

พันธุ์ และผลของสารชักนำต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของ
กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica*
(Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham]
และฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาว
ในการต้านอนุมูลอิสระ

นางสาวสุพินญา บุญมานพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2553

**VARIETY AND THE EFFECT OF ELICITORS ON
PUERARIN IN THE TUBEROUS ROOT OF WHITE
KWAO KRUA [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica*
(Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham]
AND ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY**

Suphinya Bunmanop

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Doctor of Philosophy in Crop Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2010


พันธุ์ และผลของสารชักนำต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว

[*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatbandhu) Niyomdham]

และฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการต้านอนุมูลอิสระ

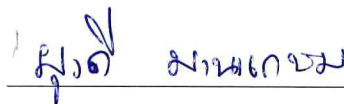
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาคุษฎีบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(อ. ดร.สุคชด วุ่นประเสริฐ)

ประธานกรรมการ



(รศ. ดร.ยูวดี มานะเกษม)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



(ผศ. ดร.รจนา โอภาสศิริ)

กรรมการ



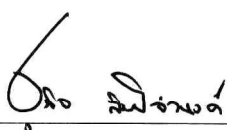
(ดร.ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล)

กรรมการ



(รศ. ดร.พูนสุข ศรีโยธา)

กรรมการ



(ศ. ดร.ชุกิจ ลิ้มปิงานงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ



(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

สุพินญา บุญมานพ : พันธุ์ และผลของสารชักนำต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatibandhu) Niyomdham] และฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการต้านอนุมูลอิสระ [VARIETY AND THE EFFECT OF ELICITORS ON PUERARIN IN THE TUBEROUS ROOT OF WHITE KWAO KRUA [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatibandhu) Niyomdham] AND ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY] อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ยวดี มานะเกษม, 123 หน้า.

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatibandhu) Niyomdham] เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค เป็นส่วนประกอบในอาหารเสริม และในเครื่องสำอาง ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวมีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้รวบรวมปลูกกวาวเครือขาวที่ได้เมล็ดมาจากต้นที่รวบรวมมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ได้ทำการวิจัย 3 การทดลอง ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ในเดือนเมษายน 2551 ถึงเดือนธันวาคม 2552 เพื่อจำแนกพันธุ์ และผลของสารชักนำต่อผลผลิต และปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว และฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการต้านอนุมูลอิสระ การทดลองที่ 1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 12 ต้น จำนวน 36 สายต้น โดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ และเทคนิค ISSR-Touchdown PCR เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ และวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มโดยวิธี principle component analysis (PCA) พบว่า การใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์แบ่งกวาวเครือขาวออกได้ 3 กลุ่มโดยมีลักษณะใบเป็นลักษณะที่แยกตามความแตกต่างได้เด่นที่สุด กลุ่มที่ 1 คือ สายต้นที่ 34 ใบมีขนาดใบเล็ก กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 23 สายต้น ลักษณะใบ รูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเรียวแหลม และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 12 สายต้น ลักษณะใบรูปไข่ ฐานใบมน และปลายใบเป็นติ่งแหลม การจำแนกด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR ใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 41 ไพรเมอร์ พบว่าตรวจจับแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 355 ตำแหน่ง คิดเป็น 8.66 ตำแหน่งต่อไพรเมอร์ มีขนาดของแถบประมาณ 280 bp ถึง 1,550 bp ในจำนวนนี้มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic) จำนวน 293 ตำแหน่ง คิดเป็น 82.54% ของทั้งหมด และเป็นตำแหน่งที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic) จำนวน 62 ตำแหน่ง คิดเป็น 17.46% มีค่า polymorphism information content (PIC) ระหว่าง 0.0315-0.9779 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 0.4779 และมีค่า number of effective alleles per locus (N_e) ระหว่าง 1.1250-1.8541 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 1.5544 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (genetic similarity : GS) ของตัวอย่างทั้งหมดพบว่า มีค่าระหว่าง 0.50-0.86 โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.77 ที่ระดับ GS เท่ากับ 0.56 สามารถแยกได้ 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย

สายต้นที่ 34 และสายต้นที่ 7 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือ อีก 34 สายต้น ซึ่งกลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่ GS เท่ากับ 0.69 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของ AgNO₃ และ yeast extract (YE) ต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ 12 ทรีตเมนต์ คือ กวาวเครือขาวที่ได้รับการฉีดพ่นที่ด้วย AgNO₃ 500 ppm, AgNO₃ 1,000 ppm, YE 2,000 ppm, YE 3,000 ppm, YE 4,000 ppm, YE 2,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 500 ppm, YE 2,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 1,000 ppm, YE 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 500 ppm, YE 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 1,000 ppm, YE 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 500 ppm, YE 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 1,000 ppm และกลุ่มควบคุม (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น) จากการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณ puerarin ของสารสกัดกวาวเครือขาวทั้ง 12 ทรีตเมนต์ พบว่าการฉีดพ่นด้วยสารชักนำทั้ง 12 ทรีตเมนต์ ไม่ทำให้กวาวเครือขาวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง เปอร์เซ็นต์ความชื้น และสารสกัดต่อกรัมน้ำหนักแห้งของรากสะสมอาหารแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีปริมาณ puerarin แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การฉีดพ่นด้วย YE ที่ความเข้มข้น 2,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin สูงสุดคือ 169.32 µg/gDW และการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 1,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin 167.79 µg/gDW สูงกว่าการฉีดพ่นร่วมกันที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ การทดลองที่ 3 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือขาว ซึ่งได้จากการทดลองที่ 2 และเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวทั้ง 12 ทรีตเมนต์ มีค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 4,000 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ เท่ากับ 1,031.33 µg/ml) สารสกัดที่ได้จากการฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นฉีดพ่นร่วมกับ AgNO₃ 500 ppm มีค่าเฉลี่ย IC₅₀ 1,563.00, 1,668.00 และ 1,411.83 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นฉีดพ่นร่วมกับ AgNO₃ ความเข้มข้น 1,000 ppm (1,763.67, 1,748.30 และ 1,828.83 µg/ml ตามลำดับ) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองทั้ง 3 นี้สรุปได้ว่าการใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์กวาวเครือขาวได้ชัดเจนมากกว่าการใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์ พบว่าทุกต้นมีพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน และคาดว่าอาจเกิดจากพันธุกรรมที่แตกต่างกันอย่างน้อย 5 พันธุ์ที่นำมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ การใช้สารชักนำ YE และ AgNO₃ สามารถเพิ่มปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว และสารสกัดที่ได้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา สุวิมล มนต์มานะ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุวิมล มนต์มานะ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สม ภูมิ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ...

SUPHINYA BUNMANOP : VARIETY AND THE EFFECT OF ELICITORS
ON PUERARIN IN THE TUBEROUS ROOT OF WHITE KWAO KRUA
[*Pueraria candollei* Grah.var. mirifica (Airy Shaw et Suvatabandhu)
Niyomdham] AND ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY. THESIS ADVISOR :
ASSOC. PROF. YUVADEE MANAKASEM, Ph.D., 123 PP.

WHITE KWAO KRUA/ISSR-TOUCHDOWN PCR/ELICITORS/PUERARIN/
ANTIOXIDANT

White Kwao Krua [*Pueraria candollei* Grah. var. mirifica (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham], is a protected Thai medicinal plant. It is used as an ingredient in dietary supplements and cosmetics. The tuberous roots of White Kwao Krua (WKK) contain estrogen-like substances. Seeds of WKK collected from Prachuab Khiri Khan province were planted and propagated in the farm of Suranaree University of Technology. However their genetic backgrounds were ambiguous. Three experiments were conducted at Suranaree University of Technology and Khon Kaen Field Crop Research Center from April 2008 to December 2009. These were to study antioxidant activities and to increase the amount of puerarin in the tuberous roots of WKK using elicitors. The genetic classification of this WKK was also examined. The first experiment was set up as a randomized complete block design (RCBD) with 3 replications. Thirty six clones of WKK of the same age were sampled for classification using 7 botanical characteristics and DNA fingerprint by the ISSR-Touchdown PCR technique. The relationship of the botanical characteristics using principle component analysis (PCA) could classify the WKK clones into 3 groups. In addition the leaf

morphology was the best parameter to classify the botanical characteristics of these WKK. The first group was clone number 34 which was distinguished from the other groups by its small leaf size. The second group consisted of 23 clones with elliptic leaf shape, acute leaf base, and acuminate leaf apex. The third group consisted of 12 clones with ovate leaf shape, obtuse leaf base, and cuspidate leaf apex. The ISSR-Touchdown PCR technique with 41 primers could detect 355 loci of DNA with an average of 8.66 loci per primer. The sizes of DNA ranged between 280 bp to 1,550 bp. Two hundred and ninety three loci exhibited polymorphisms (82.54%) and the remaining 62 loci were monomorphic (17.46%). The polymorphism information content (PIC) was between 0.0315-0.9779 (mean = 0.4779) and the number of effective alleles per locus (N_e) ranged between 1.1250-1.8541 (mean = 1.5544). The genetic similarity (GS) of WKK ranged between 0.50-0.86 (mean = 0.77). At the GS of 0.56 from cluster analysis, the WKK varieties could be divided into 2 major groups. The first group comprised clone number 34 and 7, and the second group comprised the remaining 34 clones which could be further divided into 2 subgroups at a GS of 0.69. In the second experiment, a RCBD with 12 treatments and 3 replications was performed. WKK were sprayed with AgNO_3 and yeast extract (YE) at concentrations of 0 (distilled water), AgNO_3 500 ppm, AgNO_3 1,000 ppm, YE 2,000 ppm, YE 3,000 ppm, YE 4,000 ppm, AgNO_3 500 ppm and YE 2,000 ppm, AgNO_3 500 ppm and YE 3,000 ppm, AgNO_3 500 ppm and YE 4,000 ppm, AgNO_3 1,000 ppm and YE 2,000 ppm, AgNO_3 1,000 ppm and YE 3,000 ppm, and AgNO_3 1,000 ppm and YE 4,000 ppm. The result showed that the 12 treatments had no statistically significant effect on the diameter, fresh weight, dry weight, fresh weight per dry weight, moisture content of the tuberous roots, and the crude extract per gram dry weight of tuberous roots.

However, it had a statistically significant effect on the amount of puerarin. WKK after spraying with YE 2,000 ppm showed the highest value of puerarin (169.32 $\mu\text{g/gDW}$), and the combination of YE 3,000 ppm with AgNO_3 1,000 ppm had a higher value of puerarin (167.79 $\mu\text{g/gDW}$) than other combinations. The third experiment studied the antioxidant activity of the crude extract of WKK from the second experiment. The differences of the antioxidant activity of crude extract of WKK with 12 treatments were analyzed by DPPH assay. The DPPH assay showed that the crude extract of WKK after spraying with 12 treatments had statistically significant differences in the mean IC_{50} . The crude extract of WKK after spraying with YE 4,000 ppm had a high antioxidant activity (mean $\text{IC}_{50} = 1,031.33 \mu\text{g/ml}$). The crude extract of WKK after spraying with YE 2,000 ppm, YE 3,000 ppm and YE 4,000 ppm each combined with AgNO_3 500 ppm (mean $\text{IC}_{50} = 1,563.00, 1,668.00, \text{ and } 1,411.83 \mu\text{g/ml}$ respectively) showed a significantly higher value of the antioxidant activity than those combined with AgNO_3 at 1,000 ppm (mean $\text{IC}_{50} = 1,763.67, 1,748.30, \text{ and } 1,828.83 \mu\text{g/ml}$ respectively). Therefore, the results showed that ISSR-Touchdown PCR could classify the genetic variation of WKK efficiently, better than using the botanical characteristic classification. None of the WKK clones was genetically identical, and they were expected to be derived from 5 different genetic sources collected from Prachuab Khiri Khan province. AgNO_3 and YE could increase the amount of puerarin and antioxidant activities of the crude extract of the tuberous roots of WKK.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2010

Student's Signature Suphinya Bunmanop.

Advisor's Signature Y. Manakusum.

Co-advisor's Signature Rodjima

Co-advisor's Signature Sachirak Seelaporn

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลต่างๆ ที่ได้ช่วยเหลือ และสนับสนุนให้การดำเนินการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ได้แก่

รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี มานะเกษม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำแนะนำ ให้การช่วยเหลือ และให้โอกาสทางการศึกษา และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รจนา โอภาสศิริ และอาจารย์ ดร.ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยช่วยเหลือ ให้โอกาส และให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ศรีโยธา คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. สุธชล วัณประเสริฐ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้โอกาสและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

Associate Professor Dr.Adrian E. Flood ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องของภาษาต่างประเทศ คุณกิตติมา กฤษณสุวรรณ และคุณกรสิริ พัวเจริญเกียรติ ที่ช่วยเหลือในการตรวจสอบเอกสารและความถูกต้องของการจัดทำวิทยานิพนธ์ด้วยความเมตตาและเอาใจใส่ คุณนวลปรารักษ์ อุทัยดา และ คุณสมยง พิมพ์พรหม ที่ให้คำแนะนำในงานปฏิบัติการ คุณสุชาดา อุดมพร ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์สารเคมี และฟาร์มมหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือการปฏิบัติงานในแปลงทดลอง

ขอขอบคุณเป็นพิเศษ ดร.เกสร เมืองทิพย์ ดร.จิตติมา เข้มบางหวาย ดร.กาญจนา กิระศักดิ์ ดร.บุญร่วม คิดคำ คุณสิริพันธ์ ศรีจักรวาท คุณวิโรจน์ เชาว์วิเศษ คุณจุฬาลักษณ์ ทวีบุตร คุณชัยวัฒน์ ใจวังเย็น คุณวิฑูรา วินัยธรรม คุณจารุจินันท์ หล้ากวนวัน คุณสิริพร ศิริชัยเวชกุล ว่าที่ร้อยตรีเกียรติชัย สายตากำ คุณจิราพรพรรณ แพก้านนิค และคุณวีระเดช โชนสันเทียะที่ช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อสำเร็จ-คุณแม่วันเพ็ญ บุญมานพ ที่ให้การอบรมเลี้ยงดูและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา ทำนุบำรุงคุณ คุณสกวเดือน-คุณสุรพล-คุณบุญนิมา อรุณนิมิตกุล ที่เป็นพลังผลักดันและสนับสนุนให้ผู้วิจัยสามารถฟันฝ่าอุปสรรคจนประสบความสำเร็จ

สุพินญา บุญมานพ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ด
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้	3
1.6 รายการอ้างอิง	3
2 ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 กวาวเครือขาว	4
2.2 สรรพคุณของกวาวเครือขาว	4
2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาว	5
2.4 การจำแนกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาว และแหล่งพันธุ์กวาวเครือขาว	6
2.5 เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ในการจำแนกพันธุ์พืช	8
2.6 สารประกอบทางเคมีที่พบในกวาวเครือขาว	13
2.6.1 Puerarin	16
2.7 Puerarin กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	18
2.7.1 อนุมูลอิสระ (free radicals)	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants).....	18
2.8 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	20
2.9 สารชักนำ.....	22
2.9.1 yeast extract.....	22
2.9.2 silver.....	24
2.10 อิทธิพลของสภาพแวดล้อม.....	26
2.11 รายการอ้างอิง.....	26
3 การจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวโดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และเทคนิค ISSR-Touchdown PCR	
บทคัดย่อ.....	33
3.1 บทนำ.....	34
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	36
3.2.1 ชนิดพืช.....	36
3.2.2 การจำแนกลักษณะพฤกษศาสตร์.....	36
3.2.3 การจำแนกด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR.....	38
3.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	39
3.3.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์.....	39
3.3.2 ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	49
3.3.3 โครงสร้างทางพันธุกรรม.....	58
3.4 สรุปผลการวิจัย.....	60
3.5 รายการอ้างอิง.....	60
4 สารชักนำ yeast extract และ AgNO₃ ต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว	
บทคัดย่อ.....	64
4.1 บทนำ.....	65
4.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	67
4.2.1 สถานที่ทำการวิจัย.....	67

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.2	แผนการทดลอง และการพันสารชักนำ.....67
4.2.3	การสกัด puerarin จากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาว.....69
4.2.4	การหาปริมาณของ puerarin ด้วย HPLC (High Performance Liquid Chromatography)..... 70
4.2.5	การวิเคราะห์ข้อมูล..... 70
4.3	ผลการวิจัยและการอภิปรายผล..... 71
4.3.1	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ความชื้นของ รากสะสมอาหารกวางเครือ..... 71
4.3.2	ผลของสารชักนำต่อปริมาณสารสกัดหยาบ ของรากสะสมอาหารกวางเครือขาว..... 73
4.3.3	ผลของสารชักนำต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารกวางเครือขาว..... 73
4.4	สรุปผลการวิจัย..... 80
4.5	รายการอ้างอิง..... 81
5	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือขาว
	บทคัดย่อ..... 84
5.1	บทนำ..... 85
5.2	วิธีดำเนินการวิจัย..... 86
5.2.1	สถานที่ทำการวิจัย..... 86
5.2.2	กลุ่มตัวอย่าง วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง..... 86
5.2.3	วิธีการสกัดสารจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาว..... 87
5.2.4	การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay..... 87
5.2.5	การวิเคราะห์ข้อมูล..... 88
5.3	ผลการวิจัยและการอภิปรายผล..... 88
5.3.1	ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay..... 88
5.4	สรุปผลการวิจัย..... 94

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.5 รายการอ้างอิง	94
6 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	97
ภาคผนวก	
ประวัติผู้เขียน	123

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาว.....	6
2.2	ลักษณะใบย่อยส่วนปลายของกวาวเครือขาว.....	14
2.3	สารกลุ่ม Isoflavones และ Isoflavone glycoside.....	14
2.4	โครงสร้างของ puerarin.....	14
2.5	โครงสร้างของ coumestrol และ mirificoumestan.....	15
2.6	โครงสร้างของ miroestrol.....	15
2.7	กระบวนการ radical disproportionation ของ DPPH.....	21
2.9	ตัวอย่างของสิ่งชักนำที่มีผลต่อการผลิตสารในวิธีการสังเคราะห์ Phenyl propanoids.....	23
3.1	ผังแปลงทดลองกวาวเครือขาวที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.....	37
3.2	เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะของกวาวเครือขาว 36 ต้น คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่ม ความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x.....	48
3.3	ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยใช้ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ (สีด้านหลังใบ ลักษณะใบ ขนบนส่วนของ ลำต้น ขนที่ฝัก สีของดอก ขนาดของใบ และความยาวก้านช่อดอก) จากการวิเคราะห์โดย PCA.....	49
3.4	เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR. คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x.....	53
3.5	ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการ วิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR จากการวิเคราะห์โดย PCA.....	54
3.6	เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR- Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x	56
3.7 ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้นโดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะจากการวิเคราะห์โดย PCA	57
4.1 ผังแปลงทดลองตามการจัดพรีตเมนต์แบบ RCBD มี 2 ปัจจัย 12 พรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ต้นต่อซ้ำ	69
4.2 ตัวอย่าง HPLC โครมาโตแกรมของ puerarin จากสารสกัดรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว ตรวจสอบโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร	75
4.3 ตัวอย่าง HPLC โครมาโตแกรมของ puerarin มาตรฐาน ตรวจสอบโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร	76
4.4 UV spectrum โครมาโตแกรม puerarin จากสารสกัดรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว (A) และ puerarin มาตรฐาน (B) ตรวจสอบโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร	77
 ภาพผนวกที่	
1 Consensus tree แสดงการจัดกลุ่มของกวาวเครือขาว 36 ต้น โดยลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะด้วยโปรแกรม winboot ตัวเลขแสดงเปอร์เซ็นต์การจัดกลุ่มที่เกิดจากการสุ่มจำนวน 1000 ครั้ง	108
2 Consensus tree แสดงการจัดกลุ่มของกวาวเครือขาว 36 ต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ด้วยโปรแกรม winboot ตัวเลขแสดงเปอร์เซ็นต์การจัดกลุ่มที่เกิดจากการสุ่มจำนวน 1000 ครั้ง	109
3 Consensus tree แสดงการจัดกลุ่มของกวาวเครือขาว 36 ต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ด้วยโปรแกรม winboot ตัวเลขแสดงเปอร์เซ็นต์การจัดกลุ่มที่เกิดจากการสุ่ม จำนวน 1000 ครั้ง	110
4 กราฟมาตรฐานของ puerarin	111

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
5	Diagram แสดงขั้นตอนชีวสังเคราะห์ puerarin จาก Shikimic acid pathway..... 112
6	Diagram แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ rosmarinic acid และ 3,4-dihydroxyphenyllactic acid (3,4-DHPLA)..... 113
7	Diagram แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ podophyllotoxin..... 114
8	Diagram แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ terpenoids (isoprenoids) จาก Mevalonate pathway และ Mevalonate-independent pathway..... 115
9	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของ trolox..... 116
10	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่า (T1)..... 116
11	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย AgNO ₃ 500 ppm (T2)..... 117
12	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย AgNO ₃ 1000 ppm (T3)..... 117
13	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 2000 ppm (T4)..... 118
14	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 2000 ppm + AgNO ₃ 500 ppm (T5)..... 118
15	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 2000 ppm + AgNO ₃ 1000 ppm (T6)..... 119
16	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 3000 ppm (T7)..... 119
17	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 3000 ppm + AgNO ₃ 500 ppm (T8)..... 120
18	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 3000 ppm + AgNO ₃ 1000 ppm (T9)..... 120
19	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 4000 ppm (T10)..... 121

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
20	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 4000 ppm + AgNO ₃ 500 ppm (T11).....121
21	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดกวางเครือขาว ที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 4000 ppm + AgNO ₃ 1000 ppm (T12).....122

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	การจำแนกลักษณะทางพฤกษศาสตร์และแหล่งพันธุ์ถั่วเขียว ปลูกที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร..... 8
3.1	สีด้านหลังใบของใบย่อยส่วนปลาย ของถั่วเขียว..... 42
3.2	ลักษณะใบย่อยส่วนปลาย ขนบนส่วนของลำต้น และขนที่ฝักของถั่วเขียว..... 43
3.3	สีของดอกบานคูกกลางและคูนอกของถั่วเขียว..... 45
3.4	ขนาดใบและความยาวก้านช่อดอกของถั่วเขียว..... 47
3.5	ไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วเขียว และลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดง ความแตกต่าง (polymorphisms) ค่า polymorphism information content (PIC) และ ค่า No. of effective alleles per locus (N_e) ของแต่ละไพรเมอร์..... 50
3.6	ค่าดัชนีความหลากหลาย (Shannon' information index; I) ของถั่วเขียว 2 กลุ่ม โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR 58
3.7	โครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรถั่วเขียว (population genetic structure) แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity; Ht), ค่าความหลากหลายทาง พันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic diversity of population; Hs), ค่าสัมประสิทธิ์ความ แตกต่างระหว่างประชากร (coefficient of genetic differentiation ; Gst) และค่า gene floating (Nm)..... 59
3.8	ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Nei's genetic identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกลุ่มพันธุ์ถั่วเขียว 2 กลุ่ม และแผนโคโรแกรมแสดงระยะ ห่างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ด้วย Nei's genetic distance method (1972) and UPGMA by using PHYLIP V. 3.5..... 59
4.1	การจัดทรีตเมนต์ของการทดลองแบบ RCBD มี 2 ปัจจัย 12 ทรีตเมนต์..... 68
4.2	gradient ของเฟสเคลื่อนที่ชนิด (A) และชนิด (B)..... 70
4.3	ผลของสารชักนำต่อ เส้นผ่าศูนย์กลาง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของรากสะสมอาหารถั่วเขียว..... 72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.4 ผลของสารชักนำต่อ น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ความชื้นของรากสะสมอาหารกวาวเครือขาว.....	73
4.5 ผลของสารชักนำต่อ ปริมาณสารสกัด จากรากสะสมอาหารกวาวเครือขาว.....	74
4.6 ผลของสารชักนำต่อ puerarin จากสารสกัดรากสะสมอาหารของ 12 ทริตเมนต์.....	80
5.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย IC ₅₀ ของสารสกัดกวาวเครือขาว 12 ทริตเมนต์ จากการวัดด้วยวิธี DPPH assay.....	91
5.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย IC ₅₀ ของ trolox กับสารสกัดกวาวเครือขาว 12 ทริตเมนต์ จากการวัดด้วยวิธี DPPH assay.....	92
ตารางผนวกที่	
1 ผล Matrix ของกวาวเครือขาวโดยใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ที่ได้จากการคำนวณ cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC, V 2.1 โดยใช้ Jaccard similarity coefficient.....	100
2 ผล Matrix ของกวาวเครือขาว โดยใช้ลักษณะ DNA ที่ได้จากการคำนวณ cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC, V 2.1 โดยใช้ Jaccard similarity coefficient.....	102
3 ผล Matrix ของกวาวเครือขาว โดยใช้ลักษณะ DNA และลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ที่ได้จากการคำนวณ cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC, V 2.1 โดยใช้ Jaccard similarity coefficient.....	104
4 ผลของสารชักนำต่อ puerarin จากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว 12 ทริตเมนต์.....	106
5 ผลของสารชักนำต่อ puerarin จากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว 12 ทริตเมนต์.....	107

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] เป็นไม้เถาในพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) อนุวงศ์ Papilionoideae (Niyomdham, 1994) ที่สะสมอาหารไว้ในรากสะสมอาหารที่อยู่ใต้ดิน กวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันมากในรูปแบบของยา อาหารเสริม และเครื่องสำอางค์ เนื่องจากในหัวกวาวเครือขาวมีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในเพศหญิงสะสมอยู่ (ยุทธนา สมิตะสิริ, 2541; วิชัย เชิดชูวิทยาศาสตร์, 2541) ในปัจจุบันแนวโน้มความต้องการของตลาดเพิ่มมากขึ้น ทำให้กวาวเครือขาวในสภาพธรรมชาติ หดไปอย่างรวดเร็ว สารสำคัญที่พบในหัวกวาวเครือขาวมี 6 กลุ่มคือ isoflavones, isoflavone glycosides, coumestans, chromene, steroids และ สารอื่นๆ (รุจน์ สุทธิศรี, 2547) สารในกลุ่ม isoflavone glycosides ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า puerarin มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และช่วยป้องกันเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Meng and Wang, 2001)ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกวาวเครือขาวสามารถบำบัดรักษาภาวะผิดปกติต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบหัวใจ หลอดเลือด มะเร็ง และเบาหวาน เป็นต้น (Zhu *et al.*, 2004) ยังมีรายงานว่า puerarin มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดโรคมะเร็งโดยไปยับยั้งการกลายลักษณะของเซลล์ที่จะเปลี่ยนไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ (Frank *et al.*, 1994) นอกจากนี้ puerarin ยังมีฤทธิ์ในการลดปริมาณของไขมันชนิดความหนาแน่นต่ำ [low-density lipoprotein, (LDL)] (Yan *et al.*, 2006) ข้อมูลด้านการวิจัยการปลูกกวาวเครือขาวยังมีน้อย ได้มีการศึกษาถึงแนวทางการปลูกเพื่อเพิ่มปริมาณ และคุณภาพของผลผลิตของกวาวเครือขาว แนวทางในการเพิ่มปริมาณของไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) ให้สูงขึ้น อาจจะสามารถทำได้โดยการ ใช้สารชักนำ (elicitor) เช่น การศึกษาในพืชสมุนไพรจีน *Salvia miltiorrhiza* พบว่า yeast extract และ sliver (Ag) ชักนำให้เกิดสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น (Chen *et al.*, 2001; Ge and Wu, 2005)

จากปริมาณความต้องการใช้วัตถุดิบจากหัวกวาวเครือขาว ทั้งทางด้านงานวิจัย และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ ประกอบกับมาตรการของรัฐที่มีพระราชบัญญัติให้กวาวเครือขาวเป็นพืชสงวน ห้ามขุดทำลายและขายกวาวเครือขาวที่เกิดตามธรรมชาติซึ่งมีจำนวนจำกัด ทั้งกวาวเครือขาวมีความหลากหลายมากในธรรมชาติ และมีการผสมพันธุ์เป็นแบบผสมตัวเอง และผสมข้ามได้

การศึกษาในครั้งนี้มุ่งศึกษาการจำแนกสายพันธุ์กวาวเครือขาวที่ปลูกไว้ทดลองในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี วิธีการเพิ่มปริมาณพิวรารินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวเพื่อให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยใช้สารชักนำ และฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการต้านอนุมูลอิสระ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นพื้นฐานความรู้ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยเพื่อประโยชน์ด้านการผลิตในเชิงพาณิชย์ และทางการแพทย์ของกวาวเครือขาวต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาวที่ปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พร้อมการคัดแยกสายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค inter-simple sequence repeats (ISSR) – Touchdown PCR

1.2.2 เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารชักนำ (yeast extract และ AgNO_3) ต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว

1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาวที่ปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พร้อมการคัดแยกสายพันธุ์ โดยเทคนิค ISSR–Touchdown PCR ศึกษาอิทธิพลของ yeast extract และ AgNO_3 ต่อการเจริญเติบโต การให้ผลผลิต และปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว ตรวจวัดปริมาณ puerarin ด้วย HPLC และวัดฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาว ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว และเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ข้อมูลความแตกต่างทางพันธุกรรมของกวาวเครือขาว ที่ปลูกในแปลงทดลองฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4.2 ได้ทราบถึงปัจจัยของสารชักนำตัวใหม่ คือ yeast extract และ AgNO_3 ที่มีผลต่อผลผลิต และปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวในแปลงปลูก

1.4.3 ได้ทราบถึงฤทธิ์สารในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวต่อการต้านอนุมูลอิสระ

1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1.5.1 ผู้ปลูกกวาวเครือขาวและผู้ประกอบธุรกิจด้านสมุนไพร
- 1.5.2 หน่วยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ของกวาวเครือขาว
- 1.5.3 สถาบันการศึกษาทั่วไป

1.6 รายการอ้างอิง

- ยุทธนา สมิตะสิริ. (2541). ภาพรวมงานวิจัยและพัฒนากวาวเครือขาว. สัมมนาวิชาการเรื่อง กวาวเครือ. หน้า 21-35.
- รุจน์ สุทธิศรี. (2547). สารเอสโตรเจนจากพืช (phytoestrogen). ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- วิชัย เจริญชีวะศาสตร์. (2541). ข้อเสนอแนะ และทิศทางการวิจัยกวาวเครือขาวในอนาคต. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องกวาวเครือ (หน้า 36-38). กรุงเทพฯ: สถาบันการแพทย์แผนไทย. กรมการแพทย์.
- Chen, H., Chen, F., Chiu, F.C.K. and Lo, C.M.Y. (2001). The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. **Enzyme and Microbial Technology**. 28: 100-105.
- Frank, A.A., Custer, L.J., Cerna, C.M., and Narala, K.K. (1994). Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. **J Agri Food Chem**. 42: 1905-1913.
- Ge, X. and Wu, J. (2005). Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor. **Plant Science**. 168: 487-491.
- Meng, D.S. and Wang, S.L. (2001). Antitumor effect of quercetin. **Chin. Tradit. Herb. Drugs**. 32: 186-188.
- Niyondham, C. (1994). Key the Genera of Thai Papilionaceous Plant. **Thai For. Bull. (Bot.)**. 22: 26-88.
- Yan, L.P., Chan, S.W., Chan, A.S.C., Chen, S.L., Ma, X.J. and Xu, H.X. (2006). Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelia nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Life Sciences**. 79: 324-330.
- Zhu, J.H., Wang, X.X., and Chen, J.Z.. (2004). Effects of puerarin on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *Acta Pharmacol Sin*. 25: 1045-1051.

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กวาวเครือขาว

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatibandhu) Niyomdham] (ชวลิต นิยมธรรม, 2538) มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Pueraria candollei* Grah. หรือที่เรียกว่า เครือเขาปู่ หรือตาลานเครือ ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae อนุวงศ์ Papilionoideae ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ.2518 ได้กำหนดให้กวาวเครือขาวเป็นพืชสงวนและมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า [*Pueraria candollei* Grah. ex. Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvat) Niyomdh.] พืชชนิดนี้มีชื่อท้องถิ่นแตกต่างกันเช่น กวาวเครือ จานเครือ กวาวเครือขาว ทองเครือ ตานจอมทอง กวาวหัว ตาลานเครือ จอมทอง เป็นต้น (วุฒิ วุฒธรรมเวช, 2540) พืชชนิดนี้มีรายงานว่า พบมากตามป่าเบญจพรรณในภาคเหนือที่จังหวัดเชียงใหม่และลำปาง ในพื้นที่ที่มีความสูง 300-800 เมตรจากระดับน้ำทะเล (ชวลิต นิยมธรรม, 2538) รวมทั้งแหล่งธรรมชาติ 9 แห่ง คือจังหวัดเชียงใหม่ กำแพงเพชร เลย กาญจนบุรี แหล่งโคราช (ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา) ประจวบคีรีขันธ์ เชียงราย ปราจีนบุรี และเพชรบูรณ์ (เขาค้อ) (จรัญ คิษฐ์ไชยวงศ์ และคณะ, 2548)

2.2 สรรพคุณของกวาวเครือขาว

กวาวเครือขาวใช้เป็นยาอายุวัฒนะสำหรับผู้สูงอายุทั้งหญิงและชาย เชื่อว่าทำให้ร่างกายกระชุ่มกระชวย ทำให้ผิวเต่งตึงมีน้ำมีนวล กระตุ้นการขยายตัวของเต้านม หากรับประทานต่อเนื่องกัน 1-2 เดือน จะทำให้เต้านมตึงใหญ่ขึ้น ช่วยให้เส้นผมที่หงอกกลับมาดำขึ้น เพิ่มปริมาณเส้นผม แก้โรคตาฟาง ต้อกระจก ทำให้ความจำดี ทำให้มีพลังกำลัง และช่วยให้การเคลื่อนไหวคล่องแคล่ว (หลวงอนุสารสุนทร, 2474) นอกจากนี้ยังเชื่อว่ากวาวเครือขาวยังช่วยบำรุงโลหิต ลดอาการของโรคที่เกิดจากหลอดเลือดตีบตัน ทำให้การไหลเวียนของเลือดดี และช่วยให้รับประทานอาหารมีรสชาติอร่อย (รุจน์ สุทธิศรี, 2547)

การศึกษาฤทธิ์เอสโตรเจนิกต่อเซลล์เนื้อเยื่อช่องคลอดหนูโดยวิธี vaginal cornification assay ในหนูแรทเพศเมีย พบว่า กวาวเครือขาวที่เก็บจากแหล่งต่างกัน 27 จังหวัดในประเทศไทยมีฤทธิ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เซลล์เนื้อเยื่อช่องคลอดได้ช้าหรือเร็วต่างกัน ซึ่งกลไกของการออกฤทธิ์เอสโตรเจนิกที่เนื้อเยื่อช่องคลอด เริ่มต้นจากสารไฟโตเอสโตรเจนในกวาวเครือขาวจับตัวกับตัว

รับเอสโตรเจนชนิด ER β และ ER α ภายในเซลล์ดังกล่าวแล้วไปกระตุ้นให้กลไกของยีนบางชนิดทำงาน กระตุ้นให้มีการสร้างสารที่มีผลทำให้เกิดการเก็บน้ำไว้ในเซลล์เป็นจำนวนมาก ทำให้เซลล์เต่งตึงขึ้น (Cherdshewasart *et al.*, 2007)

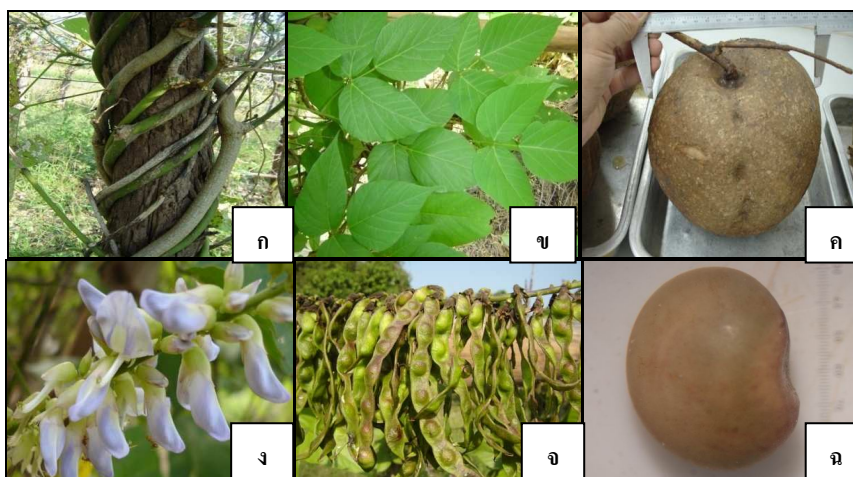
การศึกษาฤทธิ์เอสโตรเจนิกในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์เอสโตรเจนิกของกวางเครือขาวที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งต่าง ๆ 28 จังหวัดในประเทศไทย พบว่ากวางเครือขาวมีการออกฤทธิ์ 2 แบบ คือ ฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของกวางเครือขาว 1 $\mu\text{g/ml}$ แต่จะแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 ที่ความเข้มข้นของกวางเครือขาว 100 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ รวมทั้งยังพบว่ากวางเครือขาวทั้ง 28 จังหวัดมีฤทธิ์เอสโตรเจนที่แตกต่างกัน (Cherdshewasart *et al.*, 2008b)

2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวางเครือขาว

2.3.1 ลำต้น (stems) กวางเครือขาว เป็นไม้พุ่มรอเลื้อยต้นไม้ใหญ่เป็นไม้ผลัดใบ มีอายุหลายปี มีลักษณะลำต้นเกลี้ยง กิ่งอ่อน ยอดอ่อน ก้านช่อดอก และกลีบเลี้ยงมีขนสั้น ๆ สีน้ำตาลอ่อน (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ส่วนของลำต้นมีขน และไม่มีขน ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (จรัญ ดิษฐ์ไชยวงศ์ และคณะ, 2548)

2.3.2 ใบ (leaves) เป็นใบประกอบแบบขนนกมีใบย่อย 3 ใบเรียงสลับ ก้านใบยาวประมาณ 8.5–32 cm (ทิพวัลย์ สุกุมลนันทน์, 2547) โคนก้านใบและปลายยอดสีเขียวถึงสีม่วง ใบย่อยที่โคนรูปไข่ หรือไข่กลับ กว้างตั้งแต่ 6-16 cm ยาว 7-24 cm ก้านใบย่อยยาว 0.3–0.7 cm โคนใบรูปกลมหรือมน ขอบใบเรียบและหยัก ปลายใบแหลมหรือเรียวแหลม แกนกลางยาว 1.5–5.0 cm เนื้อใบบางถึงหนา พบขนสั้นประปราย เส้นแขนงใบข้างละ 5-7 เส้น คู่แรกออกจากโคนใบ หูใบย่อยเรียวแคบ กว้าง 1 mm ยาว 5 mm พบรูปร่างของใบแตกต่างกันไป 4 แบบ ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

2.3.3 ดอก (flowers) มีลักษณะเป็นช่อเดี่ยว และบางช่อดอกมีช่อดอกแยกออกตามกิ่งดอก ตั้งแต่โคนถึงกลางช่อดอกอีกประมาณ 3-5 ช่อดอก โดยทั่วไปดอกจะออกกระหว่างต้นกับกิ่ง (หรือระหว่างใบกับต้น) ประมาณ 3-5 ช่อต่อข้อ (node) โดยช่อดอกจะออกเกือบทุกข้อ ช่อดอกปกติมีความยาวตั้งแต่ 20 cm ถึง 150 cm ช่อดอกเป็นแบบกระจะ (raceme) ดอกย่อยมีลักษณะคล้ายดอกถั่ว มีสีน้ำตาลอมม่วง ม่วงอ่อน หรือสีขาวอมม่วง ออกดอกเป็นกระจุก ๆ ละ 2-5 ดอก มีจำนวนดอกย่อยในแต่ละช่อดอก ตั้งแต่ 30 ถึงมากกว่า 200 ดอก ขึ้นอยู่กับขนาดของต้น ก้านช่อดอกย่อยยาว 0.2-0.4 cm สีน้ำตาลปนม่วง มีกลีบดอก 5 กลีบ กลีบบน 1 กลีบ (ค่อนข้างใหญ่) กลีบคู่กลางและคู่ล่างเล็กกว่า สีน้ำตาลอมม่วง ตรงกลางกลีบสีขาว ลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยม มีเกสรตัวผู้ 10-12 อันติดกัน เกสรตัวเมียหรือรังไข่อยู่ภายในวงเกสรตัวผู้ ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (กรมวิชาการเกษตร, 2548)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วเขียว (วิโรจน์ เชาว์วิเศษ, 2550) [ลำต้น (ก), ใบ (ข), รากสะสมอาหารหรือหัว (ค), ดอก (ง), ฟัก (จ) และเมล็ด (ฉ)]

2.3.4 ฟักและเมล็ด (fruits and seeds) ฟักมีลักษณะเป็นฝักแบนรูปขอบขนานสีเขียว และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มเมื่อแก่ ฝักมีขนประปราย (var. *mirifica*) ถึงเกลี้ยง (var. *candollei*) ขนาดของฝักมีขน ยาวประมาณ 3.5-8.5 cm กว้าง 0.5-0.7 cm จำนวนเมล็ดต่อฝัก ประมาณ 2-6 เมล็ดลักษณะของเมล็ดค่อนข้างด้าน hilum มีขนาดเล็ก ส่วนฝักไม่มีขน ฝักเมื่อแก่มีสีน้ำตาล รูปร่างของฝักแบน ฝักของฝักมีรอยย่นค่อนข้างชัดเจน ฝักเกลี้ยง ขนาดของฝักยาวประมาณ 3.10-12.5 cm กว้าง 0.5-0.9 cm จำนวนเมล็ดต่อฝักเท่ากับ 3-7 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะค่อนข้างกลม สีน้ำตาล มีลวดลาย ฝักด้าน ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

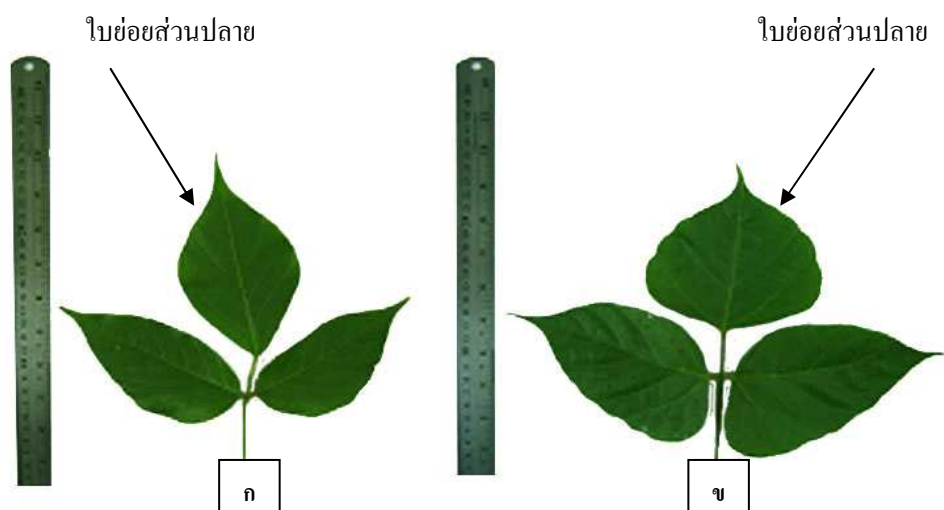
2.3.5 หัว หรือรากสะสมอาหาร (tuberous roots) หัวใต้ดินค่อนข้างกลม มีลักษณะเป็นรากสะสมอาหาร (tuberous roots) มีขนาดใหญ่และคอดยาวเป็นตอนๆ ต่อเนื่องกัน ส่วนที่กลมมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 10-70 cm ส่วนที่คอดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 cm เปลือกด้านนอกมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้มและมีความแข็ง ความหนาของเปลือกประมาณ 2-4 mm เนื้อภายในมีสีขาวขุ่น ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (ชวลิต นิยมธรรม, 2538)

2.4 การจำแนกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วเขียว และแหล่งพันธุ์ถั่วเขียว

กรมวิชาการเกษตรได้ศึกษาสายพันธุ์ถั่วเขียวโดย จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ และคณะ (2550) จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ตามลักษณะใบได้ 2 ลักษณะ (ภาพที่ 2.2 และตารางที่ 2.1) ได้แก่

