บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

องค์การสหประชาชาติได้กำหนดให้ปี พ.ศ. 2553 เป็นปีสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ (International year of biodiversity) และให้วันที่ 22 พฤษภาคมของทุกปีเป็นวันสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ (International day for biodiversity) เพื่อเป็นการเสริมสร้างความตระหนักถึงความสำคัญของความหลากหลายทางชีวภาพ และการดำรงอยู่ของทุกชีวิตบนพื้นโลก ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555-2559) ที่เน้นการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพในระยะยาว ส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ โดยภูมิประเทศของประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น ทำให้เป็นแหล่งรวบรวมความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิติต่างๆ เช่น พืชพรรณต่างๆที่มีอยู่หลากหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางการเกษตร และการแพทย์

ประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรกันอย่างกว้างขวางมานาน และใช้ประโยชน์สำหรับเป็นทางเลือกในการรักษาโรค แต่พืชชนิดเดียวกันในแต่ละท้องถิ่นมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป หรือพืชต่างชนิดกันแต่มีชื่อเรียกที่เหมือนกัน รวมทั้งพืชในสกุลเดียวกันบางชนิดมีลักษณะคล้ายกัน ทำให้เกิดความสับสนทั้งในการจัดจำแนก และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมทั้งการรุกรานของชนิดพันธุ์ต่างถิ่น ซึ่งนับว่าเป็นภัยคุกคามที่ร้ายแรงต่อความหลากหลายทางชีวภาพ

2.1 พืชในวงศ์ Acanthaceae

พืชในวงศ์เหงือกปลาหมอ หรือวงศ์ต้อยติ่ง (Acanthaceae) อยู่ในอันดับ Lamiales (Olmstead และคณะ, 1993) เป็นวงศ์พืชขนาดใหญ่ มีประมาณ 250 สกุล สายพันธุ์มากกว่า 2500 สายพันธุ์ (Cramer, 1998) ส่วนใหญ่เป็นไม้พุ่ม โดยมากพบกระจายอยู่ทั่วไปตามเขตร้อนและเขตร้อนชื้น ทั้งอินโดนีเซียและมาเลเซีย แอฟริกา บราซิล และอเมริกากลาง ส่วนใหญ่มีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นไม้ประดับและพืชสมุนไพร Bhattacharyya และ Johri (1998) ได้อธิบายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ประจำวงศ์ Acanthaceae ว่า เป็นไม้พุ่มหรือไม้ล้มลุก อาจพบเป็นไม้ต้นขนาดกลางหรือเป็นเถา บางชนิดอาจเป็นพืชทนแล้ง ลำต้นไม่มีเนื้อไม้ สีเขียว บ่อยครั้งอาจพบรูปร่างเป็นสัน ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามหรือตรงข้ามสลับฉาก ไม่มีหูใบ มีหรือไม่มีก้านใบ ดอกช่อออกที่ปลายยอด หรือช่อกระจุกเชิงซ้อนออกตามข้อ หรืออาจเป็นช่อกระจะ หรือดอกเดี่ยวออกตามข้อ มีใบประดับหรือใบประดับย่อย ใบประดับหรือใบประดับย่อยเห็นได้ชัดเจน บางครั้งอาจเป็นหนาม สมมาตรด้านข้าง มี 2 เพศ มีก้านดอกย่อยขนาดใหญ่เห็นชัด วงกลีบเลี้ยงมี 4-5 กลีบ เป็นแฉกลึก ขอบอาจเป็นหนามหรือขนแข็ง หรือลดรูปไป เรียงซ้อน เหลื่อม พบน้อยมากที่เรียงตัวบิดเวียน วงกลีบดอกมี 4-5 กลีบ ซ้อนเหลื่อม ส่วนมากเป็นรูปปากเปิด ปากบนปลายแยกเป็น 2 กลีบและตั้งตรง ปากล่าง 3 กลีบส่วนใหญ่ค่อนข้างเป็นแนวนอนตั้งฉากกับหลอดกลีบดอก ผิวหลอดด้านในมีขนจำนวนมากและแผ่ออกมาถึงปาก ปลายกลีบดอกเรียงซ้อนเหลื่อมหรือบิดเวียน เกสรเพศผู้ 2 หรือ 4 อันติดบนกลีบดอก ถ้าพบว่ามี 4 อันจะเป็นแบบมี 2 คู่ยาวไม่เท่ากัน ส่วนอีกหนึ่งอันจะไม่เจริญหรือเป็นหมัน ถ้ามี 2 อันจะติดอยู่

ด้านหน้ากลีบดอก ก้านชูเกสรเพศผู้ยาวและแยกกัน ชูอับเรณูโผล่พ้นหลอดกลีบดอก ก้านชู 1อันจะมีอับเรณู 1-2 อัน ถ้ามี 1 อันแสดงว่ายังไม่เจริญเต็มที่ ถ้ามี 2 อันจะเป็นแฉกยาวเท่ากันเชื่อมติดกันหรือบางครั้งทั้ง 2 อันอาจยาวไม่เท่ากัน อับเรณูติดด้านหลัง หรือติดไหวได้ ก้านเกสรเพศเมีย 1 อัน ยืดยาวคล้ายเส้นด้าย ปลายยอดแยกเป็น 2 แฉกรูปกรวย รังไข่มี 2 ช่องเชื่อมติดกัน อยู่เหนือวงกลีบใน 1 ช่องมีออวุล 2 อันหรือมากกว่า มีหรือไม่มีอวัยวะที่ช่วยดีดเมล็ดซึ่งติดด้านล่างออวุล ผลส่วนใหญ่เป็นแบบผลแห้งแตกกลางพู เมล็ดมีจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีอาหารสะสม

การจัดจำแนกพืชในวงศ์ Acanthaceae ใช้ข้อมูลอ้างอิงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Bentham และ Hooker, 1965; Hansen, 1985; Hansen, 1989; Bremekamp, 1995) โดย Bentham and Hooker (1965) ได้ศึกษาและรวบรวบรายชื่อพรรณไม้ในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้บรรยายลักษณะพืชในอันดับสกุล การกระจายพันธุ์ พบว่ามีพรรณไม้ในเผ่าย่อย Barleriinae 5 สกุล คือ Asystasia, Barleria, Clinacanthus, Codonacanthus และ Graptophyllum Hansen (1989) ศึกษาพรรณไม้วงศ์ Acanthaceae ในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบพรรณไม้ในสกุล Pseuderanthemum จำนวน 3 ชนิด คือ *P. graciliflorum*, *P. lapathifolium* (Vahl) B. Hansen และ *P. latifolium* (Vahl) B. Hansen ต่อมาจึงนำข้อมูลทางพันธุกรรมมาใช้ในการจัดจำแนก (Scotland และคณะ, 1995; Scotland และ Vollesen, 2000) ซึ่งในปัจจุบันนิยมแบ่งตาม Scotland และ Vollesen (2000) โดยได้จัดจำแนกพืชวงศ์เป็น 3 วงศ์ย่อย คือ Nelsonoideae, Thunbergioideae และ Acanthoideae ซึ่งใกล้เคียงกับ Mcdade and Moody (1999) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Acanthaceae จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *trn*L-*trn*F ของคลอโรพลาสต์ สามารถแบ่งกลุ่มพืชวงศ์ Acanthaceae ออกเป็น 4 กลุ่มที่สำคัญ คือ *Acanthus*, *Barleria*, *Ruellia* และ *Justicia* โดย *Ruelia*, *Justicia* และ *Barleria* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกัน และแสดงลักษณะ monophyletic ซึ่งต่างจาก *Acanthus* อย่างไรก็ตามข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลระดับโมเลกุลไม่สัมพันธ์กัน ดังเช่นการรายงานของ McDade และคณะ (2005) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชเผ่า Acantheae ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 บริเวณ คือ บริเวณ ITS ในนิวเคลียส และบริเวณ *rps16*, *trn*G-*trn*S และ*trn*L-*trn*F ในคลอโรพลาสต์ ทำการศึกษาตัวอย่างพืช 18 สกุล จาก 20 สกุล โดยใช้ Justicieae เป็น out groups

