

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยอาศัย SRB assay ที่มีการเปลี่ยนแปลงวิธีการเล็กน้อยคือ นำสารสกัดที่เตรียมได้จากพืชทั้งสามชนิดในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบกับเซลล์มะเร็งระบบทางเดินอาหารที่เลี้ยงไว้ในช่วงเวลา ๒๔ ชั่วโมง แล้วจึงย้อมด้วยสี SRB และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer จากนั้นหาค่า IC_{50} เพื่อเปรียบเทียบกับ ยาต้านมะเร็งที่ใช้เป็น positive control ของการทดลอง

ส่วนการทดสอบความสามารถในการชักนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งระบบทางเดินอาหาร ประกอบด้วย ๓ การทดลองย่อย คือ การติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์ที่เข้าได้กับเซลล์ที่เกิด apoptosis, การติดตามการเกิด nuclei formation โดยอาศัยการย้อมติดสีของ genomic DNA ของเซลล์มะเร็งที่ถูกทดสอบด้วย Acridine orange/ethidium bromide solution และการติดตามการเกิด DNA fragmentation ของเซลล์มะเร็งทดสอบ จากนั้นรวบรวมข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง

สถานที่ดำเนินการ/เก็บข้อมูล ได้แก่ พื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำพูน ลำปาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ห้องปฏิบัติการสาขาพืชสวน และห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

๑. การสำรวจและเก็บข้อมูลเบื้องต้น

ทำการสำรวจผักพื้นบ้านได้แก่ ผักกูด พ่อดำตีเมีย และมะกอกป่า ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง และแม่ฮ่องสอน ในช่วงเดือนพฤศจิกายน ๒๕๕๓ ถึง เดือนมิถุนายน ๒๕๕๕ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ผักทั้งสามชนิดกำลังมีการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ซึ่งช่วงเวลาในการออกสำรวจและเก็บข้อมูลของผักทั้งสามชนิดจะแตกต่างกันตามการเจริญเติบโตของผักแต่ละชนิด โดยมะกอกเป็นพืชชนิดแรกที่ได้ดำเนินการสำรวจในช่วงเดือนพฤศจิกายนจนถึงเดือนมกราคม ๒๕๕๔ เนื่องจากเป็นช่วงที่กำลังติดผลและผลกำลัง

จะสุกเต็มที่ ซึ่งมะกอกนอกจากเก็บข้อมูลในส่วนของผลแล้วยังต้องเก็บส่วนของใบอ่อน ในช่วงเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ๒๕๕๔ อีกครั้งหนึ่งเพราะต้องนำใบอ่อนไปสกัดสารเพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวเคมีกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งจากการสำรวจสามารถเก็บรวบรวมมะกอกได้จำนวน ๕๑ ต้นพันธุ์และแยกตามพื้นที่เก็บได้ดังตารางที่ ๕

ตารางที่ ๕ จำนวนต้นพันธุ์มะกอกที่รวบรวมมาจาก ๓ จังหวัดภาคเหนือตอนบน

พื้นที่	สัญลักษณ์พื้นที่	จำนวนต้นพันธุ์	จำนวนแหล่งที่เก็บ
จ. เชียงใหม่	CM	๑๘	๔
จ. ลำปาง	LP	๓	๑
จ. ลำพูน	L	๒๖	๒

โดยจังหวัดเชียงใหม่มีจำนวนแหล่งที่เก็บ ๔ แหล่งได้แก่ อำเภอสารภี (SP) อำเภอเมือง (M) อำเภอดอยสะเก็ด (DSK) และ อำเภอสันกำแพง (SKP) จังหวัดลำปางมี ๑ แหล่งได้แก่ อำเภอห้างฉัตร (LP) จังหวัดลำพูนมี ๒ แหล่งได้แก่ อำเภอบ้านธิ (L) และอำเภอป่าซาง (L) รวมเก็บต้นพันธุ์มะกอกทั้งหมด ๓๗ แหล่ง

