

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 การจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวโดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเทคนิค

ISSR-Touchdown PCR

4.1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

กวางเครือขาวที่รวบรวมในแปลงของฟาร์มมทส. มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลาย ดังนั้นการทดลองนี้จึงประยุกต์ตาม จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ และคณะ (2550) และวิธีการเก็บข้อมูลจาก cowpea descriptions ตามลักษณะการจำแนกพันธุ์ของ International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) (IBPGR, 1983) จำแนกความแตกต่างของกวางเครือขาวได้ ดังนี้

4.1.1.1 สีด้านหลังใบของใบย่อยส่วนปลายจากกวางเครือขาวทั้ง 36 สายต้น โดยใช้ระบบ The Hunter L, a, b Color Space (DeMan, 1999) พบว่ามีค่า L^* และ b^* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่ค่า a^* ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.1) 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 ใบย่อยส่วนปลายมีสีเขียวน้อยที่สุด ($b^* = 14.35$) 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 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ 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 ($y = 0.3338$)

4.1.1.2 ลักษณะใบ พบว่า กวางเครือขาวทั้ง 36 สายต้น มีลักษณะใบย่อยส่วนปลายแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จำแนกความแตกต่างที่ใบย่อยส่วนปลายได้ 2 กลุ่ม ดังนี้

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

4.1.1.2.2 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

4.1.1.3 ขนบนส่วนลำต้น ทั้ง 36 สายพันธุ์ ไม่มีขนบนส่วนของลำต้น ดังแสดงในตารางที่

4.2

4.1.1.4 ขนที่ฝัก (ตารางที่ 4.2)

4.1.1.4.1 มีขนที่ฝัก ได้แก่ สายพันธุ์ T6 และ T24

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

4.1.1.5 ลักษณะสีของดอก ใช้การพิจารณาสีกลีบดอกคู่กลาง และสีกลีบดอกคู่นอก จากการสังเกตสีกลีบดอกคู่กลางทั้ง 32 สายพันธุ์ มีสีกลีบดอกคู่กลางสีน้ำเงินอมม่วงที่เข้มถึงจางแตกต่างกัน จึงได้นำระบบ The Hunter L, a, b Color Space (DeMan, 1999) มาใช้ในการเก็บข้อมูลและเนื่องจากในช่วงระยะเวลาการเก็บข้อมูลสภาพอากาศแปรปรวน การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-ต่ำระหว่างการแทงช่อดอกทำให้เกิดการฝ่อของช่อดอกจำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่าสีกลีบดอกคู่กลาง และสีกลีบดอกคู่นอกทั้ง 32 สายพันธุ์มีค่า L^* , a^* และ b^* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.3) ค่า L^* อยู่ระหว่าง 26.60 ถึง 75.19 สายพันธุ์ T34 สีกลีบดอกคู่กลางมีความสว่างมากที่สุด ($L^* = 75.19$) สายพันธุ์ T25 สีกลีบดอกคู่กลางมีความสว่างน้อยที่สุด ($L^* = 26.60$) ค่า a^* อยู่ระหว่าง 10.47 ถึง 38.34 สายพันธุ์ T34 สีกลีบดอกคู่กลางมีสีเขียวมากที่สุด ($a^* = -10.47$) และสายพันธุ์ T33 สีกลีบดอกคู่กลางมีสีเขียวน้อยที่สุด ($a^* = 38.34$) และ ค่า b^* อยู่ระหว่าง -9.48 ถึง -34.19 สายพันธุ์ T34 สีกลีบดอกคู่กลางมีสีเหลืองมากที่สุด ($b^* = -9.48$) สายพันธุ์ T30 สีกลีบดอกคู่กลางมีสีเหลืองน้อยที่สุด ($b^* = -34.19$)

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

ตารางที่ 4.1 สีด้านหลังใบของใบย่อยส่วนปลายของกวาวเครือขาว

สาย ต้น	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	18.50	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-c	-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; จำนวนสีตามระบบของ 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 %

ตารางที่ 4.2 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 4.2 (ต่อ)

สาย ต้น	รูปร่างใบ	ฐานใบ	ปลายใบ	ขนบนส่วน ของลำต้น		ขนที่ฝัก		หมายเหตุ
				มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	
T27	elliptic	acute	acuminate		/			ไม่ติดฝัก
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 (ปลายใบเป็นติ่งแหลม) และacuminate (ปลายใบเรียวแหลม)]

ตารางที่ 4.3 สีของดอกบานูกู่กลางและกุ่มอกของกวาวเครือขาว

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	

หมายเหตุ ¹ 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 สีม่วง (-b); x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE ซึ่งคำนวณจากค่า L*, a*, b*; ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

4.1.1.6 ขนาดใบ พบว่ากวางเครือขาว 36 สายต้น มีขนาดใบย่อยส่วนปลายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) ความยาวใบตั้งแต่ 8.1-23.63 cm ความกว้างใบตั้งแต่ 4.33-13.83 cm กวางเครือขาวสายต้นที่ 5 มีขนาดใบใหญ่ที่สุด คือ ใบกว้าง 13.83 cm ยาว 23.63 cm กวางเครือขาวสายต้นที่ 34 มีขนาดใบเล็กที่สุด คือ ใบกว้าง 4.33 cm ยาว 8.1 cm

4.1.1.7 ความยาวก้านช่อดอก พบว่ากวางเครือขาว 36 สายต้น มีความยาวก้านช่อดอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) ความยาวก้านช่อดอกตั้งแต่ 6.5-66.03 cm กวางเครือขาวสายต้นที่ 4 มีความยาวก้านช่อดอกยาวที่สุด คือ 66.03 cm และกวางเครือขาวสายต้นที่ 34 มีความยาวก้านช่อดอกสั้นที่สุด คือ 6.5 cm

จากการใช้ลักษณะใบในการจำแนก พบว่าสามารถจำแนกกวางเครือขาวออกเป็น 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 ลักษณะมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของกวางเครือขาวที่รวบรวมไว้ วิเคราะห์ผลลักษณะที่บันทึกได้คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity จัดกลุ่มความสัมพันธ์สร้างแผนโคโรแกรมด้วย UPGMA (ภาพที่ 4.1) และวิธี PCA (ภาพที่ 4.2) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Genetic Similarity: GS) พบว่าค่า GS มีค่าระหว่าง 0.57-0.97 โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.77 ที่ความสัมพันธ์ 0.65 แยกได้ 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ 34 ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มอื่นที่เด่นชัด คือ ใบมีลักษณะขนาดเล็ก รูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเรียวแหลม

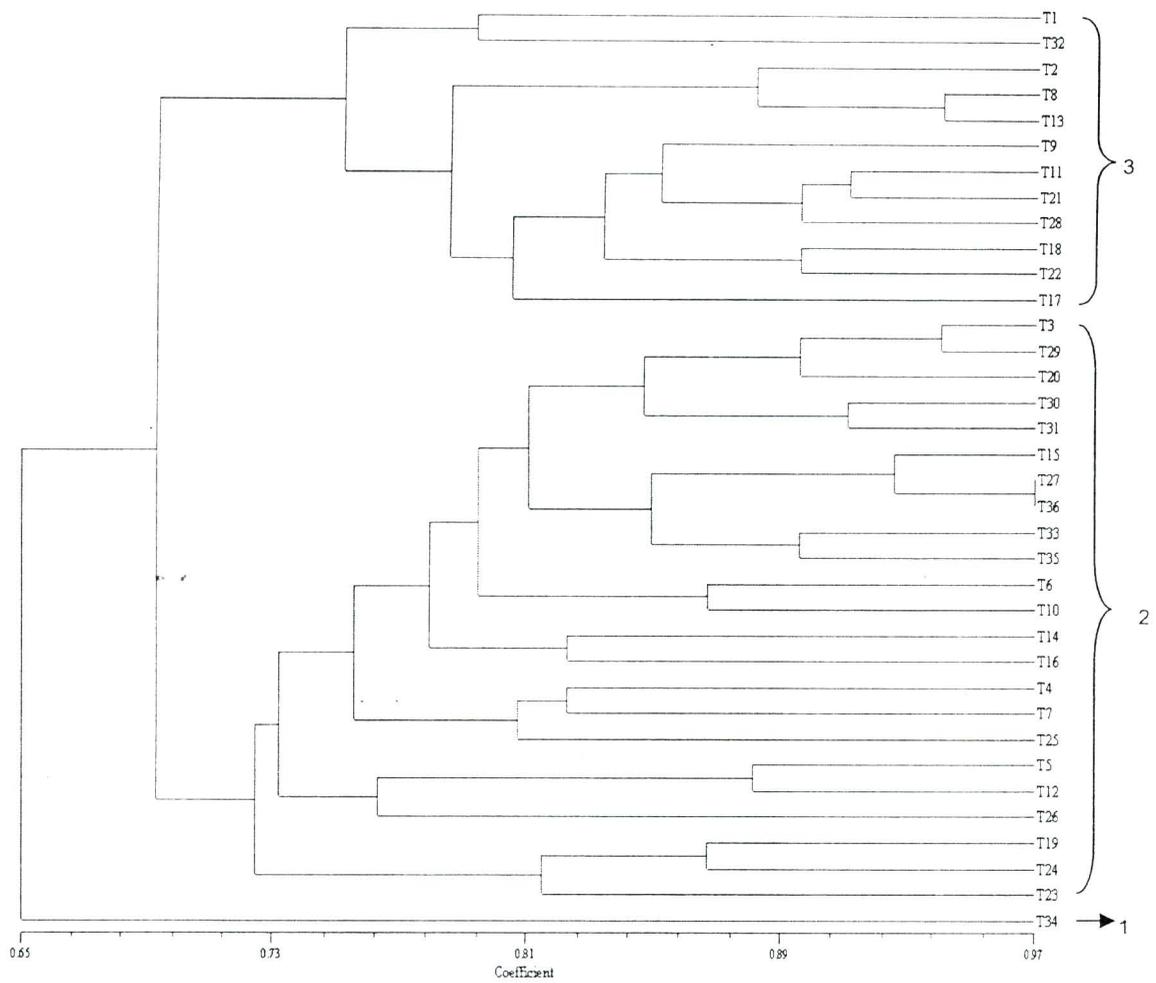
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 23 สายต้น มีลักษณะใบที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับสายต้นที่ 34 พบว่าสายต้นที่ 27 และ 36 มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากที่สุดในระดับ 0.97

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 12 สายต้น ใบมีลักษณะรูปไข่ ฐานใบมน และปลายใบเป็นติ่งแหลม ผลการจัดกลุ่มด้วยวิธีนี้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วย bootstraps มีค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ระหว่าง 2-80.9% คล้ายคลึงกับลักษณะที่รายงานโดย Dithachaiyawong *et al.* (2005) จากการวิเคราะห์ค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (GS) ของกลุ่มตัวอย่าง พบว่า มีค่าระหว่าง 0.57-0.97 แสดงให้เห็นว่าลักษณะภายนอกมีความแตกต่างกันมาก ทั้งนี้สายต้นที่ 34 มีลักษณะที่ต่างจากต้นอื่นๆ อย่างเด่นชัด

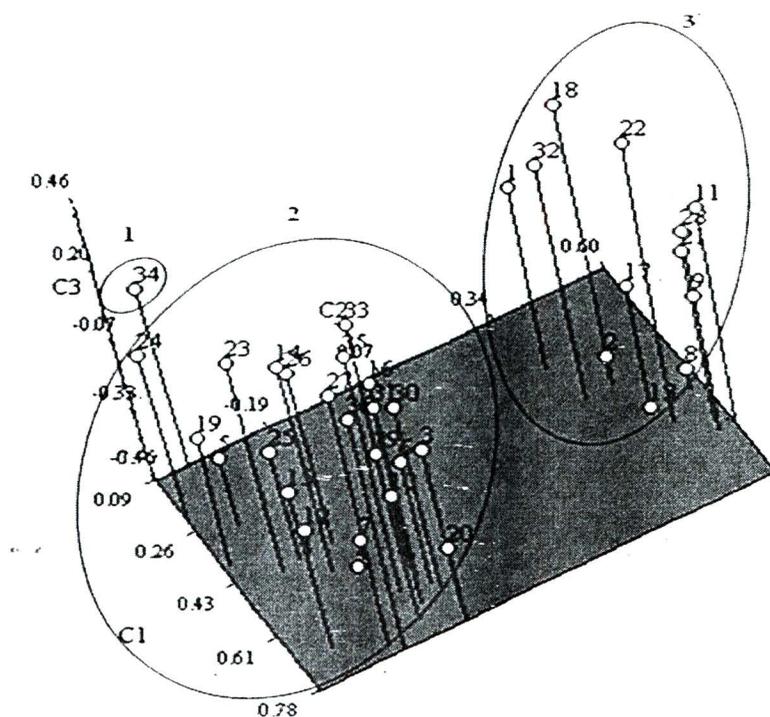
ตารางที่ 4.4 ขนาดใบและความยาวก้านช่อดอกของกวางเครือขาว

สายต้น	ใบย่อยส่วนปลาย(cm) ^{1/}				ความยาวก้านช่อดอก(cm) ^{1/}	
	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-i
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-i	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 4.1 เคนโดแกรมความสัมพันธ์ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะของกวาวเครือขาว 36 สายต้น คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x



ภาพที่ 4.2 ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างข้าว 36 สายต้น โดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ (สีด้านหลังใบ ลักษณะใบ ขนบนส่วนของลำต้น ขนที่ฝัก สีของดอก ขนาดของใบ และความยาวก้านช่อดอก) จากการวิเคราะห์โดย PCA

4.1.2 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 4.5 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 umbellata* (Thunb.) ซึ่งมีค่า

PIC เท่ากับ 0.203 เช่นเดียวกันกับงานทดลองของ Thimmappaiah *et al.* (2009) ที่ใช้เทคนิค ISSR makers ในการจำแนกความหลากหลายของมะม่วงหิมพานต์ในประเทศอินเดีย พบว่ามีค่า PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.304 และ Tantasawat *et al.* (2010) ใช้เทคนิค ISSR จำแนกและเปรียบเทียบพันธุ์ถั่วฝักยาว ในประเทศไทย 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 เป็นการตรวจสอบ เบสซ้ำเช่นเดียวกันภายในจีโนมพืช 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 ของการทดลองนี้ มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าการใช้เทคนิควิธี SSR markers ในการจำแนกและเปรียบเทียบถั่วฝักยาวในประเทศไทย 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 จำนวนอัลลีลที่เหมาะสมต่อโลกัส อยู่ระหว่าง 1.1250-1.8541 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 1.5544 จึงสรุปได้ว่าการใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR มีคุณสมบัติในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10x โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงด้วยวิธี Jaccard similarity จัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA และสร้าง dendrogram ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังแสดงในภาพที่ 4.3 ผลจากการวิเคราะห์ Similarity Coefficient พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.50-0.86 (50-86 %) จากแผนโคโรแกรม UPGMA (ภาพที่ 4.3) สามารถจัดกลุ่มกวาวเครือขาวออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่ระดับ 56% และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีกที่ระดับ 69% (ภาพที่ 4.3) เมื่อเปรียบเทียบความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ดีเอ็นเอของกวาวเครือขาวจาก UPGMA ด้วยการวิเคราะห์ค่า Bootstraps พบว่าผลการจัดกลุ่มใกล้เคียงกับ UPGMA สายต้นที่ใกล้ชิดกันยังอยู่ใกล้ชิดกันโดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ Bootstraps อยู่ระหว่าง 0.3-90.5% ผลการวิเคราะห์ UPGMA สามารถแยกได้ออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 4.3) ที่ระดับ GS 56%

ตารางที่ 4.5 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) ₈	10	0	10	0.6898	1.6480
29	ISSR74	(CCCT) ₈	9	0	9	0.3190	1.6648
30	ISSR78	(GGAT) ₈	6	0	6	0.4082	1.7085
31	ISSR80	(GGAGA) ₈	9	0	9	0.6669	1.8541
32	ISSR81	(GGGTG) ₈	10	1	9	0.4037	1.8022
33	ISSR84	HBH(AG) ₈	10	1	9	0.2728	1.6400
34	ISSR85	BHB(GA) ₈	6	4	2	0.9633	1.1776
35	ISSR86	VDV(CT) ₈	11	3	8	0.8036	1.5170
36	ISSR87	DVD(TC) ₈	8	2	6	0.8025	1.4725
37	ISSR89	DBD(AC) ₈	5	3	2	0.9779	1.1515
38	ISSR90	VHV(GT) ₈	7	4	3	0.7972	1.3413
39	ISSR91	HVH(TG) ₈	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	19.5921	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)

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ T34 และสายต้นที่ T7

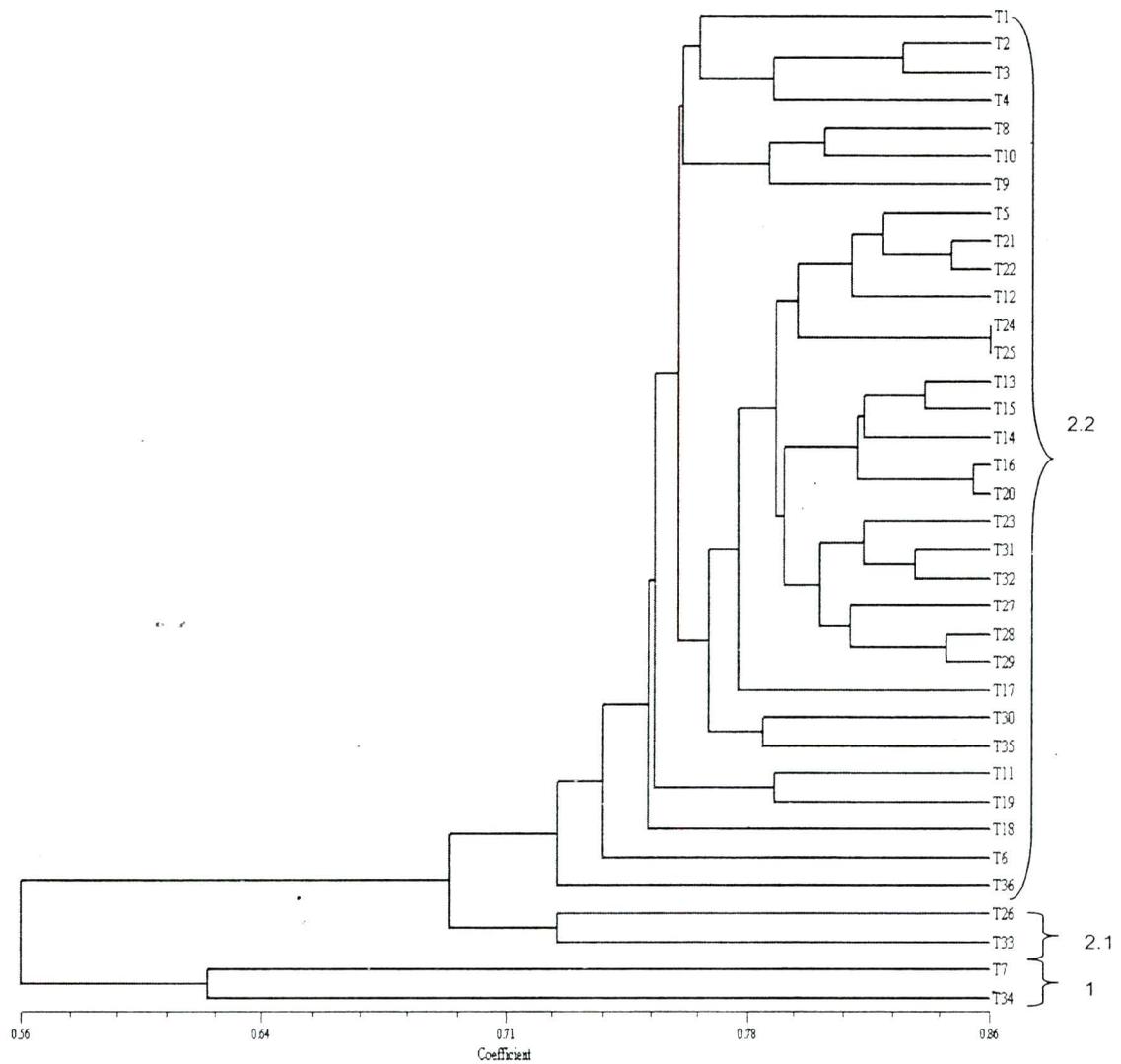
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือจำนวน 34 สายต้นแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ที่ระดับ GS 69%

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย 2 สายต้น คือ สายต้นที่ T26 และสายต้นที่ T33

