันในเมล็ด การให้เส้นใยและเยื่อหรือประโยชน์ในลักษณะอื่น ๆ ของกัญชงที่ปลูกในประเทศไว้โดยละเอียด อันจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับรองรับการพัฒนาให้กัญชงเป็นพืชเศรษฐกิจ จึงจำเป็นที่จะต้องหาวิธีวิเคราะห์สายพันธุ์กัญชง เพื่อให้สามารถระบุชนิดของสารกลุ่ม Cannabinoids และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกัญชงและกัญชา ดังนั้นการนำเอาเครื่องหมายเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeats: SSRs) มาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กัญชงและกัญชา จะช่วยทำให้ทราบความแตกต่างทางพันธุกรรมได้อย่างแท้จริง โดยที่ไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง และยังสามารถทำการประเมินผลได้อย่างรวดเร็ว (Heyden and Sharp, 2001) จึงนับเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีความสำคัญในการวางแผนงานทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ โดยสามารถนำข้อมูลมาใช้ในการพัฒนาและคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์

กัญชงให้ประสบความสำเร็จต่อไป รวมถึงการตรวจสอบพันธุ์กัญชงที่ปลูกในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลอง ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร จังหวัดชุมพร ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2562 – มิถุนายน พ.ศ. 2564 โดยทำการปลูกสายพันธุ์กัญชง 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ปางอุ๋ง, สองแคว, ปางแก, พบพระ, ปางตอง, แม่ตะละ, ห้วยหอย, ห้วยแล้ง เวียดนาม และกัญชาสายพันธุ์ซาติวา ที่มีการวางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 4 ซ้ำ

การวิเคราะห์สารกลุ่ม cannabinoids โดยก๊าซโครมาโทกราฟี

นำใบกัญชงสดมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส บดให้เป็นผงละเอียด ชั่งใบกัญชงที่อบ 5 กรัม มาสกัดด้วย Methanol (CH_3OH) 60 มิลลิลิตร และเขย่าใช้ระยะเวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง กรองเอาสารละลายที่ใช้ในการสกัดออกมาด้วยกระดาษกรอง จากนั้นขจัดน้ำออกด้วยการเติม Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) และกรองเอา Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) ออกด้วยกระดาษกรอง และนำสารละลายใบของกัญชงที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี โดยเทคนิควิเคราะห์สารตัวอย่างและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารเป็นการยืนยันโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของสารโดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS) Agilent; U.S., Column Capillary (HP-5MS)/30.0 m × 250 ไมครอน i.d.,0.25 ไมครอน และเครื่องกลั่นระบบสุญญากาศ (Buchi/R-114, Switzerland) เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และ microsyringe 50 มิลลิลิตร (Pellegrini *et al*., 2005) ใช้วิธีอิเล็กตรอนอิมแพค (Electron Impact mode) การเปรียบเทียบแมสสเปคโทรเมตรีกับฐานข้อมูล Public library: G1035A Wiley Library (Wiley7) และ National Institute of Standards and Technology, NIST NIST02 Mass Spectral Library สภาวะการทำงานของเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (GC-MS) มีดังนี้ Model Agilent mobile phase He (1.0 มิลลิลิตร/นาที) Column Capillary (HP-5MS)/30.0 มิลลิเมตร × 250 ไมครอน, 0.25 ไมครอน อุณหภูมิ Injector 110 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ Detector 300 องศาเซลเซียส/MS (EI) อุณหภูมิ Oven 1 นาที Isothermal ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และ 20 องศาเซลเซียส/นาที ที่ 300 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีด 1.0 ไมโครลิตร 70 โวลต์ (Pellegrini *et al*., 2005)

การวิเคราะห์โมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์ในกัญชงและกัญชา

ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Doyle and Doyle (1987) ส่วนการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ กระทำโดยนำดีเอ็นเอมาผ่านอีเล็กโทรโฟริซิสในวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง UV Transillumination เปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 bp Ladder Plus บันทึกภาพแถบ DNA ด้วยกล้อง Digital Gel Doc

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์กัญชงและกัญชา ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย SSR 11 ชนิด Miller (2003) โดยการนำดีเอ็นเอ

มาเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง PCR โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ด้วยขั้นตอน Pre-denaturation เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส จำนวน 1 รอบ ขั้นตอน denaturation เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส จำนวน 35 รอบ ขั้นตอน annealing เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส จำนวน 35 รอบ ขั้นตอน extension เป็นเวลา 1 วินาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย post extension เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส จำนวน 1 รอบ (Morgante and Olivieri, 1993) และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ในเครื่อง electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Bioscience) แล้วบันทึกภาพด้วยกล้อง Digital gel doc การวิเคราะห์จำนวนอัลลีล และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์กัญชงและกัญชา ดำเนินการโดยนำแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้แล้วถ่ายภาพมาวิเคราะห์ขนาดด้วยการเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ทำการบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลจากการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์กัญชงและกัญชา และใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS เพื่อหาสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (similarity Jaccard's coefficient) แล้วสร้างแผนภูมิเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยใช้ Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average (UPGMA) เพื่อจัดแบ่งกลุ่มสายพันธุ์กัญชงและกัญชาที่แตกต่างกันทางพันธุกรรม

Table 1 Primer sequences of selected 11 SSR primers for determination of genetic relationships in and marijuana. (Gilmore and Peakall, 2003) and (Gao *et al*., 2014)

No.	SSR locus	Forward (5'-->3')	Reverse (3'-->5')
1	ANUCS201	GGTTCAATGGAGATTCTCGT	CCACTAAACCAAAAGTACTCTTC
2	ANUCS202	AGGACCAATTTTGAATATGC	AGAGAGGGAAGGGCTAACTA
3	ANUCS203	GCTCTTCTTATTAATTCCTCCTT	GAATATGATAAGACACAACTTCATT
4	ANUCS204	TGGAAGATATGCAACTGGAG	AACGAACATAAGCACGAACA
5	ANUCS205	TTGACTAACCGGCAAAGATA	AAATTCAAAACCGATTCTCAG
6	BO1-CANN1	TGGAGTCAAATGAAAGGGAAC	CCATAGCATTATCCCACTCAAG
7	DO2-CANN2	AGATGATGCCAAGAGGCAC	TACCCATCCCCTTGGATCAC
8	CO8-CANN2	GCAAGAAGTAGAGAGACAATCC	CCCTCAACACTCATTAACTCAC
9	H11-CANN1	GCATGTGGTTGTTTCGTACCC	CAGCGAACATTCACTCTAGCTC
10	B02-CANN2	CAACCAAATGAGAATGCAACC	TGTTTTCTTCACTGCACCC
11	TH1-CANN1	TGCTCTGCCCAAAGTATCAA	CCACTCACCACTCCACCTTT

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเปรียบเทียบแมสสเปคโทรเมตรีกับฐานข้อมูล

ผลการวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของสารกลุ่ม cannabinoids ในกัญชง ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (GC-MS) โดยการเปรียบเทียบแมสสเปคโทรเมตรีกับฐานข้อมูลใน Public library ได้แก่ G1035A Wiley Library (Wiley7) และ NIST02 Mass Spectral Library พบว่า สามารถตรวจพบสารกลุ่ม cannabinoids ที่สำคัญ ได้แก่ Δ^8-THC, Δ^9-THC, CBC, CBD และ CBN ซึ่งมีลำดับเวลารีเทนชั่นที่แตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 18.35, 18.39, 17.08, 17.55 และ 18.93 นาที ตามลำดับ (Figure 1)

