นิพนธ์ต้นฉบับ

การปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากกัญชาเพื่อผลิตสารสำคัญ

ทิพวรรณ ปรักมานนท์*, สรเพชร มาสุด, ปภาวดี สุฉันทบุตร
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000
***ผู้รับผิดชอบบทความ:** tipawan.phrug99@gmail.com*

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: กัญชา (*Cannabis sativa* L.) วงศ์ Cannabaceae มีการนำรากมาใช้เพื่อรักษาโรค ซึ่งสารฟริเดลิน (friedelin) เป็นสารออกฤทธิ์ชนิดหนึ่งที่พบในรากกัญชามีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ต้านออกซิเดชัน ต้านอักเสบ และบรรเทาอาการปวด สมุนไพรนี้มีการใช้ประโยชน์ทั้งทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตรากกัญชาด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากและผลิตสารสำคัญ

วิธีการศึกษา: นำเมล็ดกัญชามาฟอกฆ่าเชื้อ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) จนได้ ใบเลี้ยง ใบจริง และราก แล้วนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ จำนวน 6 สูตร เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดราก จากนั้นย้ายรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว แล้วนำรากแห้งมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฟริเดลินโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟ-เฟรมไอออนไนเซชั่น (GC-FID)

ผลการศึกษา: สูตรอาหารแข็งที่ดีที่สุดที่ชักนำให้เกิดรากคือ 1.25 × MS ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzylaminopurine ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1-naphthaleneacetic acid ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวต่อเป็นเวลา 15 วัน จะได้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของรากที่ได้จากใบเลี้ยง ใบจริง และราก เท่ากับ 0.35 ± 0.36, 0.41 ± 0.15 และ 0.40 ± 0.14 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และพบสารฟริเดลินเท่ากับ 86.2 ± 0.8, 97.1 ± 1.7 และ 57.5 ± 1.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

อภิปรายผล: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากกัญชาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำให้ผลิตรากกัญชาได้อย่างรวดเร็วและลดระยะเวลาในการปลูกแบบธรรมชาติ

ข้อสรุป: กรรมวิธีและสูตรอาหารนี้มีความเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากกัญชาเพื่อผลิตสารสำคัญ

คำสำคัญ: กัญชา, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อราก

Received date 01/12/23; Revised date 17/02/24; Accepted date 18/04/24

Establishing Root Culture of *Cannabis sativa* L. for the Production of Active Compounds

Tipawan Prakmanon*, Soraphet Masud, Papawadee Suyuttabuth

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Tiwanon Road, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

***Corresponding auther:** tipawan.phrug99@gmail.com*

Abstract

Introduction and Objective: The root of cannabis (*Cannabis sativa* L. in the family Cannabaceae) has been used for therapeutic purposes. Friedelin is an active ingredient present in cannabis roots and possesses antioxidant, anti-inflammatory and pain relief properties. The medicinal plant is widely used in traditional medicine and health products. The objective of this study was to produce cannabis roots using root culture and for the production of active compounds.

Methods: Cannabis seeds were sterilized and cultured on Murashige and Skoog (MS) solid medium until the seedling had cotyledons, true leaves and roots. The explants were then cultured on six different solid medium formulas to find a suitable medium for root formation. The roots obtained from the solid medium culture were then transferred to the liquid medium; and the dried roots were analyzed for friedelin contents using gas chromatrograph-frame ionization (GC-FID).

Results: The most suitable solid medium for root formation was 1.25 × MS which contained plant growth regulators 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid at the concentrations of 0.50 and 1.00 mg/L, respectively. After 15 days of culture in liquid medium, the weights of roots obtained from cotyledons, true leaves and roots were (mean ± SD) 0.35 ± 0.36, 0.41 ± 0.15 and 0.40 ± 0.14 grams with no significant differences at the 95% confidence level, and the amounts of friedelin obtained were 86.2 ± 0.8, 97.1 ± 1.7 and 57.5 ± 1.3 mg/kg, respectively.

Discussion: Root culture of cannabis using the plant tissue culture method quickly increased the production of cannabis roots in a shorter period of time than natural cultivation.

