บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพร หมายถึงพืชพันธ์ไม้นานาชนิดที่นำมาปรุงเป็นยารักษาโรค โดยผู้ปรุงยาจะต้องรู้ว่าพืชแต่ละชนิดมีส่วนใดบ้างที่นำมาปรุงยา เช่น ราก แก่น เปลือกต้น กระพี้ ดอก ใบ ลูก เปลือกลูก ฝัก เมล็ด เกสร ยาง หัว หรือเหง้า ซึ่งพืชสมุนไพรโดยทั่วไปนั้น แบ่งออกเป็น 5 ส่วน สำคัญด้วยกัน คือ

1. ราก
2. ลำต้น
3. ใบ
4. ดอก
5. ผล

"พืชสมุนไพร" เหล่านี้มีลักษณะลำต้น ยอด ใบ ดอก ที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ แต่ส่วนต่างๆ ก็ทำหน้าที่เช่นเดียวกัน เช่นรากก็ทำหน้าที่ดูดอาหาร มาเลี้ยงลำต้นกิ่งก้านต่างๆและใบ กับส่วนต่างๆนั่นเองใบก็ทำหน้าที่ปรุงอาหารดูดออกซิเจน คายคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ดอก ผล เมล็ด ก็ทำหน้าที่สืบพันธุ์กันต่อไป เพื่อทำให้พืชพันธุ์นี้แพร่กระจายออกไปเรื่อยๆไม่มีที่สิ้นสุด

ส่วนต่างๆของพืชที่ใช้เป็นพืชสมุนไพร

1. ราก รากของพืชมีมากมายหลายชนิดเอามาเป็นยาสมุนไพรได้อย่างดี เช่นกระชาย ขมิ้นชัน ขิง ข่า เร่ว ขมิ้นอ้อย เป็นต้น รูปร่างและลักษณะของราก แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1.1 รากแก้ว ต้นพืชมากมายหลายชนิดมีรากแก้วอยู่นับ ว่าเป็นรากที่สำคัญมากงอกออกจาลำต้นส่วนปลายรูปร่างยาวใหญ่ เป็นรูปกรวยด้านข้างของรากแก้วจะแตกแยกออกเป็นรากเล็กรากน้อยและ รากฝอยออกมาเป็นจำนวนมากเพื่อทำการดูดซึมอาหารในดินไปบำรุงเลี้ยงส่วนต่างๆของต้นพืชที่มีรากแก้วได้แก่ ต้นขี้เหล็ก ต้นคูน เป็นต้น

1.2 รากฝอย รากฝอยเป็นส่วนที่งอกมาจากลำต้นของพืชที่ส่วนปลายงอกออกมาเป็นราก ฝอยจำนวนมากลักษณะรากจะกลมยาวมีขนาดเท่าๆกันต้นพืชที่มีใบเลี้ยงเดี่ยวจะมีรากฝอย เช่น หญ้าคา ตะไคร้ เป็นต้น

2. ลำต้น นับว่าเป็นโครงสร้างที่สำคัญของต้นพืชทั้งหงายที่มีอยู่สามารถค้ำยันเอาไว้ได้ ไม่ให้โค่นล้มลงโดยปกติแล้วลำต้นจะอยู่ บนดินแต่บางส่วนจะอยู่ใต้ดินพอสมควร รูปร่างของลำ ต้นนั้นแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนด้วยกัน คือ ตา ข้อ ปล้อง บริเวณเหล่านี้จะมีกิ่งก้าน ใบดอกเกิดขึ้นอีก ด้วยซึ่งจะทำให้พืช มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปชนิดของลำต้นพืช แบ่งตามลักษณะภายนอกของ ลำต้นได้เป็นประเภทต่างๆ คือ

1. ประเภทไม้ยืนต้น
2. ประเภทไม้พุ่ม
3. ประเภทหญ้า
4. ประเภทไม้เลื้อย

3. ใบ ใบเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของต้นพืชทั่วไป มีหน้าที่ทำการสังเคราะห์แสง ผลิต อาหารและ เป็นส่วนที่แลกเปลี่ยนน้ำ และอากาศให้ต้นพืชใบเกิดจากการงอกของกิ่งและตาใบไม้ โดยทั่วไปจะมีสีเขียว (สีเขียวเกิดจากสารที่มีชื่อว่า"คอลโรฟิลล์"อยู่ในใบของพืช)ใบของพืชหลาย ชนิดใช้เป็นยาสมุนไพรได้ดีมาก