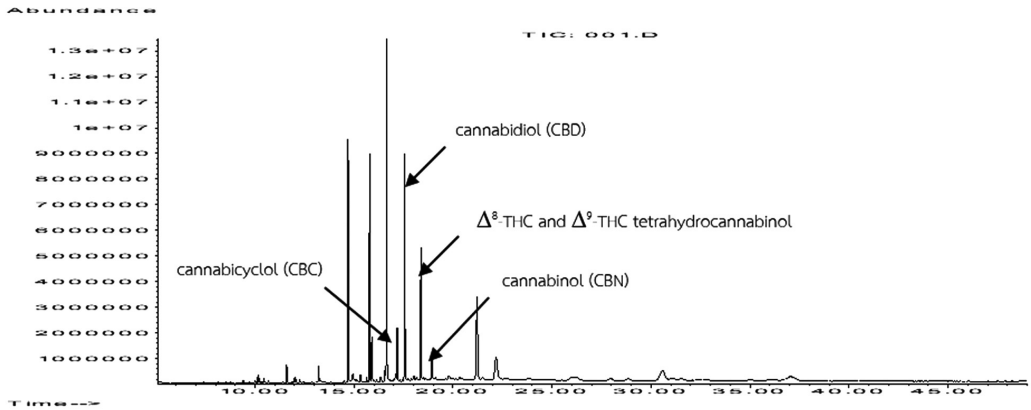

Figure 1 Chromatograms Pang Ung Hemp

การวิเคราะห์ผลด้วยการแตกตัวของแมสสเปคตรัมและตรวจสอบโดยฐานข้อมูล

ผลการวิเคราะห์การแยกชนิดของสารกลุ่ม cannabinoids ในกัญชาและกัญชงทั้ง 10 สายพันธุ์ ได้แก่ ปางอุ๋งสองแคว ปางแก พบพระ ปางตอง แม่ตะละ ห้วยหอย ห้วยแล้ง พันธุ์เวียดนาม และกัญชา ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (GC-MS) พบว่า กัญชงทุกสายพันธุ์และกัญชามีปริมาณสารกลุ่ม cannabinoids ที่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยสารกลุ่ม cannabinoids 4 ชนิด ที่ตรวจพบ ได้แก่ THC, CBN, CBC และ CBD มีค่าเฉลี่ยปริมาณสาร THC อยู่ระหว่าง 0.65±0.15 – 6.76±0.21 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยปริมาณสาร CBN มีค่าเท่ากับ 0.13±0.12 – 0.52±0.19 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยปริมาณสาร CBC มีค่าเท่ากับ 0.00 – 0.29±0.15 เปอร์เซ็นต์และมีค่าเฉลี่ยปริมาณสาร CBD อยู่ระหว่าง 0.96±0.18 – 3.97±0.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพันธุ์ปางตองมีปริมาณสาร THC มากที่สุด (Lachenmeier *et al.*, 2004) และยังพบอีกว่า กัญชง 3 สายพันธุ์ที่สามารถตรวจพบสารกลุ่ม cannabinoids ครบทั้ง 4 ชนิด (THC, CBC, CBD และ CBN) ได้แก่ สายพันธุ์ปางอุ๋ง แม่ตะละ และห้วยหอย โดยกัญชาและกัญชงสายพันธุ์ปางตองมีสาร THC มากที่สุด พันธุ์เวียดนามมีสาร CBN มากที่สุด พันธุ์ปางอุ๋งมีสาร CBC มากที่สุด และพันธุ์เวียดนามมีสาร CBD

มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 6.76±0.21, 0.52±0.19, 0.29±0.15 และ 3.97±0.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2) โดยปริมาณและชนิดของสารเสพติด cannabinoids แตกต่างกันเนื่องจากอิทธิพลของพันธุกรรมที่ใช้ที่เป็นพันธุ์ต่างกัน และสภาพแวดล้อม เช่น ภูมิอากาศ ดิน น้ำ หรืออื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Etienne *et al*. (2003) ที่พบว่าสายพันธุ์กัญชงและกัญชาที่ปลูกต่างฤดูกาลมีผลทำให้ปริมาณสาร THC, CBC, CBD, CBN แตกต่างกัน

Table 2 Cannabinoids contents in 9 hemps cultivars and 1 marijuana analyzed by GC-MS

