บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] เป็นพืชสมุนไพรและเป็นพืชสงวนลำดับที่ 8 ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 (ฉบับที่ 1) ตามประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษา (กรมวิชาการเกษตร, 2548) เพื่อไม่ให้จำนวนที่พบในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็วและอาจสูญพันธุ์ได้ ความต้องการกวาวเครือขาวมีสูงขึ้นใน พ.ศ. 2542 ในประเทศไทยกวาวเครือขาวมักพบในบริเวณพื้นที่ราบเชิงเขา และพื้นที่ลาดชันของเทือกเขาต่างๆ เช่นที่จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ เชียงใหม่ ตาก เลย ลำปาง และสระบุรี (Dithachaiwong *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายตามแห่งที่พบกวาวเครือขาวนำไปสู่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธีใช้โมเลกุลเครื่องหมาย เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter Simple Sequences Repeat (ISSR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), Simple Sequent Repeat (SSR) ในรายงานทั่วไป โมเลกุลเครื่องหมายถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาว Dithachaiwong *et al.* (2005) ใช้ RAPD ซึ่งมีการร่วมกับ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวจากแหล่งพันธุ์ต่างๆ 7 แหล่ง ได้แก่ กาญจนบุรี เชียงใหม่ ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เลย ลำปาง และสระบุรี อย่างไรก็ตามการจำแนกโดยใช้ RAPD มีความแตกต่างกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ Jamjanta (1996) ตรวจสอบชนิดของพันธุ์กวาว 5 ชนิด โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์และเทคนิค RAPD แบบแผนของไอโซไซม์ที่บ่งบอกความแตกต่างของกวาวเครือได้ดีที่สุด คือ esteras และ peroxidase ที่น่าสนใจคือแบบแผนของ dendrogram ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ สอดคล้องกับ dendrogram ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD Sittihiphrom (2005) ใช้เทคนิค HAT-RAPDในการจำแนก กวาวเครือ (*Pueraria* spp.)

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) เป็นเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายชนิดหนึ่งที่ใช้วิธีพีซีอาร์ในการตรวจสอบ ไพรเมอร์ของ ISSR จะมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำเป็นชุด ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่งเบสคู่สมที่มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำเช่นกัน บนจีโนมของสิ่งมีชีวิต ที่เรียกว่า Simple Sequnce Repeat (SSR) หรือ microsatellite ตำแหน่งของ SSR กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต ทำให้ไพร์เมอร์จับกับตำแหน่งต่างๆ บนจีโนม ชิ้นส่วนดีเด็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาเป็นบริเวณระหว่าง SSR สองตำแหน่ง เทคนิคนี้จึงชื่อ Inter Simple Sequence Repeat ซึ่งโพลีมอร์ฟิซึมหรือความแตกต่าง เกิดขึ้นจากความแปรปรวน (variation) ของลำดับเบสภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอเช่น

insertion หรือ deletion และการ mutation ของบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับ ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เทคนิคนี้คล้ายกลับ RAPD ในส่วนที่ว่าเป็นการสุ่มตำแหน่งต่างๆของจีโนม แต่ ISSR มีความจำเพาะสูงกว่า เนื่องจากลำดับเบสของไพรเมอร์ มีความจำเพาะมากกว่า ไม่ได้มีลำดับเบสสุ่มเหมือนกับ RAPD จึงเป็นเทคนิคที่ทำซ้ำได้สูง (high reproducibility)ส่วนเทคนิค touchdown PCR ช่วยในการเพิ่มความจำเพาะและปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ทำได้โดยลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ลงทุกๆ รอบพีซีอาร์ การใช้เทคนิค touchdown PCR ร่วมกับ ISSR ทำให้แถบดีเอ็นเอมีความชัดเจนมากขึ้นและง่ายต่อการอ่านผล (Tsumura *et al.*, 1996) UPGMA มีหลักการคือ การใช้หลักการทางสถิติด้วยวิธี clustering algorithms โดยนำข้อมูลทาง phonetics ซึ่งเป็นอนุกรมวิธานเชิงจำนวน numerical taxonomy อาศัยความคล้ายคลึงกันทางลักษณะภายนอกทั้งหมด ทั้งค่าเดี่ยวๆ discrete character และค่าต่อเนื่อง continuous character แล้วเปลี่ยนเป็นระยะทาง distance สร้างความสัมพันธ์รูปต้นไม้ (Sneath and Sokal, 1973) PIC มีหลักการคือ การคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นๆ ว่ามีประโยชน์ในการนำไปใช้มากหรือน้อย เป็นค่าที่แสดงความหลากหลายของข้อมูลในตำแหน่งที่ศึกษา (Botstein *et al.*, 1980)