4. ดอก ส่วนจองดอกเป็นส่วนที่สำคัญของพืชเพื่อเป็นการแพร่พันธุ์ของพืชเป็นลักษณะเด่น พิเศษของต้นไม้แต่ละชนิด ส่วนประกอบของดอกมีความแตกต่างกันตามชนิดของพันธุ์ไม้และ ลักษณะที่แตกต่างกันนี้เป็นข้อมูลสำคัญในการจำแนกประเภทของ ต้นไม้รูปร่างลักษณะของดอก

5. ผล ผลคือส่วนหนึ่งของพืชที่เกิดจากการผสมเกสรตัวผู้กับเกสรตัวเมียในดอกเดียวกัน หรือคนละดอกก็ได้ มีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันออกไปตามประเภทและสายพันธุ์รูปร่างลักษณะ ของผลมีหลายอย่าง ตามชนิดของต้นไม้ที่แตกต่างกัน

สมุนไพรแบ่งตามสรรพคุณ ได้เป็น 5 รส (สุรพงศ์ อำพันวงษ์, 2541) ดังนี้

1.สมุนไพรรสฝาด สรรพคุณสมานแผล ลดการระคายเคืองของลำไส้ แก้โรคท้องร่วง เช่น เปลือกมังคุด ขมิ้นชัน หมากสุก เปลือกแค เปลือกประดู่ ใบฝรั่ง ไพล กล้วยดิบ

2. สมุนไพรรสขม สรรพคุณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แก้อักเสบ แก้ไข้ โรคทางเดินหายใจ บำรุงกำลัง และเจริญอาหาร เช่น ฟ้าทะลายโจร บอระเพ็ด ย่านาง น้ำนมราชสีห์ ผักคราดหัวแหวน มะระขี้นก ขี้เหล็ก

3. สมุนไพรรสหอมระเหย สรรพคุณ กำจัดแมลง เห็บ เหา ไรไก่ เช่น น้อยหน่า ตะไคร้หอม สาบเสือ ยูคาลิปตัส กะเพรา สาบแร้งสาบกา ข่า

4. สมุนไพรรสเมาเบื่อ สรรพคุณ ถ่ายพยาธิภายใน พยาธิภายนอก ยาระบาย เช่น มะเกลือ มะหาด เครือเขาดำ มะกล่ำตาช้าง เหมือดแอ สะแกนา ใบและเมล็ดน้อยหน่า ชุมเห็ดเทศ รากทับทิม เมล็ดมะขามไทย หางไหล หนอนตายอยาก ยาสูบ

5.สมุนไพรแก้ท้องอืด เช่น ตูดหมูตูดหมา ฝักคูน ชุมเห็ดเทศ ตะไคร้ ไพล ใบแจง ขมิ้นชัน

การเก็บยาสมุนไพรให้ได้สรรพคุณที่ดี

1. พืชที่ให้น้ำมันหอมระเหย ควรเก็บในขณะดอกกำลังบาน
2. เก็บรากหรือหัว เก็บตอนที่พืชหยุดปรุงอาหาร หรือเริ่มมีดอก
3. เก็บเปลือก เก็บก่อนพืชเริ่มผลิใบใหม่
4. เก็บใบ เก็บก่อนพืชออกดอก ควรเก็บในเวลากลางวัน ที่มีอากาศแห้ง
5. เก็บดอก ควรเก็บเมื่อดอกเจริญเต็มที่ คือ ดอกตูม หรือแรกแย้ม
6. เก็บผล ควรเก็บผลที่โตเต็มที่ แต่ยังไม่สุก
7. เก็บเมล็ด ควรเก็บเมื่อผลสุกงอมเต็มที่ จะมีสาระสำคัญมาก

บูรพา ผดุงไทย (2550) กล่าวถึงสรรพคุณสมุนไพรในการรักษาโรคซึ่งสามารถแบ่งตามกลุ่มอาการโรคได้แก่

1. สมุนไพรเพื่อรักษากลุ่มโรคหรืออาการเจ็บป่วยในระบบทางเดินอาหาร มีดังนี้

1.1 โรคกระเพาะอาหาร ขมิ้นชัน กล้วยน้ำว้า

1.2 อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียด ขมิ้น ขิง กานพลู กระเทียม ตะไคร้ พริกไทย ดีปลี ข่า กระชาย แห้วหมู กระวาน เร่ว มะนาว กระทือ

1.3 อาการท้องผูก ชุมเห็ดเทศ มะขาม มะขามแขก แมงลัก ขี้เหล็ก คูน

1.4 อาการท้องเสีย ฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร กล้วยน้ำว้า ทับทิม มังคุด สีเสียดเหนือ

