บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

สายพันธุ์ของสมุนไพรมีผลต่อคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพร ในช่วงเวลาที่ผ่านมามีสมุนไพรเพียงไม่กี่ชนิดที่ได้รับการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ บางครั้งเราสามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะภายนอก เช่น ขนาดหรือรูปร่างของใบ ดอก หรือผล บางครั้ง พบว่า พืชชนิดเดียวกันจากต่างแหล่งกันมีลักษณะสัณฐานเหมือนกันแต่มีองค์ประกอบเคมีแตกต่างกัน ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ ตัวอย่างเช่น ฟ้าทะลายโจร ที่เก็บเมล็ดพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย เมื่อนำมาปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกันและเก็บเกี่ยวเมื่อดอกบาน พบว่า มีสารสำคัญ andrographolide ในใบฟ้าทะลายโจรจากประเทศไทย 18 แหล่ง อยู่ระหว่าง 2.2 – 3.7 % (Prathaturarug, 1998)

บังอร ศรีพานิชกุลชัยและคณะ (2548) รายงานพืชสมุนไพรที่ทำการศึกษาในพื้นที่โคกภูตากา จังหวัด ขอนแก่น จำนวน 26 ชนิด จาก 16 วงศ์ ถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟีโนลิคและสารฟลาโวนอยด์ โดยพบพืชที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน 8 ชนิดจาก 6 วงศ์ ได้แก่ Apocynaceae, Erythoxylaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Papilionoideae, Myrtaceae และ Simaroubaceae

มาตรฐานของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขึ้นอยู่กับวัตถุดิบพืชสมุนไพร การวิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เทคนิค HPLC และ TLC เพื่อทราบคุณภาพและปริมาณสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบและความบริสุทธิ์ของสารในยาหรือผลิตภัณฑ์ แต่การวิเคราะห์พันธุกรรม จะช่วยในการระบุ (identify) ชนิดและสายพันธุ์พืชได้ รวมทั้งแหล่งที่มาของพืชได้ดังตัวอย่างการศึกษาใน ginseng (Hon et al., 2003)

ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมเป็นแหล่งข้อมูลซึ่งกำกับลักษณะฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิต การศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเออาจทำได้หลายวิธีไม่ว่าจะเป็นโครงการจีโนมซึ่งใช้เทคนิคพื้นฐานทาง พันธุวิศวกรรมในการหาลำดับเบสของจีโนม แต่ในกรณีที่ไม่มีข้อมูลจีโนมก็อาจใช้เครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) นอกจากนี้การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชอาจทำได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนใดยีนหนึ่งที่มีความจำเพาะ โดยเทคนิคพีซีอาร์ ตัวอย่างเช่น ยีนใน cpDNA ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์จีโนม ได้แก่ *frx*C, *rbc*L, *psb*A, *psb*D, *trn*K, *trn*L และ *trn*F เป็นต้น หรือลำดับเบสจากบริเวณ internal transcribed spacer ของ nr DNA (ITS) ซึ่งอยู่ในนิวเคลียร์จีโนม แล้ววิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยปฏิกิริยา sequencing reaction หรือหาตำแหน่งของลำดับเบสที่เปลี่ยนไปโดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Gielly and Taberlet, 1994; Tsumura et al., 1995; Takano and Okada, 2002)

ตัวอย่างการนำพันธุศาสตร์และเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุลมาใช้กับพืชสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่จะกล่าวถึงคือ ผลิตภัณฑ์ ginseng ซึ่งมียอดจำหน่ายสูงสุดเป็นอันดับสามของร้านค้าปลีกในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 1998 ผลิตภัณฑ์ ginseng ผลิตจากต้น *Panax ginseng* ซึ่ง

เป็น Traditional Chinese Medicine โดย Nang *et al.* (1999) ได้ตรวจสอบพืชชนิดต่างๆ ในสกุล *Panax* Bai *et al.* (1997) ศึกษาความหลากหลายของ American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) ที่ปลูกใน Ontario ด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Cheng *et al.* (1997) ใช้เทคนิค RAPD ตรวจพิสูจน์ผงจากไรโซมของ *Coptis* ที่ได้เก็บจากร้านค้าแหล่งต่างๆ Ho and Leung (2002) ได้คัดแยกและวิเคราะห์ลำดับเบสที่เป็นแบบซ้ำๆ กัน (repetitive DNA sequences) จาก *Panax ginseng* โดยเทคนิคไมโครแซทเทไลต์ (microsatellite) หรือ SSR (Simple Sequence Repeat) ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมพืช เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเป็น polymorphism สูง เกิดจากชิ้น ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำ ประกอบด้วย 2-7 เบส ยาวประมาณ 200-300 คู่เบส อยู่ติดต่อกัน มีผลให้ตำแหน่งใดๆ บนโครโมโซมอาจพบไมโครแซทเทไลท์ได้หลายอัลลีลอัน เนื่องจากมีจำนวนซ้ำที่ต่างกันนั่นเอง

