บทคัดย่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้รวบรวมกวาวเครือขาว โดยเก็บเมล็ดของต้นที่รวบรวมมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และได้ทำการจำแนกสายพันธุ์ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ สุ่มซ้ำละ 12 ต้น จำนวน 36 สายต้นใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพฤกษศาสตร์จำนวน 7 ลักษณะ วิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มโดยใช้ principle component analysis (PCA) พบว่า กวาวเครือขาวมีการแบ่งเป็น 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 355ตำแหน่ง คิดเป็น 8.66 ตำแหน่งต่อไพร์เมอร์ 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) ของตัวอย่างทั้งหมดพบว่า 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 มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์กวาวเครือขาวได้ และให้ผลสอดคล้องกับความแตกต่างของลักษณะภายนอก

พิวรารินและจีนิสทีอินเป็นสารไอโซฟลาโวนอยด์ที่พบมากในหัวกวาวเครือขาว ทำให้สารสกัดจากพืชดังกล่าวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีผลในการขยายหลอดเลือด และอาจลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานได้ ได้ทำการวิจัย 3 ชุดการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในเดือนมกราคม 2549 ถึง เดือนมีนาคม 2552 เพื่อเพิ่มปริมาณพิวรารินและจีนิสทีอิน โดยใช้สารชักนำที่เหมาะสม และเพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน ชุดการทดลองที่ 1 ใช้สารไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ อย่างละ 5 ความเข้มข้น เพื่อชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระในหัวกวาวเครือขาว ที่ปลูกใน growth chamber ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์จำนวน 4 ซ้ำ เริ่มชักนำเมื่อกวาวเครือขาวอายุ 4 เดือน (ทั้งนี้เพราะกวาวเครือขาวเริ่มสะสมสารสำคัญที่อายุ 4 เดือน) จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน เก็บข้อมูลหลังสิ้นสุดการชักนำที่ 1 วัน 7 วัน 15 วันและ 30 วัน พบว่าที่เวลา 7 วันหลังการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้สารสำคัญในหัวกวาวเครือขาวมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 49.9 เปอร์เซ็นต์และมี FRAP values เท่ากับ 6.05 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและที่ 15 วันหลังการชักนำด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตรและคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้สารสำคัญในหัวกวาวเครือขาวมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 54.7 และ 49.9 เปอร์เซ็นต์และมี FRAP values เท่ากับ 5.72 และ 6.05 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตรและคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสารชักนำเพื่อชักนำปริมาณของพิวรารินจีนิสทีอินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และปลูกในโรงเรือนวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์และที่ปลูกในแปลงทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก พบว่าการใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินในหัวของกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนมีปริมาณสูงที่สุดและแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีพิวรารินเท่ากับ 423 และ 386 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และมีจีนิสทีอินเท่ากับ 22.6 และ 22.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของพิวรารินและจีนิสทีอินเมื่อชักนำในต้นที่ปลูกในแปลงทดลอง ขณะที่การใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือน และปลูกในแปลงทดลองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2,482 1,050 และ 1,026 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมี FRAP value เท่ากับ 4.55 4.73 และ 6.69 ไมโครโมล ของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ 3 นำหัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และชักนำด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร จากการทดลองที่สอง ที่มีพิวรารินสูงที่สุดมาสกัดด้วย เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้ป้อนหนูแรทพันธุ์วิสตาร์อายุ 10 สัปดาห์ ทั้งในหนูปกติและหนูเป็นเบาหวานเพื่อเปรียบเทียบผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดกับกลุ่มควบคุม พบว่าสารสกัดในกวาวเครือขาวไม่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงเฉียบพลันทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน แต่

มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 30 วัน โดยในวันที่ 14 ของการป้อนสารสกัดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 28.95 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 21 ลดได้ 26.37 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับของหนูเบาหวาน จากการทดลองทำให้ได้สารชักนำที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของ พิวรารินและจีนิสทีอินคือการใช้ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร และได้ข้อมูลเบื้องต้นว่าสารสกัดจากกวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทที่เป็นเบาหวานได้ตั้งแต่วันที่ 14 ของการป้อนอย่างต่อเนื่อง