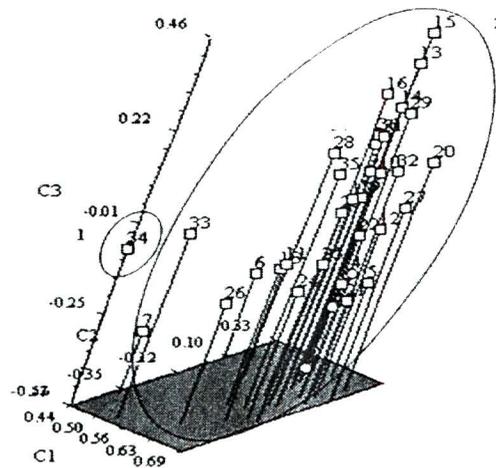
กลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือ 32 สายต้น คือ สายต้นที่ T1-6, T8-25, T27-32, T35 และ T36

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCA (ภาพที่ 4.4) 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 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 4.3 เคนโดแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR. คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x



ภาพที่ 4.4 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) จึงอาจไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ใช้ในการจัดจำแนกหากใช้สมมุติฐานว่าตำแหน่งของดีเอ็นเอไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ตรวจสอบ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการใช้ความแตกต่างของใบ ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA และสร้าง dendrogram ความสัมพันธ์ดังแสดงในภาพที่ 4.5 มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (GS) ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 36 สายต้นมีค่าระหว่าง 0.50-0.83 (50-83%) จากภาพที่ 3.6 มีจัดกลุ่มกวาวเครือขาวออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่ระดับ GS 53% และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีกที่ระดับ GS 66% เมื่อเปรียบเทียบความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA ด้วยการวิเคราะห์ค่า bootstraps พบว่า ผลการจัดกลุ่มใกล้เคียงกับ UPGMA มีค่าความเชื่อมั่นระหว่าง 1.2-96.4% ผลการวิเคราะห์ UPGMA สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 4.5) ที่ระดับ GS 53%

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายต้นที่ T34 และสายต้นที่ T7

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือจำนวน 34 สายต้น แยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่ระดับ GS 66%

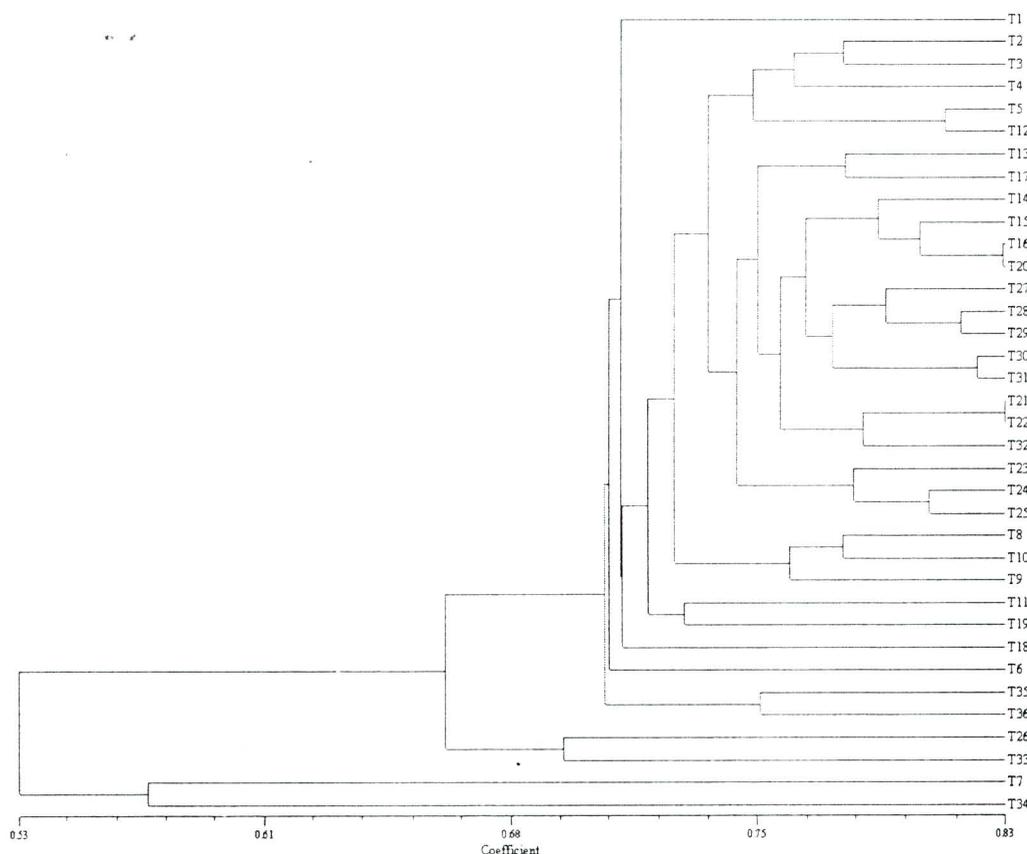
กลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย 2 สายต้น คือ สายต้นที่ T26 และสายต้นที่ T33

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือ 32 สายต้น คือ สายต้นที่ T1-6, T8-25,

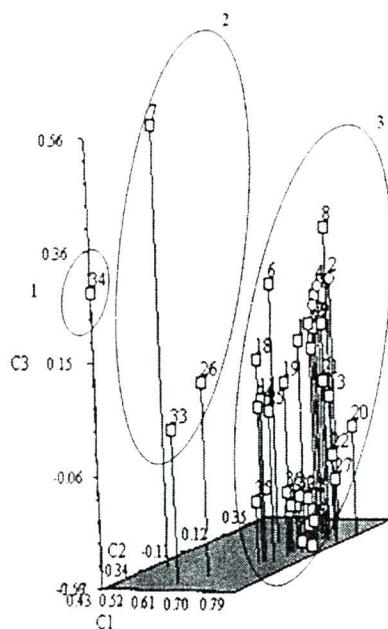
T27-32, T35 และ T36

ทั้งนี้ผลการรวม 2 ลักษณะเข้าด้วยกันให้ผลการจัดกลุ่ม UPGMA ใกล้เคียงกับการใช้ลักษณะดีเอ็นเอของกวาวเครือขาวในการจำแนกพันธุ์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCA (ภาพที่ 4.6) 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 พันธุ์กรรมของกวาวเครือขาวที่มีการรวบรวมไว้นี้อาจมาจาก 5 ฐานพันธุ์กรรมใหญ่หรือต้นพันธุ์ โดยฐานที่ 1 คือ สายต้นที่ 34 ฐานที่ 2, 3,4 คือ สายต้นที่ 7, 26, 33 (ตามลำดับ) และฐานที่ 5 มีสมาชิกในกลุ่มมากที่สุดจำนวน 32 สายต้น ซึ่งน่าจะเป็นกลุ่มจากแม่พันธุ์ที่มีพันธุ์กรรมใกล้เคียงกัน และจากผลการทดลองทั้งในลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และดีเอ็นเอ พบว่าไม่มีต้นใดมีพันธุ์กรรมเดียวกัน ทุกต้นมีความแตกต่างกันทั้งหมด



ภาพที่ 4.5 เคน โครแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x



ภาพที่ 4.6 ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ จากการวิเคราะห์โดย PCA

4.1.3 โครงสร้างทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจาก PCA (ภาพที่ 4.4) พบว่าทั้ง 2 กลุ่มมีการกระจุกตัวอยู่ในตำแหน่งต่างกัน ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความหลากหลาย (Shannon' information index; I) ของกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีค่าระหว่าง 0.1550-0.4473 (ตารางที่ 4.6) โดยกลุ่มประชากรในกลุ่มที่ 1 มีค่าดัชนีความหลากหลายน้อยที่สุดเนื่องจากจำนวนประชากรมีปริมาณน้อย การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรกวาวเครือขาว ทั้ง 2 กลุ่ม (ตารางที่ 4.7) พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity : H_t) เท่ากับ 0.2885 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic diversity of population : H_s) เท่ากับ 0.2048 และค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (coefficient of genetic differentiation : G_{st}) เท่ากับ 0.2901 แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับกว้าง แต่ความแตกต่างหรือความแปรปรวนที่เกิดขึ้นนั้นส่วนใหญ่เกิดจากความแตกต่างภายในกลุ่มประชากรเอง (70.99%) มากกว่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร (29.01%) และพบว่ามีค่าการถ่ายเทยีน (gene flow; N_m) เท่ากับ 1.2235 แสดงให้เห็นว่ามีการ

แลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.7) แสดงว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมประชากรกวาวเครือขาวที่รวบรวมไว้เกิดจาก 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 4.8)

ตารางที่ 4.6 ค่าดัชนีความหลากหลาย (Shannon' information index: I) ของกวาวเครือขาว 2 กลุ่ม โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR

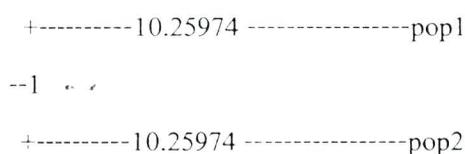
	Group 1	Group 2	Total
sample	2	34	36
I	0.1550	0.4473	0.4583
St.Dev	0.2644	0.2554	0.2457

ตารางที่ 4.7 โครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรกวาวเครือขาว (population genetic structure) แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity; Ht), ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic diversity of population; Hs), ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างระหว่างประชากร (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 4.8 ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Nei's genetic identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกลุ่มพันธุ์กวาวเครือขาว 2 กลุ่ม และเดนโดรแกรมแสดงระยะห่างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ด้วย Nei's genetic distance method (1972) and UPGMA by using PHYLIP V. 3.5

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



4.2 การทดลองที่สอง ชนิดและความเข้มข้นของสารชักนำต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว

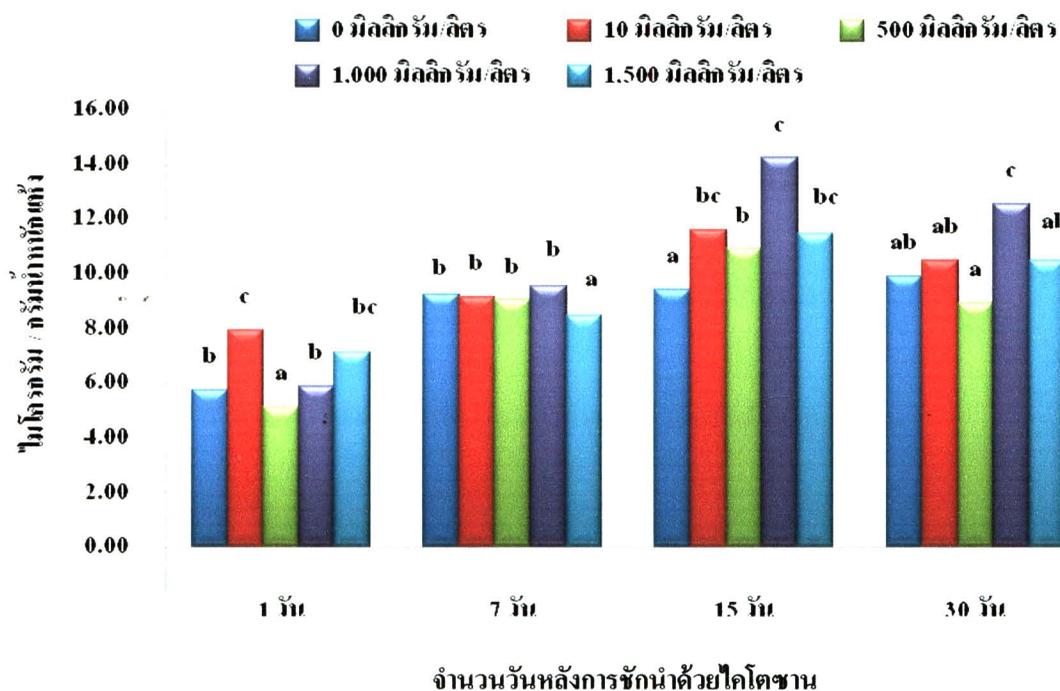
จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของสารชักนำแต่ละชนิดและจำนวนวันหลังการชักนำครั้งสุดท้ายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต่อปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกวาวเครือขาว เช่น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ ได้ผลดังต่อไปนี้

4.2.1 การชักนำด้วยไคโตซาน

เมื่อการชักนำด้วยไคโตซานทั้ง 5 ความเข้มข้น (0 10 500 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร) แล้วมีผลต่อตัวแปรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

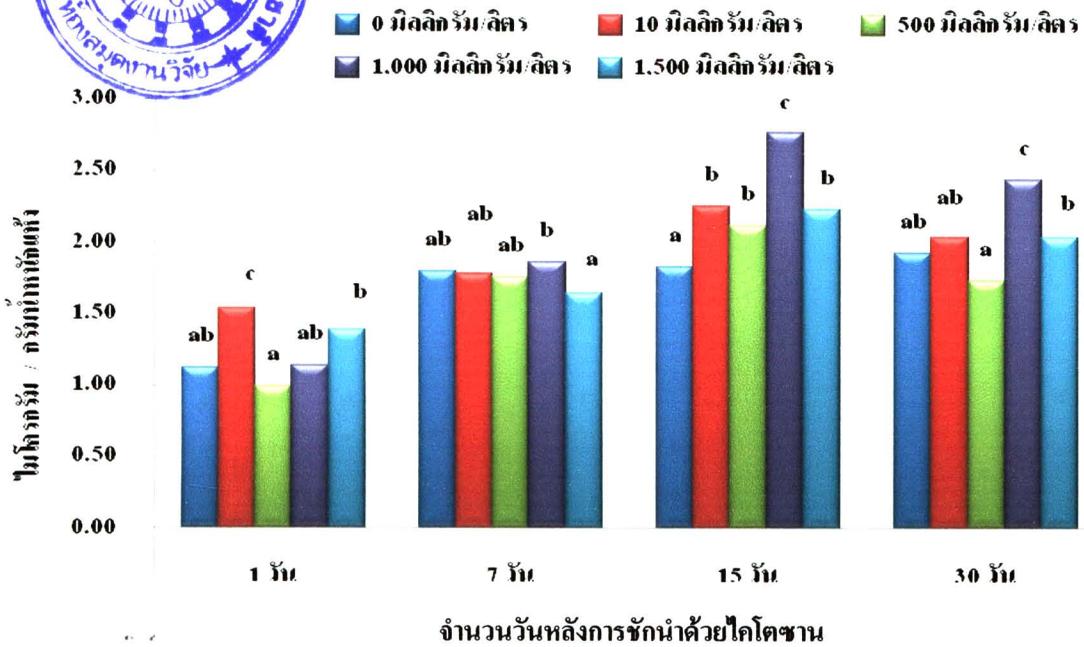
4.2.1.1 ผลต่อสารปริมาณของประกอบฟีนอลิก พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้นที่ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในหัวกวาวเครือขาว สูงที่สุด คือ 14.0 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดลองและยังสูงกว่าที่พบในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 30 ที่ใช้ความเข้มข้นเดียวกัน ถึง 58.7, 32.8 และ 11.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7) แสดงว่าสารไคโตซานสามารถชักนำสารประกอบฟีนอลิกให้เพิ่มขึ้นได้ สอดคล้องกับ Khan *et al.* (2003) ที่พบว่าสารฉีดพ่นไคโตซานในถั่วเหลืองสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) และ tyrosine ammonia-lyase (TAL) และทำให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น ดังนั้น ความ

เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร จึงเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการชักนำ การใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า เช่น 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร จะได้ผลที่ต่ำลง แสดงว่าสารฟีนอลิกตอบสนองเป็นแบบระฆังคว่ำ (bell shape) ต่อความเข้มข้นของสารชักนำที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารจะเพิ่มสูงสุดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ถ้าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีกจะทำให้ปริมาณสารลดลง สอดคล้องกับการชักนำสารไอโซฟลาโวนอยด์ในถั่วเหลือง โดย Kneer *et al.* (1999)



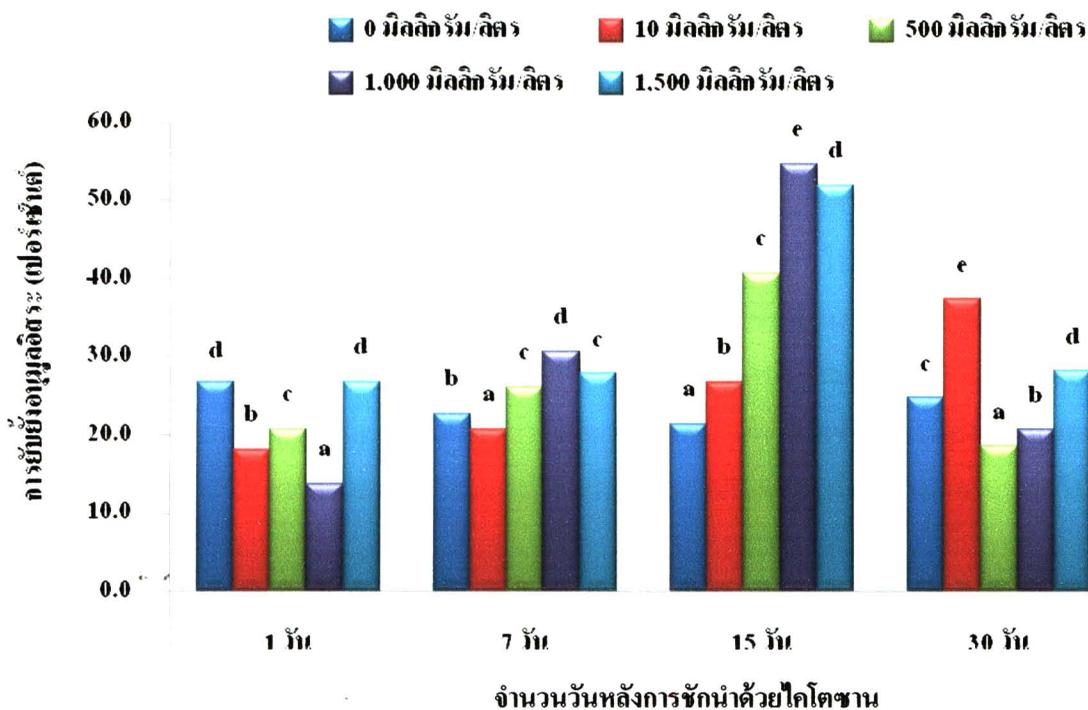
ภาพที่ 4.7 สารฟีนอลิกหลังการชักนำด้วยไคโตซาน

4.2.1.2 ผลต่อสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่า มีผลคล้ายกับผลต่อสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจสอบในข้างต้น คือ วันที่ 15 หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สูงที่สุดคือ 2.76 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดลอง (ภาพที่ 4.8) สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่าไคโตซานเพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ในถั่ว lupin ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากสารฟลาโวนอยด์เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิก (Santos and Mira, 2004) กลไกของการชักนำน่าจะไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL (Inui *et al.*, 1997)



ภาพที่ 4.8 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังการชักนำด้วยไคโตซาน

4.2.1.3 ผลต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 15 วัน มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 54.7 เปอร์เซ็นต์ (สูงกว่ากลุ่มควบคุมในวันเดียวกันถึง 61 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่น ๆ (ภาพที่ 4.9) ซึ่งอาจเกิดผลของการมีสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ ที่เพิ่มขึ้น ดังที่พบในการทดลองข้างต้น เนื่องจากสารทั้งสองกลุ่มเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้กาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น สอดคล้องกับ Ding *et al.* (2002) ที่พบว่าปริมาณของสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อกัน หรืออาจเกิดจากค่า pH ของสารละลายไคโตซานที่เป็นกรด เมื่อใช้ชักนำหลายครั้งโดยการคลุกกับดิน อาจมีผลเปลี่ยนแปลงค่า pH ของดินให้เป็นกรดด้วย จนเกิดความเปลี่ยนแปลงของความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชในดินได้ เนื่องจากขณะทำการทดลองไม่ได้วัด pH ของดิน ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นเพียงข้อสันนิษฐานของผู้วิจัยเท่านั้น ยงยุทธ โอสถสภา (2543) กล่าวถึงความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชในสภาวะดินกรดว่า ธาตุแคลเซียม แมกนีเซียมและโพแทสเซียมจะละลายได้ง่ายขึ้น แต่ฟอสฟอรัสจะถูกตรึงทำให้ละลายได้ยาก การมีธาตุบางอย่างละลายได้มากขึ้นอาจมีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ การมีไนโตรเจนสูงจะลดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วย วิธี DPPH และ FRAP ลง แต่การมีกำมะถันเพิ่มขึ้นจะทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชเพิ่มขึ้น