Varieties	% of cannabinoids			
	THC	CBN	CBC	CBD
Pang Ung	2.24±0.12^{e}	0.46±0.18^{a}	0.29±0.15^{b}	3.81±0.18^{a}
Song Kew	5.42±0.21^{b}	0.32±0.11^{b}	0.22±0.14^{b}	-
Pang kae	1.47±0.12^{f}	-	-	0.96±0.18^{d}
Pop Pra	4.22±0.12^{c}	0.30±0.22^{b}	-	3.19±0.18^{b}
Pang Tong	5.93±0.21^{b}	0.22±0.18^{b}	0.21±0.12^{b}	-
Mae Ta la	4.21±0.12^{c}	0.15±0.13^{c}	0.13±0.15^{a}	2.27±0.18^{c}
Huay Hoi	4.19±0.12^{c}	0.13±0.13^{c}	0.11±0.17^{a}	2.76±0.18^{c}
Huay Lang	3.41±0.13^{d}	0.12±0.12^{c}	0.11±0.11^{a}	-
Vietnam	6.52±0.15^{g}	0.52±0.20^{a}	-	3.97±0.18^{a}
Marijuana	6.76±0.21^{a}	0.33±0.12^{b}	0.23±0.16^{b}	2.15±0.15^{c}
F-test	**	*	*	**

Remark: Each value represents mean of three replicates ± standard deviation. Means in the same column followed by the different letter are significantly different at P<0.05 when comparing the means value by Duncan Multiple Range Test.

* = significantly different at P<0.05

** = significantly different at P<0.01

การตรวจหาชนิดของสารเสพติดกลุ่ม cannabinoids ในกัญชงและกัญชาทั้ง 10 สายพันธุ์ สามารถตรวจพบสาร THC และยังพบสาร CBD, CBN และ CBC ซึ่งสารทั้ง 4 ชนิดเป็นกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ THC ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bruce and John (1973) สารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในกัญชงมีหลายชนิด แต่สารที่สำคัญที่สุดที่มีฤทธิ์ต่อสมอง และทำให้ร่างกาย อารมณ์ และจิตใจเปลี่ยนแปลงไป คือสารในกลุ่ม THC มีสองชนิดที่เป็นสารออกฤทธิ์คือ Δ^9-THC และ CBD ส่วน Δ^8-THC ไม่มีฤทธิ์ต่อจิตใจจึงไม่จัดเป็นสารเสพติดทำให้เกิดอารมณ์เคลิบเคลิ้ม CBN เป็นสารที่ได้จากการออกซิเดชันของ Δ^9-THC แต่ Δ^9-THC จัดเป็นสารประกอบส่วนใหญ่ในกัญชงที่ส่งผลกระทบต่อจิตและประสาทมากที่สุด โดยสารนี้มีลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมัน ไม่ค่อยละลายน้ำ (Chadi, 2006) การเรียกชื่อสารเสพติดชนิดนี้โดยทั่วไปนิยมเรียกชื่อสั้น ๆ ว่าสาร THC สารเสพติดที่พบในกัญชงมีอยู่ 2 สารที่เป็น Isomer กัน คือ Δ^8-THC และ Δ^9-THC โดย THC ที่พบนี้สามารถแยกและวิเคราะห์ผลด้วยการแตกตัวของแมสสเปคตรัมที่เกิดและตรวจสอบโดยฐานข้อมูลของแมสสเปคตรัม ซึ่งฐานข้อมูลที่ใช้คือ NIST และ Wiley7 โดยสาร THC มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลเป็น $C_{21}H_{30}O_2$ มีน้ำหนักมวลโมเลกุลเท่ากับ 314.46 สอดคล้องกับรายงานของ Elsohly and Slade (2005) นอกจากนั้นยังพบกลุ่มของสารอื่นที่มีความใกล้เคียงกับสาร THC สอดคล้องกับรายงานของสุทธิรักษ์และคณะ (2552) ที่พบสาร Hexadecanoic acid, Cannabispirenone A, Cannabichromene, Cannabivarin