ในประเทศไทยการจัดจำแนกพืชตามหลักวิทยาศาสตร์กล่าวไว้ในหนังสือ 84 วงศ์พรรณไม้ เทิดไท้องค์ราชันว่ามีนักพฤกษศาสตร์หลายท่านจัดจำแนกพืชวงศ์ Acanthaceae แต่ในปัจจุบันพืชวงศ์นี้มีการจัดจำแนกตาม Scotland และ Vollesen (2000) ซึ่งศึกษาข้อมูลจากการเรียงของกลีบดอก เรณู และมีด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ทำให้สามารถแยกพืชวงศ์ Acanthaceae ได้ 3 วงศ์ย่อย ได้แก่ Nelsonoideae, Thunbergioideae และ Acanthoideae มีประมาณ 40 สกุล ประมาณ 230 ชนิดพันธุ์ ขึ้นกระจายอยู่ทั่วไปในหลายท้องที่ บางชนิดนำมาใช้เป็นไม้ประดับ เช่น อังกาบแดง หรืออังกาบสีปูน (*Barleria repen*) ใบเงิน-ใบทอง (*Graptophyllum pictum*) แดงประทัด (*Odontonema cuspidatum*) แดงพันธุ์ทิพย์ (*Megaskepasma erythrochlamys*) ห้อมช้าง (*Phlogacanthus curviflorus*) เหลืองคีรีบูน (*Pachystachys lutea*) และต้อยติ่งเทศ (*Ruellia squarrosa*) หลายชนิดมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร เช่น ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) เสลดพังพอนตัวเมีย (*Clinacanthus nutans*) เสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) อังกาบ (*Barleria cristata*) สังกรณี (*Barleria strigosa*)

รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) และเหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus*) เป็นต้น รวมทั้งหลายชนิดเป็นวัชพืช เช่น ต้อยติ่ง (*Ruellia tuberosa*) โดยสมศักดิ์ คงพริ้ว (2552) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสมุนไพรวงศ์ต้อยติ่งโดยวิธีสัณฐานวิทยา ไอโซไซม์ และเซลล์พันธุศาสตร์ จำนวน 18 ตัวอย่าง ซึ่งปลูกรวบรวมไว้ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ คือ เหงือกปลาหมอแอฟริกา (*Acanthus montanus* T. Anderson) อังกาบดอกสีขาว (*Barleria cristata* L. white flowered) อังกาบดอกสีม่วง (*B. cristata* L. violet flowered) อังกาบดอกสีขาวแถบม่วง (*B. cristata* L. white with violet strip flowered) อังกาบหนู (*B. prionitis* L.) พญาปล้องทอง (*Clinacanthus nutans* Lindau) ลิ้นงูเห่า (C. *siamensis* Bermek.) กระดูกไก่เขียว (*Justicia gendarussa* Burm. f.) กระดูกไก่ด่าง (*J. gendarussa* Burm. f.) กระดูกไก่ดำ (*J. gendarussa* Burm. f.) บัวฮาดำ (*J. ventricosa* Wall.) กำลังเจ็ดช้างสาร (*Peristrophe bivalvis* Merr.) หว้าชะอำ (*P. lanceolaria* Nees) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Kuntze) ขาไก่ (*Ruellia schomburgkii* (Craib) Bremek.) ต้อยติ่ง (*R. tuberosa* L.) คราม (*Strobilanthes cusia* Berm.) และรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) พบว่ามีลักษณะเด่นประจำวงศ์เป็นไม้ล้มลุก ไม้พุ่ม หรือไม้เลื้อย ดอกออกเป็นช่อ ดอกมีกลีบเลี้ยง 4 หรือ 5 กลีบเชื่อมติดกัน กลีบดอกมีโคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด เกสรเพศผู้มี 2 หรือ 4 อัน รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ รังไข่มี 2 ช่อง แต่ละช่องมีออวุล 1 ถึงหลายอัน ผลเป็นแบบแห้งแตกกลางพู สามารถใช้ลักษณะของลำต้น ใบ ช่อดอก ดอกย่อย และเกสรเพศผู้มาระบุพืชได้ การศึกษาจำนวนโครโมโซมร่างกายแตกต่างกันจาก 30-80 แท่ง โดยที่สกุล *Justicia* และ *Rhinacanthus* มี 2n = 30 *Ruellia*, *Strobilanthes* มี 2n = 32 *Clinacanthus* มี 2n = 34-50 *Barleria* มี 2n = 36-60 *Thunbergia* มี 2n = 54 *Peristrophe* มี 2n = 60 และ *Acanthus* มี 2n = 80 การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซมสามารถจำแนกตัวอย่างทั้งหมดออกจากกันได้

2.2 พืชสกุลอังกาบ

พืชสกุลอังกาบ (*Barleria* L.) อยู่ในวงศ์ Acanthaceae วงศ์ย่อย Acanthoideae เผ่า (Tribe) Ruellieae เผ่าย่อย (Subtribe) Barleriinae สกุล *Barleria* เป็นพืชสกุลใหญ่ที่นำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร และส่วนใหญ่เป็นพืชล้มลุก และเป็นไม้พุ่ม ใบเดี่ยว ปลายและขอบใบแหลมคม เห็นซิสโทสลิทต์ (cystolith) ชัดเจน ดอกช่อแบบช่อเชิงลด (spike) หรือ แบบช่อกระจุก ไม่มีก้านดอก มีใบประดับของช่อดอกที่ลดรูปเป็นลักษณะคล้ายหนาม เกิดที่ซอกใบ มีหลายสี ใบประดับเรียงซ้อนเหลื่อม วงกลีบเลี้ยง เป็นหยักลึก 4 แฉก แบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นนอกขนาดใหญ่กว่าชั้นใน หลอดวงกลีบรูปกรวย มี 5 แฉก รูปไข่ บานไปทางด้านบนของดอก เกสรเพศผู้มี 4 อัน แบ่งเป็นเกสรที่ยื่นออกไปด้านหน้า 2 อัน มีอับเรณู 2 อัน สมมาตร เกสรเพศผู้ที่อยู่ด้านในมี 2 อัน ลักษณะเป็นหมัน ผลแห้งแตก คล้ายรูปไข่ หรือรูปขอบขนาน ไม่มีก้าน เมล็ดมีจำนวน 2 หรือ 4 เมล็ด รูปค่อนข้างกลม ผิวหยาบ แบนชิด ไม่มีขนที่ไวต่อความชื้น (Benoist, 1912; Ridley, 1923; Cramer, 1998)

พืชสกุลนี้พบทั่วไปในเขตแห้งแล้งของเขตร้อนทั่วโลก มีประมาณ 300 สายพันธุ์ มีความเชื่อว่าพืชในสกุล *Barleria* มีการแพร่จากประเทศญี่ปุ่น เอเชียตะวันออกเชียงใต้ อินเดีย แอฟริกา หรือเกาะมาดากัสการ์ไปยังทวีปอเมริกา และเม็กซิโก ซึ่งมีการกระจายมากในแถบ Old World เช่น ในทวีปแอฟริกา มีความหลากหลายของพืชในสกุล *Barleria* บริเวณเขตอบอุ่นด้านตะวันออกประมาณ

80 สายพันธุ์ และตอนใต้ประมาณ 70 สายพันธุ์ สำหรับอเมริกาพบเพียง *B. oenotheroides* สายพันธุ์เดียวเท่านั้น (Balkwill และ Balkwill, 1998)