2.4.1 ใบรูปรี (elliptic), ฐานใบแหลม (acute) และปลายใบเรียวแหลม (acuminate) ดังแสดง
ในภาพที่ 2.2 (ก)

2.4.2 ใบรูปไข่ (ovate), ฐานใบมน (obtuse) และ ปลายใบเป็นติ่งแหลม (cuspidate) ดัง
แสดงในภาพที่ 2.2 (ข)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะใบย่อยส่วนปลายของกวางเครือขาว ใบรูปรี ฐานใบแหลม ปลายใบเรียวแหลม
(ก) และ ใบรูปไข่ ฐานใบมน ปลายใบเป็นติ่งแหลม(ข) (ถ่ายภาพจากใบกวางเครือขาว
แปลงทดลอง ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี)

ตารางที่ 2.1 การจำแนกลักษณะทางพฤกษศาสตร์และแหล่งพันธุกรรมกวาวเครือขาว ปลุกที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร (ปรับปรุงจาก จริญญา วิทยุไชยวงศ์ และคณะ, 2550)

แหล่งพันธุ์	ขนบนส่วนของลำต้น		รูปร่างใบ (leaf shape)	ฐานใบ (leaf base)	ปลายใบ (leaf apex)
	มี	ไม่มี			
กาญจนบุรี	-	/	ovate	obtuse	cuspidate
	/	-	elliptic	acute	acuminate
เชียงใหม่	-	/	elliptic	acute	acuminate
	/	-	elliptic	acute	acuminate
ตาก	-	/	ovate	obtuse	cuspidate
ประจวบคีรีขันธ์	-	/	ovate	obtuse	cuspidate
	-	/	elliptic	acute	acuminate
เลย	-	/	ovate	obtuse	cuspidate
ลำปาง	-	/	ovate	obtuse	cuspidate
สระบุรี	-	/	ovate	obtuse	cuspidate
	-	/	elliptic	acute	acuminate

หมายเหตุ : ovate (ใบรูปไข่), elliptic (ใบรูปรี), obtuse (ฐานใบมน), acute (ฐานใบแหลม), cuspidate (ปลายใบเป็นติ่งแหลม) และ acuminate (ปลายใบเรียวแหลม)

2.5 เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ในการจำแนกพันธุ์พืช

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเทคโนโลยีสมัยใหม่ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของจีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็วและครอบคลุมอย่างกว้างขวางปัจจุบันความรู้ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว การใช้วิธีการตรวจสอบพันธุกรรมด้วยการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอคือ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือเนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืชหรือตามสภาพแวดล้อม(สุชาดา สุขหรั่ง, 2548) การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถแบ่งออกได้ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ วิธีที่ต้องตรวจสอบโดยการทำให้ไฮบริดไอเซนชัน (hybridization) และวิธีที่ใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งทั้งสองวิธีการนี้มีการประยุกต์เป็นแบบต่าง ๆ อีก จึงทำให้มีการเรียกชื่อใหม่ ๆ เป็นจำนวนมาก (ยุคลธร สถาปนศิริ, 2542) ดังนี้

2.5.1 เทคนิค polymerase chain reaction เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัย

หลักการ DNA replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอด ภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาสั้นจนถึง ปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุลสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นที่ 1 denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C

ขั้นที่ 2 annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง และจัดให้ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 40-60°C

ขั้นที่ 3 extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-73°C เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

ตัวอย่างเทคนิคที่ใช้หลักการของ PCR เช่น

2.5.1.1 เทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ในระดับชนิด (species) ของสิ่งมีชีวิตจนถึงภายในชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ เช่น (AG)₆ (TC)₈ หรือ (ACG)₄ เป็นต้น ซึ่งจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าเทคนิค RAPD ใช้วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน และสามารถตรวจสอบพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดโดยไม่ต้องทราบลำดับเบสมาก่อน

ตัวอย่างการใช้เทคนิค ISSR ในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์พืช มีดังนี้

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และคณะ (2548ก, ข) ใช้ ISSR marker ในการตรวจสอบ

การจำแนกพันธุ์ทุเรียน และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะในประเทศไทย พบว่าวิธีการนี้สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่า สามารถจำแนกทุเรียนพันธุ์การค้า (*Durio zibethinus* Murr.) 4 พันธุ์ได้อย่างชัดเจน ได้แก่ พันธุ์หอมทอง กระจุม ก้านยาว และชะนี และสามารถตรวจความแตกต่างระหว่างต้นในพันธุ์เดียวกัน (plant-to-plant variation) ได้

รัฐกร ศรีสุทธิ และสร้อยา ณ ลำปาง (2550) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค ISSR พบว่า การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะและอัตราการเจริญของ colony ขนาดและรูปร่างของ conidia และ appressoria การสร้างหรือไม่สร้าง setae และ sclerotia ในการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 41 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. musae* และ *C. capsici* เมื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเทคนิค ISSR ด้วยไพรเมอร์ 6 ชนิด พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 161 แถบ และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylip พบว่าสามารถแบ่งได้ 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มของเชื้อรา *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. musae* และที่เหลือเป็นกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยพบว่า กลุ่มของเชื้อรา *C. musae* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ เชื้อรา *C. gloeosporioides* และผลการจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นการใช้เทคนิค ISSR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งในการวิเคราะห์

2.5.1.2 เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ไพรเมอร์ที่นิยมใช้เป็น oligonucleotide สายสั้นๆ มีความยาวประมาณ 10 base เป็นตัวสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่จะทำการศึกษาในปฏิกิริยา PCR ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการทำปฏิกิริยาในสภาพที่เหมาะสมจะถูกนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ วิธีการนี้สามารถนำมาใช้จำแนกและศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชได้อย่างสะดวกรวดเร็ว รวมทั้งสามารถนำมาใช้เป็นเอกลักษณ์ (DNA fingerprint) ของพันธุ์พืชได้อีกด้วย (พรพันธ์ ภูพร้อมพันธุ์, 2538)

ตัวอย่างการใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์พืช มีดังนี้

Ditchiwong *et al.* (2005) ได้จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายโดยวิธี RAPD ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า วิธี RAPD สามารถใช้ระบุพันธุ์ หรือสายต้นกวาวเครือขาวได้ ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายต้นได้ และพบว่าสายต้นที่เก็บรวบรวมได้มีพันธุกรรมที่หลากหลายแม้จะมาจากแหล่งพันธุ์เดียวกัน จากการประมวล DNA fragment แล้วศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง dendrogram สามารถแบ่งสายต้นกวาวเครือขาวที่ความใกล้ชิดระดับประมาณ 50% ได้ 5 กลุ่มใหญ่ และพบว่าทุกต้นมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง

ลักษณะทาง DNA ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และปริมาณสารสำคัญพบว่า ลักษณะทาง DNA ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปริมาณสารสำคัญ

2.5.1.3 เทคนิค DNA amplification fingerprinting หรือ DAF ซึ่ง Caetano และคณะ (1991) นำมาใช้ครั้งแรกโดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์ และใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณโดยใช้อุณหภูมิเพียง 2 ระดับ แล้วแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน โพลีอะครีลาไมด์เจล และย้อมด้วย silver stain

ตัวอย่างการใช้เทคนิค DAF ในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์พืช มีดังนี้

ทรงพล สมศรี และ สุคนธ์ทิพย์ บุญกรกุล (2549) ได้จำแนกพันธุ์มะละกอ 14 พันธุ์ ด้วยเทคนิค DAF โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 11 ไพรเมอร์ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบ DNA สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพันธุ์ปากช่องแขกดำ Mexico Mammy และแขกนวล กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยพันธุ์โกโก้ก้านดำ Apple Tainung แม่เหียะ Florida Tolerant, Sunset และ Mexico Amerilla กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยพันธุ์ Taiwan Kapoho Solo และ Richter และพบว่าไพรเมอร์ OPA-06 (5' GGT CCC TGAC 3') สามารถจำแนกเพศของมะละกอได้ โดยจะให้ความแตกต่างของแถบ DNA (polymorphic) 2 ตำแหน่ง ๆ แรกมีขนาดประมาณ 365 base pairs (bp) จากต้นสมบูรณเพศ (กระเทียม) และอีกตำแหน่งมีขนาดประมาณ 360 bp จากต้นเพศผู้ ส่วนเพศเมียไม่พบดีเอ็นเอทั้งสองตำแหน่งนี้ ต่อมาได้ทำการทดสอบไพรเมอร์ OPA-06 กับมะละกอลูกผสมชั่วที่ 1, 2, 3, 4 และพ่อแม่พันธุ์จำนวน 254 ต้น พบว่าสามารถจำแนกเพศได้อย่างถูกต้องถึง 88.18 % และได้ทำการทดสอบกับต้นมะละกอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 47 ต้น พบว่าสามารถใช้จำแนกเพศได้ถูกต้อง 100 %

2.5.1.4 เทคนิค Simple sequence repeats (SSR) เป็นเทคนิคที่อาศัยการกระจายตัวของเบสซ้ำขนาด 1-6 เบสในสิ่งมีชีวิต มีการสร้างไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนต้นและส่วนปลายของเบสซ้ำนั้น แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการมีชุดซ้ำไม่เท่ากัน

ตัวอย่างการใช้เทคนิค SSR ในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์พืช มีดังนี้

จิรพงศ์ ใจรินทร์ และคณะ (2552) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR วิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph3* จากพันธุ์ข้าว Rathu Heenati โดยการพัฒนาประชากรข้าวผสมกลับ BC_3F_2 จากคู่ผสม Rathu Heenati' ขาวดอกมะลิ105 เพื่อใช้ทดสอบความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและสร้างแผนที่พันธุกรรม พบว่ามีเพียงเครื่องหมายโมเลกุล RM190 ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานและอ่อนแอ จากนั้นได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมที่มีตำแหน่งใกล้กับ RM190 เพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานที่แน่นอนบนโครโมโซมจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง ฟิโนไทป์และจีโนไทป์ของประชากรผสมกลับ BC_3F_2

จำนวน 333 สายพันธุ์ พบว่ายีนต้านทาน *Bph3* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล RM588 และ RM589 บนโครโมโซม 6 ได้มีนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีนต้านทานไปใช้พัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและมีคุณภาพเมล็ดดี สามารถแยก linkage drag ระหว่างอัลลีล *Bph3* และ *Wx^a* ออกจากกันโดยการคัดเลือกพีโนไทป์และการใช้โมเลกุลเครื่องหมายร่วมกัน สายพันธุ์ข้าวที่พัฒนาจากการวิจัยแสดงความต้านทานต่อความหลากหลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่พบในประเทศไทยและมีคุณภาพเมล็ดเหมือนพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105

2.5.1.5 เทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่รวมเอาหลักการ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ RAPD มารวมไว้ด้วยกัน โดยมีการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด แล้วต่อเข้ากับ adapter ของเอ็นไซม์ทั้งสอง และมีการเพิ่มปริมาณด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adapter นั้นๆ

ตัวอย่างการใช้เทคนิค AFLP ในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์พืช มีดังนี้

จักรพันธ์ วณิชกุล และ สุจิตรา จางตระกูล (2548) ใช้เทคนิค AFLP ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาพันธุกรรมระหว่างแหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphio pedilum exul* (Ridl.) Rolfe) ซึ่งมีการกระจายพันธุ์อยู่บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย โดยได้ทำการรวบรวมกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่จำนวนทั้งสิ้น 6 แหล่ง ในบริเวณจังหวัดตรัง กระบี่ และพังงา โดยใช้จำนวนคู่ไพรเมอร์ 13 คู่ สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษา โดยให้จำนวนแถบดีเอ็นเอจำนวนมากและลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีความคมชัด

2.5.2 เทคนิค hybridization เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าสู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ

ตัวอย่างเทคนิคที่ใช้หลักการของ hybridization เช่น

2.5.2.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดเล็กที่ทราบลำดับเบสแล้วมาจับคู่กับดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา ทำได้โดยนำดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (genomic DNA) มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วนำไปแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ย้ายชิ้นดีเอ็นเอที่แยกแล้วทั้งหมดไปยังแผ่นไนลอน (membrane filter) ด้วยวิธี Southern blotting แล้วนำดีเอ็นเอตรวจสอบที่ทำการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีเพื่อใช้ในการติดตามผลมาทำปฏิกิริยากันกับดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนที่ผ่านกระบวนการทำให้เป็นสายเดี่ยวแล้ว โดยจะจับกับตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สม (Tanksley *et al.*, 1989)

ตัวอย่างการใช้เทคนิค RFLP ในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์พืช มีดังนี้

Corniquel and Mercier (1994) ใช้เทคนิค RFLP ในการจำแนก date palm (*Phoenix*

dactylifera L.) 5 พันธุ์ได้ คือ Barhee, Deglet Nour, Khalassa, Khadrawy และ Medjool โดยใช้ DNA digested โดย *EcoRI* ร่วมกับ cDNA probes

2.5.2.2 Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) หรือ Minisatellite DNA เป็นดีเอ็นเอที่มีหลายชุดซ้ำ ขนาดของแต่ละชุดยาวประมาณ 15-100 bp ในพืชพบขนาด 10-60 bp ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ สามารถพบชุดซ้ำนี้เรียงต่อกัน 20-30 ชุด ความยาว 1,000-5,000 bp

ตัวอย่างการใช้เทคนิค VNTR ในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์พืช มีดังนี้

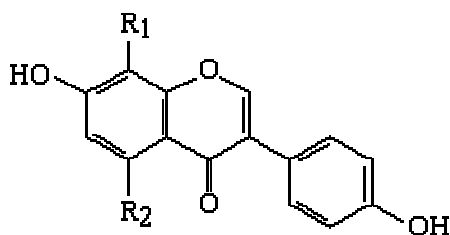
Mhameed *et al.* (1996) จำแนกลูกผสมพันธุ์โอคาโด (*Persea americana* Mill) 5 สายพันธุ์ โดยใช้ VNTR ด้วยเทคนิค Multilocus DNA fingerprints (DPP's) สามารถจำแนกพันธุ์ลูกผสมข้าม 5 สายพันธุ์ โดยมีค่า heterozygosity (ความถี่ของ heterozygote ต่อยีน 1 ตำแหน่ง) เท่ากับ 100% และลูกผสมตัวเอง 2 สายพันธุ์ มีค่า heterozygosity เท่ากับ 90 และ 94%

2.6 สารประกอบทางเคมีที่พบในหัวกวาวเครือขาว

สารสำคัญที่พบในหัวกวาวเครือขาวได้แก่ สารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชทั่วไป มีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง เช่น เป็นรงควัตถุ เป็น signaling molecule เป็นสารป้องกัน หรือต่อต้านความเครียดจากสิ่งมีชีวิต และไม่มีชีวิต และเป็นสารดึงดูดแมลงเพื่อช่วยผสมเกสรของพืช (Wade *et al.*, 2003)

สารสำคัญในหัวกวาวเครือขาวแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม (รุจน์ สุทธิศรี, 2547; Ingham, Tahara and Dziedzic, 1994) คือ

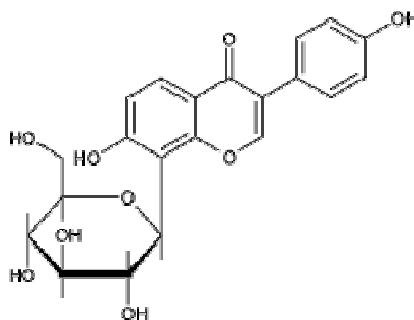
กลุ่ม 1 Isoflavones ได้แก่ daidzein, genistein, kawakhurin และ kawakhurin hydrate (ภาพที่ 2.3) ทำหน้าที่คล้าย hormone estrogen ซึ่งในธรรมชาติที่ได้จากพืชเรียกว่า phytoestrogens มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์เอสโตรเจนิก มีหน้าที่เพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่ผิวชั้นบนสุดของหนังกำพร้า และเพิ่มความหนาแน่นของเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibers) ช่วยลดอาการในสตรีวัยทอง ช่วยให้กระดูกแข็งแรง ป้องกันโรคกระดูกพรุน เป็นต้น (รุจน์ สุทธิศรี, 2547)



Genistein :	$R_1 = H, R_2 = OH$
Daidzein :	$R_1 = H, R_2 = H$
Puerarin :	$R_1 = \text{Glucose}, R_2 = H$
Mirificin :	$R_1 = \text{Glucose-Apiose}, R_2 = H$

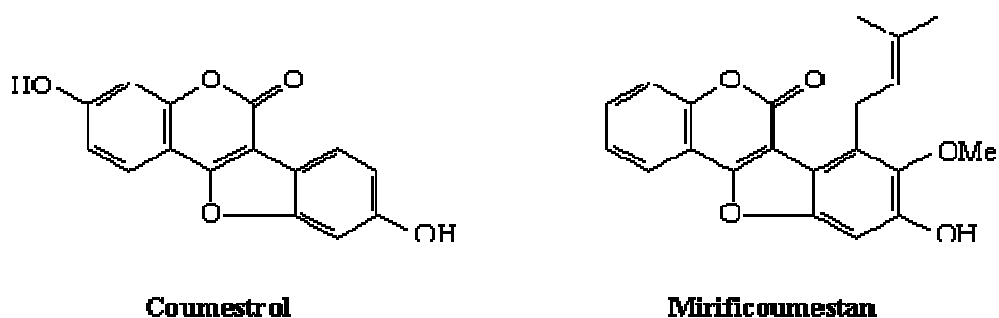
ภาพที่ 2.3 สารกลุ่ม Isoflavones และ Isoflavone glycosides (รุจน์ สุทธิศรี, 2547)

กลุ่ม 2 Isoflavone glycosides ได้แก่ daidzin, genistin, puerarin (ภาพที่ 2.4), mirificin และ puerarin-6-monoacetate (ภาพที่ 2.3) เป็นอนุพันธ์ของ isoflavone ที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีหน้าที่ป้องกันโรคกระดูกพรุน กระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ป้องกันโรคหลอดเลือดแข็งตัว ใช้รักษาอาการติดเชื้อเรื้อรัง รักษาโรคเบาหวาน เป็นต้น (รุจน์ สุทธิศรี, 2547)



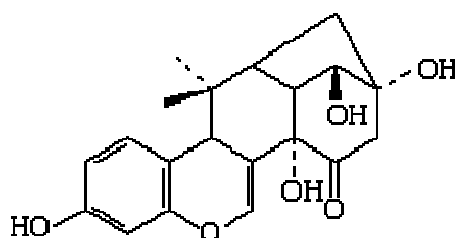
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของ puerarin (<http://www.wilshiretechnologies.com/.../puerarin.gif>)

กลุ่ม 3 Coumestans ได้แก่ coumestrol, mirificoumestan (ภาพที่ 2.5), mirificoumesta glycol และ mirificoumestan-hydrate เป็นสารธรรมชาติในกลุ่ม phytoestrogen หน้าที่ป้องกันโรคมะเร็ง เป็นต้น (รุจน์ สุทธิศรี, 2547, Stadbauer and Kappe, 1993)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของ coumestrol และ mirificoumestan (รุจน์ สุทศรี, 2547)

กลุ่ม 4 Chromene ได้แก่ miroestrol (ภาพที่ 2.6) และ deoxymiroestrol ซึ่ง miroestrol เป็นสารที่มีรายงานว่ามียุทธศาสตร์คล้ายเอสโตรเจน พบเป็นปริมาณ 0.002-0.003% ของน้ำหนักรั่วแห้งของ miroestrol เป็นสารออกฤทธิ์ชนิดแรกที่สุดที่ได้จากรากสะสมอาหารกวาวเครือขาว และออกฤทธิ์แรงที่สุด ทำหน้าที่ป้องกันโรคมะเร็ง ทำให้ช่องคลอดของสัตว์เพศเมียวัยก่อนเจริญพันธุ์มีขนาดขยายใหญ่ เป็นต้น (รุจน์ สุทศรี, 2547, Jones and Pope, 1960)



Miroestrol

ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของ miroestrol (รุจน์ สุทศรี, 2547)

กลุ่ม 5 Steroids ได้แก่ β -sitosterol และ stigmasterol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ 2 ชนิด คือ MCF-7 และ MDA-MB-231 เป็นต้น (รุจน์ สุทศรี, 2547, Awad *et al.*, 2007)

กลุ่ม 6 สารอื่นๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสไขมัน โปรตีน ใยอาหาร แอลกอฮอล์ แคลเซียม และฟอสฟอรัส

2.6.1 Puerarin

puerarin เป็นสารประกอบ isoflavonoid ในกลุ่ม isoflavone glycosides สูตรโมเลกุล คือ $C_{12}H_{20}O_9$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 432.38 โครงสร้างเคมีประกอบด้วยวงแหวนหลัก 3 วง และมี กลูโคสอยู่ 1 โมเลกุล ตรงตำแหน่งที่ 8 puerarin เป็นสาร isoflavone ที่สกัดได้เป็นครั้งแรกจาก สมุนไพรจีนที่ชื่อ *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi. ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการรักษาภาวะไขมัน ในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) โรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular diseases: CVD) โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง หลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) และภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน (myocardial infarction) ปัจจุบันมุ่งเน้นการใช้ puerarin เพื่อผลต่อการรักษาภาวะไขมันในเลือด ผิดปกติ การรักษาภาวะอ้วน (obesity) ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ความดันโลหิตสูง ภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว และเป็นสารต่อต้านสารอนุมูลอิสระจากผลการทดลองพบว่า puerarin ส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไขมันจากการชักนำของอินซูลิน และการดูดซึมกลูโคส ของ adipocytes ซึ่งนำไปสู่การดื้อต่ออินซูลิน เมื่อมีระดับกลูโคสสูง ๆ และเพิ่มอัตราการอยู่รอดของ เอนโดทีเรียลเซลล์ (เซลล์ด้านในผนังหลอดเลือด: endothelial cell) (Ming-en Xu *et al.*, 2005)

2.6.1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ puerarin

การวิเคราะห์หา puerarin ทำได้หลายวิธี เช่น Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GS-MS) การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง [Thin layer Chromatography (TLC)] และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นต้น (Li *et al.*, 2003 และ วิโรจน์ เชาว์วิเศษ, 2550)

2.6.1.1.1 GS-MS เป็นวิธีที่สามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสาร ได้อย่างค่อนข้างแม่นยำโดยอาศัยการเปรียบเทียบ Fingerprint ของเลขมวล (Mass number) ของสาร ตัวอย่างนั้นๆ กับข้อมูลที่มีอยู่ใน library สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) และเชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) GC-MS ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง GC และส่วนของเครื่อง MS Yu *et al.* (2009) สามารถใช้วิธี GC-MS วิเคราะห์ผลผลิตหลักจากการ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ puerarin จาก puerarin-7-O-glucoside เป็น puerarin-7-O-fructoside ได้

2.6.1.1.2 TLC เป็นการแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ Solid-liquid chromatography ของผสมที่ถูกแยกจะถูกดูดซับโดยเฟสคงที่ที่เป็นของแข็ง เฟสคงที่ที่นิยมใช้คือ silica gel ($SiO_2 \cdot xH_2O$) และ alumina (Al_2O_3) ในขณะที่เฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวก็จะพา สารให้เคลื่อนที่ไป เนื่องจากสารที่มีโครงสร้างต่างกันจะได้รับแรงดึงดูดและแรงผลักรันต่างกันด้วย ดังนั้นสารแต่ละชนิดจึงเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน สารที่ถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า สารที่ถูกดูดซับน้อย จึงทำให้เกิดการแยกของสารขึ้นเป็นแถบๆ เรียกว่า chromatogram เฟสคงที่

ทำหน้าที่ 2 ลักษณะ คือ รับ โมเลกุลของสารเข้ามาสัมผัสกับตัวมัน เรียกว่าเกิด adsorption และปล่อยให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ต่อไป เรียกว่าเกิด desorption วิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) ได้ทำการตรวจหา puerarin จากสารสกัดรากสะสมอาหารขาวกวาวเครือขาวด้วยวิธี TLC โดยใช้ n-butanol : acetic acid : water (5:3:1 โดยปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยเปรียบเทียบตำแหน่งของ R_f ของ puerarin จากสารสกัดกวาวเครือขาวกับค่า R_f ของ puerarin มาตรฐาน ซึ่งมี R_f เท่ากับ 0.81 และใช้เฟสเคลื่อนที่อีก 2 เฟสคือ choloform : MeOH : water (65:25:4 โดยปริมาตร) และ chloroform : MeOH (20:1 โดยปริมาตร) พบตำแหน่งของ puerarin ในสารสกัดกวาวเครือขาวเท่ากับสาร puerarin มาตรฐานเช่นกัน

2.6.1.1.3 HPLC เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกันซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสที่เคลื่อนที่หรือเฟสที่อยู่กับที่สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อนส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งเรียกว่า โครมาโตแกรม

วิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) ทำการวิเคราะห์ puerarin ด้วยวิธี HPLC พบว่า puerarin จากสารสกัดกวาวเครือขาวมี peak ที่มี retention time เท่ากับ retention time ของ puerarin มาตรฐาน และมีรูปแบบ (pattern) ของ UV spectrum ที่เหมือนกัน

อรัญญา มโนสร้อย, สมศักดิ์ ทะระธา, พิสิษฐ์ ใจนถีย์ และ จิรเดช มโนสร้อย (2551) วิจัยเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบจากรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวที่มีอายุระหว่าง 3 ถึง 14 ปี จาก จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และกาญจนบุรี วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน puerarin, daizein และ genistein พบว่าหัวกวาวเครือขาวที่มีอายุ 6 ปี จาก จังหวัดเชียงใหม่ มีสารสำคัญมาตรฐาน puerarin, daizein และ genistein สูงที่สุดเท่ากับ 290, 89 และ 9 mg/kg dry weight (DW) ตามลำดับ และพบปริมาณสารสำคัญมากในตัวอย่างกวาวเครือแดงอายุ 6 ปี ที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยปริมาณสารสำคัญ puerarin ในกวาวเครือแดงจะมีน้อยกว่ากวาวเครือขาวแต่ปริมาณ daizein และ genistein มีมากกว่ากวาวเครือขาว โดยพบในปริมาณ 19, 37.2 และ 4.5 mg/kgDW ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง (2551) ได้วิจัยกวาวเครือขาวใน 7 อำเภอของจังหวัด เชียงราย คือ อำเภอเวียงป่าเป้า แม่สรวย แม่ลาว พาน ป่าแดด เทิง เชียงของ จากการตรวจสอบฤทธิ์ คล้ายเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวจาก 7 อำเภอของจังหวัดเชียงราย พบว่าหัวกวาวเครือขาว

จากทุกอำเภอ สามารถออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนได้ โดยกวาวเครือขาวจากอำเภอแม่ลาว ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนแรงที่สุด เมื่อนำผงป่นแห้งจากหัวกวาวเครือขาว 7 อำเภอ ไปวิเคราะห์หา puerarin, daidzin, daidzein, genistin และ genistein โดยใช้ HPLC พบว่า กวาวเครือขาวแต่ละแหล่งมีค่าของสารที่วิเคราะห์แตกต่างกัน

ธิปพาวิญ จำปาพันธ์, วรพงษ์ กิจดำรงธรรม, จีระเดช มโนสร้อย และ อรัญญา มโนสร้อย (2551) ทำการวิจัยการพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากกวาวเครือขาวในอนุภาคขนาดเล็กเพื่อใช้ทางผิวหนัง ในการทดสอบความคงตัวของเคมีได้ประเมินจากการวิเคราะห์หาปริมาณ puerarin ซึ่งเป็น isoflavones ที่พบมากที่สุดในการกวาวเครือขาว และใช้เป็น marker โดยวิธี HPLC เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ตัวอย่างสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ไม่ได้เก็บกัก (nonentrap) แบบของเหลว มีปริมาณ puerarin ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ในขณะที่ตำรับอนุภาคนาโนที่เก็บกักสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวมีปริมาณ puerarin ที่ค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาผ่านไป

2.7 Puerarin กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

2.7.1 อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นอะตอม หรือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอน ภายในอะตอมหรือโมเลกุลนั้น จัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี สำหรับออกซิเจนจัดเป็นอนุมูลอิสระ และมีอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่กันอยู่ภายในโมเลกุล 2 อิเล็กตรอน อนุมูลอิสระใดที่เป็นรูปที่ทำปฏิกิริยาของออกซิเจนเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ $O_2^{\cdot-}$ และ H_2O_2 เป็นต้น (Gutteridge และ Halliwell, 1994) ในร่างกายมนุษย์ อนุมูลอิสระเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมและเกิดจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ ทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ เช่น เซลล์ถูกทำลาย เกิดการเสื่อมของเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่ (aging) และทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเยื่อหุ้มเซลล์ รุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรค เช่น โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน เป็นต้น ร่างกายมีกลไกที่สามารถป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านี้ได้โดยใช้เอนไซม์ เช่น superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GPX) ที่ร่างกายสร้างขึ้นในการกำจัด แต่การกำจัดอนุมูลอิสระด้วยเอนไซม์มักมีขีดจำกัด เนื่องจากบางคนมีพันธุกรรมที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้น้อย นอกจากนี้วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และ แอนโทไซยานิน ที่ได้จากการรับประทานอาหาร ผัก ผลไม้ก็มีสารต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ (จักรพงษ์ ไพบุลย์, 2542)

2.7.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) หมายถึง สารที่มีโครงสร้างสามารถจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และปฏิกิริยาถูกโซได้ ซึ่งชะลอ

หรือยับยั้งการทำลายเซลล์ และลดอัตราการเกิดโรคร้ายแรงต่างๆ ที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุได้ (Gutteridge and Halliwell, 1994) สารเหล่านี้มีคุณสมบัติประโยชน์อย่างมากต่อระบบที่สำคัญต่าง ๆ ในร่างกาย ได้แก่ ระบบหลอดเลือดและหัวใจ ระบบภูมิคุ้มกัน กลุ่มเซลล์ประสาทที่ทำงานเฉพาะในสมอง การต่อต้านการเกิดโรคมะเร็งต่าง ๆ และการชะลอความชรา รวมทั้งกระบวนการต่าง ๆ ที่โดดเด่นในการปกป้องชีวิต ระบบต่าง ๆ เหล่านี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับสุขภาพร่างกายของเรา ตัวอย่างเช่น โรคหัวใจที่เกิดจากการอุดตันของเส้นเลือดที่อาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลัน ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมสารต่าง ๆ ที่บริเวณหลอดเลือดทำให้ผนังหลอดเลือดถูกทำลายในกรณีโรคอื่น ๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (ปวีณา ช่วงทิพย์, 2546) สารต้านอนุมูลอิสระในพืชที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินอี พบมากในเมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง และน้ำมันรำข้าว สารประกอบ ฟีนอลิก (phenolic compound) มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดสี กลิ่นและรสชาติในพืชผักและผลไม้ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids compound) ซึ่งมีประมาณ 8,000 ชนิด (ปวีณา ช่วงทิพย์, 2546; นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชญา เจนวิถีสุข, 2545)

สารสำคัญที่พบแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาวส่วนใหญ่เป็นสารประกอบ phenolic ได้แก่ สารกลุ่ม flavonoid และ isoflavonoid จรรยา แสงอรุณ และคณะ (2545) ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาว กวาวเครือแดง และกวาวเครือดำ ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีสมบัติความมีขั้วต่างกัน ได้แก่ น้ำ เอทานอล 70% เอทานอล 95% อะซีโตน (acetone) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และเฮกเซน (hexane) ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้เทคนิค 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) free radical decolorization assay (ABTS assay) พบว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารอนุมูลอิสระจากกวาวเครือทั้งสามชนิด รวมทั้งพบว่ากวาวเครือดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด อย่างไรก็ตามกวาวเครือดำเป็นพันธุ์ที่ค่อนข้างหายากและให้ปริมาณสารสกัดน้อยมาก

การศึกษาของ Cherdshewasart and Sutjit (2008a) พบว่า puerarin และ daidzein ในรากพืชทั้งสองชนิด ได้แก่ *Pueraria mirifica* ของประเทศไทย กับ *Pueraria lobata* จากจีนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวัดด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay (DPPH assay) ค่าเฉลี่ยการต้านอนุมูลอิสระของ *P. mirifica* ต่ำกว่า *P. lobata* ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Cervellati *et al.* (2002) ศึกษาพบว่า puerarin ที่พบใน *P. lobata* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อวัดด้วยวิธี Briggs-Rauscher reaction และ Guerra *et al.* (2000) ศึกษาเปรียบเทียบ puerarin จากสารสกัดสมุนไพรจีน *P. lobata* กับ Ge-gen (*Radix puerariae*) พบว่า puerarin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า Ge-gen สายพันธ์์ สวิสค์ส์รี และคณะ (2547) พบว่า คูเมสโตรล (coumestrol) เป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ที่ยับยั้งการเกิดกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน ที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง และหลอดเลือดหัวใจตีบได้ นอกจากนี้สารสกัดกวาวเครือขาวยังสามารถป้องกันเซลล์สมองตาย ที่เป็นผลมาจากการได้รับสารอนุมูลอิสระ และสารที่เป็นพิษ

ต่อระบบประสาท เช่น กลูตาเมต (glutamate) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร genistein ซึ่งเป็นสารกลุ่ม isoflavones โดยเป็นการเปรียบเทียบกับ trolox ด้วยวิธี electron spin resonance spectroscopy (ESR) วิธี ferric-reducing ability of plasma assay (FRAP) และวิธี trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) พบว่า genistein มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (สายัณห์ สวัสดิ์ศรี และคณะ, 2547)

2.8 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

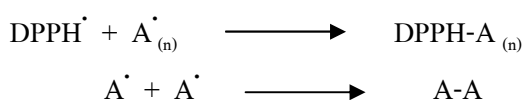
ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระได้รับความสนใจและมีการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ในการเสริมสุขภาพป้องกันและรักษาโรคต่างๆมากมาย เนื่องจากเชื่อว่าสามารถลดปฏิกิริยาออกซิเดชันและต้านการเกิดอนุมูลอิสระได้ (Molyneux, 2004) ได้มีการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต่างๆ เพื่อประเมินประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ หากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยเช่นกัน วิธีที่นิยมใช้ในการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น DPPH assay, oxygen radical absorbance capacity (ORAC), ABTS assay และ low density lipoprotein (LDL) oxidation แบบ *in vitro* เป็นต้น

2.8.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

DPPH free radical scavenging assay เป็นวิธีที่ใช้ในการวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้หลักการว่า สารอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm (สีม่วง) เมื่อผสม DPPH[•] และสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบ (AH) ในหลอดทดลอง เกิดปฏิกิริยากันดังสมการนี้



อนุมูลอิสระใหม่ที่เกิดขึ้น (A[•]) จะทำปฏิกิริยาต่อไป (radical-radical interaction) โดยกระบวนการ radical disproportionation จนได้เป็นโมเลกุลที่มีความคงตัว (A-A) ดังสมการข้างล่างนี้



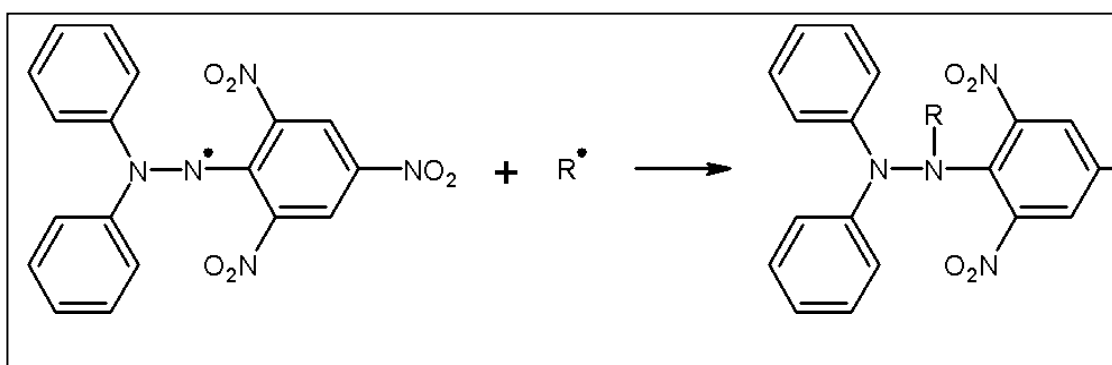
เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้รับโปรตอนก็จะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง สูตรโครงสร้างแสดงในภาพที่ 2.7 ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ดังนั้นการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH[•] จึงเป็นดัชนีที่สามารถนำมาใช้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่ใช้ทดสอบได้ (ทิพรัตน์ หงส์ภักทริรี, 2548 และ Yamasaki, Hashimoto, Kokusenya, Miyamoto and Sato, 1994)

การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอาจคำนวณได้เป็นเปอร์เซ็นต์ (Miliauskas *et al.*, 2003) ดังสมการนี้

$$\% \text{ Inhibition} = (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{DPPH}} \times 100$$

$$A_{\text{DPPH}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 nm}$$

$$A_{\text{sample}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสง DPPH}^{\bullet} \text{ เมื่อบ่มกับสารที่นำมาทดสอบ ที่ความยาวคลื่น 517 nm}$$



ภาพที่ 2.7 กระบวนการ radical disproportionation ของ DPPH

[จาก [http://www.nl.wikipedia.org/wiki/Radicaal_\(scheikunde\)](http://www.nl.wikipedia.org/wiki/Radicaal_(scheikunde))]

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระยังอาจคำนวณได้จากการหาค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 % (IC_{50}) ทำได้โดยนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ในแต่ละความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของการดูดกลืนแสงของ DPPH กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ 50 % หรือรายงานในรูปของค่า 50 effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50 % วิธี

DPPH มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และมี reproducibility สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเลือดได้เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็น alcohol ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ (ทิพรรัตน์ หงส์ภัทรศิริ, 2548; Molyneux, 2004)

อริยา เรื่องจักรเพ็ชร และคณะบุลย์ สัจจอนันตกุล (2550) ได้ทำการทดลองเรื่องผลอายุการเก็บเกี่ยวมะกอกน้ำต่อปริมาณ phenolic isoflavonoid และกิจกรรมสารต้านออกซิเดชันพบว่า ที่อายุ 6 เดือน มีปริมาณ phenolic ทั้งหมดมากที่สุด [345.8 mg gallic acid/100 g fresh weight (gFW)] และมีปริมาณ flavonoid มากที่สุด (49.0 mg catechin/100 gFW) เมื่อวิเคราะห์ค่า total antioxidant activity (TAC) จากวิธี ORAC พบว่าที่อายุ 6 เดือนมีค่าสูงสุดเป็น 24.4 μ Mole Trolox ต่อ 100 gFW และค่า antiradical efficiency (AE) จากวิธี DPPH ที่อายุ 6 เดือนมีค่าสูงสุดเช่นกัน คือ มีค่า 0.014 จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ พบว่าค่า TAC มีค่าสหสัมพันธ์สูง ($r=0.997$) กับปริมาณ flavonoid และค่า AE มีค่าสหสัมพันธ์สูง ($r = 0.992$) กับปริมาณ phenolic ทั้งหมด มะกอกน้ำอายุ 6 เดือนหลังติดดอกมีปริมาณ flavonoid phenolic และความสามารถต้านออกซิเดชันมากที่สุดเมื่อเทียบกับอายุการเก็บเกี่ยวอื่น

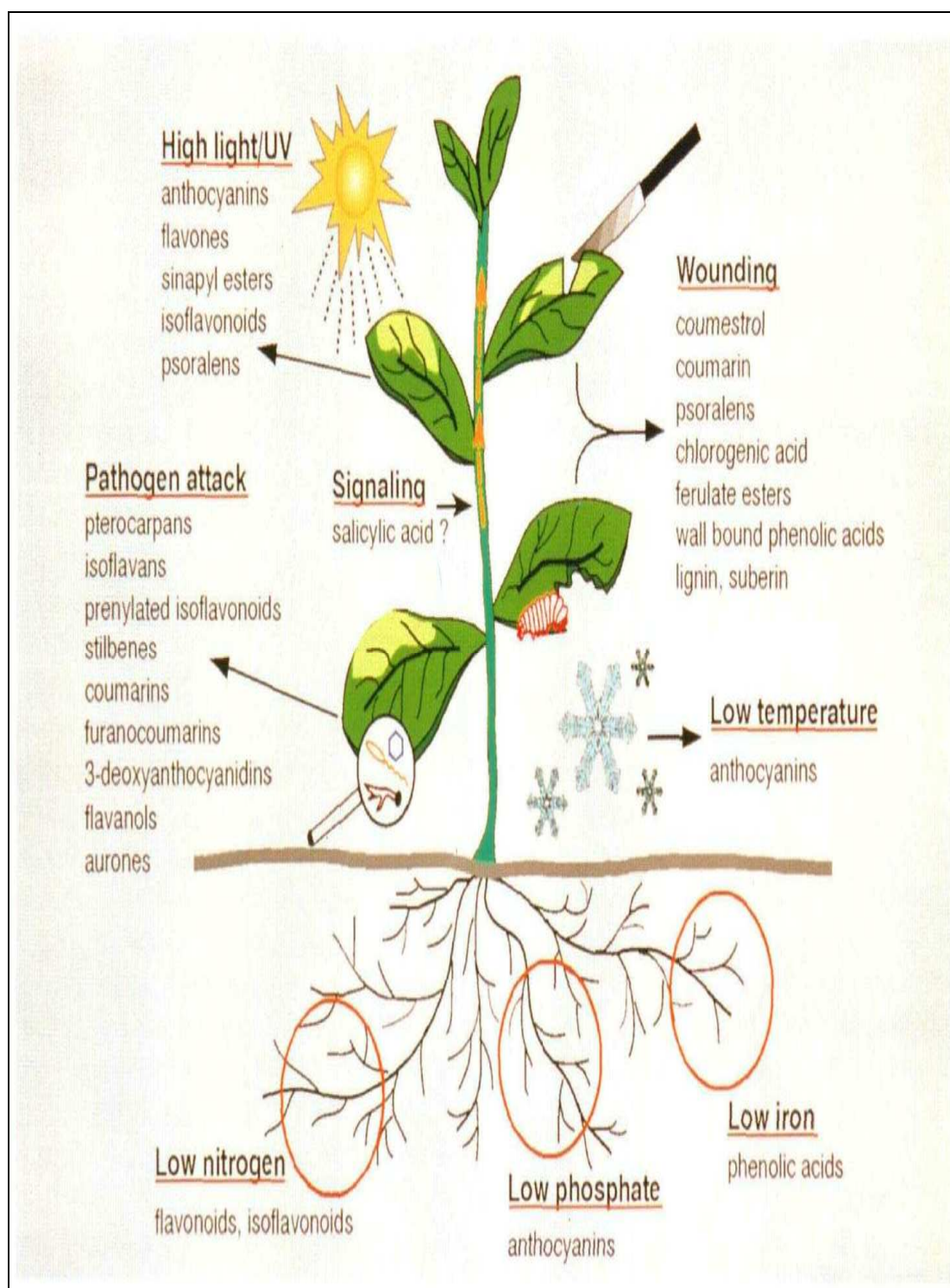
2.9 สารชักนำ

สารชักนำคือ โมเลกุลที่สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิ เช่น phenyl propanoids ที่พบว่า สิ่งที่มีผลต่อสาร isoflavonoid คือ ความเข้มแสง หรือ รังสียูวี การเข้าทำลายของโรคพืช การเกิดบาดแผล และปริมาณธาตุอาหารในดิน (ภาพที่ 2.8) เป็นต้น สารชักนำอาจมาจากภายในหรือภายนอกเซลล์ของพืชก็ได้ การจำแนกจึงขึ้นอยู่กับที่มาของสารชักนำ ได้เป็น 2 แบบ ตามลักษณะของการกำเนิด ได้แก่ปัจจัยจากสิ่งมีชีวิต เช่น สารประกอบไกลโคโปรตีน สารอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และ สารโพลีแซคคาไรด์ ที่ได้จากพืช เช่น เปกติน หรือ เซลลูโลส และที่ได้จาก จุลินทรีย์ เช่น โคลดิน โคลโตซาน หรือ กลูแคน จากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น รังสียูวี เกลือ โลหะหนัก หรือ สารเคมีที่ไปรบกวนการทำงานของเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Heike and Dietrich, 1995)