สำหรับส่วนของผักกูดและพ่อดำตีเมียได้ดำเนินการสำรวจและเก็บข้อมูลในช่วงเดือนพฤษภาคม ๒๕๕๔ ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนและเป็นช่วงเวลาที่เหมาะที่ผักพ่อดำตีเมีย ซึ่งเป็นพืชขนาดเล็ก กำลังแทงยอดและลำต้นโผล่ออกมาจากพื้นดินในป่าเบญจพรรณและการเก็บตัวอย่างต้องเก็บทั้งต้น ในงานวิจัยนี้จึงดำเนินการเก็บรวบรวมจาก ๖ แหล่งซึ่งแต่ละแหล่งมีปริมาณต้นพันธุ์จำนวนมากจึงเก็บรวบรวมเพียง ๑๐-๒๐ ต้นต่อแหล่ง รวมจำนวน ๓๕ ต้นพันธุ์ (ตารางที่ ๖)

ตารางที่ ๖ จำนวนต้นพันธุ์พ่อดำตีเมียที่รวบรวมมาจาก ๓ จังหวัดภาคเหนือตอนบน

พื้นที่	สัญลักษณ์พื้นที่	จำนวนต้นพันธุ์	จำนวนแหล่งที่เก็บ
จ. เชียงใหม่	CM	๑๐	๑
จ. ลำพูน	L	๒๕	๑
จ. แม่ฮ่องสอน	MH	๔๐	๔

โดยจังหวัดเชียงใหม่มี ๑ แหล่งได้แก่ อำเภอดอยสะเก็ด (DS/CM) จังหวัดลำพูนมี ๑ แหล่งได้แก่ อำเภอแม่ทา (MT/L) ขณะที่จังหวัดแม่ฮ่องสอนมีจำนวน ๔ แหล่งได้แก่ อำเภอปาย (P/MH) อำเภอขุนยวม (KY/MH) อำเภอแม่ลาน้อย (ML/MH) และอำเภอแม่สะเรียง (MS/MH) รวมเก็บต้นพันธุ์พืชม้าดีมีทั้งหมด ๖ แหล่ง

ในขณะที่ผักกูดพบว่า เดือนพฤษภาคมเป็นช่วงเวลาที่กำลังมีการสร้างฟรอนต์จำนวนมาก การเก็บตัวอย่างคือเก็บส่วนของฟรอนต์ที่กำลังคลี่เป็นใบอ่อนเหมือนกับที่ชาวบ้านเก็บไปจำหน่ายตามตลาด จากการสำรวจเก็บรวบรวมผักกูดได้จำนวน ๓๒ ต้นพันธุ์จาก ๓ แหล่ง โดยจังหวัดเชียงใหม่มี ๓ แหล่งได้แก่ อ. แม่วาง (MW/CM) อ. ดอยสะเก็ด (DS/CM) และ อ. แม่แตง (MT/CM) ส่วนจังหวัดแม่ฮ่องสอนมี ๔ แหล่งได้แก่ ห้วยน้ำกาด อ. เมือง (M๑/MH) ถ้ำปลา อ. เมือง (M๒/MH) ลำน้ำ อ. ขุนยวม (KY๑/MH) และเมืองปอน อ. ขุนยวม (KY๒/MH) ดังตารางที่ ๓

ตารางที่ ๓ จำนวนต้นพันธุ์ผักกูดที่รวบรวมมาจาก ๒ จังหวัดภาคเหนือตอนบน

พื้นที่	สัญลักษณ์พื้นที่	จำนวนต้นพันธุ์	จำนวนแหล่งที่เก็บ
จ. เชียงใหม่	CM	๔๐	๓
จ. แม่ฮ่องสอน	MH	๓๒	๔

จากตารางที่ ๕, ๖ และ ๓ พื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแม่ฮ่องสอน สามารถพบมะกอก พืชม้าดีมีและผักกูดได้มากกว่าจังหวัดอื่นๆ เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีป่าเบญจพรรณกว้างขวางจึงมีแหล่งที่สามารถเก็บผักกูดและพืชม้าดีมีได้มากกว่าที่อื่น ขณะที่มะกอกพบจากสวนป่าชุมชนมากกว่าจากป่าธรรมชาติ สำหรับพื้นที่จังหวัดอื่นๆบางพื้นที่ไม่มีผักกูดและพืชม้าดีมีจากป่าเพราะป่าถูกบุกรุกทำลาย มีการถางป่าจำนวนมากเพื่อทำไร่โดยเฉพาะที่เชียงราย สำหรับพื้นที่น่าน แพร่พะเยาไม่ได้เก็บด้วยมีสาเหตุจากระยะทางค่อนข้างไกล และช่วงการเก็บผักพื้นบ้านจากป่าเป็นช่วงสั้นๆโดยเฉพาะพืชม้าดีมี ทำให้เมื่อเดินทางไปสำรวจจึงไม่มีพืชม้าดีมีให้เก็บรวบรวมหรือเก็บได้น้อย สำหรับอุปสรรคที่สำคัญในการเก็บผักพื้นบ้านซึ่งเจริญเติบโตเองตามป่าคือ ผู้เก็บต้องมีความชำนาญและช่างสังเกต ทำให้ผู้เก็บผักพื้นบ้านจากป่าส่วนมากต้องเป็นคนในพื้นที่จึงคุ้นเคยกับป่าเป็นอย่างดี และยังสามารถบอกได้