กวาวเครือขาวสะสมอาหารไว้ในรากสะสมอาหาร (หัว) ที่อยู่ใต้ดิน ในหัวกวาวเครือขาวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Lee *et al.*, 1983; Cherdshewasart *et al.*, 2004) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (antioxidant) (Cherdshewasart *et al.*, 2008) สารไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) ที่พบการสะสมในกวาวเครือขาวคือพิวรารินิน (puerarin) และจีนิสทีอิน (genistein) (Chansakaow *et al.*, 2000) พิวรารินมีผลลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ลดการแข็งตัวของหลอดเลือด (Xu *et al.*, 2005) และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (John *et al.*, 2004) ส่วนจีนิสทีอินเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนอย่างอ่อนลดการเกิดภาวะกระดูกพรุน (Knight and Eden, 1996) การยับยั้งเซลล์มะเร็งและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Frank *et al.*, 1994) อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถทำลายเซลล์และทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง และโรคอัลไซเมอร์ การบริโภคหรือใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะป้องกันและลดโอกาสเกิดโรคเหล่านี้ได้ (เฉลิมพงษ์ แสนจุ้มและไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2547) สารต้านอนุมูลอิสระจะจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของสารอนุมูลอิสระ จึงยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Gutteridge and Halliwell, 1994) ความก้าว หน้าของงานวิจัยด้านสรรพคุณและพิษวิทยาของกวาวเครือขาวมีมากขึ้น ทำให้ผู้บริโภคเข้าใจและยอมรับผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของกวาวเครือขาวในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ยาแผนโบราณ อาหารเสริมสุขภาพหรือใช้ผสมในเครื่องสำอางมากขึ้น (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2541; นิสากร ปานประสงค์, 2542; อรดี สหวัชรินทร์, 2542) คณะกรรมการอาหารและยาขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ที่มีกวาวเครือขาวเป็นส่วนประกอบเป็นยาแผนโบราณแล้วกว่า 50 ตำรับ (กระทรวงสาธารณสุข, 2542)

และมูลค่าการส่งออกของผลิตภัณฑ์จากกวาวเครือขาวมีประมาณ 1,500 ล้านบาท/ปี (มูลนิธิการแพทย์แผนไทย, 2548) กวาวเครือขาวยังใช้ในการเลี้ยงสัตว์ได้ พบว่าผงกวาวเครือขาวที่ผสมในอาหารเลี้ยงสุกรสามารถเพิ่มคุณภาพเนื้อของสุกรเพศผู้ได้ใกล้เคียงกับเนื้อของสุกรเพศเมีย (สมโภชน์ ทับเจริญ และคณะ, 2552) การผสมกวาวเครือขาว 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงไก่ ทำให้ไก่เจริญเติบโตดีไม่แตกต่างจากการได้รับฮอร์โมนสังเคราะห์ แต่ทำให้สีและรสชาดของเนื้อส่วนอกดีกว่าการให้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (อรรถวุฒิ พลายบุญ และคณะ, 2552) หัวกวาวเครือขาวมีพิวรารินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงไม่แตกต่างจาก α-tocopherol ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Cherdshewasart *et al.*, 2008) และมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองได้ (Chen *et al.*, 2004) อาจจะเป็นประโยชน์ในการรักษาโรคเบาหวานได้ เนื่องจากการใช้ประโยชน์จากกวาวเครือขาวมีความหลากหลายมากขึ้น คาดว่าความต้องการใช้หัวกวาวเครือขาวจะเพิ่มขึ้นด้วย ปัญหาที่สำคัญคือ คุณภาพของหัวไม่สม่ำเสมอ Cherdshewasart *et al.* (2008) พบว่ากวาวเครือขาวที่เก็บจากป่าจำนวน 28 แห่ง มีสารไอโซฟลาโวนอยด์ชนิดหลัก ๆ เช่น พิวรารินและจีนิสทีอิน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากได้รับอิทธิพลของพันธุกรรม และอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ เพื่อลดปัญหาดังกล่าวและทำให้หัวกวาวเครือขาวที่ปลูกโดยเกษตรกรมีคุณภาพดีขึ้น จึงใช้วิธีเร่งให้กวาวเครือขาวสร้างหรือสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ให้สูงขึ้น ในพืชตระกูลเดียวกันกับกวาวเครือขาว เพิ่มปริมาณจีนิสทีอินได้ด้วยการใช้สารชักนำเช่น ไคโตซาน (chitosan) และกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) (Kneer *et al.*, 1999; Al-Tawaha *et al.*, 2005) ประสาร ฉลาดคิด (2546) พบว่าการฉีดพ่นคอปเปอร์คลอไรด์เพิ่มปริมาณจีนิสทีอินในหัวกวาวเครือขาวได้