2.9.1 yeast extract

เป็นสารอินทรีย์ที่สกัดจากยีสต์องค์ประกอบหลักของยีสต์สกัด ได้แก่ ไนโตรเจน โปรตีน กรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพิ่มสารสำคัญในพืช

Park *et al.* (1994) พบว่าการใส่ yeast extract (YE) ความเข้มข้น 1 mg/ml (1,000 ppm) ลงในสารอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Pueraria lobata* สามารถชักนำให้เกิดสารกลุ่ม isoflavonoids เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 2.8 ตัวอย่างของสิ่งชักนำที่มีผลต่อการผลิตสารในวิถีการสังเคราะห์ phenyl propanoids

(Dixon and Paiva, 1995)

Gagnon และ Ibrahim (1997) พบว่าการใส่ YE ความเข้มข้น 1 % (w/v) (10,000 ppm) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของ white lupin ชักนำให้เกิด genistein และ 2'-hydroxy genistein monoprenyls

Chen *et al.* (2001) พบว่าการใช้ YE ในปริมาณ 2 % (v/v) (20,000 ppm) ลงในสารอาหารเหลวสามารถชักนำให้ปริมาณของ phenolic acids (rosmarini acid and lithospermic acid B) และ tanshinones (cryptotanshinone, tanshinone I และ tanshinone IIA) ในเนื้อเยื่อรากของ *Salvia miltiorrhiza* เพิ่มขึ้น

Hrazdina, G. (2003) พบว่าการฉีดพ่น YE ก้นเนื้อเยื่อดันแอปเปิ้ลที่เจริญภายใต้สภาพปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.3 % (3,000 ppm) ทำให้ cinnamyl glucose และ *p*-coumarylquinic acid เพิ่มขึ้น

Wang *et al.* (2004) พบว่าการใส่ YE เพิ่มในสารอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Perilla frutescens* ในปริมาณ 0.5-5% (v/v) (5,000-50,000 ppm) สามารถชักนำการเพิ่มปริมาณ anthocyanin และ triterpenoids (tormentic acid, oleanolic acid และ ursolic acid) ได้

Cheng *et al.* (2005) พบว่าการใส่ YE ความเข้มข้น 106 mg-total sugar /L (106 ppm) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Cistanche deserticola* ชักนำให้เกิดการสะสม phenylethanoid glycosides เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonium lyase (PAL) ถูกกระตุ้นด้วย YE

Sivesid and Seguin (2006) พบว่าการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 g/L (1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm ตามลำดับ) ให้กับ red clover (*Trifolium pretense* L.) ซึ่งปลูกลงกระถางในตู้ควบคุมอุณหภูมิสามารถเพิ่มปริมาณของ genistein, daidzein, formononetin และ biochanin A ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ฉีดพ่น

2.9.2 silver

เป็นธาตุโลหะหนัก ถูกใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในการยืดอายุการปักแจกันของไม้ดอกไม้ประดับและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการชักนำสารสำคัญของพืช

Pitta-Alvarez, Spollansky and Giulietti (2000) พบว่าการใช้ YE และ Ag ในสารอาหารเหลวเพาะเลี้ยง *Brugmansia candida* ความเข้มข้น 0.8 mg/ml (800 ppm) และ 1 mM (107.9 ppm) ตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ scopolamine ได้

Ge and Wu (2005) พบว่าการใช้ YE ความเข้มข้น 100 µg/ml (100 ppm) และ Ag ความเข้มข้น 30 µg/ml (30 ppm) เพิ่มในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของ *Salvia miltiorrhiza* และการใส่ YE และ Ag ร่วมกัน สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ tanshinone เนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) ในวัฏจักร non-mevalonate (MVA)

Yan *et al.* (2006) พบว่าการเพิ่ม YE ความเข้มข้น 200 mg/L (200 ppm) และ Ag ความเข้มข้น 15 μ M (1.62 ppm) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของ *S. miltiorrhiza* และการใส่ YE และ Ag ร่วมกันทำให้เกิดการสะสม rosmarinic acid เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากการทำงานของ เอนไซม์ tyrosine aminotranferase

ตัวอย่างงานวิจัยการใช้สารชักนำเพื่อเพิ่มสารสำคัญในกวาวเครือขาว ได้แก่

ประสาร ฉลาดคิด (2546) พบว่าการฉีดพ่นสารละลายทองแดงให้กับกวาวเครือขาว ทำให้ปริมาณ daidzein และ genistein ในรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวมีปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ความเข้มข้น 300 ppm มีการสะสม daidzein และ genistein ในรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวมากที่สุด สารประกอบทองแดงในรูปของ CuCl_2 , CuSO_4 และ Cu-EDTA ทำให้การสะสม daidzein และ genistein ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

พรทิพย์ จันทรราช (2547) พบว่าการฉีดพ่นกวาวเครือขาวด้วย CuCl_2 1,000 ppm, MnCl_2 1,000 ppm และ FeCl_2 1,000 ppm สามารถชักนำการสะสมสาร comestrol ในกวาวเครือขาว เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการฉีดพ่นด้วย CuCl_2 1,000 ppm ให้ปริมาณ comestrol สูงสุด

วิโรจน์ เชาววิเศษ (2550) พบว่าการฉีดพ่นด้วยสังกะสีที่ความเข้มข้น 0 (ฉีดพ่นด้วย น้ำกลั่น), 50, 100, 200 และ 300 mg/L (0, 50, 100, 200 และ 300 ppm ตามลำดับ) ให้ปริมาณ puerarin เท่ากับ 87.7, 113.0, 129.0, 194.3 และ 146.3 $\mu\text{g/gDW}$ ตามลำดับ และการฉีดพ่นด้วยสังกะสีที่ความเข้มข้น 200 mg/L (200 ppm) ทำให้กวาวเครือขาวมีการสะสม puerarin มากที่สุด

บุญร่วม คิดคำ (2551) พบว่าการใช้ chitosan ที่ความเข้มข้น 1,000 mg/L (1,000 ppm) ร่วมกับ CuCl_2 ที่ความเข้มข้น 200 mg/L (200 ppm) ทำให้ปริมาณของ puerarin และ genistein ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนมีปริมาณ สูงที่สุดและแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมี puerarin เท่ากับ 423 และ 386 $\mu\text{g/gDW}$ และมี genistein เท่ากับ 22.6 และ 22.4 $\mu\text{g/gDW}$

ประโยชน์ของกวาวเครือขาวเกิดจากการมีสารสำคัญอยู่ในส่วนของรากสะสมอาหารที่เป็นส่วนสะสมอาหาร จากการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่าธาตุโลหะหนักบางอย่าง เช่น Fe, Cu, Zn, chitosan, salicylic acid และ CuCl_2 ทำให้กวาวเครือขาวสร้างสารสำคัญมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ AgNO_3 และ YE ทั้งที่เป็นชนิดเดี่ยว ๆ หรือใช้ร่วมกับพืชสมุนไพรเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญได้ ดังนั้นการใช้น่าจะให้ผลดีกับกวาวเครือขาวเช่นกัน และอาจเป็นแนวทางให้เกิดการผลิตเป็นสารชักนำสำเร็จรูปขึ้นมาอีกทางหนึ่งให้ผู้ปลูกกวาวเครือหรือสมุนไพรที่มีสารสำคัญคล้าย ๆ กันสามารถนำมาใช้ได้

2.10 อิทธิพลของสภาพแวดล้อม

โดยทั่วไปกวาวเครือขาวจะออกดอกในระยะผลัดใบ คือในช่วงอายุ 16-18 เดือนหลังปลูกด้วยเมล็ด โดยจะเริ่มทยอยแทงช่อดอกในช่วงต้นเดือนธันวาคมถึงเดือนมีนาคม (กรมวิชาการเกษตร, 2548) แต่พบว่ากวาวเครือขาวที่เก็บเมล็ดจากจังหวัดเพชรบุรีมาปลูกที่อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแทงช่อดอกและติดฝักได้ภายในระยะ 7-8 เดือนหลังปลูกด้วยเมล็ด (ทิพวัลย์ สุขุมลนันทน์, 2547) ประสาร ฉลาดคิด (2546) รายงานว่าเครือเถาของกวาวเครือขาวที่ขึ้นในป่าธรรมชาติที่อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา มีการเจริญเติบโตเร็วมากในช่วงของการเจริญในรอบ 1 ปี (phenological cycle) โดยมีระยะแตกเครือเถาและใบอ่อนเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม ระยะการเจริญและพัฒนาของเครือเถาและใบเริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม ระยะผลัดใบเริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์ ระยะออกดอกเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งช่วงแสงมีผลต่อการออกดอก ทั้งนี้กวาวเครือขาวจะออกดอกเมื่อได้รับแสงอย่างน้อย 8 ชั่วโมงครั้งต่อวัน และระยะการติดฝักจนเจริญและพัฒนาเป็นเมล็ดแก่ในเดือนเมษายน

2.11 รายการอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. (2548). กวาวเครือขาว-พืชมหัศจรรย์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.
- จรรยา แสงอรุณ ยุทธนา สมิตะสิริ สุศักดิ์ พ่วงบางโพ และ ไมตรี สุทธิจิตต์. (2545). รายงานการวิจัย การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือ. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. 55 หน้า.
- จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ สุจิรัตน์ สวงนรังศิริกุล ยุทธนา สมิตะสิริ สุรพจน์วงศ์ใหญ่ สิริพันธุ์ ศรีจักรวาล และ สุชน สุวรรณบุตร. (2548). การคัดเลือกสายพันธุ์กวาวเครือขาวโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย. ว. วิทย. กษ. 36(5-6)(พิเศษ): 919-922.
- จรัญ ดิษฐไชยวงศ์, สุจิรัตน์ สวงนรังศิริกุล, ยุทธนา สมิตะสิริ, สุรพจน์ วงศ์ใหญ่, สิริพันธุ์ ศรีจักรวาล และสุชน สุวรรณบุตร. (2550). การจำแนกและคัดเลือกพันธุ์กวาวเครือขาว. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตกวาวเครือขาว. กองทุนสนับสนุนงานวิจัยกรมวิชาการเกษตร. 1-58.
- จักรพงษ์ ไพบูลย์. (2542). สารต้านอนุมูลอิสระ. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thaiclinic.com/antioxidant.html>
- จักรพันธ์ วนิชกุล และ สุจิตรา จางตระกูล. (2548). การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ โดยใช้เอเอฟแอลพีเอ็มอาร์เกอร์. รายงานการประชุม ความ

- หลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ และสัตว์ป่า “ความก้าวหน้าของผลงานวิจัย และกิจกรรม ปี 2548” ณ โรงแรมริเจนท์ ชะอำ เพชรบุรี วันที่ 21-24 สิงหาคม 2548. 342-351.
- ชวลิต นิยมธรรม. (2538). กวาวเครือ. อนุกรมวิธาน ก. ราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพฯ: เพื่อนพิมพ์. 495 หน้า.
- ทรงพล สมศรี และสุคนธ์ทิพย์ บุษบากรกุล. (2549). การจำแนกพันธุ์และเพศมะละกอโดยใช้เทคนิค DNA Amplification Fingerprinting (DAF). วารสารวิชาการเกษตร. 24(3):
- ทิพรัตน์ หงส์ภัทรศิริ. (2548). รายงานวิจัย เรื่องการศึกษาและพัฒนาคุณสมบัติในกำจัดอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ไวน์ผลไม้ โดยใช้สมุนไพรและเครื่องเทศ. กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.
- ทิพวัลย์ สุกุมลันนันทน์. (2547). รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตกวาวเครือขาว กิจกรรมจำแนกและคัดเลือกพันธุ์ เรื่อง ลักษณะทางพฤกษศาสตร์. กรมวิชาการเกษตร. 18 หน้า.
- ธิปพาวิญ จำปาพันธ์ วรพงษ์ กิจดำรงธรรม จีระเดช มโนสร้อย และ อรัญญา มโนสร้อย. (2551). การพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากกวาวเครือขาวในอนุภาคขนาดเล็กเพื่อใช้ทางผิวหนัง. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.irpus.org/project_fkle/2549_2007-04-12_I14902009.pdf
- นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชญา เจนวิถีสุข. (2545). แอนติออกซิแดนซ์: สารต้านมะเร็งในผักสมุนไพรไทย. เชียงใหม่: นพบุรี. 56 หน้า.
- บุญร่วม คิดคำ. (2551). ผลของสารชักนำต่อผลผลิตและปริมาณไอโซฟลาโวนอย์ของหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] และฤทธิ์ของสารในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรท (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ประสาร ฉลาดคิด. (2546). อิทธิพลของสภาพแวดล้อมและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การออกดอก การติดฝักและเมล็ด และการสะสมสาร daidzein และ genistein ในหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham]. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ปวีณา ช่วงทิพย์. (2546). ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันของพืชผักพื้นบ้าน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาสรีรวิทยาทางการแพทย์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

- พรทิพย์ จันทร์ราช. (2547). การออกดอก การติดฝักและการสะสมสาร Coumestrol ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* Grah var. *mirifica*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธ์. (2538). เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี **Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)** ในการตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ **Isozyme pattern และ RAPD**. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการระหว่างวันที่ 24-28 กรกฎาคม 2538 ศูนย์ปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลอง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (วิทยาเขตกำแพงแสน). นครปฐม.
- มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. ส่วนบริการงานวิจัย. (2551). **บทคัดย่อ**. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://reg.mfu.ac.th/research/menu_left/43-46_1.html
- ยุคลธร สถาปนศิริ. (2542). การวิเคราะห์จีโนมของพืชบางชนิดในสกุล *Garcinia* โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาพันธุศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัฐกร ศรีสุทธิ และสร้อยยา ณ ลำปาง. (2550). ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค ISSR. *วารสารเกษตร* 23(2): 89-96.
- รุจน์ สุทธิศรี. (2542). **บทความกวาวเครือขาว**. ภาควิชาเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วิโรจน์ เชาว์วิเศษ. (2550). ผลของสังกะสีต่อการสะสม puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy shaw et. suvatabandhu) niyomdham] และผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการคลายตัวของหลอดเลือดหนูขาว (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- วุฒิ วุฒิชรรมเวช. (2540). **สารานุกรมสมุนไพรไทย**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล สุภาพ สุนทรนนท์ และธีรวุฒิ วงศ์วีรัตน์. (2548ก). การจำแนกพันธุ์ทุเรียนด้วย Inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *ว.วิทย์.เกษตร*. 36, 5-6(พิเศษ): 262-264.
- ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล สุภาพ สุนทรนนท์ สุชาชีพ สุภเกษตร และธีรวุฒิ วงศ์วีรัตน์. (2548ข). การใช้ ISSR marker เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะในประเทศไทย. *ว.วิทย์.เกษตร*. 36, 5-6 (พิเศษ): หน้า 265-267.
- สายัณห์ สวัสดิ์ศรี. (2547). กวาวเครือขาวช่วยป้องกันเซลล์สมองบาดเจ็บใน AD model. ใน เอกสารประกอบการสัมมนา เรื่อง การเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพร. 6 กันยายน 2547. โดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ณ โรงแรมมารวย การ์เด็น. กรุงเทพฯ.

- สุชาดา สุขหรั่ง. (2548). ไลพอฟิตีเอินเอ: หลักฐานทางพันธุกรรมในการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 19(1): 75-85.
- หลวงอนุสารสุนทร. (2474). ตำรายาหัวกวาวเครือ. เชียงใหม่: โรงพิมพ์อุปติพงษ์.
- อริยา เรื่องจักรเพ็ชร และธนະบุญย์ สัจจาอนันตกุล. (2550). ผลอายุการเก็บเกี่ยวมะกอกน้ำต่อปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และกิจกรรมสารต้านออกซิเดชัน. ว. วิทย์. กษ. 38(5) พิเศษ: 127-130.
- อรัญญา มโนสร้อย สมศักดิ์ ทะระกา พิสิษฐ์ ใจนถีย์ และ จิระเดช มโนสร้อย. (2551). การเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญในหัวกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*, Airy Shaw Suvatubhandhu) และกวาวเครือแดง (*Butea superba*, Roxb.) ที่มีช่วงอายุต่าง ๆ จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.scisoc.or.th/stt/28/web/content/C_03/C02.htm
- Awad, A.B., Chinnam, M., Fink, C.S. and Bradford, P.G. (2007). β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. **Phytomedicine**. 14: 747-754.
- Caetano, A.G., Bassm. B.J. and Gresshoff, P.M. (1991). DNA Amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio/ Technology**. 9: 553-557.
- Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, M.C., and Speroni, E. (2002). Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50(26): 7504-7509.
- Chen, H., Chen, F., Chiu, F.C.K. and Lo, C.M.Y. (2001). The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. **Enzyme and Microbial Technology**. 28: 100-105.
- Cheng, X.Y., Guo, B., Zhou, H.Y., Ni, W. and Liu, C.Z. (2005). Repeated elicitation enhances phenylethanoid glycosides accumulation in cell suspension cultures of *Cistanche deserticola*. **Biochemical Engineering Journal**. 24: 203-207.
- Cherdshewasart, W., Kitsamai, Y. and Malaivijitnond, S. (2007). Estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* evaluated by vaginal cornification assay. **Journal of Reproduction and Development**. 53: 385-393.
- Cherdshewasart, W. and Sujit, W. (2008a). Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Puerria lobata* tubers. **Phytomedicine**. 15(1-2): 38-43.

- Cherdshewasart, W., Traisup, V. and Picha, P. (2008b). Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation. **Journal of Reproduction and Development**. 54: 63-67.
- Ditchaiwong, C., Sakuanrungrasirikul, S., Smitasiri, Y., Wongtai, S., Srijugawan, S. and Suwanbutr, S. (2005). Clone Selection of *Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabanhu by Using Molecular Markers. **Agricultural Sci.J.** 36 5-6 (Suppl): 919-966.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**. 7: 1085-1097.
- Gagnon, H. and Ibrahim, R. (1997). Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. **Phytochemistry**. 44(8): 1463-1467.
- Ge, X. and Wu, J. (2005). Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor. **Plant Science**. 168: 487-491.
- Guerra, M.C., Speroni, E., Broccoli, M., Cangini, M., Pasini, P., Minghetti, A., Crespi-Perellino, N., Mirasoli, M., Cantelli-Forti, G., and Paolini, M. (2000). Comparison between Chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin Antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. **Life Sciences**. 67(24): 2997-3006.
- Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. (1994). **Antioxidants in nutrition, health, and disease**. Oxford University Press.
- Hrazdina, G. (2003). Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (Liberty) apple tissue to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*. **Phytochemistry**. 64: 485-492.
- Heike, D. and Dietrich, K. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme Microb Tech**. 17: 647-684.
- Ingham, J.L., Tahara, S. and Dziedzic, S.Z. (1994). A Chemical Investigation of *Pueraria mirifica* Roots. **Z. Naturforsch.** 41 c: 403-408.
- Jones, H.E.H. and Pope, G.S. (1960). A study of the action of microestrogen and other oestrogens on the reproductive tract of the immature female mouse. **Journal of Endocrinology**. 20: 229-235.
- Li, M.Q., Sheng, X. and Shao, X.G. (2003). Separation and determination of *Pueraria lobata*

- isoflavonoid extract by reverse phase high performance liquid chromatography. **Fenxi Huaxue**. 31: 178-180.
- Mhameed, S., Sharon, D., Hillel, J., Lahav, E., Kaufman, D. and Lavi, U. (1996). Level of Heterozygosity and Mode of Inheritance of Variable Number of Tandem Repeat Loci in Avocado. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 121(5):778-782.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Beek, T.A. (2003). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**. 85(2): 231-237.
- Ming-en X., Shang-zhi X., Yong-hong S., Xiao-xiang Z., Yang O. and Chen G. (2005). The study of antimetabolic syndrome effect of puerarin *in vitro*. **Life Sciences**. 77:3183-3196.
- Park, H.H., Hakamatsuka, T., Sankawa, U. and Ebizuka, Y. (1994). Rapid metabolism of isoflavonoids in elicitor-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*. **Phytochemistry**. 38(2): 373-380.
- Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C. and Giulietti, M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology**. 26: 252-258.
- Stadbauer, W. and Kapper, T. (1993). Simple and Effective Approaches to Coumestans and Azacoumestans. **Heterocycles**. 35(2): 1425-1440.
- Sivesind, E and Seguin, P. (2006). Effects of Foliar Application of Elicitors on Red Clover Isoflavone Content. **J. Agronomy & Crop Science**. 192: 50-54.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., and Bonierbale, M.W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Biotechnology**. 7:257-264.
- Wade, H.K., Sohal, A.K. and Jenkins, G.I. (2003). Arabidopsis ICX1 is a negative regulator of several pathways regulating flavonoid biosynthesis genes. **Plant Physiol**. 131: 707-715.
- Wang, J.W., Xia, Z.H., Chu, J.H. and Tan, R.X. (2004). Simultaneous production of anthocyanin and triterpenoids in suspension cultures of *Perilla frutescens*. **Enzyme and Microbial Technology**. 34: 651-656.
- Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T. (1994). Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. **Chem. Pharm.** 42(8): 1663-1665.
- Yan, L.P., Chan, S.W., Chan, A.S.C., Chen, S.L., Ma, X.J. and Xu, H.X. (2006). Puerarin decreases

serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Life Sciences**. 79: 324-330.

Yan, Q., Shi, M., Ng, J and Wu, J.Y. (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Plant Science**. 170: 853-858.

Yu, C., Xu, H., Huang, G., Chen, T., Liu, G., Chai, N., Ji, Y., Wang, S., Dai, Y. and Yuan, S. (2009). Permeabilization of *Microbacterium oxylans* shifts the conversion of puerarin from puerarin-7-*O*-glucoside to puerarin-7-*O*-fructoside. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 86(3): 863-870.

บทที่ 3

การจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวโดยใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์ และเทคนิค ISSR-Touchdown PCR

บทคัดย่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้รวบรวมกวางเครือขาว โดยเก็บเมล็ดของต้นที่รวบรวมมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ วางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ สุ่มซ้ำละ 12 ต้น จำนวน 36 สายต้น ใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพฤกษศาสตร์จำนวน 7 ลักษณะ วิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มโดยใช้ principle component analysis (PCA) พบว่า กวางเครือขาวมีการแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายต้นที่ 34 มีลักษณะเด่นคือ ใบมีขนาดใบเล็ก กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 23 สายต้น มีลักษณะเด่นคือ ใบรูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเรียวแหลม และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 12 สายต้น ลักษณะเด่นคือ ใบรูปไข่ ฐานใบมน และปลายใบเป็นติ่งแหลม จากการจำแนกด้วย ISSR-Touchdown PCR ใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 41 ไพรเมอร์ พบว่าตรวจจับแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 355 ตำแหน่ง คิดเป็น 8.66 ตำแหน่งต่อไพรเมอร์ มีขนาดของแถบประมาณ 280 bp ถึง 1,550 bp ในจำนวนนี้มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic) จำนวน 293 ตำแหน่ง คิดเป็น 82.54% ของทั้งหมด และเป็นตำแหน่งที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic) จำนวน 62 ตำแหน่ง คิดเป็น 17.46% มีค่า polymorphism information content (PIC) ระหว่าง 0.0315-0.9779 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 0.4779 และมีค่า No. of effective alleles per locus (N_e) ระหว่าง 1.1250-1.8541 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 1.5544 อัลลีลต่อโลกัส ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (genetic similarity : GS) ของตัวอย่างทั้งหมด พบว่า มีค่าระหว่าง 0.50-0.86 โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.77 ที่ระดับ GS เท่ากับ 0.56 แยกได้ 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ 34 และสายต้นที่ 7 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยต้นที่เหลือ อีก 34 สายต้น ซึ่งกลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่ GS เท่ากับ 0.69 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่า ความแปรปรวนที่พบน่าจะเกิดจากภายในกลุ่ม ทุกต้นมีพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน และคาดว่าอาจเกิดจาก 5 แหล่งพันธุกรรมจากเมล็ดภายในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จากการทดลองนี้พบว่าการใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์กวางเครือขาวได้ และให้ผลสอดคล้องกับความแตกต่างของลักษณะภายนอก

3.1 บทนำ

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันมากในรูปแบบของยา อาหารเสริม และเครื่องสำอาง เนื่องจากในหัวกวาวเครือขาวมีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในเพศหญิงสะสมอยู่ คือ phytoestrogen ได้แก่ miroestrol, deoxymiroestrol, daidzein, genistein, daizin, genistin, puerarin, mirificin, kwakhurin เป็นต้น (Samittasiri, 1998) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคของสุขภาพสตรีวัยหมดประจำเดือน (Manonai *et al.* 2007) ในประเทศไทยกวาวเครือขาวมักพบในบริเวณพื้นที่ราบเชิงเขา และพื้นที่ลาดชันของเทือกเขาต่างๆ เช่นที่จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ เชียงใหม่ ตาก เลย ลำปาง และสระบุรี (จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ และคณะ, 2550) กวาวเครือขาวมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปดังนี้

ลำต้น (stems) เป็นไม้พุ่มหรือเลื้อยต้นไม้ใหญ่ เป็นไม้ผลัดใบ มีอายุหลายปี มีลักษณะลำต้นเกลี้ยง กิ่งอ่อน ยอดอ่อน ก้านช่อดอก และกลีบเลี้ยงมีขนสั้น ๆ สีน้ำตาลอ่อน (Kashemsanta *et al.*, 1952 และ ชวลิต นิยมธรรม, 2538)

ใบ (leaves) เป็นใบประกอบแบบขนนกมีใบย่อย 3 ใบเรียงสลับ ก้านใบยาวประมาณ 8.5–32 cm (ทิพวัลย์ สุขุมลันนันทน์, 2547) โคนก้านใบและปลายยอดสีเขียวถึงสีม่วง ใบย่อยที่โคนรูปไข่หรือไข่กลับ กว้างตั้งแต่ 6-16 cm ยาว 7-24 cm ก้านใบย่อยยาว 0.3–0.7 cm โคนใบรูปกลม หรือมน ขอบใบเรียบและหยัก ปลายใบแหลมหรือเรียวแหลม แกนกลางยาว 1.5–5.0 cm เนื้อใบบางถึงหนา พบขนสั้นประปราย เส้นแขนงใบข้างละ 5-7 เส้น คู่แรกออกจากโคนใบ หูใบย่อยเรียวแคบ กว้าง 1 mm ยาว 5 mm พบรูปร่างของใบแตกต่างกันไป 4 แบบ (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

ดอก (flowers) มีลักษณะเป็นช่อเดี่ยว และบางช่อดอกมีช่อดอกแยกออกตามกิ่งดอก ตั้งแต่โคนถึงกลางช่อดอกอีกประมาณ 3-5 ช่อดอก โดยทั่วไปดอกจะออกระหว่างต้นกับกิ่ง (หรือระหว่างใบกับต้น) ประมาณ 3-5 ช่อต่อข้อ (node) โดยช่อดอกจะออกเกือบทุกข้อ ช่อดอกปกติมีความยาวตั้งแต่ 20 cm ถึง 150 cm ช่อดอกเป็นแบบกระจะ (raceme) ดอกย่อยมีลักษณะคล้ายดอกถั่วมีสีน้ำเงินอมม่วง ม่วงอ่อน หรือสีขาวอมม่วง ออกดอกเป็นกระจุก ๆ ละ 2-5 ดอก มีจำนวนดอกย่อยในแต่ละช่อดอก ตั้งแต่ 30 ถึงมากกว่า 200 ดอก ขึ้นอยู่กับขนาดของต้น ก้านช่อดอกย่อยยาว 0.2-0.4 cm สีน้ำตาลปนม่วง มีกลีบดอก 5 กลีบ กลีบบน 1 กลีบ (ค่อนข้างใหญ่) กลีบคู่กลางและคู่ล่างเล็กกว่า สีน้ำเงินอมม่วง ตรงกลางกลีบสีขาว ลักษณะคล้ายสีเหลือง มีเกสรตัวผู้ 10-12 อันติดกัน เกสรตัวเมียหรือรังไข่อยู่ภายในวงเกสรตัวผู้ (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

ฝักและเมล็ด (fruits and seeds) ฝักมีลักษณะเป็นฝักแบนรูปขอบขนานสีเขียว และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มเมื่อแก่ ผิวมีขนประปราย (var. *mirifica*) ถึงเกลี้ยง (var. *candollei*) ขนาดของฝักมีขน ยาวประมาณ 3.5-8.5 cm กว้าง 0.5-0.7 cm จำนวนเมล็ดต่อฝัก ประมาณ 2-6 เมล็ดลักษณะ

ของเมล็ดก่อนข้างด้าน hilum มีขนาดเล็ก ส่วนฝักไม่มีขน ฝักเมื่อแก่มีสีน้ำตาล รูปร่างของฝักแบน ผิวของฝักมีรอยย่นก่อนข้างชัดเจน ผิวเกลี้ยง ขนาดของฝักยาวประมาณ 3.10-12.5 cm กว้าง 0.5-0.9 cm จำนวนเมล็ดต่อฝักเท่ากับ 3-7 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะค่อนข้างกลม สีน้ำตาล มีลวดลาย ผิวด้าน (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

หัว หรือรากสะสมอาหาร (tuberous roots) หัวใต้ดินค่อนข้างกลม มีลักษณะเป็นรากสะสมอาหาร (tuberous roots) มีขนาดใหญ่และคอดยาวเป็นตอนๆ ต่อเนื่องกัน ส่วนที่กลมมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 10-70 cm ส่วนที่คอดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 cm เปลือกด้านนอกมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้มและมีความแข็ง ความหนาของเปลือกประมาณ 2-4 mm เนื้อภายในมีสีขาวขุ่น (ชวลิต นิยมธรรม, 2538)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์กวางเครือขาวพบที่มีความแปรปรวนหลากหลาย มีข้อมูลทางด้านนี้น้อย และยังไม่มียางานการจัดจำแนกลักษณะพันธุ์ จึงได้นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยการใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือ พีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) เทคนิคที่ใช้หลักการของ PCR มีหลายเทคนิคที่นำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชอย่างได้ผล เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter Simple Sequences Repeat (ISSR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), Simple Sequence Repeat (SSR)

เครื่องหมายโมเลกุลถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวโดย จริญญา ไชยวงศ์ และคณะ (2550) และ Dithachaiyawong *et al.* (2005) ได้ใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ในการจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวจากแหล่งพันธุ์ต่างๆ 7 แหล่ง ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เชียงใหม่ ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เลย ลำปาง และสระบุรี พบว่าการจำแนกโดยใช้ RAPD แยกได้ละเอียดกว่าลักษณะทางพฤกษศาสตร์ซึ่งมีความแตกต่างสอดคล้องกับแหล่งกำเนิด Jamjanta (1996) ตรวจสอบชนิดของพันธุ์กวาง 5 ชนิด โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์และเทคนิค RAPD พบว่าแบบแผนของไอโซไซม์ที่บ่งบอกความแตกต่างของกวางเครือได้ดีที่สุดได้แก่ esterase และ peroxidase และพบว่าโครงสร้างของ dendrogram ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ สอดคล้องกับ dendrogram ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD และ Sittiphrom (2005) ใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการจำแนกกวางเครือ (*Pueraria spp.*) ได้โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ORX01F1₃₉₆/ORX01F1₃₉₆

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค ISSR ในการจำแนกพันธุ์กวางเครือขาว เนื่องจากเทคนิค ISSR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ในระดับชนิด (species) ของสิ่งมีชีวิตจนถึงภายในชนิด ใช้หลักการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยไพรเมอร์

ที่ใช้จะจับกับส่วนที่เป็นลำดับเบสซ้ำเป็นชุดๆ ของ microsatellite ซึ่งจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าเทคนิค RAPD นอกจากนี้การใช้ ISSR ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอใดๆของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน ดังนั้นจึงง่ายกว่าเทคนิคอื่นๆ (Wolfe *et al.* 1998) อีกทั้งยังให้แถบที่มีความแตกต่างกันมากและทำซ้ำได้ วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน และสามารถตรวจสอบพันธุกรรมของพืชได้หลายชนิด เช่น Mendes *et al.* (2009) ประสบความสำเร็จในการใช้เทคนิค ISSR การจำแนกพืชสมุนไพร *Angelica lignescens* และ *Melanoselinum decipiens*, Sakuanrungrasirikul *et al.* (2005a, 2005b) ได้ใช้เทคนิค ISSR ในการจำแนกพันธุ์ทุเรียน และพันธุ์เงาะ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อการจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวโดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR ในการจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลาย ซึ่งรวบรวมไว้ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ชนิดของพืช : กวางเครือขาว ในแปลงของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส.) รวมทั้งสิ้น 36 สายต้น (ภาพที่ 3.1) ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดจากต้นที่ซื้อต้นพันธุ์มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

3.2.2 การจำแนกลักษณะพฤกษศาสตร์ :

3.2.2.1 การจำแนกลักษณะพฤกษศาสตร์ตาม จรัญ คิษฐไชยวงศ์ และคณะ (2550) ประกอบด้วย 7 ลักษณะ ได้แก่

3.2.2.1.1 สีด้านหลังใบ คำนวณจากค่า L^* , a^* , b^* และประยุกต์วิธีการเก็บข้อมูลจาก cowpea descriptions (IBPGR, 1983) โดยค่า L^* คือ ทิศทางสี ในด้านความสว่าง เริ่มจากมืด (สีดำ) $L^*=0$ ถึง สว่าง (สีขาว) $L^*=100$, ค่า a^* คือ ทิศทางสี เริ่มจากสีแดง ($+a$) ถึง สีเขียว ($-a$), ค่า b^* คือ ทิศทางสี เริ่มจากสีเหลือง ($+b$) ถึง สีน้ำเงิน ($-b$) ด้วยเครื่อง Minolta CR-300 ตามระบบ The Hunter L, a, b Color Space (DeMan, 1999) และค่า x และ $y =$ ค่าสีตามระบบ CIE chromaticity diagram (DeMan, 1999)

3.2.2.1.2 ลักษณะใบ ได้แก่ รูปร่างใบ [ovate (ใบรูปไข่), elliptic (ใบรูปรี)], ฐานใบ [obtuse (ฐานใบมน), acute (ฐานใบแหลม)], ปลายใบ [cuspidate (ปลายใบเป็นดิ่งแหลม)] และ acuminate (ปลายใบเรียวแหลม)

3.2.2.1.3 ขนบนส่วนของลำต้น

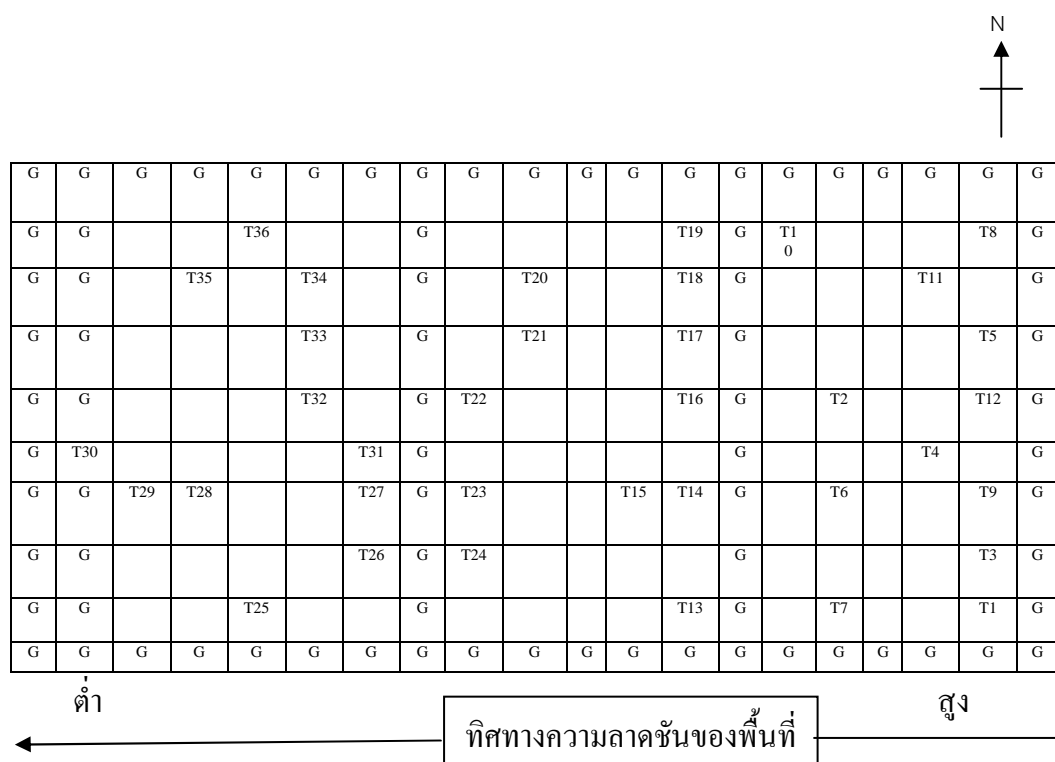
3.2.2.1.4 ขนที่ฝัก

3.2.2.1.5 สีของดอก คำนวณจากค่า L^* , a^* , b^* และประยุกต์วิธีการเก็บข้อมูลจาก cowpea descriptions (IBPGR, 1983) เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1.1

3.2.2.1.6 ขนาดของใบย่อยส่วนปลาย โดยการวัดความยาวจากส่วนยอดใบ ถึงฐานใบ และความกว้างโดยการวัดส่วนที่กว้างที่สุดของใบ

3.2.2.1.7 ความยาวก้านช่อดอก

3.2.2.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ได้แก่ สีด้านหลังใบ ลักษณะใบ ขนบนส่วนของลำต้น ขนที่ฝัก สีของดอก ขนาดของใบ และความยาวก้านช่อดอก มาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างต้น โดยต้นที่มีลักษณะเดียวกันให้คะแนนเป็น 1 หรือ 0 เมื่อปรากฏหรือไม่ปรากฏลักษณะที่ตำแหน่งเดียวกันคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม NTSYS pc v.21 (Biostatistics, Inc.) และ Winboot program (Yap and Nelson, 1996) ซึ่งกำหนดการวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำของการสุ่มวิเคราะห์ของการสร้าง Consensus tree วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Principle component analysis (PCA) และหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากร (Nei, 1972) ด้วยโปรแกรม POPGENE V1.31 (Yeh, Yang and Boyle 1999)



ภาพที่ 3.1 ฟังแปลงทดลองกวางเครือขาวที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (T1-T36=สายต้นที่ 1-36, G=แนวป้องกัน)

3.2.3 การจำแนกด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR : ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

3.2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนโดยประยุกต์จากวิธีการของ Li and Midmore (1999) โดยบดใบพืชในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด ตักผงตัวอย่างใส่ลงในหลอดไมโครพิวส์ (microcentrifuge tube) ที่มีบัฟเฟอร์สำหรับสกัด (extraction buffer : 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris pH 8.0, 0.02 M EDTA pH 8.0, 1% PVP และ 1% β -mercapto ethanol) 500 μ l นำไปอุ่นที่ 65°C 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,2000 รอบต่อนาที (16,500 g) นาน 5 นาที ดูดส่วนในหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย chloroform : isoamyl (24 : 1) ปริมาตร 1 เท่า เขย่า และปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนในหลอดไมโครพิวส์ใหม่ นำไปอุ่นที่ 55°C 30 นาที แล้วแช่เย็นที่ 4°C 5 นาที เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่ากลับหลอดไปมาเบาๆ จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอ แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที (16,500 g) นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% 1 ครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 180 μ l เติม 5 M NaCl 20 μ l และเอทานอล 95% 400 μ l พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ จนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% อีก 2 ครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติมสารละลาย TE ที่มี RNase (10 mg/ml) ปริมาตร 40 μ l เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C

จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ 5 μ l 6X Loading dye 2 μ l ที่มี 1X Vistragreen® (Amersham, USA) และ dH₂O 5 μ l รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12 μ l จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ลงในร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง และหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, EU) ลงในร่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานลงบนอะกาโรสเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นานประมาณ 50-60 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documentation System (Vilber Lourmat, France) และบันทึกภาพที่ได้

3.2.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิควิธี ISSS-Touchdown PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ตามวิธีการของ Sakuanrungrasirikul, *et al.* (2005a) ตามสภาวะดังนี้ สารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางจนเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา (10-30 ng) 3.5 μ l, 10x Taq buffer with (NH₄)₂SO₄ (Fermentas) 1.5 μ l, 25 mM MgCl₂ 0.9 μ l, 20 mM dNTPs 0.9 μ l, 5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 0.187 μ l, dH₂O 6.263 μ l และ 20 μ M ISSR 0.75 μ l ในปริมาตรรวม 15 μ l จำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ 41 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.5) ใช้

โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่อง Thermal cycler (PE Applied Biosystem, PCR System 9700) ดังนี้ ใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย touchdown PCR จำนวน 5 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที, 52°C นาน 1 นาที, 72°C นาน 1 นาที โดยอุณหภูมิลดลง 1°C ทุก 1 รอบ จากนั้นตามด้วย PCR ปกติจำนวน 30 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C 1 นาที, 48°C 1 นาที, 72°C 1 นาที และสุดท้ายการตั้งเคราะห์ ดีเอ็นเอให้เสร็จสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที เก็บผลที่ได้ที่ 4°C

ทำการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ได้จากผลผลิตปฏิกิริยา PCR โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ 5 µl 6X Loading dye ที่มี 1X Vistragreen® (Amersham, USA) 2 µl และ dH₂O 5 µl รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12 µl จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ลงในร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง และหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, EU) ลงในร่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานลงบนอะกาโรสเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นานประมาณ 50-60 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documentation System (Vilber Lourmat, France) ทำซ้ำด้วยวิธี PCR ทั้ง 36 ต้น เพื่อยืนยันผลของ PCR ที่ได้ของการทดลอง

3.2.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอ ใช้น้ำหนักโมเลกุลด้วยโปรแกรม PhotoCapt (Vilber Lourmat, France) กำหนดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันเป็นหนึ่งลักษณะ ให้ค่าคะแนนเป็น 1 หรือ 0 เมื่อปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น

3.2.3.4 การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc v.21 (Biostatistics, Inc.) และ Winboot program (Yap and Nelson, 1996) ซึ่งกำหนดการวิเคราะห์หาค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำของการสุ่มวิเคราะห์ของการสร้าง consensus tree วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย PCA และหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากร (Nei, 1972) ด้วยโปรแกรม POPGENE V1.31 (Yeh, Yang and Boyle 1999)

3.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

3.3.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

กวางเครือขาวที่รวบรวมในแปลงของฟาร์มมทส. มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลาย ดังนั้นการทดลองนี้จึงประยุกต์ตาม จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ และคณะ (2550) และวิธีการเก็บข้อมูลจาก cowpea descriptions (IBPGR, 1983) จำแนกความแตกต่างของกวางเครือขาวได้ดังนี้

3.3.1.1 สีด้านหลังใบของใบย่อยส่วนปลายจากกวางเครือขาวทั้ง 36 สายต้น โดยใช้ระบบ The Hunter L, a, b Color Space (DeMan, 1999) พบว่ามีค่า L* และ b* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่ค่า a* ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 3.1) ค่า a* อยู่ระหว่าง -23.33 ถึง -5.41

สายต้นที่ T11 ใบย่อยส่วนปลายมีสีเขียวมากที่สุด ($a^* = -23.33$) และสายต้นที่ T27 ใบย่อยส่วนปลายมีสีเขียวน้อยที่สุด ($a^* = -5.41$) ค่า b^* อยู่ระหว่าง 14.35 ถึง 31.14 สายต้นที่ T26 ใบย่อยส่วนปลายมีสีเหลืองมากที่สุด ($b^* = 31.14$) สายต้นที่ T23 ใบย่อยส่วนปลายมีสีเหลืองน้อยที่สุด ($b^* = 14.35$) ค่า L^* อยู่ระหว่าง 35.42 ถึง 47.79 สายต้นที่ T34 ใบย่อยส่วนปลายมีความสว่างมากที่สุด ($L^* = 47.79$) สายต้นที่ T24 ใบย่อยส่วนปลายมีความสว่างน้อยที่สุด ($L^* = 35.42$) และค่า x และ y หมายถึง ค่าสีตามระบบ CIE chromaticity diagram (DeMan, 1999) ซึ่งคำนวณจากค่า L^* , a^* , b^* พบว่าค่า x และ y ต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ มีค่า x อยู่ระหว่าง 0.3613 ถึง 0.3226 สายต้นที่ T34 มีค่า x มากที่สุด ($x = 0.3613$) สายต้นที่ T23 มีค่า x น้อยที่สุด ($x = 0.3226$) และมีค่า y อยู่ระหว่าง 0.4569-0.3338 สายต้นที่ T11 มีค่า y มากที่สุด ($y = 0.4569$) สายต้นที่ T30 มีค่า y น้อยที่สุด ($y = 0.3338$)