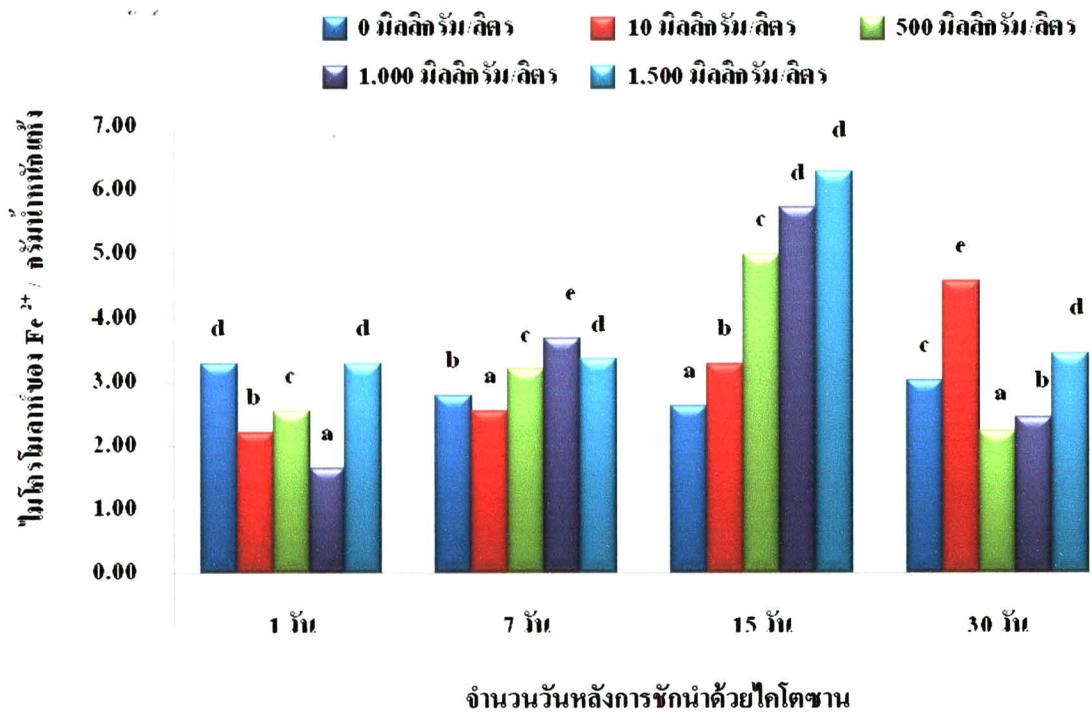


ภาพที่ 4.9 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยโคโคซาน

4.2.1.4 ผลต่อการเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยโคโคซานความเข้มข้นที่ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือขาวของทั้งสองความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 5.72 และ 6.29 ไมโครโมลาร์ของ Fe^{2+} /กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับและไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่น การชักนำเพิ่มความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่วันที่ 1 และมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 15 หลังจากนั้นจะลดต่ำลงจนใกล้เคียงกับผลในวันที่ 1 (ภาพที่ 4.10) ซึ่งอาจเกิดจากการชักนำสามารถไปเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิกและสาร ฟลาโวนอยด์ขึ้น ได้ดังที่พบในผลการทดลองข้างต้น

เพื่อกำหนดเกณฑ์ในการคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมจึงใช้วิธีการให้คะแนน (score) เป็น ระดับ ตั้งแต่ 1 คะแนน ถึง 3 คะแนน โดยกำหนดให้ค่าที่สูงที่สุดที่มีนัยสำคัญทางสถิติมีระดับคะแนนเท่ากับ 3 และกำหนดให้ ค่าที่สูงเป็นอันดับ 2 มีระดับคะแนนเท่ากับ 2 ค่าที่สูงเป็นอันดับที่ 3 มีระดับคะแนนเท่ากับ 1 ดังนั้น ทริตเมนต์ที่เหมาะสมที่สุดจะต้องมีคะแนนผลรวมของทุกปัจจัยที่เกี่ยวข้องการสารสร้างสารเคมี (total score A) สูงที่สุด ส่วนการคัดเลือกวันที่เหมาะสมต่อการเก็บผลข้อมูลหลังการชักนำ ได้จากวันเก็บข้อมูลที่มีผลรวมของ total score B ของแต่ละวันของทุกปัจจัยที่เกี่ยวข้องสูงที่สุด แสดงในตารางผนวกที่ 1 พบว่าโคโคซาน

ความเข้มข้น 1000 ppm เหมาะสมต่อการชักนำให้กวางเครือขาวสร้างส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเคมีมากที่สุด และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บข้อมูลหลังการชักนำคือ ที่ 15 วัน เนื่องจากมีคะแนนรวมของวันสูงที่สุด คือ 22 ได้จาก 6+8+4+4 จะพบว่าการชักนำด้วยโคโคซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดนั้น ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วย วิธี DPPH และ FRAP เพิ่มขึ้นด้วย ส่วนกลไกของการเพิ่มขึ้นนั้นยังไม่ทราบแน่ชัดและต้องศึกษาในรายละเอียดต่อไป ส่วนการลดลงของสารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยทั้งสองวิธีในวันที่ 30 หลังสิ้นสุดการชักนำแสดงว่าสารอนุมูลอิสระในกวางเครือขาวมีการตอบสนองต่อสารชักนำอย่างรวดเร็ว และลดปริมาณลงเมื่อระยะเวลาหลังถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าถ้าต้องใช้สารดังกล่าวเพื่อชักนำจะต้องรู้กำหนดเวลาที่แน่นอนถึงจุดที่จะให้สารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดก่อนทำการเก็บเกี่ยวให้ทันช่วงเวลานั้นต่อไป



ภาพที่ 4.10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยโคโคซาน

4) ผลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว ใน ตารางผนวกที่ 2 พบว่า ทุกตัวแปรที่ใช้วัดการเจริญเติบโตหลังการชักนำไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าไลโคซานไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แม้จะมีรายงานว่ามิซาคุโน โตรเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ในไลโคซานประมาณ 8.7 เปอร์เซ็นต์ (Ohta *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตาม กวางเครือขาวมีแนวโน้มเจริญเติบโตเป็นปกติและเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง

4.2.2 ผลของการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

การชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกทั้ง 5 ความเข้มข้น (0 10 100 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร) มีผลต่อตัวแปรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.2.2.1 ผลต่อสารประกอบฟีนอลิก พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 15.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.11)

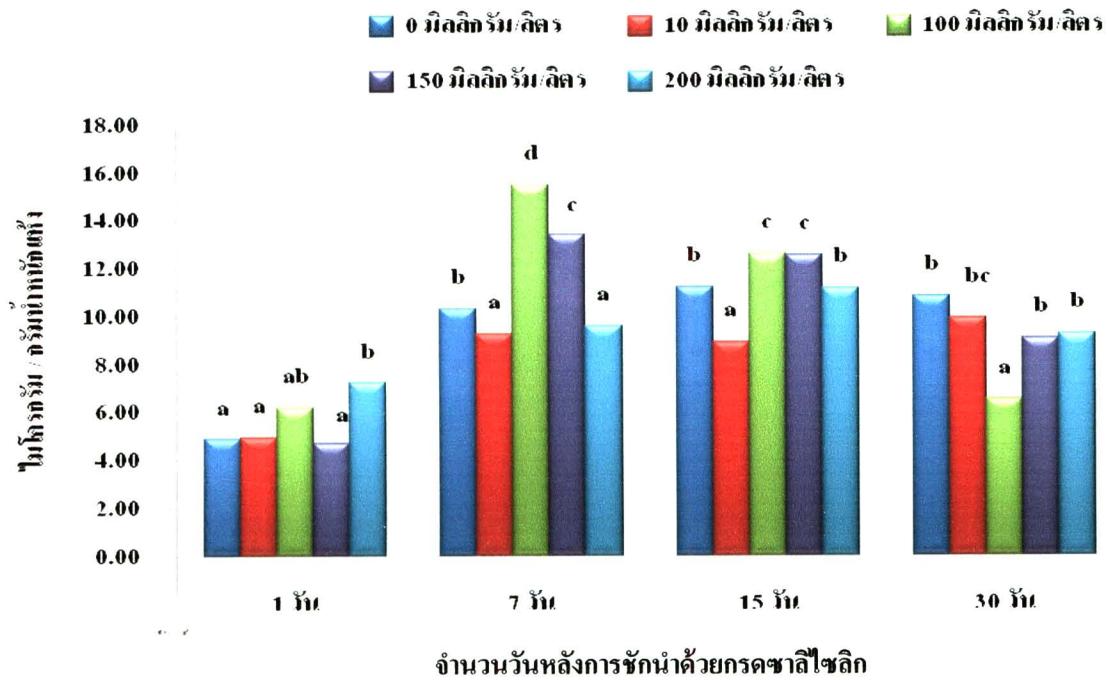
4.2.2.2 ผลต่อสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในหัว

กวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 3.01 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.12)

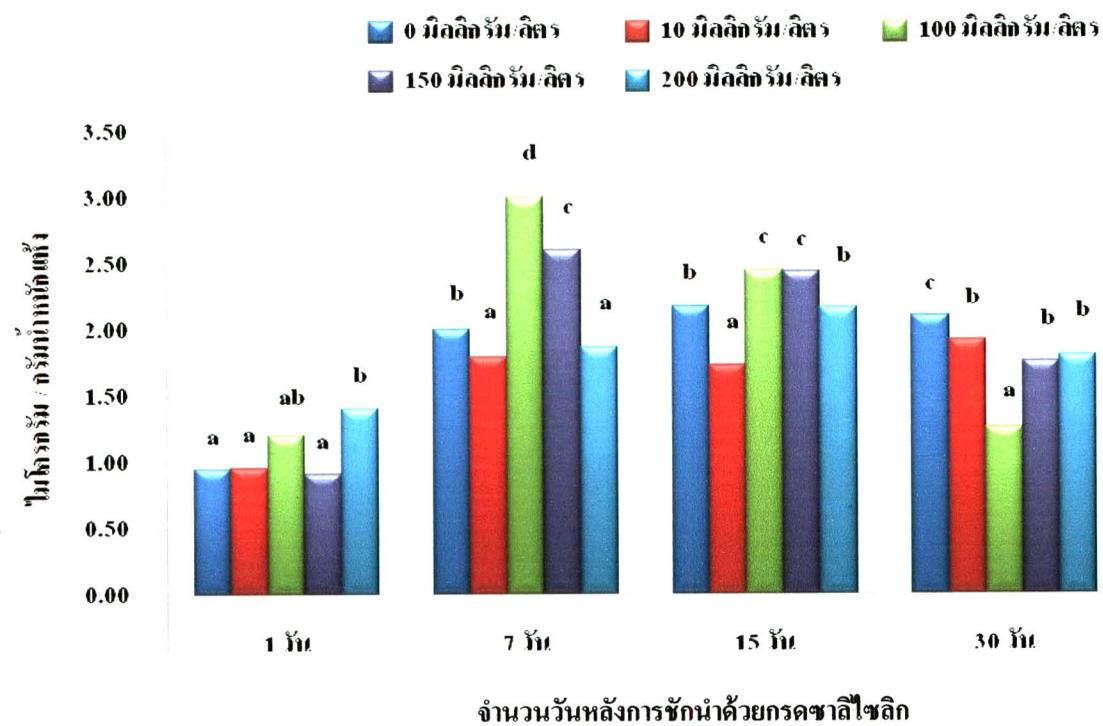
4.2.2.3 ผลต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การยับยั้งอนุมูลอิสระในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 58.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.13)

4.2.2.4 ผลต่อการเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การยับยั้งอนุมูลอิสระในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 5.89 ไมโครโมลาร์ของ Fe^{2+} /กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.14)

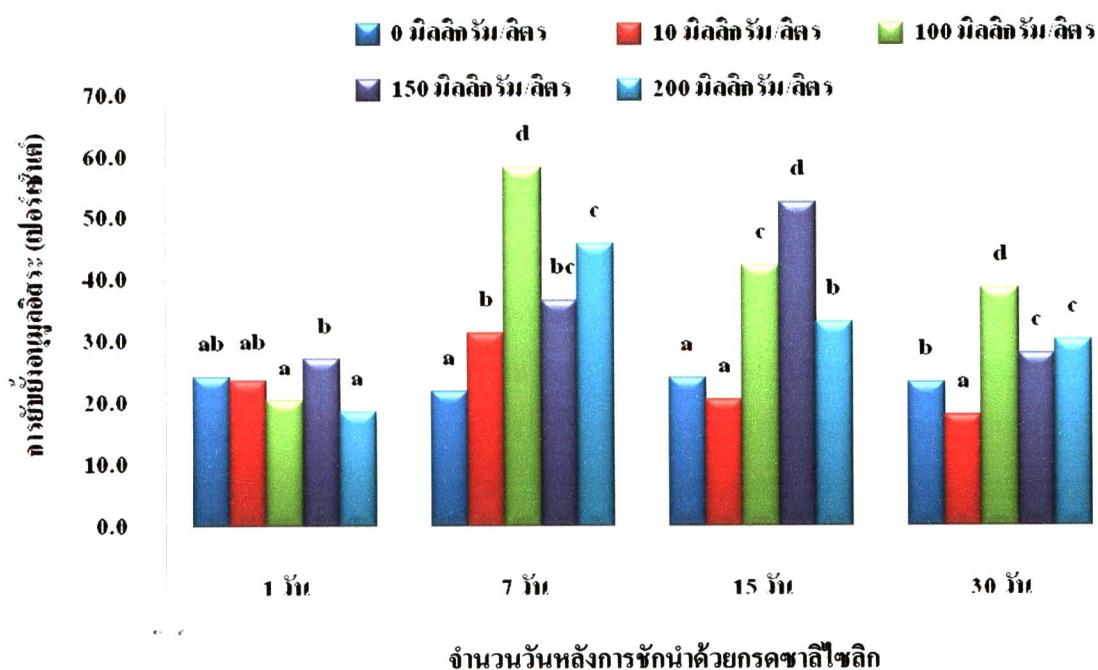
ผลจากการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งความเข้มข้นที่ใช้และระยะเวลาการเก็บข้อมูลหลังสิ้นสุดการชักนำ ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ การคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมใช้เกณฑ์การให้คะแนนเหมือนกับการชักนำด้วยไลโคซาน (ตารางผนวกที่ 3) พบว่า การชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 7 วัน หลังการชักนำ ทำให้ผลของการชักนำค่าต่าง ๆ ในข้างต้นดีที่สุด สอดคล้องกับ Ali *et al.* (2007) ที่พบว่า ค่าดังกล่าวสูงที่สุดใน



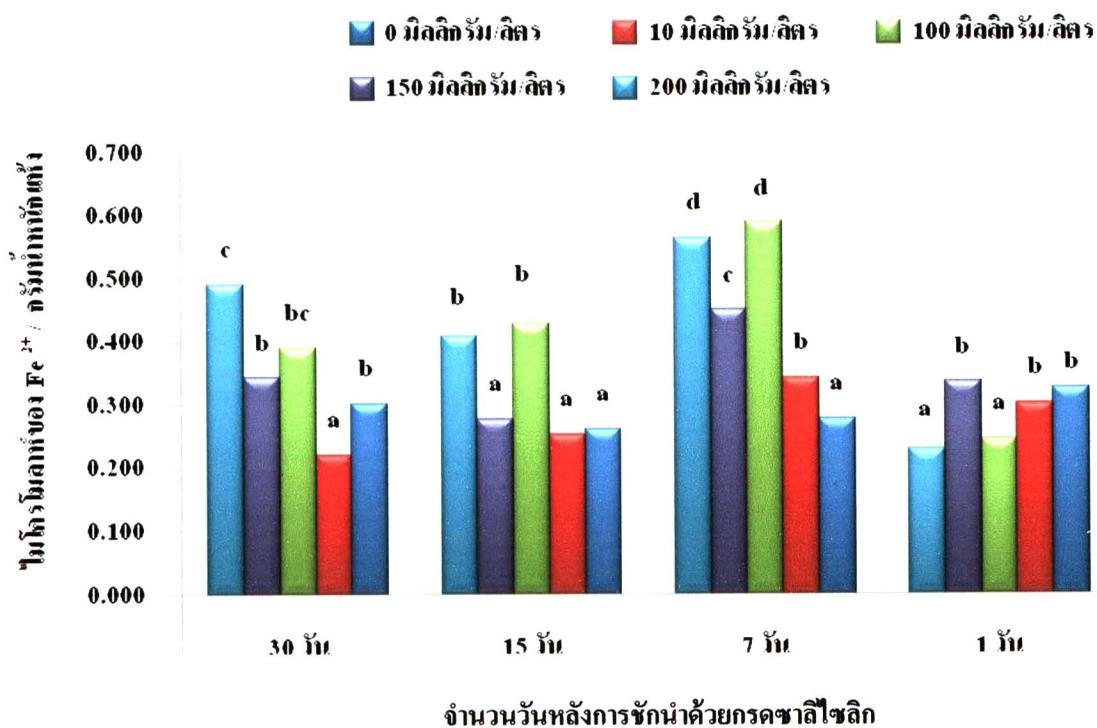
ภาพที่ 4.11 สารฟีนอลิก ของกวางเครือขาวที่ชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก



ภาพที่ 4.12 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก



ภาพที่ 4.13 ธาตุเหล็กในอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก



ภาพที่ 4.14 ธาตุเหล็กในอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

วันที่ 7 และวันที่ 9 ของการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกในโสมจีน เนื่องจากกรดซาลิไซลิกไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ PAL จึงเกิดการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกชนิดต่าง ๆ รวมถึงฟลาโวนอยด์ เพื่อตอบสนองต่อสัญญาณที่ได้รับ (Rao *et al.*, 2000)

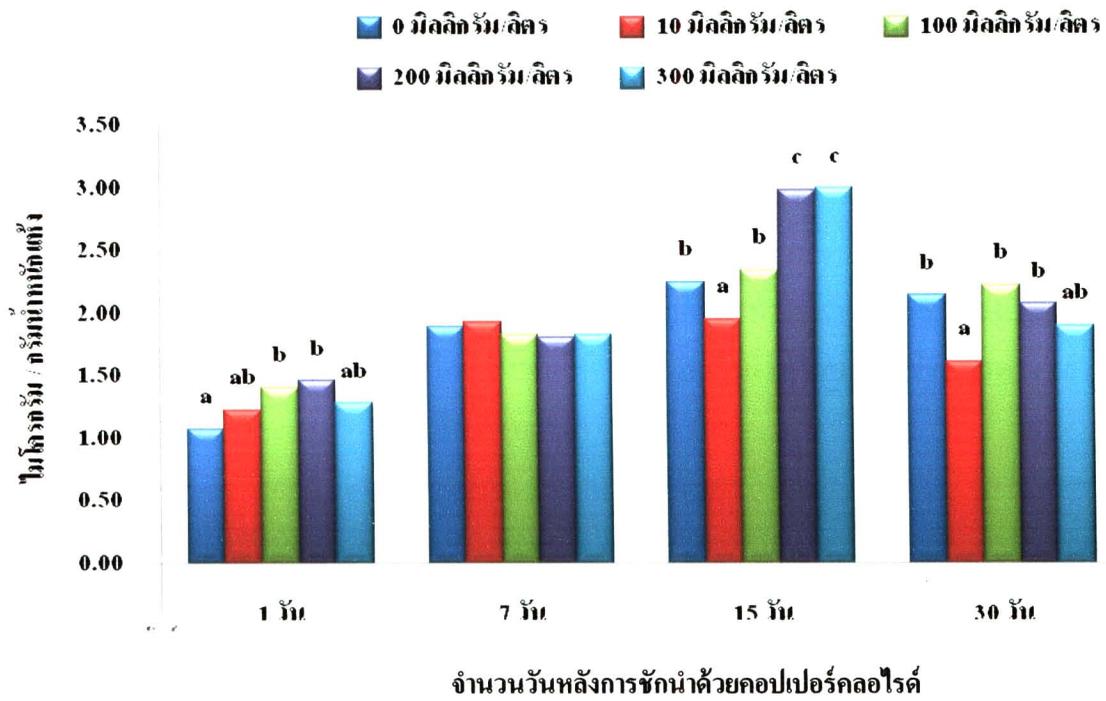
4.2.2.5 ผลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว ในตารางผนวกที่ 4 พบว่ากรดซาลิไซลิกไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แม้จะมีรายงานว่ากรดซาลิไซลิกมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชอื่น ๆ ก็ตาม เช่น การฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ให้แก่ถั่วเหลือง พบว่า ทำให้ของน้ำหนักรส น้ำหนักแห้งของดินและราก เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบต่อต้นและปริมาณของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ฉีดพ่นสารนี้ (Yildirim *et al.*, 2008) กรดซาลิไซลิกมีผลต่อความยาวรากและอาจเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและการขยายตัวของเซลล์ หรือออกฤทธิ์ในทางเสริมกันสารออกซิน (Kling and Meyer, 1983; Li and Li, 1995; Singh, 1993) การฉีดพ่นในถั่วในแปลงทดลองพบว่าสามารถเพิ่ม คลอโรฟิลล์ชนิดเอ และ ชนิดบี และแกโรทีนอยด์ (Türkyılmaz *et al.*, 2005) Khan *et al.* (2003) พบว่ากรดซาลิไซลิกเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงในถั่วเหลืองและข้าวโพด Wang and Li (2006) พบว่าการฉีดพ่นกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์/ลิตร ที่ให้แก่ถั่วเหลือง ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงสุทธิและค่า F_v / F_m (chlorophyll a fluorescence parameter) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม จึงสรุปว่ากรดซาลิไซลิกเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงได้ Hirano *et al.* (2000) รายงานว่ากรดซาลิไซลิกมีผลในทางอ้อมของการใช้สารชักนำต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยทำให้พืชมีระบบการป้องกันตัวจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม ทำให้พืชสร้างสารบางอย่างขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวก่อนที่จะมีการเข้าทำลายของเชื้อโรคจริง ๆ จึงช่วยลดความเสียหายของผลผลิตลงได้เมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อ ทำให้การเจริญเติบโตของพืชหรือผลผลิตดีขึ้น