ในสกุล *Barleria* แบ่งออกเป็น 2 สกุลย่อย คือ *Barleria* และ *Prionitis* (Nees) C.B.Clarke และแบ่งออกเป็น 7 หมู่ (sections) โดยสกุลย่อย *Barleria* มี 2 หมู่ คือ *Barleria* และ *Chrysothrix* M. Balkwill และสกุลย่อย *Prionitis* มี 5 หมู่ คือ *Cavirostrata* M. Balkwill, *Stellatohirta* M. Balkwill, *Fissimura* M. Balkwill, *Somalia* (Oliv.) Lindau และ *Prionitis* (Nees) Lindau ซึ่งต่างจากการแบ่งแบบเดิมที่เป็น 3 สกุลย่อย คือ *Barleria*, *Somalia* และ *Prionitis* (Balkwill และ Balkwill, 1997) โดย Sections *Barleria* และ *Prionitis* มีการกระจายอยู่ทั่วไป แตกต่างจาก *Somalia* (Oliv.) Lindau, *Fissimura* M. Balkwill และ *Stellatohirtae* M. ที่มีการแพร่กระจายอยู่เฉพาะทวีป Africa สำหรับ Sections *Chrysothrix* M. Balkwill และ *Cavirostrata* M. Balkwill มีการแพร่กระจายอยู่มากในประเทศ India และ Sri Lanka (Balkwill และ Balkwill, 1998) การศึกษาการกระจายตัวของพืชในสกุลอังกาบบางชนิดในหมู่เกาะอินโดนีเซีย พบว่า *B. cristata* L. หรือ Philippine violet มีแหล่งกำเนิดจาก India, Burma และพบแพร่กระจายอยู่ในประเทศ Australia, Fiji, French Polynesia และ Hawaii สำหรับ *B. lupulina* Lindley หรือ Hophead มีแหล่งกำเนิดจาก Madagascar และพบแพร่กระจายอยู่ในประเทศ Australia, Hawaii, La Réunion และ *B. prionitis* L. หรือ Porcupine flower มีแหล่งกำเนิดจาก India และพบแพร่กระจายอยู่ในประเทศ Australia และ Samoa (Meyer และ Lavergne, 2004) เป็นต้น รวมทั้ง Darbyshire (2009) พบความหลากหลายของ *B. fulvostellata* C. B. Clarke มากในบริเวณตะวันออกของ Africa

Darbyshire (2008a) ได้ทำการศึกษา *B. descampsii* Lindau บริเวณรอยต่อระหว่างสาธารณรัฐแซนทาเนียและสาธารณรัฐแซมเบียด้วยลักษณะทางสัญฐานวิทยาสามารถย้ายกลุ่มจาก *sect. Stellatohirta* M. Balkwill ไปเป็น *sect. Cavirostrata* ที่ใกล้เคียงกับ *B. grandipetala* De Wild และ *B. richardsiae* I. Darbysh และพบสปีชีส์ใหม่ คือ *B. samhanensis* บริเวณทางเหนือของประเทศโอมาน (Knees และคณะ, 2007) เช่นเดียวกับ Darbyshire (2008b) ได้ศึกษาด้านสัญฐานวิทยาพบสปีชีส์ใหม่ในพืชสกุล *Barleria sect. Stellatohirta* จากประเทศ Africa 3 สปีชีส์ คือ *B. aristata* จาก south-central Tanzania, *B. aenea* จาก south-western Tanzania และ northeast Zambia และ *B. purpureotincta* จาก south-western Zambia รวมทั้ง Malombe และ Malombe และ Darbyshire (2010) ที่ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุล *Barleria* ใน Somalia พบสปีชีส์ใหม่ คือ *Barleria compacta* ที่อยู่ในส่วน (Section) ของ Prionitis

โดยมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และข้อมูลในพืชสกุล *Barleria* ในระดับโมเลกุลน้อย มีเพียง Makholela และคณะ (2003) ที่ศึกษาด้วยเทคนิคทาง allozyme ใน *B. greenii* จากพื้นที่สามแหล่งในประเทศแอฟริกา โดยทำการศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์จำนวน 16 ตำแหน่ง เช่น Asparatate aminotransferase, Esterase, Glucose-6-phosphate isomerase และ Isocitrate dehydrogenase เป็นต้น พบว่า 7 ตำแหน่ง (43.8%) สามารถแยกความแตกต่างของประชากรทั้ง 3 ได้ และพบว่า 9 ตำแหน่ง (56.2%) ปรากฏเพียงลักษณะเดียว

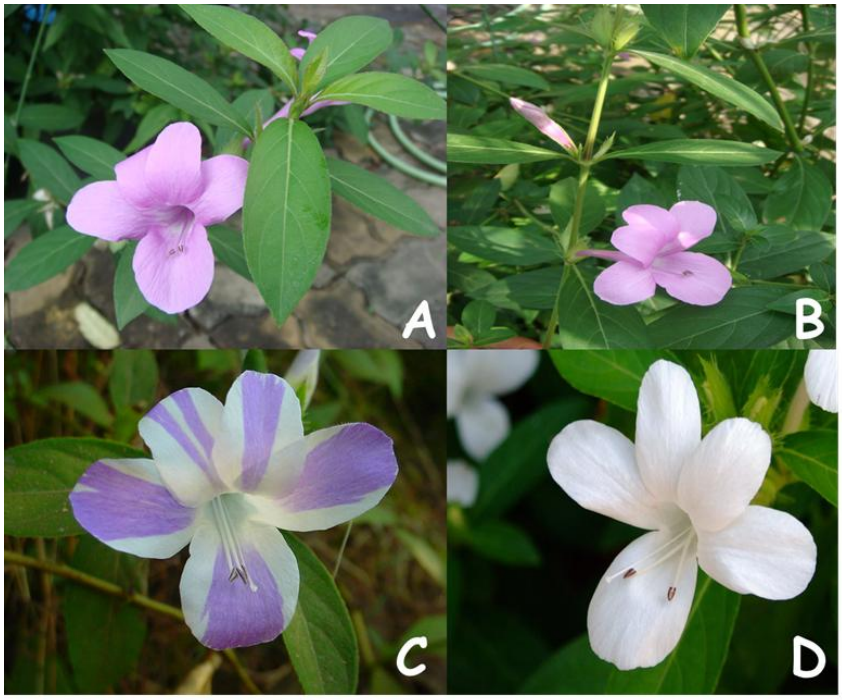
Craib (1918) ศึกษาพรรณไม้ในประเทศไทยและแถบภูมิภาคอินโดจีน โดยใช้ลักษณะสัญฐานวิทยาของพืช พบพรรณไม้ในเผ่าย่อย Barleriinae 6 ชนิด คือ *Asystasia kerrii* L.,