1.5 อาการคลื่นไส้อาเจียน ขิง ยอ

1.6 โรคพยาธิลำไส้ มะเกลือ เล็บมือนาง มะหาด ฟักทอง

1.7 อาการปวดฟัน แก้ว ข่อย ผักคราดหัวแหวน

1.8 อาการเบื่ออาหาร บอระเพ็ด ขี้เหล็ก มะระ สะเดาบ้าน

2. สมุนไพรเพื่อรักษากลุ่มโรคหรืออาการเจ็บปวดในระบบทางเดินหายใจ มีดังนี้

อาการไอ และระคายคอจากเสมหะ ขิง ดีปลี เพกา มะขามป้อม มะขาม มะนาว มะแว้งเครือ มะแว้งต้น

3. สมุนไพรเพื่อรักษากลุ่มโรคหรืออาการเจ็บป่วยในระบบทางเดินปัสสาวะ มีดังนี้

อาการขัดเบา กระเจี๊ยบแดง ขลู่ ตะไคร้ สับปะรด หญ้าคา อ้อยแดง

4. สมุนไพรเพื่อรักษากลุ่มโรคผิวหนัง มีดังนี้

4.1 อาการกลากเกลื้อน กระเทียม ข่า ชุมเห็ดเทศ ทองพันชั่ง พลู

4.2 ชันนะตุ มะคำดีควาย

4.3 แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก บัวบก น้ำมันมะพร้าว ว่านหางจระเข้ น้ำแข็ง

4.4 ฝี แผล พุพอง ขมิ้น ชุมเห็ดเทศ เทียนบ้าน ว่านหางจระเข้ ว่านหางจระเข้ ว่านมหากาฬ ฟ้าทะลายโจร

4.5 อาการแพ้ อักเสบจากแมลงสัตว์กัดต่อย ขมิ้นชัน ตำลึง ผักบุ้งทะเล พญายอ เสลดพังพอน

4.6 อาการลมพิษ พลู

4.7 อาการงูสวัดเริม พญายอ

5. สมุนไพรเพื่อรักษาโรค อาการเจ็บป่วยอื่น ๆ มีดังนี้

5.1 อาการเคล็ดขัดยอก ไพล

5.2 อาการนอนไม่หลับ ขี้เหล็ก

5.3 อาการไข้ ฟ้าทะลายโจร บอระเพ็ด

5.4 โรคเหา น้อยหน่า

มีผู้ทำการศึกษาสมุนไพรกันมากได้แก่ ในปี พ.ศ. 2549 สุรชัย สุภาพสุนทร สำรวจและศึกษาสัณฐานวิทยาของพืชสมุนไพรชนิดไม้ต้น ไม้พุ่มและไม้เลื้อย ในพื้นที่ป่าเขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชกรมป่าไม้ (BKF) โดยเก็บตัวอย่างพืชในภาคสนามด้วยการสุ่มตัวอย่างจากแปลงขนาด 100x100 ตารางเมตร จำนวน 15 แปลง ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ บรรยายลักษณะพืช พบไม้ต้นจำนวน 67 ชนิด จัดอยู่ใน 35 วงศ์ ไม้พุ่มจำนวน 30 ชนิด จัดอยู่ใน 18 วงศ์ ไม้เลื้อยจำนวน 36 ชนิด จัดอยู่ใน 24 วงศ์

สมุนไพรที่มีความสำคัญสำหรับการเข้ายา ประเภทกลุ่มไม้ต้นมี 6 ชนิด คือ กำลังช้างสาร (*Pithecellobium tenue Graib*) กำลังเสือโคร่ง (*Betula alnoides*.Buch ham.) ประดู่แดง (*Pterocapus macrocapus* Kurs.) ประดู่ลาย (*Dalbergla cochinnensis* Pierre.) ประดู่ส้ม (*Bischofia javaniga* Blum) และมะขามป้อม (*Phylanthus embia* Linn.) กลุ่มไม้พุ่มมี 3 ชนิดคือ ครอบจักรวาล (*Xantonnea parvifolia* Mill.) ปลาไหลเผือก (*Eurycoma longfolia* Jack.) และพญายา (*Limonia acidissim.* Linn.) และกลุ่มไม้เลื้อยมี 6 ชนิด คือ กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis* Linn.) กำลังช้างเผือก (*Hiptage candicans* Hook.) ตากวาง (*Salacia verrucosa* Wight) ตาไก้ (*Salacia prinoides* Vahl.) ม้ากระทืบโรง (*Ficus foveolata* Wall.) ฝนแสนห่า (*Myxopyrum smilacifolium* Blume) เมื่อสำรวจและเก็บข้อมูลจากชาวบ้านที่อาศัยอยู่รอบบริเวณพื้นที่ป่าเขื่อนสิรินธร พบว่าหมอยาพื้นบ้านได้ให้ความสำคัญและนิยมนำพืชสมุนไพรไปบำบัดรักษาโรคโดยนำมาแปรรูปและปรุงเป็นตำรับยาตามแบบภูมิปัญญาชาวบ้าน