เครื่องหมายโมเลกุล Sequence-Related Amplified Polymorphisms หรือ SRAPs (Li and Quiros, 2001) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่อาศัยเทคนิคพีซีอาร์ โดยออกแบบไพรเมอร์ความยาว 17 ถึง 18 นิวคลิโอไทด์ โดยเบส 1 ถึง 10 หรือ 11 จากปลาย 5' จะเป็นลำดับเบสแบบสุ่ม ถัดมาจะเป็นลำดับเบส CCGG ใน Forward Primer ซึ่งเป็นลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสบริเวณเอ็กซอน (exon) และใน Reverse Primer จะเป็น AATT ซึ่งจำเพาะกับลำดับเบสบริเวณอินทรอน (intron) และสุดท้ายที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ทั้งสองนี้จะเป็นลำดับเบสคัดเลือกอีกสามเบส ทั้งนี้พบว่าร้อยละ 60 ของแถบดีเอ็นเอของ *Brassica oleracea* L. ที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิค SRAPs ตรงกับยีนที่มีรายงานไว้ใน GENBANK (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) ดังนั้น SRAPs จึงเหมาะกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากบริเวณ Open Reading Frames (ORFs) นั่นเอง (Li and Quiros, 2001) SRAPs ยังมีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducible) ได้สูง (Li and Quiros, 2001) สามารถใช้เพื่อระบุพันธุ์และลูกผสมของ Paeonia ได้ (Hao, et al., 2008) และจากการศึกษาใน buffalograss (*Buchloe* spp.) (Budak *et al.*, 2004) wheat (*Triticum aestiva* L.) (Fufa *et al.*, 2005) squash (*Cucurbita moschata* L.) (Ferriol *et al.*, 2004) และ oilseed rape (*Brassica napus* L.) (Riaz *et al.*, 2001) ได้แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างประชากรได้เป็นอย่างดี Li et al. (2010) พบเครื่องหมายโมเลกุล SRAP ที่เชื่อมโยงกับความต้านทานโรค dried-shrink disease ในจีโนมของ sea buckthorn (Hippophae L.)

เทคนิค Arbitrary Primed Polymerase chain reaction (AP - PCR) เป็นการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 34 เบสหรือมากกว่านั้น (Welsh and McClelland, 1991) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ความแตกต่างของดีเอ็นเอเริ่มต้นได้ก่อให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการเกิดการจำลองตัวและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัว เกิดผลเป็นรูปแบบของแถบดีเอ็น

เอหลากหลายรูปแบบ เมื่อนำมาแยกขนาดบนแผ่นวุ้นอะกาโรส หรืออะคริลาไมด์ (acrylamide) โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิส แล้วรวบรวมข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวนหนึ่ง ก็จะสามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์หรือระหว่างสายพันธุ์ได้ เทคนิคนี้ทำได้ง่ายรวดเร็ว มีประสิทธิภาพและประหยัด ต้องการใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (10 – 25 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา) จึงเหมาะสำหรับใช้ในกรณีที่มีดีเอ็นเออยู่จำกัด และเหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุกรรมของพืช แต่มีข้อเสียคือ เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น (dominant markers) จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นเฮทเธอโรไซกัสออกจากโฮโมไซกัสได้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค AP - PCR ที่ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ใน การจำแนกสายพันธุ์และตรวจสอบความเป็นพ่อ – แม่ ใช้ติดตามการคัดแยกประชากรที่เกิดจากการผสมข้าม ใช้เป็นเครื่องหมาย (marker) ในการสร้างแผนที่ยีน และใช้ในการสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยเฉพาะในระดับสปีชีส์เดียวกัน (Welsh *et al.*, 1991) ทั้งนี้เทคนิค AP-PCR ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช รวมถึงสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ อีกมากมาย

นอกจากที่กล่าวแล้วยังมีการใช้เทคนิค PCR-RFLP และ MASA วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 18S rRNA จาก ginseng อีกด้วย (Fushimi et al., 1997)

สำหรับการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้เทคนิคต่างๆ ร่วมกัน เช่น เทคนิค RAPD ร่วมกับ DAMD (Direct Amplification of Minisatellite DNA) (Bhattacharya and Ranade, 2001), เทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Vijayan and Chatterjee, 2003; Aggarwal *et al.*, 2004; Vijayan *et al.*, 2005; Weiguo *et al.*, 2007), เทคนิค RAPD ร่วมกับ ISSR (Vijayan *et al.*, 2004) เป็นต้น