ผลการทดลองที่ได้นี้สามารถบอกว่ากลุ่มของสาร tetrahydrocannabinol (THC) cannabidiol (CBD) cannabinol (CBN) มีความเกี่ยวข้องกัน เนื่องจากในสายพันธุ์กัญชงที่มีปริมาณ THC สูงจะมีผลทำให้ปริมาณสาร CBD สูงตามไปด้วย จึงทำให้กัญชงสายพันธุ์ดังกล่าวมีฤทธิ์ที่เป็นสารเสพติดมาก ไม่เหมาะในการใช้พัฒนาพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์พบพระ แม่ตะละ ห้วยหอย และเวียดนาม โดยมีสัดส่วนระหว่างปริมาณสาร THC:CBD เท่ากับ 2:1 แต่มีกัญชงบางสายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์สองแคว ปางตอง และห้วยแล้ง ที่มีปริมาณสาร THC สูงแต่มีปริมาณ CBD ต่ำ ซึ่งจะเหมาะสมในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อนำไปใช้มากกว่า และในอีกด้านถ้าผลการวิเคราะห์ตรวจพบมีสาร CBN สูงจะทำให้ตรวจพบกลุ่มของ THC และ CBD ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งจะทำให้กัญชงสายพันธุ์นั้นมีฤทธิ์ที่เป็นสารเสพติดน้อย ข้อมูลที่ได้กล่าวมาข้างต้นเป็นผลมาจากเส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพของสาร THC ในกลุ่ม cannabinoids ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bruce and John (1973) ข้อมูลจากการทดลองนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ในการนำใช้คัดเลือกพันธุ์และพัฒนาพันธุ์กัญชงในอนาคต

การวิเคราะห์โมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์ในกัญชง

ผลของการใช้ SSR primers ทั้ง 11 ชนิด พบว่าทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ของ SSR primer ทั้งหมด แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดมี 41 แถบ หรือตำแหน่ง (polymorphic alleles) ของสายพันธุ์กัญชงทั้ง 9 สายพันธุ์ และกัญชา จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นต่อไพรเมอร์มีตั้งแต่ 3 ถึง 4 แถบ (alleles) คิดเป็นค่าเฉลี่ย 3.73 แถบต่อไพรเมอร์ SSR primer ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ ได้แก่

ANUCS201 ANUCS202 ANUCS203 ANUCS204 BO1-CANN1 CO8-CANN2 BO2-CANN2 และ TH1-CANN1 ส่วน SSR primer ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ได้แก่ ANUCS205 DO2-CANN2 และ H11-CANN1 (Figure 2) การใช้ SSR primer ต่างชนิดกันทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในกัญชงทั้ง 9 สายพันธุ์และกัญชาบางพันธุ์อาจมีความเหมือนกันหรือความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของกัญชงดูได้จากค่า similarity coefficient ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.05 ถึง 0.83 แสดงให้เห็นว่าการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย SSR สามารถบ่งบอกความหลากหลายแตกต่างกันทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กัญชาและกัญชงทั้ง 10 สายพันธุ์ได้ดี กัญชงบางสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก เช่น พันธุ์ปางอุ๋ง กับ แม่ตะละ มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.83 ในทางตรงข้ามพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ได้แก่ พันธุ์สองแคว กับ ห้วยหอย ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมน้อยมากเพียง 0.05 เท่านั้น สอดคล้องกับ Alghanim and Almirall (2003) เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) ทำให้สามารถจัดแบ่งกลุ่มพันธุ์กัญชงได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Figure 3) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์สองแคว ปางตอง ห้วยแล้ง กัญชา ปางแก และเวียดนาม ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์พบพระ ปางอุ๋ง แม่ตะละ และห้วยหอย