Asystasiella neesiana L., *Barleria cristata*, *B. lupulina*, *B. siamensis* Craib และ *B. strigosa* Willd. และในประเทศไทยพบพืชในสกุลอังกาบได้ในพื้นที่แห้งแล้ง รกร้าง ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าดิบแล้งของทุกภาคของทั่วประเทศ จำนวน 5 ชนิด (Hansen, 1985) และในการประชุมสัมมนาพิพิธภัณฑ์สิรินธรกับการพัฒนาการเกษตร และสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย ประจำปี 2552 แสดงให้เห็นว่าพบพืชในสกุลอังกาบอย่างน้อย 8 ชนิด คือ อังกาบเขา (*B. biloba*), อังกาบ (*B. cristata* L.), เท้าฤาษี (*B. longflora* L.), เสลดพังพอน (*B. lupulina* Lindl.), อังกาบหนู (*B. prionitis* L.), *B. polytricha* Wall., ระงับ (*B. siamensis* Craib) และสังกรณี (*B. strigosa* Willd.) ซึ่งพบว่ามีลักษณะทางสัญฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เช่นลักษณะสีดอก ลักษณะไม้พุ่มหรือไม้เลื้อย ซึ่งพืชในสกุลนี้มีรูปแบบที่ไม่แน่นอน รวมทั้งในประเทศไทยการเรียกชื่อนั้นส่วนใหญ่มีการเรียกชื่อที่แตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น ซึ่งอาจเกิดความสับสนได้ เช่น *B. strigosa* Willd. ชื่อสามัญ สังกรณี (Sang-ko-ra-ni) ชื่อท้องถิ่น กำแพงใหญ่ (kam-phaeng-yai) ในจังหวัดเลย, ขี้ไฟนกคุ่ม (Khi-fai-nok-khum) ในจังหวัดปราจีนบุรี, เทิ่งดี (Thoeng-de) ในจังหวัดกาญจนบุรี, หญ้าหงอนไก่ (Ya-ngon-kai) หรือ หญ้าหัวนาค (Ya-hua-nak) ในภาคเหนือ, กวางหีแฉะ (Kwang-hi-chae) ในจังหวัดสุโขทัย และยังพบในชื่อ ดอกสังกรณี ต้นสังกรณี ใบสังกรณี ผลสังกรณี และรากสังกรณี เป็นต้น *B. prionitis* L. ชื่อท้องถิ่น เขี้ยวแก้ว (Khaio-kaeo) เขี้ยวเนื้อ (Khiao-nuea) อังกาบหนู (Ang-kap-nu) (ภาคกลาง) มันไก่ (Man-kai) (ภาคเหนือ) *B. lupulina* Lindl. ชื่อสามัญ เสลดพังพอน (Salet-phang-phon) ชื่อท้องถิ่น พิมเสนต้น (Phimsen-ton) เสลดพังพอนตัวผู้ (Salet-phang-phon-tua-phu) (ภาคกลาง), ดอกเสลดพังพอน, ต้นเสลดพังพอน, ใบเสลดพังพอน, ผลเสลดพังพอน, ราก เสลดพังพอน, เช็กเชเกี่ยม Chek-che-kiam (Chinese) *B. siamensis* Craib ชื่อท้องถิ่น ระงับ (Ra-ngap), ระงับพิษ (Ra-ngap-phit) และหญ้ากำแพง (Ya-kam-phaeng) (ในจังหวัดเลย) *B. longflora* L. ชื่อท้องถิ่น เท้าฤาษี (Thao ruesi) (นครราชสีมา) *B. biloba* Imlay ชื่อท้องถิ่นอังกาบเขา (Ang kap khao) และ *B. cristata* L. ชื่อท้องถิ่น ก้านชั่ง (Kan chang), ลืมเฒ่าใหญ่ (Luem thao yai) (เชียงใหม่), คันชั่ง (Khan chang) (ตาก), ทองระอา (Thong ra a) (กรุงเทพ), อังกาบ (Ang kap), อังกาบเมือง (Ang kap mueang) (ภาคกลาง) และอังกาบกานพลู (Ang kap kan phlu) สำหรับภาคเหนือ ดังนั้นในการจัดจำแนก หรือการนำมาใช้ประโยชน์ อาจผิดพลาดจากการมีชื่อพ้องกัน โดยในประเทศไทยนำพืชสกุลอังกาบมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การนำอังกาบมาใช้เป็นไม้ดอกและไม้ประดับ ใช้เป็นพืชสมุนไพร ได้แก่ เสลดพังพอน อังกาบหนู และสังกรณี (นันทวัน และอรนุช, 2543a; นันทวัน และอรนุช, 2543b) อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานข้อมูลทางในการจัดจำแนก หรือความหลากหลายในระดับโมเลกุล มีเพียงข้อมูลด้านองค์ประกอบทางเคมีในบางสปีชีส์เท่านั้น คือ เสลดพังพอน

2.3 ตัวอย่างพืชในสกุล *Barleria*

2.3.1 อังกาบ (*Barleria cristata* L.)

อังกาบ (*Barleria cristata*) มีชื่อท้องถิ่น เช่น ก้านชั่ง ลืมเฒ่าใหญ่ อังกาบกานพลู อังกาบเมือง ทองระอา และคันชั่ง เป็นต้น เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นมีความสูงประมาณ 1-2 เมตร กิ่งก้านและใบมีขนสีเหลืองอ่อน ใบออกตรงข้ามเป็นคู่ๆ ใบรูปไข่แกมรี กว้าง 2-5 เซนติเมตร ยาว 4.5-8 เซนติเมตร มีขนทั้งสองด้านโดยเฉพาะตามเส้นใบ ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ขอบใบเรียบ ก้านใบยาว 0.3-1.3 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อ ค่อนข้างแน่นที่ปลายยอด หรือบริเวณใกล้ปลายยอด สีฟ้าอมม่วงหรือแกมชมพู ที่โคนช่อดอกมีใบประดับรูปขอบขนานยาว ขอบใบเว้า ปลายเป็นหนามแหลมยาว ดอกส่วนโคนเชื่อมเป็นหลอด ยาว 3-4 เซนติเมตร ส่วนปลายแยกเป็น 5 กลีบ ขนาดไม่เท่ากัน กลีบล่างจะใหญ่กว่า 4 กลีบบน ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ด้านนอกมีขน เกสรผู้ 4 อัน สั้น 2 ยาว 2 ผลเป็นฝักรูปยาวรี ปลายและโคนแหลม ส่วนปลายกว้างกว่าส่วนโคน เมล็ดมี 4 เมล็ด พบขึ้นทั่วๆ ไปตามหัวไร่ปลายนา ป่าละเมาะ ป่าดงดิบ และป่าเต็งรัง ตามรายงานของสมศักดิ์ (2552) พบได้ทั้งอังกาบดอกสีม่วง (รูปที่ 2.1 A และ B) อังกาบดอกสีขาวแถบม่วง (รูปที่ 2.1 C) และอังกาบดอกสีขาว (รูปที่ 2.1 D)



รูปที่ 2.1 แสดงสีของดอกอังกาบ (*B. cristata*) (A-B) อังกาบดอกสีม่วง (C) อังกาบดอกสีขาวแถบม่วง และ (D) อังกาบดอกสีขาว

2.3.2 เสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina* L.)

เสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) มีชื่อท้องถิ่น เช่น เช็กเชเกี่ยม พิมเสนต้น เป็นไม้พุ่มสูง 1-2 เมตร แตกกิ่งจำนวนมาก สีน้ำตาลอมเขียวหรือสีน้ำตาลแดง ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามสลับฉาก เรียงชิดกันใกล้ช่อดอก ใบรูปใบหอก ยาว 4-10 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบเรียวสอบจรดก้านใบ ขอบใบเรียบ แผ่นใบเกลี้ยง สีเขียวเข้มหรืออมม่วง เส้นกลางใบส่วนมากมีสีแดงหรือสีชมพู ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ก้านใบสั้น มีหนามที่โคนหนึ่งคู่ โค้งงอ ยาว 1-2 เซนติเมตร มีหนามสั้นๆ ตรง 1 อัน ช่อดอกแบบช่อเชิงลด ออกตามปลายกิ่ง ยาว 8-10 เซนติเมตร ใบประดับมีโคนสีเขียว สีน้ำตาลอมม่วงครึ่งบน หรือทั้งใบประดับมีสีแดงอมเขียวหรือสีม่วงอมน้ำตาล รูปไข่เกือบกลม ปลายเป็นติ่งแหลม ยาวได้ประมาณ 1.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียงตรงข้ามเป็นคู่ ยาว 0.8-1 เซนติเมตร คู่นอกมีขนาดใหญ่กว่าคู่ใน ปลายเป็นติ่งหนาม กลีบดอกคล้ายรูปปากเปิด หลอดกลีบเรียวยาว ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร กลีบดอก 5 กลีบ สีส้มหรือเหลือง กลีบส่วนบนส่วนใหญ่มี 4 กลีบ เรียงซ้อนแผ่ชิดกันบานแผ่ออก ขนาดใหญ่กว่ากลีบล่าง ยาว 1-2 เซนติเมตร กลีบล่างขนาดเล็ก พับงอเล็กน้อย เกสรเพศผู้ 2 อัน ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ยื่นพ้นปากหลอดกลีบดอก ดังแสดงในรูปที่ 2.2 และมีเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 2 อัน สั้นๆ รังไข่ 2 ช่อง ก้านเกสรเพศเมียเรียวยาว ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ผลแบบแคปซูล รูปไข่หรือแกมรูปขอบขนาน แบน ยาว ประมาณ 1.5 เซนติเมตร แห้งแล้วแตกเป็น 2 ซีก มี 1-2 เม็ด ในแต่ละซีก ในการนำมาใช้ประโยชน์พบว่ามีฤทธิ์ลดการอักเสบ โดย Kanchanapoom และคณะ (2001) สกัดสาร 8-O-acetyl-6-O-trans-p-coumaroylshanzhiside, saletpangponosides A–C and 8-O-acetylmussaenoside จากยอดอ่อนของเสลดพังพอนตัวผู้ เมื่อทดสอบสารดังกล่าวมีฤทธิ์ลดการอักเสบได้ มีฤทธิ์ลดอาการปวด โดยพบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มจากส่วนเหนือดิน ความเข้มข้นระหว่าง 125-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดอาการปวดในหนูถีบจักร เมื่อใช้การทดสอบด้วย acetic acid หรือฟอร์มาลิน รวมทั้งมีความเป็นพิษโดยเมื่อให้หนูถีบจักรกินสารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดิน หรือฉีดเข้าช่องท้อง ในระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง (LD50) เท่ากับ 4.5 และ 3.7 กรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ (Suba และคณะ, 2004)

