บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

เฮมพ์ซึ่งเป็นพืชผสมข้าม (cross-pollinated crop) ลักษณะของประชากรจึงเป็นประชากรแบบ heterogeneous หากจะทำการปรับปรุงประชากรเพื่อลดปริมาณสาร THC หรือเพิ่มเปอร์เซ็นต์เส้นใย โดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์มีความเป็นไปได้ วิธีการหนึ่งที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชนิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงประชากรคือ วิธีการคัดเลือกรวม (mass selection method)

แต่อย่างไรก็ตามเฮมพ์เป็นพืชพวกแยกกันระหว่างต้นเพศผู้กับต้นเพศเมียจึงมีความแปรปรวนของลักษณะต่างๆ ที่สูงมากระหว่างต้นพ่อและต้นแม่ ในการวิจัยนี้จึงได้มีสมมุติฐานคือถ้าทำการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะ THC ต่ำทั้งต้นเพศผู้และต้นเพศเมียแล้วจะทำให้ลักษณะดังกล่าวนี้เข้าสู่ความเป็นพันธุ์แท้ (homozygosity) ได้เร็วขึ้น การพัฒนาสายพันธุ์แท้ (Inbred line) เพื่อประโยชน์ในการสร้างพันธุ์ลูกผสม ซึ่งจะทำให้ผลผลิตสูงขึ้น และมีความสม่ำเสมอมากขึ้น การวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาพันธุ์ลูกผสมของเฮมพ์ โดยการพัฒนาอินเบรด (Inbred) หรือสายพันธุ์แท้ที่ดีสำหรับนำไปผลิตเมล็ดพันธุ์เฮมพ์ลูกผสมต่อไป

สารเสพติดที่พบในเฮมพ์เป็นสารในกลุ่มพวก Cannabinoids ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบ terpenophenolic พบเฉพาะในพืชกลุ่ม *Cannabis sativa* เท่านั้น (Sirikantaramas *et al.*, 2007) สารในกลุ่ม cannabinoid นี้พบมากกว่า 70 ชนิดในธรรมชาติ โดยหนึ่งในสารกลุ่มนี้ที่พบว่ามีฤทธิ์ต่อระบบประสาท คือ Δ-9-tetrahydrocannabinol (THC) ซึ่งเป็นสารหลักที่พบในกัญชา (marijuana; *C. sativa* L. subsp. *Indica*) ในทางการแพทย์สาร THC ถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการอาเจียรในผู้ป่วยที่รับการรักษามะเร็งโดยการทำ chemotherapy และใช้เป็นยากระตุ้นความอยากอาหารในการรักษาผู้ป่วย AIDS ในขณะที่สารอีกตัวหนึ่ง Cannabidiol (CBD) ซึ่งเป็น isomer กับ THC นั้น ไม่มีผลต่อระบบประสาท แต่อย่างไรก็ตาม CBD ได้ถูกนำมาใช้ในทางเภสัชศาสตร์ โดยพบว่า CBD มีฤทธิ์ลดพฤติกรรมก้าวร้าวในหนูทดลอง และใช้เป็นส่วนผสมในยาสำหรับรักษาอาการอักเสบ รักษาแผลติดเชื้อรา หรือเชื้อแบคทีเรีย (Sirikantaramas *et al.*, 2007)

จากการศึกษาพบว่าทั้ง THC และ CBD ผลิตได้จากสร้างตั้งต้นเดียวกันคือ Cannabigerol (CBG) (Fellermeier *et al.*, 2001) โดยอัตราส่วนของ CBD:THC พบว่าค่อนข้างสม่ำเสมอตลอดชั่วอายุของ *C. sativa* L. และปัจจัยภายนอกมีผลต่ออัตราส่วนนี้น้อยมาก (De Backer *et al.*, 2012) จากอัตราส่วนดังกล่าวทำให้แบ่ง *Cannabis* ออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ (1) THC-predominant มีอัตราส่วนของ CBD/THC ประมาณ 0.00-0.05 (2) CBD-predominant มีอัตราส่วนของ CBD:THC ประมาณ 15-25 และ (3) Intermediate มีอัตราส่วนของ CBD:THC ประมาณ 0.5–3 ซึ่งอัตราส่วนของ CBD:THC นั้นพบว่าควบคุมด้วยยีนเพียงตำแหน่งเดียวคือ *B* locus ซึ่งประกอบด้วย 2 alleles คือ B_T และ B_D โดย *Cannabis* ชนิด THC-predominant จะประกอบด้วย homozygous B_T/B_T ชนิด CBD-predominant จะประกอบด้วย homozygous B_D/B_D ส่วนชนิด intermediate จะประกอบด้วย heterozygous B_T/B_D จากการศึกษาของ De Backer *et al.*, (2003) พบว่า Cannabis ชนิดที่มี THC ในช่อดอกสูงมักจะพบว่ามี allele B_T อยู่ทั้งแบบ homozygous (B_T/B_T) หรือ heterozygous (B_T/B_D) ส่วน Cannabis ชนิดเส้นใย พบว่ามี allele B_D แบบ homozygous (B_D/B_D)

