

สุพินญา บุญมานพ : พันธุ์ และผลของสารชักนำต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) 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 Suvatabandhu) Niyomdham] AND ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY] อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ยวดี มานะเกษม, 123 หน้า.

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) 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 เพื่อการจำแนกสายพันธุ์และวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มโดยวิธี 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 $AgNO_3$ และ yeast extract (YE) ต่อปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ 12 ทริตเมนต์ คือ กวาวเครือขาวที่ได้รับการฉีดพ่นที่ด้วย $AgNO_3$ 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) จากการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณ puerarin ของสารสกัดกวาวเครือขาวทั้ง 12 ทริตเมนต์ พบว่าการฉีดพ่นด้วยสารชักนำทั้ง 12 ทริตเมนต์ ไม่ทำให้กวาวเครือขาวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้ง เปอร์เซ็นต์ความชื้น และสารสกัดต่อกรัมน้ำหนักแห้งของรากสะสมอาหารแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีปริมาณ puerarin แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การฉีดพ่นด้วย YE ที่ความเข้มข้น 2,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin สูงสุดคือ 169.32 $\mu g/gDW$ และการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 3,000 ppm ร่วมกับ $AgNO_3$ 1,000 ppm ให้ปริมาณ puerarin 167.79 $\mu g/gDW$ สูงกว่าการฉีดพ่นร่วมกันที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ การทดลองที่ 3 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือขาว ซึ่งได้จากการทดลองที่ 2 และเปรียบเทียบค่า IC_{50} ด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวทั้ง 12 ทริตเมนต์ มีค่าเฉลี่ยของ IC_{50} แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 4,000 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} เท่ากับ 1,031.33 $\mu g/ml$) สารสกัดที่ได้จากการฉีดพ่นด้วย YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นฉีดพ่นร่วมกับ $AgNO_3$ 500 ppm มีค่าเฉลี่ย IC_{50} 1,563.00, 1,668.00 และ 1,411.83 $\mu g/ml$ ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการฉีดพ่น YE ความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นฉีดพ่นร่วมกับ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 1,000 ppm (1,763.67, 1,748.30 และ 1,828.83 $\mu g/ml$ ตามลำดับ) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองทั้ง 3 นี้สรุปได้ว่าการใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์กวาวเครือขาวได้ชัดเจนมากกว่าการใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์ พบว่าทุกต้นมีพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน และคาดว่าอาจเกิดจากพันธุกรรมที่แตกต่างกันอย่างน้อย 5 พันธุ์ที่นำมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ การใช้สารชักนำ YE และ $AgNO_3$ สามารถเพิ่มปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว และสารสกัดที่ได้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา สุวิมล มอญวน

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุวิมล มอญวน

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สม ภูมิ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สม ภูมิ

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 Sachival Seelaporn