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะใบและดอกของเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*)

2.3.3 อังกาบหนู (*Barleria prionitis* L.)

อังกาบหนู (*Barleria prionitis*) มีชื่อท้องถิ่น เช่น มันไก่ เขี้ยวเนื้อ และเขี้ยวแก้ว เป็นต้น เป็นไม้พุ่ม สูง 1-1.5 เมตร แตกกิ่งจำนวนมาก ลำต้นเกลี้ยง มีหนามยาวรอบข้อ หนามยาว 1-2 เซนติเมตร ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรี รูปไข่ หรือรูปขอบขนาน ยาว 4-12 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ปลายเป็นติ่งแหลม โคนใบเรียวสอบจรดก้านใบ ขอบใบมีขนแข็ง แผ่นใบมีขนสั้นนุ่มกระจายด้านล่าง ก้านใบยาวได้ประมาณ 2.5 เซนติเมตร ใบตามช่อดอกมีขนาดเล็กกว่าตามลำต้น ดอกออกเป็นกระจุกตามซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ออกหนาแน่นช่วงปลายกิ่งคล้ายช่อเชิงลดสั้นๆ ใบประดับรูปแถบ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใบประดับย่อยเป็นหนาม ติดทน ยาว 1-1.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียงซ้อนเหลื่อม ขนาดไม่เท่ากัน คู่นอกมีขนาดใหญ่กว่า ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ปลายเป็นติ่งหนาม กลีบคู่ในรูปไข่ ปลายแหลมยาว กลีบดอกคล้ายรูปปากเปิด หลอดกลีบยาว 2-2.5 เซนติเมตร กลีบดอก 5 กลีบ สีเหลือง กลีบบน 4 กลีบ ยาวเท่าๆ หลอดกลีบ เรียงซ้อนเหลื่อม กลีบล่างขนาดเล็กกว่าเล็กน้อย เกสรเพศผู้ 2 อัน ติดที่โคนกลีบดอก ยื่นเลยปากหลอดกลีบเล็กน้อย ดังรูปที่ 2.3 อับเรณูยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 2 อัน ขนาดเล็ก รังไข่รูปไข่ ยาวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร มี 2 ช่อง แต่ละช่องมีออวุล 2 เม็ด ก้านเกสรเพศเมียเรียวยาว ยาวกว่าเกสรเพศผู้ ยอดเกสรเป็น 2 พู ไม่ชัดเจน ผลแบบแคปซูล รูปไข่แกมรูปขอบขนาน ยาว 1.5-2 เซนติเมตร ปลายเป็นจงอย เมล็ดแบน รูปคล้ายรูปไข่ ยาว 5-7 มิลลิเมตร มีขนคล้ายไหมแบนราบ มีชื่อพ้อง คือ *Barleria hystrix* ที่พบเฉพาะที่ปากีสถานและอินเดียซึ่งใบและดอกมีขนาดใหญ่กว่า ประโยชน์ ใบใช้แก้งูกัด เคี้ยวแก้ปวดฟัน

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะดอกของต้นอังกาบหนู (*B. prionitis*)

2.3.2 สังกรณี (*Barleria strigosa* Willd.)

สังกรณี (*Barleria strigosa*) มีชื่อท้องถิ่น เช่น กำแพงใหญ่ ขี้ไฟนกคุ่ม ตับปิ้ง หญ้าหงอนไก่และหญ้าหัวนาค เป็นต้น เป็นไม้พุ่ม สูง 1-1.5 เมตร แตกกิ่งมาก ลำต้นและกิ่งมีขนหยาบ ไม่มีหนาม ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรี รูปขอบขนาน หรือรูปใบหอก ยาวได้ประมาณ 20 เซนติเมตร ปลายใบแหลม แหลมยาว หรือยาวคล้ายหาง โคนใบเรียวสอบจรดก้านใบหรือรูปลิ่ม ขอบใบเรียบ แผ่นใบมีขนด้านล่าง ไร้ก้านหรือมีก้านยาวได้ประมาณ 3 เซนติเมตร ดอกออกเป็นกระจุกช่อคล้ายช่อเชิงลดสั้นๆ ตามซอกใบหรือปลายกิ่ง ใบประดับรูปรี รูปขอบขนาน รูปใบหอกหรือรูปแถบ ยาว 1-2 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียงซ้อนเหลื่อม ขนาดไม่เท่ากัน คู่นอกมีขนาดใหญ่กว่า รูปไข่แกมรูปสามเหลี่ยม รูปรี หรือรูปขอบขนาน ยาว 1-3 เซนติเมตร ขอบจักถี่ เป็นติ่งหนามสั้นๆ ปลายแหลมหรือแหลมยาว บางครั้งแยก 2 แฉก ตื้นๆ กลีบคู่ในรูปรีหรือรูปขอบขนาน แคบและสั้นกว่าคู่นอก ขอบส่วนมากมีขนครุย กลีบดอกคล้ายรูปปากเปิด หลอดกลีบยาว 2-4 เซนติเมตร กลีบดอก 5 กลีบ สีม่วงอมน้ำเงิน เรียงซ้อนเหลื่อม กลีบบน 4 กลีบขนาดไม่เท่ากัน ยาว 2-3 เซนติเมตร 2 กลีบนอกรูปไข่กลับ 2 กลีบในแคบกว่าเล็กน้อย กลีบล่างเกือบกลม ขนาดเล็กกว่ากลีบบนเล็กน้อย ดังรูปที่ 2.4 เกสรเพศผู้ 4 อัน ติดที่โคนกลีบดอก อันสั้น 2 อัน ยาว 2 อัน อันยาวยื่นเลยปากหลอดกลีบเล็กน้อย อับเรณูยาวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร รังไข่รูปขอบขนาน เกลี้ยง มี 2 ช่อง แต่ละช่องมีออวุล 2 เม็ด ก้านเกสรเพศเมียเรียวยาว ยาวเท่าเกสรเพศผู้อันยาว ยอดเกสรแยก 2 แฉก เรียบ ผลแบบแคปซูล เรียวแคบ ยาวประมาณ 2 ซม. เกลี้ยง เมล็ดแบน กลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร มีขนแบนราบ สังกรณีมีเขตการกระจายพันธุ์ในภูมิภาคอินโดจีน ในไทยพบทั่วทุกภาค

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะดอกของต้นสังกรณี (*B. strigosa*)