นอกจากนี้ยีนที่สังเคราะห์เอมไซม์ที่จะเปลี่ยน CBG ไปเป็น THC คือ THCA synthase (Taura *et al*., 1995) Kojoma *et al*., (2006) ศึกษาพบว่าที่ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอมไซม์ THCA synthase มีความแตกต่างของลำดับเบสระหว่าง Drug-type (THC สูง) และ Fiber-type (THC ต่ำ) และในการศึกษาครั้งนี้ได้รายงานถึงเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอคือ marker g และ h ที่พบว่ามีความจำเพาะกับ *Cannabis* ชนิด drug-type เท่านั้นแต่จะไม่พบใน fiber-type

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกประการคือเนื่องจากเฮมพ์ซึ่งเป็นพืชผสมข้ามต้น มีการแยกกันระหว่างต้นเพศผู้กับต้นเพศเมียการกำหนดเพศของเฮมพ์ถูกควบคุมด้วยระบบโครโมโซม X/Y (Hoffmann, 1961) จึงมีความแปรปรวนของลักษณะต่างๆ ที่สูง ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้จะได้รับอิทธิพลจากการกระทำของยีน (gene action) ทั้งจากต้นพ่อและต้นแม่ ทำให้เกิดความแปรปรวนในลักษณะต่างๆ รวมถึงปริมาณสารเสพติด THC คุณภาพและปริมาณเส้นใย และปริมาณกรดไขมันในเมล็ด ดังนั้นการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างต้นเพศผู้กับต้นเพศเมียมาใช้บ่งบอกเพศตั้งแต่ในระยะต้นกล้าไม่ต้องรอให้ถึงระยะออกดอกจะช่วยให้การจัดการการผลิตเฮมพ์ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

งานปรับปรุงพันธุ์พืชผสมข้ามโดยเฉพาะเฮมพ์ซึ่งเป็นพืชชนิดแยกกันระหว่างต้นเพศผู้กับต้นเพศเมียนั้นแตกต่างจากพืชชนิดอื่นๆ โดยทั่วไปจะประกอบด้วยองค์ประกอบสามช่วงได้แก่ การหาหรือสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรตั้งต้น (base population) การสร้างสายพันธุ์พ่อแม่โดยการคัดเลือกจากประชากรตั้งต้นโดยให้มีการผสมพันธุ์ระหว่างระหว่างสายพันธุ์ หรือภายในสายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็นรอบๆ เพื่อสร้าง breeding population และในขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นการทดสอบสายพันธุ์ที่พัฒนา ผลที่ได้มักจะเป็นประชากร เช่น พันธุ์ลูกผสมปล่อย (open pollinated varieties) ที่ได้จากการคัดเลือกจาก breeding population ข้างต้นหรือพันธุ์สังเคราะห์ (synthetic varieties) ที่ได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์แท้ (inbred line) จำนวนหนึ่งจาก breeding population ที่ได้รับการทดสอบความสามารถในการรวมตัวว่าให้ลูกผสมที่ดี (combining ability) แล้วนำมาปลูกร่วมกันเพื่อขยายพันธุ์เป็นประชากร วิธีการคัดเลือก mass selection นิยมใช้แพร่หลายในเฮมพ์ เช่น พันธุ์ Bolognese Toscana และ Ferrarese ของอิตาลี YunMa 1 และ YunMa 5 ของจีน ล้วนพัฒนามาโดยวิธี mass selection (Salentijn *et al*., 2015) การคัดเลือกวิธีนี้ในเฮมพ์พบว่าได้ผลในลักษณะบางอย่างที่มีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูง เช่น ปริมาณเส้นใย แต่ไม่มีประสิทธิภาพในลักษณะทางพืชไร่อื่นๆ เช่น อายุออกดอก ความสูงต้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นซึ่งมักมีความสัมพันธ์ทางลบกับเปอร์เซ็นต์เส้นใยจึงทำให้การคัดเลือกเพื่อผลผลิตเส้นใยไม่มีประสิทธิภาพ วิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยสร้างพันธุ์สังเคราะห์จึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่าเนื่องจากเป็นการใช้ประโยชน์จากความดีเด่นของลูกผสมเหนือพ่อแม่ร่วมกับการทดสอบความสามารถในการรวมตัวจึงทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือกลักษณะต่างๆ ได้ดีกว่า mass selection (Allard, 1967)