4.2.3 ผลของการชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

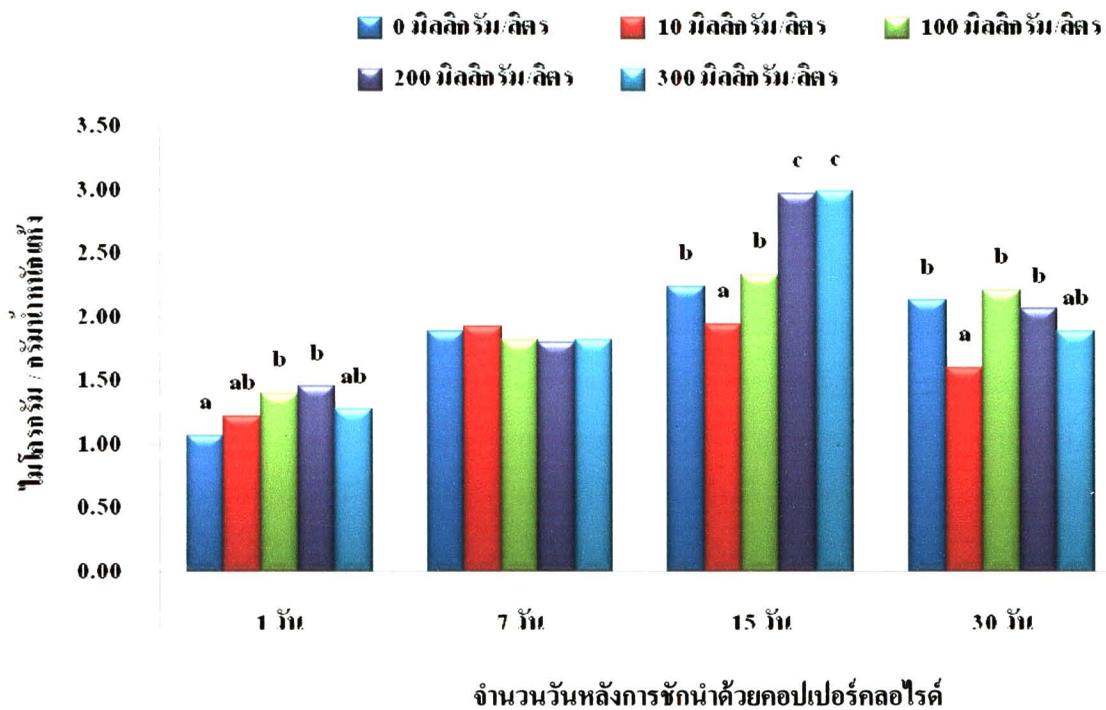
การชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 5 ความเข้มข้น (0 10 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร) มีผลต่อ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

4.2.3.1 ผลต่อสารประกอบฟีนอลิกของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 15.5 และ 15.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.15)

4.2.3.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์ของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้นที่ 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 2.98 และ 2.99 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.15 สารฟีนอลิกหลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์



ภาพที่ 4.16 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

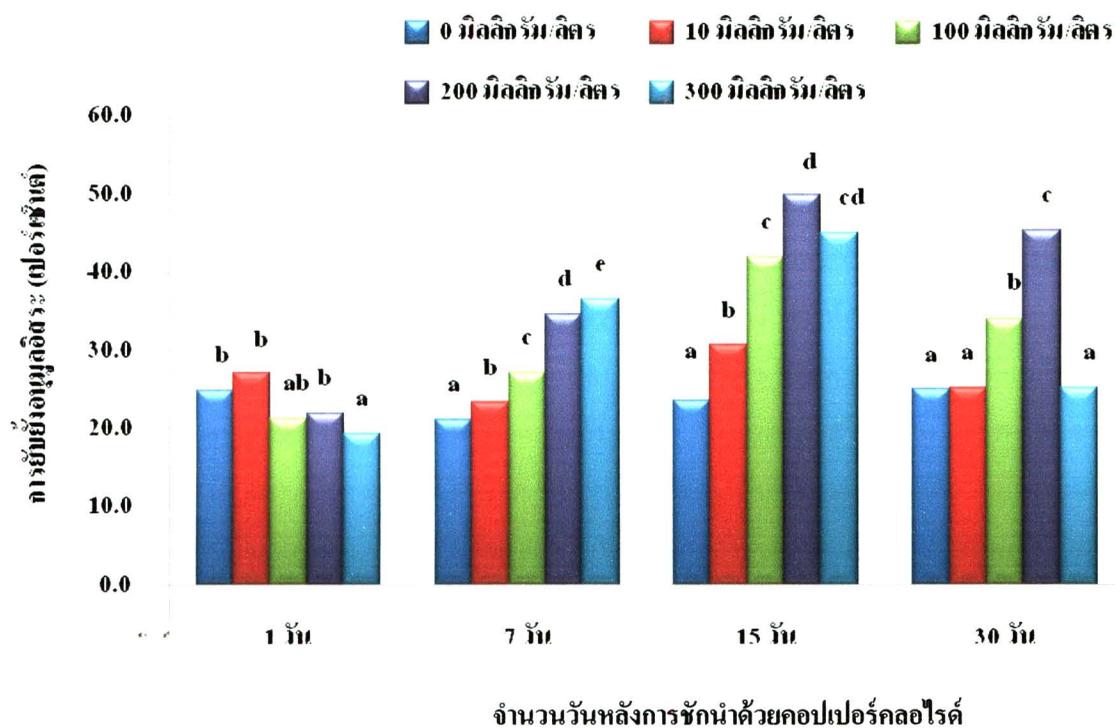
4.2.3.3 ผลต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของการเก็บข้อมูล ที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การยับยั้งอนุมูลอิสระในหัว

กวาวเครือขาวสูงที่สุดคือ 49.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.17)

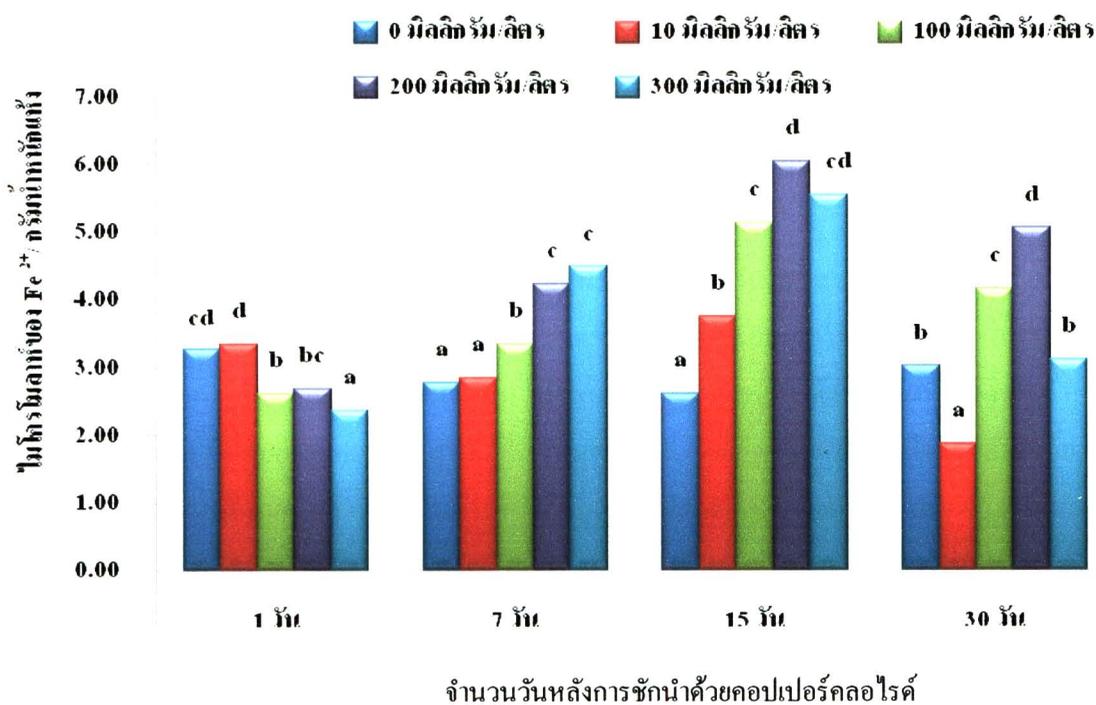
4.2.3.4 ผลต่อการเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP ของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้สารสกัดสามารถรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด คือ 6.05 ไมโครโมลาร์ของ Fe^{2+} /กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.18)

4.2.3.5 ผลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว ในตารางผนวกที่ 6 พบว่า คอปเปอร์คลอไรด์ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม กวาวเครือขาวมีแนวโน้มเจริญเติบโตเป็นปกติและเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ผลที่เกิดจากการชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ ต่อการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ การเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่ อาจเกิดจากคอปเปอร์คลอไรด์มีทองแดงเป็นส่วนองค์ประกอบ ทองแดงเป็นจุลธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับพืช เป็นโคเอนไซม์ เป็นส่วนประกอบของโปรตีนหลายชนิดและมีส่วนร่วมในวิถีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิชนิดต่าง ๆ การที่ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นหลังการชักนำอาจเกิดจาก ทองแดงไปชักนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) (Schutzendubel and Polle, 2002) เช่น superoxide anion (O_2^-), singlet oxygen (1O_2) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ให้สูงขึ้นอนุมูลอิสระเหล่านี้จะออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุล ทำให้เซลล์และดีเอ็นเอถูกทำลาย (De Vos *et al.*, 1992) เพื่อป้องกันผลกระทบของ ROS พืชจึงกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลัก ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ การสร้างสารประกอบฟีนอลขึ้นเพื่อใช้ป้องกันตัว เช่น phosphate dehydrogenase (G6PDH), shikimate dehydrogenase (SKDH), phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่า การชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ในถั่วลันเตาสามารถเพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ได้ การที่วันที่ 15 หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่สูงที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติกัน แสดงว่าการตอบสนองต่อปริมาณคอปเปอร์คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นนั้นเริ่มคงที่และน่าจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้มากกว่านี้ ประสาร ฉลาดคิด (2546) พบว่าการฉีดพ่นคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดอาการใบไหม้เป็นจุดและปริมาณของจินิสทีอินและคาอิคซิอินซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ลดลง การคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมใช้เกณฑ์การให้คะแนนเหมือนกับกรณีชักนำด้วยไลโคซานและการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก



ภาพที่ 4.17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์



ภาพที่ 4.18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

ดังแสดงในตารางผนวกที่ 5 ดังนั้นในการชักนำครั้งนี้จึงเลือกความเข้มข้นที่ 200 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากได้ผลการชักนำที่ดีเท่ากับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร แต่จะลดความเสี่ยงต่อการเป็นพิษได้ดีกว่า

ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay สารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวจะให้โปรตอน (H^+) แก่สารอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อได้รับโปรตอน DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ทำให้การดูดกลืนแสงลดลง จึงคำนวณเป็นการยับยั้งสารอนุมูลอิสระเมื่อตรวจสอบตัวอย่างต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ เช่น การทดลองของ Arokiyaraj *et al.* (2008) จึงตั้งสมมุติฐานว่า ถ้าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระแตกต่างกัน แสดงว่าในสารสกัดนั้นต้องมีชนิด หรือ ปริมาณ หรือทั้งสองอย่าง แตกต่างกันและความแตกต่างนั้น น่าจะเกิดจากผลของสารชักนำ จึงทำให้คัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมได้ จากการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวม และปริมาณของฟลาโวนอยด์ ให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกันคือ ตัวอย่างที่มีสารประกอบฟีนอลิกสูงก็จะมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระและเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีด้วย

Prior *et al.* (1998) และ Wang and Lin (2000) กล่าวถึงการชักนำด้วยทริตเมนต์ที่แตกต่างกันว่า อาจมีผลไปกระตุ้นให้เกิดสารชนิดที่แตกต่างกันไป จึงมีผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน และ Fahrendorf *et al.* (1995) รายงานว่าเมื่อสารชักนำเข้าสู่พืช ทำให้พืชสร้างสารต่าง ๆ เพื่อใช้ในระบบป้องกันตัว โดยสร้างเอนไซม์ G6PDH ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน pentose phosphate pathway (PPP) และสร้างสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกขึ้น จนได้สารฟีนอลิกในกลุ่มต่าง ๆ เพิ่มขึ้น

มีแนวโน้มว่าการชักนำเกือบทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงในวันที่ 30 หลังสิ้นสุดการชักนำ แสดงว่าสารชักนำแต่ละชนิดมีความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำ และจะลดอิทธิพลลงเมื่อผ่านจุดที่เหมาะสมนั้นไป ระยะเวลาเก็บข้อมูลหลังการชักนำครั้งสุดท้าย (1 7 15 และ 30 วัน) มีผลอย่างชัดเจนต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจเกิดจากผลของปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการดูดซึมและการเคลื่อนย้ายสารภายในต้นพืช ดังนี้ (1) ชนิดและอายุของพืช ใบพืชที่อายุน้อยจะมีอัตราการดูดซึมสารได้มากกว่าใบแก่ เนื่องจากการพัฒนาของไซและคิวทิเคิลนั้นยังไม่สมบูรณ์ จึงทำให้สารผ่านเข้าไปได้ง่ายกว่าและส่วนที่จะดูดซึมสารได้ดีคือขนราก รากที่เริ่มแตกใหม่หรือมีอายุน้อยจะมีขนรากมากและดูดซึมสารได้ดีกว่า (2) อุณหภูมิ เมื่อสูงขึ้นการดูดซึมสารจะมากขึ้น เพราะทำให้โมเลกุลของไซเกาะกันอย่างหลวม ทำให้น้ำผ่านไปได้ง่าย แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้

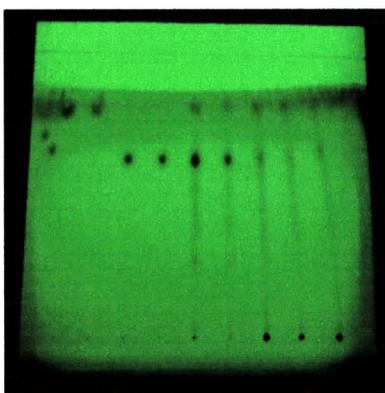
การดูดซึมสารลดลงเนื่องจากปากใบปิด (3) ความชื้นสัมพัทธ์ สารชักนำที่เป็นสารละลายน้ำเมื่อฉีดพ่นไปยังใบพืช ส่วนของน้ำจะระเหยสู่บรรยากาศ ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำน้ำจะแห้งเร็ว เนื้อสาร

จะแห้งติดอยู่บนใบ การดูดซึมจะเกิดขึ้นได้ยากมาก ถ้าให้สารขณะความชื้นสัมพัทธ์สูง น้ำอยู่ในสารละลายเมื่อฉีดพ่นไปยังใบจะระเหยได้ช้า จึงทำให้ใบพืชดูดซึมสารได้ดีกว่า (4) ปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความเข้มข้นของสารละลาย ค่า pH ของสารละลาย ความเข้มข้นของสารละลาย สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงจะทำการดูดซึมสารได้มากขึ้น (Greene and Bukovac, 1977)

4.2.4 ผลของสารชักนำต่อการมีอยู่ของจินิสทีอินและพิวราริน

เนื่องจากต้องการใช้ผลทดลองนี้ไปใช้ในการศึกษาผลของการใช้สารชักนำทั้งสามชนิดร่วมกันเพื่อชักนำพิวรารินและจินิสทีอินในการทดลองต่อไป จึงทดสอบการมีอยู่ของสารทั้งสองจากทุกการทดลอง พบว่าตำแหน่งของจุดในสารสกัด และค่า retention mobility (R_f) ของแต่ละตัวอย่างตรงกับจุดของสารมาตรฐานทั้งสองชนิด และพบว่า ทุกทริตเมนต์รวมทั้งกลุ่มควบคุมด้วยมีการสร้างสารจินิสทีอินและพิวรารินขึ้นเป็นปกติ เห็นได้จากตำแหน่งของสารจากแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏขึ้นในตำแหน่งที่ตรงกันกับสารมาตรฐานทั้งสองชนิดเมื่อทดสอบด้วยวิธี TLC ดังแสดงใน ภาพที่ 4.19 และ 4.20 แสดงว่าสารชักนำไม่มีผลไปยับยั้งการสร้างพิวรารินและจินิสทีอิน และอาจมีผลส่งเสริมให้เกิดการสร้างที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) การชักนำด้วยไคโตซาน และคอปเปอร์คลอไรด์ ในถั่ว lupin สามารถเพิ่มปริมาณของจินิสทีอินได้ประมาณ 6 ถึง 13 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Kneer *et al.* (1999) รายงานว่าสารไคโตซานและกรดซาลิไซลิกสามารถเพิ่มการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนและจินิสทีอินในรากถั่ว lupin ได้มากขึ้น ซึ่งจะได้ทดลองและหาปริมาณของสารทั้งสองที่เกิดจากการใช้สารชักนำร่วมกันในการทดลองต่อไป

($R_f = 0.78$)



{-A-} {---- B -----}

ภาพที่ 4.19 TLC โครมาโตแกรมของพิวรารินมาตรฐาน (A) และ puerarin ของสารสกัดจากหัว + กวาวเครือขาว (B) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ n-butanol : acetic acid : water (5 : 3 : 1 โดยปริมาตร)

($R_f = 0.41$)



{A} {----- B -----}

ภาพที่ 4.20 TLC โครมาโตแกรมของจีนิสทีอินมาตรฐาน (A) และจีนิสทีอินของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว (B) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ n-butanol : acetic acid : water (5:3:1 โดยปริมาตร)

4.3 พิวราริน จีนิสทีอิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาวที่ถูกชักนำด้วยไลโดซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

4.3.1 ผลของสารชักนำต่อปริมาณพิวรารินและจีนิสทีอิน

4.3.1.1 ผลต่อปริมาณพิวราริน พบว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂ ทำให้กวาวเครือขาวมีปริมาณพิวรารินสูงที่สุดทั้งการทดลองใน growth chamber (423 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) และในโรงเรือน (386 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อชักนำในแปลงทดลอง กวาวเครือขาวที่ปลูกในแปลงทดลองมีแนวโน้มของการสร้างพิวรารินสูงกว่าการปลูกใน growth chamber หรือ ปลูกในโรงเรือน (ตารางที่ 4.9) พิวรารินที่ขึ้นอาจเกิดจากสารชักนำไปกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ 2 ชนิด ในกระบวนการไกลโคไลซิส คือ fructose-1,6-bisphosphatase จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน fructose-1,6-bisphosphate ไปเป็น fructose-6-phosphate และเอ็นไซม์ aldolase จะแยก fructose-1,6-bisphosphate ให้เป็น dihydroxyacetonephosphate และ glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็น phosphoenolpyruvate (PEP) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไอโซฟลาโวน (สมบุญ เตชภิญญาวัฒน์, 2548) พิวรารินซึ่งเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนส์จึงเพิ่มขึ้น การชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂ อาจทำให้การทำงานของเอ็นไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ดีที่สุด การสังเคราะห์พิวรารินจึงเกิด ผลการทดลองใน growth chamber และในโรงเรือนให้ผลเหมือนกันและไม่มีสารชักนำที่ทำให้ปริมาณพิวรารินในหัวกวาวเครือขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าสารชักนำทั้งหมดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงยัง

ตารางที่ 4.9 ผลของสารชักนำต่อพิวรารินในกวางเครือขาวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของพิวราริน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	132 a	277 a	355
SA	292 c	299 abc	383
CuCl ₂	311 cd	297 ab	341
CuCl ₂ +SA	201 ab	288 a	333
Chitosan	257 bc	341 bcd	386
Chitosan+SA	282 bc	344 cd	371
Chitosan+CuCl ₂	423 e	386 d	4351
Chitosan+CuCl ₂ + SA	384 de	365 c	413
CV (เปอร์เซ็นต์)	1.59	1.70	1.91

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

กิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ได้ปกติ ในแปลงทดลองไม่มีความแตกต่างกันของพิวรารินอาจเกิดจากปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ เช่น รังสียูวี ลม หรือศัตรูพืช (Stafford, 1997; Olsson *et al.*, 1998) มีผลในทางเสริมหรือลดบทบาทของสารชักนำ หรือเกิดจากพิวรารินถูกสร้างเพื่อการป้องกันตัวของพืชอยู่แล้ว จึงมีปริมาณสูงเมื่อมีปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ในแปลงทดลองมากกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง เห็นได้จากกลุ่มควบคุมในแปลงทดลองมีปริมาณพิวรารินสูงกว่าในโรงเรือนและใน growth chamber การกระตุ้นด้วยสารชักนำจึงไม่เพิ่มปริมาณของสารดังกล่าวขึ้นไปได้อีก ชี้ดจำกัดดังกล่าวอาจมีผลของพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง ในบางพันธุ์อาจมีขีดจำกัดของการสร้างพิวรารินได้มากกว่าพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้

4.3.1.2 ผลต่อปริมาณจินิสทีอินพบว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂ ทำให้กวางเครือขาวมีปริมาณจินิสทีอินสูงสุด (22.6 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดลองใน growth chamber และในโรงเรือน (22.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) และในโรงเรือน การชักนำด้วย Chitosan และ Chitosan+CuCl₂+SA ทำให้ปริมาณของพิวรารินสูงไม่แตกต่างจากการใช้ Chitosan+CuCl₂ การชักนำในแปลงทดลองไม่ทำให้ปริมาณจินิสทีอินมีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4.10) จากการทดลองโคโคซาน คอปเปอร์คลอไรด์ และกรดซาลิไซลิกมีผลต่อการเพิ่มปริมาณจินิสทีอินสอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่าการชักนำด้วยโคโคซาน และคอปเปอร์คลอไรด์ ในถั่วลูปินเพิ่มปริมาณจินิสทีอินได้ 6 ถึง 13 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ

ตารางที่ 4.10 ผลของสารชักนำต่อจีนิสทีอินในกวางเครือขาวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของจีนิสทีอิน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	6.2 a	12.2 b	11.4
SA	5.2 a	8.6 a	9.3
CuCl ₂	20.6 cd	19.8 c	14.2
CuCl ₂ +SA	10.3 ab	17.8 c	14.1
Chitosan	10.4 ab	23.7 d	14.9
Chitosan+SA	9.8 ab	20.7 cd	14.3
Chitosan+CuCl ₂	22.6 d	22.4 d	19.0
Chitosan+CuCl ₂ + SA	15.7 bc	22.7 d	16.5
CV (เปอร์เซ็นต์)	2.47	3.56	3.48

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

กลุ่มควบคุม Kneer *et al.* (1999) พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ใช้ร่วมกับการเลี้ยงเซลล์รากถั่ว lupin เพิ่มจีนิสทีอินได้ 108.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และการใช้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 800 ไมโครโมลาร์ เพิ่มจีนิสทีอินได้ 122.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่การให้น้ำกลั่นมีปริมาณพิวราริน เท่ากับ 5.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งเท่านั้น รูปแบบการชักนำ Mithofer *et al.* (1996) รายงานว่าเมื่อไคโตซานถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสาร โอลิโกแซกคาไรด์ซึ่งสามารถไปจับกับ beta-glucan-binding protein ที่อยู่ในบริเวณ plasmalemma ของรากพืช จึงทำให้พืชสร้างสารทุติยภูมิขึ้นมาตอบสนอง คอปเปอร์คลอไรด์อาจมีผลในทางส่งเสริมกันกับไคโตซาน เห็นได้จากการใช้คอปเปอร์คลอไรด์อย่างเดียว เพิ่มจีนิสทีอินได้น้อยกว่าการใช้ร่วมกันกับไคโตซาน มีรายงานถึงอิทธิพลของธาตุทองแดงในคอปเปอร์คลอไรด์ต่อเพิ่มสารในกลุ่มจีนิสทีอินในสภาพแปลงทดลองของประสาร ฉลาดคิด (2546) ว่าการฉีดพ่นสารละลายทองแดงทำให้ปริมาณจีนิสทีอินในหัวกวางเครือขาวมากกว่ากลุ่มควบคุม ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร เพิ่มจีนิสทีอินได้สูงสุด Hakamatsuka (1991) พบว่าคอปเปอร์คลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้ถั่ว *P. lobata* มีจีนิสทีอินเพิ่มขึ้น 5-10 เท่า ความถี่ในการชักนำเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณจีนิสทีอิน Kneer *et al.* (1999) พบว่าการชักนำด้วยไคโตซานและกรดซาลิไซลิกเพียงครั้งเดียวทำให้ปริมาณจีนิสทีอินเพิ่มขึ้นในวันแรกและจะค่อย ๆ ลดลง จึงต้องชักนำแบบต่อเนื่องเพื่อคงปริมาณสารไว้

4.3.2 ผลต่อปริมาณสารฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารทุติยภูมิที่สำคัญในพืช สังกะหร้าจากกรดอะมิโนฟีนิลอะลานินและไทโรซีนอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ลิกนิน เป็นต้น กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนให้ผลสอดคล้องกันเมื่อชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA คือทำให้มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด คือ 15.0 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง แตกต่างจากในโรงเรือนและในแปลงทดลองที่พบว่า Chitosan+CuCl₂ มีปริมาณของสารฟีนอลิกสูงสุดคือ 16.1 และ 16.6 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) จากการทดลองพบว่าไคโตซานมีผลต่อการเพิ่มปริมาณฟีนอลิก Fahrendorf *et al.* (1995) รายงานว่าเมื่อสารชักนำเข้าสู่พืช พืชอาจสร้างระบบป้องกันตัวโดยสร้างเอนไซม์ G6PDH ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน pentose phosphate pathway (PPP) และจะสร้างสารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกขึ้น และไคโตซานอาจจะไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์ โดยกระตุ้นกิจกรรมของ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (Inui *et al.*, 1997) สอดคล้องกับ Khan *et al.* (2002) ที่พบว่ากรดไขมันไคโตซานในของถั่วเหลืองสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL และ tyrosine ammonia-lyase (TAL) ให้สูงขึ้นได้จึงส่งผลให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในใบของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.11 สารฟีนอลิกในหัวกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่ต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของสารฟีนอลิก (ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	11.7 b	9.8 a	12.4
SA	9.3 a	12.0 b	13.2
CuCl ₂	13.1 b	11.3 b	13.2
CuCl ₂ +SA	13.0 b	14.8 cd	12.6
Chitosan	11.6 b	12.0 b	12.1
Chitosan+SA	13.0 b	11.0 ab	12.8
Chitosan+CuCl ₂	12.5 b	16.1 d	16.6
Chitosan+CuCl ₂ + SA	15.0 c	14.0 c	16.0
CV (เปอร์เซ็นต์)	5.81	7.13	13.92

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกลำดับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.3 ผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มหนึ่งของสารประกอบฟีนอลิก ตัวอย่างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ แอนโทไซยานิน และไอโซฟลาโวนอยด์ เป็นต้น จากการทดลอง พบว่า กวาวเครือที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนให้ผลที่ไม่สอดคล้องกันการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA ทำให้หัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 3.09 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แต่การปลูกในโรงเรือนพบว่าการชักนำด้วย Chitosan+SA มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 2.50 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แต่ในแปลงทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของสารฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ 4.12) แสดงให้เห็นว่าโคโคซาน คอปเปอร์คลอไรด์ และกรดซาลิไซลิกมีผลต่อปริมาณของฟลาโวนอยด์ สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่า การชักนำด้วยโคโคซาน และคอปเปอร์คลอไรด์ ในถั่ว lupin เพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ให้สูงกว่ากลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากฟลาโวนอยด์เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกกลไกของการชักนำน่าจะคล้ายกันคือไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL แล้วทำให้เกิดการกระบวนการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องจนได้สารประกอบ ฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ (Inui *et al.*, 1997) ส่วนผลที่เกิดจากกรดซาลิไซลิก Ali *et al.* (2007) พบว่า กรดซาลิไซลิกเป็นสัญญาณกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ Andrew *et al.* (1994) พบว่าการฉีดพ่นคอปเปอร์คลอไรด์ทำให้ถั่วอัลฟาฟา (*M. sativa* L.) สร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น เพราะคอปเปอร์คลอไรด์ซึ่งมีธาตุทองแดงซึ่งเป็นจุลธาตุอาหารพืช เป็นโคเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ได้ แต่ทองแดงที่มากเกินไปความต้องการของพืชอาจชักนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) (Schutzendubel and Polle, 2002) เช่น superoxide anion (O₂⁻), singlet oxygen (¹O₂) และ hydrogen peroxide (H₂O₂) ให้สูงขึ้น อนุมูลอิสระเหล่านี้จะออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์และยังทำลายดีเอ็นเอ (De Vos *et al.*, 1992) ROS จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบฟลาโวนอยด์เพื่อใช้ป้องกันตัวเอง เช่น phosphate dehydrogenase (G6PDH), shikimate dehydrogenase (SKDH), phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) จึงทำให้ปริมาณของฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น

4.3.4 ผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Gutteridge and Halliwell, 1994) ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาศัยวิธีการตรวจ 2 แนวทาง แนวทางที่ 1 คือ การวัดความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระ (scavenging method) ซึ่งใช้วิธี DPPH assay เป็นวิธีทดสอบ และแนวทางที่ 2 คือ

การวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สารต้านอนุมูลอิสระ (reducing method) ซึ่งใช้วิธี FRAP เป็นวิธีทดสอบ

ตารางที่ 4.12 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาวหลังถูกชักนำในสภาพการปลูกแตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	1.87 a	2.19 bc	2.80
SA	2.38 bc	1.65 a	2.46
CuCl ₂	2.23 b	2.27 bc	2.92
CuCl ₂ +SA	2.91 d	2.12 bc	3.73
Chitosan	2.34 bc	1.94 ab	3.77
Chitosan+SA	2.57 c	2.50 c	3.07
Chitosan+CuCl ₂	2.14 ab	2.09 bc	3.06
Chitosan+CuCl ₂ + SA	3.09 d	2.16 bc	2.73
CV (เปอร์เซ็นต์)	6.85	9.81	19.2

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.4.1 DPPH assay พบว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA ทำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดจากการทดลองใน growth chamber ในโรงเรือน และในแปลงทดลอง โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.482 1,049 และ 1,025 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กวาวเครือขาวที่ปลูกในโรงเรือน และในแปลงทดลอง มีแนวโน้มของการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ปลูกใน growth chamber (ตารางที่ 4.13)

4.3.4.2 FRAP กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือนและในแปลงทดลองได้ผลสอดคล้องกัน เมื่อชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA ทำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ FRAP value = 4.55 4.73 และ 6.69 ไมโครโมล ของ Fe²⁺/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.14)

การชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดทั้งจากการตรวจวัดด้วย DPPH และ FRAP สอดคล้องกับการทดลองข้างต้นที่พบว่าทรีตเมนต์ดังกล่าวสามารถชักนำสารฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ ให้สูงที่สุดได้ เช่นกัน แสดงว่าสารทั้งสองกลุ่มเป็นสารที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวด้วย สอดคล้องกับ Ding *et al.* (2002) ที่รายงานว่า

ตารางที่ 4.13 ค่า IC_{50} ของกวางเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	3.042 h	1,889 a	1,167 a
SA	2.563 b	1,600 b	1,480 abc
CuCl ₂	2,900 f	1,810 a	1,746 c
CuCl ₂ +SA	2,612 d	1,630 b	1,635 bc
Chitosan	2,915 g	1,820 a	1,218 ab
Chitosan+SA	2,596 c	1,621 b	1,629 bc
Chitosan+CuCl ₂	2,893 e	1,183 c	1,187 a
Chitosan+CuCl ₂ + SA	2,482 a	1,049 c	1,025 a
CV (เปอร์เซ็นต์)	2.57	2.32	14.2

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.14 FRAP value ของกวางเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	FRAP value (ไมโครโมลของ Fe ²⁺ /สารสกัด 1 กรัม)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	24.7 b	30.4 a	42.9 a
SA	37.3 c	32.2 ab	44.9 a
CuCl ₂	18.5 a	28.6 a	40.4 a
CuCl ₂ +SA	20.6 a	29.2 a	40.5 a
Chitosan	28.1 b	29.3 a	41.3 a
Chitosan+SA	18.0 a	29.9 a	41.9 a
Chitosan+CuCl ₂	38.7 c	40.3 bc	57.3 ab
Chitosan+CuCl ₂ + SA	45.5 d	47.3 c	66.9 b
CV (เปอร์เซ็นต์)	7.22	12.31	17.26

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณของฟีนอลิก และปริมาณของ ฟลาโวนอยด์ ปริมาณ ช่วงทิพย์ (2546) และ นวลศรี รักอริยะธรรมและัญชนา เจนวิถีสุข (2545) รายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระในพืชที่สำคัญได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ดังนั้นการพบว่า Chitosan+CuCl₂+SA สามารถชักนำให้มีสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงขึ้นจากการทดลองในข้างต้น จึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดด้วยทั้งสองเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกัน

Wang and Lin (2000) กับ Prior *et al.* (1998) รายงานว่าสารชักนำที่ต่างกันมีผลกระตุ้นให้เกิดสารชนิดที่แตกต่างกัน ทำให้พืชที่ถูกชักนำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างกัน Cherdshewasart *et al.* (2008) พบว่า พิวรารินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงไม่แตกต่างจาก α -tocopherol ซึ่งใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน จากการทดลองพบว่า Chitosan+CuCl₂ ที่สามารถชักนำให้กวาวเครือขาวสร้างพิวรารินสูงที่สุด แต่ยังชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวได้น้อยกว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA แสดงว่าพิวรารินไม่ใช่สารชนิดเดียวที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาว การเพิ่มกรดซาลิไซลิกเข้าไปอาจจะมีผลในทางส่งเสริมให้มีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมาได้ อีก สอดคล้องกับการพบว่ามี peak intensity ของสารอื่น ๆ ที่ปรากฏในโครมาโตแกรมร่วมกับพิวรารินและจินิสทีอิน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ peak intensity ของสารในตำแหน่ง retention time ในนาทีที่ 13.2 18.3 และนาทีที่ 20.1 การชักนำด้วยทรีตเมนต์ต่าง ๆ พบว่า ratio of peak intensity ที่ตำแหน่ง 13.2 มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าตำแหน่ง 18.3 และ 20.1 และพบว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA มีค่าสัดส่วนของ ratio of peak intensity ที่ตำแหน่ง 13.2 สูงที่สุด สอดคล้องกับการชักนำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วย ดังนั้นสารในตำแหน่งดังกล่าวอาจเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่ได้จากการชักนำ พบว่ามีอัตราส่วนสูงกว่าที่พบในสารชักนำทุกทรีตเมนต์ (ตารางผนวกที่ 7) สอดคล้องกับการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดทั้งจากการตรวจวัดด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP ดังนั้นสารในตำแหน่งดังกล่าวอาจเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ผลที่ไม่สอดคล้องในทรีตเมนต์ Chitosan อาจเกิดจากค่าในแปลงที่สูงเนื่องจากการหาลำเฉลี่ยจากทั้งสามสภาพการทดลอง ควรศึกษาถึงชนิดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่อไป ส่วนสารในตำแหน่งที่ 18.3 และ 20.1 มีการเปลี่ยนแปลงของ ratio of peak intensity น้อยอาจไม่มีผลจากทรีตเมนต์ที่ใช้ชักนำ

4.3.5 ผลของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว

ผลของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาวทั้งสามสภาพแวดล้อมควรให้ผลที่สอดคล้องกัน เช่น มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตเหมือนกันเมื่อชักนำด้วยทรีตเมนต์เดียวกัน ผลที่ไม่สอดคล้องกันอาจหมายถึงมีอิทธิพลของปัจจัยอื่น

มากี่ช่วงแล้วมีผลมากกว่าสารชักนำ หรือ สารชักนำบางทรีตเมนต์อาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยอื่นแล้วมีผลส่งเสริมหรือลดบทบาทของสารชักนำ ผลการทดลองสามารถบอกถึงอิทธิของสารชักนำเมื่อใช้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะการผลการทดลองในแปลงปลูกจะช่วยยืนยันถึงผลของสารชักนำว่าสามารถแนะนำให้แก่เกษตรกรใช้ได้หรือไม่

4.3.5.1 ผลของสารชักนำต่อน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของหัวกวาวเครือขาวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในการชักนำใน growth chamber และในโรงเรือน แต่พบความแตกต่างของการชักนำในแปลงทดลอง โดยพบว่าทรีตเมนต์ที่มีไคโตซานร่วมด้วยทุกทรีตเมนต์จะมีอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งสูง (ตารางที่ 4.15) สอดคล้องกับการทดลองของ Boonlertnirun *et al.* (2008) ที่ใช้เมล็ดข้าวคลุกกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 80 มิลลิกรัม/ลิตรตามด้วยการราดลงดินอีก 4 ครั้ง ในหนึ่งฤดูการเพาะปลูกพบว่าสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าไคโตซานมีส่วนช่วยให้กวาวเครือขาวเจริญเติบโตซึ่งอาจจะเกิดจากไคโตซานในดินเป็นแหล่งของคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ในดิน เมื่อจุลินทรีย์ในดินเจริญเติบโตก็จะช่วยเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นสารอนินทรีย์ให้อยู่ในรูปที่รากพืชสามารถดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น จะเห็นได้จากผลการทดลองใส่ไคโตซานในดินโดยที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี ทำให้มีการเพิ่มของจุลินทรีย์ในดินได้มากขึ้นและทำให้การเจริญเติบโตของพืชดีขึ้นด้วย (Bolto *et al.*, 2004; Somashekar and Richard, 1996) ในแปลงทดลองมีความแตกต่างของการเจริญเติบโตของต้นที่ไม่ต่างกันมาก แต่ในส่วนที่อยู่ใต้ดินมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เช่นขนาดของหัว ที่ต่างกันนอกจากไคโตซานแล้ว จึงน่าจะมีอิทธิพลของดิน และจุลินทรีย์ในดิน ต่อการเจริญเติบโตด้วย

ตารางที่ 4.15 ผลของสารชักนำต่อน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของกวาวเครือขาว

ทรีตเมนต์	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	10.6 : 1	16.8 : 1	25.5 : 1 a
SA	12.2 : 1	18.1 : 1	30.3 : 1 bc
CuCl ₂	10.4 : 1	13.8 : 1	23.5 : 1 a
CuCl ₂ +SA	12.4 : 1	18.2 : 1	27.1 : 1 ab
Chitosan	12.7 : 1	18.6 : 1	32.2 : 1 c
Chitosan+SA	13.7 : 1	19.1 : 1	32.7 : 1 c
Chitosan+CuCl ₂	11.1 : 1	17.8 : 1	30.5 : 1 bc
Chitosan+CuCl ₂ + SA	12.1 : 1	18.5 : 1	32.3 : 1 c
CV (เปอร์เซ็นต์)	6.95 : 1	14.6 : 1	19.8