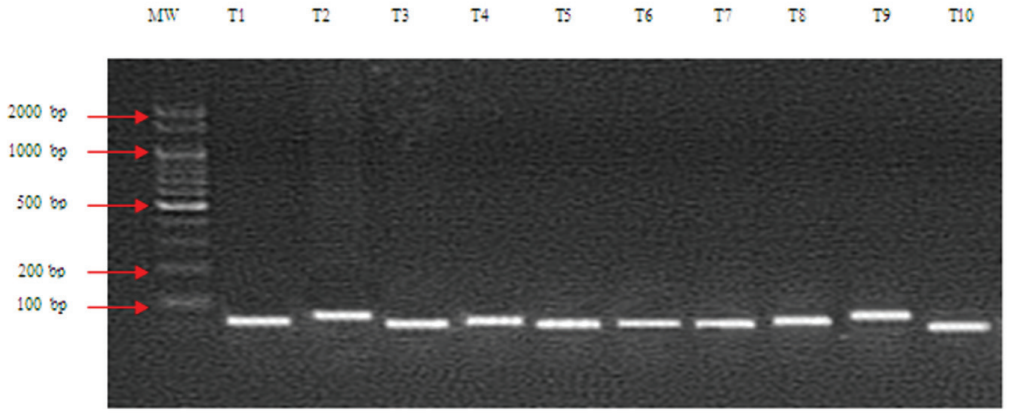

Figure 2 The simple sequence repeat (SSRs) profile of 9 hemp genotypes and marijuana (Song Kew (T1), Pang kae (T2), Pop Pra (T3), Pang Tong (T4), Pang Ung (T5), Mae Ta la (T6), Huay Hoi (T7), Huay Lang (T8), Vietnam (T9) and Marijuana (T10)) using the ANUCS201 primer pair. Lane MW was 100 bp molecular weight marker mixed with 2000 bp ladders

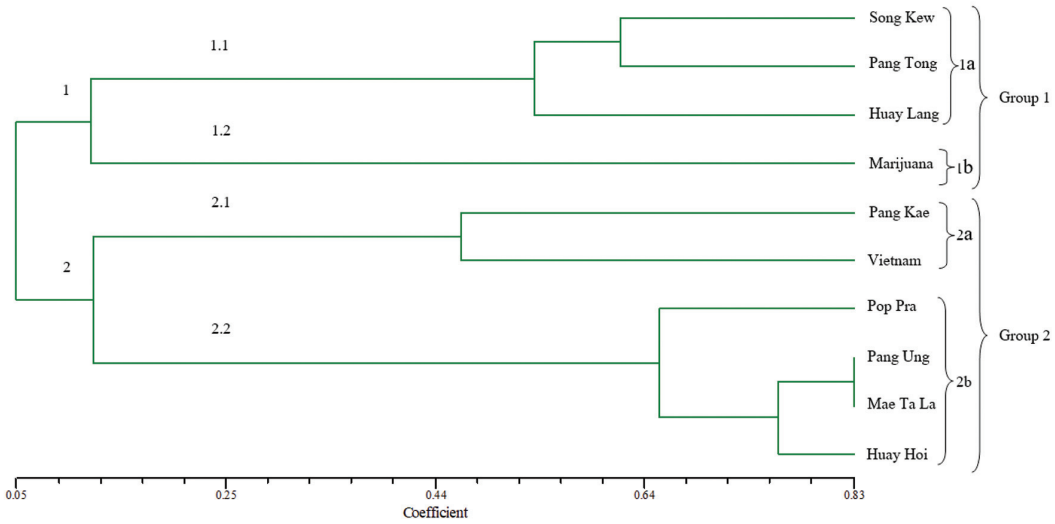

Figure 3 The dendrogram (UPGMA) was constructed based on the dice similarity coefficient in 10 *Cannabis sativa* genetic materials analyzed by SSRs

สรุปผลการวิจัย

การระบุชนิดของสารเสพติด cannabinoids ในกัญชงด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (GC-MS) สามารถวิเคราะห์ชนิดของสารเสพติด cannabinoids ในกัญชง 9 สายพันธุ์และกัญชาได้โดยพบว่า มีสารเสพติด cannabinoids ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ THC, CBN, CBC และ CBD โดยกัญชงและกัญชาสายพันธุ์ปางตองมีสาร THC มากที่สุด พันธุ์เวียดนามมีสาร CBN และ CBD มากที่สุด และพันธุ์ปางอุ๋งมีสาร CBC มากที่สุด

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกัญชงทั้ง 9 สายพันธุ์และกัญชา โดยอาศัยโมเลกุลเครื่องหมาย SSR Markers พบว่ามีไพรเมอร์ทั้งหมด 11 ชนิดเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 41 แถบ หรือ polymorphic alleles ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ในช่วง 0.05 ถึง 0.83 และเมื่อจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ทำให้แบ่งกลุ่มกัญชงและกัญชาออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยแต่ละกลุ่มยังสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก ผลของการศึกษาทำให้เกิดประโยชน์สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์กัญชงและกัญชาในอนาคต