3.3.1.2 ลักษณะใบ พบว่า กวาวเครือขาวทั้ง 36 สายต้น มีลักษณะใบย่อยส่วนปลายแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.2 จำแนกความแตกต่างที่ใบย่อยส่วนปลายได้ 2 กลุ่ม ดังนี้

3.3.1.2.1 ใบย่อยส่วนปลาย รูปไข่ (ovate) ฐานใบมน (obtuse) ปลายใบเป็นติ่งแหลม (cuspidate) จำนวน 12 สายต้น ได้แก่ สายต้นที่ T1, T2, T8, T9, T11, T13, T17, T18, T21, T22, T28, และ T32

3.3.1.2.2 ใบย่อยส่วนปลาย รูปรี (elliptic) ฐานใบแหลม (acute) ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) จำนวน 24 สายต้น ได้แก่ สายต้นที่ T3, T4, T5, T6, T7, T10, T12, T14, T15, T16, T19, T20, T23, T24, T25, T26, T27, T29, T30, T31, T33, T34, T35 และ T36

3.3.1.3 ขนบนส่วนลำต้น ทั้ง 36 สายต้น ไม่มีขนบนส่วนของลำต้น ดังแสดงในตารางที่ 3.2

3.3.1.4 ขนที่ฝัก (ตารางที่ 3.2)

3.3.1.4.1 มีขนที่ฝัก ได้แก่ สายต้นที่ T6 และ T24

3.3.1.4.2 ไม่มีขนที่ฝัก ได้แก่ สายต้นที่ T2, T3, T4, T5, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T16, T17, T18, T20, T21, T25, T26, T29, T30, T31, T32 และ T35 (สายต้นที่ไม่ติดฝักจำนวน 11 สายต้น ได้แก่ สายต้นที่ T1, T9, T15, T19, T22, T23, T27, T28, T33, T34 และ T36 เนื่องจากระหว่างการแทงช่อดอกมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-ต่ำทำให้เกิดการฝ่อของช่อดอก)

3.3.1.5 ลักษณะสีของดอก ใช้การพิจารณาสีกลีบดอกกึ่งกลาง และสีกลีบดอกกึ่งนอกจากการสังเกตสีกลีบดอกกึ่งกลางทั้ง 32 สายต้น มีสีกลีบดอกกึ่งกลางสีน้ำเงินอมม่วงที่เข้มถึงจางแตกต่างกัน จึงได้นำระบบ The Hunter L, a, b Color Space (DeMan, 1999) มาใช้ในการเก็บข้อมูลและเนื่องจากในช่วงระยะเวลาการเก็บข้อมูลสภาพอากาศแปรปรวน การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-

ต่ำ ระหว่างการแทงช่อดอกทำให้เกิดการฝ่อของช่อดอกจำนวน 4 สายต้น พบว่าสีกลีบดอกคู่กลาง และสีกลีบดอกคู่นอกทั้ง 32 สายต้นมีค่า L^* , a^* และ b^* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3.3) ค่า L^* อยู่ระหว่าง 26.60 ถึง 75.19 สายต้นที่ T34 สีกลีบดอกคู่กลางมีความสว่างมากที่สุด ($L^* = 75.19$) สายต้นที่ T25 สีกลีบดอกคู่กลางมีความสว่างน้อยที่สุด ($L^* = 26.60$) ค่า a^* อยู่ระหว่าง 10.47 ถึง 38.34 สายต้นที่ T34 สีกลีบดอกคู่กลางมีสีเขียวมากที่สุด ($a^* = -10.47$) และสายต้นที่ T33 สีกลีบดอกคู่กลางมีสีเขียวน้อยที่สุด ($a^* = 38.34$) และ ค่า b^* อยู่ระหว่าง -9.48 ถึง -34.19 สายต้นที่ T34 สีกลีบดอกคู่กลางมีสีเหลืองมากที่สุด ($b^* = -9.48$) สายต้นที่ T30 สีกลีบดอกคู่กลางมีสีเหลืองน้อยที่สุด ($b^* = -34.19$)

สีกลีบดอกคู่นอกทั้ง 32 สายต้นมีค่า L^* , a^* และ b^* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3.4) ค่า L^* อยู่ระหว่าง 101.89 ถึง 58.87 สายต้นที่ T23 สีกลีบดอกคู่นอกมีความสว่างมากที่สุด ($L^* = 101.89$) สายต้นที่ T25 สีกลีบดอกคู่นอกมีความสว่างน้อยที่สุด ($L^* = 58.87$) ค่า a^* อยู่ระหว่าง -11.45 ถึง 16.28 สายต้นที่ T18 สีกลีบดอกคู่นอกมีสีเขียวมากที่สุด ($a^* = 16.28$) และสายต้นที่ T19 สีกลีบดอกคู่นอกมีสีเขียวน้อยที่สุด ($a^* = -11.45$) และ ค่า b^* อยู่ระหว่าง -17.50 ถึง 17.85 สายต้นที่ T25 สีกลีบดอกคู่นอกมีสีเหลืองมากที่สุด ($b^* = -17.50$) สายต้นที่ T19 สีกลีบดอกคู่นอกมีสีเหลืองน้อยที่สุด ($b^* = 17.85$)

ตารางที่ 3.1 สีด้านหลังใบของใบย่อยส่วนปลาย ของกวางเครือขาว

สายต้น	สีของหลังใบ									
	L*		a*		b*		x		y	
T1	39.04	l-p	-16.80	a-c	19.17	kl	0.3295	lm	0.4188	i-l
T2	39.78	k-o	-18.40	bc	21.23	i-k	0.3312	j-l	0.4288	e-l
T3	44.10	c-h	-21.77	c	27.42	a-e	0.3386	c-i	0.4492	a-c
T4	38.08	o-q	-16.11	a-c	18.53	k-m	0.3295	k-m	0.4165	j-l
T5	39.94	k-o	-16.98	a-c	20.29	jk	0.3324	i-l	0.4219	g-l
T6	38.63	m-p	-18.07	bc	20.14	jk	0.3288	l-n	0.4262	f-l
T7	40.82	h-o	-18.35	bc	22.30	f-k	0.3344	f-l	0.4308	d-k
T8	41.44	f-o	-19.46	c	23.07	d-k	0.3329	h-l	0.4337	c-j
T9	40.54	j-o	-19.65	c	22.55	e-k	0.3312	j-l	0.4349	c-i
T10	38.93	m-p	-16.11	a-c	18.30	k-m	0.3286	l-n	0.4140	k-m
T11	46.69	a-c	-23.33	c	30.40	a-c	0.3418	c-e	0.4569	a
T12	42.47	d-l	-20.05	c	24.20	c-j	0.3348	f-l	0.4376	b-g
T13	41.03	g-o	-19.29	c	22.71	e-k	0.3329	g-l	0.4338	c-j
T14	43.41	c-j	-21.95	c	28.15	a-c	0.3405	c-f	0.4544	a
T15	44.09	c-h	-19.81	c	24.90	c-j	0.3371	d-j	0.4364	b-h
T16	44.38	b-g	-21.31	c	26.78	a-h	0.3383	c-i	0.4458	a-e
T17	39.49	k-o	-18.34	bc	21.42	i-k	0.3319	i-l	0.4301	e-l
T18	44.89	a-e	-22.66	c	28.06	a-c	0.3388	c-i	0.4529	ab
T19	38.45	n-q	-15.37	a-c	18.37	k-m	0.3310	j-l	0.4133	lm
T20	40.62	i-o	-19.20	c	22.02	h-k	0.3311	j-l	0.4317	d-j
T21	44.51	b-f	-21.41	c	27.72	a-d	0.3406	c-f	0.4491	a-c
T22	44.05	c-i	-21.18	c	27.18	a-f	0.3398	c-g	0.4474	a-d
T23	35.88	p-q	-13.83	a-c	14.35	m	0.3226	n	0.3984	m
T24	35.42	q	-13.66	a-c	14.68	lm	0.3246	mn	0.4002	m
T25	42.70	d-k	-18.79	bc	24.65	c-i	0.3398	c-h	0.4369	b-h
T26	47.54	ab	-6.30	ab	31.14	a	0.3517	b	0.4522	ab
T27	40.73	h-o	-5.41	a	21.36	i-k	0.3370	d-j	0.4200	h-l
T28	39.54	k-o	-15.70	a-c	20.63	jk	0.3375	d-j	0.4216	g-l
T29	41.96	d-m	-16.83	a-c	22.06	h-k	0.3378	d-j	0.4246	f-l
T30	41.42	f-o	-17.17	a-c	20.79	i-k	0.3330	g-l	0.3338	o
T31	41.74	d-n	-5.48	a	22.16	g-k	0.3361	d-k	0.3361	o
T32	41.48	e-o	-17.39	a-c	20.84	i-k	0.3352	e-l	0.4205	g-l
T33	43.56	c-j	-18.64	bc	25.73	b-i	0.3429	cd	0.3429	o
T34	47.79	a	-14.20	a-c	28.38	a-c	0.3613	a	0.3604	n
T35	45.01	a-d	-19.10	c	27.03	a-g	0.3450	c	0.4410	a-f
T36	42.40	d-l	-18.15	bc	24.76	c-j	0.3420	c-e	0.4365	b-h
F-test	**		ns		**		**		**	
CV(%)	4.18		36.4		10.93		1.04		2.09	

หมายเหตุ^{1/} ค่าเฉลี่ย 3 ใบ/ซ้ำ; จำแนกสีตามระบบของ The Hunter L*, a*, b* Color Space และค่า x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE chromaticity diagram (DeMan, 1999); L* = ทิศทางสี ในด้านความสว่าง เริ่มจากมืด (สีดำ) L*= 0 ถึง สว่าง (สีขาว) L*= 100; a* = ทิศทางสี เริ่มจากสีแดง (+a) ถึง สีเขียว (-a), b* = ทิศทางสี เริ่มจากสีเหลือง (+b) ถึง สีน้ำเงิน (-b); x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE ซึ่งคำนวณจากค่า L*, a*, b*; ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 3.2 ลักษณะใบย่อยส่วนปลาย ขนบนส่วนของลำต้น และขนที่ฝักของกวาวเครือขาว

สาย ต้น	รูปร่างใบ	ฐานใบ	ปลายใบ	ขนบนส่วน ของลำต้น		ขนที่ฝัก		หมายเหตุ
				มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	
T1	ovate	obtuse	cuspidate	/				ไม่ติดฝัก
T2	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T3	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T4	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T5	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T6	elliptic	acute	acuminate	/	/			
T7	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T8	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T9	ovate	obtuse	cuspidate	/				ไม่ติดฝัก
T10	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T11	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T12	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T13	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T14	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T15	elliptic	acute	acuminate	/				ไม่ติดฝัก
T16	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T17	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T18	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T19	elliptic	acute	acuminate	/				ไม่ติดฝัก
T20	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T21	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T22	ovate	obtuse	cuspidate	/				ไม่ติดฝัก
T23	elliptic	acute	acuminate	/				ไม่ติดฝัก
T24	elliptic	acute	acuminate	/	/			
T25	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T26	elliptic	acute	acuminate	/		/		

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

สาย ต้น	รูปร่างใบ	ฐานใบ	ปลายใบ	ขนบนส่วน ของลำต้น		ขนที่ฝัก		หมายเหตุ
				มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	
				T27	elliptic	acute	acuminate	
T28	ovate	obtuse	cuspidate	/	/	/	ไม่ติดฝัก	
T29	elliptic	acute	acuminate	/	/	/		
T30	elliptic	acute	acuminate	/	/	/		
T31	elliptic	acute	acuminate	/	/	/		
T32	ovate	obtuse	cuspidate	/	/	/		
T33	elliptic	acute	acuminate	/	/	/	ไม่ติดฝัก	
T34	elliptic	acute	acuminate	/	/	/	ไม่ติดฝัก	
T35	elliptic	acute	acuminate	/	/	/		
T36	elliptic	acute	acuminate	/	/	/	ไม่ติดฝัก	

หมายเหตุ : รูปร่างใบ [ovate (ใบรูปไข่) และ elliptic (ใบรูปรี)];ฐานใบ [obtuse (ฐานใบมน) และ acute (ฐานใบแหลม)];ปลายใบ [cuspidate (ปลายใบเป็นดิ่งแหลม) และacuminate (ปลายใบเรียวแหลม)]

ตารางที่ 3.3 สีของดอกบานคูกกลางและคูนอกของกวางเครือขาว

สายต้น	สีของหลังใบ											
	L*		a*		b*		L*		a*		b*	
T1	50.14	cd	22.28	k	-22.43	b-e	86.30	de	-2.37	f	5.87	c
T2	38.69	h-j	30.90	d-g	-23.60	c-f	77.27	h-j	6.70	ed	-6.29	i-k
T3	40.37	f-i	34.99	a-e	-27.93	g-i	77.54	h-j	4.41	g-k	-3.12	g-i
T4	44.36	e-g	31.14	c-g	-26.01	d-h	75.99	i-k	6.15	f-h	-4.62	h-j
T5	40.51	f-i	26.04	h-j	-21.30	bc	72.93	kl	5.79	f-i	5.58	c
T6	27.77	no	35.66	a-e	-28.90	h-j	84.84	d-f	0.32	l-o	0.75	e-g
T7	32.20	k-n	29.37	f-i	-18.96	b	77.79	h-j	2.89	h-m	-2.34	e-h
T8	35.99	i-k	37.11	a	-27.26	f-i	78.08	h-j	4.43	g-k	-2.10	e-h
T9	46.35	c-e	30.82	e-g	-25.90	d-h	80.48	gh	2.86	h-m	-1.22	e-h
T10	30.08	l-o	37.18	a	-26.48	e-i	82.18	fg	2.24	j-m	1.53	de
T11	31.97	k-n	35.47	a-e	-27.97	g-i	80.06	gh	2.70	i-m	-2.45	fh
T12	42.88	e-h	29.19	f-i	-26.23	e-i	74.63	jk	5.29	f-j	-7.18	jk
T13	40.86	f-i	37.04	a	-25.71	d-h	78.96	g-i	2.73	i-m	-0.55	e-g
T14	45.67	d-f	35.29	a-e	-22.11	b-d	91.15	c	-4.16	p	4.83	cd
T15	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง											
T16	50.87	c	31.88	b-g	-20.40	bc	77.44	h-j	11.90	bc	-8.29	k
T17	39.81	g-j	35.08	a-e	-26.40	e-i	84.09	ef	-1.31	n-p	4.70	cd
T18	28.33	m-o	37.82	a	-21.01	bc	63.38	n	16.28	a	-14.18	l
T19	58.52	b	27.25	g-l	-20.52	bc	101.73	a	-11.45	r	17.85	a
T20	35.20	j-l	34.74	a-e	-27.53	f-i	79.50	g-i	4.13	g-k	-3.10	g-i
T21	38.40	h-j	35.84	a-d	-29.13	h-j	79.57	g-i	2.94	h-m	-0.64	e-g
T22	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง											
T23	57.50	b	25.16	ij	-27.03	f-i	101.89	a	-11.30	r	16.89	a
T24	46.30	c-e	29.86	f-h	-24.04	c-g	97.86	b	-7.58	o	12.43	b
T25	26.60	o	34.74	a-e	-26.63	f-i	58.87	o	16.19	a	-17.50	m
T26	41.58	e-h	36.83	ab	-29.62	h-i	72.76	kl	9.28	c-e	-9.37	k
T27	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง											
T28	45.26	d-f	35.94	a-c	-27.56	f-i	79.29	g-i	4.27	g-k	-2.69	e-i
T29	44.07	e-g	31.94	b-g	-26.69	f-i	78.38	hi	2.39	j-m	1.19	ef
T30	32.88	k-n	37.83	a	-34.19	k	79.67	g-i	3.48	g-l	1.10	ef
T31	43.35	e-h	33.37	a-f	-30.43	ij	84.14	ef	1.38	k-n	4.89	cd
T32	30.82	k-o	37.75	a	-32.38	k	71.11	l	8.09	d-f	11.37	b
T33	31.13	k-o	38.34	a	-27.46	f-i	67.86	m	12.31	b	10.84	b
T34	75.19	a	10.47	k	-9.48	a	88.09	cd	-3.43	f	6.35	c
T35	33.18	k-m	38.17	a	-27.03	f-i	72.55	kl	10.69	b-d	-9.33	K
T36	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง											
F-test	**		**		**		**		**		**	
CV(%)	6.87		7.75		8.36		2.38		21.09		24.32	

หมายเหตุ¹ ค่าเฉลี่ย 3 ใบ/ชำ; จำแนกสีตามระบบของ The Hunter L*, a*, b* Color Space และค่า x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE chromaticity diagram (DeMan, 1999); L* = ทิศทางสี ในด้านความสว่าง เริ่มจากมืด (สีดำ) L*= 0 ถึง สว่าง (สีขาว) L*= 100; a* = ทิศทางสี เริ่มจากสีแดง (+a) ถึง สีเขียว (-a), b* = ทิศทางสี เริ่มจากสีเหลือง (+b) ถึง สีนํ้าเงิน (-b); x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE ซึ่งคำนวณจากค่า L*, a*, b*; ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3.3.1.6 ขนาดใบ พบว่ากวาวเครือขาว 36 สายต้น มีขนาดใบย่อยส่วนปลายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 3.4) ความยาวใบตั้งแต่ 8.1-23.63 cm ความกว้างใบตั้งแต่ 4.33-13.83 cm กวาวเครือขาวสายต้นที่ 5 มีขนาดใบใหญ่ที่สุด คือ ใบกว้าง 13.83 cm ยาว 23.63 cm กวาวเครือขาวสายต้นที่ 34 มีขนาดใบเล็กที่สุด คือ ใบกว้าง 4.33 cm ยาว 8.1 cm

3.3.1.7 ความยาวก้านช่อดอก พบว่ากวาวเครือขาว 36 สายต้น มีความยาวก้านช่อดอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 3.4) ความยาวก้านช่อดอกตั้งแต่ 6.5-66.03 cm กวาวเครือขาวสายต้นที่ 4 มีความยาวก้านช่อดอกยาวที่สุด คือ 66.03 cm และกวาวเครือขาวสายต้นที่ 34 มีความยาวก้านช่อดอกสั้นที่สุด คือ 6.5 cm

จากการใช้ลักษณะใบในการจำแนก พบว่าสามารถจำแนกกวาวเครือขาวออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ได้ดังนี้ คือ กลุ่มที่ 1 ใบขนาดเล็ก รูปร่างใบรูปรี (elliptic), ฐานใบแหลม (acute) และปลายใบเป็นติ่งแหลม (cuspidate) กลุ่มที่ 2 รูปร่างใบรูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเป็นติ่งแหลม กลุ่มที่ 3 รูปร่างใบรูปไข่ (ovate), ฐานใบมน (obtuse) และปลายใบเรียวแหลม (acuminate) แต่ทั้ง 36 สายต้นไม่สามารถระบุได้ว่ามีความเกี่ยวเนื่องทางสายพันธุ์หรือไม่ จึงได้ใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่เก็บข้อมูลในการทดลองนี้ จำนวน 7 ลักษณะมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของกวาวเครือขาวที่รวบรวมไว้ วิเคราะห์ผลลักษณะที่บันทึกได้คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity จัดกลุ่มความสัมพันธ์สร้างแผนโคโรแกรมด้วย UPGMA (ภาพที่ 3.2) และวิธี PCA (ภาพที่ 3.3) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Genetic Similarity: GS) พบว่าค่า GS มีค่าระหว่าง 0.57-0.97 (ตารางผนวกที่ 1) โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.77 ที่ความสัมพันธ์ 0.65 แยกได้ 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ 34 ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มอื่นที่เด่นชัด คือ ใบมีลักษณะขนาดเล็ก รูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเรียวแหลม

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 23 สายต้น มีลักษณะใบที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับสายต้นที่ 34 พบว่า สายต้นที่ 27 และ 36 มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากที่สุดในระดับ 0.97

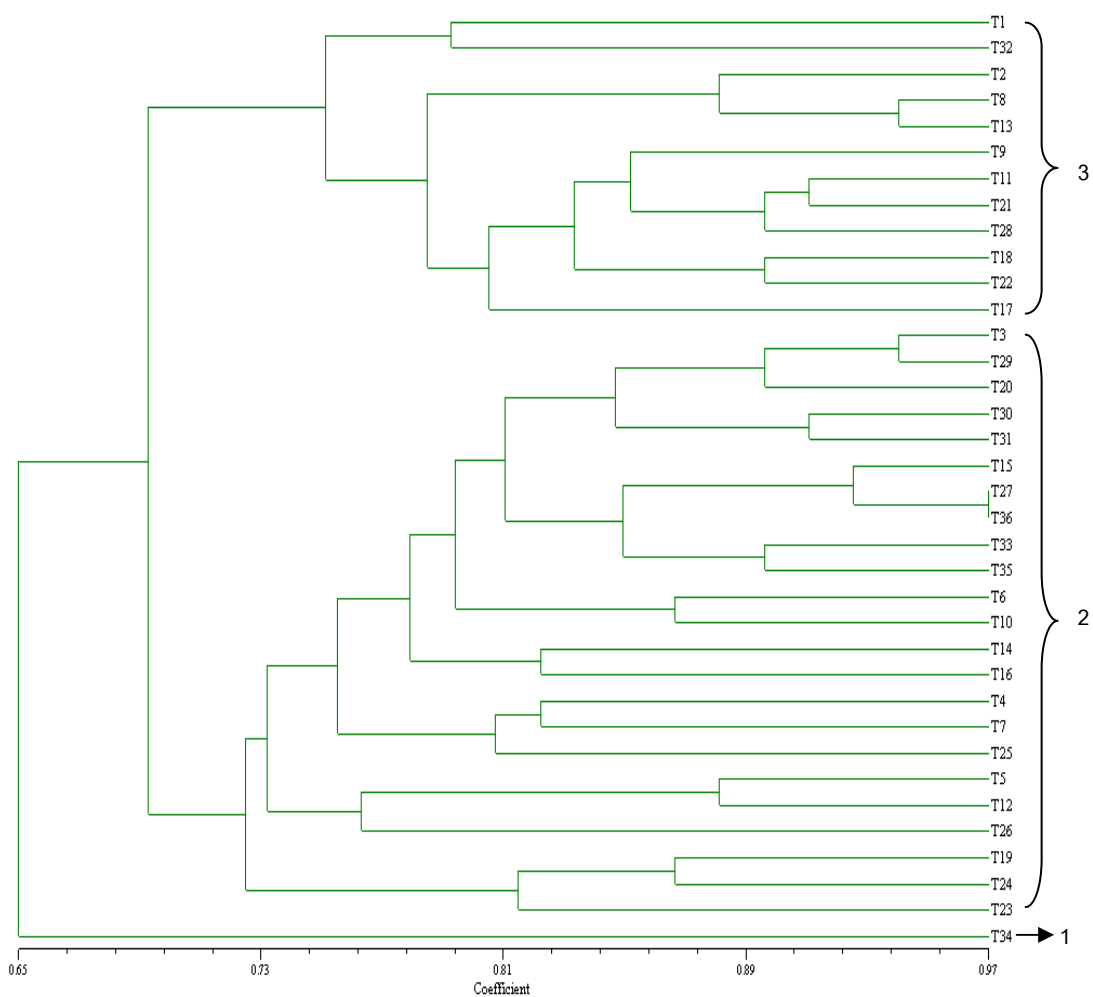
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 12 สายต้น ใบมีลักษณะรูปไข่ ฐานใบมน และปลายใบเป็นติ่งแหลม

ผลการจัดกลุ่มด้วยวิธีนี้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วย bootstraps มีค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ระหว่าง 2-80.9% (ภาพผนวกที่ 1) คล้ายคลึงกับลักษณะที่รายงานโดย Dithachaiya wong *et al.* (2005) จากการวิเคราะห์ค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (GS) ของกลุ่มตัวอย่าง พบว่า มีค่าระหว่าง 0.57-0.97 แสดงให้เห็นว่าลักษณะภายนอกมีความแตกต่างกันมาก ทั้งนี้สายต้นที่ 34 มีลักษณะที่ต่างจากต้นอื่นๆ อย่างเด่นชัด

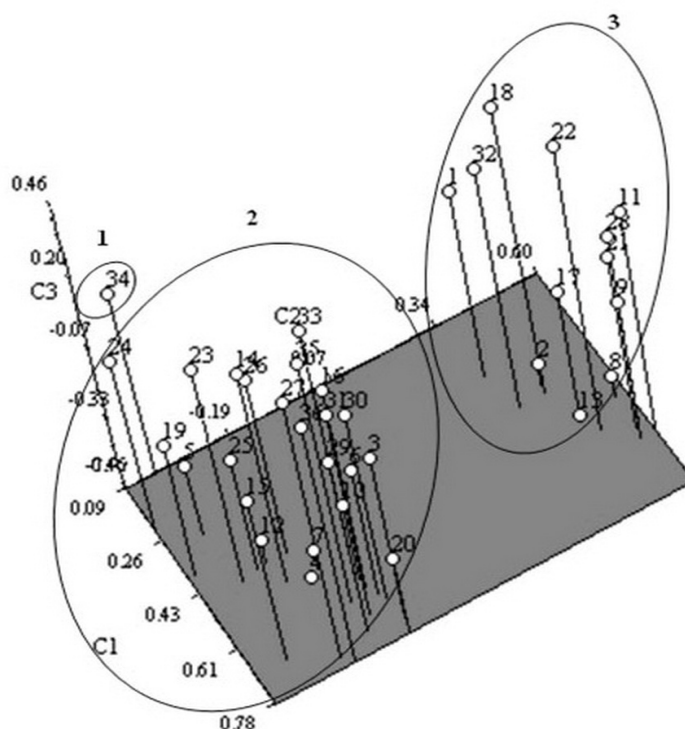
ตารางที่ 3.4 ขนาดใบและความยาวก้านช่อดอกของกวางเครือขาว

สายต้น	ใบย่อยส่วนปลาย(cm) ^L				ความยาวก้านช่อดอก(cm) ^L	
	ยาว		กว้าง			
T1	12.17	j-m	8.23	h-l	50.13	b-d
T2	16.80	c-f	10.50	c-e	48.17	c-f
T3	14.20	e-k	7.27	k-m	32.57	h-n
T4	19.53	bc	12.73	ab	66.03	a
T5	23.63	a	13.83	a	44.73	c-g
T6	14.17	e-k	9.30	e-j	40.20	d-i
T7	17.87	b-d	10.37	c-e	48.83	c-e
T8	15.93	d-i	10.80	c-e	53.77	bc
T9	13.77	f-l	9.53	d-h	49.47	c-e
T10	16.17	d-h	10.70	c-e	36.93	f-k
T11	13.07	g-m	9.53	d-h	35.37	g-l
T12	20.13	b	11.67	bc	34.33	g-m
T13	16.43	c-g	11.03	cd	28.77	i-o
T14	17.30	b-e	9.23	e-j	25.00	l-p
T15	15.6	d-j	7.93	h-l		ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง
T16	13.17	g-m	7.90	h-l	48.63	c-e
T17	14.23	e-k	9.40	e-i	38.10	e-j
T18	13.57	f-m	8.30	g-l	36.75	g-k
T19	17.83	b-d	9.93	d-g	42.30	c-h
T20	13.77	f-l	8.47	g-l	23.33	m-p
T21	12.80	h-m	7.37	k-m	14.70	pq
T22	12.00	k-m	8.87	f-k		ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง
T23	14.50	k-n	8.03	h-l	23.23	m-p
T24	15.97	d-i	8.40	g-l	35.57	g-l
T25	15.83	d-i	10.27	c-e	60.27	ab
T26	10.57	l-n	4.73	op	27.33	j-o
T27	12.83	h-m	7.47	kl		ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง
T28	12.50	i-m	9.23	e-j	25.77	k-p
T29	10.70	k-n	5.90	m-o	21.23	n-p
T30	13.00	g-m	7.77	i-l	27.77	j-o
T31	10.17	mn	5.77	n-p	22.60	n-p
T32	12.60	i-m	8.47	g-l	48.33	c-f
T33	14.10	e-l	8.00	h-l	45.10	c-g
T34	8.10	n	4.33	j-l	6.50	q
T35	13.83	e-l	7.70	l-n	20.23	op
T36	11.97	k-m	7.00	k		ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง
F-test	**		**		**	
CV (%)	12.34		9.60		18.87	

หมายเหตุ :¹ ค่าเฉลี่ย 3 ใบ/ช่อดอก; ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ภาพที่ 3.2 เดนโดแกรมความสัมพันธ์ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะของกวาวเครือขาว 36 สายต้น คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x



ภาพที่ 3.3 ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกาวเครือขาว 36 สายต้น โดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ (สีด้านหลังใบ ลักษณะใบ ขนบนส่วนของลำต้น ขนที่ฝัก สีของดอก ขนาดของใบ และความยาวก้านช่อดอก) จากการวิเคราะห์โดย PCA

3.3.2 ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผลการทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR จำนวน 41 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถตรวจจับแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 355 ตำแหน่ง คิดเป็น 8.66 ตำแหน่งต่อไพรเมอร์ โดยมีขนาดของแถบตั้งแต่ 280 bp ถึง 1,550 bp ในจำนวนนี้มีตำแหน่งดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic) จำนวน 293 ตำแหน่ง คิดเป็น 82.54% ของทั้งหมด และเป็นตำแหน่งที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic) จำนวน 62 ตำแหน่ง คิดเป็น 17.46% ดังแสดงในตารางที่ 3.5 ผลจากการตรวจสอบประสิทธิภาพของ ISSR และเทคนิคที่ใช้โดยการวิเคราะห์ค่า Polymorphism Information Content (PIC) ซึ่งบอกคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้น ๆ ว่ามีประโยชน์ในการนำไปใช้มากหรือน้อย จากผลการทดลองพบว่า มีค่าระหว่าง 0.0315-0.9779 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 0.4779 ทั้งนี้การใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR ของการทดลองนี้มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ ISSR markers ของ Muthusamy, Kanagarajan and Ponnusamy (2008) ในการจำแนก rice bean [*Vigna umbellate* (Thunb.)] ซึ่งมีค่า PIC เท่ากับ 0.203 เช่นเดียวกันกับงานทดลองของ Thimmappaiah *et al.* (2009) ที่

ตารางที่ 3.5 ไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกวางเครือขาว และลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphisms) ค่า polymorphism information content (PIC) และค่า No. of effective alleles per locus (N_e) ของแต่ละไพรเมอร์

No.	Primer	Sequence 5' → 3'	Total no. of Bands	Monomorphic	Polymorphic	PIC	N_e
1	ISSR10	(GA) ₈ T	11	0	11	0.5386	1.7102
2	ISSR12	(GA) ₈ A	10	1	9	0.3820	1.7215
3	ISSR13	(CT) ₈ T	11	0	11	0.7134	1.7097
4	ISSR15	(CT) ₈ G	11	0	11	0.8786	1.5120
5	ISSR16	(CA) ₈ T	10	6	4	0.0602	1.6379
6	ISSR17	(GA) ₈ A	6	5	1	0.0816	1.6498
7	ISSR20	(GT) ₈ C	4	0	4	0.3511	1.4500
8	ISSR22	(TC) ₈ A	5	0	5	0.2392	1.7914
9	ISSR23	(TC) ₈ C	10	1	9	0.2246	1.6203
10	ISSR26	(AC) ₈ C	11	3	8	0.2498	1.3097
11	ISSR27	(AC) ₈ G	13	0	13	0.5207	1.3113
12	ISSR34	(AG) ₈ YT	8	0	8	0.4352	1.5848
13	ISSR36	(AG) ₈ YA	8	0	8	0.3677	1.8010
14	ISSR40	(GA) ₈ YT	9	3	6	0.8516	1.5441
15	ISSR42	(GA) ₈ YG	10	4	6	0.3331	1.3331
16	ISSR46	(CA) ₈ RT	10	0	10	0.6624	1.4261
17	ISSR48	(CA) ₈ RG	11	1	10	0.6653	1.5236
18	ISSR50	(GT) ₈ YC	6	0	6	0.5149	1.5682
19	ISSR51	(GT) ₈ YG	8	0	8	0.2160	1.1250
20	ISSR55	A (CA) ₈ CYT	12	2	10	0.3361	1.5892
21	ISSR56	(AC) ₈ YA	11	3	8	0.2144	1.4782
22	ISSR57	(AC) ₈ YG	9	1	8	0.3757	1.5221
23	ISSR60	(ACC) ₈	8	0	8	0.3009	1.5650
24	ISSR66	CT(CCT) ₈ C	8	7	1	0.0615	1.7906
25	ISSR67	(GGC) ₈	10	0	10	0.4080	1.5731
26	ISSR68	(GAA) ₈	7	4	3	0.0315	1.6480
27	ISSR69	(GTT) ₈	10	0	10	0.3941	1.5142
28	ISSR73	(GACA) ₄	10	0	10	0.6898	1.6480
29	ISSR74	(CCCT) ₄	9	0	9	0.3190	1.6648
30	ISSR78	(GGAT) ₄	6	0	6	0.4082	1.7085
31	ISSR80	(GGAGA) ₃	9	0	9	0.6669	1.8541
32	ISSR81	(GGGTG) ₃	10	1	9	0.4037	1.8022
33	ISSR84	HBH(AG) ₂	10	1	9	0.2728	1.6400
34	ISSR85	BHB(GA) ₂	6	4	2	0.9633	1.1776
35	ISSR86	VDV(CT) ₂	11	3	8	0.8036	1.5170
36	ISSR87	DVD(TC) ₂	8	2	6	0.8025	1.4725
37	ISSR89	DBD(AC) ₂	5	3	2	0.9779	1.1515
38	ISSR90	VHV(GT) ₂	7	4	3	0.7972	1.3413
39	ISSR91	HVH(TG) ₂	7	3	4	0.8403	1.4032
40	ISSR95	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	5	0	5	0.2178	1.6556
41	ISSR98	GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G	5	0	5	0.7511	1.6828
Total			355	62	293	19.5924	63.7292
Average			8.66	17.46	83.54	0.4779	1.5544

หมายเหตุ : B=(C, G, T), D=(A, G, T), H=(A, C, T), R=(A, G), Y=(C, T), V=(A, C, G)

ใช้เทคนิค ISSR makers ในการจำแนกความหลากหลายของมะม่วงหิมพานต์ในประเทศอินเดีย พบว่ามีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.304 และ Tantasawat *et al.* (2010) ใช้เทคนิค ISSR จำแนกและเปรียบเทียบพันธุ์กล้วยในประเทศไทย มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.137-0.276 (PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.197)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR กับการใช้ชนิด SSR ของ Benor *et al.* (2008) ในการจำแนกสายพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์ที่ผสมตัวเอง (inbred lines) ของประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และสหรัฐอเมริกา พบว่ามีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.31 แต่ ISSR-Touchdown PCR ที่ใช้ในการทดลองนี้ให้ค่า PIC ที่สูงกว่า (0.4779) ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เป็นการตรวจสอบเบสซ้ำเช่นเดียวกันภายในจีโนมพืช และเมื่อเปรียบเทียบกับ RAPD และพบว่า ISSR ที่ใช้ในการทดลองนี้มีประสิทธิภาพดีกว่า โดยจากการรายงานของ Muthusamy, Kanagarajan and Ponnusamy (2008) ซึ่งใช้เทคนิควิธี RAPD ในการจำแนก rice bean [*Vigna umbellata* (Thunb.)] มีค่า PIC เท่ากับ 0.243 เช่นเดียวกับ Thimmappaiah *et al.* (2009) ที่จำแนกความหลากหลายของมะม่วงหิมพานต์ในประเทศอินเดีย โดยใช้เทคนิควิธี RAPD เช่นกันมีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.312 อย่างไรก็ตามค่า PIC จากเทคนิค ISSR-Touchdown PCR ของการทดลองนี้มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าการใช้เทคนิควิธี SSR markers ในการจำแนกและเปรียบเทียบกล้วยในประเทศไทย ซึ่งมีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.251-0.752 (PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.597) (Tantasawat *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามเทคนิค ISSR-Touchdown PCR ในการทดลองนี้มีค่า PIC ของไพรเมอร์ที่มีค่าสูงสุด คือ 0.9779 ซึ่งขึ้นกับการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทดลอง และมีค่า No. of effective alleles per locus (N_e) หมายถึง จำนวนอัลลีลที่เหมาะสมต่อโลคัส อยู่ระหว่าง 1.1250-1.8541 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 1.5544 จึงสรุปได้ว่าการใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR มีคุณสมบัติในการจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10x โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงด้วยวิธี Jaccard similarity จัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA และสร้าง dendrogram ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังแสดงในภาพที่ 3.4 ผลจากการวิเคราะห์ Similarity Coefficient พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.50-0.86 (50-86 %) ดังแสดงในตารางผนวกที่ 2 จากเดนโดแกรม UPGMA (ภาพที่ 3.4) สามารถจัดกลุ่มกวางเครือขาวออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่ระดับ 56% และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีกที่ระดับ 69% (ภาพที่ 3.4) เมื่อเปรียบเทียบความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ดีเอ็นเอของกวางเครือขาวจาก UPGMA ด้วยการวิเคราะห์ค่า Bootstraps พบว่าผลการจัดกลุ่มใกล้เคียงกับ UPGMA สายต้นที่ใกล้ชิดกันยังอยู่ใกล้ชิดกันโดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ Bootstraps อยู่ระหว่าง 0.3-90.5% (ภาพผนวกที่ 2) ผลการวิเคราะห์ UPGMA สามารถแยกได้ออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 3.4) ที่ระดับ GS 56%

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ T34 และสายต้นที่ T7

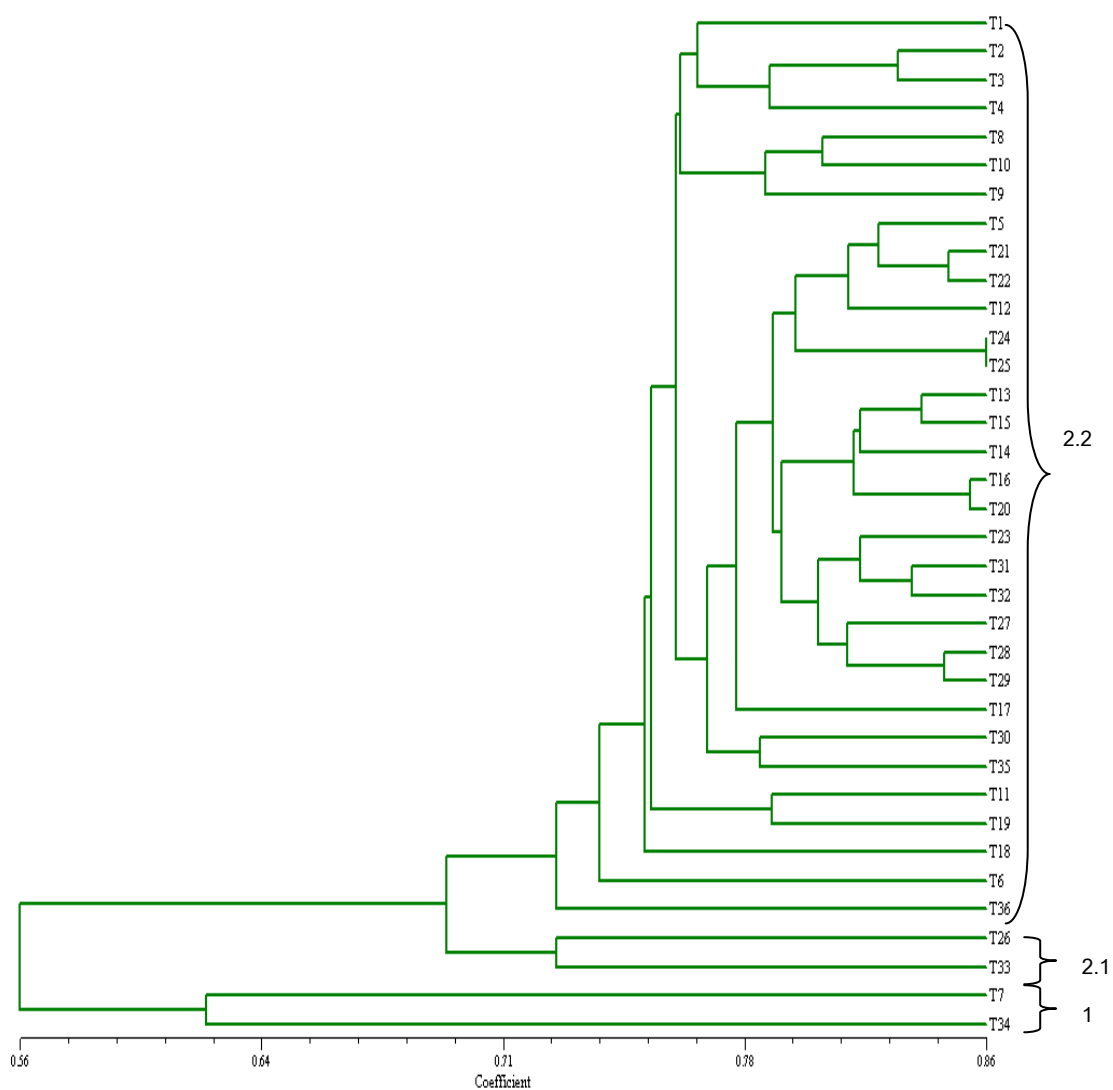
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือจำนวน 34 สายต้นแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ที่ระดับ GS 69%

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย 2 สายต้น คือ สายต้นที่ T26 และสายต้นที่ T33

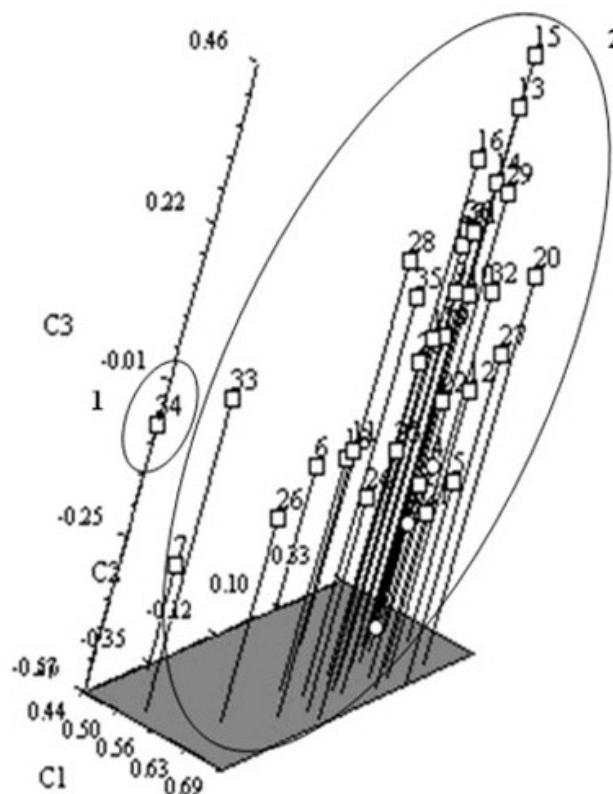
กลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือ 32 สายต้น คือ สายต้นที่ T1-6, T8-25, T27-32, T35 และ T36

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCA (ภาพที่ 3.5) พบว่าการจัดกลุ่มสามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ สายต้นที่ T34 แยกตัวออกจากกลุ่มอื่นอย่างเด่นชัดเช่นเดียวกับสายต้นที่ T7, T26 และ T33 สายต้นที่เหลือจำนวน 32 สายต้น และมีการกระจุกตัวอยู่เป็นกลุ่มเดียวกัน