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.5.2 ผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบเป็นเหมือนผลผลิตของพืชสมุนไพร มีสมุนไพรหลายชนิดรวมถึงกวาวเครือขาว ที่ซื้อขายในรูปของสารสกัดหยาบแทนการใช้ตัวอย่างแห้ง เนื่องจากจะช่วยลดขั้นตอนในกระบวนการผลิต การขนส่งและการเก็บรักษา ผลที่แตกต่างกันอาจเกิดจากสารช้กนำน้อยกว่าเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ เนื่องจากไม่พบความแตกต่างของการช้กนำใน growth chamber แต่พบความแตกต่างทางสถิติของหัวที่ปลูกในโรงเรือนและในแปลงปลูก (ตารางที่ 4.16) น่าจะเกิดจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อมอื่น ๆ มาเกี่ยวข้องด้วย ทริตเมนต์ส่วนใหญ่แสดงผลที่สอดคล้องกันเมื่อเปลี่ยนสภาพแวดล้อม เช่น การช้กนำด้วยไคโตซานให้ค่าที่สูงกว่าการช้กนำด้วยทริตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้งสองสภาพแวดล้อม แสดงว่ามีปัจจัยของสภาพแวดล้อมมีผลในทางเสริมการช้กนำด้วยไคโตซาน ไม่เคยมีรายงานที่แสดงว่าไคโตซานมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณสารสกัดหยาบในพืช แต่มีรายงานว่าสามารถเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงในพืชได้ (Khan *et al.*, 2002) จึงน่าจะมีผลทางอ้อมต่อสารสกัดหยาบ เนื่องจากการสังเคราะห์จะสร้างสารปฐมภูมิ เช่น สารไขมัน โปรตีน หรือแป้ง ในพืช สารเหล่านี้เปลี่ยนเป็นสารทุติยภูมิอย่างสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ การพบปริมาณสารสกัดหยาบที่สูงกว่าอาจคาดหวังได้ว่าจะมีสารทุติยภูมิจนคิดค่ามากกว่ามากขึ้นได้

ตารางที่ 4.16 ผลของสารช้กนำต่อสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)

ทริตเมนต์	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	32.8	42.0 bcd	79.8 cd
SA	29.4	34.1 ab	53.7 a
CuCl ₂	31.1	32.0 a	64.7 b
CuCl ₂ +SA	31.9	42.6 bcd	71.7 bc
Chitosan	35.3	49.7 d	84.2 d
Chitosan+SA	31.5	42.3 bcd	70.2 bc
Chitosan+CuCl ₂	33.6	47.7 cd	79.7 cd
Chitosan+CuCl ₂ + SA	30.4	38.6 abc	72.1 bc
CV (เปอร์เซ็นต์)	7.11	10.0	17.1

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.5.3 ผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ ต้นที่ปลูกใน ในแปลงทดลอง (ตารางที่ 4.17) โดยการชักนำด้วย $\text{CuCl}_2 + \text{SA}$ และ chitosan + SA ทำให้ การสังเคราะห์แสงสูงที่สุด ขณะที่การชักนำด้วย ไคโตซาน หรือ คอปเปอร์คลอไรด์ อย่างเดียวมี อัตราการสังเคราะห์แสงต่ำ โดยเฉพาะการใช้ กรดซาลิไซลิก มีอัตราการสังเคราะห์แสงต่ำสุด แต่การ ใช้ร่วมไคโตซาน หรือ คอปเปอร์คลอไรด์ นั้นจะมีผลส่งเสริมให้เกิดการสังเคราะห์แสงสูงขึ้น ขณะที่ การใช้สารทั้งสามชนิดทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงสูงกว่าการใช้สารชักนำแต่ละตัวเพียงเล็กน้อย ผลที่ได้อาจถึงสารชักนำที่ใช้ร่วมกันเพิ่มการสังเคราะห์แสงได้ดีขึ้น Khan *et al.* (2003) พบว่าไคโต ซานและกรดซาลิไซลิกเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงในถั่วเหลือง Wang and Li (2006) พบว่าการฉีด พ่นกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 ไมโคร โมลาร์/ลิตร ที่ให้แก่ถั่วเหลือง ทำให้อัตราการสังเคราะห์ แสงสุทธิ และค่า F_v/F_m (chlorophyll a fluorescence parameter) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลไกการชัก นำยังไม่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน เนื่องจากการทดลองในโรงเรือน และ growth chamber ได้ผลที่ไม่ แตกต่างทางสถิติ จึงไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในแปลงปลูก ผลจากแปลงทดลองอาจเกิดจาก อิทธิพลของปัจจัยอื่นได้ สมบุญ เชษภิญญาวัฒน์ (2538) ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์แสงเช่น 1) ความเข้มของแสง 2) อุณหภูมิ 3) อายุของใบ 4) ปริมาณน้ำที่พืชได้รับ และ 5) ธาตุอาหาร แต่จาก การทดลองในแปลง ปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้และน่าจะมีผลมากที่สุดคือ 1) ความเข้มแสงซึ่งในแปลงมี สูงกว่าในโรงเรือนที่มีหลังคาพลาสติกคลุมและใน growth chamber ถ้าความเข้มแสงมากจะเพิ่ม อัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์สุทธิให้สูงขึ้นจึงมีผลต่อการสังเคราะห์แสง 2) อุณหภูมิ มีอิทธิพล ต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ถ้าอุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จะทำให้พืชมีอัตรา การสังเคราะห์ด้วยแสงสูงขึ้น 3) อายุของใบ ใบที่อ่อนหรือแก่เกินไปจะสังเคราะห์ด้วยแสงต่ำกว่า ใบที่เจริญเติบโตเต็มที่เพราะว่าใบที่อ่อนเกินไปการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ยังไม่เจริญเต็มที่ ส่วนใบที่แก่เกินไปจะมีการสลายตัวของกรานูมและคลอโรฟิลล์ 4) ธาตุอาหาร ธาตุแมกนีเซียมและ ไนโตรเจนเป็นธาตุสำคัญในองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ ธาตุเหล็กจำเป็นต่อการสร้างคลอโรฟิลล์ และเป็นองค์ประกอบของไซโทโครมซึ่งเป็นตัวถ่ายอิเล็กตรอนส่วนธาตุแมงกานีส และคลอรีน จำเป็นต่อกระบวนการแตกตัวของน้ำในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง การขาดธาตุอาหารเหล่านี้ ทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง ในแปลงทดลองจะมีความแปรปรวนของชนิดและปริมาณ มากกว่าจึงอาจส่งผลให้เกิดความแตกต่างได้

ตารางที่ 4.17 ผลของสารสกัดน้ำตาลต่อการสังเคราะห์แสง (มิลลิโมลาร์/ตารางเซนติเมตรวินาที)

พรีตเมนต์	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	20.2	22.2	23.9 b
SA	20.5	20.2	20.0 a
CuCl ₂	21.1	20.2	21.1 ab
CuCl ₂ +SA	19.0	23.0	26.6 c
Chitosan	22.1	20.0	23.5 b
Chitosan+SA	23.6	23.1	26.5 c
Chitosan+CuCl ₂	21.9	23.2	20.5 a
Chitosan+CuCl ₂ + SA	21.7	21.5	21.5 ab
CV (เปอร์เซ็นต์)	5.89	7.81	6.22

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.4 การทดลองที่ 4 สารสกัดกวาวเครือขาวกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน

การหาระดับกลูโคสในเลือดของหนูแรทพันธุ์ วิสตาร์ พบว่ามีระดับกลูโคสปกติในเลือดอยู่ในช่วง 63.33 ± 7.64 ถึง 71.33 ± 11.02 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (ตารางผนวกที่ 8) ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองของ ณัฐชญ แสนบัวพันธ์ (2548) พบว่าหนูแรทพันธุ์วิสตาร์ ขนาดน้ำหนักตัว 200-250 กรัมมีระดับกลูโคสปกติในเลือดอยู่ในช่วง 64.05-75.80 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ส่วนหนูแรทพันธุ์ Sprague-Dawley ขนาดน้ำหนักตัว 250-300 กรัมมีระดับกลูโคสในเลือด 70.50 ± 4.81 ถึง 85.00 ± 3.11

4.4.1 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวาวเครือขาวในหนูแรทที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

4.4.1.1 หนูปกติ ผลของสารกลุ่มต่าง ๆ ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติ โดยการทำ OGTT นั้น พบว่ากลัยเบนคลาไมด์ซึ่งเป็นยาเม็ดลดน้ำตาลในเลือดกลุ่ม sulfonylureas ที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์บีตาในตับอ่อน โดยกระตุ้นการหลั่งอินซูลินและยับยั้งการหลั่งกลูคาγον (Luzi and Pozza, 1997) ที่ใช้เป็นยามาตรฐาน (positive control) นั้น สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่นาทีที่ 120 นาที จนถึง 240 นาทีหลังรับยาเข้าไป สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 100 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว นั้นไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.18 และตารางผนวกที่ 9) แม้ว่าที่สารที่

ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ 120 นาที จะลดระดับน้ำตาลได้มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 11.23 เปอร์เซ็นต์ ก็ตาม (ตารางที่ 4.19) ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชบางชนิด ซึ่งมีวิธีการทดสอบคล้ายกัน เช่น Mukherjee *et al.* (1972) พบว่า สารสกัดใบตำลึง (*Coccinia indica*) ขนาด 1 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถดำเนินการเพิ่มระดับกลูโคสในเลือดของหนูปกติได้ร้อยละ 25 และ Bailey *et al.* (1985) พบว่า สารสกัดเนื้อมะระ (*Momordica charantia*) มีฤทธิ์ทนกลูโคสของหนูเมาส์ในช่วงที่ 8 หลังได้รับสารสกัด ซึ่งแสดงว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิดสามารถลดระดับกลูโคสในเลือดเมื่อถูกชักนำให้เกิดภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันในหนูปกติได้ แต่ไม่พบผลดังกล่าวในการใช้สารสกัดกวาวเครือขาว

ตารางที่ 4.18 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทปกติที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะการมีกลูโคสในเลือดสูงในเลือดสูงเฉียบพลัน

การปฏิบัติ	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)				
	0 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที
น้ำกลั่น	60.0±4.8	112.5±15.1	95.8±8.9	77.0±3.7	76.5±8.6
กลัยเบนคลาไมด์ กวาวเครือขาว (100 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	63.5±3.9	105.0±5.7	62.0±11.3*	52.8±14.5*	47.5±13.5*
กวาวเครือขาว (500 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	68.3±9.8	111.5±9.5	86.5±3.1	77.0±2.8	72.5±1.3
กวาวเครือขาว (500 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	70.3±6.6	116.5±9.3	85.0±4.2	74.5±2.6	70.8±5.8

หมายเหตุ * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 4.19 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันในหนูปกติที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

กลุ่มทดลอง	0 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที	
กลัยเบนคลาไมด์ (10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)		-5.83	6.67	35.25	31.49	37.91
กวาวเครือขาว (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)		-3.75	0.89	9.66	0.00	5.23
กวาวเครือขาว (500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)		-7.08	-3.56	11.23	3.25	7.52

4.4.1.2 หนูเบาหวาน พบว่าผลของกลัยเบนคลาไมด์และสารสกัดกวางเครือไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน กรณีกลัยเบนคลาไมด์อาจเกิดจาก 2 สาเหตุ คือ 1) ขนาดที่ใช้อาจต่ำเกินไป เนื่องจากหนูเป็นเบาหวานบางตัวอาจมีอาการเบาหวานเป็นเบาหวานในขั้นรุนแรงจนยาไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้สอดคล้องกับ Sharma *et al.* (1997) ที่รายงานว่ากลัยเบนคลาไมด์มีผลลดระดับน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวานที่ไม่รุนแรงถึงปานกลาง เพราะในขั้นนี้เซลล์บีตาของตับอ่อนยังไม่ได้เสียหายทั้งหมด และยังสร้างอินซูลินได้ และ Ratzman *et al.* (1984) หนูที่เป็นเบาหวานขั้นรุนแรงนั้นเซลล์บีตาจะถูกทำลายเกือบทั้งหมดทำให้กลัยเบนคลาไมด์ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ 2) หนูเบาหวานบางตัวอาจหลุดจากการเป็นเบาหวานโดยมีการฟื้นคืน (recovery) ของไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แมนส์ได้ ทำให้ค่าเฉลี่ยระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มลดต่ำกว่าความเป็นจริง ทำให้ผลการทดลองมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐานสูงจนไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.20 และตารางผนวกที่ 10) แต่ถ้าพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การลดลงของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจากกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกันของทั้ง กลัยเบนคลาไมด์และสารสกัดกวางเครือพบว่ากลัยเบนคลาไมด์มีแนวโน้มลดระดับน้ำตาลในเลือดได้มากขึ้นตั้งแต่นาทีที่ 120 หลังได้รับสารและสามารถลดระดับน้ำตาลได้สูงที่สุดในเวลา 300 นาที คิดเป็น 36.09 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดกวางเครือทำให้ผลที่คล้ายกับผลของกลัยเบนคลาไมด์ คือมีแนวโน้มลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ตั้งแต่นาทีที่ 120 และสามารถลดระดับน้ำตาลได้มากที่สุดในเวลา 300 นาที คิดเป็น 36.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (ตารางที่ 4.21)

ตารางที่ 4.20 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

เวลา (นาที)	กลุ่มทดลอง		
	น้ำกลั่น	กลัยเบนคลาไมด์	กวางเครือขาว
0	310.00±32.68	313.75±64.58	324.25±59.71
30	363.50±46.72	359.75±63.74	369.25±69.56
60	548.75±45.13	539.75±100.9	528.00±92.62
120	416.50±57.04	373.00±95.79	375.00±61.03
180	380.50±49.49	338.00±116.59	317.50±49.26
240	349.00±33.74	259.00±103.15	290.50±37.93
300	354.00±38.24	226.25±113.77	223.25±83.05

ตารางที่ 4.21 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันในหนูเบาหวานในภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

	0 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที	300 นาที
กลัยเบนคลาไมด์	-1.21	1.03	1.64	10.44	11.17	25.79	36.09
กวาวเครือขาว	-4.60	-1.58	3.78	9.96	16.56	16.76	36.94

4.4.2 ฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานเมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน

กลัยเบนคลาไมด์สามารถลดระดับน้ำตาลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง (ตารางที่ 4.22) โดยลดได้สูงที่สุดในวันที่ 21 คิดเป็น 43.49 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น (วันที่ 0) (ตารางที่ 4.23) พบว่าวันที่ 21 ลดลงมากที่สุดถึง 38.11 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.20) Sharma *et al.* (1997) รายงานว่ากลัยเบนคลาไมด์มีผลลดระดับน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวานที่ไม่รุนแรงถึงปานกลาง เพราะในขั้นนี้เซลล์บีตาของตับอ่อนยังไม่ได้เสียหายทั้งหมดและยังสร้างอินซูลินได้ ดังนั้นกลัยเบนคลาไมด์จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งอินซูลินได้ การทดลองครั้งนี้พบว่าในวันที่ 30 กลัยเบนคลาไมด์ยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ สอดคล้องกับ Sharma *et al.* (1996) ที่พบว่าการให้กลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 10 วัน มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูเบาหวาน และ Peungvicha *et al.* (1996) พบว่าการให้ยาขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกัน 8 วัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นเพราะหนูทุกกลุ่มยังมีการดำเนินของโรคยังไม่ถึงขั้นรุนแรง ทำให้ในวันที่ 14 ถึงวันที่ 30 ของการทดลองนั้นยากกลัยเบนคลาไมด์ยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ หรืออาจเป็นไปได้ว่ากลัยเบนคลาไมด์มีฤทธิ์นอกตับอ่อน คือเพิ่มการนำกลูโคสเข้าเซลล์และเพิ่มการใช้กลูโคสได้อีกด้วย (อรพรรณ มาตังคสมบัติ, 2544; Ojewole, 2002)

ส่วนผลของสารสกัดกวาวเครือขาวหลังจากป้อนสารสกัดติดต่อกัน 14 วัน พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวลดระดับน้ำตาลได้มากที่สุดถึง 28.95 เปอร์เซ็นต์ มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (กลุ่มควบคุม: 331.40 ± 44.98 มิลลิกรัม/เดซิลิตร, สารสกัด: 236.67 ± 38.11 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) และยังได้ผลใกล้เคียงกับที่เวลา 21 วัน ที่ลดระดับน้ำตาลได้ถึง 26.37 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.18 และเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (กลุ่มควบคุม: 345.40 ± 29.90 มิลลิกรัม/เดซิลิตร, สารสกัด: 254.3 ± 67.08 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4.19 และการเทียบกับค่าเริ่มต้น (เปรียบเทียบกับวันที่ 0) ในกลุ่มเดียวกัน พบว่าในวันที่ 14 ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้มากที่สุดถึง 18.30 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.22 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารแต่ละกลุ่มต่อเนื่อง 30 วัน

กลุ่มทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)				
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
น้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม)	297	385	399	299	297
	317	375	328	352	389
	291	396	273	373	229
	297	315	322	368	355
	320	313	335	335	365
ค่าเฉลี่ย	304.40	356.80	331.40	345.40	327.00
s.d.	13.15	39.78	44.98	29.90	64.37
กลัยเบนคลาไมด์	354	306	178	132	166
	357	319	170	323	298
	283	191	152	202	124
	279	171	232	130	154
	304	223	262	189	272
ค่าเฉลี่ย	315.40 a	242.00* ab	198.80* b	195.20* b	202.80* b
s.d.	37.83	67.13	46.23	78.52	77.13
กวาวเครือขาว	308	358	270	233	290
	279	210	200	252	200
	325	349	243	239	300
	273	266	206	230	304
	274	369	292	384	309
279	329	209	188	209	
ค่าเฉลี่ย	289.67 ab	313.50 b	236.67* a	254.33* ab	268.67 ab
s.d.	21.61	62.50	38.11	67.08	50.17

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (DMRT)

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (LSD)

กับระดับน้ำตาลในวันที่ 0 ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัด (ตารางที่ 4.24)

สารสกัดกวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทที่เป็นเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 14 ของการป้อนสารอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วันได้ ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ เช่น ฟิราโรนที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนสอดคล้องกับการทดลองของ ยูทชนา สมิตสิริและคณะ (2551) ที่พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิดหนึ่งซึ่งมีส่วนผสมของกวาวเครือขาวทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติลดลงได้ เป็นที่น่ายินดีว่าสารสกัดกวาวเครือขาวออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยผ่านกลไกใดบ้าง เช่น อาจผ่านกลไกการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากบีต้าเซลล์เหมือน estradiol เช่นเดียวกับ Kooptiwut *et al.* (2007) ที่พบว่าเซลล์ตับอ่อนหลังอินซูลินสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในระดับน้ำตาลสูงร่วมกับเอสโตรเจนเป็นเวลา 10 วัน และยังช่วยป้องกันกลุ่มเซลล์ตับอ่อนซึ่งทำงานด้อยลงเมื่ออยู่ในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูงให้หลังอินซูลินได้ดีขึ้น หรืออาจผ่านกลไกการนำกลูโคสเข้าเซลล์ หรืออาจมีฤทธิ์เสริมการทำงานของอินซูลิน เหมือนฟิราโรนถูกใช้ในการบำบัดโรคเบาหวานในประเทศจีนมาตั้งแต่ปี 1990 เนื่องจากสามารถเพิ่มการตอบสนองต่ออินซูลิน เพิ่มการใช้กลูโคสและสนับสนุนการไหลเวียนของเลือด (Jia *et al.*, 2003) จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการออกฤทธิ์และผลในสัตว์ species อื่นที่สูงขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลนำไปสู่การพัฒนากวาวเครือขาวให้เป็นยารักษาโรคเบาหวานต่อไป

ตารางที่ 4.23 เปรอ์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

กลุ่มทดลอง	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
กลัยเบนคลาไมด์					
10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-3.61	32.17	40.01	43.49	37.98
กวาวเครือขาว					
100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	4.84	12.14	28.59	26.37	17.84

ตารางที่ 4.24 เปรอ์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น (เทียบกับวันที่ 0)

กลุ่มทดลอง	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
น้ำกลั่น	-17.21	-8.87	-13.47	-7.42
กลัยเบนคลาไมด์				
(10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	23.27	36.97	38.11	35.70
กวาวเครือขาว				
(100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	-8.23	18.30	12.20	7.25

4.4.3 ผลของสารสกัดกวางเครือขาวต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน

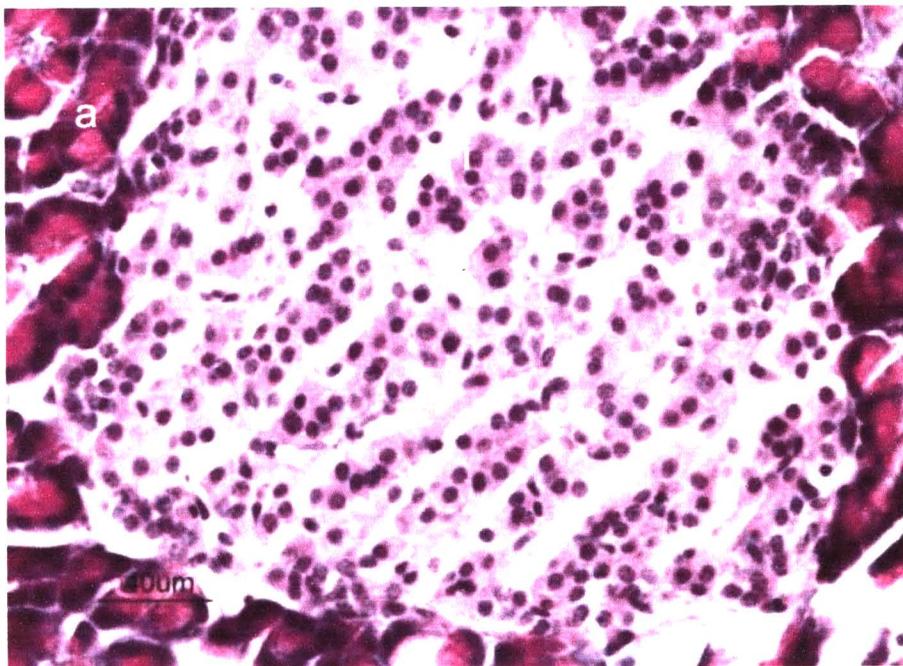
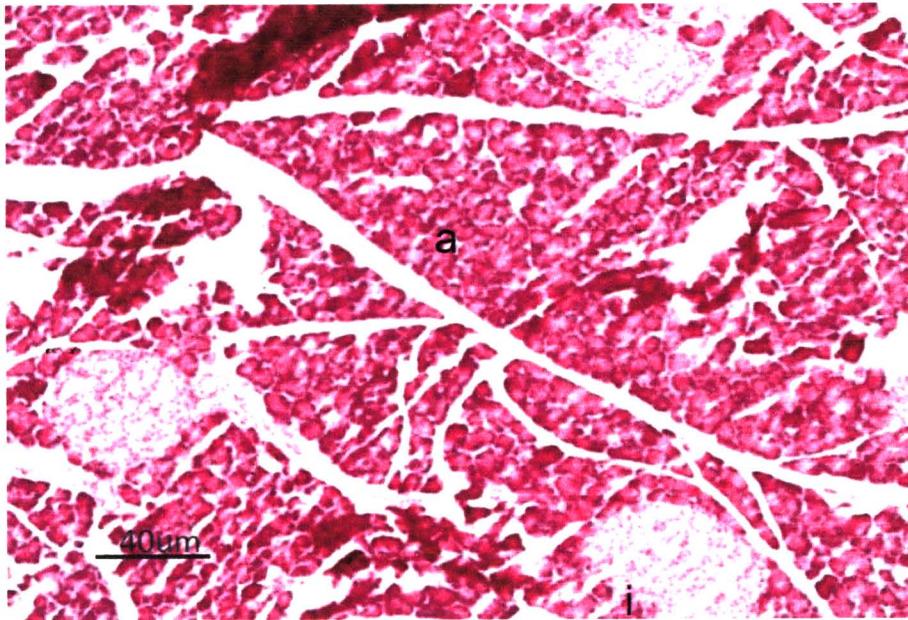
4.4.3.1 ผลต่อจุลพยาธิสภาพของตับอ่อน ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนหนูกลุ่มปกติ ที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน มีลักษณะดังนี้ พบไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์มีรูปร่างกลมหรือรี มีขอบเขตแยกออกจากตับอ่อนส่วนไม่สร้างฮอร์โมน (exocrine pancreas) มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กกระจายกันอยู่ทั่วไป การจัดเรียงตัวของเซลล์ภายในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์เป็นระเบียบ มีช่องว่าง (ภาพตัดขวางของเส้นเลือดฝอย) ที่ชัดเจนและเป็นระเบียบ ภายในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมที่มีขนาดใกล้เคียงกันมีนิวเคลียสรูปร่างกลมติดสีน้ำเงิน เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน ไซโทพลาซึมติดสีชมพูของสีอีโอซินอย่างสม่ำเสมอทั่วเซลล์ (ภาพที่ 4.21)

1) ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 วัน เมื่อย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซินมีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มปกติดังนี้ ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์มีรูปร่างไม่แน่นอนส่วนใหญ่จะเหี่ยวหรือยุบไป จำนวนไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ลดลง 62.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูปกติมีช่องว่างมากขึ้น เซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างรี (ภาพที่ 4.22)

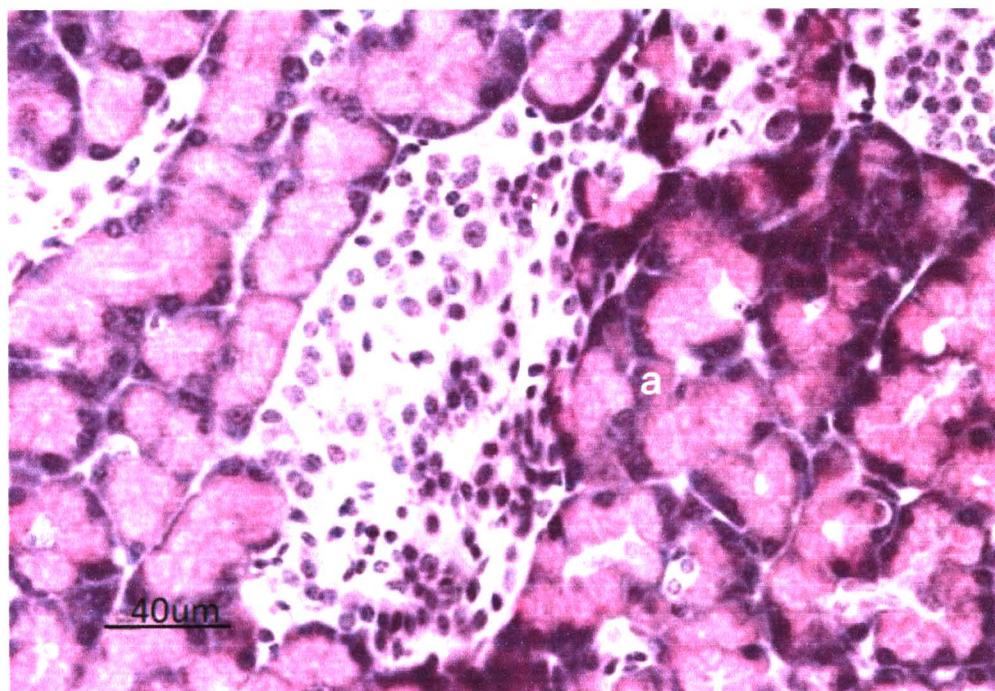
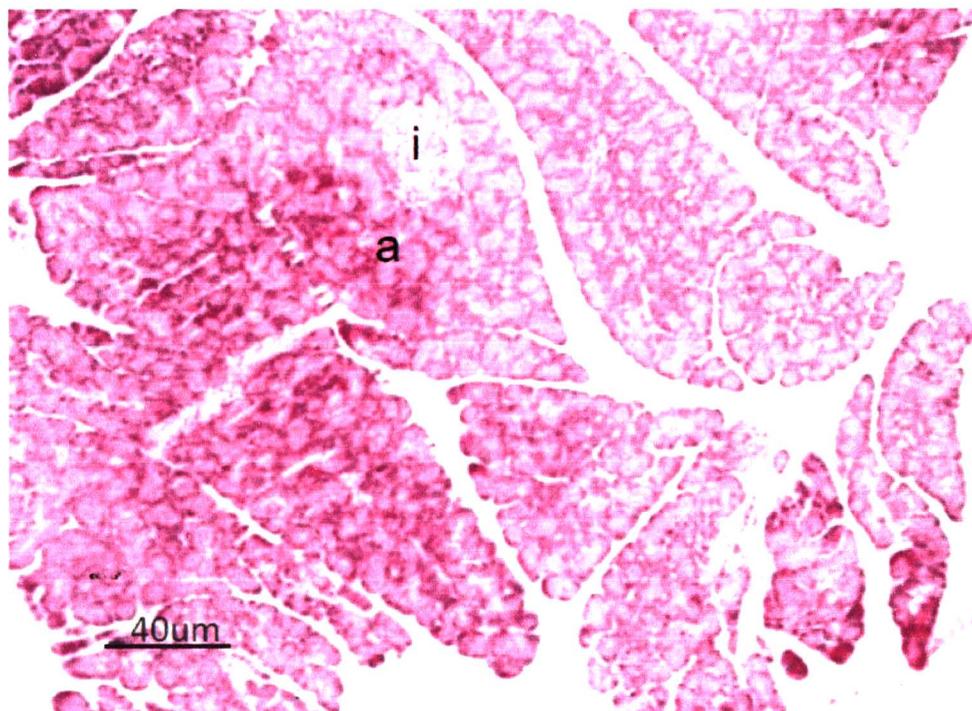
2) ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนของหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับยา กลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีลักษณะคล้ายกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมคือ ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอนส่วนใหญ่มีขนาดเล็กกว่าหนูปกติและมีจำนวนลดลง 51.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูปกติ เซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอนและจัดเรียงกันอย่างไม่เป็นระเบียบ เส้นเลือดฝอยแคบลงและไม่เป็นระเบียบ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างรีติดสีน้ำเงินเข้มทึบ (ภาพที่ 4.23)

3) ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากกวางเครือขาวปริมาณ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน มีลักษณะคล้ายกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์ แต่มีลักษณะของเซลล์ที่เป็นปกติมากกว่าและเห็นช่องว่างที่เป็นเส้นเลือดฝอยขยายออกมากกว่าที่พบในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยา กลัยเบนคลาไมด์ ซึ่งอาจเกิดจากพิววารินในสารสกัดกวางเครือขาวมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดได้ (John *et al.*, 2004) แต่ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ยังมีรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดเล็กและเป็นระเบียบน้อยกว่าในหนูปกติ โดยมีจำนวนลดลงถึง 41.1

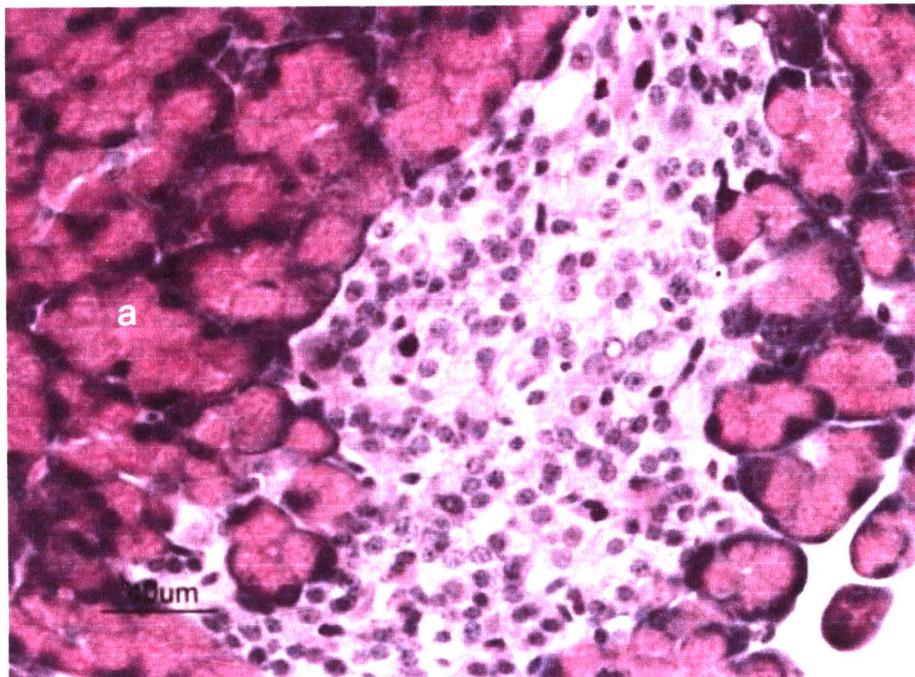
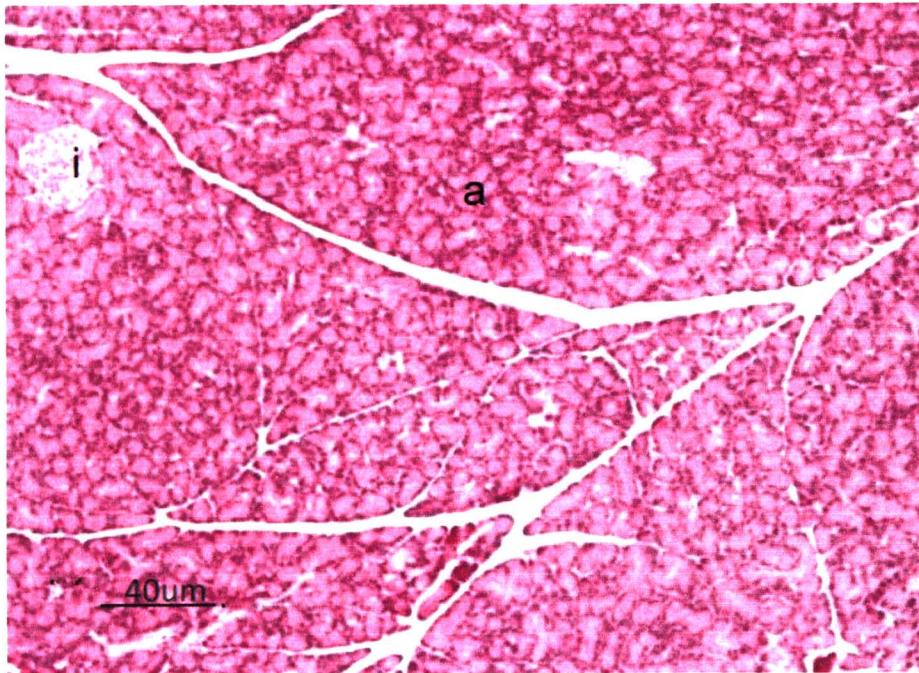
เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูปกติและพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวางเครือขาวมีจำนวนไอเลคส์ออฟแลงเกอร์เฮนส์เหลือมากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ป้อนกลัยเบนคลาไมด์ เป็นไปได้ว่าสารสกัดจากกวางเครือขาว ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงนั้น สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระจากสเตรปโตโซโทซินจึงช่วยลดความเสียหายต่อเซลล์ในไอเลคส์ออฟแลงเกอร์เฮนส์ (ภาพที่ 4.24)



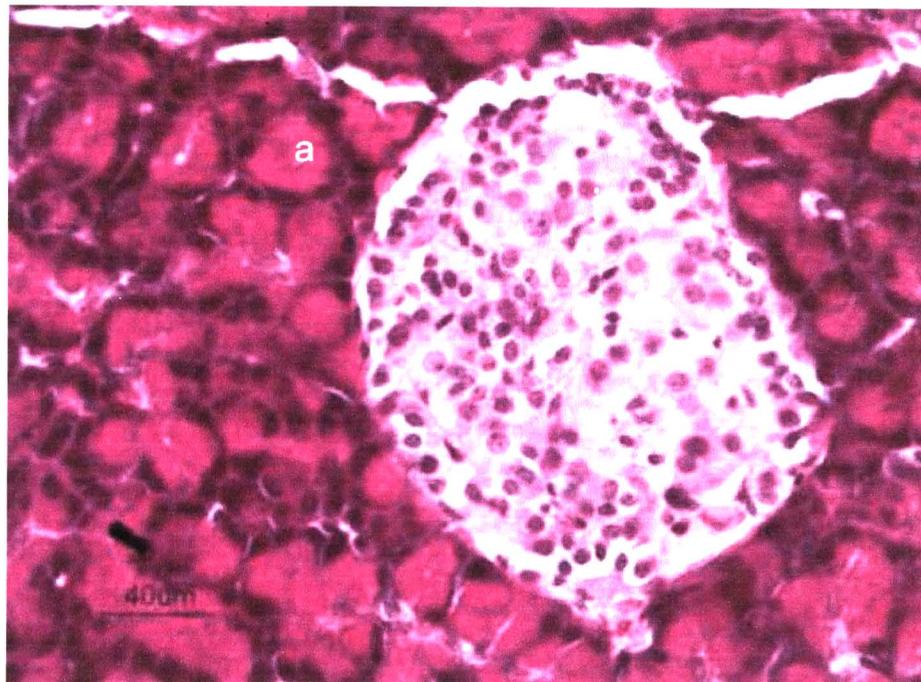
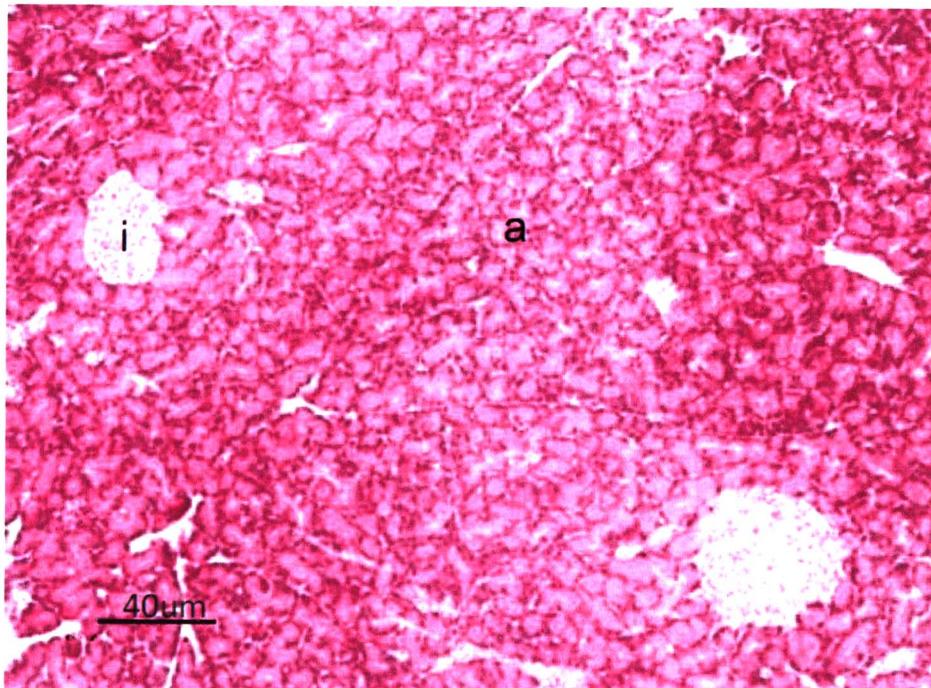
ภาพที่ 4.21 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลคส์ออฟแลงเกอร์เฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูปกติ (ภาพบน กำลังขยาย x10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 4.22 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลคส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acinous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



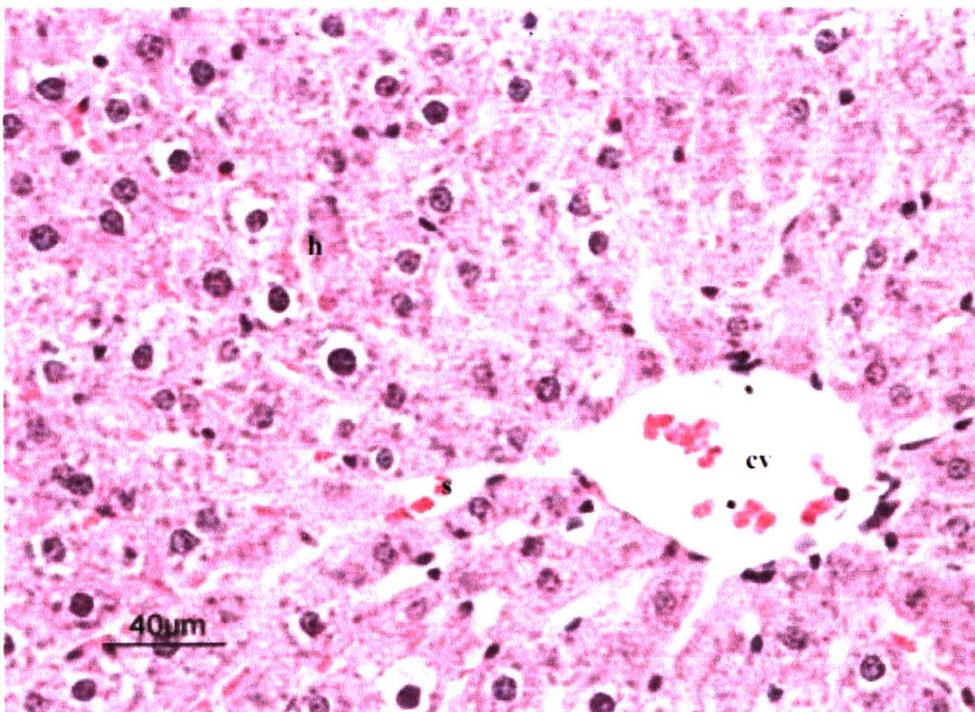
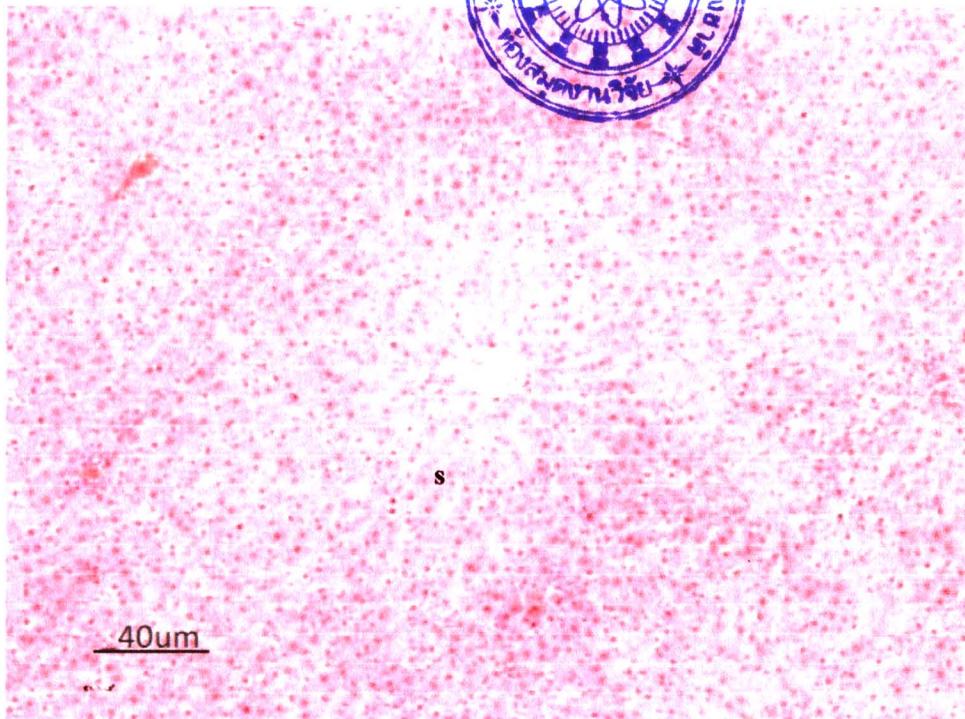
ภาพที่ 4.23 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับกลัยเบน-คลาไมด์ (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