นันทิยา รัตนคช (2549) ศึกษาความเป็นพิษในระดับจนเพื่อประเมินความสามารถในการก่อกลายพันธุ์ของสมุนไพร จากว่านชักมดลูก, ขมิ้นชัน, พริกไทยดำ, สมุนไพรที่ใช้ลดความอ้วน และสมุนไพรยาอายุวัฒนะ และสารสกัดไอน้ำจากไพล โดยสกัดจากเอทานอล 95% ซึ่งจะเป็นผงแห้ง และนำมาทดสอบคุณสมบัติการก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรียโดยวิธีเอมส์ ในการศึกษาการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซาลโมเนลลา ไทฟีมูเรียม TA98 และ TA 100 ทั้งระบบที่ต้องการและไม่ต้องการเอนไซม์จากตับหนูด้วยสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด พบว่า สมุนไพรดังกล่าวไม่มีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดการก่อกลายกลายพันธุ์ในแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ทั้งระบบที่ต้องการและไม่ต้องการเอนไซม์จากตับหนู การศึกษาในอนาคตควรใช้แบบอื่นเช่น ศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อประเมินความเป็นพิษในระดับโครโมโซมต่อไป

สุนีย์ จันทร์สกาว (2551) จาก ศูนย์วิจัยสมุนไพรภาคเหนือ กล่าวไว้ว่า การดูแลสุขภาพผู้ป่วยด้วยสมุนไพรและผักพื้นบ้าน เป็นการสร้างความสำคัญ ให้ผู้ป่วยมีสุขภาพแข็งแรงขึ้น เพื่อเพิ่มภูมิต้านทานและชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และสมุนไพรกับผักพื้นบ้านนั้น ต้องไม่ส่งผลรบกวนต่อการรักษาด้วยวิธีต่างๆ ที่ผู้ป่วยมะเร็งได้รับ ไม่ว่าจะเป็นเคมีบำบัด หรือการฉายรังสี ซึ่งมีสมุนไพรหลายชนิดที่สามารถลดอาการข้างเคียงของผู้ป่วยมะเร็ง ที่สำคัญสมุนไพรและผักพื้นบ้านของไทยหลายชนิดให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี จึงเหมาะที่จะนำมาดูแลสุขภาพในรูปแบบของอาหาร สมุนไพรที่พบว่าให้ผลในการรักษาและมีความปลอดภัยสูง มีหลายชนิด เช่น กระชาย และ ขิง ที่มีองค์ประกอบสำคัญคือ Volatile oil ประมาณ 0.08-2% ใช้บรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ บรรเทาอาการคลื่นไส้ อาเจียน แก้ไอ ขับเสมหะ บอระเพ็ด ใช้เพื่อรักษาอาการเบื่ออาหาร ไพล มี

องค์ประกอบสำคัญ คือ Volatile oil, curcumin และมีสารในกลุ่ม phenylbutanoids ที่ให้ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ใช้บรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อาการเคล็ดขัดยอกฟกช้ำ ฟ้าทะลายโจร ใช้รักษาอาการเบื่ออาหาร ข้อควรระวังในการใช้ คือ อาจเกิดอาการปวดท้อง ปวดเอว เวียนหัว ซึ่งนั่นแสดงว่าเกิดอาการ แพ้ยา ควรหยุดยา โดยเปลี่ยนไปใช้ยาอื่น และไม่ควรรับประทานติดต่อกันนาน เพราะเป็นยาเย็น จะทำให้มือและเท้าชาอ่อนแรง มะแว้งเครือ หรือ มะแว้งต้น ใช้แก้ไอ ขับเสมหะ