Conclusion and Recommendation: The developed process and medium formula are suitable for root culture of *Cannabis sativa* L. for the production of active compounds

Key words: cannabis, plant tissue culture, root culture

บทนำและวัตถุประสงค์

กัญชา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. ซึ่งอยู่ในวงศ์กัญชา (Cannabaceae) เป็นพืชล้มลุกอายุปีเดียว ดอกแยกเพศต่างต้น (dioecious) แต่อาจพบพืชกัญชาที่เป็นแบบดอกแยกเพศร่วมต้น (monoecious) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย มีประวัติการนำมาใช้ประโยชน์อย่างยาวนานโดยการนำส่วนต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นส่วนใบ ช่อดอกเพศเมีย และราก มาใช้ในการปรุงยาเพื่อรักษาโรค[1] กัญชามีส่วนประกอบของสารเคมีมากกว่า 450 ชนิด โดยมากกว่า 60 ชนิด เป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีองค์ประกอบหลักคือ Tetrahydrocannabinol

(THC) และสารชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน เช่น Cannabinol (CBN), Cannabidiol (CBD), Cannabichromene (CBC), Cannabigerol (CBG) เป็นต้น[2] สารออกฤทธิ์ในรากกัญชา ได้แก่ สารฟริเดลิน (friedelin) เป็นสารประกอบที่พบมากในรากกัญชามีสรรพคุณ แก้ปวด ลดไข้ ต้านอักเสบ นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มเทอร์พีน (terpene) ชื่ออีพิฟริเดลานอล (epifriedelanol) มีสรรพคุณต้านและยับยั้งการโตของเนื้องอก สารกลุ่มโมโนเทอร์พีน (monoterpene) เช่น คาร์โวน (carvone) และไดไฮโดรคาร์โวน (dihydrocarvone) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง สารอะโทรปีน (atropine) มีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อตาและขยายหลอดลมในปอด[3] รากกัญชามักมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากดิน ซึ่งการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์นั้นค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อราและแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ตามรอยแตกของรากหรืออาศัยอยู่ระหว่างเซลล์ การกำจัดเชื้อจุลินทรีย์จึงอาจทำให้เกิดความเสียหายแก่รากได้ นอกจากนี้ การนำรากกัญชาที่ปลูกจากธรรมชาติมาใช้ในการปรุงยารักษาโรคต่าง ๆ ต้องใช้รากจากต้นกัญชาที่มีอายุ 5 เดือน ดังนั้น การผลิตรากกัญชาด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อราก จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเพื่อลดปัญหาข้างต้น สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงได้ การผลิตรากกัญชาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใช้ระยะเวลาเพียง 2 เดือน ก็ทำให้ได้รากกัญชาที่มีคุณภาพ และสามารถเพิ่มปริมาณรากได้อย่างรวดเร็ว

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์ต้นกัญชา โดยจะเห็นได้จากรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์กัญชาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ ½MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ไซโตไคนิน และออกซินเพื่อเร่งการเจริญของยอด ต้น แคลลัส และราก[4-9] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงราก *Plumbago zeylanica* โดยวิธี suspension culture เพื่อผลิตสาร plumbagin[10] การเพาะเลี้ยง hairy root ของกัญชาเพื่อผลิตสารฟริเดลินและอีพิฟริเดลานอล[11] และมีรายงานการศึกษาสารสำคัญในรากกัญชาพันธุ์ต่างประเทศ พบว่ามีสารฟริเดลิน 12.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม[12] จากการค้นหาข้อมูลงานที่ปรากฏอยู่แล้วของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกัญชาโดยรวมจะเป็นงานวิจัยที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์ และการพัฒนาการเพาะเลี้ยงรากของกัญชาเพื่อให้ผลิตสารสำคัญเป็นส่วนมาก ยังไม่มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตรากกัญชาด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากเพื่อเพิ่มปริมาณรากได้อย่างรวดเร็ว ลดระยะเวลาในการปลูกแบบธรรมชาติ และเลือกใช้น้ำยาและสารเคมีที่สามารถหาง่าย ราคาถูก

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์พัฒนากรรมวิธีและสูตรอาหารในการผลิตรากกัญชาด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อราก ทำให้ผลิตรากกัญชาได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ได้รากกัญชาที่มีคุณภาพ และผลิตสารสำคัญเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจต่อไป

ระเบียบและวิธีการศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

เมล็ดกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (Tanao Si Kan Dang RD1) ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ทำการศึกษาวิจัยขึ้นทะเบียนสายพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร เลขที่ 1688/2564

1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด0.10 - 0.01 มิลลิกรัม (Balance, Electronic Analytical) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น AX224, เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดไม่เกิน 0.001 กรัม (Balance, Electronic Analytical) ยี่ห้อ Mettler-Toledo รุ่น MS3002TS, เครื่องวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ GOnDO รุ่น PL-700 PCS, เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบออโตเคลฟ (High Pressure sterilizer) ยี่ห้อ Zealway รุ่น FD 80 R, เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบออโตเคลฟ (High Pressure sterilizer) ยี่ห้อ TOMY รุ่น SX-700, ตู้ปราศจากเชื้อแบบ Class II (Biosafety Cabinet, Class II) ยี่ห้อ BIOBASE รุ่น BSC-1300IIA-X, ตู้ลามินาร์โฟล์/ ตู้ปราศจากเชื้อ (Laminar flow cabinet/ Cabinet, Clean Bench) ยี่ห้อ BIOBASE รุ่น BBS-V1300. ตู้อบเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator, Shaking) ยี่ห้อ Media science รุ่น SI 001, เตาอบร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Heratherm OMH 750, เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ-เฟลมไอออไนเซชัน (GC-FID) ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 7890A GC, หลอดไฟสำหรับปลูกต้นไม้ (LED Grow Light), ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp), ตู้เย็น (Refrigerator), เครื่องแก้ว (Glassware), มีดผ่าตัด (Scalpel) และ ปากคีบจับเนื้อเยื่อ (Forceps)

1.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog)[13], น้ำยาฆ่าเชื้อ (ไฮเตอร์®: 6% Sodium hypochlorite w/w), เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 95%) (CAS NO. 64-17-5, Merck), กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) (CAS NO. 7647-01-0, Merck), โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodiumhydroxide) (CAS NO. 1310-73-2, Merck), น้ำตาลซูโครส (Sucrose) (CAS NO. 57-50-1), ผงวุ้น (Gellan Gum powder) (CAS NO. 71010-52-1 ยี่ห้อ PhytoTech Labs) และสารลดแรงตึงผิว (ซันไลต์)

1.4 สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant Growth Regulators)

6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-benzylaminopurine, BAP) (CAS NO. 1214-39-7, PhytoTech Labs) และกรด 1-แนฟทาลีนแอซีติก (1-naphthaleneacetic acid, NAA) (CAS NO. 86-87-3, Fluka)

1.5 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานฟรีเดลีน ความบริสุทธิ์ ≥ 99% (EXTRASYNTHESE, batch: 05, ID: 0602/0)

2. วิธีการศึกษา

2.1 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารแข็งใช้เมล็ดกัญชา โดยคัดเลือกเมล็ดกัญชาที่มีความสมบูรณ์นำมาล้างทำความสะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายที่เตรียมจากสารฟอกขาวที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีปริมาณของคลอรีนที่ร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก (Sodium hypochlorite as available Chlorine 6% w/w) หรือ น้ำยาคลอร็อกซ์/ น้ำยาไฮเตอร์ผสมกับน้ำยาล้างจานปริมาณ 1-2 หยด จากนั้นนำเมล็ดกัญชาไปล้างโดยการแช่และเขย่าเป็นช่วง ๆ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และนำเมล็ดกัญชาที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมเป็นสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1 × MS) ที่เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) และผงวุ้น (Agar) ร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพาะเลี้ยงในห้องปลอดเชื้อที่ควบคุมสภาพแวดล้อม ที่อุณหภูมิ 25 ±

2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ตั้งเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ใช้ระยะเวลาในการงอก 10-14 วัน ให้ได้ต้นอ่อนที่มีใบเลี้ยง (cotyledons) ใบจริง (leaves) และราก (roots)