เนื่องจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้รวบรวมพันธุ์กวาวเครือขาวจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ตั้งแต่ปี 2542 และขยายพันธุ์จากเมล็ดที่เกิดจากการผสมข้าม เนื่องจากเป็นพืชตระกูลถั่ว กวาวเครือขาวมีลักษณะดอกสมบูรณ์เพศและขยายพันธุ์โดยเกิดผสมตัวเอง แต่มีรายงานการศึกษาการผสมของถั่วมีโอกาสเกิดการผสมข้ามได้ (Mackie and Smith, 1935) เป็นเรื่องที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ที่ไม่สามารถจำแนกกวาวเครือขาวชุดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เนื่องจากรักษาพันธุ์ไว้ใกล้กวาวเครือขาวที่มาจากแหล่งอื่น

งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อการประยุกต์เทคนิคการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (ISSR-Touchdown PCR) ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายซึ่งรวบรวมไว้ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และศึกษาถึงวิธีการชักนำปริมาณสารสำคัญในกวาวเครือขาว โดยใช้ไคโตซาน กรดซาลิไซลิกและคอปเปอร์คลอไรด์เป็นสารชักนำ แล้วคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำ (treatment time) ของสารแต่ละชนิดที่เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุดมาใช้ร่วมกัน เพื่อชักนำให้กวาวเครือขาวสร้างพิวราริน จีนิสทีอิน สารฟีนอลิค

โดยรวม (total phenolic acid) สารฟลาโวนอยด์โดยรวม (total flavonoids) และศึกษาผลกระทบของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว แล้วนำกวาวเครือขาวที่มีพิวรารินสูงที่สุดที่ได้จากการชักนำ ไปป้อนหนูแรทที่เป็นเบาหวานเพื่อศึกษาฤทธิ์ของการลดระดับน้ำตาลในเลือดเปรียบเทียบกับการป้อนน้ำกลั้นและการป้อนยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการใช้สารชักนำในการปลูกกวาวเครือขาว และการใช้กวาวเครือขาวในเชิงการรักษาโรคเบาหวานต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อรวบรวมสายพันธุ์กวาวเครือ และจัดกลุ่มโดยใช้ความใกล้ชิดของสายพันธุ์

1.2.2 เพื่อให้ทราบถึงชนิด และผลของสารออกฤทธิ์สำคัญของกวาวเครือขาวในทุกสายพันธุ์ที่พบ

1.2.3 เพื่อให้ได้แนวทางการเพิ่ม ผลผลิต และสารออกฤทธิ์ให้สูงขึ้น จากการปลูก และการจัดการที่เหมาะสม

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 การทดลองที่หนึ่ง ทำการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายซึ่งรวบรวมไว้ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยการประยุกต์เทคนิคการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (ISSR-Touchdown PCR) ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาว สุ่มตรวจจำนวน 36 สายต้น

1.3.2 การทดลองที่สอง กลุ่มตัวอย่างคือกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber อายุ 4 เดือน ชักนำด้วยไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ ชนิดละ 5 ความเข้มข้น ตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คัดเลือกความเข้มข้นของสารชักนำแต่ละชนิดที่ทำให้หัวกวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดไปใช้ในการทดลองที่สาม

1.3.3 การทดลองที่สาม นำสารจากการทดลองที่สองมาใช้ร่วมกันเพื่อชักนำ ให้กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ในโรงเรือนและแปลงทดลอง สร้างสารพิวรารินจีนิสทีอินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.3.4 การทดลองที่สี่คัดเลือกหัวกวาวเครือขาวที่มีปริมาณของพิวรารินสูงที่สุดจากการทดลองที่สาม ไปสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แล้วป้อนหนูแรทที่เป็นเบาหวานเปรียบเทียบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดกับการป้อนน้ำกลั่นและยากลัยเบนคลาไมด์ (glibenclamide)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายซึ่งรวบรวมไว้ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้

1.4.2 ได้สารชักนำที่เหมาะสมในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มพิวรารินและจีนิสทีอินในหัวกวาวเครือขาวให้สูงขึ้นก่อนการเก็บเกี่ยว

1.4.3 ทราบถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.4.4 ได้ทราบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทในสภาวะที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเฉียบพลันและการให้สารติดต่อกัน เป็นเวลา 30 วัน ผลต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับ ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในผู้ป่วยโรคเบาหวานต่อไป

1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.5.1 ผู้ปลูกกวาวเครือขาวและผู้ประกอบธุรกิจด้านสมุนไพร

1.5.2 ผู้ประกอบวิชาชีพเวชกรรม เภสัชกรรม

1.5.3 ผู้ประกอบโรคศิลปะสาขาการแพทย์แผนไทยและหมอพื้นบ้าน

1.5.4 หน่วยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ของกวาวเครือขาว

1.5.5 สถาบันการศึกษาทั่วไป