2.4 เทคนิคที่ใช้ในการวิจัย

2.4.1 เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ปัจจุบันนิยมหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในการหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของพืชดอก Taberlet และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาไพรเมอร์ชนิดใหม่ขึ้นมาเพื่อใช้ในการจำแนกพืช โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของ tobacco,

marchantia และ rice บริเวณยีน *trn*T (UGU) และ *trn*F (GAA) ซึ่งเป็น single-copy region ขนาดใหญ่ที่มีความจำเพาะ และพบว่ายีน *trn* เป็นยีนอนุรักษ์ เมื่อออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tRNA 6 ชนิด คือ a, b, c, d, e, และ f แสดงดังตารางที่ 2.1 โดยไพรเมอร์ a และ b ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*T(UGU) และ *trn*L(UAA) 5'exon ไพรเมอร์ c และ d ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*L(UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon และไพรเมอร์ e และ f ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*L (UAA) 3'exon และ *trn*F (GAA) ขนาดของผลผลิต (PCR product) ที่คาดว่าจะพบมีขนาด 773, 833 และ 251 คู่เบส (base pair: bp) ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ a และ b ขนาด 577, 614 และ 389 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ c และ d และ ขนาด 438, 324 และ 158 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ e และ f ในพืชชนิด tobacco , marchantia และ rice เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน algae, bryophytes, pteridophytes, gymnosperms และ angiosperm จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ c และ d สามารถจำแนกพืชดังกล่าวได้มาก ชนิดที่สุด คือจำแนกได้ถึง 15 ชนิดใน 19 ชนิด จึงนิยมนำไพรเมอร์ c และ d มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของพืช

ตารางที่ 2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

Name	sequence 5' – 3'
a	CATTACAAATGCGATGCTCT
b	TCTACCGATTTCGCCATATC
c	CGAAATCGGTAGACGCTACG
d	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
e	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
f	ATTTGAACTGGTGACACGAG

2.4.2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะใช้ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) มาช่วยในการวิเคราะห์ซึ่งชีวสารสนเทศเป็นศาสตร์แขนงใหม่ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการนำความรู้ด้านเทคโนโลยีสารสนเทศมาใช้ในการศึกษาและใช้เพื่อการจัดการกับข้อมูลจำนวนมากที่ได้จากการวิจัยด้านชีวภาพ (biological Science) เช่น การนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีมาเปรียบเทียบทีละคู่ (pairwise sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ซึ่งทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่นั้นว่าเหมือนหรือต่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล แล้วแสดงออกมาเป็นคะแนนในรูปของ graphic view รวมไปถึงการแสดงข้อมูลทั้งหมดของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล เช่น เลขประจำตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) รายละเอียดต่างๆ เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณใด แหล่งที่มา หรือการใช้โปรแกรม Webcutter 2.0 มาใช้ตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree analysis) มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มและศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในปัจจุบันโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมาก ในแง่ของ phylogenetic tree building method โปรแกรมซึ่งเป็นที่นิยมมากคือโปรแกรม PHYLIP ถูกเขียนขึ้นโดย Joe Felsenstein (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2547) โปรแกรม PHYLIP ประกอบไปด้วย phylogenetic analysis method มากมาย เช่น distance matrix, pasimony และ likelihood method ซึ่งมีความยืดหยุ่นในการปรับค่าการทำงานอีกด้วย ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเลือกวิธี วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยการใช้ distance matrix method โดยหลักการสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ phylogenetic tree คือ จัดเรียงข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันอยู่ตรงกัน จากนั้นตรวจเช็คความถูกต้อง และตัดแต่งให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดที่จะนำมาหาความสัมพันธ์ให้มีหัวและท้ายเท่ากัน แล้วจึงเปรียบเทียบข้อมูลโดยวิธี aligment ด้วยโปรแกรม เช่น ClustalW, ClustalX เป็นต้น พร้อมใช้ distance matrix method เป็น substitution model แล้วทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (tree construction) โดยอาศัยโปรแกรม PHYLIP ได้แก่ seqboot.exe, dnadist.exe, neighbor.exe และ consense.exe พร้อมปรับแต่งแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม tree viewer หรือ tree editor เช่น TreeView32

2.4.3 เทคนิคอาร์เอพีดี

อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphism DNA: RAPD) คิดค้นขึ้นโดย Williams และคณะเมื่อปี ค.ศ.1990 เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบข่มสมบูรณ์ หลักการที่ใช้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบสุ่ม (Random primer) ขนาดของไพรเมอร์สั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ และใช้อุณภูมิในขั้นตอนการ Annealing ต่ำ เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง และอย่างไม่จำเพาะเจาะจงในจีโนม ถ้าตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอนั้นไม่ไกลกันมากนัก และเกาะในทิศทางตรงกันข้ามแบบหันปลาย 3’ เข้าหากัน จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองได้

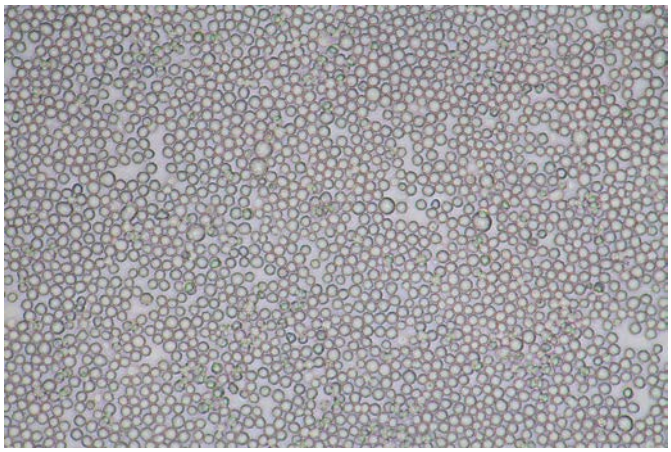
2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

2.5.1 ชนิดของเซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง ประกอบไปด้วยเซลล์ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (Murine lymphocytic leukemia cell line: P388) เซลล์มะเร็งเต้านมของคนชนิด MCF7 (Human breast cancer cell line: MCF7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของคนชนิด HT29 (Human colon adenocarcinoma cell line: HT29) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากของคนชนิด KB (Human oral epidermoid carcinoma: KB) เซลล์ไตลิงชนิด Vero (African green monkey kidney cell line: Vero) และเซลล์มะเร็งตับของคนชนิด HepG2 (Human hepatoma cell line: HepG2) โดยสามารถแยกชนิดของเซลล์ไลน์ที่นำมาศึกษาได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.5.1.1 เซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอย (suspension cell line)

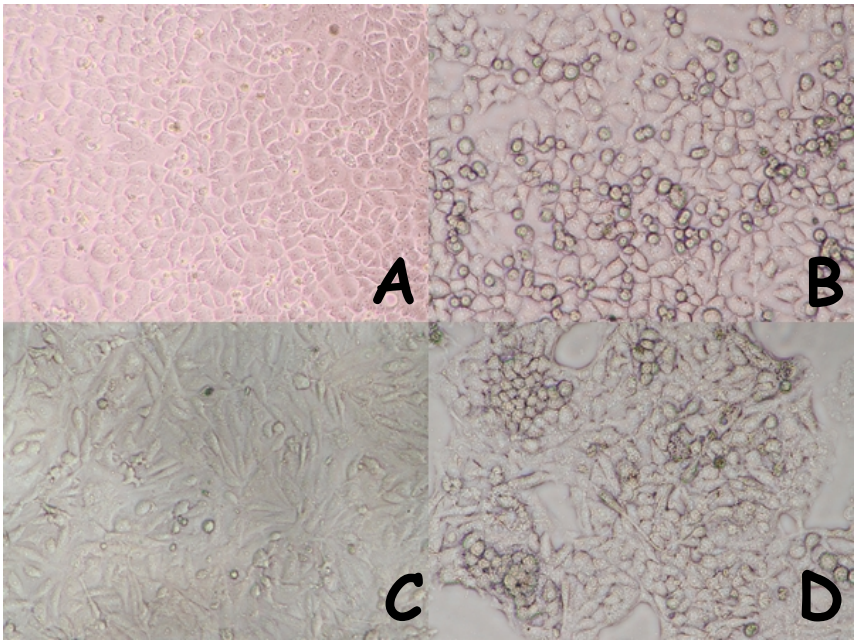
เซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอยที่ใช้ในการศึกษา ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เซลล์ P388 เป็นเซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอยชนิดเดียวในการทดลองครั้งนี้ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู มีลักษณะรูปร่างของเซลล์เป็นแบบกลมใส มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.5 มีระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ หรือ Biosafety อยู่ที่ระดับ 1 สามารถนำไปใช้ในงานด้านอื่นๆได้อีก เช่น การนำไปใช้เป็น Host ของการ Transfection คือ ลักษณะเซลล์ P388 เมื่อเลี้ยงในอาหาร RMPI 1640