ทั้งนี้สายต้นที่ 34 มีลักษณะที่ต่างจากต้นอื่นๆ อย่างเด่นชัด ซึ่งปรากฏทั้งในข้อมูลการแยกด้วยลักษณะทางพฤกษศาสตร์และดีเอ็นเอ ผลการแยกกลุ่มด้วยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะทางดีเอ็นเอ โดยมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (GS) ของกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR มีค่าระหว่าง 0.50-0.86 (ตารางผนวกที่ 2) แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ถึงแม้ว่าสายต้นภายในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 34 สายต้น คือ สายต้นที่ T1-6, T8-33, T35 และ T36 จะมีลักษณะใบที่แตกต่างกัน แต่ผลการวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงว่าตำแหน่งที่ตรวจจับด้วย ISSR นั้นอาจไม่สัมพันธ์กับตำแหน่งที่ควบคุมการแสดงออกของใบเช่นเดียวกับรายงานของ Dithachaiyawong *et al.* (2005) ที่พบว่าลักษณะใบมีความแตกต่างกันถึงแม้จะมาจากจังหวัดเดียวกัน เนื่องจากกวาวเครือขาวจัดเป็นพืชตระกูลถั่วและมีโอกาสการผสมข้ามได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของความแปรปรวนนี้ (Mackie and Smith, 1935)



ภาพที่ 3.4 เคนโดแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR. คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x



ภาพที่ 3.5 ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้นโดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR จากการวิเคราะห์โดย PCA

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นเมื่อทดลองรวม 2 ลักษณะเข้าด้วยกัน เนื่องจากเครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องหมายแบบสุ่มที่จับลำดับเบสซ้ำในช่วงสั้น ๆ ประมาณ 1-6 คู่เบส ที่มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม ซึ่งส่วนใหญ่ไม่ใช่ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการแสดงออก (Reddy, Sarla and Suddiq, 2002) จึงอาจไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ใช้ในการจัดจำแนกหากใช้สมมุติฐานว่า ตำแหน่งของดีเอ็นเอไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ตรวจสอบ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการใช้ความแตกต่างของใบ ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA และสร้าง dendrogram ความสัมพันธ์ดังแสดงในภาพที่ 3.6 มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (GS) ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 36 สายต้นมีค่าระหว่าง 0.50-0.83 (50-83%) (ตารางผนวกที่ 3) จากภาพที่ 3.6 มีจัดกลุ่มกวาวเครือขาวออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่ระดับ GS 53% และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีกที่ระดับ GS 66% เมื่อเปรียบเทียบความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA ด้วยการวิเคราะห์ค่า bootstraps พบว่า ผลการจัดกลุ่มใกล้เคียงกับ UPGMA มีค่าความเชื่อมั่นระหว่าง 1.2-96.4% (ภาพผนวกที่ 3) ผลการวิเคราะห์ UPGMA สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 3.6) ที่ระดับ GS 53%

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายต้นที่ T34 และสายต้นที่ T7

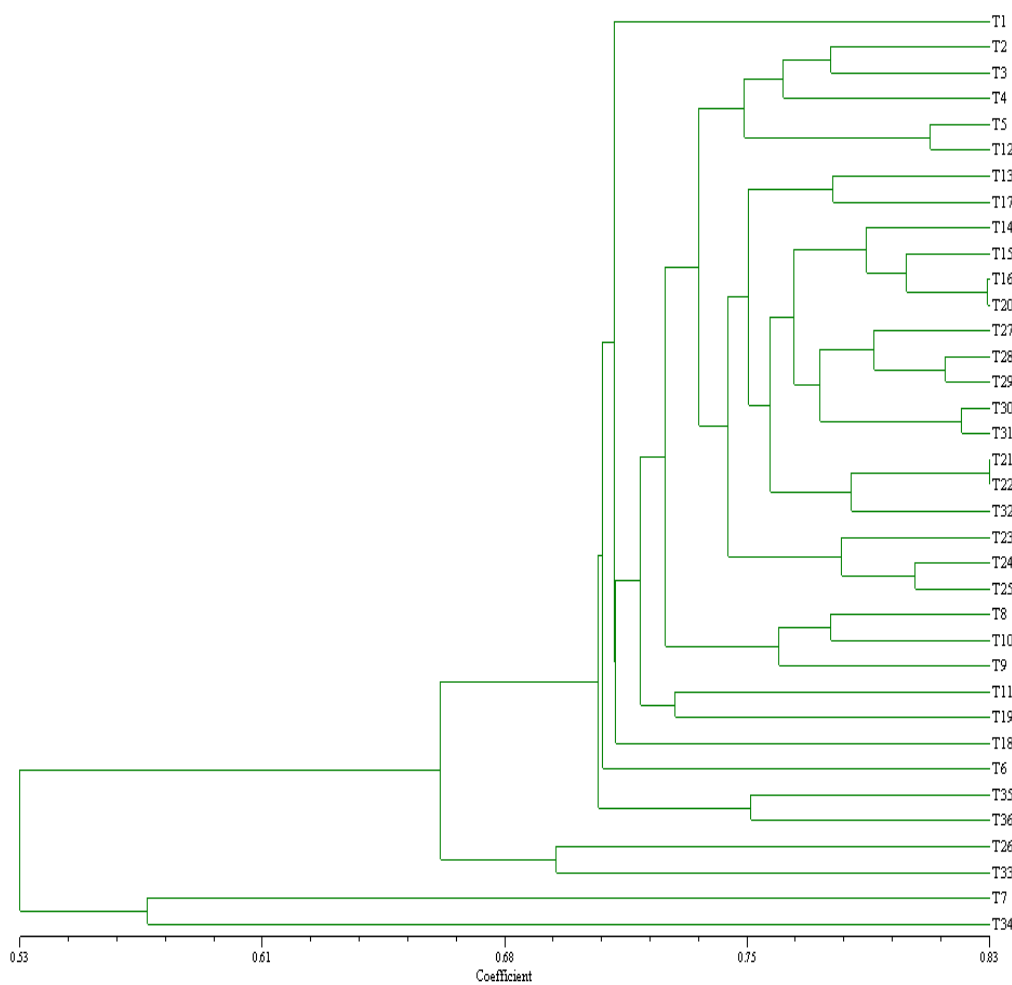
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือจำนวน 34 สายต้น แยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่ระดับ GS 66%

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย 2 สายต้น คือ สายต้นที่ T26 และสายต้นที่ T33

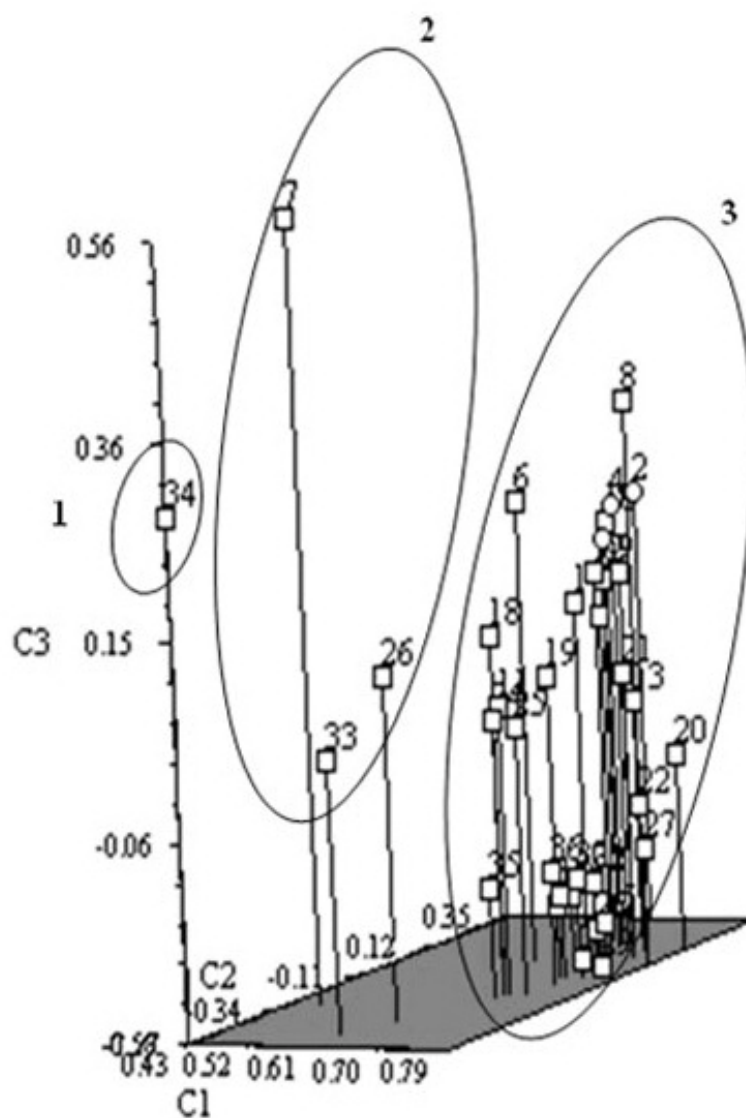
กลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือ 32 สายต้น คือ สายต้นที่ T1-6, T8-25, T27-32, T35 และ T36

ทั้งนี้ผลการรวม 2 ลักษณะเข้าด้วยกันให้ผลการจัดกลุ่ม UPGMA ใกล้เคียงกับการใช้ลักษณะดีเอ็นเอของกวางเครือขาวในการจำแนกพันธุ์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCA (ภาพที่ 3.7) พบว่าการจัดกลุ่มสามารถ 3 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 คือ สายต้นที่ T34 กลุ่มที่ 2 สายต้นที่ T7, T26 และ T33 และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย สายต้นที่เหลืออีก 32 สายต้น โดยมีการกระจุกตัวอยู่เป็นกลุ่มเดียวกัน ทั้งนี้การรวมลักษณะทั้ง 2 นี้เข้าด้วยกันทำให้คาดได้ว่า พันธุกรรมของกวางเครือขาวที่มีการรวบรวมไว้นี้อาจมาจาก 5 ฐานพันธุกรรมใหญ่หรือต้นพันธุ์ โดยฐานที่ 1 คือ สายต้นที่ 34 ฐานที่ 2, 3, 4 คือ สายต้นที่ 7, 26, 33 (ตามลำดับ) และฐานที่ 5 มีสมาชิกในกลุ่มมากที่สุดจำนวน 32 สายต้น ซึ่งน่าจะเป็นกลุ่มจากแม่พันธุ์ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน และจากผลการทดลองทั้งในลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และดีเอ็นเอ พบว่าไม่มีต้นใดมีพันธุกรรมเดียวกัน ทุกต้นมีความแตกต่างกันทั้งหมด



ภาพที่ 3.6 เคนโดแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x



ภาพที่ 3.7 ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ จากการวิเคราะห์โดย PCA

3.3.3 โครงสร้างทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจาก PCA (ภาพที่ 3.5) พบว่าทั้ง 2 กลุ่มมีการกระจุกตัวอยู่ในตำแหน่งต่างกัน ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความหลากหลาย (Shannon' information index; I) ของกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีค่าระหว่าง 0.1550-0.4473 (ตารางที่ 3.6) โดยกลุ่มประชากรในกลุ่มที่ 1 มีค่าดัชนีความหลากหลายน้อยที่สุดเนื่องจากจำนวนประชากรมีปริมาณน้อย การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรกวาวเครือขาว ทั้ง 2 กลุ่ม (ตารางที่ 3.7) พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity : Ht) เท่ากับ 0.2885 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic diversity of population : Hs) เท่ากับ 0.2048 และค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (coefficient of genetic differentiation : Gst) เท่ากับ 0.2901 แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับกว้าง แต่ความแตกต่างหรือความแปรปรวนที่เกิดขึ้นนั้นส่วนใหญ่เกิดจากความแตกต่างภายในกลุ่มประชากรเอง (70.99%) มากกว่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร (29.01%) และพบว่ามีค่าการถ่ายยีน (gene flow; Nm) เท่ากับ 1.2235 แสดงให้เห็นว่ามีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรในระดับต่ำ (ตารางที่ 3.7) แสดงว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมประชากรกวาวเครือขาวที่รวบรวมไว้นี้เกิดจาก plant to plant variation หรือเกิดจากการกระจายตัวของลักษณะ heterosis มีการผสมข้ามกับพันธุ์ที่มาจากแหล่งอื่น (open pollination) น้อย การวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Nei's genetic identity) มีค่าเท่ากับ 0.8145 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เท่ากับ 0.2052 และระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่มเท่ากับ 10.25974 (ตารางที่ 3.8)

ตารางที่ 3.6 ค่าดัชนีความหลากหลาย (Shannon' information index; I) ของกวาวเครือขาว 2 กลุ่ม โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR

	Group 1	Group 2	Total
sample	2	34	36
I	0.1550	0.4473	0.4583
St.Dev	0.2644	0.2554	0.2457

ตารางที่ 3.7 โครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรกวางเครือขาว (population genetic structure) แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity; Ht), ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic diversity of population; Hs), ประสิทธิภาพความแตกต่างระหว่างประชากร (coefficient of genetic differentiation ; Gst) และค่า gene floating (Nm)

List	Ht	Hs	Gst	Nm
Mean	0.2885	0.2048	0.2901	1.2235
St.Dev.	0.0319	0.0194		

ตารางที่ 3.8 ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Nei's genetic identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกลุ่มพันธุ์กวางเครือขาว 2 กลุ่ม และเดนโดรแกรมแสดงระยะห่างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ด้วย Nei's genetic distance method (1972) and UPGMA by using PHYLIP V. 3.5

pop ID	1	2	
1	****	0.8145	Genetic identity
2	0.2052	****	

Genetic distance

```

+-----10.25974 -----pop1
--1
+-----10.25974 -----pop2

```

3.4 สรุปผลการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้รวบรวมกวาวเครือขาวที่ได้มาจากเมล็ดจากต้นที่รวบรวมมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบว่ามีลักษณะที่แปรปรวนหลากหลาย จึงทำให้ไม่สามารถแยกกลุ่มได้ด้วยลักษณะภายนอก งานวิจัยนี้ใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเทคนิค ISSR-Touchdown PCR ในการจำแนกสายพันธุ์ กวาวเครือขาวจำนวน 36 สายต้น ซึ่งการใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะโดยการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มด้วย UPGMA และ PCA พบว่าสามารถแยกออกได้ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายต้นที่ 34 ลักษณะเด่นคือ ใบมีขนาดใหญ่ ใบเล็ก กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 23 สายต้น มีลักษณะเด่นคือ ใบรูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเรียวแหลม และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 12 สายต้น ลักษณะเด่นคือ ใบรูปไข่ ฐานใบมน และปลายใบเป็นติ่งแหลม และการจำแนกโดยใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลและวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์มีค่า PIC ระหว่าง 0.0315-0.9779 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 0.4779 และมีค่า N_c ระหว่าง 1.1250-1.1854 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 1.5544 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (GS) ของตัวอย่างทั้งหมดพบว่ามีค่าระหว่าง 0.50-0.86 โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.77 ที่ระดับ GS เท่ากับ 0.56 (56%) แยกได้ 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ 34 และสายต้นที่ 7 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยต้นที่เหลือ อีก 34 สายต้น ภายในกลุ่ม 2 นี้สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่ GS เท่ากับ 0.69 (69%) ผลของโครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่า ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกวาวเครือขาวที่รวบรวมไว้น่าจะเกิดจากภายในกลุ่ม โดยทุกต้นมีพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน และคาดว่าอาจเกิดจาก 5 แหล่งพันธุกรรมที่มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

3.5 รายการอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. (2548). กวาวเครือขาว-พืชมหัศจรรย์. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 495 หน้า.
- ชวลิต นิยมธรรม. (2538). กวาวเครือ, อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. ราชบัณฑิตยสถาน: เพื่อนพิมพ์. 495 หน้า.
- จรัญ ดิษฐไชยวงศ์, ศุภรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ยุทธนา สมิตะสิริ, สุรพจน์ วงศ์ใหญ่, สิริพันธุ์ ศรีจักรวาล และสุชน สุวรรณบุตร. (2550). การจำแนกและคัดเลือกพันธุ์กวาวเครือขาว. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: โครงการวิจัยและพัฒนการผลิตกวาวเครือขาว. กองทุนสนับสนุนงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร. 1-58.
- ทิพวัลย์ สุขุมลันนันทน์. (2547). รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยและพัฒนการผลิตกวาวเครือ

ขาว กิจกรรมจำแนกและคัดเลือกพันธุ์ เรื่อง ลักษณะทางพฤกษศาสตร์. กรมวิชาการเกษตร.
18 หน้า.

- Benor, S., Zhang, M., Wang, Z. and Zhang, H. (2008). Assessment of genetic variation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in bred lines using SSR molecular markers. **J. Gene. Genomics.** 35: 373-379.
- DeMan, J.D. (1999). **Principles of Food Chemistry.** 3rd Eds. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland. 520 p.
- Dithachaiyawong, J., Sakuanrungsirikul, S., Samittasiri, Y., Wongyai, S., Srijukkawan, S. and Suwannabury, S. (2005). Clonal selection of *Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu by using molecular markers. **Agricultural Sci. J.** 365-6(Suppl): 36(5-6): 919-922.
- IBPGR. (1983). **Cowpea Descriptors International Board for Plant Genetic Resources.** IBPGR, Rome. 29 p.
- Jamjanta, N. (1996). Identification of *Pueraria* spp. by Molecular Biology Techniques. **M.Sc. thesis, Department of Biology,** Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Kashemsanta, L., Suvatabandhu, K., Airy Shaw, A.K. (1952). A New Species of *Pueraria* (Leguminosae) from Thailand, Yielding an Oestrogenic Principle. **Kew Bull.** 4: 549-551.
- Li, M. and Midmore, D.J. (1999). Estimating the genetic relationships of Chinese water chestnut (*E. dulcis* (Burm.f.) Hensch) cultivated in Australia, using RAPDs. **J. of Hort and Biotech.** 74 (2): 224-231.
- Mackie WW, Smith FL. (1935). Evidence of field hybridization in beans. **Amer. Soc. Agron. J.** 27: 903-909.
- Manonai, J., Chittachoen, A., Theppisai, U., and Theppisai, H. (2007). Effect of *Pueraria mirifica* on vaginal health. **Menopause.** 14 (5): 919-924
- Mendes, M.D., Trindade, H., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Fontinha, S.S. and Pedro, L.G. (2009). Volatile and molecular characterization of two Portuguese endemic species: *Angelica lignescens* and *Melanoselinum decipiens*. **Biochemical Systematics and Ecology.** 37: 98-105.

- Muthusamy, S., Kanagarajan, S. and Ponnusamy, P. (2008). Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. **Plant Biotechnology**. 11(3) [online]. from: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/issue3/full/8/>
- Nei, M. (1972). Genetic Distance Between Populations. **Amer. Naturalist**. 10: 232-292.
- Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding **Euphytica**. 128: 9–17.
- Sakuanrungsirikul, S., Suntonnon, S. and Wongwarat, T. (2005a). Discrimination of Durian Cultivars Using Inter-Simple Sequence Repeat Markers. **Agricultural Sci. J.** (36) 5-6 (Suppl); 262-264.
- Sakuanrungsirikul, S., Suntonnon, S., Supakaesorn, S. and Wongwarat, T. (2005b). Genetic diversity of cultivated rambutan cultivars (*Nephlium lappaceum* L.) in Thailand as revealed by Intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **Agricultural Sci. J.** (36) 5-6 (Suppl); 265-267.
- Samittasiri, Y. (1998). **Research and Development of White Kwao Krua**. In Seminar of White Kwao Krua. Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand. pp. 21-35.
- Sitthiphrom, S. (2005). Molecular Identification of *Dimocarpus longan* L., *Curcuma* spp., *Pueraria* spp. And *Ficus* spp. By SCAR Markers. **Ph.D. of Biology. Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.**
- Tantasawat, P., Trongchuen, J., Prajongjai, T., Seehalak, W. and Jittayasothorn, Y. (2010). Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. **Scientia Horticulturae**. 124: 204-216.
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S. (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**. 120: 411-417.
- Wolfe ,A.D., Xiang, Q-Y, Kephart, S.R. (1998). Assessing hybridization in natural populations of enstemon (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR)

bands. *Molecular Ecology*. 7: 1107-1125.

Yap, I. V. and Nelson, R.J. (1996). **Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms.**

International rice research institute, Philippines. pp. 5-11.

Yeh, C.F., Yang, R.C. and Boyle, T. (1999). **POPGENE VERSION 1.31. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Quick User Guide.** University of Alberta, Alberta, Canada.

บทที่ 4

สารชักนำ AgNO₃ และ yeast extract ต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว

บทคัดย่อ

Puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. Var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยการขยายตัวของหลอดเลือด ลดการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับความดันโลหิตสูง และลดระดับน้ำตาลในเลือด วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาผลของ AgNO₃ และ yeast extract (YE) ต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ 12 ทรีตเมนต์ คือ กวาวเครือขาวที่ได้รับการฉีดพ่นที่ด้วย AgNO₃ 500 ppm, AgNO₃ 1,000 ppm, YE 2,000 ppm, YE 3,000 ppm, YE 4,000 ppm, YE 2,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 500 ppm, YE 2,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 1,000 ppm, YE 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 500 ppm, YE 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 1,000 ppm, YE 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 500 ppm, YE 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 1,000 ppm และกลุ่มควบคุม (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น) พบว่าการฉีดพ่นด้วยสารชักนำทั้ง 12 ทรีตเมนต์ ไม่ทำให้รากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง เปอร์เซ็นต์ความชื้นและสารสกัดหยาบต่อกรัม น้ำหนักแห้งแตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้ปริมาณ puerarin แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 2,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin สูงสุดคือ 169.32 µg/g dry weight (µg/gDW) และการฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ 1,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin 167.79 µg/gDW สูงกว่าการฉีดพ่นที่ความเข้มข้นระดับอื่นๆ และ/หรือร่วมกันที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ทั้งนี้การฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น ให้ปริมาณ puerarin เท่ากับ 54.73 µg/gDW

4.1 บทนำ

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. Var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] เป็นไม้เถาในพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) อนุวงศ์ Papilionoideae (Niyomdham, 1994) ที่สะสมอาหารไว้ในรากสะสมอาหารที่อยู่ใต้ดินกวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันมากในรูปแบบของยา อาหารเสริม และเครื่องสำอางค์ เนื่องจากในหัวกวาวเครือขาวมีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในเพศหญิงสะสมอยู่ (ยุทธนา สมิตะศิริ, 2541) สารสำคัญที่พบในหัวกวาวเครือขาว มี 6 กลุ่ม คือ isoflavones, isoflavone glycosides, coumestans, chromene, steroids และสารอื่นๆ (น้ำตาลกลูโคส ไขมัน โปรตีน เป็นต้น) (รุจน์ สุทธิศรี, 2547) สารในกลุ่ม isoflavone glycosides ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin เป็นต้น puerarin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และช่วยป้องกันเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Meng and Wang, 2001) และใช้ในการบำบัดรักษาภาวะผิดปกติต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบหัวใจและหลอดเลือด, มะเร็ง และเบาหวาน เป็นต้น นอกจากนี้ puerarin ยังยับยั้งการกลายลักษณะของเซลล์ที่จะเปลี่ยนไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ (Frank *et al.*, 1994) puerarin มีฤทธิ์ในการลดปริมาณของไขมันความหนาแน่นต่ำ [low-density lipoprotein, (LDL)] (Yan *et al.*, 2006) ในปัจจุบันแนวโน้มความต้องการของตลาดเพิ่มมากขึ้น ทำให้กวาวเครือขาวในสภาพธรรมชาติหมดไปอย่างรวดเร็วข้อมูลการวิจัยด้านการปลูกกวาวเครือขาวมีน้อย อย่างไรก็ตามจากการศึกษาใน พืชสมุนไพรจีน *Salvia miltiorrhiza* พบว่า yeast extract และ silver (Ag) ชักนำให้สารทุติยภูมิ phenolic acid และ tanshinones เพิ่มขึ้น (Chen *et al.*, 2001)

Park *et al.* (1994) พบว่า การใส่ yeast extract (YE) ความเข้มข้น 1 mg/ml (1,000 ppm) ลงในสารอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Pueraria lobata* สามารถชักนำให้ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoids เพิ่มขึ้น

Gagnon และ Ibrahim (1997) พบว่า การใส่ YE ความเข้มข้น 1 % (w/v) (10,000 ppm) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของ white lupin ชักนำให้เกิด genistein และ 2'-hydroxygenistein monopenyls เพิ่มขึ้น

Pitta-Alvarez, Spollansky and Giulietti (2000) พบว่า การใช้ YE และ AgNO₃ ในสารอาหารเหลวเพาะเลี้ยง *Brugmansia candida* ความเข้มข้น 0.8 mg/ml (800 ppm) และ 1 mM (169.9 ppm) ตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ scopolamine เพิ่มขึ้น

Chen *et al.* (2001) พบว่า การใช้ YE ในปริมาณ 2% (v/v) (20,000 ppm) ลงในสารอาหารเหลวสามารถชักนำให้ปริมาณของ phenolic acids (rosmarini acid และ lithospermic acid B) และ tanshinones (cryptotanshinone, tanshinone I และ tanshinone IIA) ในเนื้อเยื่อรากของ *Salvia miltiorrhiza* เพิ่มขึ้น

Hrazdina, G. (2003) พบว่า การใส่ YE ความเข้มข้น 0.3% (3,000 ppm) ลงไปในอาหารกับ

เนื้อเยื่อต้นแอปเปิ้ลที่เจริญภายใต้สภาพปลอดเชื้อที่ทำให้ cinnamyl glucose และ *p*-coumarylquinic acid เพิ่มขึ้น

Wang *et al.* (2004) พบว่า การใส่ YE เพิ่มลงไปในสารอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Perilla frutescens* เป็นปริมาณ 0.5-5% (v/v) (5,000–50,000 ppm) ตั้งแต่ต้นสามารถชักนำให้ปริมาณ anthocyanin และ triterpenoids (tormentonic acid, oleanolic acid และ ursolic acid) เพิ่มขึ้นได้

Cheng *et al.* (2005) พบว่า การใส่ YE ความเข้มข้น 106 mg-total sugar/l (106 ppm) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ของ *Cistanche deserticola* ชักนำให้เกิดการสะสม phenylethanoid glycosides เนื่องจาก YE กระตุ้น การทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL)

Ge และ Wu (2005) พบว่า YE ความเข้มข้น 100 µg/ml (100 ppm) และ Ag ความเข้มข้น 30 µg/ml (30 ppm) ใส่ลงไปอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้กับรากของ *Salvia miltiorrhiza* ปริมาณสามารถชักนำการทำงานของเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) ในวัฏจักร non-mevalonate (MVA) ทำให้ เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ tanshinone เพิ่มขึ้น

Yan *et al.* (2006) พบว่า การใช้ YE ความเข้มข้น 200 mg/L (200 ppm) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของ *Salvia miltiorrhiza* ทำให้เกิดการสะสม rosmarinic acid และสารประกอบ phenolic เพิ่มสูงกว่าการใช้ Ag ความเข้มข้น 15 µM (1.62 ppm) ทั้งนี้ เนื่องมาจากทำให้การทำงานของเอนไซม์ tyrosine aminotransferase (TAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น

Sivesind and Seguin (2006) พบว่า การฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 g/L (1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm) ให้กับ red clover (*Trifolium pretense* L.) ซึ่งปลูกในกระถางในตู้ควบคุมอุณหภูมิสามารถเพิ่มปริมาณของ genistein, daidzein, formononetin และ biochanin A ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ฉีดพ่น

ประสาร ฉลาดคิด (2546) พบว่าการฉีดพ่นสารละลายทองแดงให้กับกวาวเครือขาว ทำให้ ปริมาณ daidzein และ genistein ในรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวมีปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ความเข้มข้น 300 ppm มีการสะสม daidzein และ genistein ในรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวมากที่สุด สารประกอบทองแดงในรูปของ CuCl₂, CuSO₄ และ Cu-EDTA ทำให้การสะสม daidzein และ genistein ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

พรทิพย์ จันทรราช (2547) พบว่าการฉีดพ่นกวาวเครือขาวด้วย CuCl₂ 1,000 ppm, MnCl₂ 1,000 ppm และ FeCl₂ 1,000 ppm สามารถชักนำการสะสมสาร comestrol ในกวาวเครือขาวเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการฉีดพ่นด้วย CuCl₂ 1,000 ppm ให้ปริมาณ comestrol สูงสุด

วิโรจน์ เชาววิเศษ (2550) พบว่าการฉีดพ่นด้วย Zn ที่ความเข้มข้น 0 (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น), 50, 100, 200 และ 300 mg/L (0, 50, 100, 200 และ 300 ppm ตามลำดับ) ให้ปริมาณ puerarin เท่ากับ 87.7, 113.0, 129.0, 194.3 และ 146.3 µg/gDW ตามลำดับ และการฉีดพ่นด้วย Zn ที่ความเข้มข้น 200

mg/L (200 ppm) ทำให้กวางเครือขาวมีการสะสม puerarin มากที่สุด

บุญร่วม คิตคำ (2551) พบว่าการใช้ chitosan ที่ความเข้มข้น 1,000 mg/L (1,000 ppm) ร่วมกับ CuCl_2 ที่ความเข้มข้น 200 mg/L (200 ppm) ทำให้ปริมาณของ puerarin และ genistein ในรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนมีปริมาณสูงที่สุดและแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมี puerarin เท่ากับ 423 และ 386 $\mu\text{g/gDW}$ และมี genistein เท่ากับ 22.6 และ 22.4 $\mu\text{g/gDW}$

จากการศึกษาต่างๆข้างต้นจะเห็นได้ว่าการใช้สารชักนำ (elicitor) ต่างๆ เช่น yeast extract, chitosan, AgNO_3 , CuCl_2 , Zn เป็นต้นสามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิต่างๆเพิ่มขึ้นได้ และเนื่องจาก puerarin เป็นสารทุติยภูมิประเภทไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) ในรากสะสมอาหารของกวางเครือขาว ดังนั้นการใช้สารชักนำต่างๆดังกล่าว จึงใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวได้

งานวิจัยนี้ศึกษาการเพิ่มปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวโดยการชักนำด้วย AgNO_3 และ YE ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานความรู้ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยเพื่อการผลิตในเชิงพาณิชย์ของกวางเครือขาวต่อไป

4.2 วิธีดำเนินการวิจัย

4.2.1 สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาการผลิตพืช อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 (F3) และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 (F1) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตั้งแต่ เมษายน 2551-ธันวาคม 2552

4.2.2 แผนการทดลอง และการพ่นสารชักนำ

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ [Randomized Complete Block Design (RCBD)] ศึกษาผลของสารชักนำ คือ YE และ AgNO_3 จำนวน 12 ทรีตเมนต์ (ตารางที่ 4.1) จำนวน 3 ซ้ำ (blocks) ซ้ำละ 3 ต้น

YE ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้น คือ 0, 2,000 ppm, 3,000 ppm และ 4,000 ppm

AgNO_3 ความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น คือ 0, 500 ppm และ 1,000 ppm

โดยใช้สารชักนำแต่ละชนิดเดี่ยวๆ 5 ทรีตเมนต์ และชักนำร่วมกันโดยฉีดพ่นด้วย YE ทางใบก่อน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงฉีดพ่น AgNO_3 จำนวน 6 ทรีตเมนต์ และทรีตเมนต์ควบคุมฉีดพ่นน้ำกลั่น 1 ทรีตเมนต์ รวมทั้งหมดเป็น 12 ทรีตเมนต์ (ตารางที่ 4.1)

การทดลองต่างๆ ใช้ต้นกวางเครือขาวอายุ 2 ปี ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดจากต้นที่ซื้อต้นพันธุ์

มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระยะปลูก 3 เมตร x 3 เมตร จำนวน 10 แถว ๆ ละ 20 ต้น (ภาพที่ 4.1) ฉีดพ่นใบทั้งต้นด้วยสารชักนำให้เป็ยกชุ่มเต็มที่จนกระทั่งสารที่พ่นไหลหยดจากใบ (run off) ทำการฉีดพ่นสารชักนำ 3 ครั้ง (ในระยะใบอ่อนจนถึงใบเพสลาด)

ครั้งที่ 1 มิถุนายน 2551

ครั้งที่ 2 กรกฎาคม 2551

ครั้งที่ 3 สิงหาคม 2551

เมื่อให้สารชักนำครั้งที่ 3 ไปแล้วเป็นเวลา 1 เดือน ชุดตัวอย่างของหัวกวาวเครือขาว เลือกหัว กวาวเครือขาวที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกันในแต่ละทรีตเมนต์ ล้างน้ำให้สะอาด ปอกเปลือกหัวกวาวเครือขาว เอาเฉพาะเนื้อสีขาวข้างใน หั่นหัวกวาวเครือขาวเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบลมร้อน ที่ 50°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด ชนิด ultra centrifuge mill ของ Retsch® solutions in Milling & Sieving เมือง Haan ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี จนได้ผงกวาวเครือขาวที่มีขนาดอนุภาค 100 mesh เก็บในตู้ ควบคุมอุณหภูมิ 24°C และความชื้น 31%

ตารางที่ 4.1 การจัดทรีตเมนต์ของการทดลองแบบ RCBD มี 2 ปัจจัย 12 ทรีตเมนต์

ทรีตเมนต์	Yeast extract (ppm)	AgNO ₃ (ppm)
ทรีตเมนต์ที่ 1 (T1) กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	0	0
ทรีตเมนต์ที่ 2 (T2)	0	500
ทรีตเมนต์ที่ 3 (T3)	0	1,000
ทรีตเมนต์ที่ 4 (T4)	2,000	0
ทรีตเมนต์ที่ 5 (T5)	2,000	500
ทรีตเมนต์ที่ 6 (T6)	2,000	1,000
ทรีตเมนต์ที่ 7 (T7)	3,000	0
ทรีตเมนต์ที่ 8 (T8)	3,000	500
ทรีตเมนต์ที่ 9 (T9)	3,000	1,000
ทรีตเมนต์ที่ 10 (T10)	4,000	0
ทรีตเมนต์ที่ 11 (T11)	4,000	500
ทรีตเมนต์ที่ 12 (T12)	4,000	1,000

4.2.4 การหาปริมาณของ puerarin ด้วย HPLC (High Performance Liquid

Chromatography)

ใช้วิธีของ Zhang *et al.* (1999) และ วิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550)

นำสารสกัดกาวเครือขาวจากข้อ 4.2.3 แต่ละตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองไนลอน เมมเบรน ขนาด 0.45 μm เก็บสารละลายที่กรองได้ใน vial ขนาด 1.5 ml วิเคราะห์ด้วย HPLC (hewlett-packard 1050 series) ใช้ diode array เป็น detector โดยฉีดสารสกัดแต่ละตัวอย่างปริมาตร 20 μl 2 ครั้ง ผ่านคอลัมน์ชนิด RP-C₁₈ agilent® column (4.6x150 มิลลิเมตร) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์เท่ากับ 5 μm ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งประกอบด้วย 0.1 % (v/v) acetic acid ในน้ำ (A) และ 0.1 % (v/v) acetic acid ใน acetonitrile (B) โดยทำเป็น gradient (ตารางที่ 4.2) อัตราการเคลื่อนที่ 1.0 ml/min ตรวจสอบ puerarin ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 256 nm อุณหภูมิของ column ที่ใช้เท่ากับ 35 °C คำนวณพื้นที่ใต้กราฟด้วยโปรแกรม Chem station 3D (hewlett-packard company, scientific instruments division) เปรียบเทียบตำแหน่งของสาร puerarin ในสารสกัดกาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างกับสาร puerarin มาตรฐาน แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟของ puerarin ที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดกาวเครือขาวมาคำนวณหาปริมาณ โดยกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่เตรียมจากสาร puerarin มาตรฐาน ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm วิเคราะห์ในสภาวะเดียวกับสารสกัดกาวเครือขาว

ตารางที่ 4.2 gradient ของเฟสเคลื่อนที่ชนิด (A) และชนิด (B)

เวลา (นาที)	ปริมาณของเฟสเคลื่อนที่ (เปอร์เซ็นต์)	
	(A)	(B)
0	90	10
35	72	28
45	72	28

4.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของ puerarin ที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดกาวเครือขาวในแต่ละทริตเมนต์และแต่ละซ้ำ คำนวณปริมาณ puerarin จากกราฟมาตรฐานดังแสดงในภาพผนวกที่ 4 วิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance : ANOVA) ของปริมาณ puerarin ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SPSS Vol. 13 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

4.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.3.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ความชื้น ของรากสะสมอาหารกวาวเครือขาว

การฉีดพ่นด้วยสารชักนำทั้ง 12 ทริตเมนต์ ไม่ทำให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าระหว่าง 5.06-9.88 cm ดังแสดงในตารางที่ 4.3 สอดคล้องกับการทดลองของวิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) เนื่องจากการเจริญและพัฒนาการของพืชโดยทั่วไปจะเกิดขึ้นทีละน้อย และเป็นไปอย่างช้า ๆ ดังนั้นการเจริญของใบ ลำต้น และราก การเจริญของรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวจึงอาจเกิดขึ้นช้าจึงทำให้ขนาดของรากสะสมอาหารไม่มีความแตกต่างกัน (สมบุญ เทชภิญญาวัฒน์, 2548) นอกจากนี้ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ความชื้นของรากสะสมอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่า น้ำหนักสดของรากอยู่ระหว่าง 773.33-2,166.67 g (ตารางที่ 4.3) น้ำหนักแห้งมีค่าระหว่าง 95-283.33 g ดังแสดงในตารางที่ 4.3 น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้งของรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวทั้ง 12 ทริตเมนต์มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 6.88:1-10.53:1 g/g (ตารางที่ 4.4) และมีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวอยู่ระหว่าง 84.02-90.20% (ตารางที่ 4.4) สอดคล้องกับผลการทดลองของวิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) ซึ่งอาจเป็นผลจากการให้น้ำกับกวาวเครือขาวอย่างสม่ำเสมอระหว่างการทดลองโดยให้น้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ความชื้นในดินมีความสม่ำเสมอ ทำให้อัตราการดูดและคายน้ำไม่แตกต่างกัน (ปิยะดา ธีรกุลพิศุทธิ์, 2554)

ตารางที่ 4.3 ผลของสารชักนำต่อ เส้นผ่าศูนย์กลาง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของรากสะสมอาหารกวางเครือขาว

พรีตเมนต์	เส้นผ่าศูนย์กลางของ รากสะสมอาหาร กวางเครือขาว (cm)	น้ำหนักสดของ รากสะสมอาหาร กวางเครือขาว (g)	น้ำหนักแห้งของ รากสะสมอาหาร กวางเครือขาว (g)
T1-กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	7.18	1,222.67	121.67
T2-AgNO ₃ (500 ppm)	8.42	2,216.67	245.00
T3-AgNO ₃ (1,000 ppm)	6.93	1,046.67	98.33
T4-YE(2,000 ppm)	5.06	1,453.33	175.00
T5-YE (2,000 ppm) + AgNO ₃ (500 ppm)	6.39	773.33	103.33
T6-YE (2,000ppm) + AgNO ₃ (1,000 ppm)	8.79	1,160.00	123.33
T7- YE (3,000 ppm)	6.41	2,166.67	283.33
T8- YE (3,000 ppm) + AgNO ₃ (500 ppm)	7.19	950.00	118.33
T9- YE (3,000 ppm) + AgNO ₃ (1,000 ppm)	9.88	1,443.33	143.33
T10- YE (4,000 ppm)	7.16	943.33	95.00
T11- YE (4,000 ppm) + AgNO ₃ (500 ppm)	6.06	1,260.00	135.00
T12- YE (4,000 ppm) +AgNO ₃ (1,000 ppm)	7.81	1043.33	106.67
CV (เปอร์เซ็นต์)	22.28	36.56	33.26

ตารางที่ 4.4 ผลของสารชักนำต่อ น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ความชื้นของราก
 สะสมอาหารกวางเครือขาว

ทรีตเมนต์	น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง ของรากสะสมอาหาร กวางเครือขาว (g/g)	เปอร์เซ็นต์ความชื้น ของราก สะสมอาหารกวางเครือขาว
T1-กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	9.89 : 1	89.73
T2-AgNO ₃ (500 ppm)	9.30 : 1	89.18
T3-AgNO ₃ (1,000 ppm)	10.53 : 1	90.20
T4-YE(2,000 ppm)	7.16 : 1	84.30
T5-YE(2,000 ppm) + AgNO ₃ (500 ppm)	6.88 : 1	84.02
T6-YE(2,000 ppm) + AgNO ₃ (1,000 ppm)	9.68 : 1	89.44
T7- YE(3,000 ppm)	7.61 : 1	86.80
T8- YE(3,000 ppm) + AgNO ₃ (500 ppm)	8.00 : 1	87.13
T9- YE(3,000 ppm) + AgNO ₃ (1,000 ppm)	9.89 : 1	89.78
T10- YE(4,000 ppm)	10.02 : 1	89.96
T11- YE(4,000 ppm) + AgNO ₃ (500 ppm)	9.90 : 1	89.72
T12- YE(4,000 ppm) + AgNO ₃ (1,000 ppm)	9.15 : 1	88.64
CV (เปอร์เซ็นต์)	20.64	3.65

4.3.2 ผลของสารชักนำต่อปริมาณสารสกัดจากรากสะสมอาหารกวางเครือขาว

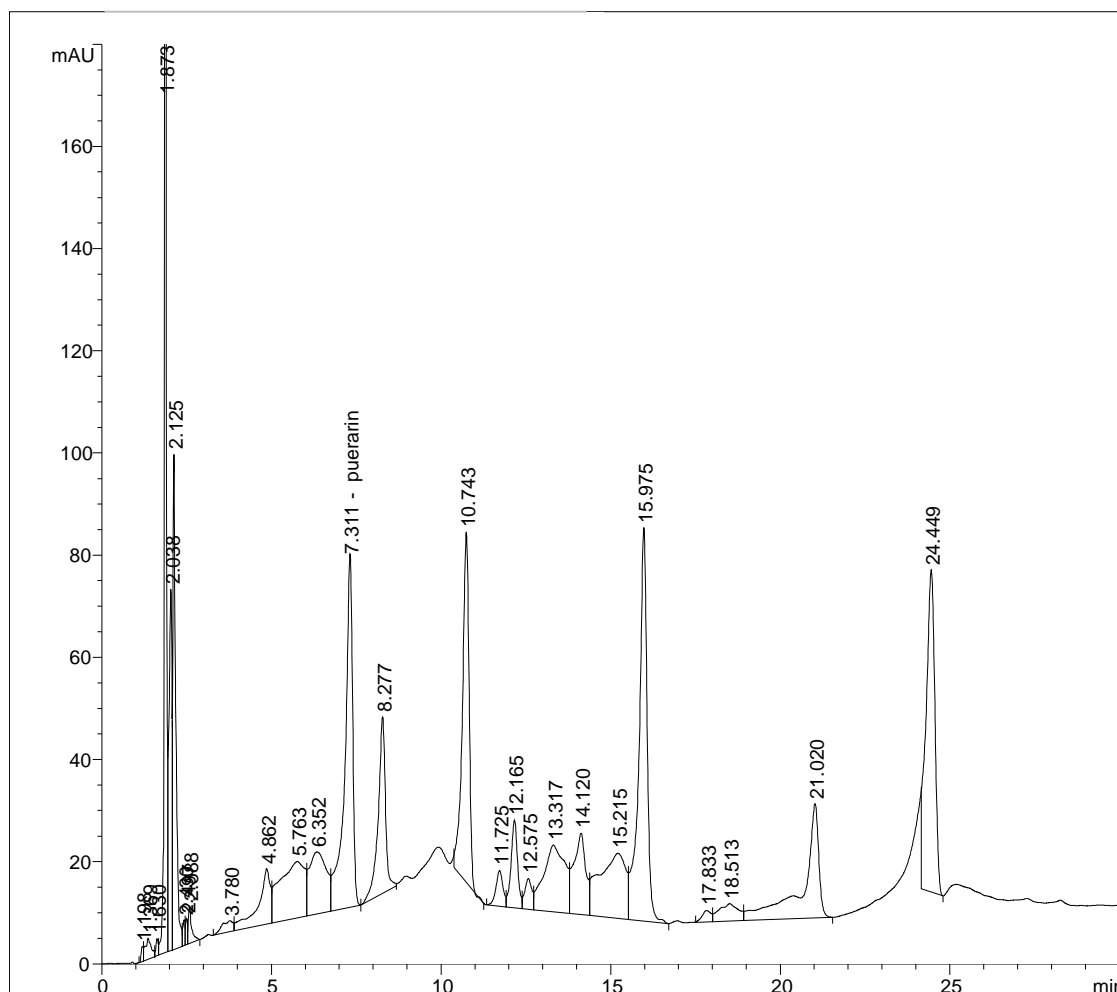
การใช้สารชักนำทั้ง 12 ทรีตเมนต์ ให้ค่าสารสกัดไม่แตกต่างกันทางสถิติ (74.43-157.36 mg/gDW) แต่มีแนวโน้มของการที่สารชักนำ YE ความเข้มข้น 4,000 ppm ให้สารสกัดสูงสุดคือ 157.36 mg/gDW สูงกว่าความเข้มข้น YE ที่ต่ำกว่า และสูงกว่าปริมาณ 129.94 mg/gDW ที่ได้จากการชักนำด้วย YE ความเข้มข้น 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ ความเข้มข้น 500 ppm และสูงกว่าปริมาณที่ได้จาก control ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับของบุญร่วม คิคคำ (2551) ที่พบว่าปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวที่อยู่ใน growth chamber ที่ชักนำด้วย chitosan, salicylic acid และ CuCl₂ ไม่แตกต่างกัน แต่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณสารสกัดจากรากสะสมอาหารที่ปลูกในโรงเรือน ที่ให้สารสกัด 32-47.7 mg/gDW) และที่ได้จากในแปลงปลูก คือ 53.7-79.8 mg/gDW