ในปี 2558 ได้คัดเลือกพันธุ์เฮมพ์ต่อเนื่องมาจากปี พ.ศ.2557 เพื่อมุ่งที่จะสร้างเฮมพ์สายพันธุ์แท้ (Inbred line) สำหรับใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์เฮมพ์ลูกผสมพันธุ์สังเคราะห์ (synthetic varieties) โดยใช้เฮมพ์ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนพันธุ์ 4 พันธุ์ มาปลูกผสมพันธุ์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน โดยในปี พ.ศ. 2558 คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีปริมาณ THC ต่ำ และเปอร์เซ็นต์เส้นใยสูงได้เมล็ดรุ่น S_3 ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ (Line) ที่พบว่ามีปริมาณ THC ต่ำกว่า 0.3% และมีเปอร์เซ็นต์เส้นใยสูง (ศันสนีย์และคณะ 2558) ในปี พ.ศ. 2559 ได้ดำเนินงานต่อเนื่องเพื่อผสมพันธุ์เฮมพ์ในสายพันธุ์ (Sib-mating) เดียวกันได้ปลูกทดลองเฮมพ์รุ่นที่ 3 (S_3) ประเมินลักษณะ ผสมพันธุ์ระหว่างเครือญาติ

รุ่นที่ 3 จำนวน 200 สายพันธุ์และสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์รุ่นที่ 4 (S_4) ได้จำนวน 339 สายพันธุ์ เฮมพ์ที่ปลูกเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ในรุ่น S_3 มีการกระจายตัวของลักษณะการเกษตรทุกลักษณะที่วัด มีฐานพันธุกรรมกว้างทั้งระหว่างสายพันธุ์และภายในสายพันธุ์ พบความสัมพันธ์ในทางบวกระหว่างทุกลักษณะที่ศึกษายกเว้นปริมาณเส้นใย (ศันสนีย์และคณะ 2559) ได้คัดเลือก 150 สายพันธุ์เพื่อปลูกทดสอบในรุ่นลูก รุ่นที่ 4 (S_4) พบได้ปลูกทดลองเฮมพ์รุ่นที่ 4 (S_4) ประเมินลักษณะ ผสมพันธุ์ระหว่างเครือญาติรุ่นที่ 4 จำนวน 150 สายพันธุ์ สามารถผลิตและคัดเลือกเก็บเมล็ดพันธุ์รุ่นที่ 5 (S_5) จากข้อมูลการปลูกประเมินรุ่นลูกรุ่นที่ 4 (S_4) ที่มีลักษณะดีเด่นได้จำนวน 249 สายพันธุ์ เฮมพ์ที่ปลูกเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ยังคงมีการกระจายตัวของลักษณะทุกลักษณะที่วัด มีฐานพันธุกรรมกว้างทั้งระหว่างสายพันธุ์และภายในสายพันธุ์มีความสัมพันธ์ในทางบวกระหว่างทุกลักษณะที่ศึกษา ยกเว้นปริมาณเส้นใยได้คัดเลือกสายพันธุ์รุ่นที่ 5 (S_5) จากข้อมูลต้นแม่รุ่น S_4 เหลือ 56 สายพันธุ์ นำไปปลูกทดสอบในรุ่นลูกรุ่นที่ 5 (S_5) ในฤดู ได้คัดเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นต้นพ่อและนำมาปลูกผสมพันธุ์กับพันธุ์ทดสอบ RPF3 ปลูกลูกผสมเพื่อประเมินสมรรถนะในการรวมตัวของสายพันธุ์คัดเลือกรุ่นที่ 4 ในฤดูฝน คัดเลือกสายพันธุ์รุ่นที่ 5 (S_5) ที่ให้ลูกลักษณะดีเพื่อสร้างลูกผสมในฤดูถัดไป (ศันสนีย์และคณะ 2560)

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)