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการระบุชนิดของสารกลุ่ม cannabinoids กับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกัญชงมีความเกี่ยวข้องกัน โดยกลุ่ม 1 สามารถระบุได้ว่า เป็นกลุ่มที่มีปริมาณสาร THC สูง คือ กลุ่ม 1a ประกอบด้วย สายพันธุ์สองแคว ปางตอง และห้วยหอย และเป็นกลุ่มที่พบสารกลุ่ม cannabinoids 3 ชนิดเหมือนกัน คือ THC CBN และ CBC ส่วนกลุ่ม 2 ระบุได้ว่ากัญชามีสาร THC สูง โดยกลุ่ม 2a ได้แก่ สายพันธุ์ปางแก และเวียดนาม ระบุได้ว่ามีปริมาณสาร THC น้อยเหมือนกัน และกลุ่ม 2b ได้แก่ สายพันธุ์ปางอุ๋ง แม่ตะละ และห้วยหอย มีสารเสพติด cannabinoids ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ THC, CBN, CBC และ CBD

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.วีรชัย พุทธวงศ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์งบประมาณในการวิจัยและห้องปฏิบัติการ รวมถึงความอนุเคราะห์ด้านตัวอย่างพืช และขอขอบคุณนางสาวรัตติกาล ติง นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

สุทธิรักษ์ ผลเจริญ เศรษฐา ศิริพินธุ์ ดนุวัติ เพ็งอ้น และวีรชัย พุทธวงศ์. 2552. การวิเคราะห์สารเสพติด tetrahydrocannabinol (THC) ในกัญชงพันธุ์ต่างกัน โดยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (GC/MS). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40(3): 305-308.

Alghanim, H. J., and J. R. Almirall. 2003. Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. Anal. Bioanal. Chem. 376: 1225-1233.

Bruce, L.H. and D.R. John. 1973. Nuclear magnetic resonance spectroscopy ^{13}C fourier transformspectra of Δ-8-THC and Δ-9-tetrahydrocannabinol. Proc. Nat. Acad. Sci. 70(4): 1027-1029.

Chadi, A. 2006. Development and validation of the quantitation of Δ^9-tetrahydro-cannabinol in human plasma by high performance liquid chromatography after solid-phase extraction. Pharma. and Biom. Ana. 41(3): 1011-1016.

Cherney, J.H. and E. Small. 2016. Industrial Hemp in North America: Production, Politics, and Potential. Agronomy. 58(6): 1-24.

De Zeeuw, R.A., Th. M. Malingre and F.W.H.M. Merkus. 1972. Tetrahydro-cannabinolic acid, an important component in the evaluation of *Cannabis* products. Pharm. Pharmacology. 24: 1-6.

Devane, W.A., L. Hanuš, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger and R. Mechoulam. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Sci. 258: 1946-1949.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

Elsohly, M.A. and D. Slade. 2005. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. Life Sci. 78: 539-548.

Etienne, P.M. de Meijer, B. Manuela, C. Andrea, C. Paola, M. Cristina, R. Paolo and M. Giuseppe. 2003. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. Genetics. 136: 335-346.

Gao C., Xin P., C. Cheng, Q. Tang, P. Chen, C. Wang, G. Zang and L. Zhao 2014. Diversity Analysis in *Cannabis sativa* Based on Large-Scale Development of Expressed Sequence Tag-Derived Simple Sequence Repeat Markers. PLoS ONE. 9(10): 110638.

Gilmore S. and R. Peakall 2003. Isolation of Microsatellite Markers in *Cannabis sativa* L. (marijuana). Molecular Biology Notes. 3: 105-107

Hazekamp, A., Y. Hae Choi and R. Verpoorte. 2004. Quantitative Analysis of Cannabinoids from *Cannabis sativa* using ^{1}H NMR Chem. Pharin. Bull. 52(6): 718-721.

Heyden, M.J. and P.J. Sharp 2001. Targeted development of informative Microsatellite (SSR) markers. Nucleic Acids Res. 29(8): 44-4.

Lachenmeier, D. W., L. Kroener, F. Musshoff and B. Madea. 2004. Determination of cannabinoids in hemp food products by use of headspace solid-phase micro extraction and gas chromatography mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 378: 183-189.

Miller Coyle, H. 2003. An overview of DNA methods for the identification and individualization of marijuana. Croat. Med. 44(3): 315-321.

Morgante, M. and A. M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant 3: 175-182.

Pellegrini M., E. Marchesi, R. Pacifici and S. Pichini. 2005. A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography mass spectrometry. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36: 939-946.