Abstract

Seeds of White Kwao Krua (WKK) [*Pueraria candollei* Grah. var. mirifica (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] were collected from Prachuab Khiri Khan were planted and propagated in the farm of Suranaree University of Technology, however, their genetic backgrounds were ambiguous. Thirty six clones of WKK in the same age were sampled for classification using 7 botanical characteristics and DNA fingerprint by ISSR-Touchdown PCR technique. The relationship of the 7 botanical characteristics using principle component analysis (PCA) showed the WKK clones fell into 3 groups. 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 clone with elliptic leaf shape, acute leaf base, and acuminate leaf base, and cuspidate leaf apex. The ISSR-Touchdown PCR technique with 41 primers detected 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 ninety three loci exhibited polymorphism information content (PIC) was between 0.0315-0.9779 (average 0.4779) and number of effective alleles per locus (Ne) ranged between 1.1250-1.8541 (average 1.5544). The genetic similarity (GS) of WKK ranged between 0.50-0.86 (average 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 of clone number 34, and the second group could be further divided into 2 subgroups at GS of 0.69. Population structure revealed that variation of WKK resulted from segregation tithing groups. None of the WKK clones was identical in genetic, and they were expected to be driven from 5 genetic sources. These result showed that applying of the ISSR-Touchdown PCR technique could be used to classify WKK efficiently and the result corresponded to the classification using botanical characteristics.

Puerarin and genistein are isoflavonoids in the tuberous roots of WKK. WKK contains estrogen-like substances. It contains antioxidants and has vascular relaxation properties. It was decided to determine whether it also has a hypoglycemic effect on diabetic rats. Three sets of experiments were conducted at Suranaree University of Technology from January 2006 to March 2009. These were to study the antioxidant activities and to increase the amount of puerarin and genistein in the tuberous roots of WKK through the use of elicitors. Furthermore, whether the crude extract of WKK has a hypoglycemic effect on diabetic rats was also investigated. The first set of experiments was set up as a complete randomized design with five concentrations of each

elicitor (chitosan, salicylic acid and $CuCl_2$) which were applied 4 times over one month to WKK grown in a growth chamber. The experiment had 4 replications. The data were collected at 1, 7, 15 and 30 days after the final application of the elicitors. The results showed that all concentrations of elicitors used could promote statistically significant differences in the antioxidant activities of WKK. Salicylic acid at 100 mg/L gave the highest antioxidant activities [% inhibition by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method = 58.3%, ferric reducing antioxidant power (FRAP) values = 5.89 μmol Fe^{2+}/g dw] at 7 days after application. Chitosan at 1,000 mg/L and $CuCl_2$ at 200 mg/L gave the highest antioxidant activities (% inhibition = 54.7 and 49.9% by the DPPH method) and had FRAP values = 5.72 and 6.05 μmol Fe^{2+}/g dw at 15 days after application. In the second set of experiments, chitosan at 1,000 mg/L, salicylic acid at 100 mg/L, and $CuCl_2$ at 200 mg/L were used together to induce and to increase the amount of puerarin and genistein, and to increase antioxidant activity in WKK grown in the growth chamber, in the greenhouse, and in the field. The experiments in the growth chamber and in the greenhouse were set up as complete randomized designs with 8 treatments and 4 replications. The experiment in the field was set up as a randomized complete block design with 8 treatments and 3 replications. The result showed that WKK that were treated with chitosan at 1,000 mg/L plus $CuCl_2$ at 200 mg/L gave the highest amount of puerarin and genistein when grown in the growth chamber and in the greenhouse. The result for this treatment was significantly different from other treatments. The puerarin content after this treatment was 423 and 386 μg/g dw, and the genistein content was 22.6 and 22.4 μg/g dw. However, there were no statistically significant differences in the amount of puerarin and genistein for WKK that was grown in the field. The treatment of chitosan at 1,000 mg/L, plus salicylic acid at 100 mg/L, plus $CuCl_2$ at 200 mg/L, gave the highest antioxidant activities for the WKK that were grown in the growth chamber, in the greenhouse, and in the field. The IC_{50} results for these treatments were 2,482, 1,050 and 1,026 μg/ml by the DPPH method, and the FRAP values were 4.55, 4.73 and 6.69 μmol Fe^{2+}/g dw, respectively. The third set of experiments involved WKK that were grown in a growth chamber with treatment using chitosan at 1,000 mg/L plus $CuCl_2$ at 200 mg/L, which gave the highest puerarin content from the second experiment. Samples from WKK grown under these conditions were used to test the hypoglycemic effect in normal rats and in diabetic rats. Those WKK were extracted with 80% ethanol, and the crude extract was given to 10 week old rats, both normal and diabetic. The results showed that the crude extract could not reduce the blood sugar level in normal and acute diabetic rats. But, after repeated

daily oral administration in chronic diabetic rats for 30 days, the crude extract statistically significantly reduced blood sugar levels compared to those of the control group by 28.92% and 26.37% on days 14 and 21. Furthermore, histopathology findings showed no evidence of lesions related to the extract toxicity. Therefore, chitosan at 1,000 mg/L plus $CuCl_2$ at 200 mg/L could increase the amount of puerarin and genistein in WKK. In addition, the WKK crude extract administered orally daily at 100 mg/kg body weight to chronic diabetic rats showed an hypoglycemic effect from day 14.