2.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดราก

นำชิ้นส่วนของใบเลี้ยง ใบจริง และราก มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งจำนวน 6 สูตร โดยแต่ละสูตรจะมีส่วนผสมเป็นสูตรอาหาร MS ความเข้มข้นเป็น 1.25 เท่า (1.25 × MS) ที่เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และผงวุ้น ร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดราก ได้แก่ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-benzylaminopurine, BAP) ความเข้มข้น 0.50, 1.00, 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรด 1-แนฟทาลีนแอซีติก (1-naphthaleneacetic acid, NAA) ความเข้มข้น 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องปลอดเชื้อที่ควบคุมสภาพแวดล้อม ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ตั้งเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน (ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 1 ชิ้นต่อขวด) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 30 วัน บันทึกขนาดของรากและเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

2.3 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณรากกัญชา

นำชิ้นส่วนของรากกัญชาที่เกิดจากใบเลี้ยง ใบจริง และราก มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณรากในอาหารเหลว สูตร MS ความเข้มข้นเป็น 1.25 เท่า (1.25 × MS) ที่เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน ร่วมกับ กรด 1-แนฟทาลีนแอซีติก ในความเข้มข้นเดียวกับอาหารแข็งที่ชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด เพาะเลี้ยงโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในห้องปลอดเชื้อที่ควบคุมสภาพแวดล้อม ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ตั้งเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน (ทำการทดลอง 10 ซ้ำ) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อราก เป็นเวลา 15 วัน บันทึกขนาดของรากและเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

2.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารฟริเดลีนในสารสกัดเอธิลอะซิเตทของรากกัญชาโดยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี-เฟลมไอออไนเซชั่น (GC-FID)

เตรียมตัวอย่างวิเคราะห์สารสกัดเอธิลอะซิเตทของรากกัญชาแห้ง ด้วยการใช้รากกัญชาแห้งบดละเอียดน้ำหนัก 300 มิลลิกรัม สกัดด้วยการหมักในตัวทำละลายเอธิลอะซิเตทปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ-เฟรมไอออไนเซชัน ใช้คอลัมน์ชนิดแคปิลลารี่ ที่มีความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์มเคลือบผิว 0.25 ไมโครเมตร (DB-5 capillary column, 30 m × ID 0.25 mm, film thickness 0.25 μm) ปริมาณที่ใช้ฉีดวิเคราะห์ 1 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ฉีด (injector temperature) และอุณหภูมิที่ตรวจวัด (detector temperature) อยู่ที่ 280 องศาเซลเซียส มีสภาวะที่ใช้ใน การวิเคราะห์ เริ่มจากอุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส และเพิ่มเป็น 280 องศาเซลเซียส ที่อัตราเร็ว 2 องศา เซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิที่ 280 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 310 องศา 30 เซลเซียส ที่อัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิที่ 260 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 16.0 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

นำเมล็ดกัญชา ฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาไฮเตอร์ จำนวนสองครั้ง โดยใช้ไฮเตอร์ครั้งแรกที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 นาที และฟอกครั้งที่สอง ใช้ไฮเตอร์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ มีการปลอดเชื้อในช่วงระยะเวลา 14 วัน เท่ากับร้อยละ 98 มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และเมล็ดจะงอกได้ต้นอ่อนที่มี ใบเลี้ยง ใบจริง และราก (Figure 1)

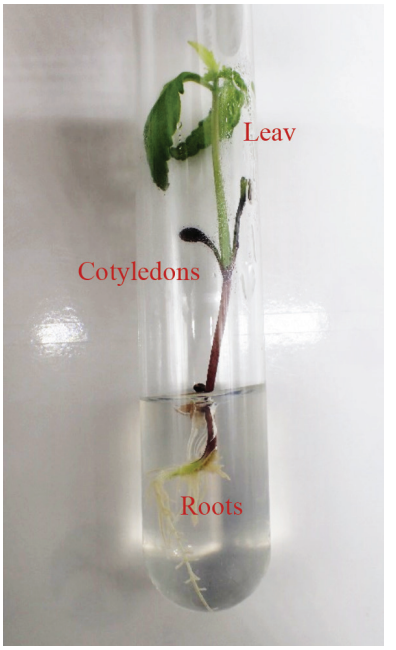

Figure 1 Characteristics of cannabis seedlings obtained from cannabis seed culture