ตารางที่ 4.5 ผลของสารชักนำต่อ ปริมาณสารสกัด จากรากสะสมอาหารกวาวเครือขาว

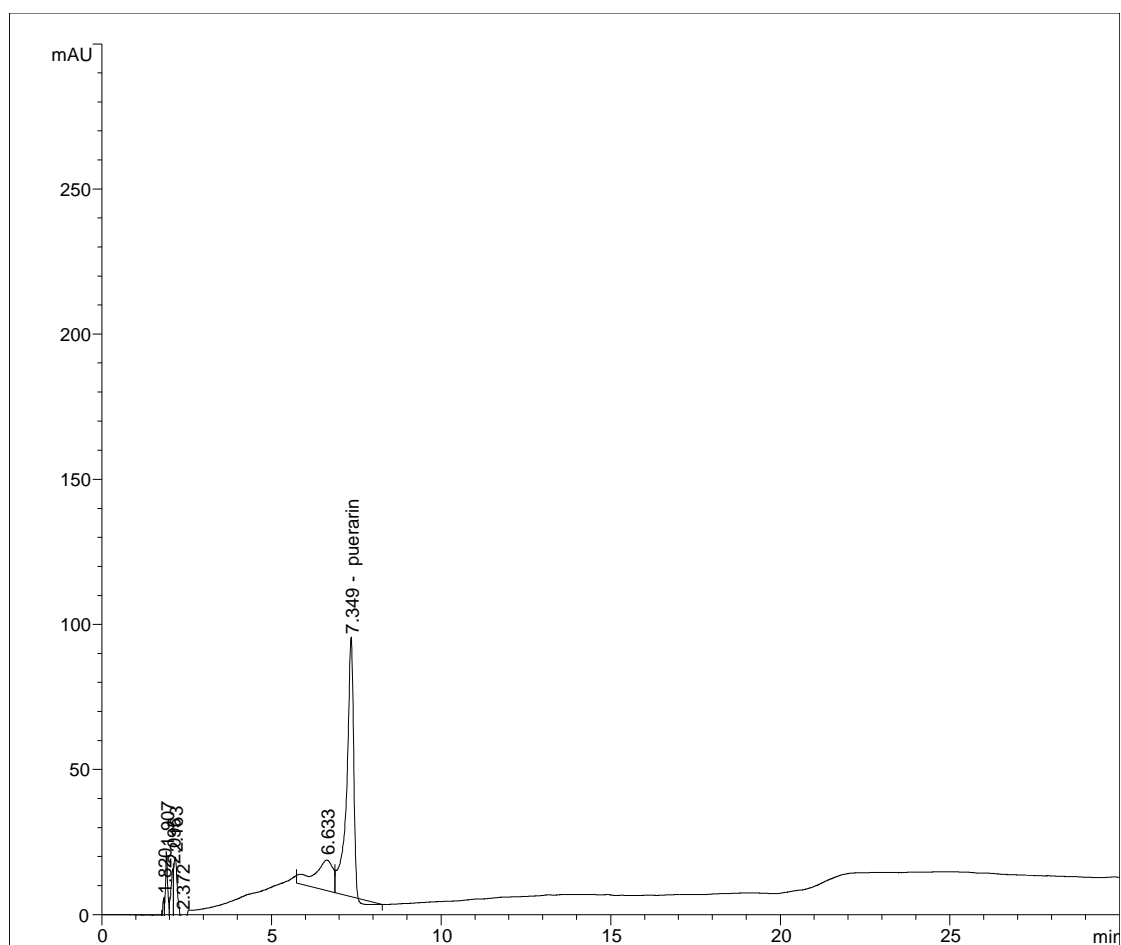
ทรีตเมนต์	สารสกัด (mg/gDW) ของรากสะสมอาหารกวาวเครือขาว
T1-กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	109.42
T2-AgNO ₃ (500 ppm)	81.15
T3-AgNO ₃ (1,000 ppm)	81.19
T4-YE(2,000 ppm)	98.76
T5-YE(2,000 ppm) + AgNO ₃ (500 ppm)	97.87
T6-YE(2,000 ppm) + AgNO ₃ (1,000 ppm)	107.73
T7- YE(3,000 ppm)	74.43
T8- YE(3,000 ppm) + AgNO ₃ (500 ppm)	129.94
T9- YE(3,000 ppm) + AgNO ₃ (1,000 ppm)	88.43
T10- YE(4,000 ppm)	157.36
T11- YE(4,000 ppm) + AgNO ₃ (500 ppm)	126.00
T12- YE(4,000 ppm) + AgNO ₃ (1,000 ppm)	116.12
CV (เปอร์เซ็นต์)	20.09

4.3.3 ผลของสารชักนำต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารกวาวเครือขาว

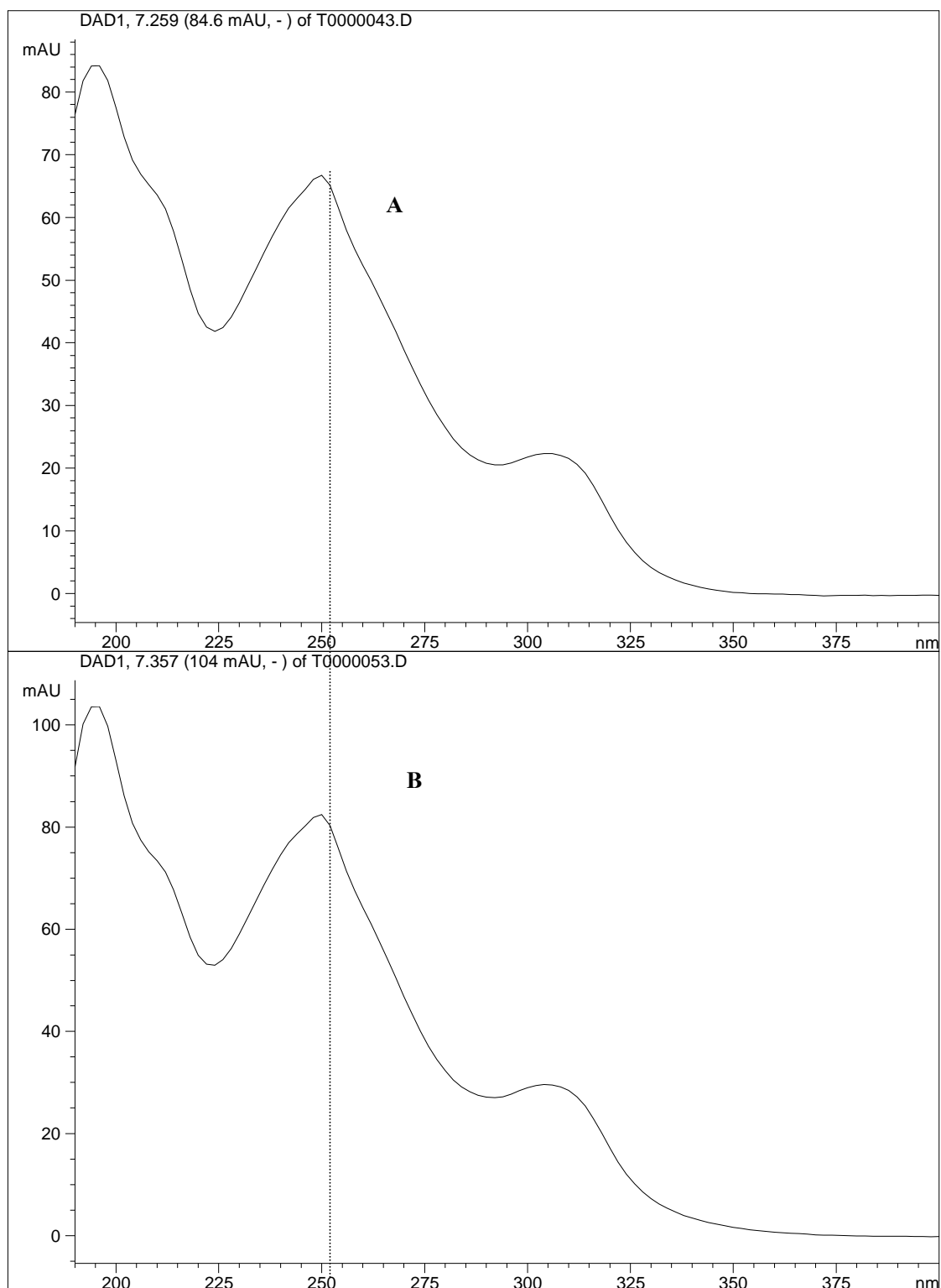
จากการวิเคราะห์ puerarin ที่สกัดจากรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวด้วย HPLC พบว่า retention time ของ puerarin จากสารสกัดอยู่ที่ 7.314 ± 0.08 นาที และ retention time ของ puerarin มาตรฐานอยู่ที่ 7.128 ± 0.24 นาที (ภาพที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ) จากการศึกษ UV spectrum ของ puerarin สกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว และของ puerarin มาตรฐาน พบว่าลักษณะของการดูดกลืนแสงเหมือนกัน (ภาพที่ 4.4) ปริมาณของ puerarin เติบโตจากการทดลอง 3 ชั่วโมง คำนวณจากพื้นที่ peak ของ puerarin จากสารสกัดกวาวเครือขาวเปรียบเทียบกับ puerarin มาตรฐาน แสดงในตารางที่ 4. 6 และภาพผนวกที่ 4



ภาพที่ 4.2 ตัวอย่าง HPLC โครมาโตแกรมของ puerarin จากสารสกัดรากสะสมอาหารของ กวาวเครือขาว ตรวจหาโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 256 nm



ภาพที่ 4.3 ตัวอย่าง HPLC โครมาโตแกรมของ puerarin มาตรฐาน ตรวจสอบโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 256 nm



ภาพที่ 4.4 UV spectrum โครมาโตแกรม puerarin จากสารสกัดรากสะสมอาหารของ กวาวเครือขาว (A) และ puerarin มาตรฐาน (B) ตรวจสอบโดยใช้แสง อัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 256 nm

รากสะสมอาหารของกวางเครือขาวที่เก็บเกี่ยว หลังฉีดพ่นสารชักนำทั้ง 12 ทริตเมนต์ ครั้งที่ 3 ไปแล้ว 1 เดือน พบว่า ปริมาณ puerarin มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการฉีดพ่นสารชักนำ YE ความเข้มข้น 2,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin เฉลี่ยสูงสุด คือ 169.32 $\mu\text{g/gDW}$ ซึ่งสูงกว่าปริมาณ puerarin ที่ได้จากการชักนำด้วย YE ความเข้มข้น 3,000 และ 4,000 ppm คือ 77.14 และ 60.59 $\mu\text{g/gDW}$ ตามลำดับ ซึ่งไม่สูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tawaha, Segun, Smith และ Beaulieu (2005) ที่พบว่า การใช้ YE ความเข้มข้น 2,000 ppm สามารถเพิ่ม daidzein, genistein, glyciein และ total isoflavones ขึ้นได้ในถั่วเหลือง และ Sivesind และ Seguin (2006) พบว่า การใช้ YE ความเข้มข้น 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm ทำให้ปริมาณของ total isoflavone เพิ่มขึ้น 12% จาก control ใน red clover (*Trifolium pretense* L.) การที่ YE สามารถกระตุ้นการสร้าง puerarin ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิให้เพิ่มขึ้น ในพืชได้นั้นอาจเกิดจาก YE ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในกระบวนการไกลโคไลซิส 2 เอนไซม์ คือ fructose-1,6-bis-phosphatase และ aldolase (ภาพผนวกที่ 5) ที่นำไปสู่การสังเคราะห์ phosphoenol pyruvate (PEP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารกลุ่ม flavonols, flavones และ isoflavones (สมบุญ เตชภิญญาวัฒน์, 2548) นอกจากนี้ YE อาจมีผลต่อเอนไซม์อื่นบนวิถีสังเคราะห์ puerarin เช่นกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ flavones synthase เปลี่ยน naringenin เป็น flavone หรือเอนไซม์ isoflavone synthase เปลี่ยน flavones เป็น isoflavones (Ge and Wu, 2005) แต่เมื่อความเข้มข้นของ YE เพิ่มขึ้นอาจทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสองลดลง หรืออาจไปลดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ PAL ทำให้ปริมาณสารเริ่มต้นของการสังเคราะห์ puerarin ลดลง (ภาพผนวกที่ 5) สอดคล้องกับผลของ Yan *et al.* (2006) พบว่า การใช้ YE ความเข้มข้น 200 mg/L (200 ppm) ทำให้เกิดการสะสม RA และสารประกอบ phenolic เพิ่มสูงกว่าการใช้ Ag ความเข้มข้น 15 μM (1.62 ppm) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของ *S. miltiorrhiza* ซึ่ง YE มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ tyrosine aminotransferase (TAT) สังเคราะห์ rosmarinic acid และสารประกอบ phenolic เพิ่มขึ้น ได้แก่ 3,4-dihydroxyphenyllactic acid (3,4-DHPLA) แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ PAL ความเข้มข้นของ YE ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองลดลง ดังแสดงในภาพผนวกที่ 6 Kim และ Yoo (1996) พบว่า การใช้ YE ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแครอทชักนำให้การทำงานของ PAL เพิ่มขึ้นได้ และทำให้ปริมาณ phenolic ของรากแครอทลดต่ำในระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้นการชักนำให้การทำงานของ PAL เพิ่มขึ้นน่าจะขึ้นกับชนิดของพืชที่ถูกชักนำ และชนิดของสารชักนำ

การใช้สารชักนำ AgNO_3 ทั้ง 2 ความเข้มข้นพบว่า AgNO_3 ความเข้มข้น 1,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin 102.87 $\mu\text{g/gDW}$ ซึ่งสูงกว่าปริมาณที่ได้จากการชักนำด้วย AgNO_3 500 ppm คือ 49.87 $\mu\text{g/gDW}$ (ตารางที่ 4.6) AgNO_3 อาจไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ fructose-1,6-bis-phosphatase และ aldolase นำไปสู่การสังเคราะห์ PEP ซึ่งเข้าสู่ shikimic acid pathway หรือ

อาจไปกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ PAL ทำให้เกิดการสังเคราะห์ puerarin เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ AgNO_3 อาจมีผลต่อเอนไซม์อื่นบนวิถีสังเคราะห์ puerarin เช่นกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ flavones synthase เปลี่ยน naringenin เป็น flavone หรือเอนไซม์ isoflavone synthase เปลี่ยน flavones เป็น isoflavones โดยความเข้มข้นของ AgNO_3 ที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสองเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณสารเริ่มต้นของการสังเคราะห์ puerarin เพิ่มขึ้น (ภาพผนวกที่ 5) Ardakani, Hemmati และ Mohagheghzaden (2005) พบว่า การใส่ Ag 1 mM (169.9 ppm) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Linum album* ทำให้ปริมาณ podophyllotoxin (PTOX) เพิ่มขึ้น 0.24 % เป็นผลของ Ag ต่อการผลิต PTOX อาจเป็นผลโดยอ้อมที่เกิดจาก ethylene เนื่องจาก ethylene เป็นทั้งตัวกระตุ้นและยับยั้งในยีนที่ต่างกันซึ่งเป็นตัวควบคุมการทำงานของเอนไซม์ deoxy-podophyllotoxin 7-hydroxylase (ภาพผนวกที่ 7) Alvarez, Spollansky และ Giulietti, 2000 และ Yan *et al.* (2006) พบว่าการใช้ Ag ความเข้มข้น 15 μM (1.62 ppm) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของ *S. miltiorrhiza* มีผลต่อการสังเคราะห์ RA และ สารประกอบ phenolic (ภาพผนวกที่ 6) เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ TAT และ PAL โดยเอนไซม์ TAT จะเปลี่ยน L-Tyrosine เป็น 4-hydroxyphenylpyruvic acid และเอนไซม์ PAL เปลี่ยน L-Phenylalanine เป็น *t*-Cinnamic acid ขั้นตอนสุดท้ายเกิดการสังเคราะห์ RA และสารประกอบ phenolic ดังแสดงในภาพผนวกที่ 6 ทั้งนี้ในการใช้ AgNO_3 น่าจะมีการศึกษาต่อไป เนื่องจากผลการทดลองการใช้ AgNO_3 เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นสูงถึง 1,000 ppm ยังไม่ทำให้ค่าปริมาณ puerarin ลดลง

การใช้สารชักนำ AgNO_3 และ YE นิดพ่นเดี่ยวๆ พบว่า YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin 169.32, 77.14 และ 60.59 $\mu\text{g/gDW}$ ตามลำดับ สูงกว่าการชักนำโดย AgNO_3 ความเข้มข้น 500 และ 1,000 ppm ซึ่งให้ puerarin 49.87 และ 102.87 $\mu\text{g/gDW}$ ตามลำดับ

จากผลการทดลองนิตพ่น YE 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 1,000 ppm พบว่าได้ปริมาณ puerarin 167.79 $\mu\text{g/gDW}$ ซึ่งสูงกว่าปริมาณที่ได้จากการนิตพ่นร่วมกันที่ความเข้มข้นอื่น ๆ และการนิตพ่นด้วย YE 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 500 ppm ให้ปริมาณ puerarin ต่ำสุด คือ 26.04 $\mu\text{g/gDW}$ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 จากการศึกษาของ Yan *et al.* (2006) พบว่าการใส่ YE และ Ag ร่วมกันทำให้เกิดการสะสม rosmarinic acid เพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ TAT และจากการศึกษาของ Ge และ Wu (2005) พบว่า การใส่ YE และ Ag ร่วมกันในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของ *Salvia miltiorrhiza* สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ tanshinone เนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase (HMGR) และ 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) ซึ่งเปลี่ยน pyruvate และ glyceraldehyde-3-phosphate (GA-3A) เป็น 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate ใน Mevalonate-independent pathway ที่ plastid วิถีสังเคราะห์ isoprenoid ได้แก่ diterpenes และ monoterpenes เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ tanshinone ดังแสดงในภาพผนวกที่ 8

ตารางที่ 4.6 ผลของสารชักนำต่อ puerarin จากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว 12 ทริตเมนต์

ทริตเมนต์	ค่าเฉลี่ย puerarin ($\mu\text{g/g DW}$)
T1-กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	54.73 bc
T2- AgNO_3 (500 ppm)	49.87 bc
T3- AgNO_3 (1000 ppm)	102.87 ab
T4-YE(2000 ppm)	169.32 a
T5-YE(2000 ppm) + AgNO_3 (500 ppm)	42.03 bc
T6-YE(2000 ppm) + AgNO_3 (1000 ppm)	60.43 bc
T7- YE(3000 ppm)	77.14 bc
T8- YE(3000 ppm) + AgNO_3 (500 ppm)	68.39 bc
T9- YE(3000 ppm) + AgNO_3 (1000 ppm)	167.79 a
T10- YE(4000 ppm)	60.59 bc
T11- YE(4000 ppm) + AgNO_3 (500 ppm)	26.04 c
T12- YE(4000 ppm) + AgNO_3 (1000 ppm)	28.51 c
CV* (เปอร์เซ็นต์)	26.76

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี DMRT

: ค่า CV จากการ transform ด้วยวิธีถดถอยที่ 2 (ตารางผนวกที่ 4 และ 5)

4.4 สรุปผลการวิจัย

การฉีดพ่นกวาวเครือขาวทางใบด้วยสารชักนำ YE และ AgNO_3 ทั้ง 12 ทริตเมนต์ ไม่ทำให้กวาวเครือขาวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง เปอร์เซ็นต์ความชื้นและสารสกัดต่อกรัมน้ำหนักแห้งของรากสะสมอาหารแตกต่างกันทางสถิติ แต่ทำให้ปริมาณ puerarin แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 2,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin สูงสุดคือ 169.32 $\mu\text{g/gDW}$ และสูงกว่าปริมาณที่ได้จากการฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 1,000 ppm ซึ่งให้ปริมาณ puerarin 167.79 $\mu\text{g/gDW}$ ซึ่งสูงกว่าการฉีดพ่นด้วยสารชักนำร่วมกันที่ความเข้มข้นอื่น ดังนั้นจึงควรชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณ puerarin ด้วย YE ความเข้มข้น 2,000 ppm เพียงสารเดียว เนื่องจาก ปริมาณ YE ที่ใช้ต่ำกว่าปริมาณที่ใช้ในสารชักนำร่วม และไม่ต้องใช้ AgNO_3 ที่มีราคาสูงกว่า YE เป็นการลดค่าใช้จ่ายสารชักนำให้กับเกษตรกร นอกจากนี้ AgNO_3 ที่ตกค้างอยู่หลังจากการฉีดพ่นยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

4.5 รายการอ้างอิง

- ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์. (2545). **สรีรวิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพของพืชเมืองต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 227 หน้า.
- ยุทธนา สมิตะสิริ. (2541). **ภาพรวมงานวิจัยและพัฒนาควาวเครือขาว**. สัมมนาวิชาการเรื่องควาวเครือ. หน้า 21-35.
- รุจน์ สุทธิศรี. (2547). สารเอสโตรเจนจากพืช (phyoestrogen). ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2548). **ชีววิทยาพืช**. กรุงเทพฯ: จามจุรีโปรดักท์. 297 หน้า.
- Alvarez, S.P., Spollansky, T.C. and Giulieti, A.M. (2000). The influence of biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropan alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology**. 26: 252-258.
- Ardakani, M.S., Hemmati, S. and Mohagheghzadeh, A. (2005). Effect of elicitors on the enhancement of podophyllotoxin biosynthesis in suspension cultures of *Linum album*. **DARU**. 13(2): 56-60.
- Chen, H., Chen, F., Chiu, F.C.K. and Lo, C.M.Y. (2001). The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. **Enzyme and Microbial Technology**. 28: 100-105.
- Cheng, X.Y., Guo, B., Zhou, H.Y., Ni, W. and Liu, C.Z. (2005). Repeated elicitation enhances phenylethanoid glycosides accumulation in cell suspension cultures of *Cistanche deserticola*. **Biochemical Engineering Journal**. 24: 203-207.
- Frank, A.A., Custer, L.J., Cerna, C.M. and Narala, K.K. (1994). Quantixation of phytoestrogen in legume by HPLC. **J.Agric.Food Chem**. 42: 1905-1913.
- Gagnon, H และ Ibrahim, R. (1997). Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. **Phytochemistry**. 44(8): 1463-1467.
- Ge, X. and Wu, J. (2005). Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor. **Plant Science**. 168: 487-491.
- Hrazdina, G. (2003). Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (Liberty) apple tissue to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*. **Phytochemistry**. 64: 485-492.

- Kim, Y.H. and Yoo, Y.J. (1996). Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. **Enzyme Microb. Techol.** 18: 531-535.
- Li, M.Q., Sheng, X. and Shao, X.G. (2003). Separation and determination of *Pueraria lobata* isoflavonoid extract by reverse phase high performance liquid chromatography. **Fenxi Huaxue.** 31: 178-180.
- Meng, D.S. and Wang, S.L. (2001). Antitumor effect of quercetin. **Chin.Tradit.Herb.Drugs.** 32: 186-188.
- Niyondham, C. (1994). Key the Genera of Thai Papilionaceous Plant. **Thai For. Bull. (Bot.)** 22: 26-88.
- Park, H.H., Hakamatsuka, T., Sankawa, U. and Ebizuka, Y. (1994). Rapid metabolism of isoflavonoids in elicitor-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*. **Phytochemistry.** 38(2): 373-380.
- Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C. and Giulietti, M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology.** 26: 252-258.
- Seidel, V., Windhovel, J., Eaton, G., Alfermann, A.W., Arroo, R.R.J., Medarde, M., Petersen, M., and Wolley, J.G. (2002). Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. **Planta.** 215: 1013-1039.
- Sivesind, E and Seguin, P. (2006). Effects of Foliar Application of Elicitors on Red Clover Isoflavone Content. **J. Agronomy & Crop Science.** 192: 50-54.
- Tawaha, A., Seguin, P., Smith, D.L. and Beaulieu, C. (2005). Biotic elicitors as a means of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. **Annals of Applied Biology.** 146: 303-310.
- Wang, J.W., Xia, Z.H., Chu, J.H. and Tan, R.X. (2004). Simultaneous production of anthocyanin and triterpenoids in suspension cultures of *Perilla frutescens*. **Enzyme and Microbial Technology.** 34: 651-656.
- Yan, L.P., Chan, S.W., Chan, A.S.C., Chen, S.L., Ma, X.J. and Xu, H.X. (2006). Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Life Sciences.** 79: 324-330.

- Yan, Q., Shi, M., Ng, J and Wu, J.Y. (2006). Elicitor-induces rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Plant Science**. 170: 853-858.
- Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croses, R.A., Farder, G.M., MaGonigle, B. and Odell. J.T. (2000). Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume Dicot and monocot tissues. **Plant Physiol**. 124: 781-793.
- Zhang, Y., Tong, T.S., Cunnick, J.E., Murphy, P.A. and Hendrich, S. (1999). Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and active human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. **J Nutr**. 129: 399-405.

บทที่ 5

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือขาว

บทคัดย่อ

รากสะสมอาหารของกวางเครือขาวมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายกลุ่ม การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของ AgNO_3 และ yeast extract (YE) ต่อปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวางเครือขาว โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ 12 ทริตเมนต์ ได้แก่ กวางเครือขาวที่ได้รับการฉีดพ่นที่ด้วย AgNO_3 500 ppm, AgNO_3 1,000 ppm, YE 2,000 ppm, YE 3,000 ppm, YE 4,000 ppm, YE 2,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 500 ppm, YE 2,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 1,000 ppm, YE 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 500 ppm, YE 3,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 1,000 ppm, YE 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 500 ppm, YE 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 1,000 ppm และกลุ่มควบคุม (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น) จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือขาวทั้ง 12 ทริตเมนต์ โดยการทดสอบและเปรียบเทียบค่า IC_{50} ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่า สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 4,000 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่าเฉลี่ย IC_{50} เท่ากับ 1,031.33 $\mu\text{g/ml}$) สารสกัดที่ได้จากการฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นฉีดพ่นร่วมกับ AgNO_3 500 ppm มีค่าเฉลี่ย IC_{50} เท่ากับ 1,563, 1,668 และ 1,411.83 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นฉีดพ่นร่วมกับ AgNO_3 ความเข้มข้น 1,000 ppm (ค่าเฉลี่ย IC_{50} เท่ากับ 1,763.67, 1,748.3 และ 1,828.83 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวทั้ง 12 ทริตเมนต์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox (ค่าเฉลี่ย IC_{50} ของ trolox เท่ากับ 3.5 $\mu\text{g/ml}$) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ผลการทดลองสรุปได้ว่าการฉีดพ่นด้วย AgNO_3 และ YE น่าจะมีผลต่อการสะสมสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1 บทนำ

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdham] (ชาวลิต นิยมธรรม, 2538) เป็นพืชที่มีการใช้เป็นยาสมุนไพรมาแต่โบราณ รากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวมีสารออกฤทธิ์สำคัญหลายกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสาร หรือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpair electron) อยู่รอบนอกเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถทำลายดีเอ็นเอ ไขมัน โปรตีน และเซลล์ ก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของอวัยวะส่วนต่าง ๆ ในร่างกาย ส่งผลให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคความดันสูง โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไต และโรคอัลไซเมอร์ (Sawa *et al.*, 1999; Shrikhande, 2000; Rodrigo and Rivera, 2002; Saint-Cricq de Gaulejac *et al.*, 1999) ในปัจจุบันมีผู้ป่วยด้วยโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น การบริโภคหรือใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคดังกล่าวได้ (เฉลิมพงษ์ แสนจิม และ ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2547)

สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาวส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิกจำพวก ฟลาโวนอยด์ และไอโซฟลาโวน ได้แก่ chromenes, isoflavones, isoflavone glycosides, coumestans และ pterocarpans (Ingham *et al.*, 1998) จรรยาแสงอรุณ และคณะ (2545) ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาว กวาวเครือแดง และกวาวเครือดำ ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีสมบัติความมีขั้วต่างกัน ได้แก่ น้ำเอทานอล 70% เอทานอล 95% อะซิโตน (acetone) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และเฮกเซน (hexane) ตามลำดับ แล้วใช้เทคนิค ABTS assay ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า น้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากกวาวเครือทั้งสามชนิด กวาวเครือดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด แต่กวาวเครือดำเป็นพันธุ์ที่ค่อนข้างหายากและให้ปริมาณสารสกัดน้อยมาก ต่อมา Cherdshewasart and Sutjit (2008) ศึกษา พบว่า puerarin และ daidzein ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรากของ *Pueraria mirifica* ที่พบในประเทศไทยมีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า *Pueraria lobata* ของประเทศจีน Guerra *et al.* (2000) ศึกษาพบว่า puerarin ในสารสกัดสมุนไพรจีน *Pueraria lobata* และ Ge-geen (*Radix puerariae*) มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ สายัณห์ สวัสดิ์ศรี และคณะ (2546) พบว่า coumestrol ที่พบในกวาวเครือขาว เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระที่ยับยั้งการเกิดกระบวนการออกซิเดชันของไขมันที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง และหลอดเลือดหัวใจตีบได้ นอกจากนี้สารสกัดกวาวเครือขาวยังสามารถป้องกันเซลล์สมองตาย ที่เป็นผลมาจากการได้รับอนุมูลอิสระ และสารที่เป็นพิษต่อระบบประสาท เช่น กลูตาเมต (glutamate) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide)

ก่อนหน้านี้นี้มีการศึกษาผลของ YE ใน red clover (*Trifolium pratense*) ซึ่งปลูกกลางแจ้งในผู้ควบคุมอุณหภูมิ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของ genistein, daidzein, formononetin และ biochanin A ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ฉีดพ่น (Sivisid and Seguin, 2006) และ Yan *et al.* (2006) ใช้ Ag และ YE ร่วมกันในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของ *Salvia miltiorrhiza* ทำให้เกิดการสะสม rosmarinic acid เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ tyrosine aminotranferase เพิ่มขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของ AgNO₃ และ YE ต่อปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาว

5.2 วิธีดำเนินการวิจัย

5.2.1 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาการผลิตพืช อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F3) ระหว่างเดือนกันยายน 2551 ถึงเดือนตุลาคม 2552

5.2.2 กลุ่มตัวอย่าง วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง

1. รากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว จากการทดลองที่ 2 จำนวน 12 ทริตเมนต์ ที่ฉีดพ่นด้วยสารต่าง ๆ ดังนี้

ทริตเมนต์ที่ 1 (T1) น้ำกลั่น

ทริตเมนต์ที่ 2 (T2) AgNO₃ (500 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 3 (T3) AgNO₃ (1,000 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 4 (T4) YE (2,000 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 5 (T5) YE (2,000 ppm) ร่วมกับ AgNO₃ (500 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 6 (T6) YE (2,000 ppm) ร่วมกับ AgNO₃ (1,000 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 7 (T7) YE (3,000 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 8 (T8) YE (3,000 ppm) ร่วมกับ AgNO₃ (500 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 9 (T9) YE (3,000 ppm) ร่วมกับ AgNO₃ (1,000 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 10 (T10) YE (4,000 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 11 (T11) YE (4,000 ppm) ร่วมกับ AgNO₃ (500 ppm)

ทริตเมนต์ที่ 12 (T12) YE (4,000 ppm) ร่วมกับ AgNO₃ (1,000 ppm)

2. สารที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (C₁₈H₁₂N₅O₆) ของ Fluka เมือง steinheim ประเทศ สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

2.2 Trolox (C₁₄H₁₈O₄) ของ Sigma เมือง steinheim ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

3. อุปกรณ์ที่ใช้วัด

3.1 Spectrometer รุ่น Spectronic® 20 ของ Genesys เมืองนิวยอร์ก ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 Cuvette ชนิดหลอดแก้วกลม

5.2.3 วิธีการสกัดสารจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาว

เก็บรากสะสมอาหารกวางเครือขาวจากแปลงทดลองดังที่แสดงในบทที่ 4 หลังการฉีดพ่นสารชักนำครั้งที่ 3 ไปแล้วเป็นเวลา 1 เดือน โดยชุดตัวอย่างของรากสะสมอาหารกวางเครือขาวเลือกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกันในแต่ละทริตเมนต์ ล้างน้ำให้สะอาด ปอกเปลือกจากรากสะสมอาหารกวางเครือเอเฉพาะเนื้อสีขาวข้างใน หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบลมร้อน ที่ 50°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด ชนิด ultra centrifuge mill ของ Retsch® solutions in Milling & Sieving เมือง Haan ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี จนได้ผงกวางเครือขาวที่มีขนาดอนุภาค 100 mesh เก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 24°C และความชื้น 31% รอการสกัดต่อไป

สกัดสารจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาว ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Li *et al.* (2003) และ วิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) ชั่งผงกวางเครือขาว 10 g ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml เติมเอทานอล 80% ปริมาตร 100 ml แล้วเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 42) นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แยกเอาสารละลายส่วนที่ใสไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ water bath 50°C อุณหภูมิของ cooling water 15°C และลดความดันบรรยากาศ จนได้สารสกัดสีน้ำตาล ติดอยู่ใน flask ที่ใช้ระเหยตัวทำละลาย ชั่งน้ำหนักของสารที่สกัดจากรากสะสมอาหารกวางเครือขาว และปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยเอทานอล 80% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์ ต่อไป

5.2.4 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (DPPH assay)

วิธี DPPH assay ทำตามวิธีของทิพรัตน์ หงส์ภักทริศรี (2548) เตรียมสารละลาย DPPH ในเอทานอล 99% (DPPH solution) ความเข้มข้น 0.08 mM เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้องโดยเตรียมสารละลายนี้ก่อนการใช้ในการทดลอง 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

วิธีการทดสอบ

เจือจางสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวจากการทดลองที่ 2 ทุกทริตเมนต์ ด้วยเอทานอล 80% ให้ได้ความเข้มข้น 0, 800, 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 µg/ml นำสารสกัดที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1.5 ml มาทำปฏิกิริยากับ DPPH solution 1.5 ml ในที่มืด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยใช้เอทา

นอล 80 % เป็น blank ใช้ DPPH solution ที่ไม่เติมสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุม (DPPH solution : เอทานอล สัดส่วน 1:1) และใช้ trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คำนวณค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์ตามวิธีของ Miliauskas *et al.* (2003) ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

% Inhibition = เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ DPPH[•]

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่นำมาทดสอบ

คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ 50% (IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารสกัด เมื่อแทนค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50% ลงในสมการจะได้ค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ DPPH[•] ได้ 50% (ทิพรรัตน์ หงส์ภักทศิริ, 2548; Choavanalikit, 2004)

5.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ห่าเวียนซ์ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v. 13 for window (Levesque and SPSS Inc., 2006) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวทั้ง 12 ตรีตเมนต์ โดยใช้วิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวทั้ง 12 ตรีตเมนต์กับ trolox โดยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ independent sample t-test

5.3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

5.3.1 ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

วิธี DPPH assay เป็นวิธีที่ใช้ในการวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยหลักการ DPPH[•] เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว และดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm เมื่อผสมอนุมูลอิสระ DPPH[•] และสารสกัด สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจะให้โปรตอน (H^+)

แก่อนุมูลอิสระ DPPH[•] เมื่อนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้รับโปรตอนก็จะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (กระบวนการ radical disproportionation ของ DPPH[•] ดังแสดงในภาพที่ 2.7) ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ค่า IC₅₀ เป็นดัชนีที่ใช้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งในการทดลองหมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ 50% ค่านี้ได้จากร่างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ภาพผนวกที่ 9-21) แล้วคำนวณหาค่า IC₅₀ จากสมการเส้นตรง โดยการแทนค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50% ลงในสมการจะได้ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้

จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวทั้ง 12 ทริตเมนต์จากการทดลองที่ 2 แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ ด้วยวิธี DMRT (ตารางที่ 5.1) พบว่า สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย AgNO₃ ความเข้มข้น 500 ppm ให้ค่าเฉลี่ย IC₅₀ ต่ำกว่าการฉีดพ่นด้วย AgNO₃ ความเข้มข้น 1,000 ppm และกลุ่มควบคุม (ค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ เท่ากับ 1,639, 2,416.67 และ 2,382 µg/ml ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ซึ่งการฉีดพ่นด้วย AgNO₃ ความเข้มข้น 1,000 ppm ให้ค่าเฉลี่ย IC₅₀ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm ให้ค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ ผันแปรไปตามความเข้มข้นของ YE การฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 4,000 ppm มีค่า IC₅₀ ต่ำสุดโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ เท่ากับ 1,031.33 µg/ml)

สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นร่วมกันระหว่าง AgNO₃ และ YE ทุกระดับความเข้มข้นมีค่า IC₅₀ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ทุกความเข้มข้นมีค่า IC₅₀ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การฉีดพ่นด้วยร่วมกันระหว่าง AgNO₃ ความเข้มข้น 500 ppm และ YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1,563, 1,668 และ 1,411.83 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ถูกรับ YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm ฉีดพ่นร่วมกับ AgNO₃ ความเข้มข้น 1,000 ppm (ค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ เท่ากับ 1,763.67, 1,748.30 และ 1,828.83 µg/ml ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) (ตารางที่ 5.1)

สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นร่วมกันระหว่าง YE ความเข้มข้น 2,000 ppm และ AgNO₃ ความเข้มข้น 0, 500 และ 1,000 ppm มีค่า IC₅₀ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ค่า IC₅₀ เท่ากับ 1,600.50, 1,563 และ 1,763.67 µg/ml ตามลำดับ) แต่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5.1)

สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นร่วมกันระหว่าง YE ความเข้มข้น 3,000 ppm และ AgNO₃ ความเข้มข้น 0, 500 และ 1,000 ppm มีค่า IC₅₀ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ค่า

IC₅₀ เท่ากับ 1,951.50, 1,668 และ 1,748.33 µg/ml ตามลำดับ) แต่การฉีดพ่นร่วมกันระหว่าง YE ความเข้มข้น 3,000 ppm และ AgNO₃ ความเข้มข้น 500 และ 1,000 ppm มีค่าแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5.1)

สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วยร่วมกันระหว่าง YE ความเข้มข้น 4,000 ppm และ AgNO₃ ความเข้มข้น 0, 500 และ 1,000 ppm มีค่า IC₅₀ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า IC₅₀ เท่ากับ 1,031.33, 1,411.83 และ 1,828.83 µg/ml ตามลำดับ) ซึ่งการฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 4,000 ppm และการฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ ความเข้มข้น 500 ppm มีค่า IC₅₀ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5.1)

จากการทดลองนี้สรุปภาพรวมได้ว่า การฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 4,000 ppm ให้ค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด ฉีดพ่นด้วย AgNO₃ ที่ 500 ppm มีค่า IC₅₀ ต่ำกว่า AgNO₃ ที่ 1,000 ppm การฉีดพ่นร่วมกันระหว่าง YE และ AgNO₃ เมื่อให้ความเข้มข้นของ AgNO₃ คงที่ พบว่า ความเข้มข้นของ YE ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด เมื่อให้ความเข้มข้นของ YE คงที่ที่ 2,000 และ 3,000 ppm พบว่า ความเข้มข้นของ AgNO₃ ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเช่นเดียวกัน แต่เมื่อให้ความเข้มข้น YE คงที่ที่ 4,000 ppm กลับพบว่า ความเข้มข้นของ AgNO₃ มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้ว พบว่า การฉีดพ่นด้วย AgNO₃ ที่ 1,000 ppm, YE ที่ 3,000 ppm และฉีดพ่นระหว่าง YE ที่ 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO₃ ที่ 1,000 ppm มีค่า IC₅₀ ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดกวางเครือขาวสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ และ YE และ AgNO₃ น่าจะมีผลในการเพิ่มของสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ แต่ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของสารชักนำที่ฉีดพ่นทั้งสองชนิด

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย IC_{50} ของสารสกัดกวางเครือขาว 12 ทริตเมนต์ จากการวัดด้วยวิธี DPPH assay

กลุ่มทดลอง	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
T1-กลุ่มควบคุม(น้ำกลั่น)	2,382.00 a
T2- AgNO_3 (500 ppm)	1,639.00 bc
T3- AgNO_3 (1,000 ppm)	2,416.67 a
T4-YE(2,000 ppm)	1,600.50 bc
T5-YE(2,000 ppm) + AgNO_3 (500 ppm)	1,563.00 bc
T6-YE(2,000 ppm) + AgNO_3 (1,000 ppm)	1,763.67 b
T7- YE(3,000 ppm)	1,951.50 ab
T8- YE(3,000 ppm) + AgNO_3 (500 ppm)	1,668.00 b
T9- YE(3,000 ppm) + AgNO_3 (1,000 ppm)	1,748.33 b
T10- YE(4,000 ppm)	1,031.33 c
T11- YE(4,000 ppm) + AgNO_3 (500 ppm)	1,411.83 bc
T12- YE(4,000 ppm) + AgNO_3 (1,000 ppm)	1,828.83 ab
CV (%)	18.89%

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} ของสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาว ทั้ง 12 ทริตเมนต์กับ trolox ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ independent sample t-test พบว่า สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวทั้ง 12 ทริตเมนต์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า trolox (ค่าเฉลี่ย IC_{50} ของ trolox เท่ากับ $3.5 \mu\text{g/ml}$) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 5.2) โดยพบว่า trolox มีค่าเฉลี่ย IC_{50} ต่ำกว่าสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาว 200-700 เท่า เนื่องจาก trolox เป็นสารสกัดบริสุทธิ์ ทำให้การใช้ trolox ที่ความเข้มข้นต่ำ (มีค่า IC_{50} ความเข้มข้นต่ำ) มีประสิทธิภาพในการต้านทานอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดกวางเครือขาว

ค่าเฉลี่ย IC_{50} ของสารสกัดที่ได้จากการทดลองอยู่ในช่วง $1,031.33-2,416.67 \mu\text{g/ml}$ สูงกว่าค่า IC_{50} ในงานทดลองของ บุญร่วม คิดคำ (2551) ซึ่งพบว่า สารสกัดกวางเครือขาวจากการใช้สารชักนำ chitosan, salicylic acid และ CuCl_2 สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH \cdot ได้ มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง

ตารางที่ 5.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย IC_{50} ของ trolox กับสารสกัดกวางเครือขาว 12 ทรินเมนต์ จากการวัดด้วยวิธี DPPH assay

กลุ่มทดลอง	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
trolox	3.50
T1-กลุ่มควบคุม(น้ำกลั่น)	2,382.00 **
T2- AgNO_3 (500ppm)	1,639.00 **
T3- AgNO_3 (1000ppm)	2,416.67 **
T4-YE(2000ppm)	1,600.50 **
T5-YE(2000ppm) + AgNO_3 (500ppm)	1,563.00 **
T6-YE(2000ppm) + AgNO_3 (1000ppm)	1,763.67 **
T7- YE(3000ppm)	1,951.50 **
T8- YE(3000ppm) + AgNO_3 (500ppm)	1,668.00 **
T9- YE(3000ppm) + AgNO_3 (1000ppm)	1,748.33 **
T10- YE(4000ppm)	1,031.33 **
T11- YE(4000ppm) + AgNO_3 (500ppm)	1,411.83 **
T12- YE(4000ppm) + AgNO_3 (1000ppm)	1,828.83 **

หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

โดยวิธี independent sample t-test ระหว่าง trolox กับแต่ละทรินเมนต์

1,025-1,746 $\mu\text{g/ml}$ ผลการทดลองดังกล่าวอาจมีผลจากอิทธิพลของสารชักนำที่ใช้ในการทดลอง ความแปรปรวนของพันธุ์ และสภาพแวดล้อม จากผลการทดลองมีค่าเฉลี่ย IC_{50} ต่ำกว่าผลการทดลองของ Cherdshewasart and Sutjit (2008) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกวางเครือขาวด้วยวิธี DPPH Assay พบว่า สารสกัดกวางเครือขาว (*Pueraria mirifica*) จากแหล่งปลูกในธรรมชาติ 28 จังหวัดใน 76 จังหวัดของประเทศไทยต่ำกว่าความเข้มข้น *Pueraria lobata* จากจีน (ค่าเฉลี่ย IC_{50} เท่ากับ 2,470.38-3,376.97 กับ 2,482 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) และ Cherdshewasart, Sriwatcharakut and Malaivijitmond (2008) พบว่า สารสกัดกวางเครือขาวจาก 3 แหล่งปลูกในธรรมชาติ คือ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สระบุรี และ นครราชสีมา และใน 3 ฤดู (ฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวัดด้วยวิธี DPPH assay ด้วยค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 7,000-1,4000 $\mu\text{g/ml}$ มีค่า IC_{50} สูงกว่าผลการทดลองในการใช้สารชักนำคือ AgNO_3 และ YE อาจเนื่องจากการความเข้มข้นของ DPPH ที่ใช้แตกต่าง การละลายสารสกัด สัดส่วน และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้

จากผลการทดลองนี้พบว่า การฉีดพ่นสารชักนำ AgNO_3 และ YE สามารถเพิ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อเปรียบเทียบกับพรีติเมนต์ที่ไม่ได้ฉีดพ่นสารชักนำ เช่นเดียวกับบุญร่วม คิคคำ (2551) ที่พบว่า การใช้สารชักนำ อันประกอบด้วย Chitosan, CuCl_2 และ Salicylic acid (SA) สามารถชักนำสารฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ให้เพิ่มสูงขึ้น จากการวัดด้วย DPPH และ ferric reducing/antioxidant power (FRAP) ทั้งนี้ Vargas and Saltveit (2002) รายงานว่า YE สามารถชักนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในรากแครอทเพิ่มขึ้น หรือลดลงแปรผันตามช่วงระยะเวลาที่ทำการทดลอง Chen *et. al.* (2001) พบว่า YE ชักนำให้มีสารทุติยภูมิคือ phenolic acid และ tanshinones เพิ่มขึ้นในราก *Salvia miltiorrhiza* สอดคล้องกับ Ge and Wu (2005) ใช้สารชักนำ Ag และ YE ในราก *S. miltiorrhiza* สามารถชักนำการทำงานของเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) ในวัฏจักร non-mevalonate (MVA) ให้สูงขึ้น จึงทำให้มีการสังเคราะห์สาร tanshinone เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Yan *et al.* (2006) พบว่า Ag และ YE สามารถชักนำให้สังเคราะห์ rosmarinic acid และสารประกอบฟีนอลิกในรากของ *S. miltiorrhiza* ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ tryrosine aminotranferase ที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการชักนำการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase แต่อย่างไร ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ดังที่กล่าวมานี้ตรวจสอบด้วย enzyme assays

การศึกษาในพืชตระกูลถั่ว Tawaha *et al.* (2005) พบว่า การฉีดพ่นสารชักนำ YE ที่ความเข้มข้น 2,000 ppm เพิ่มความเข้มข้นของ genistein, daidzein, glycitein, และ isoflavone รวมในเมล็ดถั่วเหลืองเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ฉีดพ่นสารชักนำ สอดคล้องกับ Sivisid and Seguin (2006) พบว่า การฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 1,000-4,000 ppm ใน red cover (*Trifolium pretense* L.) สามารถเพิ่มปริมาณของ genistein, daidzein, formononetin และ biochanin A ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ฉีดพ่น

เป็นไปได้ว่าการฉีดพ่นสารชักนำเพื่อเพิ่มสารทุติยภูมินั้นขึ้นกับชนิดของสารชักนำ ระยะเวลาในการฉีดพ่นคือ ระยะใบแก่ก่อนระยะออกดอก ความเข้มข้นของสารชักนำ และชนิดของพืช ผลของการตอบสนองอาจเกิดจากการใช้สารชักนำร่วมกันในการกระตุ้นระบบป้องกันตัวของพืชในระยะแรก หรือการกระตุ้น เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ทั้งนี้ถั่วเขียวเป็นพืชตระกูลถั่วเช่นเดียวกับถั่วเหลือง และ red cover การใช้สารชักนำ YE มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิได้ และการใช้ AgNO_3 ร่วมกับ YE ในปริมาณที่เหมาะสมก็จะสามารถเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามการใช้ AgNO_3 ความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อพืชได้ เนื่องจากเป็นโลหะหนัก จากการสังเกตเมื่อฉีดพ่นจะทำให้เกิดจุดดำกระจายทั่วไป อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ได้ให้เพียงข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงถึง

การเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณเมื่อได้รับสารชักนำเท่านั้น แต่ยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างบทบาทสารชักนำ ต่อการตอบสนองของเซลล์พืช และการสร้างสารทุติยภูมิ

5.4 สรุปผลการวิจัย

จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากรากสะสมอาหารของ กวาวเครือขาวทั้ง 12 ทริตเมนต์ แล้วทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ด้วยวิธี DMRT พบว่า สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวที่ฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 4,000 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} เท่ากับ 1,031.33 $\mu\text{g/ml}$) และการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 ความเข้มข้น 500 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 1,563, 1,668 และ 1,411.83 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งดีกว่าการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 ความเข้มข้น 1,000 ppm (1,763.67, 1,748.3 และ 1,828.83 $\mu\text{g/ml}$) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} ของสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวทั้ง 12 ทริตเมนต์กับ trolox ด้วยวิธี independent sample t-test พบว่า สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า trolox (ค่าเฉลี่ย IC_{50} ของ trolox เท่ากับ 3.5 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่า trolox มีค่าเฉลี่ย IC_{50} ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 200-700 เท่าของสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว

5.5 รายการอ้างอิง

- จรรยา แสงอรุณ ยุทธนา สมิตะสิริ สุพักตร์ พ่วงบางโพ และ ไมตรี สุทธจิตต์. (2545). การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือ. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. 55 หน้า.
- เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2547). การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดกระชายดำและน้ำหมักชีวภาพที่สกัดจากกระชายดำ. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.irpus.org/project_file/2547_2006-08-23_R10003-47.pdf.
- ชวลิต นิยมธรรม. (2538). กวาวเครือ. อนุกรมวิธาน ก. ราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพฯ: เพื่อนพิมพ์. 495 หน้า.
- ทิพรัตน์ หงส์ภักดิ์ศิริ. (2548). รายงานวิจัย เรื่องการศึกษาและพัฒนาคุณสมบัติในกำจัดอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ไวน์ผลไม้ โดยใช้สมุนไพรและเครื่องเทศ. กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

- บุญร่วม กิดคำ. (2551). ผลของสารชักนำต่อผลผลิตและปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ของหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatbandhu) Niyomdham] และฤทธิ์ของสารในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรท (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- วิโรจน์ เชาว์วิเศษ. (2550). ผลของสังกะสีต่อการสะสม puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatbandhu) Niyomdham] และผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการคลายตัวของหลอดเลือดหนูขาว (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สายัณห์ สวัสดิ์ ศรี, บัณฑิต จันทะยานี, สุรพจน์ วงศ์ใหญ่ และ วันเพ็ญ เข้มขุนทอง. (2546). กวาวเครือขาวช่วยป้องกันเซลล์สมองบาดเจ็บใน **human neuroblastoma cells**. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 1-40 หน้า.
- Chen, H., Chen, F., Chiu, F.C.K. and Lo, C.M.Y. (2001). The effect of yeast elicitor on the growth an secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. **Enzyme and Microbial Technology**, 28: 100-105.
- Cherdshewasart, W. and Sutjit, W. (2008). Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. **Phytomedicine**. 15: 38-43.
- Cherdshewasart, W., Sriwatcharakul, S. and Malaivijitnond, S. (2008). Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. **Maturitas**. 61: 350-357.
- Ge, X. and Wu, J. (2005). Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag^+ and yeast elicitor. **Plant Science**. 168: 487-491.
- Guerra, M.C., Speroni, E., Broccoli, M., Cangini, M., Pasini, P., Minghetti, A., Crespi-Perellino, N., Mirasoli, M., Cantelli-Forti, G., and Paolini, M. (2000). Comparison between Chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin Antioxidant properties and effectgs on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. **Life Sciences**. 67: 2997-3006.
- Ingham, J.L., Tahara, S. and Dziedzic, S.Z. (1998). Minor isoflavone from root of *Pueraria mirifica*. **Z Naturforsch**. 44: 742-762.
- Li, M.Q., Sheng, X. and Shao, X.G. (2003). Separation and determination of *Pueraria lobata*

- isoflavonoid extract by reverse phase high performance liquid chromatography. **Fenxi Huaxue**. 31: 178-180.
- Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C. and Giulietti, M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology**. 26: 252-258.
- Rodrigo, R. and Rivera, G. (2002). Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. **Free Rad. Biol. Med.** 33: 409-422.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N. Glories, Y. and Vivas, N. (1999). Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Res. Int.** 32: 327-333.
- Sawa, T. Nakao, M. Akaike, T. Ono, K. and Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the antitumor-promoter effect of vegetables. **J. Agric. Food Chem.** 47: 397-402.
- Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. **Food Res. Int.** 33: 469-474.
- Sivesind, E and Seguin, P. (2006). Effects of Foliar Application of Elicitors on Red Clover Isoflavone Content. **J. Agronomy & Crop Science**. 192: 50-54.
- Tawaha, A., Seguin, P., Smith, D.L. and Beaulieu, C.. (2005). Biotic elicitors as a means of increasing isoflavone concentration of soybean seed. **Annals of Applied Biology**. 146: 303-310.
- Vargas, R.C. and Saltveit, M.E. (2002). Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism inn wounded lettuce. **Physiol. Plant.** 114: 73-84.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J and Wu, J.Y. (2006). Elicitor-induces rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Plant Science**. 170: 853-858.
- Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croses, R.A., Farder, G.M., MaGonigle, B. and Odell. J.T. (2000). Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume Dicot and monocot tissues. **Plant Physiol.** 124: 781-793.

บทที่ 6

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ตามวัตถุประสงค์ของการทดลองที่ตั้งไว้

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาวที่ปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พร้อมการคัดแยกสายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค ISSR–Touchdown PCR พบว่า กวาวเครือขาวทั้ง 36 สายต้น ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพฤกษศาสตร์จำนวน 7 ลักษณะ วิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มใช้ PCA แบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายต้นที่ 34 มีลักษณะเด่นคือ ใบมีขนาดใบเล็ก กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 23 สายต้น ลักษณะเด่นคือ ใบรูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเรียวแหลม และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 12 สายต้น ลักษณะเด่นคือ ใบรูปไข่ ฐานใบมน และปลายใบเป็นติ่งแหลม จากการจำแนกด้วย ISSR– Touchdown PCR พบว่ากวาวเครือขาวออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ 34 และสายต้นที่ 7 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยต้นที่เหลืออีก 34 สายต้น ผลของโครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่า ความแปรปรวนน่าจะเกิดจากภายในกลุ่ม ทุกต้นมีพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน และคาดว่าอาจเกิดจาก 5 แหล่งพันธุกรรม จากการทดลองนี้พบว่าการใช้เทคนิค ISSR–Touchdown PCR มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์กวาวเครือขาวได้ชัดเจนมากกว่าการใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์

2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารชักนำ (YE และ $AgNO_3$) ต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว พบว่าการฉีดพ่นด้วยสารชักนำทั้ง 12 ทริตเมนต์ ไม่ทำให้กวาวเครือขาวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง เปอร์เซ็นต์ความชื้น และสารสกัดต่อกรัมน้ำหนักแห้งของรากสะสมอาหารแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีปริมาณ puerarin แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การฉีดพ่นด้วย YE ที่ความเข้มข้น 2,000 ppm ให้ปริมาณสูงสุดคือ 169.32 $\mu g/gDW$ และการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 3,000 ppm ร่วมกับ $AgNO_3$ 1,000 ppm ให้ค่าปริมาณ puerarin 167.79 $\mu g/gDW$ สูงกว่าการฉีดพ่นร่วมกันที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว พบว่าการทดสอบสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวและเปรียบเทียบกับ IC_{50} ด้วยวิธี DPPH ทั้ง 12 ทริตเมนต์ มีค่าเฉลี่ยของ IC_{50} แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดจากกวาวเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 4,000 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} เท่ากับ 1031.33 $\mu g/ml$) สารสกัดที่ได้จากการฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm

ร่วมกับ AgNO_3 500 ppm ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} เท่ากับ 1,563, 1,668 และ 1,411.83 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm ร่วมกับ AgNO_3 ความเข้มข้น 1,000 ppm (ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} เท่ากับ 1,763.67, 1,748.3 และ 1,828.83 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) ดังนั้น AgNO_3 และ YE น่าจะมีผลต่อการสะสมสารต้านอนุมูลอิสระให้เพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจสอบสายพันธุ์กวาวเครือขาวในประเทศไทยมีข้อมูลอยู่น้อยจึงควรได้มีการตรวจสอบและจัดเก็บเป็นแหล่งพันธุกรรม เนื่องจากกวาวเครือขาวที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่แตกต่างกันจากแหล่งพันธุ์เดียวกัน การใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR จึงเป็นอีกวิธีการที่นำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวซึ่งสามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง

2. การใช้สารชักนำเพื่อให้กวาวเครือขาวมีการสะสม puerarin และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรากสะสมอาหารมากที่สุดนั้น ควรฉีดพ่นด้วย YE (ความเข้มข้น 2,000 และ 4,000 ppm ตามลำดับ) เหมาะสมกับกวาวเครือขาวที่มีอายุประมาณ 2 ปี ทั้งนี้ น่าจะสามารถนำไปใช้ได้กับสมุนไพรชนิดอื่นที่มีสารฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญ เพื่อเพิ่มคุณภาพของสมุนไพรที่ได้จากการปลูกต่อไป

3. การใช้สารชักนำ YE ชนิดเดียวสามารถเพิ่มปริมาณ puerarin สูงสุด แต่การใช้ร่วมกันระหว่าง AgNO_3 กับ YE มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ puerarin เช่นกันและควรศึกษาเพิ่มเติมโดยเฉพาะความเข้มข้น เนื่องจากต้องคำนึงถึงชนิดของพืช อายุพืช ระยะเวลาในการฉีดพ่นและต้นทุนของสารเคมีที่จะแนะนำเกษตรกรต่อไป

4. เนื่องจากในการทดลองใช้สารสกัดกวาวเครือขาวซึ่งมีสารประกอบหลายชนิดไม่เฉพาะแต่ puerarin ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อให้ได้ข้อมูลผลของสารชักนำในการเพิ่มปริมาณ puerarin และการสกัด puerarin ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ควรมีการทำการทดลองต่อไป

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผล Matrix ของกวางเครือขาวโดยใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ที่ได้จากการ
คำนวณ cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC, V 2.1 โดยใช้ Jaccard
similarity coefficient

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18
T1	1.00																	
T2	0.73	1.00																
T3	0.61	0.67	1.00															
T4	0.64	0.79	0.79	1.00														
T5	0.67	0.70	0.67	0.79	1.00													
T6	0.66	0.63	0.78	0.75	0.69	1.00												
T7	0.64	0.76	0.73	0.82	0.73	0.81	1.00											
T8	0.70	0.91	0.70	0.76	0.64	0.72	0.79	1.00										
T9	0.79	0.85	0.76	0.70	0.58	0.75	0.73	0.88	1.00									
T10	0.61	0.70	0.73	0.82	0.76	0.87	0.82	0.79	0.70	1.00								
T11	0.70	0.73	0.79	0.64	0.58	0.78	0.67	0.82	0.85	0.76	1.00							
T12	0.58	0.73	0.76	0.82	0.88	0.72	0.79	0.73	0.67	0.73	0.61	1.00						
T13	0.70	0.85	0.73	0.79	0.64	0.75	0.79	0.94	0.82	0.76	0.79	0.76	1.00					
T14	0.73	0.61	0.76	0.70	0.67	0.75	0.70	0.61	0.61	0.73	0.67	0.67	0.67	1.00				
T15	0.72	0.72	0.81	0.81	0.75	0.82	0.84	0.72	0.72	0.78	0.72	0.78	0.75	0.87	1.00			
T16	0.73	0.70	0.85	0.76	0.67	0.75	0.76	0.64	0.76	0.67	0.73	0.67	0.64	0.82	0.84	1.00		
T17	0.76	0.76	0.70	0.67	0.67	0.81	0.64	0.82	0.82	0.73	0.82	0.70	0.82	0.67	0.72	0.64	1.00	
T18	0.73	0.70	0.67	0.55	0.61	0.69	0.58	0.70	0.73	0.67	0.88	0.55	0.67	0.70	0.72	0.70	0.76	1.00
T19	0.70	0.64	0.67	0.76	0.79	0.75	0.76	0.61	0.61	0.76	0.61	0.70	0.64	0.76	0.84	0.73	0.64	0.64
T20	0.67	0.73	0.91	0.85	0.70	0.87	0.82	0.76	0.82	0.76	0.73	0.82	0.82	0.73	0.84	0.82	0.76	0.61
T21	0.73	0.73	0.82	0.70	0.58	0.75	0.67	0.82	0.82	0.67	0.91	0.64	0.85	0.70	0.75	0.76	0.82	0.79
T22	0.81	0.78	0.78	0.66	0.66	0.70	0.66	0.78	0.84	0.69	0.90	0.66	0.75	0.75	0.82	0.78	0.81	0.90
T23	0.61	0.58	0.76	0.67	0.67	0.72	0.67	0.61	0.67	0.70	0.67	0.73	0.61	0.70	0.78	0.70	0.64	0.64
T24	0.66	0.60	0.66	0.69	0.72	0.73	0.72	0.57	0.60	0.69	0.60	0.66	0.60	0.78	0.82	0.75	0.60	0.63
T25	0.58	0.67	0.73	0.82	0.67	0.75	0.79	0.67	0.64	0.76	0.64	0.73	0.70	0.73	0.87	0.73	0.61	0.70
T26	0.58	0.61	0.82	0.73	0.73	0.72	0.64	0.64	0.61	0.70	0.67	0.79	0.67	0.73	0.75	0.70	0.67	0.67
T27	0.75	0.69	0.84	0.78	0.78	0.79	0.75	0.69	0.75	0.81	0.78	0.75	0.66	0.81	0.91	0.84	0.72	0.78
T28	0.76	0.73	0.79	0.67	0.58	0.72	0.64	0.82	0.88	0.73	0.91	0.64	0.82	0.70	0.72	0.73	0.79	0.79
T29	0.64	0.64	0.94	0.79	0.70	0.81	0.70	0.67	0.73	0.79	0.73	0.73	0.70	0.76	0.81	0.79	0.73	0.64
T30	0.64	0.64	0.79	0.70	0.67	0.87	0.76	0.70	0.73	0.85	0.76	0.70	0.70	0.76	0.78	0.73	0.73	0.70
T31	0.61	0.67	0.88	0.73	0.67	0.78	0.70	0.67	0.73	0.76	0.73	0.70	0.67	0.76	0.81	0.79	0.70	0.67
T32	0.79	0.70	0.64	0.64	0.64	0.69	0.64	0.70	0.73	0.64	0.79	0.61	0.70	0.67	0.75	0.70	0.73	0.79
T33	0.64	0.61	0.76	0.67	0.67	0.78	0.70	0.67	0.70	0.76	0.76	0.70	0.61	0.73	0.81	0.79	0.67	0.73
T34	0.66	0.57	0.69	0.66	0.69	0.64	0.66	0.57	0.57	0.66	0.57	0.66	0.57	0.72	0.76	0.66	0.60	0.57
T35	0.60	0.60	0.78	0.66	0.66	0.79	0.69	0.66	0.69	0.75	0.75	0.75	0.66	0.75	0.82	0.75	0.69	0.75
T36	0.72	0.72	0.84	0.75	0.75	0.82	0.78	0.72	0.78	0.78	0.78	0.78	0.69	0.81	0.94	0.84	0.75	0.78

ตารางผนวกที่ 1 ผล Matrix ของกวางเครือขาว โดยใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ที่ได้จากการ
คำนวณ cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC, V 2.1 โดยใช้ Jaccard
similarity coefficient (ต่อ)

	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32	T33	T34	T35	T36
T1																		
T2																		
T3																		
T4																		
T5																		
T6																		
T7																		
T8																		
T9																		
T10																		
T11																		
T12																		
T13																		
T14																		
T15																		
T16																		
T17																		
T18																		
T19	1.00																	
T20	0.73	1.00																
T21	0.61	0.79	1.00															
T22	0.69	0.72	0.87	1.00														
T23	0.82	0.76	0.64	0.75	1.00													
T24	0.87	0.69	0.60	0.67	0.81	1.00												
T25	0.70	0.76	0.64	0.69	0.67	0.69	1.00											
T26	0.64	0.76	0.70	0.72	0.73	0.63	0.70	1.00										
T27	0.81	0.81	0.75	0.88	0.84	0.76	0.78	0.78	1.00									
T28	0.61	0.76	0.88	0.87	0.70	0.60	0.61	0.67	0.81	1.00								
T29	0.70	0.88	0.76	0.75	0.76	0.66	0.73	0.79	0.87	0.79	1.00							
T30	0.70	0.82	0.70	0.75	0.76	0.66	0.67	0.73	0.84	0.76	0.82	1.00						
T31	0.67	0.85	0.73	0.78	0.76	0.66	0.70	0.73	0.87	0.76	0.91	0.91	1.00					
T32	0.64	0.64	0.79	0.84	0.61	0.63	0.64	0.67	0.78	0.79	0.67	0.70	0.67	1.00				
T33	0.67	0.73	0.70	0.78	0.76	0.69	0.73	0.76	0.87	0.73	0.76	0.82	0.79	0.79	1.00			
T34	0.66	0.66	0.60	0.67	0.66	0.64	0.66	0.72	0.76	0.57	0.69	0.66	0.66	0.57	0.66	1.00		
T35	0.66	0.78	0.69	0.76	0.78	0.64	0.78	0.81	0.85	0.75	0.78	0.81	0.78	0.72	0.90	0.64	1.00	
T36	0.78	0.84	0.75	0.88	0.84	0.76	0.81	0.78	0.97	0.78	0.84	0.84	0.87	0.75	0.87	0.76	0.88	1.00

ตารางผนวกที่ 2 ผล Matrix ของกวางเครือขาว โดยใช้ลักษณะ DNA ที่ได้จากการคำนวณ cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC, V 2.1 โดยใช้ Jaccard similarity coefficient

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18
T1	1.00																	
T2	0.78	1.00																
T3	0.76	0.83	1.00															
T4	0.77	0.78	0.80	1.00														
T5	0.78	0.81	0.81	0.78	1.00													
T6	0.74	0.73	0.76	0.74	0.79	1.00												
T7	0.55	0.55	0.59	0.55	0.58	0.57	1.00											
T8	0.75	0.78	0.78	0.77	0.80	0.76	0.56	1.00										
T9	0.75	0.74	0.74	0.78	0.75	0.73	0.55	0.79	1.00									
T10	0.77	0.77	0.75	0.78	0.79	0.77	0.57	0.81	0.79	1.00								
T11	0.67	0.73	0.74	0.75	0.74	0.69	0.58	0.71	0.70	0.73	1.00							
T12	0.74	0.78	0.77	0.78	0.82	0.73	0.59	0.76	0.77	0.77	0.75	1.00						
T13	0.79	0.76	0.75	0.76	0.78	0.72	0.56	0.75	0.79	0.80	0.71	0.82	1.00					
T14	0.75	0.77	0.75	0.76	0.80	0.74	0.54	0.74	0.74	0.78	0.75	0.78	0.83	1.00				
T15	0.78	0.74	0.72	0.75	0.77	0.72	0.53	0.74	0.76	0.79	0.74	0.78	0.84	0.81	1.00			
T16	0.74	0.74	0.74	0.76	0.76	0.73	0.57	0.74	0.75	0.76	0.77	0.80	0.81	0.81	0.82	1.00		
T17	0.76	0.75	0.74	0.76	0.76	0.77	0.61	0.74	0.77	0.78	0.75	0.78	0.80	0.76	0.79	0.80	1.00	
T18	0.74	0.75	0.75	0.74	0.76	0.73	0.63	0.72	0.73	0.72	0.74	0.79	0.74	0.73	0.74	0.77	0.78	1.00
T19	0.75	0.74	0.76	0.77	0.77	0.73	0.56	0.76	0.77	0.77	0.79	0.78	0.76	0.78	0.76	0.79	0.77	0.73
T20	0.80	0.80	0.80	0.81	0.82	0.77	0.57	0.79	0.79	0.81	0.77	0.83	0.81	0.83	0.83	0.85	0.80	0.80
T21	0.76	0.80	0.81	0.81	0.82	0.75	0.58	0.77	0.75	0.76	0.77	0.83	0.80	0.77	0.76	0.78	0.78	0.77
T22	0.78	0.80	0.79	0.80	0.83	0.74	0.55	0.78	0.72	0.78	0.74	0.79	0.81	0.80	0.79	0.79	0.77	0.75
T23	0.74	0.78	0.78	0.76	0.80	0.75	0.55	0.77	0.76	0.75	0.75	0.79	0.79	0.79	0.77	0.79	0.79	0.75
T24	0.70	0.76	0.76	0.77	0.79	0.73	0.58	0.75	0.75	0.75	0.77	0.80	0.76	0.78	0.75	0.79	0.79	0.76
T25	0.72	0.76	0.77	0.76	0.79	0.73	0.59	0.75	0.75	0.74	0.78	0.79	0.76	0.80	0.76	0.80	0.78	0.79
T26	0.65	0.69	0.68	0.69	0.70	0.68	0.60	0.67	0.67	0.66	0.76	0.69	0.68	0.69	0.69	0.71	0.72	0.69
T27	0.76	0.80	0.78	0.78	0.79	0.72	0.58	0.76	0.77	0.76	0.78	0.79	0.79	0.79	0.79	0.81	0.79	0.76
T28	0.76	0.77	0.77	0.76	0.79	0.73	0.55	0.74	0.76	0.77	0.74	0.75	0.78	0.76	0.77	0.76	0.76	0.74
T29	0.75	0.76	0.74	0.77	0.79	0.72	0.54	0.74	0.75	0.76	0.76	0.77	0.78	0.80	0.81	0.81	0.77	0.76
T30	0.72	0.76	0.76	0.73	0.78	0.76	0.54	0.76	0.77	0.78	0.75	0.79	0.78	0.78	0.77	0.77	0.78	0.75
T31	0.76	0.77	0.76	0.75	0.81	0.75	0.58	0.75	0.75	0.78	0.75	0.80	0.82	0.78	0.80	0.81	0.79	0.77
T32	0.76	0.77	0.76	0.77	0.81	0.74	0.55	0.76	0.73	0.77	0.71	0.77	0.80	0.77	0.78	0.77	0.76	0.74
T33	0.65	0.66	0.66	0.65	0.67	0.64	0.59	0.65	0.64	0.65	0.71	0.69	0.70	0.67	0.69	0.68	0.70	0.71
T34	0.53	0.50	0.52	0.54	0.52	0.54	0.62	0.54	0.53	0.55	0.60	0.55	0.55	0.53	0.57	0.55	0.58	0.59
T35	0.73	0.71	0.72	0.74	0.76	0.73	0.55	0.73	0.73	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.77	0.76	0.75	0.76
T36	0.73	0.68	0.69	0.73	0.72	0.70	0.54	0.70	0.71	0.70	0.69	0.72	0.73	0.72	0.76	0.75	0.73	0.73

ตารางผนวกที่ 2 ผล Matrix ของกวางเครือขาว โดยใช้ลักษณะ DNA ที่ได้จากการคำนวณ cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC, V 2.1 โดยใช้ Jaccard similarity coefficient (ต่อ)

	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32	T33	T34	T35	T36
T1																		
T2																		
T3																		
T4																		
T5																		
T6																		
T7																		
T8																		
T9																		
T10																		
T11																		
T12																		
T13																		
T14																		
T15																		
T16																		
T17																		
T18																		
T19	1.00																	
T20	0.81	1.00																
T21	0.78	0.83	1.00															
T22	0.76	0.82	0.85	1.00														
T23	0.75	0.83	0.83	0.81	1.00													
T24	0.75	0.79	0.81	0.81	0.83	1.00												
T25	0.77	0.80	0.79	0.82	0.81	0.86	1.00											
T26	0.70	0.71	0.73	0.72	0.73	0.77	0.77	1.00										
T27	0.77	0.81	0.82	0.81	0.81	0.78	0.81	0.73	1.00									
T28	0.77	0.83	0.81	0.81	0.83	0.75	0.77	0.72	0.82	1.00								
T29	0.77	0.83	0.79	0.80	0.79	0.76	0.80	0.70	0.81	0.84	1.00							
T30	0.79	0.81	0.77	0.78	0.79	0.77	0.76	0.69	0.77	0.80	0.79	1.00						
T31	0.77	0.83	0.82	0.80	0.82	0.79	0.80	0.71	0.81	0.82	0.80	0.83	1.00					
T32	0.74	0.81	0.80	0.82	0.82	0.77	0.78	0.69	0.81	0.79	0.79	0.79	0.83	1.00				
T33	0.68	0.68	0.71	0.70	0.69	0.71	0.71	0.73	0.67	0.68	0.69	0.69	0.73	0.72	1.00			
T34	0.56	0.55	0.58	0.55	0.56	0.58	0.58	0.62	0.55	0.54	0.57	0.53	0.56	0.56	0.66	1.00		
T35	0.75	0.76	0.77	0.74	0.76	0.78	0.75	0.71	0.75	0.76	0.76	0.79	0.81	0.77	0.71	0.59	1.00	
T36	0.74	0.77	0.75	0.71	0.73	0.71	0.73	0.66	0.74	0.71	0.74	0.72	0.77	0.76	0.68	0.57	0.77	1.00

ตารางผนวกที่ 3 ผล Matrix ของกวางเครือขาว โดยใช้ลักษณะDNA และลักษณะพฤกษศาสตร์ 7
ลักษณะ ที่ได้จากการคำนวณ cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC, V 2.1
โดยใช้ Jaccard similarity coefficient

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18
T1	1.00																	
T2	0.74	1.00																
T3	0.70	0.78	1.00															
T4	0.72	0.76	0.77	1.00														
T5	0.73	0.77	0.76	0.76	1.00													
T6	0.69	0.68	0.73	0.71	0.74	1.00												
T7	0.52	0.53	0.57	0.54	0.56	0.56	1.00											
T8	0.72	0.77	0.74	0.74	0.75	0.72	0.55	1.00										
T9	0.73	0.73	0.72	0.74	0.69	0.70	0.53	0.78	1.00									
T10	0.72	0.73	0.72	0.76	0.76	0.76	0.56	0.78	0.75	1.00								
T11	0.64	0.70	0.72	0.70	0.68	0.67	0.55	0.69	0.69	0.70	1.00							
T12	0.69	0.74	0.74	0.76	0.81	0.69	0.58	0.73	0.73	0.74	0.70	1.00						
T13	0.75	0.74	0.72	0.74	0.73	0.69	0.55	0.75	0.77	0.77	0.69	0.78	1.00					
T14	0.71	0.71	0.72	0.72	0.76	0.71	0.51	0.69	0.69	0.74	0.71	0.73	0.78	1.00				
T15	0.73	0.71	0.70	0.73	0.73	0.70	0.53	0.70	0.72	0.75	0.70	0.74	0.80	0.80	1.00			
T16	0.71	0.71	0.73	0.73	0.72	0.70	0.56	0.69	0.72	0.72	0.74	0.75	0.75	0.79	0.80	1.00		
T17	0.73	0.72	0.71	0.71	0.72	0.75	0.57	0.72	0.75	0.75	0.73	0.75	0.78	0.72	0.74	0.75	1.00	
T18	0.71	0.71	0.71	0.68	0.71	0.69	0.58	0.69	0.70	0.68	0.73	0.73	0.70	0.69	0.70	0.73	0.75	1.00
T19	0.71	0.70	0.72	0.74	0.74	0.70	0.54	0.70	0.71	0.74	0.73	0.74	0.71	0.75	0.74	0.75	0.72	0.68
T20	0.75	0.77	0.79	0.79	0.78	0.76	0.56	0.76	0.77	0.78	0.74	0.80	0.79	0.79	0.81	0.83	0.77	0.74
T21	0.73	0.76	0.79	0.76	0.76	0.72	0.55	0.75	0.74	0.72	0.77	0.78	0.78	0.73	0.72	0.75	0.76	0.75
T22	0.75	0.77	0.76	0.75	0.77	0.70	0.52	0.75	0.71	0.74	0.73	0.74	0.77	0.76	0.77	0.76	0.75	0.74
T23	0.69	0.72	0.75	0.72	0.76	0.71	0.52	0.72	0.72	0.72	0.71	0.75	0.74	0.75	0.75	0.75	0.74	0.70
T24	0.66	0.71	0.72	0.73	0.75	0.70	0.55	0.69	0.69	0.71	0.71	0.75	0.71	0.76	0.73	0.75	0.73	0.70
T25	0.67	0.72	0.73	0.74	0.74	0.70	0.57	0.71	0.70	0.71	0.73	0.76	0.73	0.76	0.75	0.76	0.73	0.75
T26	0.60	0.64	0.67	0.66	0.67	0.65	0.56	0.63	0.62	0.63	0.72	0.67	0.64	0.66	0.66	0.67	0.67	0.65
T27	0.73	0.75	0.76	0.75	0.76	0.69	0.55	0.72	0.74	0.74	0.75	0.76	0.74	0.76	0.78	0.79	0.75	0.73
T28	0.73	0.74	0.75	0.72	0.73	0.69	0.52	0.73	0.75	0.74	0.74	0.70	0.76	0.72	0.73	0.73	0.74	0.72
T29	0.70	0.71	0.74	0.75	0.75	0.70	0.51	0.70	0.72	0.74	0.73	0.73	0.74	0.76	0.78	0.78	0.74	0.71
T30	0.68	0.71	0.73	0.69	0.74	0.75	0.52	0.73	0.73	0.77	0.73	0.74	0.74	0.75	0.74	0.74	0.74	0.71
T31	0.71	0.72	0.75	0.72	0.76	0.73	0.55	0.71	0.72	0.75	0.72	0.76	0.77	0.75	0.78	0.79	0.74	0.72
T32	0.74	0.73	0.71	0.72	0.76	0.70	0.51	0.72	0.70	0.72	0.69	0.72	0.76	0.73	0.75	0.73	0.73	0.72
T33	0.61	0.61	0.64	0.61	0.64	0.62	0.56	0.61	0.61	0.63	0.68	0.66	0.65	0.64	0.66	0.67	0.66	0.68
T34	0.50	0.46	0.50	0.51	0.50	0.51	0.57	0.50	0.48	0.52	0.55	0.52	0.51	0.51	0.55	0.52	0.54	0.54
T35	0.68	0.66	0.70	0.70	0.71	0.70	0.52	0.69	0.69	0.72	0.72	0.72	0.70	0.72	0.75	0.73	0.71	0.73
T36	0.69	0.65	0.67	0.69	0.69	0.68	0.52	0.66	0.69	0.67	0.66	0.70	0.69	0.70	0.75	0.73	0.69	0.70

ตารางผนวกที่ 3 ผล Matrix ของกาวเครือขาวโดยใช้ลักษณะDNA ร่วมกับลักษณะพฤกษศาสตร์ 7
ลักษณะ ที่ได้จากการคำนวณ cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC, V 2.1
โดยใช้ Jaccard similarity coefficient (ต่อ)

	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32	T33	T34	T35	T36	
T1																			
T2																			
T3																			
T4																			
T5																			
T6																			
T7																			
T8																			
T9																			
T10																			
T11																			
T12																			
T13																			
T14																			
T15																			
T16																			
T17																			
T18																			
T19	1.00																		
T20	0.78	1.00																	
T21	0.72	0.80	1.00																
T22	0.72	0.78	0.83	1.00															
T23	0.73	0.80	0.77	0.78	1.00														
T24	0.74	0.75	0.75	0.76	0.80	1.00													
T25	0.73	0.77	0.74	0.77	0.77	0.81	1.00												
T26	0.65	0.68	0.69	0.68	0.70	0.71	0.73	1.00											
T27	0.74	0.79	0.78	0.79	0.79	0.75	0.77	0.70	1.00										
T28	0.72	0.80	0.80	0.79	0.79	0.70	0.72	0.68	0.79	1.00									
T29	0.73	0.82	0.76	0.76	0.76	0.71	0.76	0.68	0.79	0.81	1.00								
T30	0.74	0.79	0.73	0.74	0.76	0.72	0.72	0.66	0.75	0.77	0.77	1.00							
T31	0.73	0.81	0.78	0.77	0.79	0.74	0.76	0.68	0.79	0.79	0.79	0.82	1.00						
T32	0.69	0.75	0.78	0.80	0.76	0.72	0.73	0.65	0.78	0.77	0.74	0.75	0.78	1.00					
T33	0.64	0.65	0.67	0.67	0.67	0.67	0.68	0.70	0.66	0.65	0.66	0.67	0.71	0.69	1.00				
T34	0.53	0.52	0.54	0.51	0.53	0.54	0.55	0.59	0.53	0.50	0.54	0.50	0.53	0.51	0.61	1.00			
T35	0.71	0.74	0.73	0.71	0.73	0.73	0.72	0.69	0.73	0.73	0.74	0.76	0.78	0.73	0.70	0.55	1.00		
T36	0.71	0.75	0.72	0.70	0.71	0.68	0.71	0.63	0.74	0.69	0.72	0.71	0.76	0.72	0.67	0.55	0.76	1.00	

ตารางผนวกที่ 4 ผลของสารชักนำต่อ puerarin จากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว 12 ทริตเมนต์

ทริตเมนต์	Puerarin ($\mu\text{g/gDW}$)
T1-water(Control)	54.73 b
T2-AgNO ₃ (500ppm)	49.87 b
T3-AgNO ₃ (1000ppm)	102.87 ab
T4-YE(2000ppm)	169.32 a
T5-YE(2000ppm) + AgNO ₃ (500ppm)	42.03 b
T6-YE(2000ppm) + AgNO ₃ (1000ppm)	60.43 b
T7- YE(3000ppm)	77.14 b
T8- YE(3000ppm) + AgNO ₃ (500ppm)	68.39 b
T9- YE(3000ppm) + AgNO ₃ (1000ppm)	167.79 a
T10- YE(4000ppm)	60.59 b
T11- YE(4000ppm) + AgNO ₃ (500ppm)	26.04 b
T12- YE(4000ppm) + AgNO ₃ (1000ppm)	28.51 b
CV(%)	60.57

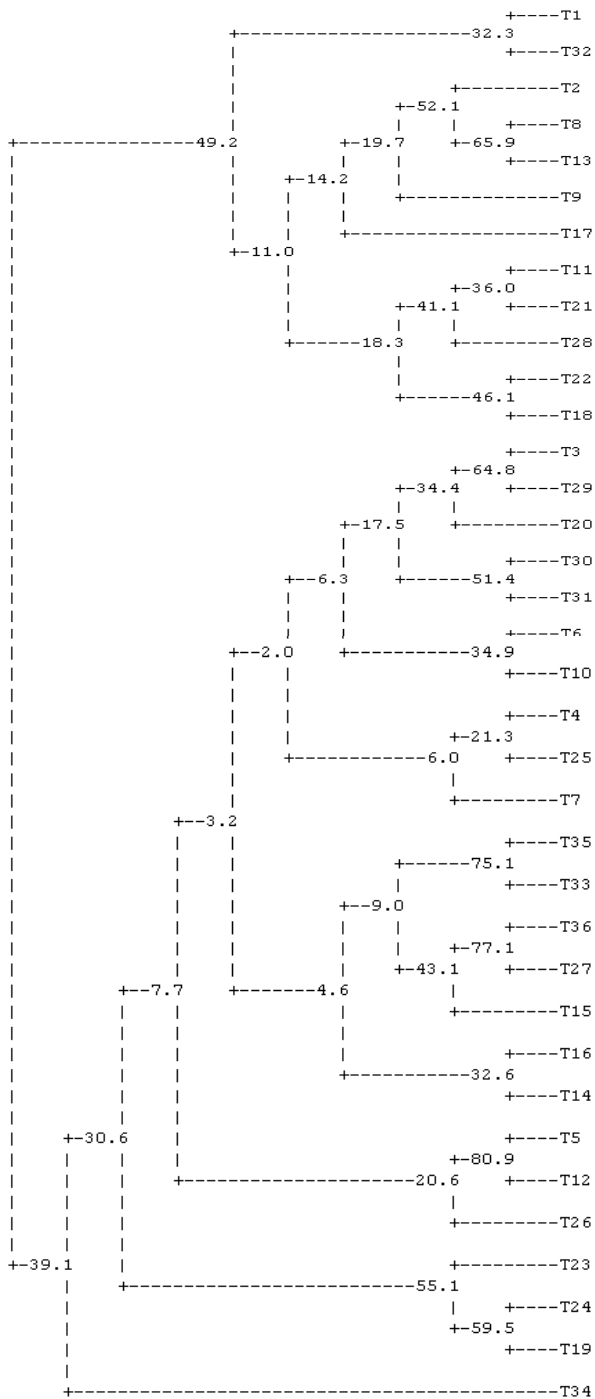
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 5 ผลของสารชักนำต่อ puerarin จากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว 12 ทรีตเมนต์

ทรีตเมนต์	Puerarin ($\mu\text{g/gDW}$)	
	transform	ข้อมูลเดิม
T1-water (Control)	7.37 bc	54.73 bc
T2-AgNO ₃ (500ppm)	6.85 bc	49.87 bc
T3-AgNO ₃ (1000ppm)	10.13 ab	102.87 ab
T4-YE (2000ppm)	12.82 a	169.32 a
T5-YE (2000ppm) + AgNO ₃ (500ppm)	6.48 bc	42.03 bc
T6-YE (2000ppm) + AgNO ₃ (1000ppm)	7.58 bc	60.43 bc
T7- YE (3000ppm)	8.31 bc	77.14 bc
T8- YE (3000ppm) + AgNO ₃ (500ppm)	8.03 bc	68.39 bc
T9- YE (3000ppm) + AgNO ₃ (1000ppm)	12.55 a	167.79 a
T10- YE (4000ppm)	7.74 bc	60.59 bc
T11- YE (4000ppm) + AgNO ₃ (500ppm)	5.00 c	26.04 c
T12- YE (4000ppm) + AgNO ₃ (1000ppm)	5.33 c	28.51 c
CV (เปอร์เซ็นต์)	26.76	

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี DMRTและใช้ค่าการ transform ด้วยวิธีถดถอกที่ 2 (การปรับค่าเพื่อใช้ CV ใหม่จากการ transform ที่ยอมรับได้ และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างจากข้อมูลชุดเดิม)