บุษบา เครือวัชรกุล (2549) ได้เผยแพร่การขยายพันธุ์พืชสมุนไพร และผู้เชี่ยวชาญได้อธิบายเกี่ยวสมุนไพรแก้ไข้ ฟ้าทะลายโจร มีสารสำคัญในการรักษาโรค คือ สารแอนโดรแกรโฟไลด์ (Andrographpolide) จัดอยู่ในจำพวกยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลลินและเตตราซัยคลิน ซึ่งเป็น ยาแผนปัจจุบันครอบจักรวาลเลยทีเดียว แต่ปลอดภัยกว่า เพราะไม่มีพิษต่อตับ และไม่ตกค้างในร่างกาย ซ้ำยังมีประสิทธิภาพ ในการรักษาโรคบางอย่าง ดีกว่ายาแผนปัจจุบันเสียอีก นอกจากนี้ฟ้าทะลายโจรจึงไม่เพียงแก้ร้อนในได้ผลเท่านั้น หากยังสรรพคุณเด่นแก้ไข้หวัด ตัวร้อน ระงับการอักเสบเจ็บคอ แก้ติดเชื้อ และเป็นยาขมเจริญอาหาร จึงนับได้ว่า ฟ้าทะลายโจรเป็นยาครอบคลุมได้กว้างขวาง ฟ้าทะลายโจร ให้ได้ผลดี ดีซึ่งเคล็ดลับนั้นมีอยู่ว่า จะต้องกินตอนเริ่มมีการอาการเป็นไข้เจ็บคอ และท้องเสีย โดยกินครั้งละ 5 เม็ดขึ้นไป แต่ถ้ามีอาการมาก ให้กินได้ถึงครั้งละ 10 เม็ด วันละ 3-4 เวลา ก่อนอาหาร ถ้ากินเป็นยาขมเจริญอาหาร แก้ธาตุพิการ อาหารไม่ย่อย ใช้ขนาดตั้งแต่ 3-4 เม็ด หรือหากบริเวณบ้านของคุณ พอจะมีที่ว่างอยู่สักหน่อย ก็ลองหาฟ้าทะลายโจรมาปลูกกันดู ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชที่ขึ้นได้ง่าย สามารถปลูกได้ดีทุกสภาพ แวดล้อม ซึ่งเราสามารถใช้ส่วนใบของฟ้าทะลายโจร มากินสดได้เลยก็จะยิ่งดี แม้ว่าฟ้าทะลายโจร จะมีประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง และแม้ว่าฟ้าทะลายโจร จะดูเหมือนจะมีพิษน้อย แต่เนื่องจากเป็น ยาเย็นจัด การกินฟ้าทะลายโจรรักษาโรคนาน ๆ ติดต่อกันหลายปี อาจจะเกิดอาการข้างเคียงได้ เช่น มีอาการท้องอืดอาหารไม่ย่อย แขนขาไม่มีแรง เป็นต้น แต่ถ้ากินวันละ 1-2 เม็ด เป็นยาอายุวัฒนะสามารถกินได้เรื่อย ๆ ไม่มีพิษอะไร

2.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือ DNA fingerprint มาจากคำ 2 คำ คือ DNA และ Fingerprint ซึ่ง DNA ย่อมาจาก Deoxyribonucleic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ดีเอ็นเอมีองค์ประกอบหลักเป็นนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ซึ่งองค์ประกอบทั้ง 4 นี้ จะมาต่อกันเป็นเส้นสายดีเอ็นเอ ปกติดีเอ็นเอจะอยู่เป็นเส้นคู่ ดังนั้นการวัดความยาวหรือขนาดของดีเอ็นเอจึงมีหน่วยเป็นคู่เบส (base pair, bp) ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆ นอกจากจะมีขนาดต่างกันแล้วยังมีลำดับเบสขององค์ประกอบทั้ง 4 ต่างกันด้วย ดังนั้น DNA fingerprinting คือการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม โดยการสร้างลายพิมพ์

ดีเอ็นเอเพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในแต่ละชนิดได้ โดยมีการนำมาใช้เป็นครั้งแรกโดย Alec Jeffeys (1985) การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกหรือตรวจสอบสิ่งมีชีวิตต่างๆ และยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ทั้งในการศึกษาวิวัฒนาการ ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดและพิสูจน์บุคคล ซึ่งการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Weising *et al.*,1995) ถูกแบ่งออกเป็นการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization-based DNA fingerprinting) และการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR-based DNA fingerprinting)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริไดเซชัน (Hybridization-based DNA fingerprinting) คือการนำดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์มาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส ถ่ายดีเอ็นเอลงสู่แผ่นฟิลเตอร์ แล้วไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสีตรวจสอบผลที่เกิดขึ้น (Weising *et al*., 1995) จะปรากฏแถบมีลักษณะจำเพาะกับแต่ละพันธุ์ โดยโพรบที่ได้อาจมาจากมินิซาเทลไลท์ดีเอ็นเอคนสามารถใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ในสัตว์และพืชหลายชนิด มินิซาเทลไลท์ดีเอ็นเออื่นๆ เช่น มินิซาเทลไลท์ดีเอ็นเอจากจีโนมของไวรัส M13 และมินิซาเทลไลท์ดีเอ็นเอจากพืชเอง เป็นชุดซ้ำสั้นประมาณ 10-60 คู่เบส และไมโครซาเทลไลด์ดีเอ็นเอ หรือ SSR ซึ่งเป็นดีเอ็นเอชุดซ้ำขนาดสั้นมากประมาณ 1-6 คู่เบส พบได้ทั้งในจีโนมของคน สัตว์ พืช รา และแบคทีเรีย ในทางปฏิบัติจะสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี แล้วจึงนำมาเป็นโพรบ โดยเลือกชนิดที่เหมาะสมกับจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น $(GATA)_4$, $(TCC)_5$, $(CA)_8$, $(GTG)_5$ เป็นต้น ซึ่งมีเทคนิคต่างๆ ได้แก่ เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR-based DNA fingerprinting) PCR หรือ polymerase chain reaction คือการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนเพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอโดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบ ซึ่งในปฏิกริยาพีซีอาร์จะมีองค์ประกอบ ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด บัฟเฟอร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และใช้ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสซ้ำกันหลาย ๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอหรือยีนหนึ่ง ๆ โดยต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน เพื่อเป็นข้อมูลในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ แล้วจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อตรวจสอบว่ามียีนนั้นอยู่ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3′ ในทิศทางเข้าหากันบริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลายของไพรเมอร์หนึ่งชนิดหนึ่ง ถึงปลายของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่ง (สุรินทร์, 2540) ซึ่งในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะตั้งอุณหภูมิเป็นโปรแกรมเอาไว้ 3 ค่าเพื่อจุดประสงค์ที่แตกต่างกันคือ อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส จะสำหรับทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่