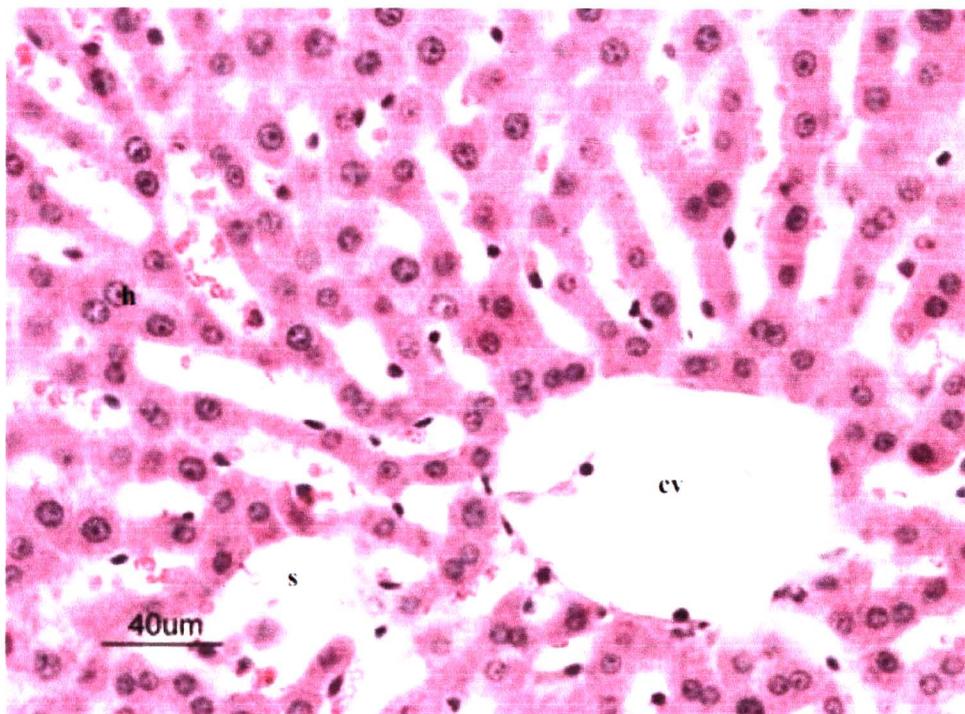
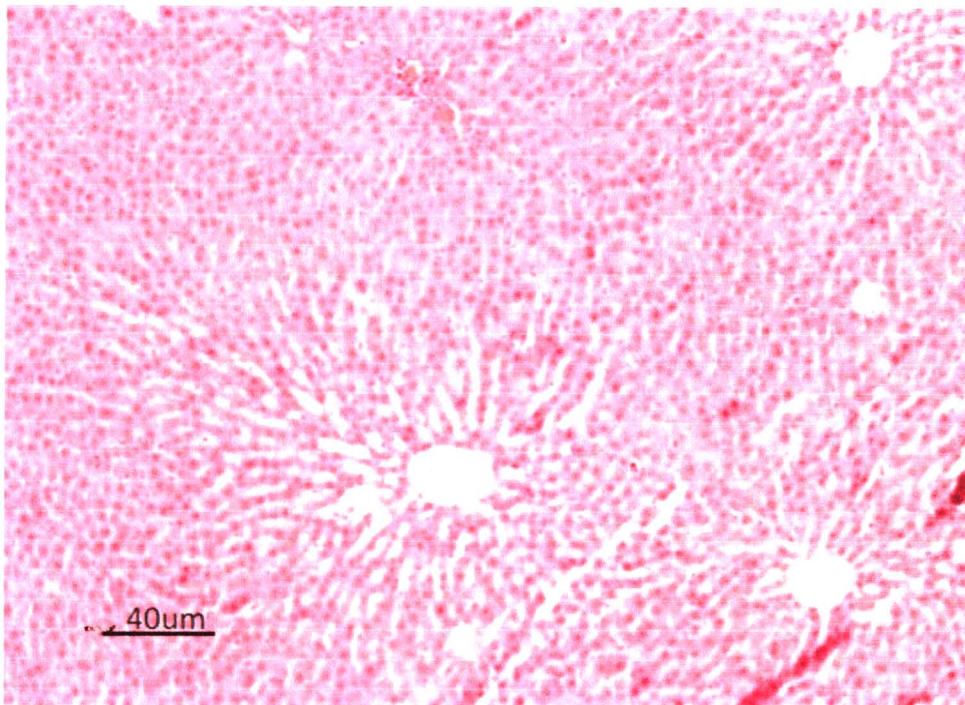
ภาพที่ 4.24 ตับอ่อนของหนุเบหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวางเครือขาว แสดงพยาธิสภาพของ ตับอ่อน แสดงไอเลคส์ออฟแลงเกอร์เฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับ สารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนุเบหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวางเครือขาว (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)

พยาธิสภาพของตับอ่อนในที่พบในหนูที่เป็นเบาหวานทุกกลุ่ม เป็นผลโดยตรงจากการทำลายของ streptozotocin ที่ใช้ชักนำให้หนูทดลองเกิดเป็นเบาหวาน (Rakieten *et al.* 1963; Junod *et al.* 1967; Szkudelski, 2001) สอดคล้องกับ Ahmed *et al.* (1998) ที่รายงานว่าสาร streptozotocin ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีผลทำให้เซลล์บีตาในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แซนส์เหลือเพียงร้อยละ 27.01 ขณะที่ในหนูกลุ่มปกติมีเซลล์บีตาสูงถึงร้อยละ 60.01 และ Szkudelski (2001) รายงานว่าสาร streptozotocin ที่ใช้ในการชักนำเบาหวานในสัตว์ทดลองนั้น เป็นสารที่เติมกลุ่มเมทิลให้กับดีเอ็นเอและให้สารอนุมูลอิสระชนิดแรง คือ สารไนตริกออกไซด์ ดังนั้นเซลล์บีตาที่อยู่ภายในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แซนส์จึงถูกทำลายโดยไนตริกออกไซด์ได้ง่ายเพราะในเซลล์ตับอ่อนไม่มีเอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระ เซลล์จึงถูกทำลายและตายในที่สุด นอกจากนี้ การพบการบวมของเซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แซนส์ที่พบในหนูทุกกลุ่มที่เป็นเบาหวาน อาจเกิดจากภาวะแทรกซ้อนที่พบในโรคเบาหวาน เช่น การติดเชื้อ การอักเสบ หรือความผิดปกติของการเผาผลาญไขมัน เป็นต้น (พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ และ พิเชฐ สัมปทานุกุล, 2541) ดังนั้นพยาธิสภาพของตับอ่อนที่พบในการทดลองนี้ พบในหนูเบาหวานทุกกลุ่ม จึงยังไม่อาจสรุปได้ว่าพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องจากสารสกัดกวางเครือขาว

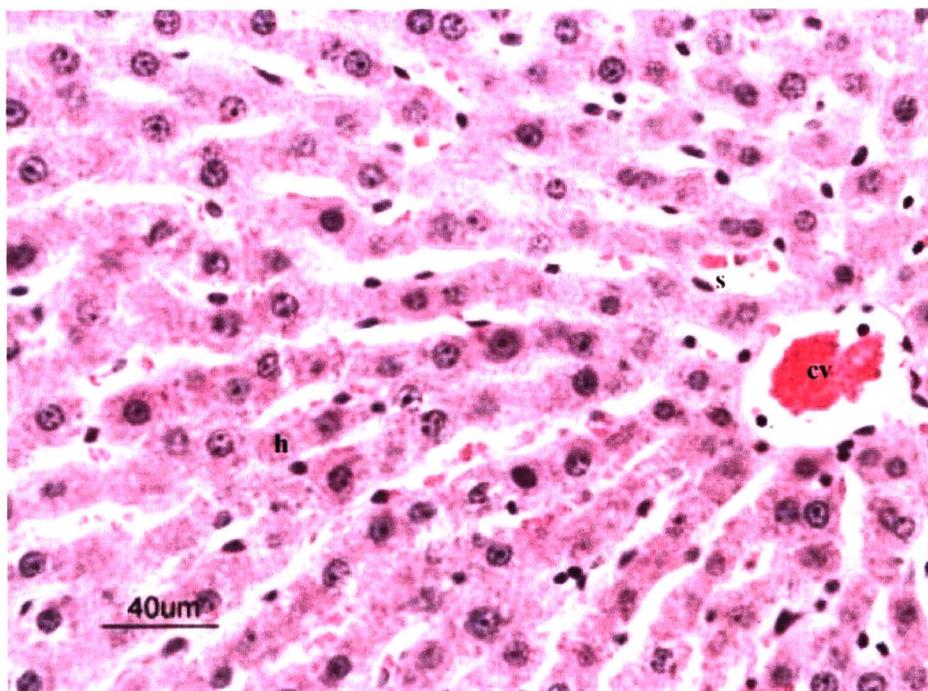
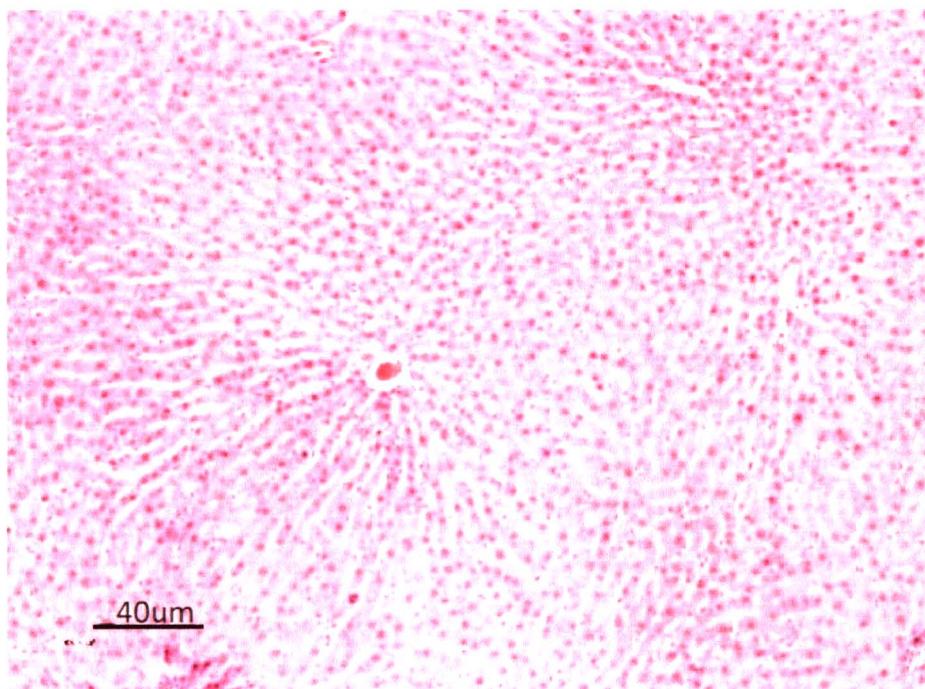
4.4.3.2 ผลต่อลักษณะจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับหนูแรท กลุ่มปกติทุกตัวที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซาลินและอีโอซินมีลักษณะปกติและเหมือนกัน คือ มีหลอดเลือดดำตรงกลาง (central vein: cv) (ภาพที่ 4.25) มีเซลล์ตับเรียงเป็นแถวในแนวรัศมี (hepatic cord: h) มีหลอดเลือดฝอย (sinusoid: s) อยู่ระหว่างแถวของเซลล์ตับ มีเซลล์เม็ดเลือดแดงติดสีชมพูเข้มของสีอีโอซินอยู่ในหลอดเลือด ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับหนูเบาหวานทุกกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน 30 วัน (ภาพที่ 4.26) กลุ่มที่ได้รับยาไกลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน 30 วัน (ภาพที่ 4.27) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวางเครือขาว 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน 30 วัน (ภาพที่ 4.28) มีความแตกต่างจากหนูกลุ่มปกติ คือ หลอดเลือดฝอยที่แทรกระหว่างแถวของเซลล์ตับมีการขยายกว้างขึ้น (sinusoid dilation) พยาธิสภาพที่เกิดในตับพบในหนูทุกกลุ่ม Singh *et al.* (2001) รายงานว่าสาร streptozotocin ขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ใช้ชักนำให้หนูทดลองเป็นโรคเบาหวานไม่ทำลายตับของสัตว์ การเกิดการขยายของหลอดเลือดฝอยที่มีมากกว่าในหนูปกติ อาจมีสาเหตุจากตับมีการอักเสบเนื่องจากภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานตลอดจนภาวะเลือดไปเลี้ยงไม่เพียงพอ (พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์และพิเชฐ สัมปทานุกุล, 2541) และกรณีของสารสกัดกวางเครืออาจมีผลของพิววารินร่วมด้วยเนื่องจากพิววารินมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและเพิ่มการไหลเวียนของเลือดในหลอดเลือด coronary artery (John *et al.*, 2004)



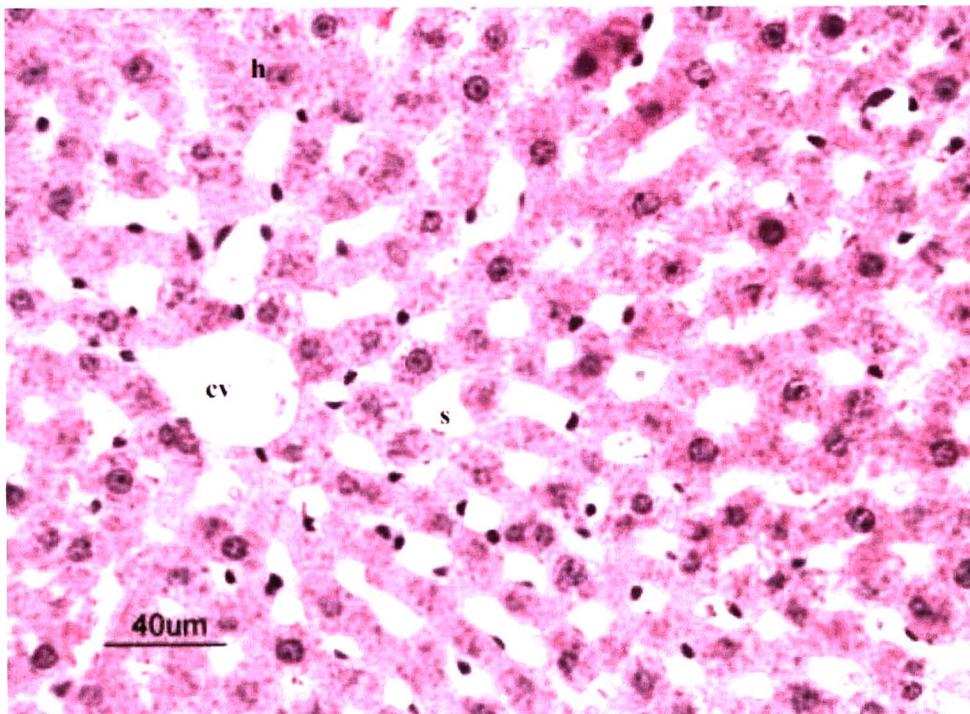
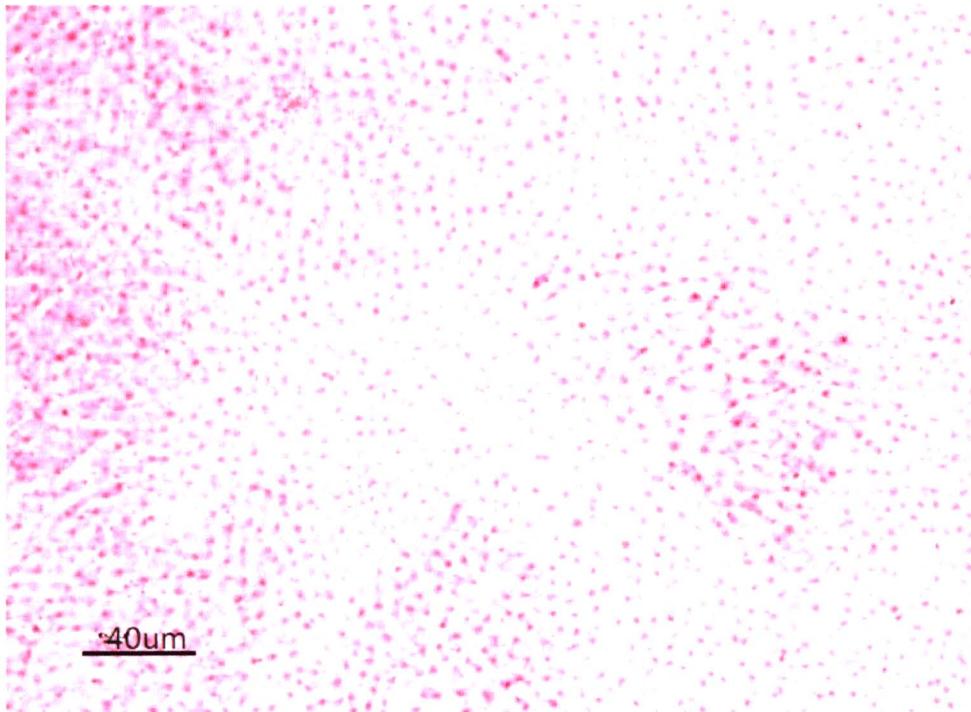
ภาพที่ 4.25 ภาพตัดขวางตับหนูแรทของหนูปกติประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 4.26 พยาธิสภาพของต้นหนูแรทเบาหวานกลุ่มควบคุมประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 4.27 พยาธิสภาพของตับหนูแรทหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์ประกอบด้วย หลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 4.28 พยาธิสภาพของตับหนูแรทหนูเบฮานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวางเครือขาวประกอบ
ด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s)
(H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)

ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าลักษณะดังกล่าวเกิดจากการได้รับสารสกัดกวางเครือขาว สอดคล้องกับการศึกษาถึงพิษเรื้อรังของกวางเครือขาวโดย ทรงพล ชีวะพัฒน์และคณะ (2543) ที่ให้ผงกวางเครือขาวแก่หนูขาวพันธุ์วิสตาในขนาด 10 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 90 วัน ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อค่าโลหิตวิทยาและไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของอวัยวะในที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติของกวางเครือขาว บางพยาธิสภาพมีโอกาสเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรืออาจเป็นความผิดปกติที่เกี่ยวเนื่องกับอายุ หรืออาจเกิดเนื่องจากภาวะเบาหวาน เพราะฉะนั้นผลการตรวจทางจุลพยาธิสภาพที่พบครั้งนี้ ยังไม่อาจสรุปได้ว่าสารสกัดจากกวางเครือขาวทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรท