



การประเมินเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่เกี่ยวกับยีน **THCAS** และ **CBDAS**
สำหรับปรับปรุงพันธุ์ **CANNABIS SATIVA L.**



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
วิทยาลัยนวัตกรรมการเกษตรและเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2567



**EVALUATION OF SNP MARKERS LINKED TO THE *THCAS* AND *CBDAS*
GENES FOR VARIETAL IMPROVEMENT IN *CANNABIS SATIVA* L.**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
COLLEGE OF AGRICULTURAL INNOVATION AND FOOD**

**GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2024**

วิทยานิพนธ์เรื่อง

การประเมินเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่เกี่ยวกับยีน *THCAS* และ *CBDAS* สำหรับ
ปรับปรุงพันธุ์ *CANNABIS SATIVA L.*

โดย

ธนัสสร ถวิลเชื้อ

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2567

ผศ.ดร. จักรพงษ์ หรั่งเจริญ
ประธานกรรมการสอบ

ดร. กฤตพร ร้าจวนเกียรติ
กรรมการ

ดร. หทัยรัตน์ อุไรรงค์

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ศ. ดร. สือจิตต์ เพ็ชรประสาท)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

5 สิงหาคม 2567

Thesis entitled

**EVALUATION OF SNP MARKERS LINKED TO THE *THCAS* AND *CBDAS* GENES
FOR VARIETAL IMPROVEMENT IN *CANNABIS SATIVA* L.**

by

TANASSORN TAWINCHURE

was submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master of Science in Biotechnology

Rangsit University
Academic Year 2024

Asst.Prof. Chakrapong Rangjaroen, Ph.D.

Examination Committee Chairperson

Kittaporn Rumjuankiat, Ph.D.

Member

Hathairat Uairong, Ph.D.

Member and Adviser

Approved by Graduate School

(Prof. Suejit Pechprasarn, Ph.D.)

Dean of Graduate School

August 5, 2024

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จอย่างราบรื่นและลุล่วงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก ดร. ทศยรัตน์ อุไรรงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางด้วยความทุ่มเท อดทนและเอาใจใส่อย่างเต็มที่มาโดยตลอด และช่วยเหลือให้คำปรึกษาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ตามหลักวิชาการ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. จักรพงษ์ หรั่งเจริญ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.กฤตพร รำจวนเกียรติ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้แนวคิด คำแนะนำ และข้อเสนอแนะอันมีส่วนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Plants R&D Manager Mae Fah Luang Foundation, Doi Tung Development Project ที่อนุเคราะห์ศึกษาที่ใช้ในงานวิจัยนี้ และขอบคุณ สถาบันวิจัยกัญชาเพื่อการแพทย์มหาวิทยาลัยรังสิต ในการวิเคราะห์สารในกัญชาโดยเครื่อง HPLC และขอบคุณ กองทุนวิจัยกัญชามหาวิทยาลัยรังสิต ในการให้ทุนสนับสนุนบางส่วนที่ทำให้งานวิจัยนี้ลุล่วงไปได้อย่างราบรื่น รวมถึงเพื่อน ๆ นักศึกษาทุกท่านที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนและคอยให้กำลังใจจนงานวิจัยนี้ลุล่วงได้ในที่สุด

ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย และขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคณาจารย์ ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาจนทำให้ผลงานวิจัยบรรลุผลสำเร็จและขอขอบคุณความกตัญญูทศเวทิตาคคุณ แต่บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน สำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยต้องขออภัยมา ณ ที่นี้และขอน้อมรับความผิดไว้แต่เพียงผู้เดียว รวมถึงยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

ธนัสสร ถวิลเชื้อ

ผู้วิจัย

6305541 : ธนัสสร ถวิลเชื้อ
 ชื่อวิทยานิพนธ์ : การประเมินเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่เกี่ยวกับยีน *THCAS* และ *CBDAS* สำหรับปรับปรุงพันธุ์ *Cannabis sativa* L.
 หลักสูตร : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
 อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. ทศรัตน์ อุไรรงค์

บทคัดย่อ

Cannabis sativa L. มีสาร Cannabinoids ที่สำคัญหลายชนิดหนึ่งในนั้นคือ Tetrahydrocannabinol (THC) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางจิตและสารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ Cannabidiol (CBD) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทและมีศักยภาพในการใช้ทางการแพทย์ สารประกอบเหล่านี้ถูกควบคุมโดยเอนไซม์ Tetrahydrocannabinolic acid synthase (*THCAS*) และ Cannabidiolic acid synthase (*CBDAS*) เครื่องหมายโมเลกุล Single nucleotide polymorphism (SNP) คือการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งเดียวในลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต มีการใช้ SNP เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษา Genotype ของสิ่งมีชีวิต และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์พืช (Marker-Aided Selection, MAS) (Jehan & Lakhanpaul, 2006)

การศึกษานี้เปรียบเทียบการแปรผันของนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS* ระหว่างพืชกัญชาที่มี THC สูง (Type I) และ CBD สูง (Type III) ผลการวิจัยพบว่า SNP 12 จาก 63 ตำแหน่ง ถูกเลือกและมีศักยภาพในการแยกความแตกต่างระหว่างกัญชาสองประเภทนี้ การตรวจสอบความถูกต้องของ SNPs 12 ตำแหน่งได้ทำการทดสอบในรุ่นลูก F1 ที่ได้มาจากการผสมข้ามระหว่างพืช Type III (DNM) และ Type I (CHP) โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing และในการวิเคราะห์ *In silico* ผลการวิจัยพบว่าตำแหน่ง SNP 869 (T/C) และ 881 (T/G) สามารถใช้เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการทำนายชนิด Cannabinoid ของพืชกัญชาได้อย่างถูกต้องแต่ไม่สามารถใช้ทำนายปริมาณสารได้ ท้ายที่สุด Tetra-primer ARMS-PCR ได้รับการออกแบบเพื่อใช้เป็น Marker-Aided Selection ในโครงการปรับปรุงพันธุ์กัญชา

(วิทยานิพนธ์มีจำนวนทั้งสิ้น 84 หน้า)

คำสำคัญ: Cannabis, SNPs, THC, CBD, Tetra-primer ARMS-PCR

6305541 : Tanassorn Tawinchure
 Thesis Title : Evaluation of SNP Markers Linked to the *THCAS* and *CBDAS* Genes for Varietal Improvement in *Cannabis sativa* L.
 Program : Master of Science in Biotechnology
 Thesis Advisor : Hathairat Uairong, Ph.D.

Abstract

Cannabis sativa L. contains many cannabinoids. One of them is Tetrahydrocannabinol (THC), a psychoactive compound. The other important compound is Cannabidiol (CBD), a non-psychoactive compound with the potential for medical use. These compounds were metabolically regulated by two genes that are Tetrahydrocannabinolic acid synthase (*THCAS*) and Cannabidiolic acid synthase (*CBDAS*) genes. Single nucleotide polymorphism (SNP) is a variation at a single position in a DNA sequence of individuals. SNP has been used as a molecular marker for studying the organism genotype and could be used as the Marker-Aided Selection (MAS) in plant breeding (Jehan & Lakhanpaul, 2006).

This study compared the nucleotide variation of the *THCAS* gene between the high THC (Type I) and high CBD (Type III) of cannabis plants. The results showed that 12 of 63 SNP positions were selected as having the potential to distinguish between these two types. Validation of the 12 SNPs was performed in F1 progeny derived from the cross between Type III (DNM) and Type I (CHP) plants using a pyrosequencing technique and *in silico* analysis. The results revealed that the SNP positions 869 (T/C) and 881 (T/G) could be used as effective markers to predict the cannabinoid type of cannabis plant correctly but not the quantity. Finally, the tetra-primer ARMS-PCR was designed to be used as the Marker-Aided Selection in the cannabis breeding program.

(Total 84 pages)

Keywords: Cannabis, SNPs, THC, CBD, Tetra-primer ARMS-PCR

Student's Signature Thesis Advisor's Signature.....

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฅ
บทที่ 1	บทนำ
1.1	ที่มาและความสำคัญ
1.2	วัตถุประสงค์การวิจัย
1.3	ขอบเขตของโครงการวิจัย
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ
บทที่ 2	ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง
2.1	ประวัติความเป็นมาของกัญชาและกัญชง
2.2	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลกัญชา
2.3	พันธุ์กัญชาในประเทศไทย
2.4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกัญชา
2.5	สารสำคัญในกัญชา
2.6	ยื่นที่ควบคุมการส่งออกของเอนไซม์ THCAS และ CBDAS
2.7	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล
2.8	การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยเทคนิค Pyrosequencing
2.9	การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยเทคนิค Tetra-primer ARMS-PCR
บทที่ 3	วิธีการทดลอง
3.1	พันธุ์กัญชาที่ใช้ในการศึกษา

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	35
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	36
3.4 การศึกษา <i>In silico</i> ในการวิเคราะห์ยีน <i>THCAS</i> และ <i>CBDAS</i> เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่ง SNPs และ InDel กับ Chemotype ของกัญชา	37
3.5 การตรวจสอบยืนยันตำแหน่ง SNPs ที่คาดว่าจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน <i>THCAS</i> และ <i>CBDAS</i> โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing	38
3.6 การวิเคราะห์ปริมาณสาร THC และ CBD โดยใช้ HPLC	40
3.7 การวิเคราะห์กัญชาลูกผสมเพื่อทำการยืนยันประสิทธิภาพในการทำนาย Chemotype ของตำแหน่ง SNPs ที่ศึกษา	41
3.8 การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยเทคนิค Tetra-primer ARMS-PCR	41
บทที่ 4 ผลการวิจัย	43
4.1 ผลการศึกษา <i>In silico</i> ในการวิเคราะห์ยีน <i>THCAS</i> และ <i>CBDAS</i> เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่ง SNPs และ InDel กับ Chemotype ของพันธุ์กัญชา	43
4.2 การตรวจสอบยืนยันตำแหน่ง SNPs ที่คาดว่าจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน <i>THCAS</i> และ <i>CBDAS</i> โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing	55
4.3 การยืนยันประสิทธิภาพในการทำนาย Chemotype ของเครื่องหมาย SNP	67
4.4 การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยเทคนิค Tetra-primer ARMS-PCR	70
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	73
5.1 สรุปผลการวิจัย	73
5.2 ข้อเสนอแนะ	74

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม	75
ภาคผนวก	82
ประวัติผู้วิจัย	84



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงชื่อัญชาทางการค้าของต่างประเทศที่พัฒนามาจากัญชาพันธุ์ไทย	13
2.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของัญชาแต่ละพันธุ์	15
2.3 แสดงสารประกอบในัญชาและจำนวนสารที่สามารถระบุและจัดหมวดหมู่ได้	19
2.4 แสดงชนิดและจำนวนของสาร Cannabinoids	20
2.5 แสดงชนิดและคุณสมบัติของสาร Terpenoids ที่พบในัญชา	23
3.1 แสดงพันธุ์ัญชา Chemotype และแหล่งที่มาของัญชาที่ใช้ในงานวิจัยนี้	34
3.2 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายของยีน <i>THCAS</i> และ <i>CBDAS</i>	40
4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ของัญชาพันธุ์ต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และอัตราส่วน A260/A280 และความเข้มข้นของ DNA ที่ได้จากการสกัด	56
4.2 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>THCAS</i> และ <i>CBDAS</i> และตำแหน่งเป้าหมาย (Target Position) ของไพรเมอร์โดยวิธี Pyrosequencing	58
4.3 แสดงตำแหน่ง SNP และเปอร์เซ็นต์ Allele ระหว่างัญชา Type I และ Type III ในยีน <i>THCAS</i> โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing และแสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนและทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนที่ตำแหน่งต่าง ๆ	63
4.4 แสดงตำแหน่ง SNP และ InDel และเปอร์เซ็นต์ Allele ของพันธุ์ ัญชา Type I และ Type III ในยีน <i>CBDAS</i> โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนและทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนที่ตำแหน่งต่าง ๆ	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.5	69
แสดงตำแหน่ง SNP และ เปอร์เซนต์ Allele ของกัญชาลูกผสม F1 ของ DNM x CHP (DCP22) โดยเทคนิค Pyrosequencing และแสดงปริมาณสาร THC และ CBD ที่วิเคราะห์โดย HPLC	
4.6	71
ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของ Tetra primer ที่ใช้ในการตรวจหา SNP ที่ตำแหน่ง 869 บนยีน <i>THCAS</i> และ Product size ของ Target allele	



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ข้อกำหนดการใช้ประโยชน์ส่วนต่าง ๆ ของกัญชาและกัญชงตามกฎหมายไทยที่ใช้ในปัจจุบัน (พ.ศ. 2564)
2.2	ราชกิจจานุเบกษาเรื่องกำหนดลักษณะกัญชง พ.ศ. 2562
2.3	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกัญชาแต่ละพันธุ์
2.4	แสดงลักษณะดอกกัญชา A) ดอกกัญชาเพศเมีย B) ดอกกัญชาเพศผู้
2.5	แสดงโครงสร้างของดอกกัญชาเพศเมีย
2.6	แสดงโครงสร้างของดอกกัญชาเพศผู้
2.7	แสดงลักษณะของ Trichome A คือภาพขยายกลุ่ม Trichome ที่มีอายุน้อยบนผิวของดอกกัญชา B คือ 4 ภาพของ Trichome แบบใกล้
2.8	แสดงกระบวนการเปลี่ยน THCA ไปเป็น THC โดยการเกิด Decarboxylation ด้วยความร้อน แสดง และการเก็บรักษา
2.9	แสดงกระบวนการการเปลี่ยนแปลงของสารด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร THC และ CBD
2.10	แสดงแผนภาพกระบวนการผลิตสาร THCA CBDA CBCA และ CBGA ที่ควบคุมโดย Single locus ได้แก่ Locus B C O เป็นผลทำให้เกิดกัญชา Chemotype ต่าง ๆ
2.11	แสดงตำแหน่งของยีน Cannabinoid synthase ที่ได้จากการศึกษากัญชากลุ่ม Type III โดยพบการแสดงออกของยีน CBDAS, CBDAS-like และ THCAS-like ที่ตำแหน่ง 31, 26 และ 29 Mb
2.12	แสดงตำแหน่งของยีน Cannabinoid synthase บน Chromosome 7 ที่ได้จากการศึกษากัญชากลุ่ม Type II และ Type III โดย Type III พบการแสดงออกของยีน CBDAS, CBDAS-like และ THCAS-like ที่บริเวณ 31, 29 และ 26 Mbs แต่ไม่พบการแสดงออกของทั้งยีน CBDAS และ THCAS
2.13	แสดงหลักการทำงานของเทคนิค pyrosequencing
4.1	แสดงผล Multiple alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน THCAS ระหว่างกัญชา Type I และ Type III โดยสามเหลี่ยมคือตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีความผันแปร และลูกศรคือตำแหน่ง SNP ที่ศึกษาในการทดลองนี้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.2	51
แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน <i>THCAS</i> ในกัญชา Type I และ Type III และตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนที่มีผลมาจากการเกิด SNP (ลูกศรสีแดง)	
4.3	55
แสดงผล Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ยีน <i>CBDAS</i> ระหว่างกัญชา Type I และ Type III โดยสามเหลี่ยมคือตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีความผันแปร วงกลมคือ ตำแหน่ง InDel และลูกศรคือตำแหน่ง SNP ที่ศึกษาในการทดลองต่อไปนี้	
4.4	59
แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสยีน <i>CBDAS</i> ในกัญชา Type I และ Type III และตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนที่มีผลมาจากการเกิด SNP (ลูกศรสีแดง)	
4.5	76
แสดงแถบ DNA ของกัญชาแต่ละพันธุ์ที่ตรวจสอบได้โดย Tetra primer ที่ออกแบบจาก SNP ที่ตำแหน่ง 869 ของยีน <i>THCAS</i> Lane ที่ 1 และ 13 คือ DNA Ladder 100 bp (SMOBIO, Taiwan) Lane ที่ 2-7 เป็นพันธุ์กัญชา Type I, Lane ที่ 8 เป็นพันธุ์กัญชา Type III ที่ให้แถบ DNA ขนาด 257 และ 319 bp ตามลำดับ Lane ที่ 8-12 เป็นพันธุ์ผสมให้แถบ DNA ทั้ง 2 แถบ	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

Cannabis sativa L. เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในชื่อ กัญชา (Marijuana) และ กัญชง (Hemp) ทั้งสองเป็นพืชดอกที่มีดอกเพศผู้และเพศเมียแยกคนละต้น (Dioecious Plant) (Salentijn, Zhang, Amaducci, Yang, & Trindade, 2015) มีการเพาะปลูกพืชชนิดนี้สำหรับนำมาใช้ประโยชน์จากสาร Cannabinoids เพื่อการรักษาและการสันถนาการมาเป็นเวลานานนับพันปี แต่ได้มีการกำหนดให้กัญชาผิดกฎหมายในหลายประเทศทั่วโลกตั้งแต่อดีตเนื่องจากมีสารที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทที่ชื่อว่า Tetrahydrocannabinol (THC) แต่ในปัจจุบันหลาย ๆ ประเทศได้ทำให้กัญชาถูกกฎหมายเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์รวมถึงการสันถนาการบางประเทศจึงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่า ปัจจุบันประเทศไทยที่ได้ประกาศกฎหมายควบคุมกัญชาฉบับใหม่เพื่อใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และการวิจัย แต่เนื่องจากกัญชาพันธุ์ไทยไม่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มานานหลายทศวรรษจึงทำให้มีลักษณะสำคัญทางการเกษตร เช่น ความสูงของต้น ช่วงเวลาออกดอก ขนาดของช่อดอก รวมถึงปริมาณสาร Cannabinoids ในช่อดอกไม่ได้รับการปรับปรุงไปด้วย สำหรับสารสำคัญที่ชื่อ Cannabinoids ที่พบในกัญชาซึ่งสะสมไว้ใน Trichome ที่อยู่บริเวณช่อดอกตัวเมีย ประกอบด้วยสารหลายชนิดที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาหลายประการ สารสำคัญที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาททำให้เกิดอาการมึนเมา ช่วยลดอาการปวด สารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือ Cannabidiol (CBD) เป็นสารที่นิยมนำมาใช้ทางการแพทย์เนื่องจากเป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทและมีคุณสมบัติที่ช่วยเรื่องโรคลมชัก ต้านการอักเสบ และช่วยลดอาการปวดได้ (Ramirez, Fanovich, & Churio, 2019) สารทั้งสองดังกล่าวมีสารตั้งต้น (Precursor) ตัวเดียวกันคือ Cannabigerol acid (CBGA) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น Tetrahydrocannabinol acid (THCA) และ Cannabidiol acid (CBDA) จาก

กระบวนการเมทาบอลิซึมของยีน Tetrahydrocannabinolic acid synthase (THCAS) และ Cannabidiolic acid synthase (CBDAS) นอกจากนั้นพบว่าจะเปลี่ยนไปเป็น THC และ CBD ได้จากการ Decarboxylation โดยความร้อน (Sirikantaramas & Taura, 2017) กัญชาแต่ละพันธุ์จะมีปริมาณสาร THC และ CBD แตกต่างกันไป มีการแยกประเภทของกัญชาตามสารสำคัญ (Chemotype) โดยแบ่งตามอัตราส่วนของ Cannabinoid ในกัญชาได้แก่ THCA, CBDA, และ CBGA แบ่งออกเป็น 5 ประเภท ได้แก่ Type I คือพันธุ์ที่มีปริมาณสาร THC สูง CBD ต่ำ Type II คือพันธุ์ที่มีปริมาณสาร THC และ CBD ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันหรือเท่ากัน Type III เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณสาร CBD สูง THC ต่ำ Type IV เป็นพันธุ์ที่มี CBGA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ THCA และ CBDA Type IV ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ THC และ CBD และ Type V เป็นพันธุ์ที่ไม่พบสาร Cannabinoids หรือเรียกอีกอย่างว่าเป็นพันธุ์ Cannabinoid-free (Garfinkel, Otten, & Crawford, 2021) ในประเทศไทยกัญชาที่มีปริมาณสาร THC สูงกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ถูกจัดให้เป็นกัญชา (Marijuana) ในขณะที่กัญชาที่มีสาร THC ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ถูกจัดว่าเป็นกัญชง (Hemp) ตามราชกิจจานุเบกษาเรื่องกำหนดลักษณะกัญชง พ.ศ. 2562 (คณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ, 2562)

การวิเคราะห์ปริมาณสาร THC และ CBD สามารถทำได้โดยใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อแยกความแตกต่างตาม Chemotype ของกัญชาแต่ละพันธุ์และใช้ในการวิเคราะห์และคัดเลือกลูกผสมของกัญชาที่มีปริมาณสาร THC และ CBD ตามต้องการในการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาตำแหน่ง Single nucleotide polymorphisms (SNPs) หรือ SNPs ที่สามารถแยกกัญชาพันธุ์ที่มีปริมาณสาร THC สูง CBD ต่ำ และกัญชาที่มีปริมาณสาร THC ต่ำ และ CBD สูง ออกจากกันได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษายีน THCAS และ CBDAS ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่นำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ (Kojima, Seki, Yoshida, & Muranaka, 2006) ต่อมาได้มีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิค DNA sequencing เพื่อใช้ในการแยกกัญชา (Drug Type) ที่มีสาร THC สูง และกัญชงเส้นใย (Fiber Type) ที่มีสาร THC ต่ำออกจากกันเพื่อใช้ประโยชน์ในทางนิติวิทยาศาสตร์และเพื่อศึกษากลไกทางชีวเคมีที่ควบคุมลักษณะของพืช จากงานวิจัยดังกล่าวทำให้พบเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่สามารถในการแยกกัญชาและกัญชงเส้นใยได้ (Cascini et al., 2019)

ในการปรับปรุงพันธุ์กัญชาที่เป็นพืชมีดอกตัวผู้และตัวเมียแยกจากกันคนละต้นและผสมพันธุ์แบบข้ามต้น (Cross Pollinated) หมายความว่า เป็นพืช Outcrossing ตามธรรมชาติ ทุกพันธุ์สามารถเกิด Inter-cross creating การควบคุมการผสมเกสรระหว่างต้นตัวผู้และต้นตัวเมียจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างมาก (Salentijn et al., 2015) โดยขั้นตอนประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

ได้แก่ 1) การหาความหลากหลายของตัวอย่างและสร้างฐานกลุ่มประชากร 2) การสร้างพันธุ์พ่อแม่ (Parents) โดยการคัดเลือกและพัฒนาจากกลุ่มประชากรผ่านการเลือกซ้ำ 3) การพัฒนาและการทดสอบคุณสมบัติของพันธุ์ที่ได้มา (Posselt, 2010) วิธีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กัญชามี 4 วิธีที่สำคัญ ได้แก่ การคัดเลือกแบบรวม (Mass Selection) การทำ Cross-breeding การทำ Inbreeding และการทำ Hybrid cross (Ranalli, 2004) แต่การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคดั้งเดิมนั้นค่อนข้างใช้ระยะเวลานาน อีกทั้งยังใช้ทรัพยากรและต้นทุนในการเพาะปลูก การปลูกดูแลรักษาจนได้ดอกกัญชา รวมถึงการวิเคราะห์สาร Cannabinoids ของแต่ละต้นด้วยเครื่อง HPLC ทำให้ยุ่งยาก ต้องใช้พื้นที่ปลูกมาก ใช้เวลานาน มีหลายขั้นตอนและมีราคาต้นทุนสูง ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker) ได้ถูกพัฒนามาเพื่อช่วยนักปรับปรุงพันธุ์พืชหรือเรียกว่า Marker Assisted/Marker Aided Selection ที่สามารถใช้เพื่อช่วยในการตัดสินใจในการเลือกต้นรุ่นลูก การเลือกลักษณะพันธุกรรม (Trait) ตามต้องการตั้งแต่ระยะต้นกล้า (Seedling Stage) ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวจึงมีประโยชน์อย่างมากในการลดต้นทุนในการคัดเลือก Phenotype ที่ต้องการ การลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ และการเพิ่มความแม่นยำในการปรับปรุงพันธุ์ การประยุกต์ใช้นาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ในการปรับปรุงพันธุ์กัญชาสามารถใช้วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของกัญชาได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า (Sigh, D., Singh, A.K., & Singh, A., 2021) จึงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *THCAS* และ *CBDAS* เพื่อช่วยในการคัดเลือกกัญชาที่มี Chemotype ตามที่ต้องการได้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อค้นหาตำแหน่ง SNPs ในยีน *THCAS* หรือ *CBDAS* ที่สามารถใช้สำหรับทำนาย Chemotype สำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกพันธุ์ (Marker Aided Selection, MAS) ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ *Cannabis sativa* L.

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยนี้มีขอบเขตในการค้นหาและศึกษาตำแหน่ง SNPs ในยีน *THCAS* และ *CBDAS* ที่มีประสิทธิภาพในการทำนาย Chemotype ของกัญชาพันธุ์ที่มีสาร Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) สูง (Type I) และพันธุ์ที่มีสาร Cannabidiol (CBD) สูง (Type III) โดยกัญชาที่นำมาศึกษาประกอบไปด้วยกัญชาพันธุ์ไทย (Thai Domestic Line) และพันธุ์ทางการค้า (Commercial Line) จากต่างประเทศ ในการศึกษาทั้งสองศึกษาโดย *In*

silico และใช้เทคนิคทางด้านโมเลกุลเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของตำแหน่ง SNPs ที่นำมาศึกษาและยืนยันการนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็น Marker aided selection ที่ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์กัญชา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบตำแหน่ง SNPs ในยีน *THCAS* หรือ *CBDAS* ที่มีประสิทธิภาพในการทำนาย Chemotype ของกัญชา

1.4.2 สามารถนำตำแหน่ง SNPs ที่ศึกษาไปใช้ประโยชน์ในการเป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกพันธุ์ (Marker Aided-Selection) เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ *Cannabis sativa* L.



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติความเป็นมาของกัญชาและกัญชง (*Cannabis sativa* L.)

กัญชาและกัญชง (*Cannabis sativa* L.) จัดเป็นพืชดอกที่สามารถผสมพันธุ์แบบเปิด (Open-pollinated Plant) โดยเกสรตัวผู้ผสมกับเกสรตัวเมียซึ่งเป็นการปฏิสนธิตามธรรมชาติ (Chandra, Lata, Khan, & ElSohly, 2017) จากประวัติของพืชทั้งสองชนิดนี้พบว่ามีมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์มาอย่างยาวนาน รวมทั้งมีความเกี่ยวข้องกับการใช้ในแง่ของวัฒนธรรมและศาสนาถึงแม้ว่าจะมีผลข้างเคียงในการใช้ก็ตาม หากย้อนกลับไปในช่วงก่อนคริสต์ศักราช ประเทศจีนมีการใช้กัญชาในการรักษาอาการป่วยหลายแบบ เช่น อาการท้องผูก อาการปวด โรคไข้มาลาเรีย โรคลมบ้าหมู วัณโรค และอื่น ๆ (Linares, Crippa, & Chagas, 2017) ปัจจุบันคำว่า Cannabis หมายถึงพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. ซึ่งช่อดอกตัวเมียมีสาร Tetrahydrocannabinol (THC) โดยมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (Psychoactive Chemicals) สามารถใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ รวมทั้งการสันทนาการพักผ่อนหย่อนใจ และสาร Cannabidiol (CBD) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (Non-psychoactive Chemicals) แต่มีคุณสมบัติในทางการแพทย์ นอกจากนี้ยังมีเส้นใยที่สามารถใช้ทำผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ อาทิ สิ่งทอ พลาสติก และวัสดุก่อสร้างหลายรูปแบบ (Small, 2017) โดยพบหลักฐานการใช้เส้นใยของกัญชาพันธุ์ที่มีเส้นใยสูง (Hemp) เพื่อใช้ทำสิ่งทอที่มณฑลเหอหนานของประเทศจีนเมื่อ 5,600 ปีที่แล้วอีกด้วย (McPartland, Hegman, & Long, 2019) อีกทั้งชาวจีนยังใช้เมล็ดของกัญชาในการประกอบอาหารซึ่งหลักฐานดังกล่าวถูกค้นพบในช่วงของราชวงศ์ฮั่น ในช่วง 206-220 ปีก่อนคริสตกาลหลังจากนั้นในช่วงต้นของคริสต์ศักราชเริ่มมีวัฒนธรรมใหม่เกิดขึ้นทำให้เมล็ดพืชดังกล่าวไม่เป็นที่นิยมในประเทศจีนอีกต่อไป ซึ่งตรงข้ามกับประเทศเนปาลที่ยังมีการใช้ประโยชน์จากเมล็ดพืชดังกล่าวในการทำอาหารในครัวเรือนจนถึงปัจจุบัน (Zuardi, 2006) อย่างไรก็ตามจากจุดเริ่มต้นการใช้เมล็ดที่ประเทศจีน พบว่าได้มีการแพร่กระจายไปยังประเทศอินเดียและเปอร์เซีย จนในช่วงยุคกลางยุโรป มีการปลูกกัญชาพันธุ์เส้นใยสูงหรือที่รู้จักในชื่อกัญชง (Fiber Hemp) อย่างแพร่หลายเพื่อใช้ประโยชน์จากเส้นใยและเมล็ดในการประกอบอาหารร่วมกับพืชชนิดอื่น นอกจากนี้ช่วงต้น ค.ศ. 1545 เริ่มมีการ

เพาะปลูกในทวีปอเมริการ่วมกับชาวสเปนในประเทศชิลี (Lata, Chandra, Khan, & ElSohly, 2017) ประมาณ 100 ปี หลังจากนั้นมีการแพร่กระจายไปยังสหรัฐอเมริกาและนิวซีแลนด์ (Merfield, 1999) ปัจจุบันมีการใช้เส้นใยของพันธุ์ดังกล่าวเป็นวัตถุดิบในหลายอุตสาหกรรม มีการใช้เป็นพลังงานทดแทนในรูปของ Bio-fiber เพื่อใช้กับรถยนต์ (Bledzki, Faruk, & Sperber, 2006) อีกทั้งยังมีการเพาะปลูกมาอย่างยาวนานในหลายประเทศก่อนที่จะประกาศให้พืชนี้ผิดกฎหมายครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งส่งอิทธิพลไปถึงกฎหมายในอีกหลายประเทศทั่วโลก ปัจจุบันสหรัฐอเมริการได้มีกฎหมายอนุญาตให้ใช้กัญชาทางการแพทย์ (Mead, 2017) มีการขายในรูปของสารสกัดใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการด้านจิตใจ ช่วยกล่อมประสาทและช่วยในการนอนหลับ (Russo & Guy, 2006) และใช้ในเชิงสันตนาการเต็มรูปแบบในบางรัฐ (Dragone, Prarolo, Vanin, & Zanella, 2018) นอกจากนี้ยังการมีอนุญาตเพาะปลูกเพื่อใช้ในทางการแพทย์และสันตนาการในหลายประเทศทั่วโลก (Hädener, König, & Weinmann, 2019)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลกัญชา

การจัดหมวดหมู่พืชสกุลกัญชาตามหลักอนุกรมวิธานมีดังนี้ (Chandra et al., 2017)

Kingdom:	Plantae (Plants)
Subkingdom:	Tracheobionta (Vascular Plants)
Superdivision:	Spermatophyta (Seed Plants)
Division:	Magnoliophyta (Flowering Plants)
Class:	Magnoliopsida (Dicotyledons)
Subclass:	Hamamelididae
Order:	Urticales
Family:	Cannabaceae

Genus: *Cannabis*

Species: *Sativa* L.

2.2.1 วิวัฒนาการระบบการตั้งชื่อของกัญชาและกัญชง

ระบบในการเรียกชื่อกัญชาและกัญชงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันจึงทำให้เกิดความสับสนอย่างมาก ในปี ค.ศ.1753 เมื่อ Linnaeus ได้ตีพิมพ์หนังสือเรื่อง Species Plantarum ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของระบบการตั้งชื่อพฤกษศาสตร์ทำให้เกิดระบบชื่อที่มีลำดับความสำคัญของ *C. sativa* ขึ้นอีกด้วย หลังจากนั้น 32 ปี Lanmarck ได้ตั้งชื่อ *C. indica* Lam. จัดเป็นพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจากอินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแอฟริกาใต้ โดยได้อธิบายไว้ว่า *C. indica* แตกต่างจาก *C. sativa* ทางสัณฐานวิทยาอย่างมาก เช่น ก้าน การแตกแขนงของกิ่ง ใบและดอก นอกจากนี้ยังได้อธิบายถึงความแตกต่างทางเคมีไว้อีกด้วย โดยระบุว่า *C. indica* นั้นมีกลิ่นที่แรงและผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางจิตซึ่งมีผลต่อสมองทำให้เกิดอาการเมา ลืมความเศร้าและทำให้ร่าเริง

หลังจากนั้นนักพฤกษศาสตร์ได้ศึกษาการกระจายตัวของพืชซึ่งระบุว่าเป็น *C. sativa* หรือ *C. indica* และได้เปรียบเทียบความแตกต่างของพันธุ์ที่ทั้งสองตั้งชื่อขึ้น และจัดทำแผนที่การกระจายตัวขึ้น จึงสามารถสรุปการจำแนก *C. sativa* และ *C. indica* ออกจากกันโดยสามารถจำแนกได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Profile) จำแนกจากสารสำคัญ (Chemical Profile) โดย *C. sativa* นั้นมีสาร THC สูงกว่า CBD ในขณะที่เดียวกัน *C. indica* มีสาร THC ต่ำกว่า CBD นอกจากนี้ยังจำแนกได้จากแหล่งที่มา แต่หลักการจำแนกที่กล่าวมาพบว่าเป็นปัญหาหลัก ในระบบ Cannabis taxonomy (McPartland, 2018)

ต่อมา Small และ Cronquist ได้สร้างระบบการตั้งชื่อสำหรับ *C. sativa* อย่างเป็นทางการ หลักในการจำแนก 2 หลักการ ได้แก่ การแยกเป็น subspecies โดยอิงจากค่าองค์ประกอบของสาร THC ในดอกเพศเมียที่แห้งแล้ว หากมีสาร THC สูงกว่า 0.3% จะถือว่าเป็น subsp. *indica* นอกจากนี้ยังจำแนกจากลักษณะในการเพาะเลี้ยง (McPartland, 2018) โดยสามารถจำแนกได้ดังนี้

- 1) *C. sativa* subsp. *sativa* var. *sativa* (ปริมาณ THC ต่ำ มีการเพาะปลูก)
- 2) *C. sativa* subsp. *sativa* var. *spontanea* (ปริมาณ THC ต่ำ และเป็น Wild-type)

3) *C. sativa* subsp. *indica* var. *indica* (ปริมาณ THC สูง มีการเพาะปลูก)

4) *C. sativa* subsp. *indica* var. *kafiristanica* (ปริมาณ THC สูง และเป็น Wild-type)

อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่มีการวิเคราะห์คุณสมบัติการมีสารสำคัญ (Chemotype) โดยการวิเคราะห์ อัตราส่วนระหว่าง $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) พบว่าสามารถแยกพันธุ์ได้ออกเป็น 3 แบบ (McPartland & Guy, 2017) ได้แก่

1) Type I หรือที่เรียกว่ากลุ่มที่เป็นยา (Drug-type) คือ พันธุ์ที่มีสาร THC สูงกว่า 0.3% และมีสาร CBD ต่ำกว่า 0.5%

2) Type II คือ พันธุ์ที่มีสาร THC สูงกว่า 0.3% และมีสาร CBD สูงกว่า 0.5%

3) Type III หรือที่เรียกว่ากลุ่มที่เป็นเส้นใย (Fiber-type) คือ พันธุ์ที่มีสาร THC ต่ำกว่า 0.3% และมีสาร CBD สูงกว่า 0.5%

2.2.2 ระบบการจำแนกพันธุ์กัญชาที่นิยมในปัจจุบัน

ระบบการจำแนกพันธุ์กัญชานั้นมีการจัดเป็นระบบการตั้งชื่อมากมายตามที่ได้กล่าวถึงข้างต้น อย่างไรก็ตามระบบการตั้งชื่อที่ได้รับความนิยมและเป็นที่ยอมรับกันดีในทางวิทยาศาสตร์คือการเรียก *C. sativa* subsp. *sativa* ว่ากัญชง เนื่องจากมีสาร THC ต่ำ เส้นใยสูง ส่วน *C. sativa* subsp. *Indica* เรียกแทนกัญชา ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มี THC สูง และ *Ruderalis* หรือ *C. sativa* subsp. *ruderalis* ที่พบในประเทศรัสเซียนั้น เป็นกัญชาพันธุ์ที่มีลำต้นเตี้ย การทำดอกขึ้นอยู่กับอายุที่ปลูกไม่ขึ้นอยู่กับช่วงแสง (Autoflowering) (Small, 2017) กัญชาพันธุ์นี้ถูกนำมาพัฒนาพันธุ์ผสมกับกัญชาทั่วไปจนเกิดเป็นกัญชาพันธุ์ใหม่ที่มีการออกดอกไม่ขึ้นอยู่กับช่วงแสง และสามารถขยายในเชิงพาณิชย์ได้ในปัจจุบัน (McPartland, 2018)

2.2.2.1 ระบบการจำแนกพันธุ์กัญชาโดยสารสำคัญ (Chemotype)

ในทางวิทยาศาสตร์มีการแยกประเภทของกัญชาตามสารสำคัญ (Chemotype) โดยที่นิยมใช้จะแบ่งตามอัตราส่วนของ Cannabinoid ซึ่งเป็นสารสำคัญจำนวน 3 ชนิด ในกัญชา ได้แก่ Tetrahydrocannabinolic acid (THCA), Cannabidiolic acid (CBDA) และ Cannabigerol acid (CBGA) (Garfinkel et al., 2021) ดังนี้

1) Type I คือพันธุ์ที่มีปริมาณสาร THC สูง CBD ต่ำ

2) Type II คือพันธุ์ที่มีปริมาณสาร THC และ CBD ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน หรือเท่ากัน

3) Type III เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณสาร CBD สูง THC ต่ำ

4) Type IV เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณสาร CBG สูง ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ THC และ CBD

5) Type V เป็นพันธุ์ที่ไม่พบสาร Cannabinoid หรือเรียกอีกอย่างว่าเป็นพันธุ์ Cannabinoid-free

2.2.2.2 ระบบการจำแนกัญชาและกัญชงตามกฎหมายประเทศไทย

ปัจจุบันประเทศไทยได้ประกาศให้กัญชาและกัญชงสามารถขออนุญาตปลูก นำเข้า ครอบครอง จำหน่าย และใช้ประโยชน์ได้ในบางส่วนของต้นตามที่กฎหมายกำหนด (รูปที่ 2.1) และได้มีการจำแนกกัญชาและกัญชงด้วยปริมาณสาร THC โดยกำหนดให้กัญชง (Hemp) มีลักษณะเป็นพืชซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* ซึ่งเป็นชนิดย่อยของพืชกัญชา (*Cannabis sativa* L.) ที่มีปริมาณสาร Tetrahydrocannabinol (THC) ในใบ และช่อดอก ไม่เกินร้อยละ 1 ต่อน้ำหนักแห้งโดยตรวจวิเคราะห์ตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่คณะกรรมการกำหนด (คณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ, 2562) แสดงในรูป 2.2 ปัจจุบันได้มีการประกาศให้ช่อดอกกัญชาจัดเป็นสมุนไพรควบคุม สามารถศึกษาวิจัย ส่งออก จำหน่าย หรือแปรรูปสมุนไพรควบคุมเพื่อการค้า แต่ต้องขออนุญาตและปฏิบัติตามเงื่อนไขตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่อง สมุนไพรควบคุม (กัญชา) พ.ศ. 2565 ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 139 ตอนพิเศษ 272 ง (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2565)

กัญชา กัญชงที่ผลิตในประเทศ
ส่วนไหนเป็น - ไม่เป็นยาเสพติด
 ตามประกาศ สร. เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 พ.ศ. 2563

เมล็ดกัญชา
เป็นยาเสพติด
 ใช้เป็นเมล็ดพันธุ์

เมล็ดกัญชง
น้ำมันและสารสกัด
จากเมล็ดกัญชง
ไม่เป็นยาเสพติด
 ใช้เป็นเมล็ดพันธุ์/ ศึกขาววัญ/ ผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น ยา อาหาร สบุนโฟร เครื่องสำอาง

เปลือก ลำต้น เส้นใย
ไม่เป็นยาเสพติด
 ใช้ศึกขาววัญ/
 ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ
 เช่น สิ่งทอ ยานยนต์
 กระดาษ

ราก
ไม่เป็นยาเสพติด
 ใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์/
 ศึกขาววัญ/ ผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น
 ยา อาหาร สบุนโฟร
 เครื่องสำอาง

ช่อดอก
เป็นยาเสพติด
 ใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์/
 ศึกขาววัญ/ ผลิตสารสกัด

สารสกัด CBD และต้องมี
THC ไม่เกิน 0.2%
ไม่เป็นยาเสพติด
 ใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์/
 ศึกขาววัญ/ ผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น
 ยา อาหาร สบุนโฟร เครื่องสำอาง

ใบจริง/ใบพัด
ไม่เป็นยาเสพติด
 ใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์/
 ศึกขาววัญ/ ผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น
 ยา อาหาร สบุนโฟร เครื่องสำอาง

กิ่ง ก้าน
ไม่เป็นยาเสพติด
 ใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์/
 ศึกขาววัญ/ ผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น
 ยา อาหาร สบุนโฟร เครื่องสำอาง

กากจากการสกัด
 ต้องมี THC ไม่เกิน 0.2 %
ไม่เป็นยาเสพติด

ส่วนต่าง ๆ ของกัญชา กัญชง
 ต้องได้จากการปลูกหรือผลิตโดยผู้รับอนุญาตตามกฎหมาย
 ตรวจสอบได้ที่เว็บไซต์ ออย. <https://www.fda.moph.go.th>

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
 Food and Drug Administration

รูปที่ 2.1 ข้อกำหนดการใช้ประโยชน์ส่วนต่าง ๆ ของกัญชาและกัญชงตามกฎหมาย
 ไทยที่ใช้ในปัจจุบัน (พ.ศ. 2564)

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2564

ประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ

เรื่อง กำหนดลักษณะกัญชง (Hemp)

พ.ศ. ๒๕๖๒

โดยที่เป็นการสมควรกำหนดลักษณะกัญชง (Hemp) เพื่อเป็นประโยชน์ในการควบคุมการผลิต นำเข้า ส่งออก จำหน่าย หรือมีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท ๕ เฉพาะกัญชง (Hemp) ให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและเป็นการส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์จากกัญชง (Hemp)

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๑๓ (๖/๔) และมาตรา ๒๖/๒ (๒) แห่งพระราชบัญญัติ ยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. ๒๕๖๒ ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ ๗) พ.ศ. ๒๕๖๒ ประกอบกับมติของคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษในการประชุมครั้งที่ ๔๐๗-๑๑/๒๕๖๒ เมื่อวันที่ ๑๗ กันยายน พ.ศ. ๒๕๖๒ คณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษจึงออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ประกาศนี้เรียกว่า “ประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ เรื่อง กำหนด ลักษณะกัญชง (Hemp) พ.ศ. ๒๕๖๒”

ข้อ ๒ ยกเลิกประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ เรื่อง กำหนดลักษณะกัญชง (Hemp) พ.ศ. ๒๕๖๒ ลงวันที่ ๒๗ สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๖๒

ข้อ ๓ ประกาศนี้ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ข้อ ๔ กัญชง (Hemp) มีลักษณะเป็นพืชซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* อันเป็นชนิดย่อยของพืชกัญชา (*Cannabis sativa* L.) ที่มีปริมาณสารเตตราไฮโดร แคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol, THC) ในใบและช่อดอก ไม่เกินร้อยละ ๑.๐ ต่อน้ำหนักแห้ง โดยตรวจวิเคราะห์ ตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่คณะกรรมการประกาศกำหนด

ข้อ ๕ เมล็ดพันธุ์รับรอง มีลักษณะเป็นเมล็ดพันธุ์กัญชง (Hemp) ที่มีปริมาณสารเตตรา ไฮโดรแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol, THC) ในใบและช่อดอก ไม่เกินร้อยละ ๑.๐ ต่อน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้ ตามที่คณะกรรมการประกาศกำหนด โดยการตรวจวิเคราะห์ตามหลักเกณฑ์และ วิธีการที่คณะกรรมการประกาศกำหนด และเป็นพันธุ์พืชขึ้นทะเบียนตามกฎหมายว่าด้วยพันธุ์พืช

รูปที่ 2.2 ราชกิจจานุเบกษาเรื่องกำหนดลักษณะกัญชง พ.ศ.2562

ที่มา: คณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ, 2562

2.3 พันธุ์กัญชาในประเทศไทย

จากหลักฐานทางประวัติศาสตร์ในสมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราชระหว่างปีพุทธศักราช 2199-2231 พบบันทึกตำราพระโอสถพระนารายณ์ที่มีรายละเอียดตำรับยาที่ใช้ส่วนต่างๆ ของกัญชาเป็นส่วนประกอบในยาต่าง ๆ มาตั้งแต่สมัยนั้น นอกจากนี้ชาวเขาเผ่าม้ง ลีซอ และอาข่าที่อาศัยอยู่บริเวณภาคเหนือของไทยยังได้มีการนำเส้นใยกัญชาพันธุ์ที่มีเส้นใยสูงมาใช้ประโยชน์ในการทอผ้า เครื่องนุ่งห่ม ทำเชือก มาอย่างยาวนานจนถึงปัจจุบัน (กรมวิชาการเกษตร, 2564)

2.3.1 กัญชาพันธุ์ไทย

เป็นพันธุ์ดั้งเดิมของไทยนิยมเรียกกันว่า Thai หรือพันธุ์ Thai stick เป็นพันธุ์ท้องถิ่นในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นฐานพันธุ์กรรมของพันธุ์ไทยอื่น ๆ เช่น พันธุ์หางกระรอก ด้ายแดง ฝอยทอง หมิ่นสี ตะนาวศรี และพันธุ์อื่น ๆ (กรมวิชาการเกษตร, 2564)

2.3.2 พันธุ์ไทยที่ถูกพัฒนาในต่างประเทศ

พันธุ์กัญชาไทยที่มีชื่อเสียงเป็นที่รู้จักดีในทางการค้าและงานวิจัยของต่างประเทศคือ พันธุ์ “Thai” หรือ “Thai stick” ซึ่งเป็นพันธุ์ Sativaแท้ ถูกใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ สร้างเป็นลูกผสมกับพันธุ์ต่างประเทศมากมาย เช่น พันธุ์ Original Haze นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ไทยอื่น ๆ ที่ถูกนำไปปรับปรุงพันธุ์ผสมกับพันธุ์ต่างประเทศมากมาย เช่น พันธุ์ AK-47 และ Blueberry ที่มีกัญชาพันธุ์ไทยเป็นพันธุ์พ่อแม่ (Bailey, Pearson, Trigiano, & Gray, 2017) แสดงในตารางที่

ตารางที่ 2.1 แสดงชื่อกัญชาทางการค้าของต่างประเทศที่พัฒนามาจากกัญชาพันธุ์ไทย

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ชื่อพันธุ์พ่อแม่ (Parents)
1	AK-47	Colombian, Mexican, Thai, Afghani
2	Amnesia Haze	Afghani, Hawaiian, Thai, Cambodian, Laotian, Jamaican Haze varieties
3	Atomic Northern Lights	Nothern Lights x Thai Haze x Afghani
4	Blue Moonshine	Highland Thai x Afghani
5	Blue Velvet	Purple Thai x Afghani
6	Blueberry	(Purple Thai x Highland Thai) x Afghani
7	Brainstorm Haze	Stargazer x Thai landrace
8	Casey Jones	(Trainwreck x Thai) x East Coast Sour Diesel
9	Chocolate Thai	Thai
10	Chocolope	Chocolate Thai x Cannalope Haze
11	DJ Short Blueberry	(Purple Thai x Highland Thai) x Afghani
12	Flo	Purple Thai x Afghani
13	Harlequin	Colombian Gold x Thai S x Swiss S x Nepalese I
14	Harmony	Colombian Gold x Lemon OG Kush x Lemon Thai
15	Haze	Mexican x Colombian x Thai x South Indian Ss
16	Juicy Fruit	Afghani x Thai
17	Khola	(Brazil x Thai) x Unknown Dutch H
18	Laughing Buddha	Thai x Jamaican
19	Lemon Thai	Unknown
20	Lemonberry	Dabney Blue x Lemon Thai
21	Lost Coast OG	(Pakistan x Thai) x Chemdawg 4
22	Northern Lights	Afghani x Thai
23	Northern Lights #5	Afghani x Thai
24	Purple Haze	Haze x Purple Thai
25	Purple Thai	HOG (Mexican S) x Chocolate Thai

ตารางที่ 2.1 แสดงชื่อกัญชาทางการค้าของต่างประเทศที่พัฒนามาจากกัญชาพันธุ์ไทย (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ชื่อพันธุ์พ่อแม่ (Parents)
26	Skunk #1	Central American, South American, Afghani, and Thai landraces
27	Thai Lights	Thai x Northern Lights
28	Thai-Tanic	Thai x Skunk
29	Trainwreck	Mexican x Thai
30	Voodoo	Thai x Thai

ที่มา: Bailey et al., 2017

2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกัญชา

กัญชาจัดเป็นพืชล้มลุกที่มีดอกแบบไม่สมบูรณ์เพศ มีดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่คนละต้น (Dioecious) บางครั้งสามารถพบต้นที่มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในต้นเดียวกัน (Monoecious) (Chandra et al., 2017) หรือเรียกว่าต้นกะเทย เมล็ดของกัญชามีลักษณะเป็นรูปไข่ป้อม ผิวเรียบ มีลายสีน้ำตาล (Small, 2015)

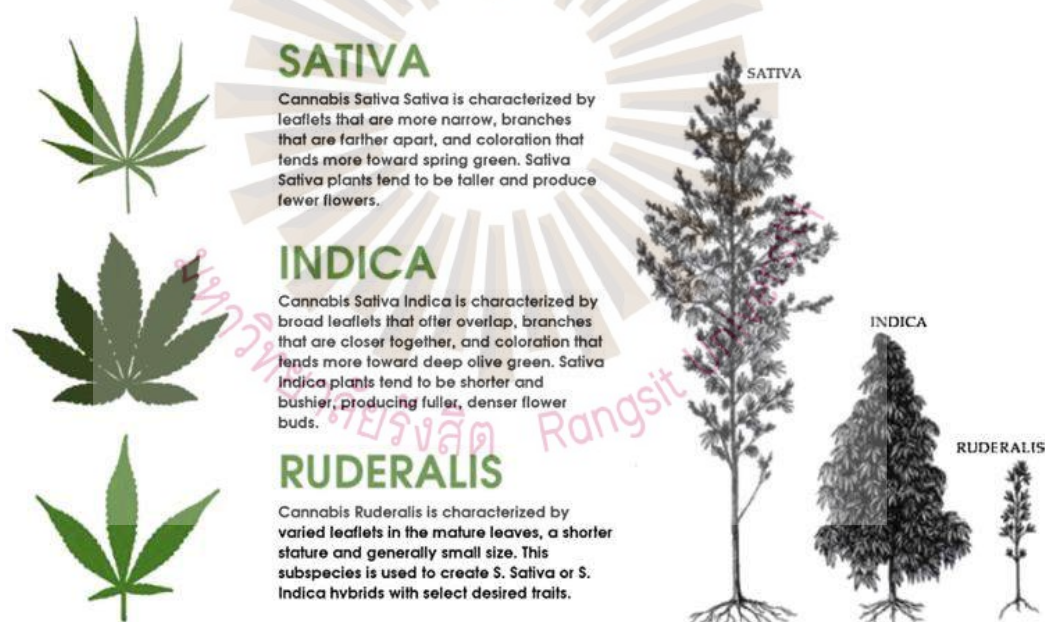
2.4.1 ลำต้นและใบของกัญชา

ลำต้นของกัญชามีลักษณะตั้งตรง ความสูงประมาณ 0.2-6 เมตร ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อมในการเพาะปลูก (Chandra et al., 2017) สามารถจำแนกลักษณะของแต่ละพันธุ์ได้ตามแสดงในตารางที่ 2.2 และรูปที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกัญชาแต่ละพันธุ์

ชนิดพันธุ์	ความสูง (Height)	ข้อใบ (Node)	ใบ (Leaf)	แผ่นใบ (Blade)	การออกดอก
<i>Sativa</i>	ต้นสูง (เฉลี่ย 1.5-4.5 เมตร)	ข้อใบห่าง	ใบแคบเรียว แหลม ไม่ใหญ่	มีแฉกมาก (7-11 แฉก/ใบ)	ขึ้นกับช่วง แสง
<i>Indica</i>	ต้นเตี้ย (เฉลี่ย 0.15-1.5 เมตร)	ข้อใบสั้น	ใบกว้างสั้น และใหญ่	มีแฉกน้อย (5-7 แฉก/ใบ)	ขึ้นกับช่วง แสง
<i>Ruderalis</i>	ต้นเตี้ย (เฉลี่ย 0.15-1.5 เมตร)	ข้อใบสั้น และถี่	ใบเล็กหนา	มีแฉกน้อย (4-6 แฉก/ใบ)	ไม่ขึ้นกับ ช่วงแสง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Chandra et al., 2017; Hazekamp, Fishedick, Llano-Diez, Lubbe, & Ruhaak, 2010



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกัญชาแต่ละพันธุ์

ที่มา: Messina, Rosati, Curini, & Marcotullio, 2015

2.4.2 ดอกกัญชา

มีลักษณะเป็นช่อ ดอกเพศผู้และเพศเมียแยกกันอยู่คนละต้นโดยมีลักษณะที่แตกต่างกัน ช่อดอกของกัญชาเพศเมียจะมีลักษณะเป็นก้านดอกเล็กๆ แยกออกมาจากก้านใหญ่ (Racemes) ส่วนช่อดอกเพศผู้จะมีลักษณะเป็นช่อคล้ายฝักหลาย ๆ ช่อ หรือเรียกว่า Panicle (Moliterni, Cattivelli, Ranalli, & Mandolino, 2004) ลักษณะของดอกกัญชาเพศเมียและเพศผู้แสดงในรูปที่ 2.4 และโครงสร้างของดอกตัวเมียแสดงในรูปที่ 2.5 และตัวผู้โครงสร้างของดอกกัญชาตัวผู้แสดงในรูปที่ 2.6 โดยพบการสะสมของสาร Cannabinoid อยู่ในช่อดอกกัญชาเพศเมียโดยสะสมอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า Trichome มีลักษณะเป็นขนอยู่บริเวณดอกของกัญชาเพศเมียแสดงดังรูปที่ 2.7 กัญชาเพศเมียที่ได้รับการปฏิสนธิจากเกสรตัวผู้จะมีการผลิตสาร Cannabinoid ลดลงเพื่อพัฒนาเมล็ด ในการหลีกเลี่ยงการปฏิสนธิทำได้โดยการแยกต้นเพศผู้ออกจากต้นเพศเมีย (Chandra et al., 2017)

A)

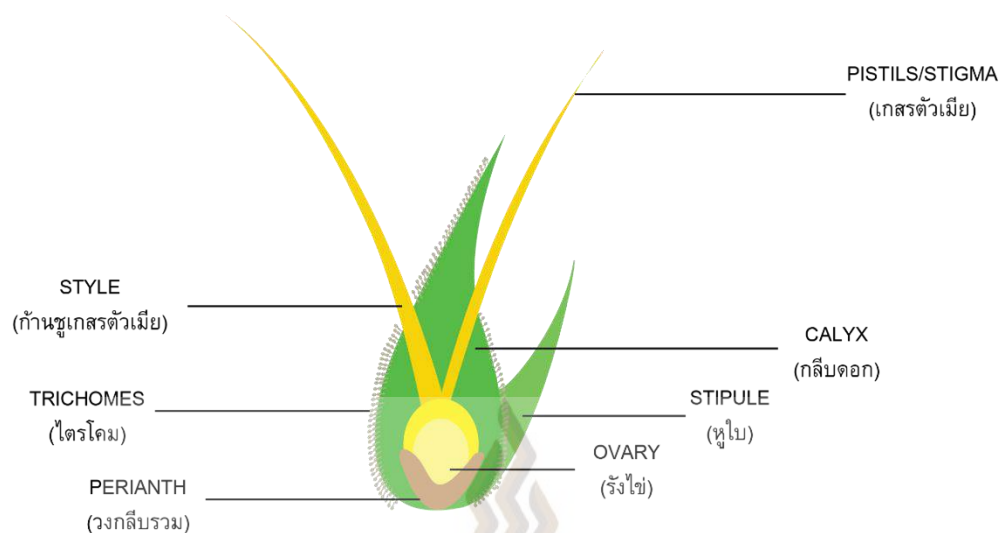


B)



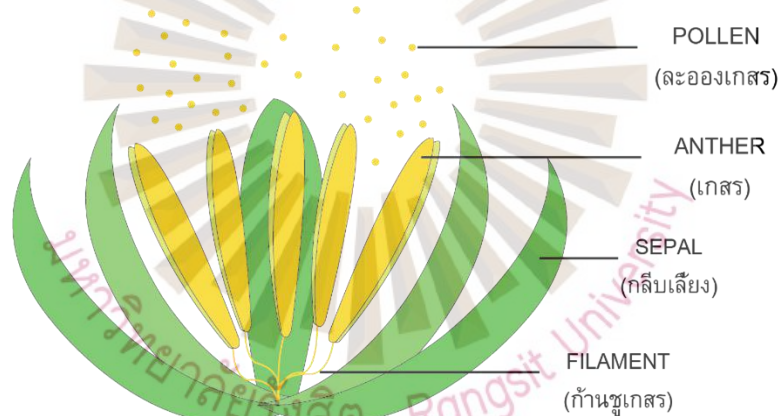
รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะดอกกัญชา A) ดอกกัญชาเพศเมีย B)
ดอกกัญชาเพศผู้

ที่มา: ดัดแปลงจาก Chandra et al., 2017; Schilling et al., 2020



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของดอกกัญชาเพศเมีย

ที่มา: ดัดแปลงจาก Schilling et al., 2020



รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของดอกกัญชาเพศผู้

ที่มา: ดัดแปลงจาก Schilling et al., 2020

A)



B)



รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะของ Trichome A คือ ภาพขยายกลุ่ม Trichome ที่มีอายุน้อยบนผิวของดอกกัญชา B คือ ภาพของ Trichome แบบใกล้
ที่มา: Chandra et al., 2017

2.5 สารสำคัญในกัญชา

กัญชาเป็นพืชที่มีสารประกอบมากมายหลายชนิด ปัจจุบันมีการศึกษาและระบุสารได้กว่า 538 ชนิด (Haze Kamp et al., 2010) สารประกอบที่สามารถระบุชนิดของสารและจัดหมวดหมู่ได้แสดงในตารางที่ 2.3 โดยสารสำคัญในกัญชาที่สำคัญและน่าสนใจในการศึกษาประกอบด้วย Cannabinoids Terpenoids และ Flavonoids

ตารางที่ 2.3 แสดงสารประกอบในกัญชาและจำนวนสารที่สามารถระบุและจัดหมวดหมู่ได้

Chemical class	Number of compounds
Terpenoids	>120
Cannabinoids	>70
Hydrocarbons	50
Sugars and related compounds	34
Nitrogenous compounds	27
Non-cannabinoid phenols	25
Flavonoids	23
Fatty acids	22
Simple acids	21
Amino acids	18
Simple ketones	13
Simple esters and lactones	13
Simple aldehydes	12
Proteins, glycoproteins, and enzymes	11
Steroids	11
Elements	9
Simple alcohols	7
Pigments	2
Vitamin (Vitamin K)	1

ที่มา: Hazekamp et al., 2010

2.5.1 สาร Cannabinoids

Cannabinoids หมายถึงสารที่สามารถจับกับ Cannabinoid receptor ในสัตว์หรือมนุษย์ได้ซึ่งมีโมเลกุลแตกต่างกันตามชนิดโดย มี 3 ชนิด ได้แก่ Endocannabinoid, Synthetic cannabinoid และ Phytocannabinoid โดยทั้งสามชนิดจะมีโมเลกุลที่แตกต่างกัน (Heteromorphic) นอกจากนี้ยังสามารถพบสาร Cannabinoid ได้ในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ต้น liverwort และ Helichrysum (Hazekamp et al., 2010) โดยสาร Cannabinoid ที่พบในกัญชา จัดเป็น Phytocannabinoid ถูกสะสมไว้ที่ Trichome สาร Cannabinoids มีหลายชนิดแสดงใน ตารางที่ 2.4 และมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาหลายประการ สารสำคัญที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ต่อ

ระบบประสาททำให้เกิดอาการมึนเมา ช่วยลดอาการปวด สารสำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือ Cannabidiol (CBD) เป็นสารที่นิยมนำมาใช้ทางการแพทย์เนื่องจากเป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทและมีคุณสมบัติที่ช่วยเรื่องโรคลมชัก ด้านการอักเสบ และช่วยลดอาการปวดได้ (Ramirez et al., 2019) นอกจากนี้สารที่มีความสำคัญได้แก่ Cannabigerol (CBG) ที่ถูกเปลี่ยนมาจาก CBGA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ THC และ CBD

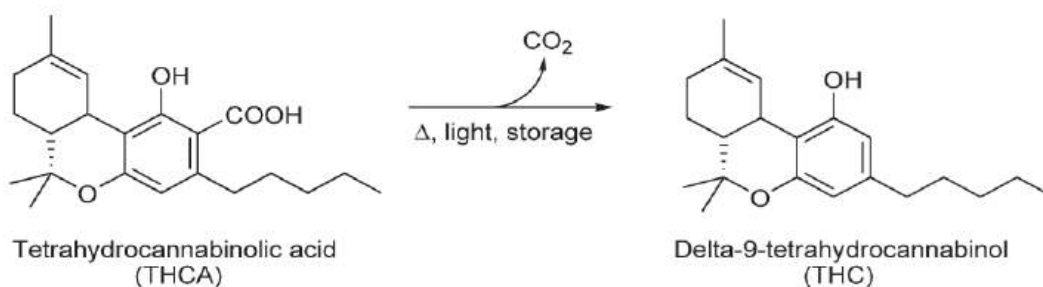
ตารางที่ 2.4 แสดงชนิดและจำนวนของสาร Cannabinoids

Chemical class	Number of compounds
Delta-9 Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) type	18
Delta-8 Tetrahydrocannabinol (Δ 8-THC type)	2
Cannabigerol (CBG type)	17
Cannabichromene (CBC type)	8
Cannabidiol (CBD type)	8
Cannabinodiol (CBND type)	2
Cannabielsoin (CBE type)	5
Cannabicyclol (CBL type)	3
Cannabinol (CBN type)	10
Cannabitriol (CBT type)	9
Misc type	22
Total cannabinoids	104
Total noncannabinoids	441
Total	545

ที่มา: ElSohly & Gul, 2014

2.5.1.1 สาร Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC)

Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC/THC) เป็นสารที่เปลี่ยนมาจาก Tetrahydrocannabinol Acid (THCA) ที่ไม่ได้มีฤทธิ์ต่อระบบประสาท เมื่อเกิดกระบวนการ Decarboxylation โดยความร้อน แสง และการเก็บรักษา แล้วเปลี่ยนไปเป็น THC จึงจะที่เป็นสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท แสดงดังรูปที่ 2.8 สร้างความรู้สึกสนุกสนาน ตื่นเต้น และผ่อนคลาย นอกจากนี้ยังพบว่ามีคุณสมบัติทำให้เกิดการบรรเทาอาการเจ็บปวด ด้านการอักเสบ (Anti-Inflammatory) เพิ่มความอยากอาหาร และด้านการอาเจียนอีกด้วย (Costa, 2007) ปัจจุบันได้มีการอนุญาตให้ใช้กัญชารวมถึงสารสกัด THC เพื่อใช้ในเชิงสันติภาพและการทาง



รูปที่ 2.8 แสดงกระบวนการเปลี่ยน THCA ไปเป็น THC โดยการเกิด Decarboxylation

ด้วยความร้อน แสง และการเก็บรักษา

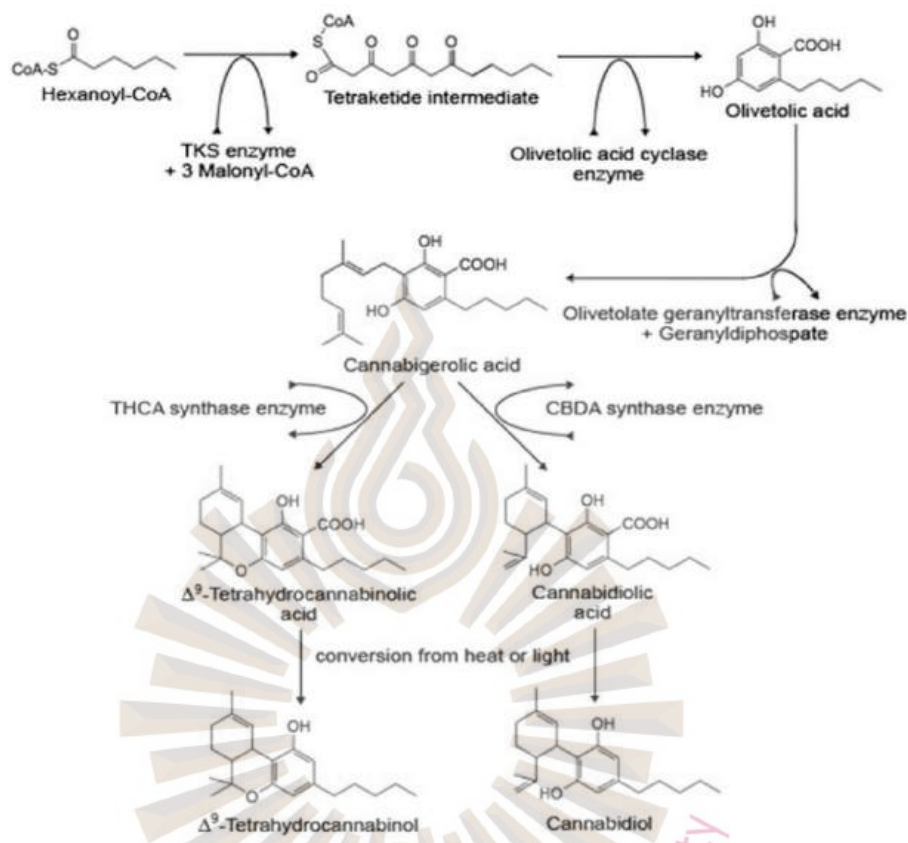
ที่มา: Hazekamp et al., 2010

Cannabidiol (CBD) เป็นสารที่เปลี่ยนมาจาก Cannabidiol Acid (CBDA) ที่ผ่านกระบวนการ Decarboxylation ทั้ง CBDA และ CBD เป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทโดย CBD เป็น Isomer ของ THC ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติด้านการอักเสบ ด้านอาการชัก ลดความกังวล บรรเทาอาการปวด การป้องกันระบบประสาท ด้านมะเร็ง และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้พบว่า CBD มีผลทำให้กิจกรรมการออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทของ THC ลดลง ซึ่งเป็นการบรรเทาผลที่เกิดขึ้นจาก THC (Russo & Marcu, 2017) และยังช่วยในเรื่องของการนอนหลับอีกด้วย คุณสมบัติดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้ทางการแพทย์และมีการวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อย่างต่อเนื่อง

2.5.1.3 สาร Cannabigerol (CBG)

Cannabigerol (CBG) เป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทที่พบได้น้อยมากในกัญชาเนื่องจาก Cannabigerol (CBG) เปลี่ยนไปเป็นสาร THC, CBD และ CBC อย่างรวดเร็ว ซึ่ง CBGA ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาโดยการเกิด Alkylation ของ Olivetolic (OLA) โดยเอนไซม์ Olivatolate geranyl transferase ร่วมกับ Geranyl diphosphate (Sirikantaramas & Taura, 2017) ในกระบวนการสังเคราะห์หลังจากที่เกิด CBGA ขึ้นนั้น CBGA ได้ถูกเปลี่ยนไปเป็น THC และ CBD โดยเอนไซม์ THCA synthase และ CBDA synthase โดยกระบวนการการเปลี่ยนแปลงของสารด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร THC และ CBD แสดงในรูป 2.9 การศึกษาสาร CBG ยังมีน้อยมากเมื่อเทียบกับ THC และ CBD งานวิจัยใหม่ต่าง ๆ ได้เพิ่มความรู้อีกเกี่ยวกับสาร CBG รวมทั้งประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยาและทางการแพทย์มากขึ้น เช่น ประโยชน์ในการต้านการอักเสบ แก้อาการปวด และเป็นสารต้านมะเร็ง (Deiana, 2017) และต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก Mycobacteria และฟังไจได้มากกว่า THC และ CBD (Russo & Marcu, 2017) และยังสามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin ได้อีกด้วย (Appendino et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีการทดลองต่าง ๆ ในหนู แต่ยังไม่มีการทดลอง

ในมนุษย์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสาร CBG เป็นสารที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์เป็นอย่างมาก



รูปที่ 2.9 แสดงกระบวนการการเปลี่ยนแปลงของสารด้วยเอนไซม์
ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร THC และ CBD
ที่มา: Grassi & McPartland, 2017

2.5.2 สาร Terpenoids

สาร Terpenoids เป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย (Essential Oil) เป็นสารที่มีกลิ่นหอม พบในพืชมากกว่า 120 ชนิด โดย Terpenoids ชนิดที่มีการศึกษาและทราบถึงคุณสมบัติของสารแล้วแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 แสดงชนิดและคุณสมบัติของสาร Terpenoids ที่พบในกัญชา

ชนิดของ Terpenoids	คุณสมบัติ
Beta-Myrcene	แก้ปวด ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย
Beta-Caryophyllene	ต้านการอักเสบ ปกป้องและถนอมผิวกระเพาะอาหาร
Delta-Limonene	กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ยากล่อมประสาท ต้านการกลายพันธุ์
Linalool	กล่อมประสาท คลายความวิตกกังวล
Pulegone	Acetylcholinesterase (AChE) inhibitor กล่อมประสาท
1,8-Cineol	AChE inhibitor ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อไวรัส
Alpha-Pinene	ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ขยายหลอดลม
Alpha-Terpeneol	ต้านเชื้อแบคทีเรีย AChE inhibitor เป็นสาร antioxidant
Terpeneol-4-ol	AChE inhibitor ต้านเชื้อแบคทีเรีย
p-Cymene	Anticandidal ต้านเชื้อแบคทีเรีย AChE inhibitor

ที่มา: Hazekamp et al., 2010

2.5.3 สาร Flavonoids

สาร Flavonoids มีความสำคัญกับสาร THC และสาร Cannabinoids อื่น ๆ ซึ่งอาจจะช่วยทั้งในด้านของการเสริมฤทธิ์กันหรือลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังมีการทดสอบคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสาร Flavonoids บางชนิด เช่น Cannflavins A และ B พบว่าสามารถยับยั้ง Prostaglandin E2 ในเซลล์ Rheumatoid synovial ของมนุษย์ มากกว่านั้นพบว่า Cannflavins A มีประสิทธิภาพมากกว่ายา Aspirin ถึง 30 เท่า (Hazekamp et al., 2010) จึงจัดเป็นสารที่นอกเหนือจากสาร Cannabinoids ที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก

2.6 ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ THCAS และ CBDAS

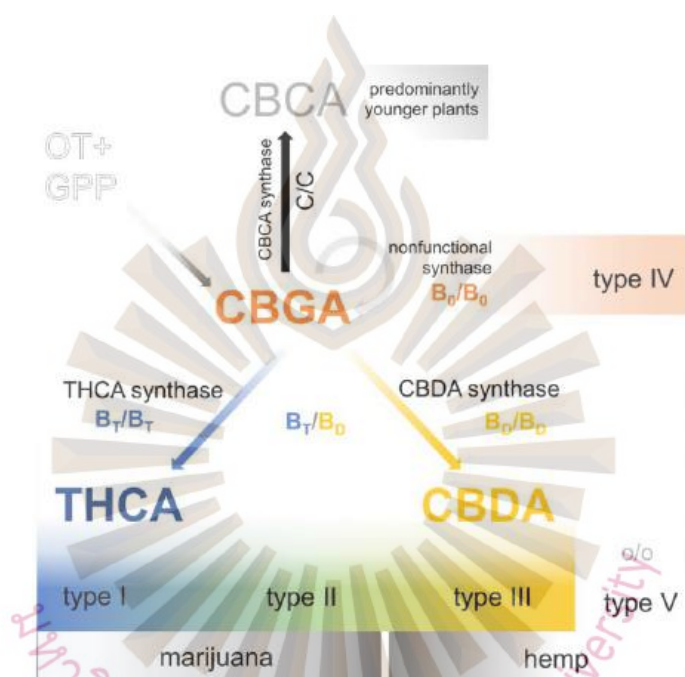
THCA และ CBDA ที่ถูกสังเคราะห์มาจาก CBGA โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ THCA synthase (THCAS) และ CBDA synthase (CBDAS) (Sirikantaramas & Taura, 2017) โดยมียีน Tetrahydrocannabinolic acid synthase (THCAS) เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ THCAS โดยยีนดังกล่าวมีความยาวทั้งหมด 1,638 bp (Base Pair) นับตั้งแต่บริเวณปลาย 5' ที่มี Start codon (นิวคลีโอไทด์ ATG) จนถึงบริเวณปลาย 3' ที่มี Stop codon (นิวคลีโอไทด์ TAA) และมีความคล้ายคลึงกับยีน Cannabidiolic acid synthase (CBDAS) ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ CBDAS มากถึง 87.9% (Kojoma et al., 2006) โดยยีน CBDAS มี

ความยาวทั้งหมด 1,635 bp สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 544 Residues ในขณะที่ยีน *THCAS* สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 545 Residues (Onofri, de Meijer, & Mandolino, 2015) การแสดงออกของยีนที่ควบคุมเอนไซม์ *THCAS* และ *CBDAS* นั้นเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้ในการศึกษาปริมาณ Cannabinoids ได้ (Lavery et al., 2019) จากการศึกษา *CBGA*, *THCA* และ *CBDA* ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างกัญชาพันธุ์ที่มีสาร *THCA* สูง และกัญชาที่มีสาร *CBGA* สูง และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ที่มีสาร *CBGA* สูง จากการวิเคราะห์ทางเคมีและการทำ Genotyping analysis ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า พันธุ์ที่มีสาร *CBGA* สูง นั้นได้รับการถ่ายทอดยีนด้อยหนึ่งยีนซึ่งถูกควบคุมโดยยีน *THCAS* ที่ไม่ทำงาน (Non-function) ประกอบด้วย Single nucleotide polymorphism (SNP) ที่ทำให้ไม่สามารถเกิดกระบวนการเปลี่ยน *CBGA* ไปเป็น *THCA* จึงทำให้เกิดการสะสม *CBGA* ในพันธุ์ดังกล่าวขึ้น SNP ดังกล่าวสามารถใช้เป็น Molecular marker สำหรับการคัดเลือกพันธุ์ *CBGA* เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กัญชาได้ (Garfinkel et al., 2021)

2.6.1 Genetic model ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร THC และ CBD ในกัญชา

ในอดีต de Meijer et al. (2003) ได้เสนอ Genetic model ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร Cannabinoids ในกัญชา (รูปที่ 2.10) ว่าเกี่ยวข้องกับ Locus เดียว (Single Locus) ซึ่งคือ Locus B ที่มี Allele จำนวน 2 Allele ได้แก่ BT และ BD โดยทั้งสอง Allele นี้แสดงออกแบบข่มร่วมกัน (Codominant) โดย BT Allele นั้นควบคุมการแสดงออกของยีน *THCAS* ส่วน BD Allele ควบคุมการแสดงออกของยีน *CBDAS* หากกัญชามีลักษณะทางพันธุกรรม (Genotype) ที่เป็นแบบ Homozygous ได้แก่ BT/BT และ BD/BD จะทำให้เกิด Type I (พันธุ์ที่มีสาร *THCA* สูง) และ Type III (พันธุ์ที่มีสาร *CBDA* สูง) ตามลำดับ ส่วนลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นแบบ Heterozygous ได้แก่ BT/BD ทำให้เกิด Type II (พันธุ์ที่มีสาร *THCA* และ *CBDA* ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันหรือเท่ากัน) มากไปกว่านั้นยังมีการอธิบายถึงการเกิด Type IV (พันธุ์ที่มีสาร *CBGA* สูง) ว่าเกิดจากการควบคุมโดย BO Allele ที่บ่งบอกถึงการแสดงออกแบบ Non-functional ของยีน *THCA* และ *CBDA* ทำให้เกิดการสะสม *CBGA* ขึ้นเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ *THCA* และ *CBDA* ได้ (de Meijer & Hammond, 2005) และได้อธิบายถึง Type V (พันธุ์ที่มีสาร Cannabinoid ต่ำ หรือไม่มีเลย) ว่าเกิดจาก Locus O ซึ่งเป็น Locus ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารตั้งต้นของสาร Cannabinoids เมื่อเกิด Homologous recessive ของ O Allele (O/O) (de Meijer, Hammond, & Sutton, 2009b) ทำให้เกิดการ Knock out การผลิตสารตั้งต้นของสาร Cannabinoids มีผลทำให้กัญชามีสาร Cannabinoids ที่ต่ำ นอกจากนี้ยังอธิบายถึงการสังเคราะห์สาร Cannabichromene Acid (CBCA) นั้นเกิดจาก Locus C ที่ควบคุมการ

แสดงออกของยีน CBCA synthase (CBCAS) (de Meijer, Hammond, & Micheler, 2009a) อย่างไรก็ตาม Genetic model ดังกล่าวยังขาดการศึกษาเกี่ยวกับ Genetic effects ที่มีความซับซ้อนมากกว่าที่ยังไม่ได้รับการทดสอบ (Campbell, Dufresne, & Sabatinos, 2019) ต่อมา Weiblen et al. (2015) ได้ทำการศึกษายีนและการแสดงออกของยีน *THCAS* และ *CBDAS* และการทำ Linkage mapping ทำให้พบหลักฐานใหม่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีนทั้งสองที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร THCA และ CBDA ซึ่งถูกควบคุมยีน *THCAS* และ *CBDAS* ที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้กันแต่อยู่คนละ Locus กัน (Multiple linked loci)

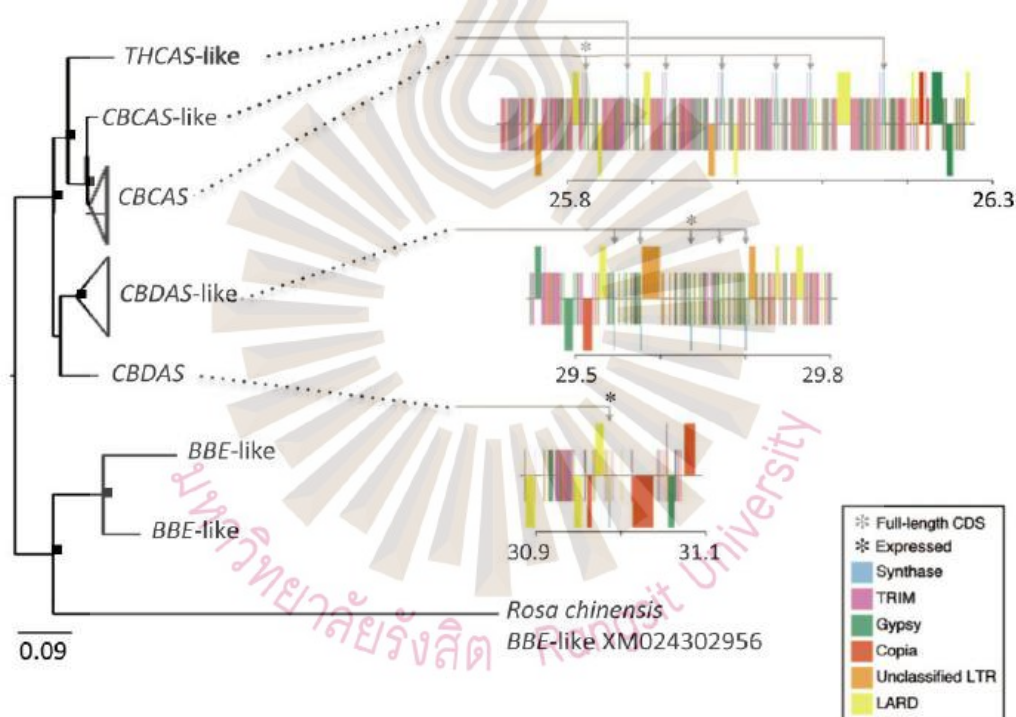


รูปที่ 2.10 แสดงแผนภาพกระบวนการผลิตสาร THCA CBDA CBCA และ CBGA ที่ควบคุมโดย Single locus ได้แก่ locus B C O เป็นผลทำให้เกิดกัญชา

Chemotype ต่าง ๆ

ที่มา: Schilling et al., 2020

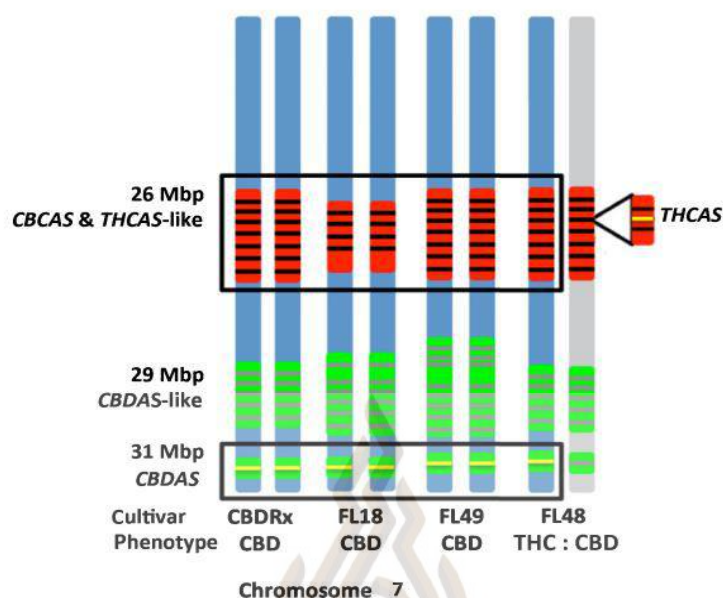
ปัจจุบัน Grassa et al. (2021) ได้ทำการศึกษา Genome assembly และทำ Genetic mapping จึงสามารถระบุตำแหน่งของยีน *THCAS* และ *CBDAS* ที่อยู่บน Chromosome 7 ได้ จากการศึกษาทางพันธุกรรมของกัญชาพันธุ์ที่มีสาร CBD สูง (Type I) ทำให้ทราบว่ากัญชากลุ่ม Type I นั้นมีการแสดงออกของยีน *CBDAS* แต่ไม่มีการแสดงออกของยีน *THCAS* จะมีเพียง *THCAS-like* ที่จัดเป็น Pseudogene (รูปที่ 2.11) ในขณะที่กัญชากลุ่ม Type III นั้นพบการแสดงออกของทั้งยีน *CBDAS* และ *THCAS* (รูปที่ 2.12) งานวิจัยดังกล่าวจึงสามารถอธิบายการผลิตสาร *THCAS* และ *CBDAS* ว่าเกิดจากการแสดงออกของยีนหลายยีนที่อยู่บน Locus กัน อีกทั้งการผลิต Cannabinoids ทั้งหมดอาจเกี่ยวข้องกับยีนที่อยู่บน Chromosome อื่นของอีกด้วย



รูปที่ 2.11 แสดงตำแหน่งของยีน Cannabinoid synthase ที่ได้จากการศึกษากัญชากลุ่ม Type III โดยพบการแสดงออกของยีน *CBDAS* *CBDAS-like* และ *THCAS-like*

ที่ตำแหน่ง 31, 26 และ 29 Mb

ที่มา: ดัดแปลงจาก Grassa et al., 2021



รูปที่ 2.12 แสดงตำแหน่งของยีน Cannabinoid synthase บน Chromosome 7 ที่ได้จากการศึกษาพันธุศาสตร์กลุ่ม Type II และ Type III โดย Type III พบการแสดงออกของยีน CBDAS, CBDAS-like และ THCAS-like ที่บริเวณ 31 29 26 Mbp แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน THCAS ในขณะที่กลุ่ม Type II พบการแสดงออกของทั้งยีน CBDAS และ THCAS

ที่มา: Grassa et al., 2021

2.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker/ DNA Marker) คือลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน DNA ของสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดซึ่งสามารถส่งต่อทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกได้โดยเครื่องหมายโมเลกุลจะอยู่ใกล้กับยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา (Collard, Jahufer, Brouwer, & Pang, 2005) เครื่องหมายโมเลกุลสามารถใช้เพื่อบอกความแตกต่างภายในลักษณะทางพันธุกรรม ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันได้หากมีความแตกต่างกันหรือมีความหลากหลายจะเรียกว่า Polymorphisms ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากการกลาย (Mutation) หลายรูปแบบภายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิต (Mandal, Verma, Sasmal, & Katara, 2018) เทคนิคการใช้ DNA marker มีจุดเริ่มต้นมาจาก Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ที่สามารถบอกความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยการใช้ Restriction enzyme ตัดชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการศึกษาและติด Probe ในส่วนที่

ต้องการวิเคราะห์ เทคนิคนี้แพร่หลายไปในหลายสายงานรวมถึงการศึกษาในพืชแต่มีข้อจำกัดในการศึกษาความหลากหลาย (Polymorphism) หลายลักษณะพร้อมกัน อีกทั้งยังมีวิธีการที่ยุ่งยากและเปลืองเวลาดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ที่เรียกว่า Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ที่พัฒนาจากการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยข้อดีของ RAPD คือสามารถใช้เทคนิคนี้ศึกษา DNA ได้โดยไม่ต้องรู้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์มาก่อนได้และสามารถใช้เครื่องมือพื้นฐาน ส่วนข้อเสียคือ RAPD เป็นปฏิกิริยาที่ไม่ทนทานเนื่องจากใช้ Primer จำนวนมากและเป็นปฏิกิริยาที่ไม่สามารถใช้ซ้ำได้ จึงหมดความนิยมไปในภายหลัง จากนั้นได้มีการพัฒนาเทคนิคที่ชื่อว่า Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) marker ที่ต่อยอดจาก Simple sequence repeat (SSR) ที่มีความก้าวหน้าครั้งสำคัญ มีหลักคือใช้ Primer ที่ออกแบบจากบริเวณ Flanking region ของ Microsatellite ที่ต้องการเพิ่มจำนวนเพื่อการศึกษา บริเวณดังกล่าว Microsatellite ที่เพิ่มจำนวนได้นั้นบ่งบอกถึงความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตนั้น โดย ISSR มีข้อดีเหมือนกับ RAPD คือไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับเบสที่ต้องการศึกษาก่อนก็สามารถใช้เทคนิคนี้ได้แต่เทคนิคทั้งสองยังคงมีข้อจำกัดในการศึกษา จากการพัฒนาเทคนิค SSR นั้นเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างมากเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ปฏิกิริยามีความทนทานและมีประสิทธิภาพสูงจึงกลายเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในงาน Biological system รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับพืชความง่ายในการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาทำให้เกิดการค้นพบความหลากหลายอีกรูปแบบหนึ่งที่สำคัญคือ Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

2.7.1 พื้นฐานเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA (DNA segment) ที่มีความจำเพาะจากตัวอย่างเริ่มต้นที่มีปริมาณน้อยให้เพิ่มมากขึ้นได้ เช่นการเพิ่มจำนวนจาก DNA template หรือ Target sequence เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง เทคนิคนี้ได้เปลี่ยนวิธีการเรียนรู้ทางด้าน Molecular science ซึ่งส่งผลในการศึกษาทางชีววิทยาอย่างมากโดยทฤษฎีแรกเริ่มเกิดจาก Keppe และเพื่อนร่วมงานในปี 1971 จนกระทั่ง 14 ปีให้หลังได้มีการอธิบายขั้นตอนการทำ PCR จากการทดลองและการนำมาประยุกต์ใช้โดย Kary Mullis จาก Cetus Corporation ในปี 1985 โดยการทำเทคนิคดังกล่าวได้ใช้ DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อนสูงที่ได้จาก *Thermus aquaticus* จึงถูกเรียกว่า Taq DNA polymerase (Lorenz, 2012) เทคนิคนี้ทำให้เราสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ได้กว่า 10 พันล้านก๊อปปี้จาก DNA template ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Sequence) ที่มีจำนวนน้อยได้ ด้วยเหตุนี้ทำให้เทคนิคนี้เป็นเทคนิคสำหรับการทำให้บริสุทธิ์ (Purification) และการโคลน (Cloning) หลักการในการทำ PCR คือการทำให้เกิด DNA replication ขึ้นภายในหลอดทดลอง

ซึ่งได้ก็อปปีจำนวนมาจากชิ้นส่วน DNA ที่สกัดออกมาเป็น Template ในการเกิดปฏิกิริยา โดย DNA ที่นำมาเป็น Template สามารถเป็น Genomic DNA หรือ Complementary DNA ที่ได้จากการนำ Messenger RNA (Poly-A RNA) มาทำ RT-PCR หรือแม้แต่ Mitochondrial DNA ก็สามารถใช้ได้ เทคนิคนี้เป็นการจำลองการเกิด Replication ของ Double-strand DNA template ในสิ่งมีชีวิต แบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลักได้แก่ Denaturation phase, Hybridization phase ที่มีการใช้ primer และสุดท้ายคือ Elongation phase ปฏิกิริยา PCR จะสมบูรณ์ได้เมื่อมี Reaction mixer ที่ประกอบด้วย DNA extract (Template DNA), Taq polymerase, Primer และ Deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) ใน Buffer solution ที่มากพอ หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR ตั้งค่าอุณหภูมิในปฏิกิริยาแต่ละรอบ (Cycle) จนสุดท้ายได้ผลผลิตของ PCR (PCR Product) (Kadri, 2019) ในการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence) จำเป็นต้องมี Oligonucleotide อย่างน้อย 1 คู่ เรียก Oligonucleotide นี้ว่า Primer ซึ่งใช้ในการ Replication ได้มาจากการสังเคราะห์ โดย Primer จะต้องเข้าคู่กันกับทั้งสองด้านของ sequence โดยตัวหนึ่งออกแบบมาให้เข้าคู่กับตำแหน่งปลาย 5'-3' ของสาย DNA (Forward primer) อีกตัวหนึ่งเข้าคู่กับปลาย 3'-5' (Reverse Primer) เมื่อเกิดการเข้าคู่กัน DNA template ในขั้นตอน Annealing จะทำให้เกิดการ Replication โดย Primer ส่วนใหญ่จะมาขนาดประมาณ 10-30 bp เพื่อทำให้มันมีความจำเพาะกับ DNA ที่ศึกษา และมี DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการ Replication ขึ้น ปัจจุบันนิยมใช้ DNA polymerase ที่ได้จาก *Thermus aquaticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนต่ออุณหภูมิสูง (Extremophilic Bacterium) ซึ่งอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำพุร้อน สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากกว่า 100°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เพียงพอต่อการเกิด Denaturation ของโปรตีนส่วนใหญ่ และ Taq polymerase นี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ 72°C (Kadri, 2019) ขั้นตอน PCR ขั้นแรกเรียกว่า Denaturation เป็นขั้นตอนในการแยกสาย DNA สองสายออกจากกันโดยใช้การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ โดยใช้อุณหภูมิ 94°C อุณหภูมิดังกล่าว DNA template จะเกิดการเสียสภาพ (Denatured) โดยพันธะไฮโดรเจนไม่สามารถรักษาสภาพได้ที่อุณหภูมิเกินกว่า 80°C และ Double-strand DNA แยกจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว (Single-stranded DNA) ต่อมาจะเข้าสู่กระบวนการ Hybridization หรือ Annealing step ขั้นตอนนี้จะลดอุณหภูมิลงมาให้เหลือประมาณ 40 ถึง 70°C การลดอุณหภูมิจะทำให้พันธะไฮโดรเจนสามารถจับกันใหม่ (Reform) จึงเกิดการ Hybridize ขึ้น โดย Primer จะเข้าไปจับกับ DNA template ที่เป็นสายเดี่ยว จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน Elongation ขั้นตอนนี้จะเพิ่มอุณหภูมิให้อยู่ที่ 72°C โดย Taq polymerase จะเข้าจับกับ DNA สายเดี่ยวบริเวณที่ Primer เข้าจับและเกิดการสร้าง DNA สายใหม่โดยการนำเอา dNTPs มาใช้ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ แต่ละ Cycle จะเกิด DNA สายใหม่ขึ้นแบบทวีคูณ (Double) (Kadri, 2019)

ปัจจุบันได้มีการนำพื้นฐาน PCR มาใช้เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตโดยการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ วิธีการนั้นเรียกว่า มีข้อดีคือใช้จำนวน DNA ที่น้อย ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี มีความแม่นยำที่สูง เช่น Amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่ผสมระหว่าง RFLP และ PCR โดยใช้ Restriction enzyme ตัดชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการศึกษาและใช้ Ligating primer ที่สามารถจับกับลำดับ และเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนี้ยังมีเทคนิค ISSR, SNP, Diversity arrays technology (Dart) และอีกหลายเทคนิคที่ถือเป็น PCR based marker (Amom & Nongdam, 2017)

2.7.2 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) คือตำแหน่งหนึ่งของเบสใน Genomic DNA ที่มีความแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว SNP ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเนื่องจากสามารถพบได้มากในจีโนมและมีประโยชน์อย่างมากในการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม (Genetic map) ที่มีความเข้มข้นสูง (Jehan & Lakhnypaul, 2006) SNP บางตำแหน่งบน DNA sequence เป็นตัวแปรสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Gene function หรือ Gene regulation ซึ่งส่งผลโดยตรงกับการเกิดโรคต่าง ๆ SNP จึงมีประโยชน์อย่างมากในการใช้หาพื้นที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการหา Functional SNP ที่สำคัญได้ SNP มีหลายรูปแบบที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง Function การควบคุมและการแสดงออกของโปรตีน ที่ชัดเจนที่สุดคือรูปแบบ

Non-synonymous SNP ที่มีความแตกต่างกันบน Allele และทำให้เกิดการสร้างกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน บางแบบรูปเป็น Polymorphism ที่ Splice site ทำให้เกิดโปรตีนที่แตกต่างกันภายใน Exon นอกจากนี้ก็รูปแบบหนึ่งคือเป็น SNP ภายใน Promoter region ซึ่งส่งผลต่อการควบคุมและการแสดงออกของยีน ดังนั้น SNP จึงมีความสำคัญมากไม่ว่าจะเป็น SNP ที่อยู่บน Exon, Intron และ Noncoding region หรือแม้กระทั่ง SNP เพียงตำแหน่งเดียวก็สามารถทำให้เกิดโรคหรือลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันได้ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Brooks, 2003)

2.7.3 การศึกษาความหลากหลายของกัญชาโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SNP

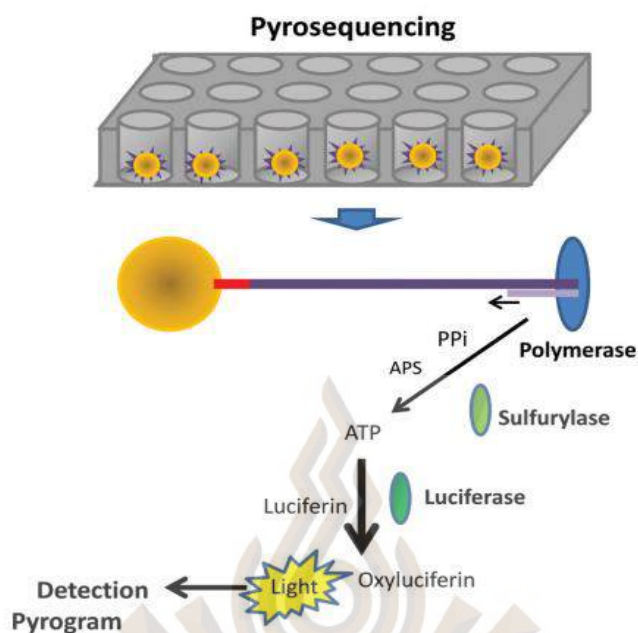
นอกจากประโยชน์ในด้านการศึกษาการเกิดโรคในมนุษย์แล้วยังมีการใช้ตำแหน่ง SNP ในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน THCAS, CBDAS และ CBGAS ทำให้เข้าใจ

กระบวนการการเกิดกัญชาพันธุ์ที่มี CBGA ขึ้น โดยพันธุ์ดังกล่าวเกิดขึ้นจากการมียีน *THCAS* ที่ไม่สามารถทำงานได้จึงไม่เกิดการเปลี่ยน CBGA ไปเป็น THCA ทำให้เกิดการสะสมของ CBGA ขึ้น จากการค้นพบดังกล่าวทำให้สามารถนำ SNP ดังกล่าวไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ในการปรับปรุงพันธุ์กัญชาได้ (Garfinkel et al., 2021)

2.8 การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยเทคนิค Pyrosequencing

Pyrosequencing เป็นเทคนิคการทำ DNA sequencing แบบใหม่ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษา SNPs และ Insertion/Deletion ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) เป้าหมายได้ เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบได้แบบ Real time โดยการใช้ระบบ Enzyme cascade ประกอบด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ DNA polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase และ Apyrase จึงต้องมี Substrate ที่มีความจำเพาะเจาะจง ในที่นี้คือนิวคลีโอไทด์ (dNTP) ที่ถูกเติมเข้าไปในปฏิกิริยา เพื่อทำให้เกิดแสงขึ้นเมื่อเบสที่เป็น Complementary nucleotide กับ DNA template เกิดการเข้าคู่กันและ DNA polymerase ทำงานจะมีการปล่อย Pyrophosphate (PPi) และถูกเปลี่ยนไปเป็น ATP โดย ATP sulfurylase ซึ่ง ATP จะถูก Luciferase นำไปใช้ และเกิดการเรืองแสงขึ้นตามสัดส่วนของเบส ส่วนนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาจะโดนย่อยสลายโดย apyrase ทำให้เกิดการเติมนิวคลีโอไทด์แบบเติมซ้ำดังที่แสดงในรูปที่ 2.12 อีกทั้งยังป้องกันการสะสมแล้วเกิด Inhibition ขึ้น ผลของ Pyrosequencing ที่ได้จะอยู่ในรูปของพีคที่สามารถอ่านผลได้แบบ Real time (Ronaghi, 2003)

โดยก่อนที่จะเข้าเครื่อง Pyrosequencing จะต้องมีการเตรียม PCR product ที่มี Primer ที่ติด Biotin ในปฏิกิริยา และ Streptavidin-coated magnetic beads ที่สามารถจับกับ Biotin ได้เพื่อให้ได้ Template ที่ต้องการในการทำ Pyrosequencing และสุดท้ายต้องมี Sequencing primer โดยทั้งหมดจะต้องผ่านการออกแบบ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงต้องมีข้อมูลของ Target ที่ต้องการมาพอสมควรจึงจะสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ (Ronaghi, 2003)



รูปที่ 2.13 แสดงหลักการทำงานของเทคนิค pyrosequencing

ที่มา: ดัดแปลงจาก Siqueira, Fouad, & Rôças, 2012

2.9 การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยเทคนิค Tetra primer ARMS PCR

เทคนิค Tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain (ARMS-PCR) เป็นเทคนิคในการทำ Genotyping อย่างง่ายและมีราคาถูก เทคนิคนี้จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด ประกอบด้วยชุด Outer primer และ Inner primer ที่รวมไพรเมอร์ทั้งหมด 4 สาย ในหนึ่งปฏิกิริยา PCR โดยเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ได้โดยการทำ PCR ตามปกติและตรวจสอบโดยใช้ Agarose gel electrophoresis (Medrano & de Oliveira, 2014)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 พันธุ์กัญชาที่ใช้ในการศึกษา

ในงานวิจัยนี้ใช้พันธุ์กัญชา 2 กลุ่ม คือกลุ่มพันธุ์ที่มีสาร THC สูง มีสาร CBD ต่ำ (Type I) จำนวน 9 พันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์ไทยจำนวน 8 พันธุ์ และพันธุ์ต่างประเทศที่เป็นพันธุ์ทางการค้า 1 พันธุ์ และกลุ่มพันธุ์ที่มีสาร CBD สูง มีสาร THC ต่ำ (Type III) ที่เป็นพันธุ์ทางการค้าจากต่างประเทศทางการค้าจำนวน 4 พันธุ์ (ตารางที่ 3.1) โดยพันธุ์ทางการค้าทั้งหมดจะมีเอกสาร Certificate of analysis (COA) รับรองปริมาณสาร THC และ CBD ที่พบในดอกเพศเมียของกัญชาพันธุ์นั้น ๆ นอกจากนี้ยังมีกลุ่มพันธุ์ลูกผสมระหว่างกัญชา Type I และ Type III โดยพันธุ์แม่คือพันธุ์ Dinamed (Type III) ผสมกับพันธุ์พ่อคือ Chang Phuak (Type I) พันธุ์ลูกที่ได้ให้ชื่อ DCP22 จำนวน 10 ต้น



ตารางที่ 3.1 แสดงพันธุ์กัญชา Chemotype และแหล่งที่มาของกัญชาที่ใช้ในงานวิจัยนี้

Name	Chemotype	Source	Line/Variety
Wild Thai (WT)	I	Thai domestic	Sativa
Lopburi-1 (LOP-1)	I	Thai domestic	Sativa
Lopburi-2 (LOP-2)	I	Thai domestic	Sativa
Suphan (SP)	I	Thai domestic	Sativa
Phrik Thai (PT)	I	Thai domestic	Sativa
Chang Phuak* (CHP)	I	Thai domestic	Sativa
Kroeng Krawia (KRKW)	I	Thai domestic	Sativa
KD	I	Thai domestic	Sativa
King Kong (KK)	I	Commercial strain	Sativa 20% x Indica 80%
BRR	III	Commercial strain	Sativa x Indica
Dinamed* (DNM)	III	Commercial strain	Sativa 60% x Indica 40%
Crystal Med (CRST)	III	Commercial strain	Sativa 50% x Indica 50%
Charlotte's Angel (CHLA)	III	Commercial strain	Sativa 60% x Indica 40%
DCP22 (10 Plants)	ND	F1 derived in this study	Dinamed x Chang Phuak

* พันธุ์แม่ (Dinamed) และพันธุ์พ่อ (Chang Phuak) ของพันธุ์ DCP22

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 1) โกร่งบดตัวอย่าง (Mortar and Pestle)
- 2) กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3) หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Micro Centrifuge Tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 4) เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Autopipette Gilson, Germany) ขนาด P2, P200 และ P1000
- 5) Pipette Tip ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- 6) PyroMark Q48 Absorber Strips (QIAGEN, Germany)
- 7) PyroMark Q48 Discs (QIAGEN, Germany)
- 8) เครื่อง PyroMark Q48 Autoprep (QIAGEN, Germany)
- 9) เครื่อง gel electrophoresis (myGel Mini Electrophoresis System), (Accuris Instruments, USA)
- 10) เครื่อง High speed refrigerated micro centrifuge (TOMY MX-370, Japan)
- 11) เครื่องส่องเจล (B-BOX™ Blue Light LED epi-illuminator), (SMOBIO, Taiwan)
- 12) Vortex mixer (Scientific Industries G560E, USA)
- 13) เครื่องวัดความเข้มของแสง (UV/Vis Spectrophotometer Libra S22, Biochrom, UK)
- 14) เครื่อง PCR T100™ (Thermal Cycler BIORAD, USA)
- 15) เครื่องชั่งความละเอียดสูงทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius BSA224S-CW, Germany)
- 16) เครื่องวัดค่า pH (Mettler Toledo™ 30019033, Switzerland)
- 17) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (TOMY SX-700, Japan)
- 18) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Thermo Scientific TLE Ultra-Low Freezers TLE60086A, USA)
- 19) ตู้ระบายควัน (Fume Hood), (GT-200DA, GTech, Thailand)
- 20) เครื่องปั่นตก (Spin down), (Cryste Purispin 6, USA)
- 21) เตาอบไมโครเวฟ (Microwave Oven)
- 22) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert WNE 14, Germany)
- 23) ถาดเพาะกล้า

24) ฟิทมอสสำหรับเพาะเมล็ด

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 1) 1XTBE buffer (Sigma-aldrich, USA)
- 2) 2X CTAB buffer (Merck, USA)
- 3) 2X DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA)
- 4) 10X CoralLoad Concentrate (QIAGEN, Germany)
- 5) Absolute ethanol (NZYTech, Turkey)
- 6) Agarose (Merck, USA)
- 7) Ammonium acetate (Sigma-aldrich, USA)
- 8) Chloroform (RCI Labscan™, Thailand)
- 9) DNA Ladder 100 bp (SMOBIO, Taiwan)
- 10) EDTA pH 8 (Merck, USA)
- 11) High-purity water
- 12) Iso-amyl (RCI Labscan™, Thailand)
- 13) Isopropanol (Merck, USA)
- 14) PyroMark PCR Master Mix (QIAGEN, Germany)
- 15) PyroMark Q48 magnetic beads (QIAGEN, Germany)
- 16) PyroMark binding buffer (QIAGEN, Germany)
- 17) MgCl₂, 25 mM (QIAGEN, Germany)
- 18) NaCl, 0.2 mM (Merck, USA)
- 19) NaOAc (KemAus™, Austria)
- 20) Nuclease-free water
- 21) RNase-free water (QIAGEN, Germany)
- 22) RNase A (Sigma-aldrich, USA)
- 23) SafeView™ Classic (abm, USA)
- 24) TE buffer (Merck, USA)
- 25) TrisHCl pH 8 (Merck, USA)

3.4 การศึกษา *In silico* ในการวิเคราะห์ยีน *THCAS* และ *CBDAS* เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่ง SNPs และ InDel กับ Chemotype ของพันธุ์กัญชา

3.4.1 ทำการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Complete coding sequence (CDS) ของยีน *THCAS* ของพันธุ์กัญชา Chemotype I และ III จากฐานข้อมูลสาธารณะ GenBank of National Center for Biotechnology Information (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) แล้วทำการบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบของ FASTA format

3.4.2 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการสืบค้นมาทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบหลายตัวอย่าง (Multiple Alignment) โดยใช้โปรแกรม MEGA X (<https://www.megasoftware.net>) โดยเลือก Clustal W จากนั้นค้นหาตำแหน่ง SNPs และ InDel ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์กัญชา Type I และ Type III ในตัวอย่างที่ศึกษาออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์

3.4.3 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการสืบค้นมาทำการแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน (Amino Acid Sequence) โดยใช้โปรแกรม MEGA X เฉพาะตำแหน่ง SNPs ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์กัญชา Type I และ Type III ออกจากกันได้ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากตำแหน่ง SNPs ที่ศึกษา โดยตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนจะถูกนำไปศึกษาต่อไปเนื่องจากคาดว่าจะการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นอาจมีผลเปลี่ยนแปลงหรือหยุดการแสดงออกของยีน *THCAS*

3.4.4 นำตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนมาทำนายการเกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Plant Protein Variation Effect Detector (PPVED) ซึ่งเข้าถึงได้จาก <http://www.ppved.org.cn>. จากนั้นเลือกตำแหน่งกรดอะมิโนที่ทำนายว่าเมื่อเปลี่ยนแล้วมีผลต่อการแสดงออก (Expression) ของยีน *THCAS* ตรวจสอบยืนยันในขั้นต่อไป

3.4.5 สำหรับยีน *CBDAS* เริ่มจากการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CBDAS* ของพันธุ์กัญชา Chemotype I และ III จากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI หลังจากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนเดียวกันกับยีน *THCAS* ที่กล่าวมาทั้งหมด

3.5 การตรวจสอบยืนยันตำแหน่ง SNPs ที่คาดว่าจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน *THCAS* และ *CBDAS* โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing

3.5.1 การสกัด DNA

นำใบสดของกัญชาแต่ละพันธุ์ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (Vegetative Stage) มาทำการสกัด DNA โดยใช้วิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle, J. J. Doyle, J. L. (1987) โดยนำใบกัญชาน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในโถงที่มี 2X CTAB buffer (ประกอบด้วย 2% CTAB, 1% PVP, 100 mM TrisHCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl และ 0.2 % 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด จากนั้นเทส่วนผสมที่บดได้ ประมาณ 700 ไมโครลิตรในหลอดไมโครเซนติฟิว 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที เขย่าทุก ๆ 10 นาที จากนั้นเติมสาร Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าโดยใช้วิธีพลิกหลอดคว่ำลงและหงายขึ้น (invert) เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดน้ำใสที่อยู่ด้านบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่โดยระวังอย่าดูดชั้นล่างที่มี Chloroform ติดมาด้วย หลังจากได้ส่วนใสในหลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ 3M NaOAc ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย Washing solution (ประกอบด้วย 70% (v/v) ethanol, 10 mM ammonium acetate) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง และล้างด้วย 70% (v/v) ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นผึ่ง DNA ให้แห้ง โดยนำไปใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอนของ DNA ใน TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ที่ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ DNA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer (Libra S22; Biochrom, UK) สุดท้ายเก็บสารละลาย DNA ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ Pyrosequencing

ทำการเลือกตำแหน่ง SNPs ที่ได้จากการวิเคราะห์ *In silico* ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีน *THCAS* และ *CBDAS* มาออกแบบไพรเมอร์สำหรับ Pyrosequencing เพื่อตรวจสอบความแม่นยำในการทำนาย Chemotype ของกัญชาพันธุ์ไทยโดยใช้เทคนิค Pyrosequencing โดยไพรเมอร์ออกแบบมี 2 ชุด ชุดที่ 1 คือไพรเมอร์ที่ใช้ในการปฏิกิริยา PCR (PCR Primer) เพื่อขยายยีนช่วงที่ต้องการศึกษา โดยมีการติดฉลากไบโอตินที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของไพรเมอร์ และ ชุดที่ 2 คือ ไพรเมอร์ที่ใช้ในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing Primer) เพื่อใช้วิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยใช้โปรแกรม PyroMark® Assay Design (QIAGEN, Germany)

3.5.3 การทำปฏิกิริยา PCR

นำ DNA ของตัวอย่างกัญชาพันธุ์ไทย พันธุ์ต่างประเทศ และพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการสกัด DNA ในข้อ 3.4.1 มาใช้ทำปฏิกิริยา PCR โดยปฏิกิริยารวมมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR แสดงในตารางที่ 3.2 โดยใช้เครื่อง T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) ในการทำปฏิกิริยา PCR สภาพของปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นที่การ preheating ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเข้าสู่การแยกสาย DNA (Denaturation) ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที ลดอุณหภูมิลงเป็น 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับสาย DNA (Annealing) และเข้าสู่ช่วงการต่อสาย DNA เส้นใหม่ (Extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที และต่อสายดีเอ็นเอที่เหลือ (Final Extension) อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวนรอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 45 รอบ จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของผลผลิต PCR (PCR product) ที่ได้ด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel เข้มข้น 1.5% ที่ย้อมด้วย SafeView™ Classic (abm, USA) จากนั้นส่องภายใต้แสง LED สีฟ้า (Blue Light LED) ที่ 470 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง B-BOX™ Blue Light LED Epi-illuminator (SMOBIO, TW) * และนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายของ ยีน *THCAS* และ *CBDAS*

ชื่อสาร/เอนไซม์	ยีนเป้าหมาย	
	<i>THCAS</i> (ไมโครลิตร)	<i>CBDAS</i> (ไมโครลิตร)
2X PyroMark PCR Master Mix	12.5	12.5
10X CoralLoad Concentrate	2.5	2.5
10 μ M Forward primer	0.75	0.5
10 μ M Reverse primer	0.75	0.5
25 mM MgCl ₂	0.5	-
RNase-free water	7	8
DNA template ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม	1	1
ปริมาตรรวม	25	25

3.5.4 การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 3.4.3 มาวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs ด้วยเทคนิค Pyrosequencing ด้วยเครื่อง PyroMark® Q48 Autoprep (QIAGEN, Germany) ผลการวิเคราะห์จะแสดงชนิดของและ Genotype ของกัญชาในรูปของนิวคลีโอไทด์และเปอร์เซ็นต์ที่เปลี่ยนแปลงไป องค์ประกอบของปฏิกิริยามีดังนี้

- 1) PCR product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (μ l)
- 2) PyroMark Q48 magnetic beads 3 ไมโครลิตร (μ l)
- 3) PyroMark binding buffer
- 4) เอนไซม์และซับสเตรท
- 5) Sequencing primer ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ (μ M)

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณสาร THC และ CBD โดยใช้ HPLC

นำตัวอย่างแห้งของดอกกัญชาเพศเมียที่โตเต็มที่มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ -COOH (Decarboxylation) และบดด้วยเครื่องปั่นจากนั้นกรองด้วยตะแกรงกรองเบอร์ 60 ที่มีขนาดรู 0.0098 นิ้ว (Cole-Parmer®, USA) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gradient elution HPLC โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย เฟสเคลื่อนที่ A ได้แก่ Ammonium formate-acetonitrile ที่เตรียมโดยการละลาย Ammonium formate น้ำหนัก 3.153

กรัม ใน Acetonitrile ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มีค่า pH 3.75 และเฟสเคลื่อนที่ B ได้แก่ Acetonitrile ความเข้มข้น 90% v/v และเฟสอยู่กับที่ (Stationary Phase) ได้แก่คอลัมน์ XBridge C18 (3.5 ไมโครเมตร, 4.6 x 150 นาโนเมตร) และใช้อัตราการไหล (Flow Rate) ที่ใช้เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที เป็นเวลา 40 นาที เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร THC และ CBD ในตัวอย่างดอกกัญชา

3.7 การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อการทำนายประสิทธิภาพในการทำนาย Chemotype ของตำแหน่ง SNPs ที่ศึกษา

นำตัวอย่างลักษณะทางพันธุกรรม F1 ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์แม่ ได้แก่ Dinamed (DNM) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีสาร CBD สูง และพันธุ์พ่อคือพันธุ์ช้างเผือก (CHP) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีสาร THC สูง โดยให้ชื่อพันธุ์ลูกผสมว่า DCP22 จำนวน 10 ต้น มาทำการวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยเริ่มจากการนำตัวอย่างใบสดที่อยู่ในระยะต้นกล้า (Seedling Stage) มาทำการสกัด DNA และทำการศึกษา SNPs ที่ตำแหน่งต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.4 และนำตัวอย่างดอกแห้งของลูกผสมมาวิเคราะห์หาปริมาณสาร THC และ CBD โดยใช้ HPLC เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.5

3.8 การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยเทคนิค Tetra-primer ARMS PCR

หลังจากการวิเคราะห์ทั้งหมดและได้ SNPs ที่มีประสิทธิภาพในการทำนาย Chemotype ของพันธุ์มาแล้ว นำตำแหน่งดังกล่าวมาออกแบบ Tetra-primer ARMS-PCR สำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ (Marker Aided Selection) โดยใช้โปรแกรม Primer1 (primer1.soton.ac.uk/primer1.html) ในการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ที่บริษัท QIAGEN, Germany สำหรับปฏิกิริยา Tetra-primer ARMS-PCR ที่ใช้ในการทดสอบตำแหน่ง SNPs มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร RNase-free water ปริมาตร 4.4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ทั้งหมด 4 เส้น ประกอบด้วยเส้น Forward outer (FO) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร เส้น Reverse outer (RO) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร เส้น Forward inner (FI) ปริมาตร 0.7 ไมโครลิตร และเส้น Reverse inner (RI) ปริมาตร 1.3 ไมโครลิตร และ DNA ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม ปริมาตร 3 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยา PCR เริ่มที่การ Preheating ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่การ

แยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที ลดอุณหภูมิลงเป็น 58°C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับสาย DNA และเข้าสู่ช่วงการต่อสาย DNA เส้นใหม่ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที และต่อสาย DNA ที่เหลือที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จำนวนรอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 45 รอบ โดยใช้เครื่อง T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) ในการทำปฏิกิริยา PCR จากนั้นทำการตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 3% ที่ย้อมด้วย SafeView™ Classic (abm, USA) จากนั้นส่องภายใต้แสง LED สีฟ้า (Blue Light LED) ที่ 470 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง B-BOX™ Blue Light LED Epi-illuminator (SMOBIO, TW) และทำการตรวจสอบและบันทึกภาพแถบ DNA ที่เกิดขึ้น



บทที่ 4

ผลการทดลอง

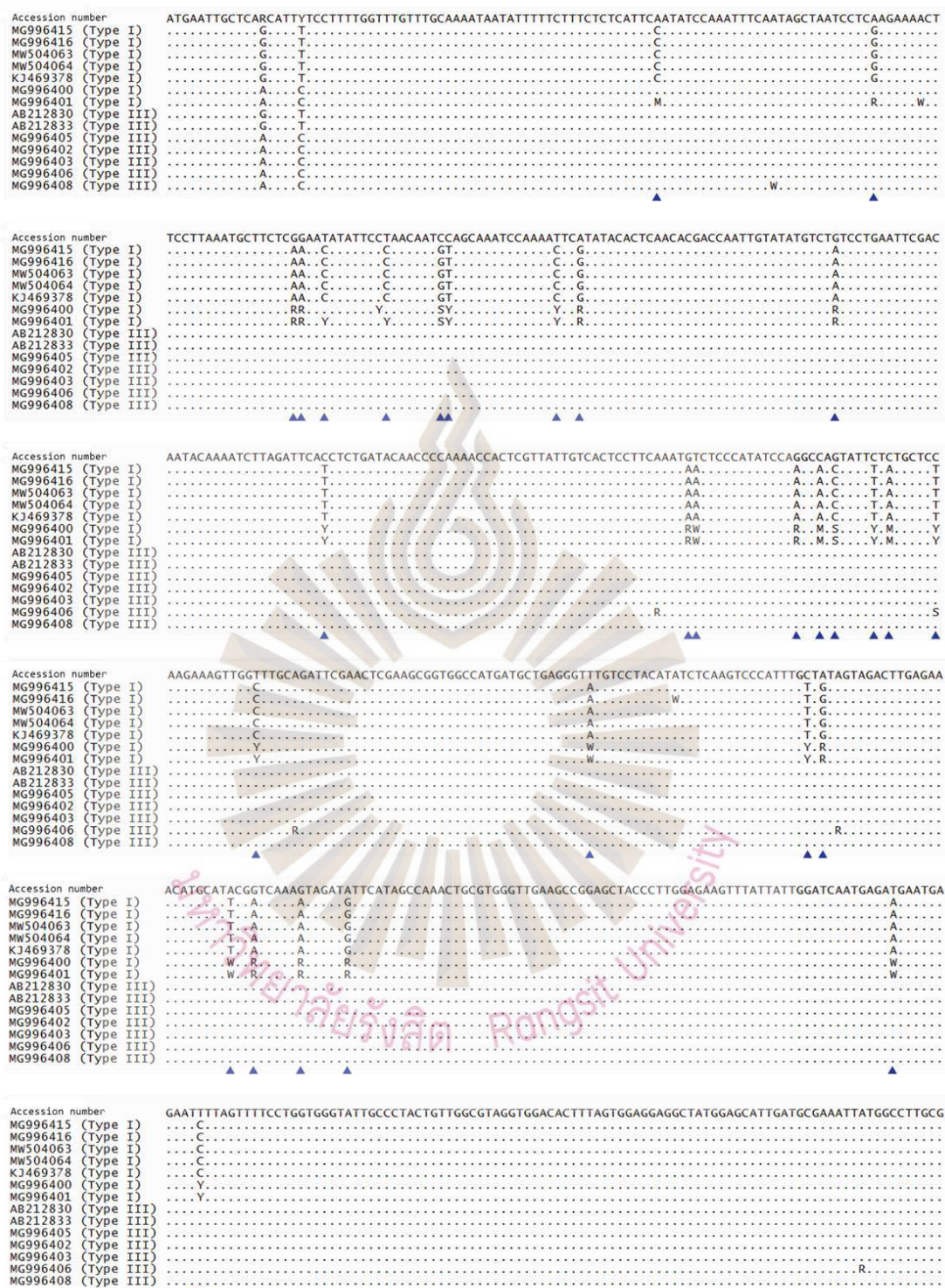
4.1 ผลการศึกษา *In silico* ในการวิเคราะห์ยีน *THCAS* และ *CBDAS* เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่ง SNPs และ InDel กับ Chemotype ของพันธุ์กัญชา

4.1.1 ผลการศึกษา *In silico* ในการวิเคราะห์ยีน *THCAS*

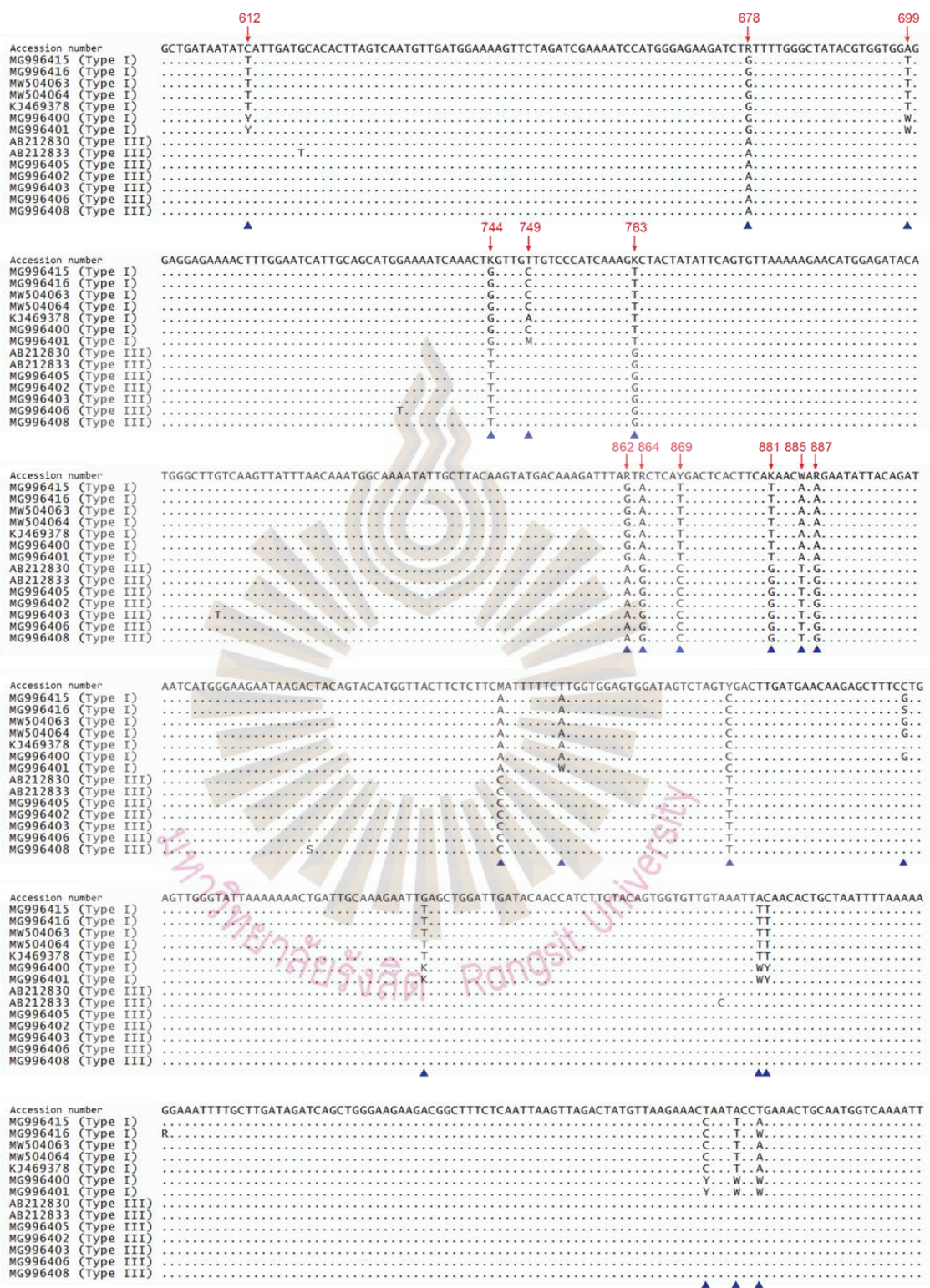
4.1.1.1 ผลการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่ง (Multiple Alignment) ของยีน *THCAS*

ผลการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS* ที่เป็น Coding Sequence (CDS) มีความยาวประมาณ 1,638 bp จากฐานข้อมูล GenBank ของพันธุ์กัญชา Type I จำนวน 7 Accessions คือ MG996415, MG996416, MW504063, MW504064, KJ469378, MG996400 และ MG996401 สำหรับยีน *THCAS* ของพันธุ์กัญชา Type III ที่กล่าวไว้ได้แก่ AB212830, AB212833, MG996402, MG996403, MG996405, MG996406 และ MG996408 จากนั้นบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้มาทำ Multiple alignment พบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรหรือมีหลายรูปแบบ (Polymorphism) ทั้งหมด 103 ตำแหน่ง โดยเป็นตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงแบบสุ่ม 40 ตำแหน่ง และตำแหน่งที่คาดว่าเป็น SNPs เนื่องจาก ณ ตำแหน่งหนึ่ง ๆ จะพบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์กัญชา Type I และ Type III โดยกัญชาภายใน Type เดียวกันจะมีนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมดแต่จะมีความแตกต่างไปในพันธุ์กัญชาต่าง Type ในการทดลองครั้งนี้พบตำแหน่งที่สามารถระบุความแตกต่างของพันธุ์ได้ทั้งหมด 63 SNPs (รูปที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Kojoma et al. (2006) ที่ศึกษายีน *THCAS* โดยการทำ Cycle sequencing และทำ Multiple alignment ระหว่างกัญชา Drug-type และ Fiber-type ทำให้พบตำแหน่งที่คาดว่าเป็น SNPs ทั้งหมด 62 SNPs ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวสอดคล้องกับตำแหน่งที่พบได้จากการทำ Multiple alignment ระหว่างกัญชา Type I และ Type III ในงานวิจัยนี้ ยกเว้นตำแหน่งที่ 998 บนยีน *THCAS* ที่เป็นตำแหน่งที่งานวิจัยนี้พบแต่ไม่ตรงกับรายงานของ Kojoma et al. (2006) ซึ่งคาดว่าเกิดจากการใช้ตัวอย่างมากขึ้นในการทำ Multiple alignment จึงทำให้พบตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงไปเพิ่มขึ้น นอกจากนี้

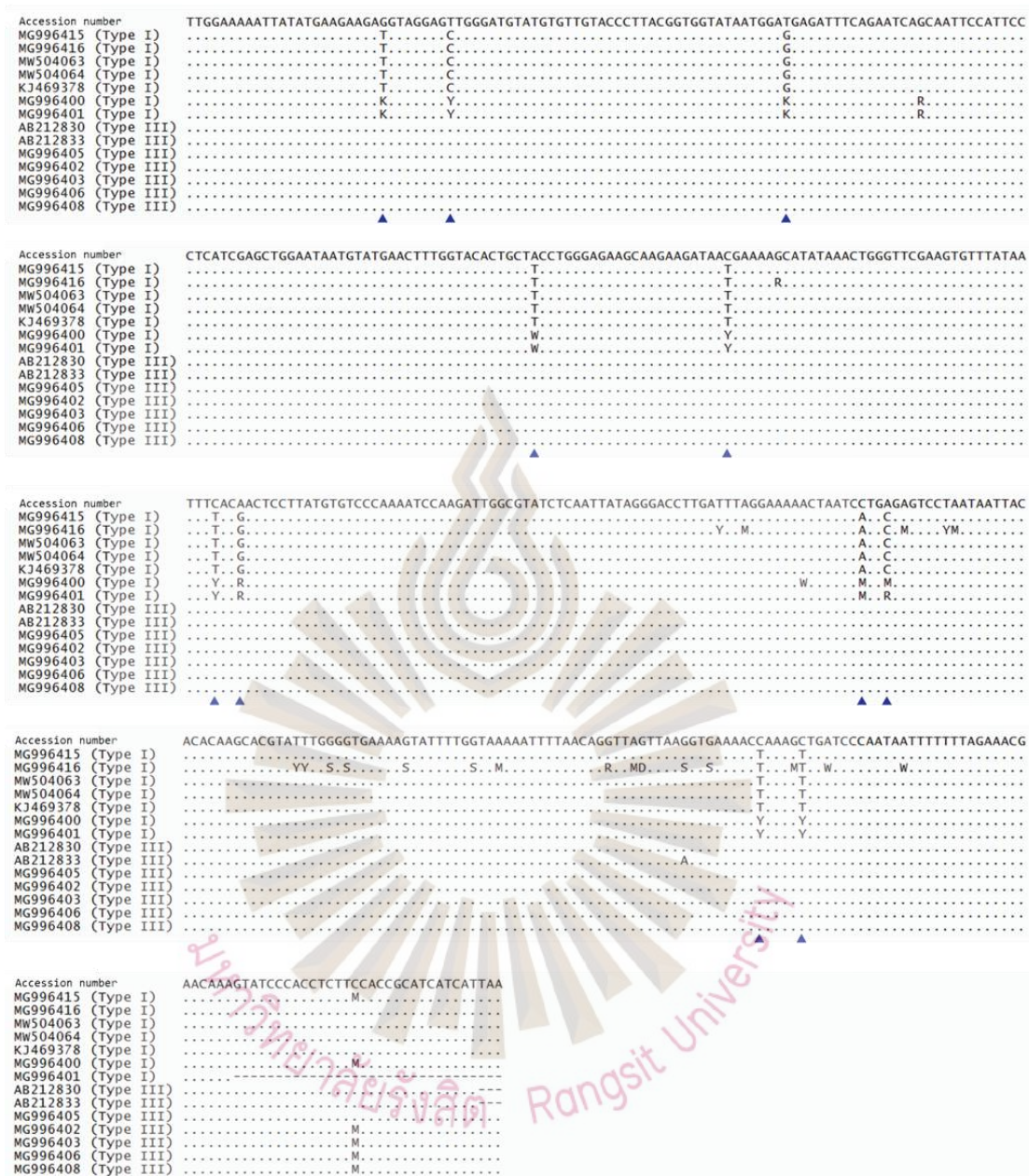
SNPs ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ยังสอดคล้องกับรายงานของ Cascini et al. (2019) ที่ศึกษา SNPs ในยีน *THCAS* และ *CBDAS* เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างระหว่างกัญชา Drug-type และ Fiber-type โดยการทำการ Sequencing และ Multiple alignment ทำให้พบ SNPs ที่มีประสิทธิภาพ 25 ตำแหน่งบนยีน *THCAS* ได้แก่ตำแหน่งที่ 136, 137, 154, 221, 269, 287, 300, 355, 383, 385, 409, 412, 418, 424, 494, 505, 612, 678, 699, 744, 749, 763, 862, 864 และ 869 ตามลำดับ หลังจากศึกษาผล Multiple alignment ที่ได้ จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการเลือก SNPs ที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้กันเหมาะต่อการวิเคราะห์โดยเครื่อง Pyrosequencing และอยู่ในตำแหน่งที่คาดว่าจะสามารถระบุ Type ของพันธุ์กัญชาได้อย่างถูกต้องสำหรับนำไปศึกษาต่อในขั้นต่อไปโดยมีหลักในการเลือกเช่นเดียวกับที่กล่าวมาคือเลือกตำแหน่งที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกัญชาทั้งสอง Type ออกจากกันได้ ซึ่งในกัญชากลุ่มเดียวกันจะต้องมีนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกัน (Consensus) เช่นตำแหน่งที่ 678 เป็น SNP (G/A) กล่าวคือกัญชา Type I ทั้งหมดมีนิวคลีโอไทด์เป็น G ในขณะที่กัญชา Type III ทั้งหมด มีนิวคลีโอไทด์เป็น A จากหลักการดังกล่าวจึงได้ทำการคัดเลือกตำแหน่งที่เป็นไปตามหลักการคัดเลือกและคาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างระหว่างกัญชาทั้งสองกลุ่มมาทั้งหมด 12 SNPs ได้แก่ SNPs ในตำแหน่ง 612 (G/T), 678 (G/A), 699 (T/A), 744 (G/T), 749 (C/T), 763 (T/G), 862 (G/A), 864 (A/G), 869 (T/C), 881 (T/G), 885 (A/T) และ 887 (A/G) สำหรับใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป จากรูปที่ 4.1 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีตัวอักษรที่เป็นรหัส IUPAC codes นอกจากนิวคลีโอไทด์ A, G, C และ T ที่พบยังมีรหัสอื่น ๆ เช่น รหัส R หมายถึงตำแหน่งนั้นมีทั้งนิวคลีโอไทด์ A และ G รวมกัน รหัส Y หมายถึงตำแหน่งนั้นมีทั้งนิวคลีโอไทด์ T และ C รวมกัน รหัส M หมายถึงตำแหน่งนั้นมีทั้งนิวคลีโอไทด์ A และ C รวมกัน รหัส K หมายถึงตำแหน่งนั้นมีทั้งนิวคลีโอไทด์ G และ T รวมกัน รหัส S หมายถึงตำแหน่งนั้นมีทั้งนิวคลีโอไทด์ C และ G รวมกัน และ รหัส W หมายถึงตำแหน่งนั้นมีทั้งนิวคลีโอไทด์ A และ T รวมกัน (Liébecq, 1992)



รูปที่ 4.1 แสดงผล Multiple alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS* ระหว่างกัญชา Type I และ Type III โดยสามเหลี่ยมคือตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีความผันแปร และลูกศรคือตำแหน่ง SNP ที่ศึกษาในการทดลองนี้



รูปที่ 4.1 แสดงผล Multiple alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS* ระหว่างกัญชา Type I และ Type III โดยสามเหลี่ยมคือตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีความผันแปร และลูกศรคือตำแหน่ง SNP ที่ศึกษาในการทดลองนี้ (ต่อ)



รูปที่ 4.1 แสดงผล Multiple alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS* ระหว่างกัญชา Type I และ Type III โดยสามเหลี่ยมคือตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีความผันแปร และลูกศรคือตำแหน่ง SNP ที่ศึกษาในการทดลองนี้ (ต่อ)

4.1.1.2 ผลการแปลรหัสพันธุกรรม (Genetic Code) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS*

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS* ที่เป็น CDS ความยาว 1,683 bp เป็นลำดับกรดอะมิโน (รูปที่ 4.2) พบว่าเมื่อแปลรหัสได้ลำดับอะมิโนที่มีความยาว 545 Amino acid โดย SNPs ตำแหน่งที่ 612, 678, 699, 744, 749, 862, 864, 869, 881, 885 และ 887 บนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการคัดเลือกมาจากข้อ 4.1.1.1 เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วตรงกับตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 204, 226, 233, 248, 250, 255, 288, 288, 290, 294, 295 และ 296 ตามลำดับ จากตำแหน่ง SNPs ที่เลือกมาศึกษา 12 ตำแหน่ง พบว่า 6 ตำแหน่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน และตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนทั้งหมด 6 ตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างของกัญชา Type I และ Type III ได้อย่างสมบูรณ์ ได้แก่ตำแหน่ง 250 จากกัญชา Type I พบ Alanine (Ala, A) และ Aspartic acid (Asp, D) เปลี่ยนเป็น Valine (Val, V) ในกัญชา Type III ตำแหน่ง 255 จากกัญชา Type I พบ Serine (Ser, S) เปลี่ยนเป็น Alanine (Ala, A) ในกัญชา Type III ตำแหน่ง 288 จากกัญชา Type I พบ Valine (Val, V) เปลี่ยนเป็น Methionine (Met, M) ในกัญชา Type III ตำแหน่ง 290 จากกัญชา Type I พบ Methionine (Met, M) เปลี่ยนเป็น Threonine (Thr, T) ในกัญชา Type III ตำแหน่ง 294 จากกัญชา Type I พบ Isoleucine (Ile, I) เปลี่ยนเป็น Alanine (Ala, A) ในกัญชา Type III และตำแหน่งที่ 296 จากกัญชา Type I พบ Lysine (Lys, K) เปลี่ยนเป็น Arginine (Arg, R) ในกัญชา Type III ซึ่งคาดว่าตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนนั้นอาจจะมีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *THCAS* จึงได้นำตำแหน่ง 250, 255, 288, 290, 294 และ 296 มาศึกษาในขั้นต่อไป

	250	255	260	270	280	288	290	294	296	300																																										
MG996415 (Type I)	V	A	V	P	S	K	S	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	V	L	M	T	H	F	I	T	K	N	I	T	D
MG996416 (Type I)	V	A	V	P	S	K	S	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	V	L	M	T	H	F	I	T	K	N	I	T	D
MW504063 (Type I)	V	A	V	P	S	K	S	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	V	L	M	T	H	F	I	T	K	N	I	T	D
MW504064 (Type I)	V	A	V	P	S	K	S	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	V	L	M	T	H	F	I	T	K	N	I	T	D
KJ469378 (Type I)	V	D	V	P	S	K	S	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	V	L	M	T	H	F	I	T	K	N	I	T	D
MG996400 (Type I)	V	A	V	P	S	K	S	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	V	L	M	T	H	F	I	T	K	N	I	T	D
MG996401 (Type I)	V	X	V	P	S	K	S	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	V	L	M	T	H	F	I	T	K	N	I	T	D
AB212830 (Type III)	V	V	V	P	S	K	A	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	M	L	T	T	H	F	R	T	R	N	I	T	D
AB212833 (Type III)	V	V	V	P	S	K	A	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	M	L	T	T	H	F	R	T	R	N	I	T	D
MG996405 (Type III)	V	V	V	P	S	K	A	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	M	L	T	T	H	F	R	T	R	N	I	T	D
MG996402 (Type III)	V	V	V	P	S	K	A	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	M	L	T	T	H	F	R	T	R	N	I	T	D
MG996403 (Type III)	V	V	V	P	S	K	A	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	M	L	T	T	H	F	R	T	R	N	I	T	D
MG996406 (Type III)	V	V	V	P	S	K	A	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	M	L	T	T	H	F	R	T	R	N	I	T	D
MG996408 (Type III)	V	V	V	P	S	K	A	T	I	F	S	V	K	K	N	M	E	I	H	G	L	V	K	L	F	N	K	W	Q	N	I	A	Y	K	Y	D	K	D	L	M	L	T	T	H	F	R	T	R	N	I	T	D

รูปที่ 4.2 แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *THCAS* ในกัญชา Type I และ Type III และตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนที่มีผลมาจากการเกิด SNP (ลูกศรสีแดง)

4.1.1.3 การทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนของยีน *THCAS*

จากการนำตำแหน่งที่เมื่อเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่แล้วมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนมาทั้งหมด 6 ตำแหน่ง คือตำแหน่ง 250, 255, 288, 290 และ 296 ไปทำทำนายการเกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Plant Protein Variation Effect Detector (PPVED)) ที่มีความแม่นยำสูงกว่าโปรแกรมการทำนายอื่น ๆ เมื่อใช้ทำนายยีนของพืชได้แก่โปรแกรม SIFT, PROVEAN, PANTHER-PSEP, PhD-SNP, PolyPhen-2, and MutPred2 (Gou et al., 2022) พบว่าตำแหน่งที่ 250, 255, 288 และ 296 จัดอยู่ใน Neutral class ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *THCAS* และที่ตำแหน่ง 290 และ 294 จัดอยู่ในกลุ่ม Functional class ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวมีผลทำให้หน้าที่ของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงไปทำให้คาดว่าตำแหน่งดังกล่าวส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *THCAS* ผลที่ได้นี้ขัดแย้งกับรายงานของ Cascini et al. (2019) ที่รายงาน SNPs บนยีน *THCAS* บริเวณตำแหน่งที่ 136-869 แต่ระบุว่ามีเพียง SNP ตำแหน่ง 494 (T/A) ที่เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจะอยู่ตำแหน่งที่ 165 (Lysine (K) → Methionine (M)) เมื่อนำตำแหน่งดังกล่าววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PROVEAN ผลที่ได้ทำให้คาดว่าเป็นตำแหน่งที่เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนแล้วมีความเป็นไปได้สูงที่จะทำให้โปรตีนไม่ถูกผลิตขึ้นหรือหน้าที่ของโปรตีนเสียประสิทธิภาพไป (Deleterious) แต่ไม่มีการรายงานว่า SNP ตำแหน่งที่ 869 มีความเป็นไปได้ดังกล่าวจึงคาดว่าเกิดจากการใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้นำลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 165 มาทำการทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม PPVED พบว่าการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน (Functional class) ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Cascini et al. (2019) ที่วิเคราะห์โดยโปรแกรม PROVEAN แสดงว่าถึงแม้ว่าการใช้โปรแกรมการทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนจะมีความแม่นยำสูงแต่การพิสูจน์ในพืชจริงก็ยังคงมีความจำเป็นในการตรวจสอบยืนยัน

4.1.2 ผลการศึกษา *In silico* ในการวิเคราะห์ยีน *CBDAS*

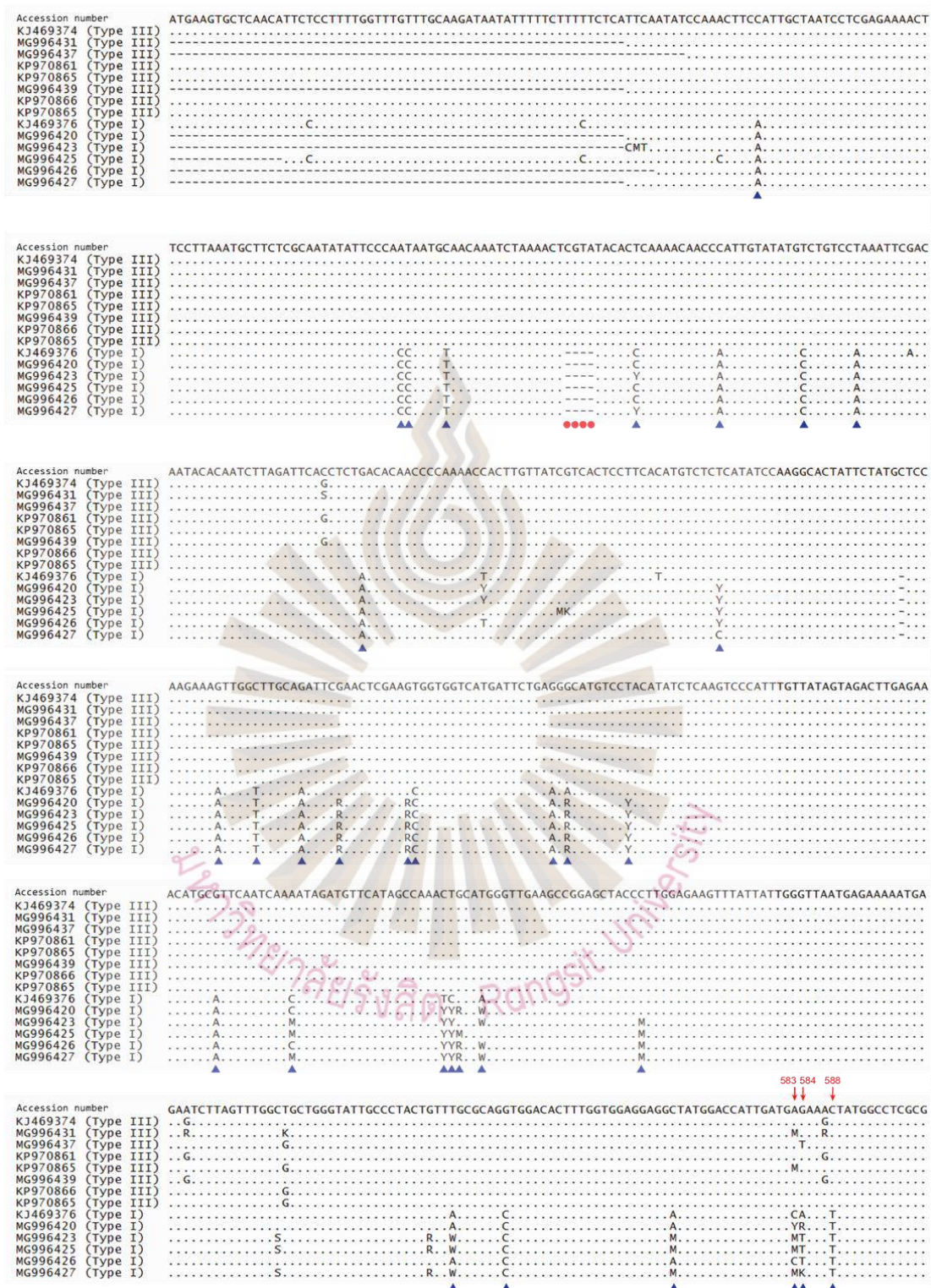
4.1.2.1 ผลการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่ง (Multiple Alignment) ของยีน *CBDAS*

จากการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CBDAS* มีความยาวประมาณ 1,635 bp ที่เป็น CDS จากฐานข้อมูล GenBank ของกัญชา Type I สุ่มเลือกได้จำนวน 6

Accessions ได้แก่ KJ469376, MG996420, MG996423, MG996425, MG996426 และ MG996427 สำหรับยีน *CBDAS* ของกัญชา Type III ที่สุ่มเลือกไว้จำนวน 8 Accessions ได้แก่ KJ469374, MG996431, MG996437, KP970861, KP970865, MG996439, KP970866 และ KP970865 ตามลำดับ จากนั้นบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านั้น มาทำ Multiple alignment พบตำแหน่ง Polymorphism ทั้งหมด 156 ตำแหน่ง โดยเป็นตำแหน่ง ที่พบการเปลี่ยนแปลงแบบสุ่ม 88 ตำแหน่ง และตำแหน่งที่คาดว่าเป็น SNPs เนื่องจาก ณ ตำแหน่งหนึ่ง ๆ จะพบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์กัญชา Type I และ Type III โดย ในพันธุ์กัญชา Type เดียวกันจะมีนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมดแต่จะมีความแตกต่างไปใน พันธุ์กัญชาต่าง Type ในการทดลองครั้งนี้พบตำแหน่งที่สามารถระบุความแตกต่างของพันธุ์ได้ ทั้งหมด 70 SNPs นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งที่มีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ (InDel) ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ประกอบด้วย 4 bp InDel ที่ตำแหน่ง 153, 1 bp InDel 2 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 297 และ 1,366 และ 3 bp InDel ที่ตำแหน่ง 758-760 (รูปที่ 4.3) ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของ Cascini et al. (2019) ที่ศึกษา SNPs ในยีน *THCAS* และ *CBDAS* เพื่อใช้เป็น เครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างระหว่างกัญชา Drug-type และ Fiber-type โดย การทำ Sequencing และ Multiple alignment ทำให้พบ SNPs ที่มีประสิทธิภาพ 8 ตำแหน่งบน ยีน *CBDAS* ได้แก่ตำแหน่งที่ 407, 545, 583, 588, 613, 637, 688 และ 704 จากนั้นผู้วิจัยได้ ทำการเลือก SNPs ที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้กันเหมาะต่อการวิเคราะห์โดยเครื่อง Pyrosequencing

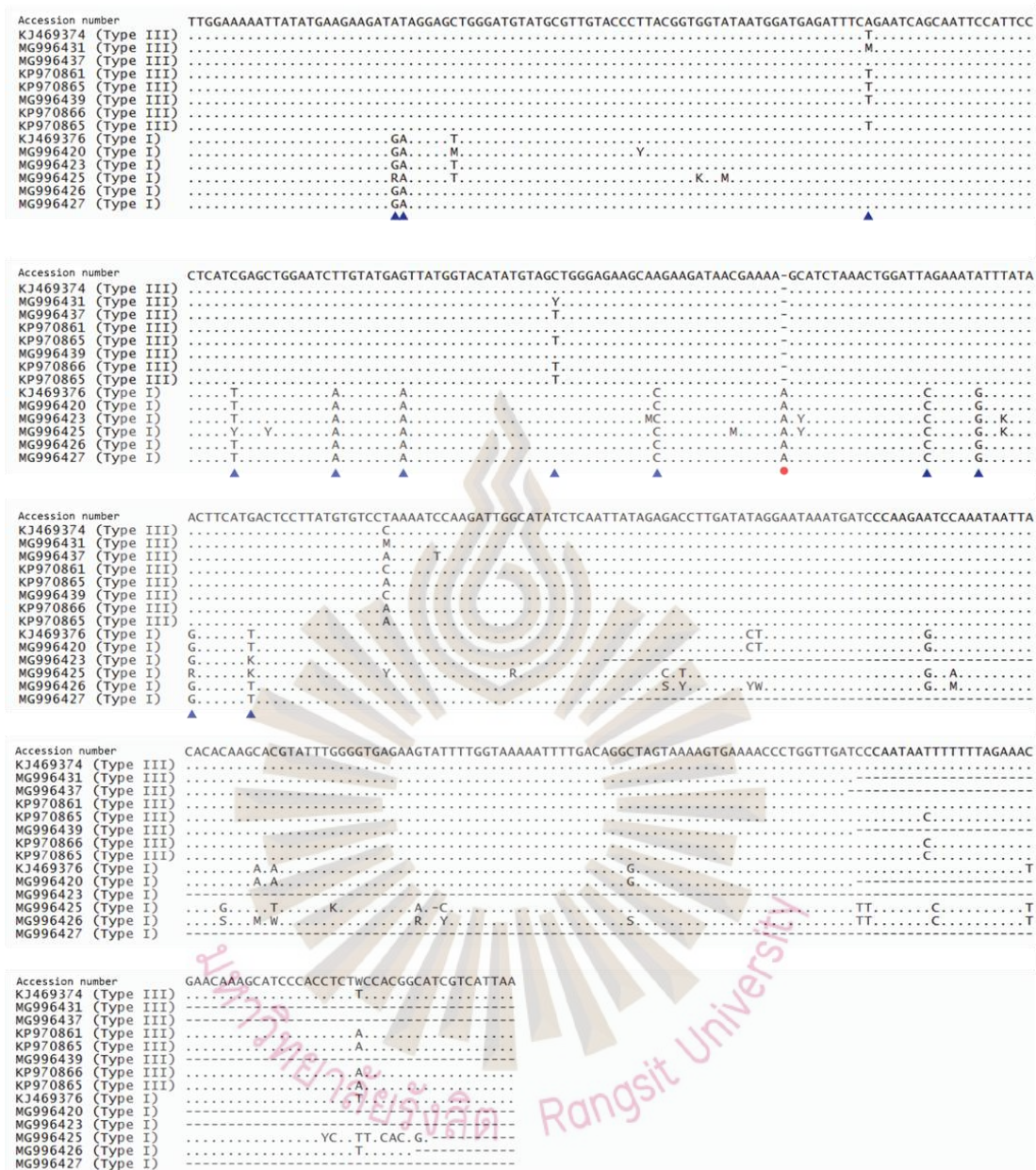
เพื่อนำไปศึกษาต่อในขั้นต่อไปโดยมีหลักในการเลือกคือเลือกตำแหน่งที่ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกัญชาทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้ ซึ่งในกัญชากลุ่มเดียวกัน จะต้องมียีนนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกัน (Consensus) เช่น ตำแหน่งที่ 87 กัญชา Type I ทั้งหมดมียีน นิวคลีโอไทด์เป็น C ในขณะที่กัญชา Type III ทั้งหมด มียีนนิวคลีโอไทด์เป็น A

จากหลักการดังกล่าวจึงได้ทำการคัดเลือกตำแหน่งที่เป็นไปตามหลักการ คัดเลือกและคาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างระหว่างกัญชาทั้งสองกลุ่มมา ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง ได้แก่ตำแหน่ง 583, 584, 588, 613 และ 637 โดยตำแหน่งที่ 583 และ 584 ไม่ได้ตรงไปตามหลักการเลือกแต่เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่อยู่ใกล้เคียงกันกับตำแหน่งที่ 588 จึง ทำให้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในเทคนิค Pyrosequencing สามารถศึกษาตำแหน่งทั้งสองได้ นอกจากนี้ยังมีตำแหน่ง 3 bp InDel ได้แก่ตำแหน่งที่ 758-760 (รูปที่ 4.3) ที่ผู้วิจัย คัดเลือกไว้เพื่อศึกษาต่อในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.3 แสดงผล Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม CBDAS ระหว่างกลุ่ม Type I และ Type III โดยสามเหลี่ยมคือตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีความผันแปร วงกลมคือตำแหน่ง InDel และลูกศรคือตำแหน่ง SNP ที่ศึกษาในการทดลองครั้งนี้

รูปที่ 4.3 แสดงผล Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม *CBDAS* ระหว่างกลุ่มชา Type I และ Type III โดยสามเหลี่ยมคือตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีความผันแปร วงกลมคือตำแหน่ง InDel และลูกศรคือตำแหน่ง SNP ที่ศึกษาในการทดลองครั้งนี้ (ต่อ)



รูปที่ 4.3 แสดงผล Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ยีน CDBAS ระหว่างกัญชา Type I และ Type III โดยสามเหลี่ยมคือตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์มีความผันแปร วงกลมคือตำแหน่ง InDel และลูกศรคือตำแหน่ง SNP ที่ศึกษาในการทดลองครั้งนี้ (ต่อ)

4.1.2.2 ผลการแปลรหัสพันธุกรรม (Genetic Code) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CBDAS*

การแปลรหัส DNA จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CBDAS* เป็นลำดับกรดอะมิโน (รูปที่ 4.4) พบว่าแปลรหัสได้ลำดับอะมิโนที่มีความยาว 544 Amino acid โดยตำแหน่งที่ 583, 584, 588, 613 และ 637 บนลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อแปลรหัสจากการอ่าน Codon เป็นกรดอะมิโน พบว่ากลายเป็นกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 195, 195, 196, 205 และ 213 ตามลำดับ อีกทั้งตำแหน่ง 758-760 (3 bp InDel) บนนิวคลีโอไทด์เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วเป็นตำแหน่งที่ 253 และ 254 จากการศึกษาค้นพบว่าการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนทั้งหมด 6 ตำแหน่ง ได้แก่ตำแหน่งที่ 195 จาก Arginine (Arg, R) กลายเป็น Isoleucine (Ile, I) หรือ Leucine (Leu, L) ขึ้นอยู่กับชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไปที่ตำแหน่ง 583 และ 584 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 196 พบว่าในัญชา Type III บางพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Asparagine (Asn, N) กลายเป็น Serine (Ser, S) แต่ในัญชา Type I ยังคงเป็น Asparagine (Asn, N) เช่นเดิม ตำแหน่งที่ 205 เปลี่ยนจาก Isoleucine (Ile, I) กลายเป็น Valine (Val, V) ตำแหน่งที่ 213 จาก Histidine (His, H) กลายเป็น Aspartic Acid (Asp, D) และตำแหน่งที่ 253 และ 254 เกิด Protein gap ขึ้นเนื่องจากการเกิด InDel บนลำดับนิวคลีโอไทด์

4.1.2.3 การทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนของยีน *CBDAS*

จากการนำตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนไปทำทำนายการเกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Plant Protein Variation Effect Detector (PPVED) พบว่าตำแหน่งที่ 195 จัดอยู่ใน Functional class ซึ่งหมายความว่า การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวมีผลทำให้หน้าที่ของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงไปจึงคาดว่าส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *CBDAS* ขณะเดียวกันตำแหน่งที่ 196, 205 และ 213 จัดอยู่ใน Neutral class ซึ่งหมายความว่า การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน

	150	160	170	180	190	200																																												
KJ469374 (Type III)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	C	A	G	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
MG996431 (Type III)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	C	A	G	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
MG996437 (Type III)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	C	A	G	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
KP970861 (Type III)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	C	A	G	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
KP970865 (Type III)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	C	A	G	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
MG996439 (Type III)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	C	A	G	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
KP970866 (Type III)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	C	A	G	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
KP970865 (Type III)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	C	A	G	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
KJ469376 (Type I)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	S	A	A	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
MG996420 (Type I)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	S	A	A	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
MG996423 (Type I)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	S	A	A	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
MG996425 (Type I)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	S	A	A	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
MG996426 (Type I)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	S	A	A	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A
MG996427 (Type I)	E	A	G	A	T	L	G	E	V	Y	Y	W	V	N	E	K	N	E	S	L	S	L	A	A	G	Y	C	P	T	V	S	A	A	G	H	F	G	G	G	Y	G	P	L	M	R	S	Y	G	L	A

	200	205	210	213	220	230	240	250	253	254																																												
KJ469374 (Type III)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	A	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
MG996431 (Type III)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	A	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
MG996437 (Type III)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	A	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
KP970861 (Type III)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	A	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
KP970865 (Type III)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	A	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
MG996439 (Type III)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	A	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
KP970866 (Type III)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	A	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
KP970865 (Type III)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	A	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
KJ469376 (Type I)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	G	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
MG996420 (Type I)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	G	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
MG996423 (Type I)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	G	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
MG996425 (Type I)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	G	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
MG996426 (Type I)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	G	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S
MG996427 (Type I)	A	A	D	N	I	D	A	H	L	V	N	V	H	G	K	V	L	D	R	K	S	M	G	E	D	L	F	W	A	L	R	G	G	G	E	S	F	G	I	I	V	A	W	K	I	R	L	V	A	V	P	T	K	S

รูปที่ 4.4 แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *CBDAS* ในกัญชา Type I และ Type III และตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนที่มีผลมาจากการเกิด SNP (ลูกศรสีแดง)

4.2 การตรวจสอบยืนยันตำแหน่ง SNPs ที่คาดว่าส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *THCAS* และ *CBDAS* โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing

4.2.1 การสกัด DNA

การตรวจสอบปริมาณของ DNA ที่สกัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 260 นาโนเมตร (A260) โดยที่วัดค่า A260 ได้เท่ากับ 1 หมายถึง มี DNA เข้มข้น 50 ng/μl และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ DNA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 บ่งบอกคุณภาพของ DNA โดย DNA ที่มีความบริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 1.7-1.9 กรณีอัตราส่วนนี้มีค่าต่ำกว่า 1.6 บ่งบอกว่ามีการปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้สกัด (Lucena-Aguilar et al., 2016) เช่น CTAB, Chloroform, Alcohol และสารอื่น ๆ ถ้าอัตราส่วนนี้สูงกว่า 2 แสดงว่ามีปริมาณโปรตีนปนเปื้อน การคำนวณปริมาณ DNA มีสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของ DNA (ng/μl)} = 50 \text{ (ng/μl)} \times \text{ค่า A260 ที่วัดได้} \times \text{Dilution Factor}$$

ปริมาณ DNA ที่คำนวณได้แสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า DNA เกือบทั้งหมดมีค่า $260/280$ ในช่วง 1.6-2 ยกเว้น DCP22-1, DCP22-8, และ DCP22-10 ที่มีค่า 1.55, 1.53 และ 1.52 ตามลำดับ เนื่องจาก DNA ที่ได้สกัดมาจากส่วนใบบริเวณดอกของกัญชาซึ่งมี Trichome ที่มีต่อม Resin ที่ผลิตสารเหนียวอยู่เป็นจำนวนมากทำให้การสกัด DNA โดยวิธีปกติไม่สามารถกำจัดสารต่าง ๆ ออกไปได้จึงเกิดการปนเปื้อนสารดังกล่าวขึ้น

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ของกัญชาพันธุ์ต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และอัตราส่วน A_{260}/A_{280} และความเข้มข้นของ DNA ที่ได้จากการสกัด

ลำดับ ที่	ชื่อพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสง			ความเข้มข้น ของ DNA (g/ml)
		A260	A280	A_{260}/A_{280}	
1	Wild Thai (WT)	2.183	1.199	1.82	4.37
2	Lopburi-1 (LOP-1)	1.946	1.029	1.89	3.89
3	Lopburi-2 (LOP-2)	1.422	0.809	1.76	2.84
4	Suphan (SP)	1.355	0.762	1.78	2.71
5	Phrik Thai (PT)	0.915	0.545	1.68	1.83
6	Chang Phuak (CHP)	2.502	1.398	1.79	5.00
7	Kroeng Krawia (KRKW)	2.582	1.431	1.80	5.16
8	KD	1.528	0.879	1.74	3.06
9	King Kong (KK)	0.845	0.516	1.64	4.23
10	BRR	1.991	1.106	1.80	3.98
11	Dinamed (DNM)	2.243	1.278	1.76	4.49
12	Crystal Med (CRST)	2.907	1.787	1.63	5.81
13	Charlotte's Angel (CHLA)	1.049	0.616	1.70	5.25
14	DCP22-1	2.958	1.912	1.55	5.92
15	DCP22-2	1.108	0.678	1.64	2.22
16	DCP22-3	1.281	0.772	1.66	2.56
17	DCP22-4	1.435	0.838	1.71	2.87
18	DCP22-5	1.117	0.593	1.88	2.23

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ของกัญชาพันธุ์ต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และอัตราส่วน A260/A280 และความเข้มข้นของ DNA ที่ได้จากการสกัด (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชื่อพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสง			ความเข้มข้น ของ DNA (g/ml)
		A260	A280	A260/280	
19	DCP22-6	1.418	0.757	1.87	2.84
20	DCP22-7	1.002	0.609	1.65	2.00
21	DCP22-8	1.113	0.729	1.53	2.23
22	DCP22-9	0.975	0.593	1.64	1.95
23	DCP22-10	1.038	0.682	1.52	2.08

4.2.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ Pyrosequencing

หลังจากทำการเลือกตำแหน่ง SNP ที่ได้จากการวิเคราะห์ *In silico* ซึ่งคาดว่าจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน *THCAS* และ *CBDAS* จากข้อ 4.1 มาออกแบบไพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP โดยวิธี Pyrosequencing สำหรับยีน *THCAS* ได้ทำการเลือกตำแหน่ง SNP ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง โดย PCR primer ที่ทำการออกแบบมีตำแหน่งเป้าหมาย (Target Region) ตั้งแต่บริเวณ 549-931 bp และ Sequencing Primer สำหรับวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณตำแหน่งที่ 612, 678, 699, 744, 749, 763, 862, 864, 869, 881, 885 และ 887 และสำหรับยีน *CBDAS* ได้ทำการเลือกตำแหน่ง SNP ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง ได้แก่บริเวณตำแหน่ง 583, 583, 588, 613 และ 637 นอกจากนี้ยังมีตำแหน่งที่ 758-760 ที่พบว่านิวคลีโอไทด์หายไป หรือเพิ่มขึ้น 3 bp โดยทำการสังเคราะห์ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ออกแบบได้ที่บริษัท QIAGEN, Germany สำหรับ PCR primer จะสังเคราะห์ให้ติดฉลากไบโอติน (Biotin) ที่ปลาย 5' ของเส้น Reverse primer ด้วย (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS* และ *CBDAS* และตำแหน่งเป้าหมาย (Target Position) ของไพรเมอร์ โดยวิธี Pyrosequencing

Gene	Name	Primer Sequence (5'-3')	Target position
<i>THCAS</i>	PCR primer		
	FP-THCA2	TGGCGTAGGTGGACACTTTA	549-931
	RPB-THCA2	Biotin-TCTTATTCTTCCCATGATTATCTG	
	Sequencing primer		
	SP-THCA2-1	CCTTGCGGCTGATAA	612
	SP-THCA2-2	AGTTCTAGATCGAAAATCC	678, 699
	SP-THCA2-3	AGCATGGAAAATCAAAC	744, 749, 763
	SP-THCA2-4	AATATTGCTTACAAGTATGA	862, 864, 869, 881, 885, 887
<i>CBDAS</i>	PCR primer		
	FP-CBDA1	GGAGCTACCCTTGGAGAAGTTTA	451-735
	RPB-CBDA1	Biotin-GGGACAGCAACCAGTCTAATT	
	FP-CBDA2	ACGTGGTGGTGGAGCAGAAA	690-960
	RPB-CBDA2	Biotin-CACTCCACCAAGGAAAACCTGAAGA	
	Sequencing primer		
	SP-CBDA1-2	GAGGAGGCTATGGACC	583, 584, 588, 613, 637
	SP-CBDA2	TGGTTGCTGTCCCAA	758-760 (3bp InDel)

4.2.4 การวิเคราะห์ SNPs บนยีน *THCAS* และ *CBDAS* โดย Pyrosequencing

จากงานวิจัยของ Schilling et al. (2020) ที่อธิบายถึงการสังเคราะห์สาร Phytocannabinoids ของกัญชาที่มีสารตั้งต้น (Precursor) คือ Cannabigerolic acid (CBGA) โดยการสังเคราะห์เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์สามชนิดซึ่ง CBGA ถูกเปลี่ยนเป็น Tetrahydrocannabinolic acid (THCA), Cannabidiolic acid (CBDA) และ Cannabichromenic acid (CBCA) โดยการทำงานของเอนไซม์ THCA synthase (THCAS) และ CBCA synthase (CBCAS) ตามลำดับ งานวิจัยนี้จึงเน้นศึกษายีน *THCAS* และ *CBDAS* ที่มีความยาว Full length 1,635 bp และ Encode ลำดับกรดอะมิโน 545 และ 544 Amino Acid ตามลำดับ (Onofri et al., 2015) เนื่องจากการแสดงออกของยีนทั้งสองคาดว่าจะปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่มีผลต่อการสะสมของสาร Cannabinoid ในพืชกัญชาอย่างไรก็ตามกลไกที่ควบคุมการทำงานของยีน *THCAS* และ *CBDAS* ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก

4.2.4.1 การวิเคราะห์ SNPs ของยีน *THCAS* โดย Pyrosequencing

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS* เพื่อเปรียบเทียบ SNPs ที่ตำแหน่ง 612, 678, 699, 744, 749, 763, 862, 864, 869, 881, 885 และ 887 ของพันธุ์กัญชาที่มี THC สูงที่เป็น Type I และพันธุ์ที่มี CBD สูงที่เป็น Type III โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing (ตารางที่ 4.3) พบว่า SNP ที่ตำแหน่งที่ 612 ในพันธุ์กัญชาที่มี THC สูง (Type I) จะมี SNP (T) ในขณะที่พันธุ์กัญชาที่มี CBD สูง (Type III) พบ SNP (C) สอดคล้องกันทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ KK ที่จัดเป็นกัญชา Type I แต่พบว่ามี SNP (C) ซึ่งตรงกับกัญชา Type III นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ Kroeng Krawia (KRKW) ที่พบ SNP (T/C) จึงบ่งบอกถึง Genotype ที่ตำแหน่งนี้อยู่ในสภาพ Heterozygous SNP ที่ตำแหน่งที่ 678 จากสมมติฐานกัญชา Type I จะตรวจพบ Allele G ในพันธุ์ Chang Phuak (CHP) ซึ่งสอดคล้องกับผล Multiple alignment และกัญชา Type I พันธุ์อื่น ๆ พบ SNP (G/A) ยกเว้นพันธุ์ KK ที่พบ SNP (A) ส่วนกัญชา Type III ที่ตำแหน่งดังกล่าวพบ SNP (A) สอดคล้องกันทุกพันธุ์ SNP ที่ตำแหน่ง 699 ในกัญชา Type I พบ SNP (T) ในพันธุ์ CHP และ SNP (T/A) ในกัญชา Type I พันธุ์อื่น ๆ ยกเว้นพันธุ์ KK เช่นเดียวกันที่พบ SNP (A) ซึ่งตรงกับกัญชา Type III ที่พบ SNP (A) ยกเว้นพันธุ์ BRR ที่พบ SNP (T/A) ต่อมาตำแหน่งที่ 744 ในกัญชา Type I พบ SNP (G) ในขณะที่ Type III พบ SNP (T) สอดคล้องกันทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ KK กัญชา Type I ที่พบ SNP (T) และ KRKW ที่พบ SNP (G/T) นอกจากนี้พบว่า SNP ที่ตำแหน่ง 612, 678, 699 และ 744 ของยีน *THCAS* ที่กล่าวมานอกจากจะเกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มแล้วยังพบว่า SNPs ที่เกิดขึ้นเมื่อแปลรหัส DNA แล้วตำแหน่งดังกล่าวไม่ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (Synonymous SNP)

แสดงผลเป็น NS ในตารางที่ 4.3 ตำแหน่งดังกล่าวจึงไม่ถูกนำไปทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนและถูกคัดออกจากกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยนี้

ที่ตำแหน่ง 749 พันธุกรรม Type I พบ SNP (C) และพันธุกรรม Type III พบ SNP (T) สอดคล้องกันทุกพันธุกรรมยกเว้นพันธุกรรม KK พันธุกรรม Type I เพียงพันธุกรรมเดียวที่พบ SNP (T) และ พันธุกรรม KRKW ที่พบ SNP (C/T)

ตำแหน่งที่ 763 พันธุกรรม Type I พบ SNP (T) และพันธุกรรม Type III พบ SNP (G) สอดคล้องกันทุกพันธุกรรมยกเว้นพันธุกรรม KK พันธุกรรม type I เพียงพันธุกรรมเดียวที่พบ SNP (G) และพันธุกรรม KRKW (Type I) และ BRR (Type III) ที่พบ SNP (T/G)

ตำแหน่งที่ 862 พบพันธุกรรม Type I เกือบทั้งหมดมี SNP (G/A) ยกเว้นพันธุกรรม CHP พบ SNP (G) และ KK พบ SNP (A) ขณะเดียวกันพันธุกรรม Type III พบ SNP (A) สอดคล้องกันทุกพันธุกรรม

ต่อมาตำแหน่ง 864 ในพันธุกรรม Type I พบ SNP (A) ยกเว้นพันธุกรรม KK และ KRKW ที่พบ SNP (A/G) ขณะที่พันธุกรรม Type III ส่วนใหญ่พบ SNP (A/G) ยกเว้นพันธุกรรม Dinamed (DNM) ที่พบ SNP (G)

จากตารางที่ 4.3 พบว่านิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 749, 763, 862 และ 864 บนยีน *THCAS* ที่กล่าวมาข้างต้นเมื่อทำการแปลรหัสพันธุกรรมแล้วพบว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนหรือ SNPs ที่เกิดขึ้นส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (Non-Synonymous SNP) ได้แก่ SNPs ตำแหน่ง 749 (C/T), 763 (T/G), 862 (G/A) และ 864 (A/G) เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจะตรงกับตำแหน่ง 250 (Ala→Val), 255 (Ser→Ala), 288 (Val→Met) และ 288 (Val→Met) ตามลำดับ เมื่อนำไปทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนที่ตำแหน่ง 250, 255 และ 288 พบว่าจัดอยู่ใน Neutral Class ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนจึงคาดว่าตำแหน่งดังกล่าวอาจไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *THCAS* ดังนั้นจึงตัดออกจากกลุ่มเป้าหมายการศึกษาของงานวิจัยนี้ ต่อมาตำแหน่งที่ 869 และ 881 บนยีน *THCAS* เริ่มที่ตำแหน่ง 869 ในพันธุกรรม Type I พบ SNP (T) ยกเว้นพันธุกรรม KRKW และ KK ที่พบ SNP (T/C) ขณะที่พันธุกรรม Type III ส่วนใหญ่พบ SNP (T/C) ยกเว้นพันธุกรรม DNM พบ SNP (C) ต่อมาตำแหน่งที่ 881 ในพันธุกรรม Type I พบ SNP (T) และพันธุกรรม Type III พบ SNP (G) สอดคล้องกันทุกพันธุกรรมยกเว้นพันธุกรรม KK (Type I) ที่ควรพบ SNP (T) แต่กลับพบ SNP (G) ซึ่งตรงกับพันธุกรรม Type III อีกทั้งยังมีพันธุกรรม Wild Thai (WT), KRKW และ Charlotte's Angel (CHLA) ที่พบ SNP (T/G) ตำแหน่งทั้งสองพบว่าเป็น Non-Synonymous SNP กล่าวคือเมื่อทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนที่ตำแหน่ง 290 (Met→Thr) และ 294 (Ile→Ala) บนลำดับกรดอะมิโนพบว่าจัดอยู่ใน Functional Class ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลง

ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวมีผลทำให้หน้าที่ของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงไปทำให้คาดว่าตำแหน่งดังกล่าวส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ผู้วิจัยจึงจัดทั้งสองตำแหน่งนี้อยู่ในกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ผลการวิเคราะห์ SNP genotype จากตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ที่ตำแหน่งที่ 869 มี Genotype เป็นแบบ Homozygous ของนิวคลีโอไทด์ T ทั้งสอง Allele (T/T) ในกัญชา Type I กล่าวคือ ณ ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนยีน มี Allele ที่เหมือนอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน โดย Allele หนึ่งได้รับจากพ่อส่วนอีก Allele หนึ่งได้รับจากแม่เนื่องจากกัญชาเป็นพืช Diploid โดยพบ Genotype แบบข้างต้นในกัญชา Type I ทั้งหมด 7 พันธุ์ ได้แก่ Wild Thai (WT), Lopburi-1 (LOP-1), Lopburi-2 (LOP-2), Suphan (SP) Phrik Thai (PT), Chang Phuak (CHP) และ KD โดยมีค่า T allele ของทั้ง 7 พันธุ์มีค่าเท่ากับ 82%, 86%, 86%, 87%, 86%, 94% และ 86% ตามลำดับ และกัญชา Type I จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ Kroeng Krawia (KRKW) และ KK มี Genotype แบบ Heterozygous กล่าวคือ ณ ตำแหน่งดังกล่าวยีนมี Allele ที่แตกต่างกันบนตำแหน่งเดียวกันโดย Allele หนึ่งได้รับจากพ่ออีก Allele หนึ่งได้รับจากแม่ ซึ่งคือพันธุ์ KRKW และ KK มี T และ C allele (T/C) โดยทั้งสองพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ Allele ของ T/C ที่ 51:49% ในขณะที่กัญชา Type III จำนวน 1 พันธุ์ ได้แก่ Dinamed (DNM) มี Genotype แบบ Homozygous ของ C allele (C/C) ที่ 83% และพันธุ์ที่เหลือจำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ BRR, Crystal Med (CRST) และ Charlotte's Angel (CHLA) มี Genotype แบบ Heterozygous ของ T/C Allele มีค่าของแต่ละ Allele คือ 37:63%, 34:66% และ 38:62% ตามลำดับ

ตำแหน่งที่ 881 พบว่ามี Genotype เป็นแบบ Heterozygous ประกอบด้วย T และ G allele (T/G) ในกัญชา Type I ทั้งหมด 2 พันธุ์ ได้แก่ WT และ KRKW โดยมีเปอร์เซ็นต์ Allele ที่ 75:25% และ 41:59% ในขณะที่กัญชา Type I อีก 6 พันธุ์ ได้แก่ LOP-1, LOP-2, SP, PT, CHP และ KD มี Genotype แบบ Homozygous ของ T allele (T/T) ที่ 85%, 76%, 76%, 76%, 83% และ 77% ตามลำดับ แต่พันธุ์ KK ซึ่งเป็นกัญชา Type I กลับมี Genotype แบบ Homozygous ของ G allele (G/G) ที่ 80% ซึ่งควรเป็น Genotype ของกัญชา Type III โดยกัญชา Type III มีทั้งหมด 3 พันธุ์ ได้แก่ BRR, DNM และ CRST ที่พบว่ามี G allele ที่ 79%, 91% และ 86% ตามลำดับ แต่พันธุ์ CHLA ซึ่งเป็นกัญชา Type III กลับมี Genotype แบบ Heterozygous โดยมี T/G Allele ที่ 27:73%

จากรายงานของ Garfinkel et al. (2021) ที่ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *THCAS* และ *CBDAS* โดยเทคนิค Real-time PCR (qPCR), Reverse transcription PCR (RT-PCR) และทำการศึกษา SNP โดยใช้เทคนิค TaqMan assay เพื่ออธิบายการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Inheritance) ของกัญชา Type IV (กัญชาที่มี CBGA เป็นหลัก) รายงานนี้ได้สรุปไว้ว่ากัญชา Type IV นั้นเกิดจาก Single recessive gene ซึ่งอาจควบคุมทำให้ยีน *THCAS* ไม่ทำงานทั้งนี้อาจเป็นเพราะ SNP อาจส่งผลทำให้เอนไซม์ *THCAS* และ *CBDAS* ไม่สามารถ

เปลี่ยนสาร CBGA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นไปเป็นสาร THCA และ CBDA ได้ทำให้เกิดการสะสมของสาร CBGA ขึ้นในกัญชา Type IV ซึ่ง SNP ดังกล่าวอยู่ที่ตำแหน่ง 1064 บนยีน *THCAS* เป็นตำแหน่งสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์กัญชาโดยการเลือกกัญชา Type IV ได้ จากรายงานฉบับนี้ทำให้เห็นถึงความแตกต่างของเทคนิคที่ใช้ในการศึกษา SNP ได้แก่เทคนิค TaqMan assay ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้การติดฉลาก Probe ด้วยสี Fluorescence ทำให้ได้ผลวิเคราะห์รวดเร็วแบบ Real-time มีความแม่นยำสูงและใช้เวลาน้อยกว่าโดยใช้วิธีการอ่านลำดับพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Pyrosequencing ที่มีความแม่นยำสูงเช่นกัน และทั้งสองเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ SNP (Nordfors et al., 2002) นอกจากนี้เทคนิค Pyrosequencing ในปัจจุบันเมื่อวิเคราะห์โดยเครื่อง PyroMark® Q48 Autoprep ทำให้สามารถวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของ Allele ที่ต้องการศึกษาได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยของผู้วิจัยยังขาดการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนโดยเทคนิคเฉพาะซึ่งเป็นสิ่งสำคัญเพื่อที่จะเข้าใจการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร Cannabinoid ของกัญชาจึงจำเป็นต้องว่าควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตต่อไป



ตารางที่ 4.3 แสดงตำแหน่ง SNP และเปอร์เซ็นต์ Allele ระหว่างกัญชา Type I และ Type III ในยีน *THCAS* โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing และแสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนและทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนที่ตำแหน่งต่าง ๆ

Strain	Chemotype	SNP positions											
		612	678	699	744	749	763	862	864	869	881	885	887
WT	I	T (86%)	G/A (59:41%)	T/A (57:43%)	G (97%)	C (98%)	T (92%)	G/A (66:34%)	A (86%)	T (82%)	T/G (75:25%)	A/T	A
LOP-1	I	0	G/A (71:29%)	T/A (70:30%)	G (74%)	C (85%)	T (98%)	G/A (78:22%)	A (86%)	T (86%)	T (85%)	A/T	A
LOP-2	I	0	G/A (27:73%)	T/A (28:72%)	0	0	0	G/A (52:48%)	A (84%)	T (86%)	T (76%)	A/T	A
SP	I	T (88%)	G/A (49:51%)	T/A (45:55%)	G (99%)	C (98%)	T (100%)	G/A (72:28%)	A (87%)	T (87%)	T (76%)	A/T	A
PT	I	T (80%)	G/A (45:55%)	T/A (44:56%)	G (91%)	C (91%)	T (92%)	G/A (73:27%)	A (88%)	T (86%)	T (76%)	A/T	A
CHP	I	T (82%)	G (77%)	T (78%)	G (96%)	C (96%)	T (96%)	G (85%)	A (90%)	T (94%)	T (83%)	A/T	A
KRKW	I	T/C (31:69%)	G/A (28:72%)	T/A (27:73%)	G/T (38:62%)	C/T (41:59%)	T/G (38:62%)	G/A (32:68%)	A/G (60:40%)	T/C (51:49%)	T/G (41:59%)	A/T	A/G
KD	I	T (81%)	G/A (64:36%)	T/A (57:43%)	G (96%)	C (100%)	T (86%)	G/A (69:31%)	A (90%)	T (86%)	T (77%)	A/T	A
KK	I	C (82%)	A (77%)	A (78%)	T (81%)	T (84%)	T/G (26:74%)	A (75%)	A/G (70:30%)	T/C (51:49%)	G (80%)	T	A/G
BRR	III	C (77%)	A (76%)	T/A (26:74%)	T (84%)	T (80%)	T/G (27:73%)	A (81%)	A/G (53:47%)	T/C (37:63%)	G (79%)	T	A/G
DNM	III	C (97%)	A (87%)	A (86%)	T (100%)	T (91%)	G (87%)	A (93%)	G (77%)	C (83%)	G (91%)	T	G
CRST	III	C (87%)	A (82%)	A (80%)	T (88%)	T (87%)	G (81%)	A (82%)	A/G (52:48%)	T/C (34:66%)	G (86%)	T	A/G
CHLA	III	C (89%)	A (85%)	A (87%)	T (83%)	T (76%)	T/G (27:73%)	A (78%)	A/G (58:42%)	T/C (38:62%)	T/G (27:73%)	T	A/G
SNP		T→C	G→A	T→A	G→T	C→T	T→G	G→A	A→G	T→C	T→G	A→T	A→G
Amino acid position		204	226	233	248	250	255	288	288	290	294	295	296
Amino acid change*		NS	NS	NS	NS	A→V	S→A	V→M	V→M	M→T	I→A	NS	K→R
Predicted class**		-	-	-	-	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral	Functional	Functional	-	Neutral

* NS หมายถึงมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Substitution) แต่ไม่เกิดการเปลี่ยนชนิดของ amino acid (Synonymous SNP) ** (-) หมายถึงไม่มีการทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน, 0 คือ missing

4.2.4.4 การวิเคราะห์ SNPs ของยีน *CBDAS* โดย Pyrosequencing

จากการวิเคราะห์ SNP และ InDel ของยีน *CBDAS* ที่ตำแหน่ง SNP 583, 584, 588, 637 และ ตำแหน่ง InDel 758-760 (3 bp InDel) โดยเทคนิค Pyrosequencing (ตารางที่ 4.4) พบว่าตำแหน่งที่ 583 ในกัญชา Type I พบ SNP (A/C) ทั้งหมดยกเว้นพันธุ์ SP พบ SNP (A) ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับกัญชา Type III ที่พบ SNP (A) ยกเว้น CRST และ CHLA พบ SNP (A/C) จึงทำให้ตำแหน่งนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ THC สูง (Type I) และ CBD สูง (Type III) ได้

ตำแหน่ง 584 ในกัญชา Type I พบ SNP (T) ขณะที่กัญชา Type III พบ SNP (G) สอดคล้องกันทั้งหมดยกเว้นพันธุ์ CRST และ CHLA ที่เป็นกัญชา Type III ควรพบ SNP (G) แต่กลับพบ SNP (T) แทน ในตำแหน่งที่ 588 ในกัญชา Type I พบ SNP (T) และ กัญชา Type III พบ SNP (C) สอดคล้องกันทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ CRST และ CHLA ที่เป็นพันธุ์ Type III ควรพบ SNP (G) แต่กลับพบ SNP (T) แทน นอกจากนี้ตำแหน่งที่ 613 ในกัญชา Type I พบ SNP (A/G) ขณะที่ Type III พบ SNP (A) สอดคล้องกันทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ CRST และ CHLA ที่เป็นพันธุ์ Type III แต่กลับพบพบ SNP (A/G)

ต่อมาตำแหน่งที่ 637 ในกัญชา Type I พบ SNP (G) ยกเว้น WT, LOP-1, LOP-2, CHP, KRKW พบ SNP (C/G) ขณะที่ Type III พบ SNP (C) ในพันธุ์ DNM นอกนั้น พบ SNP (C/G) ในพันธุ์อื่น ๆ ทำให้ไม่สามารถใช้ Allele ในตำแหน่งแยกพันธุ์กัญชา Type I กับ Type III ได้

4.2.4.5 ผลการแปลรหัสพันธุกรรม (Codon) เป็นกรดอะมิโน

ตำแหน่ง 583 และ 584 นั้นเมื่อแปลรหัสพันธุกรรมเป็นกรดอะมิโนพบว่าเป็น Non-Synonymous SNP ทำให้เกิดการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนโดยเมื่อแปลรหัสพันธุกรรมเป็นกรดอะมิโนเป็นตำแหน่งที่ 195 กรดอะมิโนจาก Arginine (Arg, R) ไปเป็น Isoleucine (Ile, I) หรือ Leucine (Leu, L) หรือ Arg→Ile, Leu จัดอยู่ใน Functional class ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวมีผลทำให้หน้าที่ของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงไปทำให้คาดว่าตำแหน่งดังกล่าวส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *CBDAS* ขณะที่ตำแหน่ง 588 พบว่าเป็น Synonymous SNP กล่าวคือ SNP ตำแหน่งดังกล่าวไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนตำแหน่งนี้จึงไม่นำไปทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน และ ตำแหน่งที่ 613 และ 637 เป็น Non-Synonymous SNP ทำให้เกิดการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนโดยเมื่อแปลรหัสพันธุกรรม แล้วเป็นตำแหน่งที่ 205 (Ile→Val) และตำแหน่งที่ 213 (His→Asp)

สำหรับตำแหน่งที่ 758-760 ที่เกิดการเพิ่มขึ้นหรือหายไปของ นิวคลีโอไทด์ (InDel) ทั้งหมด 3 bp ในกัญชา Type I พบ การเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์

(Insertion) ของนิวคลีโอไทด์ CAA ทุกพันธุ์ ยกเว้นพันธุ์ LOP-2 ที่เกิดการหายไปของนิวคลีโอไทด์ (Deletion) ขณะที่กัญชา Type III พบการเกิด Deletion ในพันธุ์ BRR และ DNM ขณะที่พันธุ์ CRST และ CHLA พบการเกิด Insertion ซึ่งการเกิด Deletion ทำให้เกิด Protein Gap ที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน CBDAS

นอกจากนี้พบว่าตำแหน่ง 583 บนยีน CBDAS ในกัญชา Type I มี Genotype แบบ Heterozygous ของ A และ C Allele (A/C) จำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ WT, LOP-1, LOP-2, PT, CHP, KRKW, KD และ KK โดยมีเปอร์เซ็นต์ของ A/C allele ที่ 52:48%, 59:41%, 57:43%, 73:27%, 35:65%, 58:42%, 46:54% และ 46:54% ตามลำดับ ยกเว้นพันธุ์ SP ที่ควรมี A/C allele แต่กลับมี Genotype แบบ Homozygous ของ A allele (A/A) ที่ 82% ในขณะที่กัญชา Type III จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ BRR และ DNM มี Genotype แบบ Homozygous ของ A allele (A/A) ที่ 85% และ 97% ตามลำดับ แต่กัญชา Type III อีก 2 พันธุ์ ได้แก่ CRST และ CHLA ที่ควรมี A/A allele แต่กลับมี Genotype แบบ Heterozygous ได้แก่ A/C allele ที่ 58:42% และ 72:28% ตามลำดับ

ในขณะเดียวกันตำแหน่งที่ 584 พบว่ามี Genotype แบบ Homozygous ของ T allele (T/T) ในกัญชา Type I ทั้งหมด ได้แก่ WT, LOP-1, LOP-2, SP, PT, CHP, KRKW, KD และ KK ที่ 89%, 88%, 79%, 85%, 82%, 96%, 94%, 87% และ 83% ตามลำดับ ในขณะที่กัญชา Type III มี Genotype แบบ Homozygous ได้แก่ G allele (G/G) จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ BRR และ DNM ที่ 91% ทั้งสองพันธุ์ แต่พันธุ์ CRST และ CHLA ที่เป็นกัญชา Type III กลับพบว่าเป็น Genotype แบบ Homozygous ของ T allele (T/T) ที่ 86% และ 93% ซึ่งเป็นลักษณะ Genotype เดียวกับกัญชา Type I

นอกจากนี้ที่ตำแหน่งอื่น ๆ บนยีน CBDAS ยังพบว่า SNP และ InDel ที่เกิดขึ้นคาดว่าเป็นแบบสุ่มทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกัญชา Type I และ Type III ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยจึงตัดยีน CBDAS ออกจากกลุ่มเป้าหมายในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.4 แสดงตำแหน่ง SNP และ InDel และเปอร์เซ็นต์ Allele ของพันธุ์กัญชา Type I และ Type III ในยีน *CBDAS* โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนที่ตำแหน่งต่าง ๆ

Name	Chemotype	SNP position					758-760 (3 bp InDel)
		583	584	588	613	637	
WT	I	A/C (52:48%)	T (89%)	T (88%)	A/G (54:46%)	C/G (40:60%)	C A A (100%)
LOP-1	I	A/C (59:41%)	T (88%)	T (93%)	A/G (56:44%)	C/G (48:52%)	C A A (81%)
LOP-2	I	A/C (57:43%)	T (79%)	T (90%)	A/G (65:35%)	C/G (43:57%)	- - - (67%)
SP	I	A (82%)	T (85%)	C/T (35:65%)	A/G (72:28%)	G (83%)	C A A (89%)
PT	I	A/C (73:27%)	T (82%)	C/T (37:63%)	A/G (65:35%)	G (81%)	C A A (97%)
CHP	I	A/C (35:65%)	T (96%)	T (93%)	A/G (31:69%)	C/G (54:46%)	C A A (92%)
KRKW	I	A/C (58:42%)	T (94%)	T (93%)	A/G (56:44%)	C/G (53:47%)	C A A (92%)
KD	I	A/C (46:54%)	T (87%)	T (89%)	A/G (56:44%)	G (78%)	C A A (100%)
KK	I	A/C (46:54%)	T (83%)	T (93%)	A/G (54:46%)	G (81%)	C A A (100%)
BRR	III	A (85%)	G (91%)	C (89%)	A (82%)	C/G (70:30%)	- - - (95%)
DNM	III	A (97%)	G (91%)	C (99%)	A (96%)	C (86%)	- - - (87%)
CRST	III	A/C (58:42%)	T (86%)	T (91%)	A/G (57:43%)	C/G (34:66%)	C A A (77%)
CHLA	III	A/C (72:28%)	T (93%)	T (82%)	A/G (70:30%)	C/G (63:37%)	C A A (100%)
SNP		A→C	G→T	C→T	A→G	C→G	T, K → -
Amino acid Position		195	195	196	205	213	253, 254
Amino acid change		Arg→Ile, Leu	Arg→Ile, Leu	NS	Ile→Val	His→Asp	Protein gap
Predicted class		Functional		NP	Neutral	Neutral	NP

NS หมายถึงมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์แต่ไม่เกิดการเปลี่ยนชนิดของ กรดอะมิโน (Synonymous SNP), NP หมายถึงไม่มีการทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน, (-) คือ การหายไปของนิวคลีโอไทด์

4.3 การยืนยันประสิทธิภาพในการทำนาย Chemotype ของเครื่องหมาย SNP

จากการวิเคราะห์ Allele บนตำแหน่ง SNP โดยเทคนิค Pyrosequencing ของกัญชาลูกผสม F1 (DCP22) จำนวน 10 ต้น ซึ่งได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ DNM และ CHP (DNM x CHP) และการวิเคราะห์ปริมาณสาร THC และ CBD ในช่อดอกตัวเมียโดยใช้ HPLC (ตารางที่ 4.5) พบว่าตำแหน่งที่ 869 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THCAS* กัญชาพันธุ์ DNM ซึ่งเป็นต้นแม่จัดอยู่ในกัญชา Type III (High CBD) มี Genotype แบบ Homozygous ของ C allele ที่ 83% โดยจากเอกสาร Certificate of analysis (COA) ของพันธุ์ DNM มีปริมาณสาร THC 0.9% และ CBD 9% ในขณะที่พันธุ์ CHP ซึ่งเป็นต้นพ่อจัดอยู่ในกัญชา Type I (High THC) มี Genotype แบบ Homozygous ของ T allele ที่ 94% แต่เนื่องจากเป็นกัญชาเพศผู้จึงไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสาร THC และ CBD ในการยืนยันประสิทธิภาพของ SNP ตำแหน่ง 869 ในยีน *THCAS* เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกัญชา Type I และ Type III กัญชาลูกผสม DCP22 จำนวน 10 ต้น ได้แก่ DCP22-1 DCP22-2, DCP22-3, DCP22-4, DCP22-5, DCP22-6, DCP22-7, DCP22-8, DCP22-9 และ DCP22-10 พบว่าทั้งหมดมี Genotype เป็นแบบ Heterozygous ที่มีปริมาณ T:C ที่ 45:55%, 36:64%, 71:29%, 41:59%, 55:45%, 47:53%, 55:45%, 31:69%, 32:68% และ 59:41% ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงสัดส่วนที่แตกต่างกันของทั้งสอง Alleles โดยมีลูกผสม 6 ต้นที่มีเปอร์เซ็นต์ของทั้งสอง Alleles ใกล้เคียงกันและ 4 ต้นที่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของ C allele ที่สูงกว่า T allele อย่างชัดเจนและมีเพียง 1 ต้น ที่พบว่ามีค่า T allele สูงกว่า C allele ซึ่งเป็นต้นเดียวที่มีปริมาณสาร THC สูงกว่า CBD เปอร์เซ็นต์ของ Alleles ดังกล่าวนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณสาร THC และ CBD ที่วิเคราะห์ได้จึงคาด T allele เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *THCAS* และ C allele เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *CBDAS* โดยต้นที่มีสัดส่วนของ C allele ที่สูงกว่า T allele นั้นมักจะมีปริมาณสาร CBD สูงกว่า THC จากผลของค่า Alleles ที่พบซึ่งทำให้สามารถคาดการณ์แนวโน้มในการสร้างสาร THC และ CBD ของกัญชาได้ โดยที่ตำแหน่ง 869 ลูกผสมทั้งหมดพบค่า C allele ที่สูงกว่า T allele และมีปริมาณสาร CBD สูงกว่า THC และมีเพียงหนึ่งต้นที่เป็นในทางตรงกันข้ามทำให้สรุปได้ว่ายีน *CBDAS* นั้นเป็น Dominant แสดงออกขมยีน *THCAS* และการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Genetic Inheritance) ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร Cannabinoids นั้นเป็น Quantitative trait loci (QTL) ซึ่งหมายถึงการแสดงออกดังกล่าวถูกควบคุมโดย Minor genes หรือ Gene family และสิ่งแวดล้อมยังมีผลต่อการแสดงออกดังกล่าวอีกด้วย (Wenger et al., 2020) อย่างไรก็ตามเมื่อสัดส่วนของ Alleles ทั้งสองมีความใกล้เคียงกันการดูแลแนวโน้มของปริมาณสาร THC และ CBD ทั้งนี้เพราะการผลิตสาร THC และ CBD ไม่ได้ควบคุมโดยยีน *THCAS* หรือ *CBDAS* เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่งแต่อาจควบคุมโดยยีนหลายยีน (Multiple genes) ข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับ

รายงานของ Vergara et al. (2019) ที่พบข้อมูลที่สนับสนุนว่าการผลิตสาร Cannabinoids เกิดขึ้นจากการแสดงออกของยีนหลายยีน ยิ่งกว่านั้นรายงานของ Grassa et al. (2021) ที่ได้ทำการศึกษา Genome assembly และทำ Genetic mapping จึงสามารถระบุตำแหน่งของยีน *THCAS* และ *CBDAS* ที่อยู่บน Chromosome 7 ได้ งานวิจัยดังกล่าวสามารถอธิบายการผลิตสาร THC และ CBD ว่าเกิดจากการแสดงออกของยีนหลายยีนที่อยู่บน Locus กัน อีกทั้งการผลิตสาร Cannabinoids ทั้งหมดอาจเกี่ยวข้องกับยีนอื่นที่อยู่บน Chromosome อื่นนอกจากยีน *THCAS* และ *CBDAS*

นอกจากนี้ตำแหน่ง 881 พบว่าพันธุ์ DNM มี Genotype แบบ Homozygous ของ G allele ที่ 91% ในทางตรงกันข้ามพบว่าพันธุ์ CHP มี Genotype แบบ Homozygous ของ T allele ที่ 83% ในขณะที่พันธุ์ DCP22-1 และ DCP22-2 พบว่าเป็นแบบ Homozygous ของ G allele ที่ 79% และ 78% ส่วนพันธุ์ DCP22-3, DCP22-4, DCP22-5, DCP22-6, DCP22-7, DCP22-8, DCP22-9 และ DCP22-10 มี Genotype แบบ Heterozygous ของ T/G ที่ 60:40%, 29:71%, 43:57%, 42:58%, 48:52%, 25:75%, 16:84% และ 32:68% ตามลำดับ จึงคาดว่าตำแหน่งที่ 881 บนยีน *THCAS* นั้น T allele ส่งผลต่อการผลิตสาร THCA ส่วน G allele มีผลต่อการผลิตสาร CBDA

ถึงแม้ว่างานวิจัยนี้มีจำนวนประชากรของกัญชาน้อยเกินไปสำหรับการศึกษาทางพันธุกรรมอีกทั้งปริมาณสาร Cannabinoids ที่ตรวจพบยังอาจมีผลมาจากสภาพแวดล้อมและปัจจัยอื่น ๆ เช่น แสง อุณหภูมิ คาร์บอนไดออกไซด์ สารอาหาร อายุ และอื่น ๆ (Trancoso et al., 2022) จากรายงานของ Aizpurua-Olaizola et al. (2016) แสดงให้เห็นถึงสาร Cannabinoids ที่ต่างกันในช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยวต่างกันอีกทั้งสาร Cannabinoids แต่ละชนิดยังมีช่วงเวลาที่ผลิตมากหรือน้อยแตกต่างกันอีกด้วย อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังสามารถยืนยันตำแหน่ง SNP ที่มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ นั่นก็คือ SNP ตำแหน่งที่ 869 บนยีน *THCAS* โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อกัญชามี Homozygous alleles จะสามารถใช้ในการทำนาย Chemotype ของกัญชาได้อย่างแม่นยำตัวอย่างเช่นพันธุ์ DNM ที่พบ Homozygous ของ C allele สามารถทำนายได้ว่าพันธุ์ดังกล่าวนั้นเป็นกัญชาที่มีสาร CBD สูง (Type III) แต่เครื่องหมายโมเลกุลไม่สามารถบอกปริมาณของสาร Cannabinoids ได้ การวิเคราะห์ปริมาณสาร Cannabinoids โดย HPLC หรือเทคนิคอื่น ๆ จึงยังคงมีความสำคัญในการยืนยันปริมาณสารดังกล่าว

ตารางที่ 4.5 แสดงตำแหน่ง SNP และ เปอร์เซ็นต์ Allele ของกัญชาลูกผสม F1 ของ DNM x CHP (DCP22) โดยเทคนิค Pyrosequencing และแสดงปริมาณสาร THC และ CBD ที่วิเคราะห์โดย HPLC

Name	SNP position				Cannabinoid content (%)	
	862	864	869	881	THC	CBD
DNM	G (85%)	A (90%)	C (83%)	G (91%)	0.5	9
CHP*	A (93%)	G (77%)	T (94%)	T (83%)	ND	ND
DCP22-1	A (77%)	A/G (74:26%)	T/C (45:55%)	G (79%)	1.85	2.66
DCP22-2	A (83%)	A/G (61:39%)	T/C (36:64%)	G (78%)	2.51	4.48
DCP22-3	G/A (53:48%)	A (82%)	T/C (71:29%)	T/G (60:40%)	7.43	0.37
DCP22-4	A (78%)	A/G (63:37%)	T/C (41:59%)	T/G (29:71%)	4.30	6.58
DCP22-5	G/A (47:53%)	A/G (52:48%)	T/C (55:45%)	T/G (43:57%)	2.24	5.68
DCP22-6	G/A (32:68%)	A/G (38:62%)	T/C (47:53%)	T/G (42:58%)	1.13	4.86
DCP22-7	G/A (48:52%)	A/G (51:49%)	T/C (55:45%)	T/G (48:52%)	1.70	4.79
DCP22-8	G/A (31:69%)	A/G (38:62%)	T/C (31:69%)	T/G (25:75%)	3.16	6.29
DCP22-9	G/A (25:75%)	A/G (29:71%)	T/C (32:68%)	T/G (16:84%)	2.22	4.91
DCP22-10	G/A (45:55%)	A/G (55:45%)	T/C (59:41%)	T/G (32:68%)	2.06	4.75

* CHP เป็นกัญชาต้นตัวผู้ที่อยู่ใน Type I (high THC) จึงไม่ได้ศึกษาปริมาณ Cannabinoid (ND)

4.4 การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs โดยเทคนิค Tetra-primer ARMS-PCR

จากการศึกษาตำแหน่ง SNP บนยีน *THCAS* โดยเทคนิค Pyrosequencing ในข้อที่ 4.3 ทำให้ได้ตำแหน่งที่คาดว่าจะมีความสำคัญในการแสดงออกของยีน *THCAS* ได้แก่ตำแหน่งที่ 869 และ 881 ผู้วิจัยจึงได้ทำการเลือกตำแหน่งที่ 869 (T/C) เพื่อออกแบบ Tetra primer สำหรับตรวจศึกษาลูกผสมเนื่องจากตำแหน่งดังกล่าวในลูกผสม DCP22 ทั้ง 10 ต้น นั้นมี Genotype แบบ Heterozygous ทั้งหมดในขณะที่พันธุ์พ่อแม่มี Genotype แบบ Homozygous ของ Allele ที่แตกต่างกันจึงสามารถใช้ในการตรวจสอบศึกษาลูกผสมในลักษณะนี้โดยใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ได้ โดยการออกแบบ Tetra primer ใช้โปรแกรม Primer1 (Primer1.soton.ac.uk/primer1.html) Tetra primer ผลที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 4.6

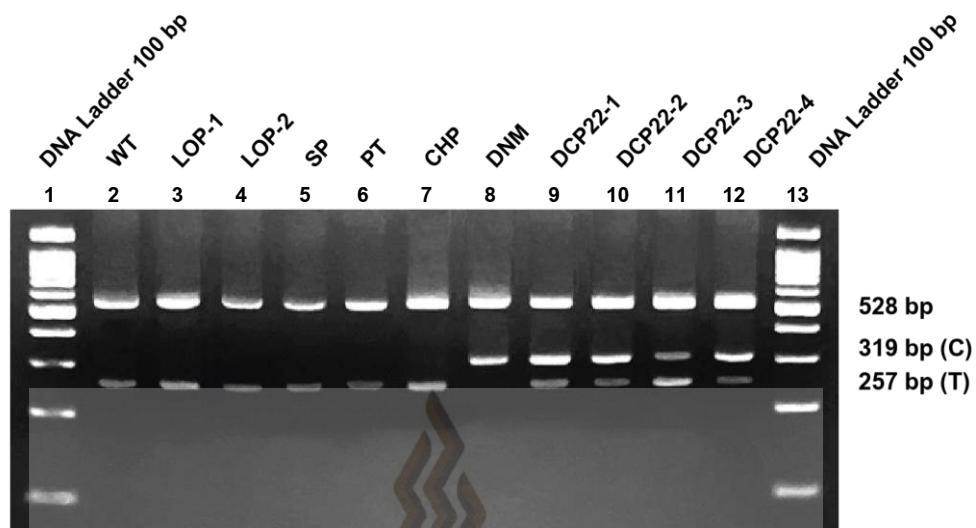
จากการใช้ Tetra-primer ในการทำปฏิกิริยา PCR นำผลผลิต PCR แยกขนาดบน Agarose gel electrophoresis (รูปที่ 4.5) พบว่าศึกษา Type I ได้แก่ WT, LOP-1, LOP-2, SP, PT และ CHP ที่เป็นพันธุ์พ่อแม่ DNA ที่ออกแบบสำหรับตรวจ SNP ของ T allele ที่ให้ผลผลิต PCR ขนาด 257 bp ในขณะเดียวกันพบว่าศึกษา Type III ได้แก่ DNM ที่เป็นพันธุ์แม่พ่อแม่ DNA ที่ออกแบบสำหรับตรวจสอบ SNP ของ C allele ที่ให้ผลผลิต PCR ขนาด 319 bp นอกจากนี้ยังพบว่าลูกผสมได้แก่ DCP22-1, DCP22-2, DCP22-3 และ DCP22-4 มีแถบ DNA จำนวน 2 แถบ ได้แก่แถบที่มีขนาด 257 bp และ 319 bp หรือตรวจพบทั้งสอง Allele ได้แก่ T/C ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้จากการใช้เทคนิค Pyrosequencing ที่แสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.5 จึงสามารถใช้ Tetra primer ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการแยกศึกษา Type I และ Type III รวมถึงตรวจสอบศึกษาลูกผสมได้ เทคนิค Tetra-primer ARMS-PCR เป็นเทคนิคที่ต้นทุนต่ำ หลักการทำงานไม่ซับซ้อน สามารถใช้ในการตรวจ Genotyping เพื่อศึกษา SNP โดยทำปฏิกิริยา PCR เพียงรอบเดียวและสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ Agarose gel electrophoresis (Medrano & de Oliveira, 2014) มีการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหา SNP เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์มากมายเช่นรายงานของ Leonela, Beatriz, Soledad, Elfrida, and Ester (2020) ที่ทำการปรับปรุงเทคนิค Tetra-primer ARMS-PCR ให้เหมาะสมกับการตรวจหา SNP rs267729 ที่อยู่บริเวณ Promoter ของยีน *ADIPOQ* ในผู้ป่วยโรคเบาชนิดที่ 2 ที่อยู่ในเมือง San Luis จากรายงานพบว่าเทคนิค Tetra-primer ARMS-PCR ที่ปรับปรุงแล้วนั้นเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ หลักการไม่ซับซ้อน และค่อนข้างประหยัด สำหรับวิเคราะห์ Genotyping ในการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมยีนดังกล่าวที่อยู่บริเวณ Promoter ของมนุษย์และยังสามารถใช้เพื่อตรวจสอบการแปรผันทางพันธุกรรมอื่น ๆ ของมนุษย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Suhda, Paramita, and Fachiroh (2016) ที่ทำปฏิกิริยา Tetra-primer ARMS-PCR ที่เหมาะสมในการตรวจหา SNP ที่อยู่ในยีน Cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ

โรคมะเร็ง จากรายงานทำให้ได้ปฏิบัติการ Tetra-primer ARMS-PCR ที่เหมาะสมและมีความแม่นยำในการตรวจหา SNP ดังกล่าว แต่เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ได้เพียงเบื้องต้นไม่สามารถวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิด Heterozygous และ Homozygous ได้ อย่างไรก็ตาม เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสาร Cannabinoids ในกัญชาได้เพียงแต่ผลที่ได้สามารถใช้เพื่อดูแนวโน้ม (Trend) ของการแสดงออกของยีน *THCAS* และ *CBDAS* ซึ่งมีผลต่อการผลิตสาร THCA และ CBDA เพื่อช่วยในการคัดเลือกต้นกัญชาในการปรับปรุงพันธุ์ทำให้ใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกน้อยลง ใช้เวลาในการปรับปรุงพันธุ์น้อยลง ประหยัดทรัพยากรที่ใช้ในการเพาะปลูก และแรงงานที่ใช้เนื่องจากสามารถคัดเลือกต้นที่ต้องการได้ตั้งแต่ระยะ Seedling stage จึงไม่ต้องปลูก ดูแล รักษา กัญชาหลายต้น จนถึงขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและวิเคราะห์ปริมาณสาร Cannabinoids จึงทำให้ต้นทุนในการวิเคราะห์สารด้วย HPLC ถูกลงอีกด้วย ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณสาร Cannabinoids ในดอกกัญชายังคงมีความสำคัญในการยืนยันปริมาณสารดังกล่าวแต่ในการปรับปรุงพันธุ์สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยเพื่อคัดเลือกต้นที่ต้องการทำให้ประหยัดต้นทุนและเวลาที่ใช้เพื่อให้บรรลุเป้าหมายในการปรับปรุงพันธุ์รวดเร็วและถูกต้องมากขึ้นจากวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบเดิมที่ไม่ได้ใช้ MAS เข้าช่วย

ตารางที่ 4.6 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของ Tetra primer ที่ใช้ในการตรวจหา SNP ที่ตำแหน่ง 869 บนยีน *THCAS* และ Product size ของ Target allele

Name	Primer Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Target allele*
Forward outer	ATGTTGATGGAAAAGTTCTAGAT	528	
Reverse outer	AGTCTAACTTAATTGAGAAAGCC		
Forward inner	ACAAGTATGACAAAGATTTAGTACT <u>AA</u> C	319	C
Reverse inner	CTTTGTTATGAAGTGAGG <u>CA</u>	257	T

*Specific allele at SNP position 869: C allele represents Type III cannabis while T allele represents Type I cannabis. Underline = mismatch. Arrow (red font) = nucleotide that designed for a specific allele.



รูปที่ 4.5 แสดงแถบ DNA ของกัญชาแต่ละพันธุ์ที่ตรวจสอบได้โดย Tetra primer ที่ออกแบบจาก SNP ที่ตำแหน่ง 869 ของยีน *THCAS* Lane ที่ 1 และ 13 คือ DNA Ladder 100 bp (SMOBIO, Taiwan) Lane ที่ 2-7 เป็นพันธุ์กัญชา Type I, Lane ที่ 8 เป็นพันธุ์กัญชา Type III ที่ให้แถบ DNA ขนาด 257 และ 319 bp ตามลำดับ Lane ที่ 8-12 เป็นพันธุ์ผสมให้แถบ DNA ทั้ง 2 แถบ

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษา SNPs ที่อยู่บนยีน *THCAS* และ *CBDAS* โดย *In silico* และทำการทำนายผลที่ได้จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนที่เกิดจาก SNPs ตำแหน่งนั้น ๆ โดยโปรแกรม PPVED และทำการยืนยันในกัญชาจริงโดยเทคนิค Pyrosequencing ทำให้พบ SNPs ที่คาดว่าจะมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน *THCAS* และมีประสิทธิภาพในการทำนาย Type ของกัญชาระหว่าง Type I และ Type III ได้แก่ SNPs ตำแหน่งที่ 869 (SNP T/C) และ 881 (SNP T/G) บนยีน *THCAS* ที่เมื่อแปลรหัสพันธุกรรมเป็นกรดอะมิโนแล้วพบว่าตำแหน่งดังกล่าวมีกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปโดย SNPs ตำแหน่งที่ 869 และ 881 เมื่อแปลรหัสแล้วเป็นตำแหน่งที่ 290 และ 294 โดยตำแหน่งที่ 290 พบว่าจาก Methionine (Met, M) เปลี่ยนเป็น Threonine (Thr, T) และตำแหน่งที่ 294 พบว่าจาก Isoleucine (Ile, I) เปลี่ยนเป็น Alanine (Ala, A) และจากการทำนายด้วยโปรแกรม PPVED พบว่าทั้งสองตำแหน่งจัดอยู่ใน Functional class ซึ่งหมายถึงตำแหน่งดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีนจึงคาดว่าตำแหน่งทั้งสองอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *THCAS* และผลการศึกษาโดยเทคนิค Pyrosequencing ในพันธุ์กัญชาจริงนั้นมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาโดย *In silico* และเมื่อทำการผสมกัญชา Type I กับ Type III นำลูกผสม F1 มาทำการวิเคราะห์ SNP และปริมาณสาร Cannabinoid พบว่ายีนที่ควบคุม CBD เป็นยีนเด่นเหนือ THC อีกทั้งยังทำให้ทราบอัตราส่วนของ Allele ในกัญชาแต่ละต้นซึ่งทำให้สามารถใช้ช่วยในการเลือกกัญชาที่มี Genotype ที่ต้องการในการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วยเทคนิค Pyrosequencing หลังจากนั้นได้ทำการออกแบบ Tetra-primer ARMS-PCR เพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์กัญชาโดยใช้ตำแหน่งที่ 869 ผลที่ได้ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถตรวจหา SNP โดยตรวจสอบผ่านการใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis ทำให้สามารถตรวจพบ Genotype ทั้งแบบ Heterozygous และ Homozygous ได้ทั้งจากต้นพ่อแม่และลูกผสมได้ในราคาที่ประหยัด เครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จึงสามารถนำไปใช้ช่วยในการคัดเลือกกัญชาลูกผสมที่มี Genotype ที่ต้องการได้เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กัญชาให้มีลักษณะพันธุกรรมที่ต้องการต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนต้นกัญชาที่ใช้ทำให้การตรวจสอบยืนยันผลประสิทธิภาพของ SNP ที่มีค่อนข้างน้อยและทำการวิเคราะห์ยืนยันผลเฉพาะลูกชั่วที่ 1 (F1) สำหรับการศึกษาทางด้าน Genetic effect และ Chemotype inheritance จึงมีข้อแนะนำในอนาคตว่าควรตรวจสอบยืนยันโดยใช้กัญชาจำนวนมากขึ้นเพื่อให้ได้ผลที่มีความชัดเจนและได้ข้อมูลที่มากขึ้นและควรมีการนำลูกผสมนี้ไปทำการผสมกลับ (Back cross) กับพันธุ์พ่อหรือแม่จะทำให้ได้ข้อมูลสมบูรณ์ขึ้น นอกจากนี้ยังควรศึกษาต่อยอดไปถึงเรื่องการแสดงออกของยีน *THCAS*, *CBDAS* และยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร Cannabinoids ตัวอื่น ๆ เช่น สาร *CBGA* และ *CBCA* เนื่องจากสาร *CBGA* นั้นเป็นสารตั้งต้นของสาร *THCA* และ *CBDA* จึงจัดว่ามีความสำคัญ ในขณะที่สาร *CBCA* นั้นก็เป็นสารที่มีสารตั้งต้นคือ *CBGA* เช่นกัน จึงคาดว่ายีน *CBCAS* นั้นอาจมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณสาร *THCA* และ *CBDA* ด้วย

ในการเลือกใช้เทคนิคในการศึกษา SNP นั้นขึ้นอยู่กับทุนและความพร้อมของห้องปฏิบัติการนั้น ๆ โดยเทคนิค Pyrosequencing เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์อัตราส่วนของ Allele ได้แต่ต้องมีเครื่อง Pyrosequencing และชุดตรวจสอบของบริษัทผู้ผลิตซึ่งมีราคาสูงในขณะที่ Tetra-primer ARMS-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ต้นทุนน้อยกว่าสามารถตรวจสอบ Genotype ได้โดยการทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบโดยใช้ Agarose gel electrophoresis แต่ไม่สามารถวิเคราะห์อัตราส่วนของ Allele ได้ เพื่อความสะดวก Tetra-primer ARMS-PCR ได้ถูกออกแบบสำหรับใช้งานในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือจำกัด แต่ต้องมีการปรับสภาพของการทำปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมให้สามารถวิเคราะห์ SNP ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในการเลือกใช้เทคนิคเพื่อวิเคราะห์ SNP และการนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลจึงขึ้นอยู่กับความพร้อมและทุน

บรรณานุกรม

- ราชกิจจานุเบกษา. (2562). ประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษเรื่องกำหนดลักษณะกัญชง (*Hemp*) พ.ศ. 2562. เล่ม 139 ตอนพิเศษ 264 ง หน้า 11 ประกาศใช้ 27 สิงหาคม 2562.
- ราชกิจจานุเบกษา. (2565). ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง สมุนไพรควบคุม (กัญชา) พ.ศ. 2565. เล่ม 139 ตอนพิเศษ 272 ง หน้า 3 ประกาศใช้ 11 พฤศจิกายน 2565.
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, Usobiaga, A. (2016). Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79(2), 324-331.
- Amom, T., & Nongdam, P. (2017). The Use of Molecular Marker Methods in Plants: A Review. *Int J Cur Res Rev*, 9(17), 1-7.
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., . . . Rahman, M. (2008). Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis sativa*: A Structure-Activity Study. *Journal of Natural Products*, 71, 1427-1430.
- Bailey, R., Pearson, B., Trigiano, R., & Gray, D. (2017). The Derivation of Modern *Cannabis* Varieties. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35, 1-21.
- Bledzki, A., Faruk, O., & Sperber, V. E. (2006). Cars from Bio-fibers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 291, 449-457.
- Brooks, L. D. (2003). Single Nucleotide Polymorphisms. In P.-Y. Kwok (Ed.), *Single Nucleotide Polymorphisms Methods and Protocols* (Vol. 212, pp. 1-4). Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Campbell, L., Dufresne, J., & Sabatinos, S. (2019). Cannabinoid Inheritance Relies on Complex Genetic Architecture. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 5(1), 105-116.
- Cascini, F., Farcomeni, A., Migliorini, D., Baldassarri, L., Boschi, I., Martello, S., . . . Bernardi, J. (2019). Highly Predictive Genetic Markers Distinguish Drug-Type from Fiber-Type *Cannabis sativa* L. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(11), 496.
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2017). *Cannabis sativa* L.: Botany and Horticulture. In S. Chandra, H. Lata, & M. Elsohly (Eds.), *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (pp. 79-100). Mississippi: Springer.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Collard, B., Jahufer, Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. (2005). An introduction to s, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142, 169-196.
- Costa, B. (2007). On the Pharmacological Properties of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC). *Chemistry & biodiversity*, 4, 1664-1677.
- de Meijer, E., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, v. m. c., Ranalli, P., & Mandolino, G. (2003). The Inheritance of Chemical Phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*, 163, 335-346.
- de Meijer, E., & Hammond, K. (2005). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (II): Cannabigerol predominant plants. *Euphytica*, 145, 189-198.
- de Meijer, E., Hammond, K., & Micheler, M. (2009a). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (III): variation in cannabichromene proportion. *Euphytica*, 165(2), 293-311.
- de Meijer, E., Hammond, K. M., & Sutton, A. (2009b). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (IV): Cannabinoid-free plants. *Euphytica*, 168, 95-112.
- Deiana, S. (2017). Chapter 99 - Potential Medical Uses of Cannabigerol: A Brief Overview. In V. R. Preedy (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (pp. 958-967). San Diego: Academic Press.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.
- Dragone, D., Prarolo, G., Vanin, P., & Zanella, G. (2018). Crime and the legalization of recreational marijuana. *Journal of Economic Behavior & Organization*, 159, 488-501.
- ElSohly, M., & Gul, W. (2014). *Handbook of Cannabis*. Oxford: Oxford University Press.
- Garfinkel, A. R., Otten, M., & Crawford, S. (2021). SNP in Potentially Defunct Tetrahydrocannabinolic Acid Synthase Is a Marker for Cannabigerolic Acid Dominance in *Cannabis sativa* L. *Genes*, 12(2), 228.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Gou, X., Feng, X., Shi, H., Guo, T., Xie, R., Liu, Y., . . . Lu, Y. (2022). PPVED: A machine learning tool for predicting the effect of single amino acid substitution on protein function in plants. *Plant Biotechnol J*, 20(7), 1417-1431.
- Grassa, C., Weiblen, G., Wenger, J., Dabney, C., Poplawski, S., Motley, T., . . . Schwartz, C. J. (2021). A new Cannabis genome assembly associates elevated cannabidiol (CBD) with hemp introgressed into marijuana. *The New Phytologist*, 230(4), 1665-1679.
- Hädener, M., König, S., & Weinmann, W. (2019). Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Science International*, 299, 142-150.
- Hazekamp, A., Fishedick, J., Llano-Diez, M., Lubbe, A., & Ruhaak, L. (2010). Chemistry of Cannabis. In *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Vol. 3, pp. 1033-1084). Oxford: Elsevier.
- Hazekamp, A., Fishedick, J. T., Díez, M. L., Lubbe, A., & Ruhaak, R. L. (2010). 3.24 - Chemistry of Cannabis. In H.-W. Liu & L. Mander (Eds.), *Comprehensive Natural Products II* (pp. 1033-1084). Oxford: Elsevier.
- Jehan, T., & Lakhanpaul, S. (2006). Single nucleotide polymorphism (SNP)–Methods and applications in plant genetics: A review. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 435-459.
- Kadri, K. (2019). *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications*. London: IntechOpen.
- Kojoma, M., Seki, H., Yoshida, S., & Muranaka, T. (2006). DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in “drug-type” and “fiber-type” Cannabis sativa L. *Forensic Science International*, 159, 132-140.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2017). *Cannabis sativa L. - botany and biotechnology*. Mississippi: Springer.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Leonela, O. R. A., Beatriz, D. S., Soledad, B. M. E., Elfrida, S. S., & Ester, V. G. M. (2020). Modified Tetra-Primer ARMS PCR optimization for detection of ADIPOQ rs267729 SNP (C>G) in type 2 diabetes patients in San Luis, Argentina population. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 10(02), 138-147.
- Liébecq, C. (1992). *Biochemical nomenclature and related documents: a compendium* (2nd ed.). London: Portland Press.
- Linares, I., Crippa, J., & Chagas, M. (2017). Beneficial Effects of Cannabis and Related Compounds on Sleep. In R. P. Victor (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment* (pp. 877-881). London: Academic Press.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments: JoVE*(63), e3998.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and biobanking*, 14(4), 264-270.
- Mandal, L., Verma, K. S., Sasmal, S., & Katara, J. (2018). Potential Applications of Molecular Markers in Plant. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*, 12(4), 555844.
- McPartland, J. M. (2018). Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 3, 203-212.
- McPartland, J. M., & Guy, G. W. (2017). Models of Cannabis Taxonomy, Cultural Bias, and Conflicts between Scientific and Vernacular Names. *The Botanical Review*, 83(4), 327-381.
- McPartland, J. M., Hegman, W., & Long, T. (2019). Cannabis in Asia: its center of origin and early cultivation, based on a synthesis of subfossil pollen and archaeobotanical studies. *Vegetation History and Archaeobotany*, 28, 691–702.
- Mead, A. (2017). The legal status of cannabis (marijuana) and cannabidiol (CBD) under U.S. law. *Epilepsy & Behavior*, 70, 288-291.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Medrano, R. F., & de Oliveira, C. A. (2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol Biotechnol*, 56(7), 599-608.
- Merfield, C. (1999). *Industrial hemp and its potential for New Zealand*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/277111429_Industrial_hemp_and_its_potential_for_New_Zealand.
- Messina, F., Rosati, O., Curini, M., & Marcotullio, M. C. (2015). Chapter 2 - Cannabis and Bioactive Cannabinoids. In R. Atta ur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 45, pp. 17-57). Oxford: Elsevier.
- Moliterni, V. M. C., Cattivelli, L., Ranalli, P., & Mandolino, G. (2004). The sexual differentiation of Cannabis sativa L.: A morphological and molecular study. *Euphytica*, 140(1), 95-106.
- Nordfors, L., Jansson, M., Sandberg, G., Lavebratt, C., Sengul, S., Schalling, M., & Arner, P. (2002). Large-scale genotyping of single nucleotide polymorphisms by Pyrosequencing™ and validation against the 5' nuclease (Taqman®) assay. *Human Mutation*, 19(4), 395-401.
- Onofri, C., de Meijer, E. P. M., & Mandolino, G. (2015). Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in Cannabis sativa L. and its relationship with chemical phenotype. *Phytochemistry*, 116, 57-68.
- Posselt, U. (2010). Breeding Methods in Cross-Pollinated Species. In B. Boller, U. Posselt & F. Veronesi (Eds.), *Fodder Crops and Amenity Grasses* (Vol. 5, pp. 39-87). New York: Springer.
- Ramirez, C. L., Fanovich, M. A., & Churio, M. S. (2019). Chapter 4 - Cannabinoids: Extraction Methods, Analysis, and Physicochemical Characterization. In R. Atta ur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 61, pp. 143-173). Oxford: Elsevier.
- Ranalli, P. (2004). Current status and future scenarios of hemp breeding. *Euphytica*, 140, 121-131.
- Ronaghi, M. (2003). Pyrosequencing for SNP Genotyping. In P.-Y. Kwok (Ed.), *Single Nucleotide Polymorphisms Methods and Protocols* (Vol. 212, pp. 189-194). Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.

บรรณานุกรม (ต่อ)

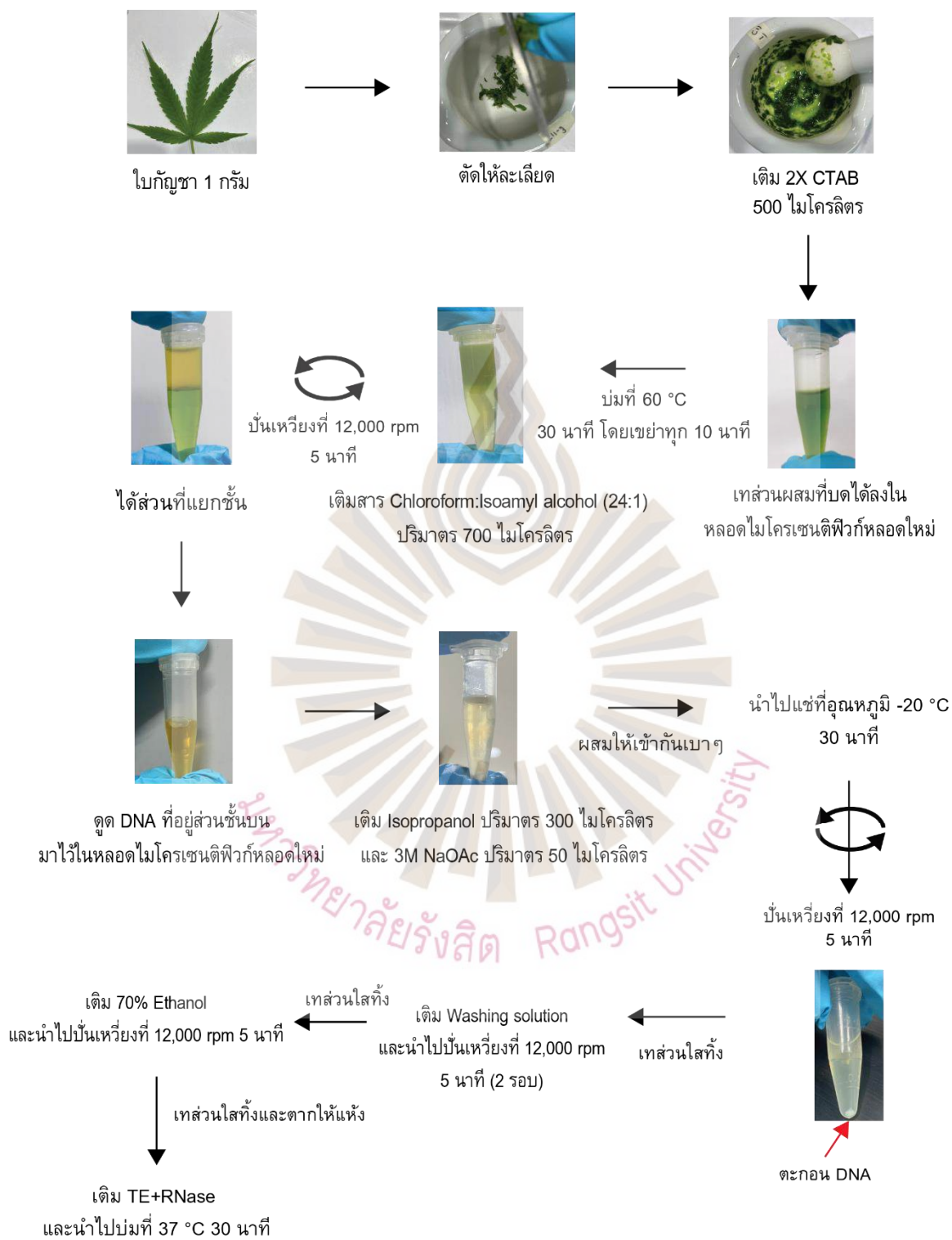
- Russo, E., & Guy, G. (2006). A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical hypotheses*, 66, 234-246.
- Russo, E., & Marcu, J. (2017). Chapter Three - Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. In D. Kendall & S. P. H. Alexander (Eds.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 80, pp. 67-134). Oxford: Academic Press.
- Salentijn, E. M. J., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M., & Trindade, L. M. (2015). New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*, 68, 32-41.
- Schilling, S., Dowling, C., Shi, J., Ryan, L., Hunt, D., Oreilly, E., . . . Melzer, R. (2020). *The Cream of the Crop: Biology, Breeding and Applications of Cannabis sativa*.
- Singh, D. P., Singh, A. K., & Singh, A. (2021). Chapter 27 - Molecular tools in crop improvement and cultivar development. In D. P. Singh, A. K. Singh, & A. Singh (Eds.), *Plant Breeding and Cultivar Development* (pp. 535-562). Oxford: Academic Press.
- Siqueira, J., Fouad, A., & Rôças, I. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of oral microbiology*, 4.
- Sirikantaramas, S., & Taura, F. (2017). Cannabinoids: Biosynthesis and Biotechnological Applications. In S. Chandra, H. Lata, & M. ElSohly (Eds.), *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (pp. 183–206). Cham: Springer.
- Small, E. (2015). Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *The Botanical Review*, 81(3), 189-294.
- Small, E. (2017). Classification of *Cannabis sativa* L. in Relation to Agricultural, Biotechnological, Medical and Recreational Utilization. In S. Chandra, H. Lata, & M. Elsohly (Eds.), *Cannabis sativa L. - botany and biotechnology* (pp. 79-84). Mississippi: Springer.
- Suhda, S., Paramita, D., & Fachiroh, J. (2016). Tetra primer ARMS PCR optimization to detect single nucleotide polymorphisms of the CYP2E1 gene. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 17, 3065-3069.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Trancoso, I., de Souza, G. A. R., dos Santos, P. R., dos Santos, K. D., de Miranda, R. M., da Silva, A. L., . . . Campostrini, E. (2022). Cannabis sativa L.: Crop Management and Abiotic Factors That Affect Phytocannabinoid Production. *Agronomy*, 12(7), 1492.
- Vergara, D., Huscher, E., Keepers, K., Givens, R., Cizek, C., Torres, A., . . . Kane, N. (2019). Gene copy number is associated with phytochemistry in Cannabis sativa. *AoB PLANTS*, 11, plz074.
- Weiblen, G., Wenger, J., Craft, K., Elsohly, M., Mehmedic, Z., Treiber, E., & Marks, M. (2015). Gene duplication and divergence affecting drug content in Cannabis sativa. *The New phytologist*, 208(4), 1241-1250.
- Wenger, J. P., Dabney, C. J., 3rd, ElSohly, M. A., Chandra, S., Radwan, M. M., Majumdar, C. G., & Weiblen, G. D. (2020). Validating a predictive model of cannabinoid inheritance with feral, clinical, and industrial Cannabis sativa. *Am J Bot*, 107(10), 1423-1432.
- Zuardi, A. (2006). History of Cannabis as a Medicine: A Review. *Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)*, 28, 153-157.

ภาคผนวก
การสกัด DNA

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	ธนัสสร ถวิลเชื้อ
วัน เดือน ปีเกิด	12 ธันวาคม 2539
สถานที่เกิด	จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปริญญาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา, 2562 มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ, 2567
ที่อยู่ปัจจุบัน	585 หมู่ 17 ตำบลศิลา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40000