เป็นสายคู่เสียสภาพกลายเป็นสายเดี่ยว (denaturing) อุณหภูมิ 35-60 องศาเซลเซียส สำหรับให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเข้ามาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสซึ่งเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นต่อจาก ไพรเมอร์ (extension) โดยวิธีพีซีอาร์มีหลายเทคนิค เช่น เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD),เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), เทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) และเทคนิค Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP)

เทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified fragment length polymorphism : AFLP) เป็นเทคนิคที่พัฒนาโดย Zabeau and Vos และได้จดสิทธิบัตรในปีค.ศ. 1993 โดยใช้ชื่อว่า selective restriction fragment amplification (SRFA) เทคนิคนี้เป็นวิธีสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่รวมเอาเทคนิคอาร์เอฟแอลพีและอาร์เอพีดีเข้ามาด้วยกัน ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายทั้งสองของชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อเป็นส่วนสำหรับให้ไพรเมอร์มาเกาะได้ที่ปลายทั้งสองด้านและสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ มีลำดับเบสเหมือนกันกับส่วนของ adapter ที่เชื่อมต่อเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอ ส่วนปลาย 3′ ของไพรเมอร์มีลำดับเบสที่เป็นส่วนตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้และเพิ่มเบสอีก 2-3 เบสเข้าที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์นี้ เพื่อให้เกิดการเลือกจับได้เฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น ดังนั้นชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ จะมีเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เข้าคู่ได้กับไพรเมอร์ที่เลือกใช้เท่านั้น แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกขนาดโดยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing acrylamide gel และตรวจสอบด้วย ออโตเรดิโอกราฟ ฟลูออเรสเซนต์ ซิลเวอร์ไนเตรท หรือ ไฮบริไดเซชัน (Vos and Kuiper, 1997) โดยทั่วไปจะเกิดแถบดีเอ็นเอประมาณ 50-100 แถบ ความแตกต่างของลายพิมพ์หรือโพลีมอร์ฟีซึม เกิดจากมีการกลายโดยเบสที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะเปลี่ยนไป ตำแหน่งที่จะตัดได้จึงหายไป หรือเกิดตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะเพิ่มขึ้น หรือมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น หายไป หรือมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอใหม่ในช่วงระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะเดิม ทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป (Weising *et al*., 1995) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิคเอเอฟแอลพี เป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (randon fingerprint) ใช้กันดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถทำได้รวดเร็วและทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) สามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบที่ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันหรือโพลิมอร์ฟีซึม (polymorphism) จำนวนมาก ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้เกิดการหายไป หรือเพิ่มใหม่หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ให้สามารถ หรือไม่สามารถ

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้หรืออาจเกิดจากมีชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ หายไปหรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ผลที่เกิดขึ้นคือ การมีแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคเอเอฟแอลพี จึงมีทั้งแบบลักษณะข่ม (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพีแบบที่เป็นลักษณะข่ม (สุรินทร์, 2543) มีงานวิจัยโดยใช้เทคนิคนี้ได้แก่

Minoo *et al*. (2006) ได้ศึกษากล้วยไม้สกุลวนิลลา พบว่า *Vanilla planitolia* เป็นกล้วยไม้พื้นเมืองของเมคซิโก และอเมริกากลาง ปัจจุบันปลูกกันทั่วไปในเขตร้อน มีความแปรปรวนในสปีชีย์ต่ำจึงเป็นอุปสรรคในการปรับปรุงพันธุ์ภายในสปีชีย์ จึงได้ทำการผสมข้ามสปีชีย์ กับ *Vanilla aphylla* ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย ซึ่งต้านทานต่อเชื้อรา Fusarium จากการใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี แถบดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกลูกผสมได้จำนวน 319 ตำแหน่ง

Singh *et al* .(2002) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรของสะเดาที่เจริญเติบโตใน Kanpur ประเทศอินเดียและสะเดาจากประเทศไทย 2 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีและเทคนิคเอสเอเอ็มพีแอล (selectively amplified microsatelite polymorphic loci) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ค่า heterozygosity สูงในการตรวจสอบการผสมข้ามของสะเดา ผลการศึกษาพบว่ามีค่าเฉลี่ยโพลีมอร์ฟิซึมภายในกลุ่มที่เจริญเติบ โตใน Kanpur จากเทคนิคเอเอฟแอลพีและเอสเอเอ็มพีแอลมีค่า 35 เปอร์เซ็นต์ และ 69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยวิธี Jaccard' s coefficient เท่ากับ 0.80 และ 0.68 เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีและเอสเอเอ็มพีแอลตามลำดับ พบว่าเทคนิคเอสเอเอ็มพีแอลมีประ สิทธิภาพมากกว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีในการแยกความแตกต่างภายในกลุ่มตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันซึ่งมีความแปรปรวนของตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ในจีโนมสูง ข้อมูลที่ได้จากเทคนิคทั้งสองนี้เมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี principal correspondence analysis พบว่ามีความสอดคล้องกันและเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA จากข้อมูลของทั้งสองเทคนิคพบว่าสะเดาที่เจริญเติบโตใน Kanpur มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากสะเดาของประเทศไทย ซึ่งสะเดาจากประเทศไทยและสะเดาในกลุ่ม Kanpur มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.41 และ 0.80

จากการศึกษาของ Iqbal *et al.* (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของฝ้ายพันธุ์ที่มีจีโนม 4 ชุด (tetraploid species) และจีโนม 2 ชุด (diploid species) จากการใช้ 20 คู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอ 3,178 แถบ ค่า similarities index มีค่าระหว่าง 0.25-0.99 สอดคล้องกับข้อมูลความสัม พันธ์ทางอนุกรมวิธาน แสดงให้เห็นว่าฝ้ายสายพันธุ์ในอเมริกาเหนือ อเมริกากลางและอเมริกาตะวัน ตกเฉียงใต้อยู่ในกลุ่มเดียวกันน่าจะเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์เหล่านี้มาจากแหล่งพันธุกรรมเดียวกัน

สุรินทร์ และคณะ (2542) ใช้เทคนิคเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ในการตรวจสอบชนิดของพืชในสกุล *Garcinia* 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วยมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) จำนวน 11 ตัวอย่าง พืชสกุล *Garcinia* ชนิดอื่น 11 ตัวอย่าง และพืชในสกุลใกล้เคียงอีก รวมทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง พบว่าดีเอ็นเอของกลุ่มมังคุดมีความคล้ายคลึงกันมากส่วนพืชต่างชนิดมีแบบของดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างชัดเจน เมื่อโคลนแถบดีเอ็นเอของมังคุดจำนวน 2 แถบ แล้วนำไปหาลำดับเบส ออกแบบไพรเมอร์นำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชแต่ละชนิด พบว่าแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบเฉพาะในพืชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะในการจำแนกชนิดของพืชได้

สิริพร และคณะ (2544) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปอสา (*Broussonetia*) จำนวน 27 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี และเทคนิค ซีเอฟแอลพีประยุกต์ พบว่า เทคนิคทั้งสองให้ผลที่สอดคล้องกันมีประสิทธิภาพในการจำแนก สามารถจำแนกตัวอย่างได้ 3 กลุ่มและพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่างแต่ละกลุ่ม สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลในการจำแนกชนิดปอสา

นันทนา และคณะ(2546) ศึกษาสัณฐานวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของปอสา (*Broussonetia papyrifera*) จำนวน 41 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี และเทคนิคเอสอาร์เอพี พบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่ ไม่สามารถใช้จำแนกปอสาจากแหล่งต่าง ๆ ได้ชัดเจนยกเว้นความหนาแน่นของเลนติเซลซึ่งใช้แบ่งปอสาออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่1 ประกอบด้วยปอสาจากจังหวัดเชียงใหม่ แพร่ น่าน สุโขทัย กลุ่มที่2 ประกอบด้วยปอสาจากจังหวัดราช บุรี กาญจนบุรี ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา เลย จำนวนโลปของใบจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางมี 3.50-3.81 โลป มากกว่าภาคเหนือ และภาคตะวันตกซึ่งมี 2.25-2.37โลป นอกจากนี้พบว่ารูปร่างของเซลล์ผิวมี 2 แบบคือเป็นเหลี่ยม และหยักเป็นคลื่น ลักษณะหยักเป็นคลื่นปรากฏเฉพาะปอสาจากจังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรี ปอสามีจำนวนโครโมโซม 2n = 2X = 26 โครโมโซมแฮพลอยด์มีรูปร่างเป็น

แบบซับเมทาเซนทริก 12 แท่ง และเมทาเซนทริก 1 แท่ง การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปอสาโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี เทคนิคเอสอาร์เอพี และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS เวอร์ชัน 2.0e และโปรแกรม PAUP* pc เวอร์ชัน 4 พบว่าแผนภาพทางพันธุกรรมที่ได้จากโปรแกรมทั้งสองนั้นสอดคล้องกัน แต่มีความแตกต่างกันระหว่างแผนภาพจากเอเอฟแอลพี และเอสอาร์เอพี ค่าเฉลี่ย Polymorphic Information Content (PIC) ของเทคนิคเอเอฟแอลพีและเทคนิคเอสอาร์เอพีมีค่าเฉลี่ย 0.215 และ 0.211 ตามลำดับ

อรุณรัศมิ์ และคณะ (2552) คัดเลือกแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายจากเทคนิคเอเอฟแอลพี 7 แถบ เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำข้อมูลของชิ้นดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก The National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST พบลำดับนิวคลีโอไทด์จากคู่ไพรเมอร์ E-ACT/M-CAG ตัวอย่าง 18F มีความเหมือนกับ repetitive DNA fragment ของ *Ceratitis capitata* นอกจากนั้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ อีก 6 ตัวอย่าง ไม่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตใดในฐานข้อมูล แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์นี้อาจเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่ของตาลโตนด

เทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกัน แต่ต่างสายพันธุ์กันได้เช่นในถั่ว cowpea พันธุ์พื้นเมือง (*Vigna unguiculata*) (Nicola and Valeria, 2002), ข้าว indica (Prashanth *et al*., 2002), daylily (*Hemerocallis* spp.) (Tomkins *et al*., 2001), ถั่ว azuki (Xu and Vaughan, 2000), ข้าวสาลี *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* (Soleimani *et al*., 2002) ข้าวฟ่าง (Uptmoor *et al*., 2003), อะกาเว (Kutia *et al*., 2006), ถั่วเหลืองอินเดีย (C. Tara *et al*., 2006), chamomile (Carola *et al*. , 2005) บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกันเช่นการศึกษาความ สัมพันธ์ของพืชในสกุล *Berberis* ที่พบใน Patagonia และ Argentina (Zhang *et al*., 1999), มะละกอที่พบในฮาวายและออสเตรเลีย (de Ennequin *et al*., 2000), หญ้า Blue grass (Capo-chichi*et al*., 2001; หญ้า tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) (Larson *et al*., 2001); อ้อย (*Saccharum* spp.) (Bottini*et al*., 2002); ข้าวฟ่าง (Lima *et al*., 2002) และสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้เช่น Aggarwal *et al*. (1999) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชต่างชนิดในสกุล *Oryza* รวมทั้ง ข้าวโพด อ้อย และถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีทำให้สามารถอธิบายวิวัฒนาการของพืชในสกุลนี้ได้ว่า มีบรรพบุรุษร่วมกัน หรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่ถูกแยกออกจากกันในช่วงแรก ของกระบวนการวิวัฒนาการเกิดเป็นพืชหลายชนิดที่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า เทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถที่จะจำแนกลักษณะที่เกิดจากการ

กลายพันธุ์ได้ เช่นการตรวจสอบการกลายพันธุ์หญ้าเนเปียร์แคระ(*Pennisetum purpureum* cv.Mott) โดยการฉายรังสี แล้วคัดเลือกในอาหารที่ใส่เกลือเมื่อนำออกปลูกได้โคลนที่เจริญในดินเค็ม 20 ตัวอย่างเมื่อนำโคลนที่ได้มาตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ใช้ไพรเมอร์ 11 คู่ได้แถบดีเอ็นเอ 1,048 แถบ มีเปอร์เซ็นต์ polymorphism 94.75 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อจัดกลุ่มในรูป phylogenetic tree พบว่าต้น control ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีแกมมา แยกตัวออกมาอย่างชัดเจนจากกลุ่มตัวอย่าง ที่ผ่านการฉายรังสีซึ่งแสดงว่าเป็นสายพันธุ์กลายอย่างแท้จริง (ประดิษฐ์ และคณะ, 2546)