จากนั้นตัดแยกชิ้นส่วนของใบเลี้ยง ใบจริง และราก มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งจำนวน 6 สูตร โดยแต่ละสูตรจะมีส่วนผสมเป็นสูตรอาหาร MS ความเข้มข้นเป็น 1.25 เท่า (1.25 × MS) โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดราก ได้แก่ BAP ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการเกิดราก 30 วัน พบว่าอาหารสูตร 1.25 × MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยในชิ้นส่วนของใบเลี้ยงและใบจริงจะเกิดรากที่มีขนาดหนาและใหญ่มาก ชิ้นส่วนของรากจะเกิดรากที่มีขนาดหนาและใหญ่ปานกลาง ส่วนอาหารสูตรอื่น ๆ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ในชิ้นส่วนใบเลี้ยง ใบจริง และรากได้ โดยรากที่เกิดจะมีขนาดเล็กและบาง ส่วนอาหารสูตร 1.25 × MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชิ้นส่วนของใบจริงไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ และมีเปอร์เซนต์การเกิดรากเฉลี่ยในชิ้นส่วนของใบเลี้ยง ใบจริง และราก (Table 1 and Figure 2)

จากการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดรากในอาหารแข็งแล้ว นำชิ้นส่วนของรากกัญชาที่เกิดจากใบเลี้ยง ใบจริง และราก มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณรากในอาหารเหลวสูตร MS ความเข้มข้นเป็น 1.25 เท่า (1.25 × MS) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด ใช้ระยะเวลาในการเกิดราก 15 วัน (Figure 3) แล้วนำรากที่เลี้ยงได้มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้น้ำหนักของรากแห้ง

Table 1 Shows the root formation of cannabis cultured from cotyledon leave and root in 6 solid medium

Hormones (mg/L)			Root size			% Root formation		
Formula	BAP	NAA	Cotyledon	Leave	Root	Cotyledon	Leave	Root
1	0.50	1.00	+++	+++	++	90	90	75
2	0.50	2.00	+	+	+	85	75	60
3	1.00	1.00	+	+	+	65	55	70
4	1.00	2.00	+	+	+	60	45	65
5	1.50	1.00	+	+	+	50	45	45
6	1.50	2.00	+	–	+	45	0	40