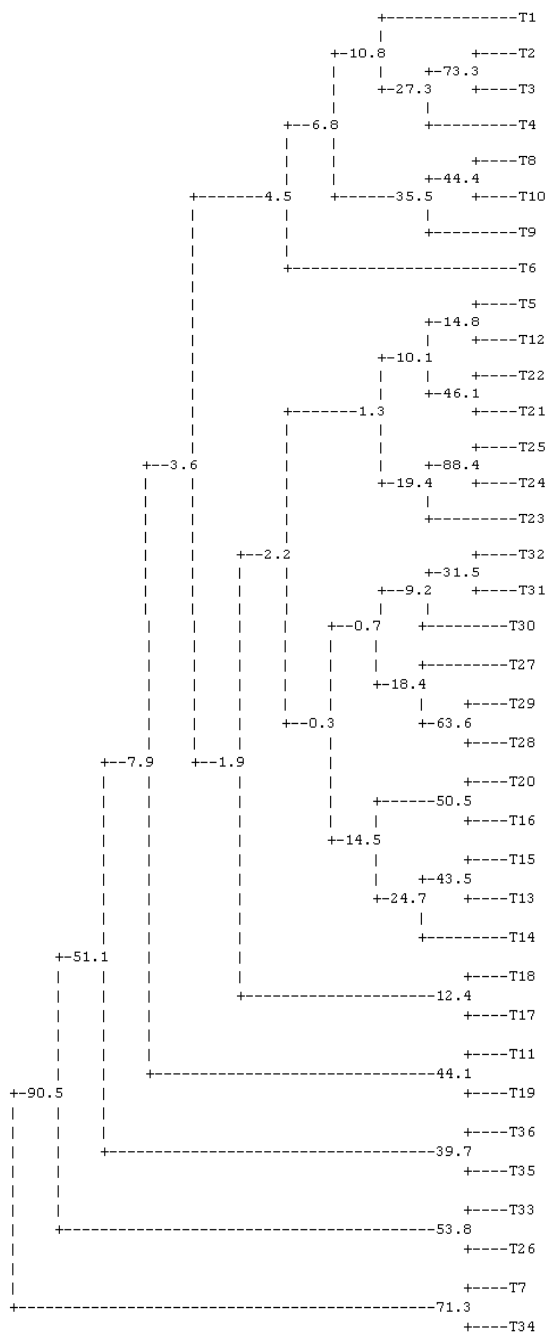
CONSENSUS TREE:
 the numbers at the forks show the percentage
 of times the group consisting of the species
 which are to the right of that fork occurred



WinBoot computational run time: 0:00:37.907

ภาพผนวกที่ 1 Consensus tree แสดงการจัดกลุ่มของกวางเครือขาว 36 ต้น โดยลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ด้วยโปรแกรม winboot ตัวเลขแสดงเปอร์เซ็นต์การจัดกลุ่มที่เกิดจากการสุ่มจำนวน 1000 ครั้ง

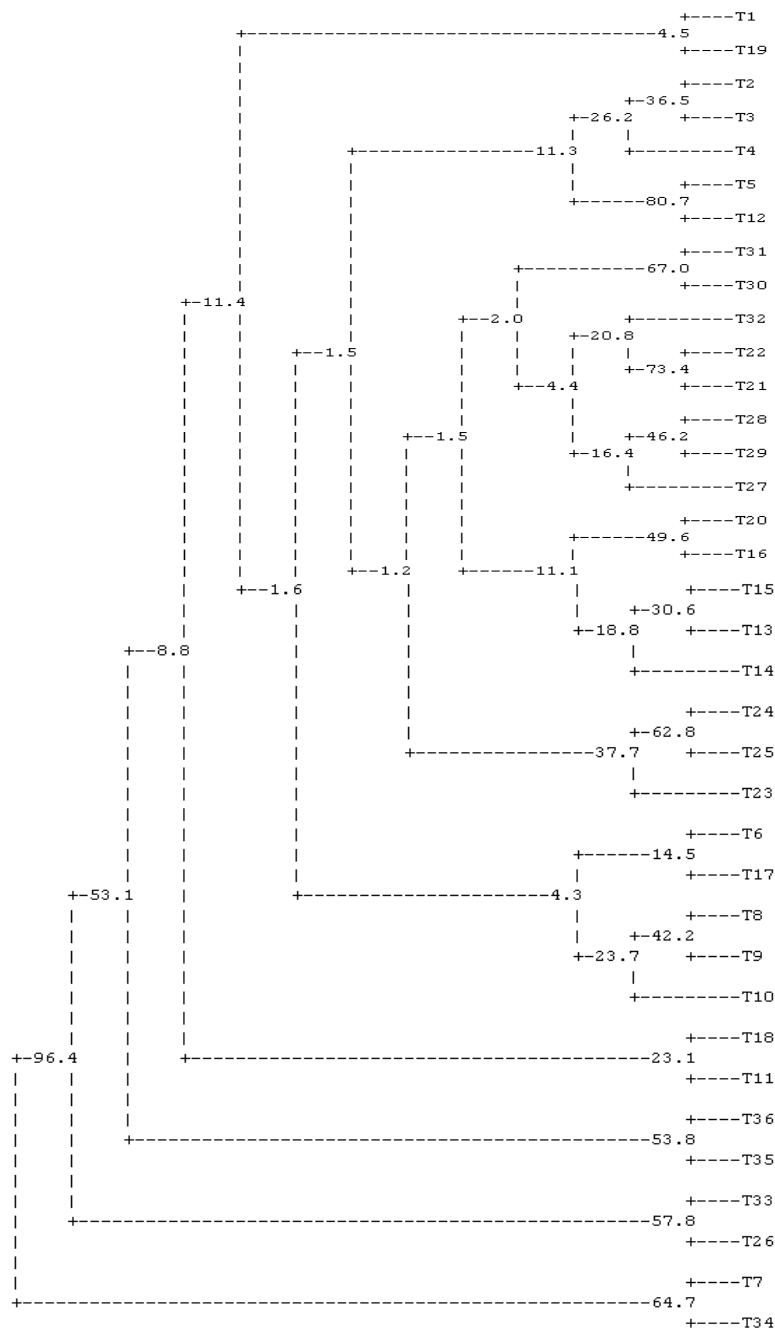
CONSENSUS TREE:
 the numbers at the forks show the percentage
 of times the group consisting of the species
 which are to the right of that fork occurred



WinBoot computational run time: 0:02:21.125

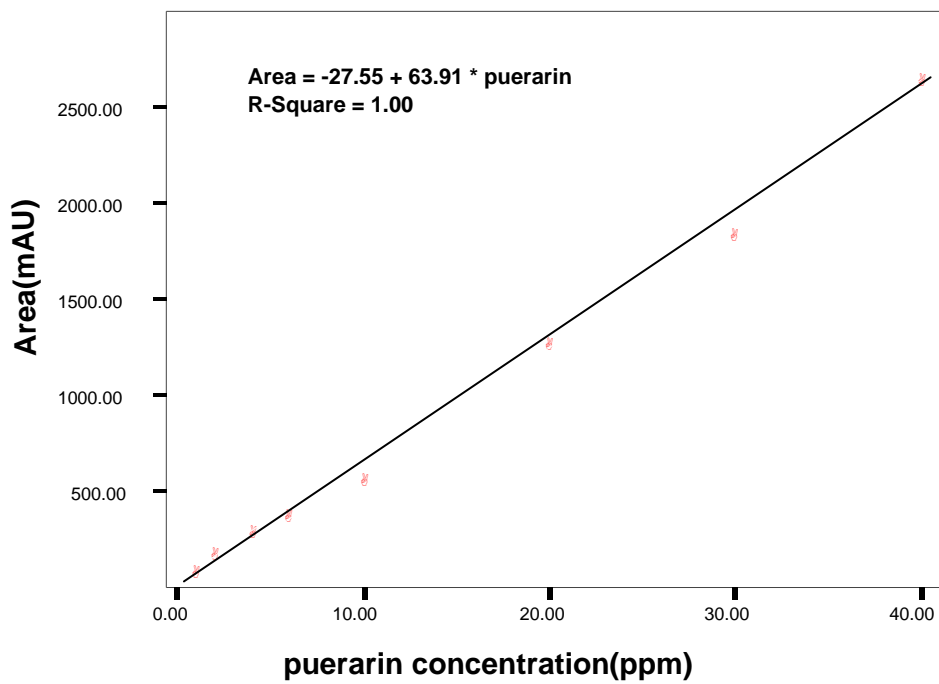
ภาพผนวกที่ 2 Consensus tree แสดงการจัดกลุ่มของกวางเครือขาว 36 ต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ด้วยโปรแกรม winboot ตัวเลขแสดงเปอร์เซ็นต์การจับกลุ่มที่เกิดจากการสุ่มจำนวน 1000 ครั้ง

CONSENSUS TREE:
 the numbers at the forks show the percentage
 of times the group consisting of the species
 which are to the right of that fork occurred

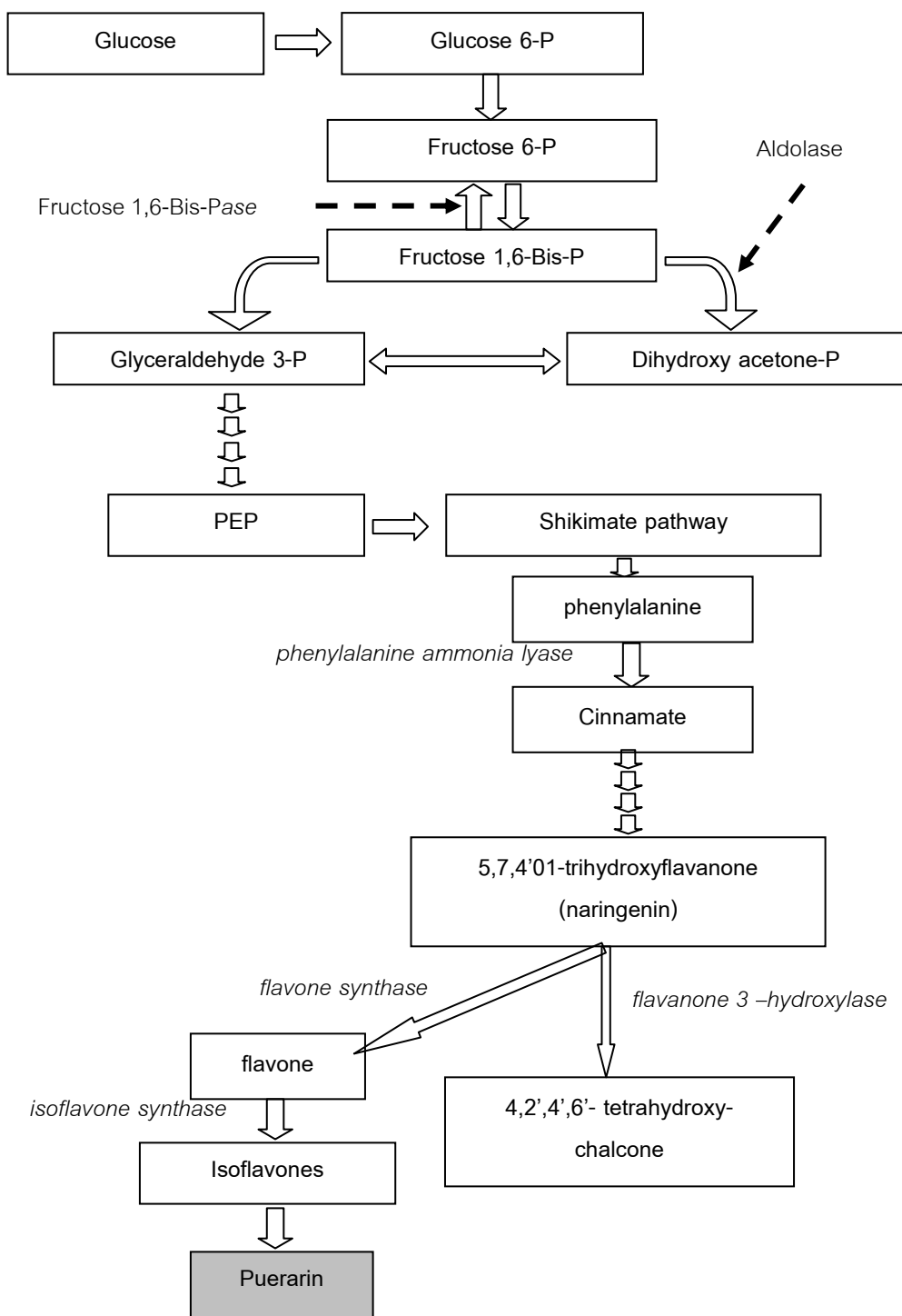


WinBoot computational run time: 0:02:06.657

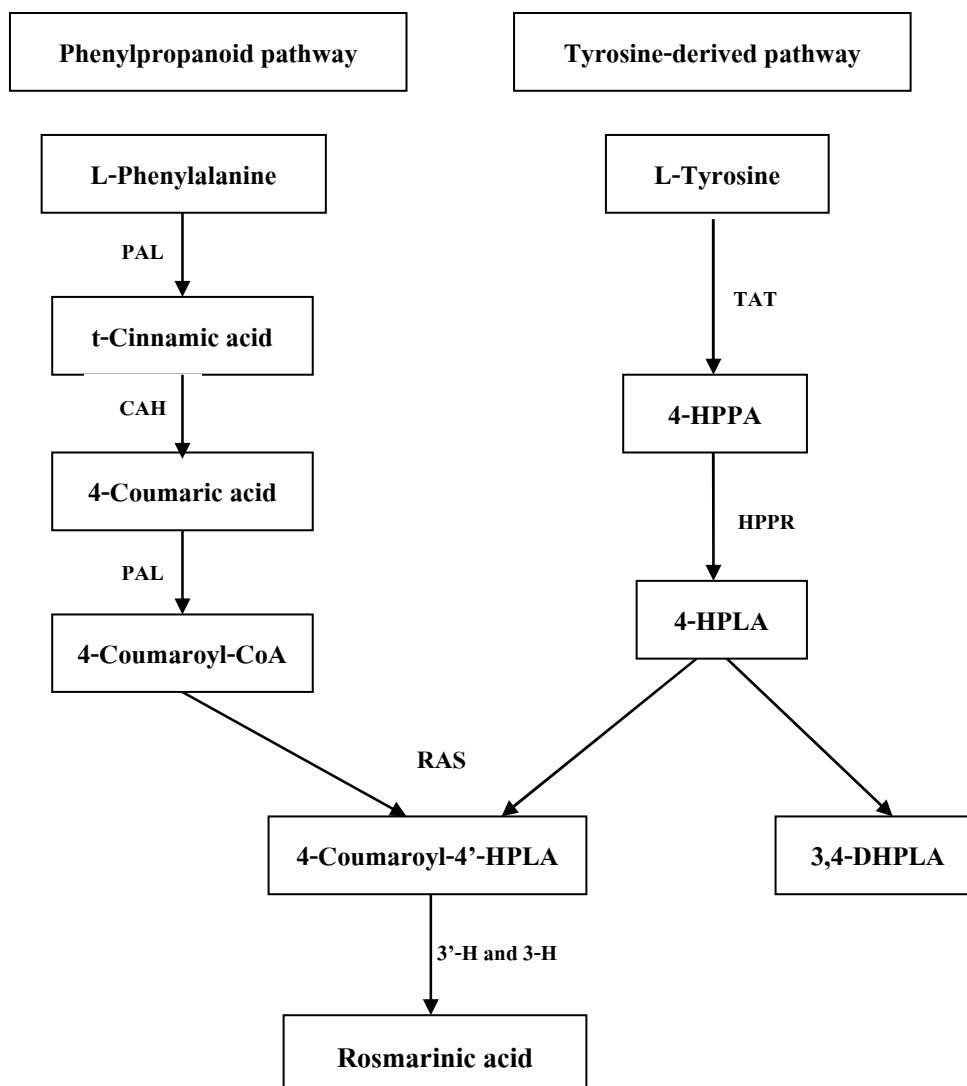
ภาพผนวกที่ 3 Consensus tree แสดงการจัดกลุ่มของกวางเครือขาว 36 ต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ด้วยโปรแกรม Winboot ตัวเลขแสดงเปอร์เซ็นต์การจับกลุ่มที่เกิดจากการสุ่ม จำนวน 1000 ครั้ง



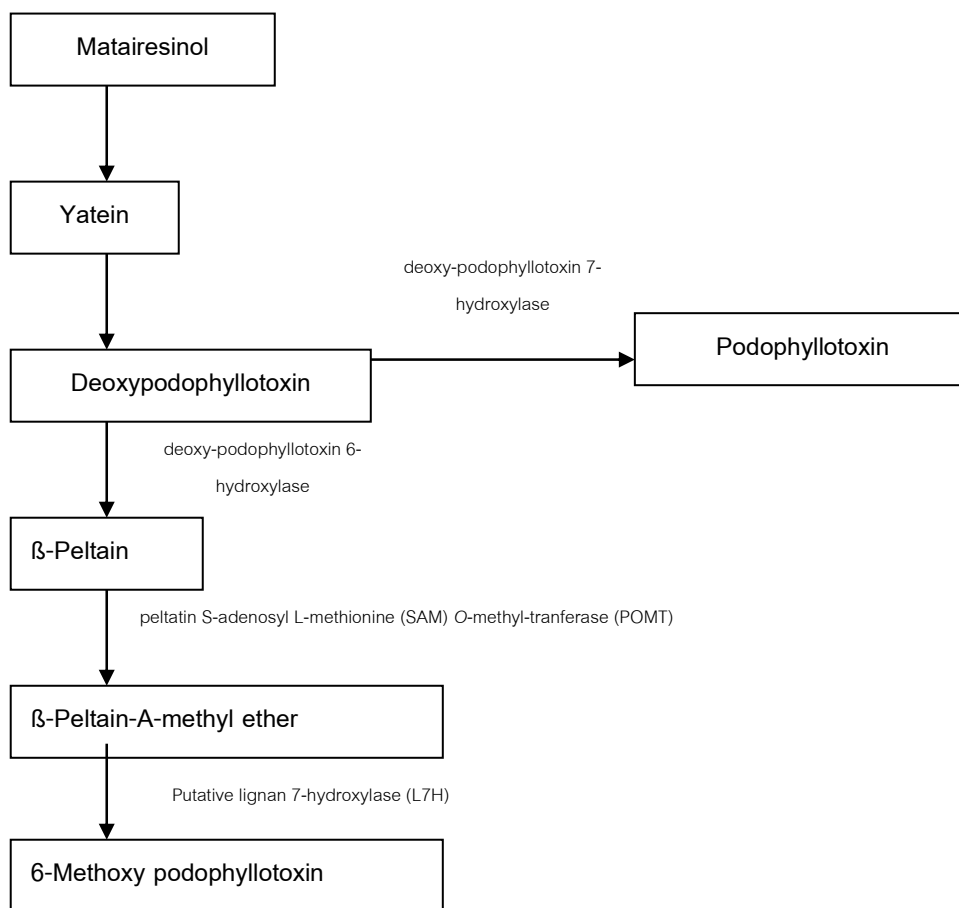
ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานของ puerarin



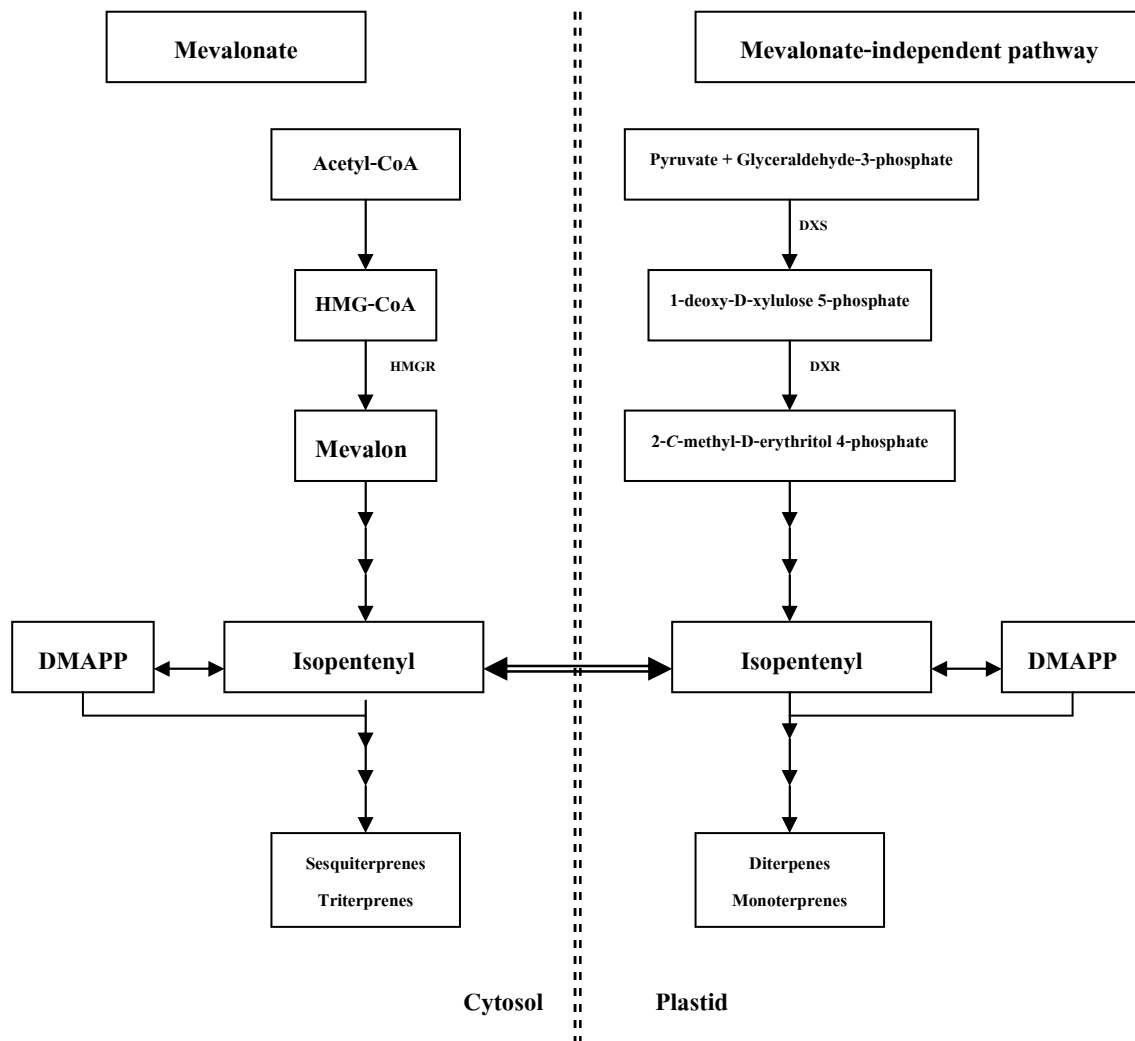
ภาพผนวกที่ 5 Diagram แสดงขั้นตอนชีวสังเคราะห์ puerarin จาก Shikimic acid pathway



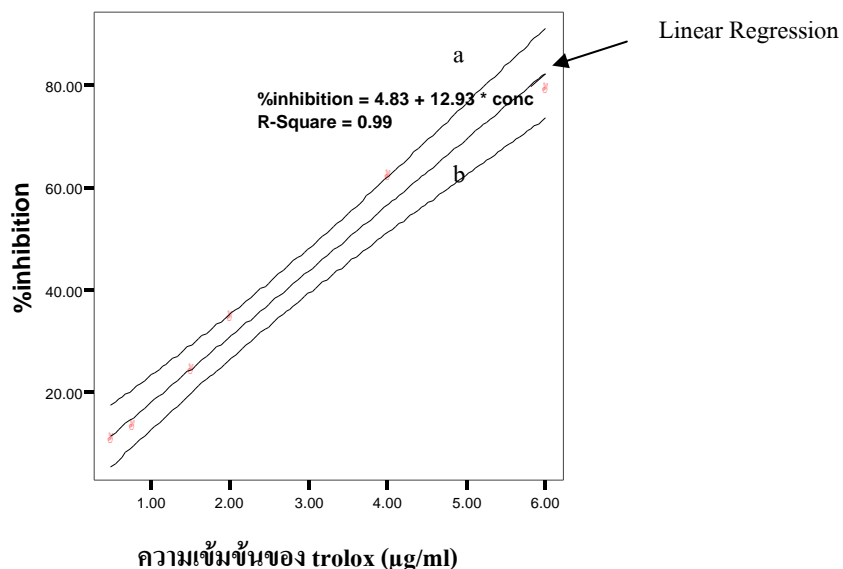
ภาพผนวกที่ 6 Diagram แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ rosmarinic acid และ 3,4-dihydroxyphenyllactic acid (3,4-DHPLA) [cinnamic acid 4-hydroxylase (CAH), hydroxycinnamate: coenzyme A ligase (4CL), hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllactate 3- and 3'-hydroxylases (3-H and 3'-H), 4-hydroxyphenyllactic acid (HPLA), 4-hydroxyphenylpyruvic acid (4-HPPA), hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), rosmarinic acid synthase (RAS), tyrosine aminotransferase (TAT)] (Yan *et al.*, 2006)



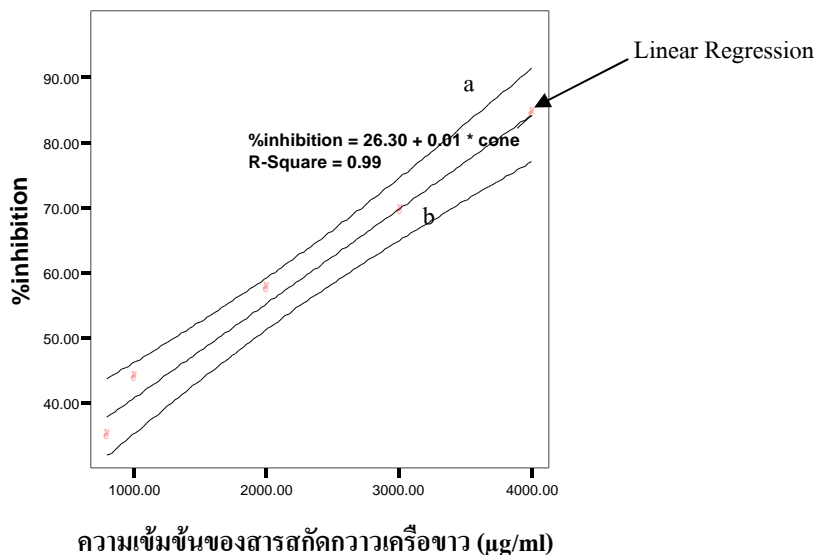
ภาพผนวกที่ 7 Diagram แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ podophyllotoxin (Ge and Wu, 2005)



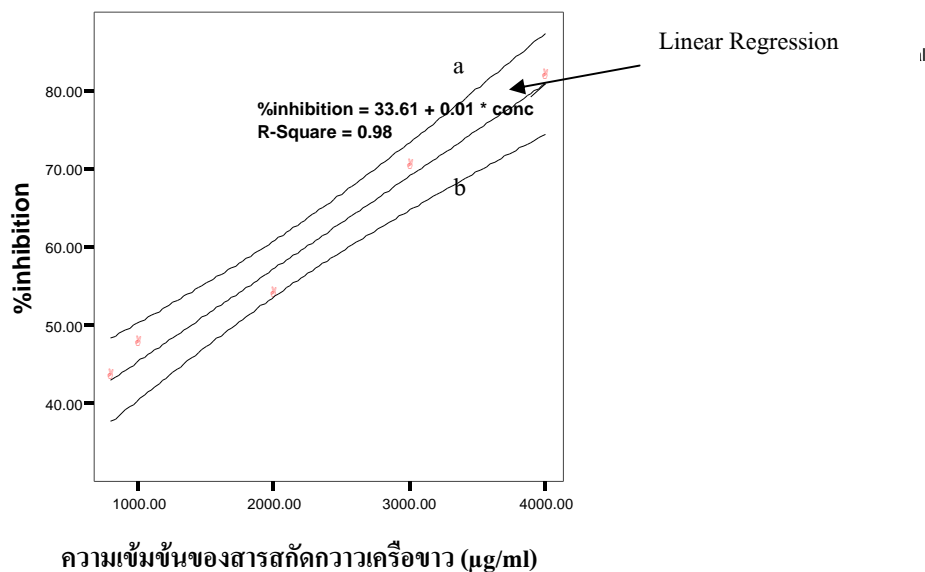
ภาพผนวกที่ 8 Diagram แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ terpenoids (isoprenoids) จาก Mevalonate pathway และ Mevalonate-independent pathway



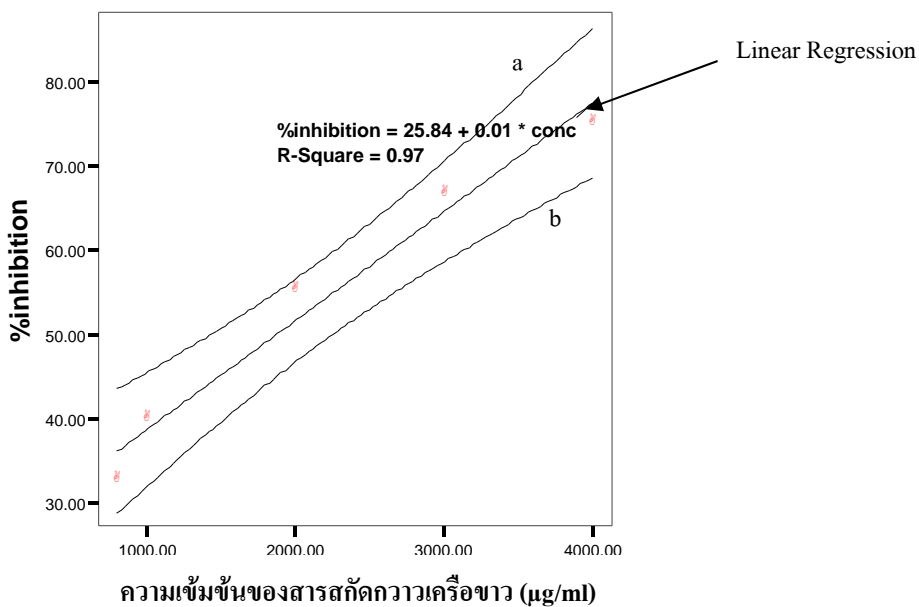
ภาพผนวกที่ 9 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของ trolox
(สมการหาค่า IC_{50} คือ $y = 4.83 + 12.93x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



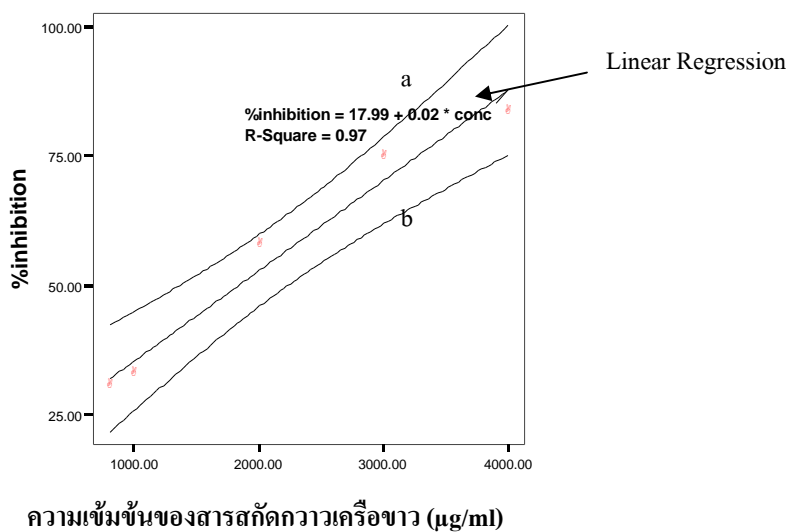
ภาพผนวกที่ 10 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่า (T1)(สมการหาค่า IC_{50} คือ $y = 26.30 + 0.01x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



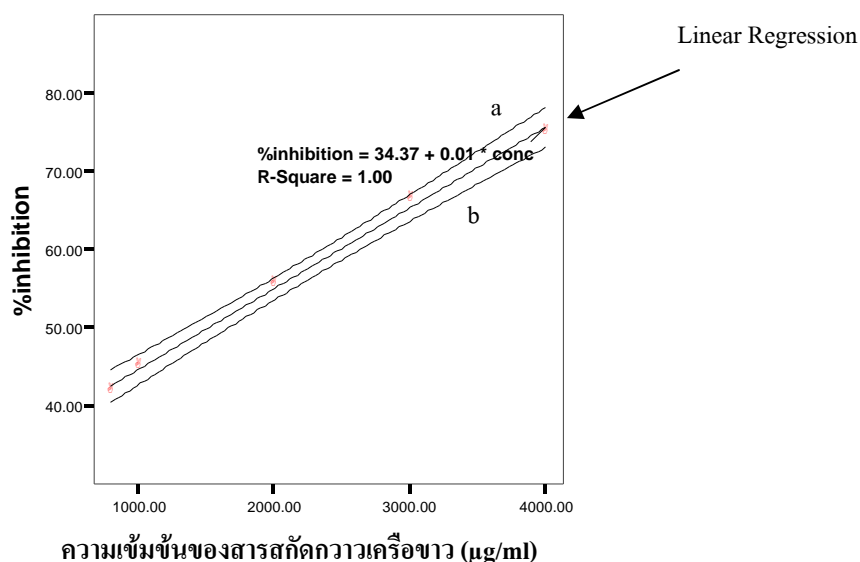
ภาพผนวกที่ 11 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย AgNO₃ 500 ppm (T2) (สมการหาค่า IC₅₀ คือ $y = 33.61 + 0.01x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



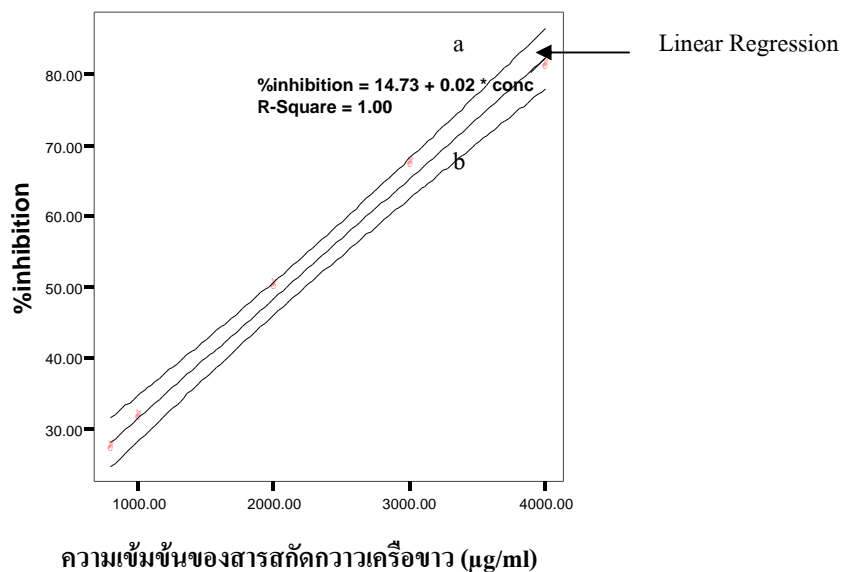
ภาพผนวกที่ 12 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย AgNO₃ 1000 ppm (T3) (สมการหาค่า IC₅₀ คือ $y = 25.84 + 0.01x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



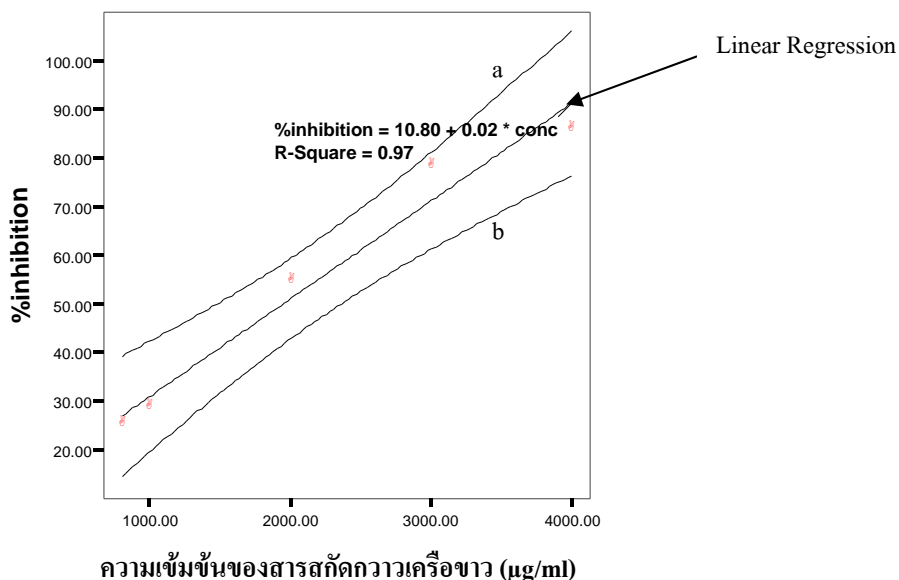
ภาพผนวกที่ 13 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 2000 ppm (T4) (สมการหาค่า IC_{50} คือ $y = 17.99 + 0.02x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



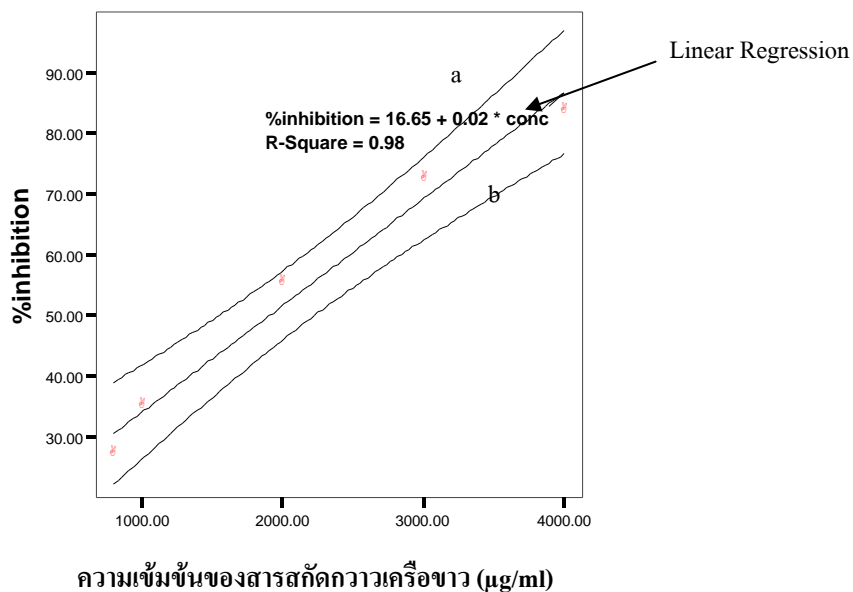
ภาพผนวกที่ 14 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 2000 ppm + AgNO₃ 500 ppm (T5) (สมการหาค่า IC_{50} คือ $y = 34.37 + 0.01x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



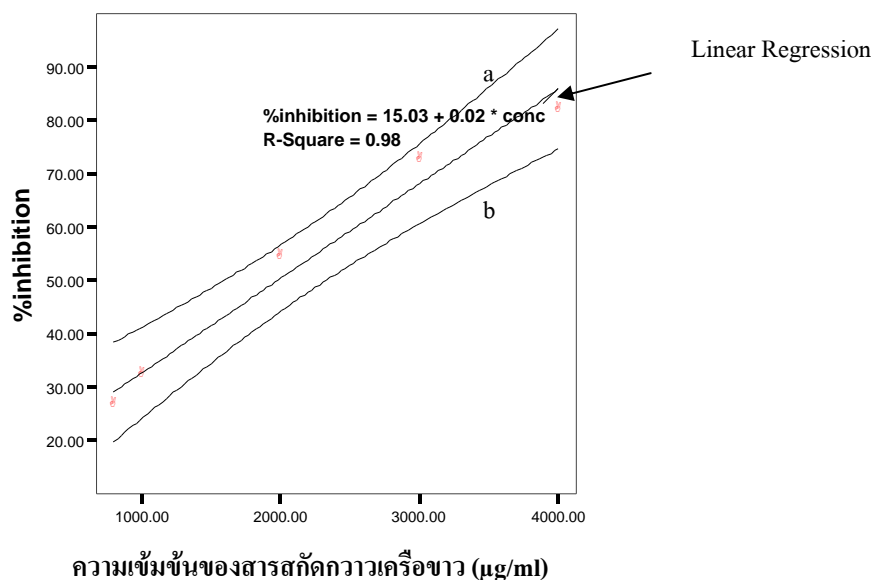
ภาพผนวกที่ 15 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 2000 ppm + AgNO₃ 1000 ppm (T6)(สมการหาค่า IC₅₀ คือ $y = 14.73 + 0.02x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



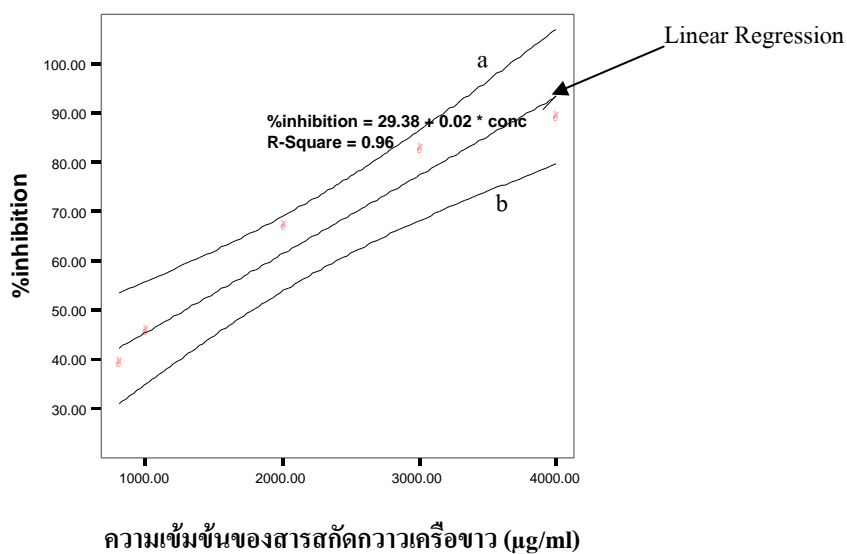
ภาพผนวกที่ 16 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 3000 ppm (T7) (สมการหาค่า IC₅₀ คือ $y = 10.80 + 0.02x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



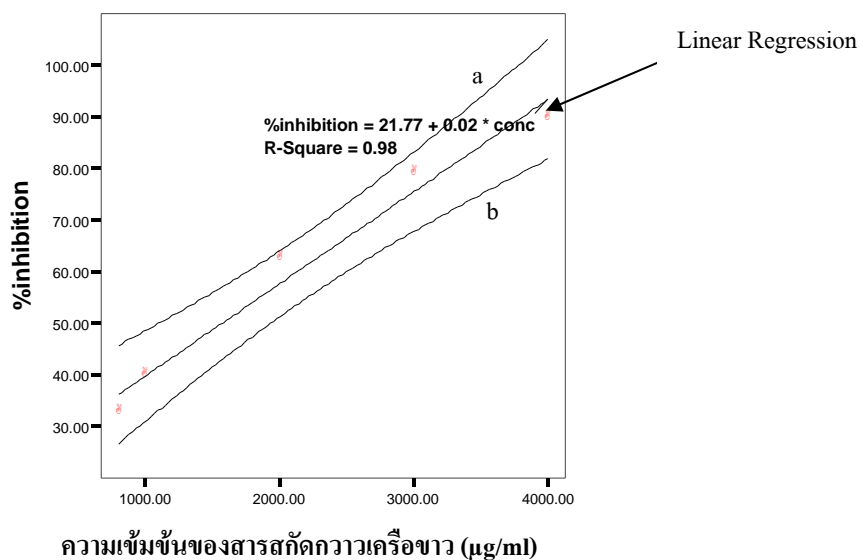
ภาพผนวกที่ 17 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกาวเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 3000 ppm + AgNO₃ 500 ppm (T8) (สมการหาค่า IC₅₀ คือ $y = 16.65 + 0.02x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



ภาพผนวกที่ 18 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกาวเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 3000 ppm + AgNO₃ 1000 ppm (T9) (สมการหาค่า IC₅₀ คือ $y = 15.03 + 0.02x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



ภาพผนวกที่ 19 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 4000 ppm (T10) (สมการหาค่า IC_{50} คือ $y = 29.38 + 0.02x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)



ภาพผนวกที่ 20 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ฉีดพ่นด้วย yeast extract 4000 ppm + AgNO_3 500 ppm (T11) (สมการหาค่า IC_{50} คือ $y = 21.77 + 0.02x$, a และ b คือ 95% Mean Prediction Interval)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุพินญา บุญมานพ เกิดวันที่ 19 กันยายน พ.ศ. 2512 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์(พืชสวน) คณะเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2534 ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาเกษตร(พืชสวน) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2540 เข้ารับราชการกรมวิชาการเกษตรในปีพ.ศ. 2541 และลาศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปี พ.ศ. 2549-2554 สถานที่ติดต่อ บ้านเลขที่ 111/44 หมู่บ้านเฟริสต์โฮม ซอยร่วมใจพัฒนา ถนนรามอินทรา(วัชรพล) แขวงท่าแร้ง เขตบางเขน กรุงเทพฯ 10220 E-mail address: bsupinya@hotmail.com