รูปที่ 2.5 ลักษณะเซลล์ไลน์ P388 ที่กำลังขยาย 20 เท่า

2.5.1.2 เซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิว (adherent cell line)

เซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิวที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์ MCF7 เป็นเซลล์มะเร็งเต้านมที่แยกได้จากผู้หญิงผิวขาวอายุ 69 ปี โดยเซลล์มีรูปร่างคล้ายโดมสี่เหลี่ยม เซลล์ HT29 เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของคน เจริญเติบโตโดยการเกาะบนพื้นผิวของฟลาสก์สามารถนำไปใช้เป็น Transfection host ได้เช่นเดียวกัน เซลล์ Vero คือ เซลล์ไลน์ที่แยกได้จากไตของลิง มีรูปร่างคล้ายกับกระสวย สามารถนำไปใช้ในงานด้านอื่นได้มาก เช่น ใช้สำหรับตรวจหาไวรัส หรือการศึกษาเกี่ยวกับโรคมาลาเรีย และเซลล์ HepG2 ได้จากเนื้อเยื่อตับ โดยเซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิวมีลักษณะการเจริญเติบโตในฟลาสก์ตามรูปที่ 2.6



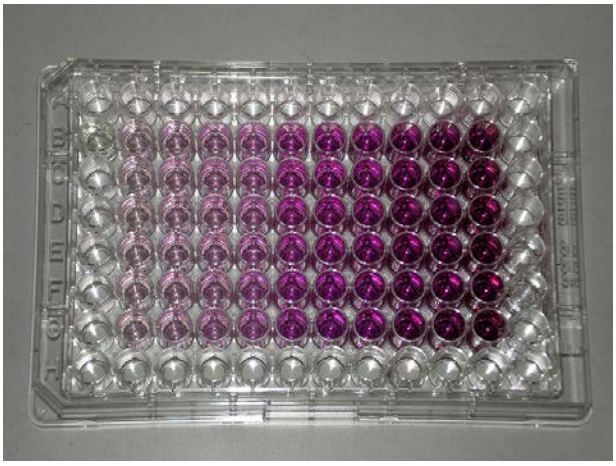
รูปที่ 2.6 ลักษณะเซลล์ไลน์ชนิดเกาะพื้นผิว (A) เซลล์ไลน์ชนิด MCF7 (B) เซลล์ไลน์ชนิด HT29 (C) เซลล์ไลน์ชนิด Vero และ (D) เซลล์ไลน์ชนิด HepG2 ถ่ายโดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 20 เท่า

2.5.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT

โดยทั่วไปการทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity Test) สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และการนำไปใช้ประโยชน์ โดยสามารถจำแนกวิธีการทดสอบตามผลของการนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2 ประเภท คือ การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย (Bioassays) และการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย หรือการใช้สัตว์ทดลอง เช่น หนู กระต่ายและสุนัข เป็นต้น การใช้สัตว์ทดลองนั้นจะสามารถทดสอบได้หลายวิธีการ เช่น การกิน การสัมผัสโดยผิวหนัง การหายใจ และการฉีดสารเคมีเข้าลำตัว เป็นต้น ซึ่งเมื่อทำการทดลอง สัตว์จะแสดงอาการตอบสนองต่อสารเคมีที่ได้รับในลักษณะต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการอักเสบของเนื้อเยื่อ การระคายเคือง การเกิดเนื้องอก อัมพาต หรือแม้กระทั่งตาย ซึ่งอาการทั้งหลายเหล่านี้ล้วนแล้วแต่สร้างความเจ็บปวดและทุกข์ทรมานแก่สัตว์ทดลองทั้งสิ้น อีกทั้งยังสิ้นเปลืองงบประมาณมากในการทดสอบแต่ละครั้ง ดังนั้นเพื่อเหตุผลทางเศรษฐศาสตร์ และศีลธรรม นักพิษวิทยาจึงคิดหาวิธีการอื่นๆ เพื่อลดการใช้สัตว์ในการทดสอบสารพิษ จากข้อจำกัดดังกล่าว นักพิษวิทยาจึงได้มีการพัฒนานำเอาเนื้อเยื่อ และเซลล์จากส่วนต่างๆ ของสัตว์และมนุษย์มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมี เช่น การนำเอาเม็ดเลือดแดง (Red blood cells: RBCs) มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง (Irritant) สำหรับการทดลองนี้จะเลือกใช้วิธีการทดสอบแบบ MTT assay โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Mosmann (1983) เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสีที่ยุ่งยากและเครื่องเก็บเกี่ยวเซลล์ที่มีราคาแพง

MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นสีสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt ที่ในปัจจุบันมีผู้นิยมใช้ในการทดสอบทางชีววิทยาในงานด้านต่างๆ มากมาย เพื่อหลีกเลี่ยงวิธีทดสอบมาตรฐานที่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งเป็นการวิเคราะห์

ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหา Cell viability โดยหลักการของวิธีนี้ คือ เซลล์ที่ทำการทดสอบ ถ้าเป็นเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้ enzyme succinate dehydrogenase ใน mitocondria ทำปฏิกิริยากับสาร MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น formazan product ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน หลังจากละลายสีภายในเซลล์ด้วย DMSO จึงทำการวัดหาปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ในปัจจุบันมีการใช้สารอนุพันธ์ (derivatives) ของ MTT หรือ สารที่ทำงานคล้ายคลึงกับ MTT เช่น การใช้ MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy- phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, XTT (sodium 3'-[1-[(phenylamino)carbo-nyl]-3,4-tetrazo-lium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene- sulfonic acid hydrate, AP (acid phosphatase), NR (neutral red), CVDE (crystal violet dye elution), SRB (sulforhodamine B), lactate dehydrogenase, hexosa-minidase เป็นต้น (Buttke และคณะ, 1993) แต่สารที่เป็นอนุพันธ์ของ MTT มีราคาสูงกว่า MTT มาก และ MTT เป็น tetrazolium salt ที่มีผู้นิยมใช้กันมาก เพราะให้ค่าที่ถูกต้อง แม่นยำ และมีความสม่ำเสมอ เมื่อเทียบกับสารอื่น โครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ MTT ในการพัฒนาวิธีการทดสอบ ซึ่งตัวอย่างของไมโครเพลตในการทดสอบครั้งนี้ แสดงไว้ในรูปที่ 2.7
(http://www.mtec.or.th/laboratorycellunit/index. php/tools-and-services/29)



รูปที่ 2.7 ตัวอย่างไมโครเพลตที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT
(ที่มา: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTT_Plate.jpg)

2.6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย คือ การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารที่มีอยู่ในสมุนไพร โดยวิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด คือ paper disc diffusion method (Kirby-Bauer) เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่

หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไว้ก่อนซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้