–No root, + Short or thin, ++ Longer or thicker, +++ Longest or thickest

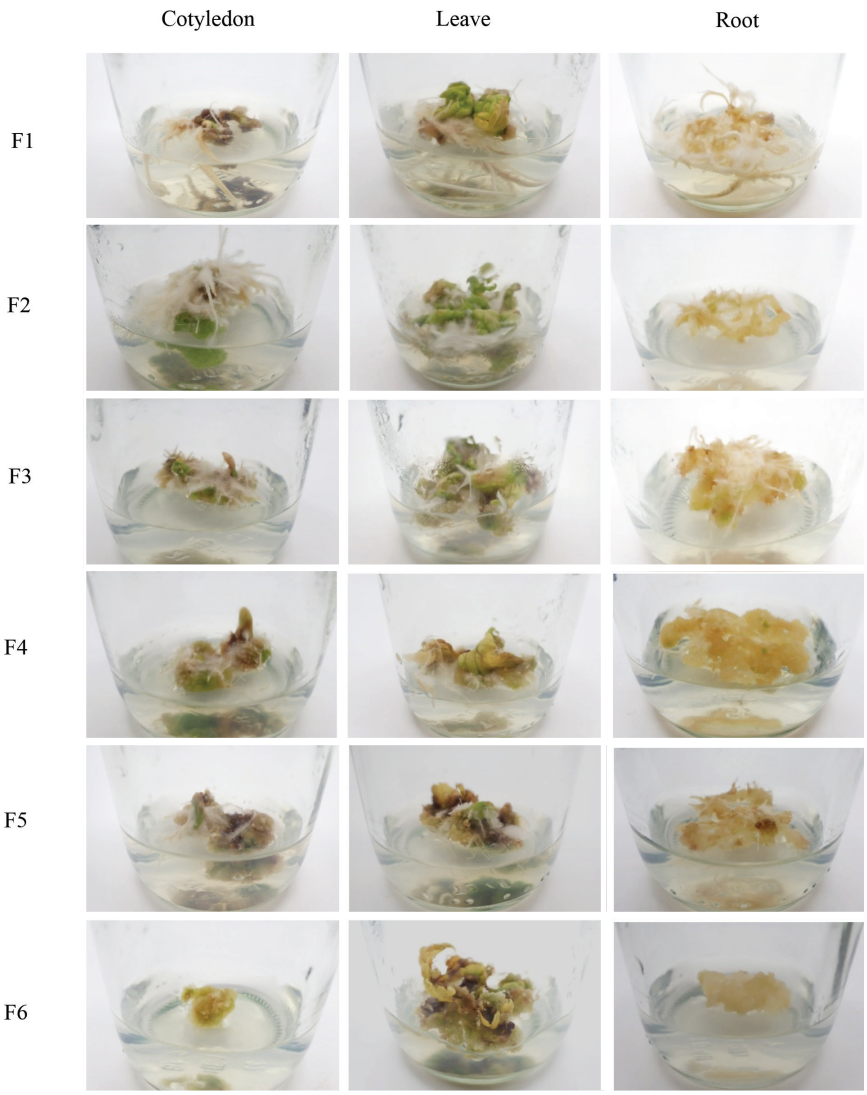

Figure 2 Characteristics of cannabis roots obtained by cotyledons, leaves and roots

เฉลี่ยที่ได้จากใบเลี้ยง ใบจริง และราก เท่ากับ 0.35 ± 0.36, 0.41 ± 0.15 และ 0.40 ± 0.14 กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อนำรากกัญชาแห้งมาตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-เฟรมไอออนไนเซชั่น (GC-FID) พบพีคของ 1.แคมเปสเตอรอล (campesterol), 2. สติกมาสเตอรอล (stigmasterol), 3. เบต้า-ไซโตสเตอรอล (β-sitosterol), 4. ฟริเดลานอล (friedelanol) และ 5. ฟริเดลีน (friedelin) โดยพบสารฟริเดลีนในรากกัญชาที่ได้จากส่วนใบเลี้ยง ใบจริง และรากเท่ากับ 86.2 ± 0.8, 97.1 ± 1.7 และ 57.5 ± 1.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และพบปริมาณสารแคมเปสเตอรอล, สติกมาสเตอรอล, เบต้า-ไซโตสเตอรอล, ฟริเดลานอล และฟริเดลีน มีค่าเท่ากับ 3.92, 13.73, 15.69, 31.37 และ 35.29% เมื่อเทียบกับ peak area รวมทั้งหมด (Figure 4 and Table 2)

Figure 3 Cannabis roots from cotyledons (A), leaves (B) and roots (C) cultured in liquid medium at 15 days

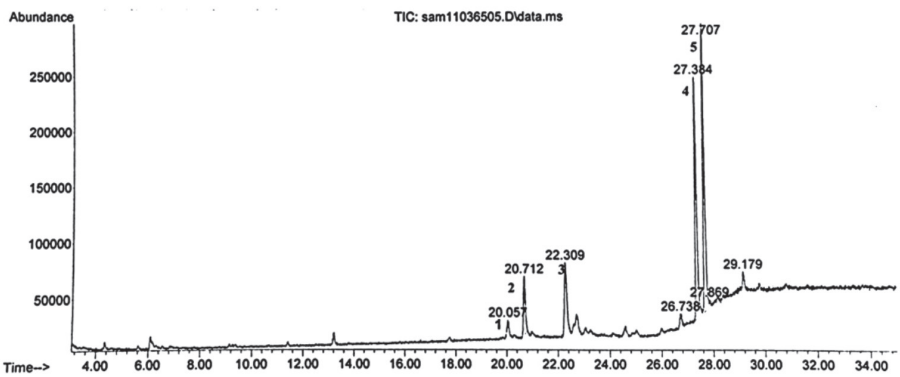

Figure 4 Total ion current (TIC) chromatogram of Ethyl acetate extract of *C. sativa* roots Peaks: 1 (campesterol), 2 (stigmasterol), 3 (β-sitosterol), 4 (friedelanol) and 5 (friedelin)

Table 2 Area under the peak of campesterol, stigmasterol, β-sitosterol, friedelanol and friedelin of ethyl acetate extract of *C. sativa* roots by GC-FID

Sample	Vial	Retention time (minutes)/Area peak/% of total peak area				
		campesterol	stigmasterol	β-sitosterol	friedelanol	friedelin
C. Sativa roots	1	20.057/15408/3.92	20.712/53928/13.73	22.309/61632/15.69	27.384/123264/31.37	27.707/138672/35.29

อภิปรายผล

จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดกัญชาโดยใช้ไฮเตอร์ ซึ่งเป็นชื่อทางการค้า ก็ทำให้เมล็ดมีการปลอดเชื้อสูงสุดร้อยละ 98 การเลือกใช้ไฮเตอร์ฟอกฆ่าเชื้อเป็นน้ำยาที่มีประสิทธิภาพในการฟอก เนื่องจากไฮเตอร์มีโซเดียมไฮโปครอไรท์เป็นส่วนประกอบ 6 เปอร์เซ็นต์ มีราคาถูก สามารถหาซื้อได้โดยทั่วไป ไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช รวมถึงความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการฟอก ระยะเวลาและชนิดของเนื้อเยื่อพืชมีส่วนสำคัญที่ทำให้การฟอกฆ่าเชื้อประสบความสำเร็จได้

การศึกษาอาหารสูตรเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดรากของกัญชาโดยใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยง ใบจริง และราก ที่เกิดจากการงอกของเมล็ดที่ทำให้ปลอดเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่อายุ 14 วัน มาเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน ในสูตรอาหารแข็ง 1.25 × MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดรากได้ดีที่สุดทั้งในส่วนของใบเลี้ยง ใบจริง และราก แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำให้เกิดราก โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตของออกซินสูงกว่าไซโตไคนินจะพัฒนาไปเป็นราก แต่ในการทดลองในสูตรอาหารที่มีออกซินสูงกว่าไซโตไคนินชักนำการเกิดรากได้น้อยหรือไม่เกิดรากในบางชิ้นส่วน อาจขึ้นกับชนิดและอายุของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นและชนิดของออกซินและไซโตไคนินมีส่วนที่ทำให้การชักนำทำให้เกิดรากได้สำเร็จ

การเพิ่มปริมาณรากของกัญชาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากนั้นสามารถย้ายรากที่เกิดจากชิ้นส่วนใบเลี้ยง ใบจริง และราก มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว 1.25 × MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 0.5 ร่วมกับ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรเดียวกันกับสูตรอาหารแข็งที่ชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 15 วันก็สามารถตัดแยกเพื่อเพิ่มปริมาณรากในอาหารใหม่สูตรเดิมได้ทุก ๆ 15 วัน ก็สามารถเพิ่มปริมาณรากได้อย่างรวดเร็ว

จากการนำรากแห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรากมาวิเคราะห์หาปริมาณฟริเดลินด้วยวิธี GC-FID พบว่ารากที่นำมาจากชิ้นส่วนใบเลี้ยง ใบจริง และราก มีปริมาณสารฟริเดลีนเท่ากับ 86.2 ± 0.8, 97.1 ± 1.7 และ 57.5 ± 1.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยรากที่เกิดจากชิ้นส่วนใบจริงนั้นมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาใบเลี้ยง และรากมีปริมาณน้อยสุด และพบว่ารากกัญชาสายพันธุ์ไทยนี้ที่เพาะเลี้ยงรากด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปริมาณฟริเดลีนสูงกว่าประมาณ 7.6 เท่าเมื่อเทียบกับกัญชาสายพันธุ์ต่างประเทศโดยมีปริมาณสารฟริเดลีน 12.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม[3] แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่ทำให้เกิดรากและสายพันธุ์นั้นมีปริมาณสารฟริเดลีนต่างกัน และมีการศึกษารากกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงที่เพาะปลูกแบบธรรมชาติพบว่าปริมาณสารฟริเดลีนมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.025 โดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา (ไมโครกรัมต่อไมโครกรัม) โดยวิธีเดนซิโทเมทรี-โครมาโทกราฟีผิวบาง[14] เนื่องจากยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการหาปริมาณสารฟริเดลีนในกัญชาสายพันธุ์ไทยโดยวิธี GC-FID และไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงรากกัญชาสายพันธุ์ไทยด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก่อน การเพาะเลี้ยงรากกัญชาด้วยกรรมวิธีและสูตรอาหารดังกล่าวทำให้ผลิตรากกัญชาได้อย่างรวดเร็ว และรากที่ได้พบสารฟริเดลีนและสารประกอบอื่น ๆ การศึกษาวิจัยนี้จึงมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรม ด้านยา อาหาร เวชสำอาง หรือผลิตภัณฑ์

เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ

ข้อสรุป

จากการศึกษากรรมวิธีการเพาะเลี้ยงรากกัญชาเพื่อการผลิตรากกัญชา มีขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ 1) การฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารแข็ง โดยการนำเมล็ดกัญชามาทำให้ปลอดเชื้อเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS จนได้ต้นอ่อนที่มีใบเลี้ยง ใบจริง และราก ใช้ระยะเวลา 14 วัน, 2) การเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดราก โดยการนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นเป็น 1.25 เท่า (1.25 × MS) ซึ่งมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดรากใช้ระยะเวลา 30 วัน และ 3) การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณรากกัญชาแบบแขวนลอย โดยการย้ายรากที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เพื่อเพิ่มปริมาณราก เป็นระยะเวลา 15 วัน ทั้ง 3 ขั้นตอนที่กล่าวมานี้ใช้ระยะเวลา 2 เดือน เมื่อเทียบกับการเพาะปลูกแบบธรรมชาติจะใช้ระยะเวลา 5 เดือน ดังนั้นการผลิตรากกัญชาด้วยวิธีเพาะเลี้ยงรากด้วยวิธีนี้ช่วยเพิ่มปริมาณรากได้อย่างรวดเร็ว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพร ดร.ภญ.ประภัสสร ทิพย์รัตน์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ผู้ร่วมงานวิจัยทุกคนในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษานี้

References

1. Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Medicinal Plants indigenous to Thailand. Bankok: Prachachon; 1996. 1(1):p.169-177. (in Thai)
2. Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. Nat Rev Neurosci 2014;15(11):757-64.
3. Ruang rak E, Arunruang P and Waesalaemae N. Effect of Friedelin Extract from Cannabis Roots on Cosmeceutical Application. Department of Science, Faculty Science and Technology, Songkhla University. 2022;147-50.
4. Slusarkiewicz-Jarzina A, Ponitka A, Kaczmarek Z. Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica . 2005;472:145-51.
5. Bing X, Ning L, Jinfeng T, Nan G. Rapid tissue culture method of *Cannabis sativa* for industrial uses.CN 1887043 A 20070103 Patent. 2007:9.
6. George EF, Hall MA, DeKlerk GJ. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: George EF, Hall MA, DeKlerk GJ (Eds.), Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, Netherlands. 2008:205-226.
7. Chaohua C, Gonggu Z, Lining Z, Chunsheng G, Qing T, Jianhua C, Xinbo G, Dingxiang P, Jianguang S. A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). Industrial Crops and Products. 2016;83:61-65.
8. Ferreira l. Studies on the development of callus culture of *Cannabis sativa* L. Regarding plant regeneration. Instituto Superior Tecnico, Lisboa, Portugal, 2018.
9. Pranitch B. and Benyakan P. Factors affecting micropropagation of *Cannabis sativa* L. Pharmaceutical Sciences Asia 2020; 47(1):21-29.
10. Roy A, Bharadvaja N. Establishment of root suspension culture of *Plumbago zeylanica* and enhanced production of plumbagin. Industrial Crop and Products. 2019;137:419-427.
11. Kobtrakul K, Rani D, Binalee A, Udomlarp P, Srichai T, De - Eknamkul W, Vimolmangkang S. Elictation enhances the production of friedelin and epifriedelin in hairy root cultures of *Cannabis sativa* L. Frontier in Plant Science. 2023:1-9.

12. Natasha R, David J, Ethan B. Cannabis roots: A traditional therapy with future potential for treating inflammation and pain. Cannabis and Cannabinoid Res. 2017;2(1):210-6.
13. Murashige T, Skooge T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 1962;15:473-97.
14. Thongchin T,Thiemthieprat P, Ruengkhet S, Shuayprom A. Development and Method Validation of Friedelin Contents in *Cannabis sativa* L. Roots Using Thin Layer Chromatography Densitometry. J Thai Trad Alt Med. 2023;21(2):396-413. (in Thai)