เชื้อ เจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบแผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว และใช้เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารสกัดจากพืชในสกุลนี้โดยส่วนใหญ่ใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาอาการไอ ขับเหงื่อ และขับเสมหะ (Singh และคณะ, 2005) ต้านข้ออักเสบ ต้านการอักเสบ และใช้เป็นสารคุมกำเนิด (Singh และคณะ, 2003; Gupta และคณะ, 2000) Samuel และคณะ (2010) ศึกษาถึงการใช้ยาสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศมาเลเซีย พบว่าใช้ใบของ *B. lupulina* ในการพอกเพื่อกำจัดหูด และใช้ใบของ *B. prionitis* มาบดเพื่อพอกในการแก้การอักเสบ โดยมีองค์ประกอบทางเคมีชนิด iridoid glucoside (Kanchanapoom และคณะ, 2001) betaine (Tuntiwachwuttikul และคณะ, 1998) และสารสกัดมีความสามารถในการต้านไวรัสชนิด herpes simplex virus type 2 (HSV-2) (Yoosook และคณะ, 2000) Suba และคณะ (2004a, 2004b) เมื่อให้หนูถีบจักรกินสารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดินของต้นเสลดพังพอน (*B. lupulina*) หรือฉีดเข้าช่องท้อง ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) เท่ากับ 4.5 และ 3.7 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยมีฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือดหลังรับสารสกัดภายใน 4 ชั่วโมง และฤทธิ์สามารถอยู่ได้นาน 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ Suba และคณะ (2005) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอาการอักเสบจากสารสกัดใบของ *B. lupulina* Lindl. ทั้งในแบบเฉียบพลัน และกึ่งเฉียบพลันในหนูเผือก (albino rat) ในทุกความเข้มข้น (200-300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สามารถลดอาการบวมที่ชักนำโดย carrageenin และ serotonin ลงได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และที่ขนาดความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะ

Ata และคณะ (2009) ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรจากสารสกัดเอทานอลของใบ *B. prionitis* สามารถแยกสารองค์ประกอบทางเคมีชนิด phenylethanoid glycoside ชนิดใหม่ คือ barlerinoside และ iridoid glycosides จำนวน 6 ชนิด คือ shanzhiside methyl ester, 6-O-transp-coumaroyl-8-O-acetylshanzhiside methyl ester, barlerin, acetylbarlerin, 7-methoxydiderroside และ lupulinoside

Gupta และคณะ (2000) ศึกษาสารสกัดจากรากของ *B. prionitis* มีความสามารถทำให้เกิดความเป็นหมันในหนูได้ โดยให้สารสกัดจากรากขนาด 100 mg: rat: day ในหนูเพศผู้ เป็นระยะเวลา 60 วัน ซึ่งไม่มีผลทำให้น้ำหนักตัวลด แต่มีผลทำให้เกิดการขัดขวางการสร้างอสุจิ โดยปริมาณของ spermatids ลดลง 73.6% แต่ปริมาณของ secondary spermatocytes ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับ Verma และคณะ (2005) ได้ศึกษาความสามารถในการคุมกำเนิดของสารสกัดจากส่วนของเมทานอลของส่วนรากจาก *B. prionitis* ในหนูเพศผู้ ที่ได้รับสารสกัดในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 60 วัน

Banerjee และคณะ (2012) ได้รวบรวมผลการวิจัยถึงองค์ประกอบทางเคมีของ *B. prionitis* ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีสารที่องค์ประกอบหลากหลายชนิด เช่น balarenone (1), pipataline (2), lupeol (3), prioniside A (4), prioniside B (5) and prioniside C (6) ที่พบในสารสกัดจากเอทานอล และสารชนิด glycosides ประกอบด้วย barlerinoside (7), verbascoside (8), shanzhiside methyl ester (9), 6-O-trans-p-coumaroyl-8-O-acetylshanzhiside methyl ester (10), barlerin (11), acetylbarlerin (12), 7-methoxydiderroside (13) และ lupulinoside (14) เป็นต้น รวมทั้งสารสกัดจากใบที่มีองค์ประกอบทางเคมี เช่น scutellarein (15), melilotic acid (16), syringic acid (17), vanillic acid (18), p-hydroxybenzoic acid (19), 6-hydroxyflavones (20), luteolin-7-O-β-D-glucoside (21), β-sitosterol (22), scutellarein 7-neohesperidoside (23), apigenin 7-O-glucoside (24), 13, 14-seco-stigmasta-5 และ 14-diene-3-a-ol (25) เป็นต้น

Amoo และคณะ (2009) ศึกษาสารสกัดจากส่วนต่างๆของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 3 สปีชีส์ คือ *B. prionitis*, *B. greenii* และ *B. albostellata* พบว่ามีความสามารถในการเป็นยับยั้งแบคทีเรียโดยมีค่า minimum inhibitory concentrations (MIC) ระหว่าง 0.059 - 6.25 mg/ml และมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านการอักเสบ โดยมีสารสกัดจำนวน 12 จากสารสกัดทั้งหมด 21 ชนิดที่มีผลต่อ cyclooxygenase COX-1 ขณะที่สารสกัดจำนวน 10 จากสารสกัดทั้งหมด 21 ชนิดที่มีผลต่อ cyclooxygenase COX-2

Kanchanapoom และคณะ (2004) ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรในวงศ์เหงือกปลาหมอ 4 ชนิด คือ ย่าหยา (กลีบดอกมน) ย่าหยา (กลีบดอกเรียวแหลม) สังกรณี และปีกไก่ดำ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟี และสเปคโตรสโคปี จากต้นสังกรณี (*B. strigosa*) สามารถแยกสารองค์ประกอบทางเคมี ได้ 9 ชนิด โดยเป็นสารประกอบที่พบทั่วไปในพืช 7 ชนิด คือ verbascoside, isoverbascoside, decaffeoylverbascoside, (+)-lyoniresinol 3a-O-b -D-glucoside, apigenin 7-O-a-Lrhamnosyl-(1-6)-O-b -D-glucoside, 7-O-acetyl-8-epi-loganic acid และ (3R)-1-octen-3-ol-3-O-b -D-xylosyl-(1-6)-b - D-glucoside และเป็นสารใหม่ 2 ชนิด คือ Phenylethanoid (4-hydroxyphenylethyl 4-O-b -D-glucopyranosyl-(1-3)-O-a-L-rhamnopyranoside) และ iridoid (10-O-trans-coumaroyl-eranthemoside)

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากอังกาบที่กล่าวมานี้มีเพียงรายงานของ Salib และคณะ (2013) ที่สกัดสารจากเปลือกของอังกาบ ด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเอทานอล พบว่าสารสกัดจากเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งต่อ *S. aureus, B. subtilis* และ *S. mutans*

ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Antibacterial activity) โดย balarenone, pipataline และ 13, 14-seco-stigmasta-5, 14-diene-3-a-ol ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในสารสกัดจาก *B. prionitis* ด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *P. aeruginosa* (Kosmulalage และคณะ, 2007) และ Aneja และคณะ (2010) แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคในช่องปาก โดยพบว่าสารสกัดจากส่วนเปลือกลำต้น ใบ และยอด ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *B. cereus* โดยเฉพาะสารสกัดจากส่วนของเปลือกด้วยตัวทำละลายเมทานอลให้ผลดีที่สุด เช่นเดียวกับ Shukla และคณะ (2011) ที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบและ

แคลลัสของ *B. prionitis* ด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ เอทานอล และคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก โดยสารสกัดด้วยตัวทำละลายอีเทอร์แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียสูงสุด ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย นอกจากนั้นแล้วสารสกัดจากส่วนของยอดและรากด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* (Amoo และคณะ, 2011) ในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) Chetan และคณะ (2011) รายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากต้น *B. prionitis* ด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ และในด้านความเป็นพิษมีเพียงรายงานการศึกษาในหนู โดยไม่พบหนูตายภายใน 14 วันหลังจากการให้หนูกินสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Dheer และ Bhatnagar, 2010) แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง (cytotoxicity)