ว่าป่าบริเวณใดจะมีผักชนิดไหนขึ้นอยู่ ด้วยเหตุนี้จึงค่อนข้างเป็นอุปสรรคสำหรับคณะผู้วิจัยที่ต้องออกสำรวจและคอยติดตามชาวบ้านเข้าไปเก็บ มะกอก พ้อคำดีเมียและผักกูดในป่า

๑.๑ สภาพพื้นที่และนิเวศวิทยา

โดยจากการสำรวจพบผักพื้นบ้านทั้งสามชนิดอาศัยอยู่ในสภาพพื้นที่แตกต่างกัน โดยมะกอกนั้นในธรรมชาติสามารถพบได้ตามป่าเบญจพรรณทั่วไป แต่ต้นมะกอกที่ปลูกพบได้ตามสวนหรือไร่ของชาวบ้านซึ่งมักปลูกไว้เพื่อรับประทานส่วนของผลสุกและยอดอ่อน สำหรับผักพ้อคำดีเมียซึ่งเป็นพืชขนาดเล็กพบได้ตามป่าเบญจพรรณที่มีสภาพพื้นที่อุดมสมบูรณ์และชุ่มชื้น ไม่ได้พบเห็นตามป่าทั่วไปเพราะเจริญเติบโตเฉพาะพื้นที่ซึ่งมีราคาขายค่อนข้างแพงคือ กิโลกรัมละ ๑๒๐-๒๐๐ บาท ส่วนผักกูดสามารถพบเจอได้ในพื้นที่ชุ่มชื้นและมีน้ำไหลผ่านหรือพื้นที่ใกล้แม่น้ำที่เป็นแหล่งน้ำที่สะอาดตามธรรมชาติ ซึ่งสภาพพื้นที่และนิเวศวิทยาของผักพื้นบ้านแต่ละชนิดสามารถอธิบายได้ดังนี้

๑. มะกอก

ต้นมะกอกป่าเป็นไม้ผลยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่สามารถพบได้ในป่าเบญจพรรณทั่วไป ถ้าเป็นมะกอกปลูกพบได้ตามปลายไร่ปลายนา หรือตามสวนผลไม้อื่น มะกอกมีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และหมู่เกาะต่างๆ ในเขตร้อนของมหาสมุทรแปซิฟิก



(ก)



(ข)

ภาพที่ ๑ ต้นมะกอกที่ปลูกไว้ในสวนลำไย (ก) ต้นมะกอกที่ปลูกไว้ตามไร่

มะกอกที่สำรวจและเก็บรวบรวมในงานวิจัยนี้ พบมากตามสวนป่าชุมชนเพราะมีการอนุรักษ์ไว้เพื่อใช้ประโยชน์ซึ่งสภาพดินส่วนใหญ่มักเป็นดินร่วนหรือดินร่วนปนทรายเล็กน้อย การเจริญเติบโตอาศัยความชื้นจากลำธารหรือลำห้วยธรรมชาติ สำหรับมะกอกที่พบตามสวนผลไม้ได้แก่ สวนลำไย สภาพดินเป็นดินร่วน เจริญเติบโตโดยอาศัยน้ำและปุ๋ยจากการดูแลของชาวสวนลำไย ส่วนมะกอกที่พบปลูกตามไร่นามักเจริญเติบโตในสภาพดินร่วนปนเหนียว เจริญเติบโตโดยอาศัยน้ำจากลำคลองที่ไหลผ่านและน้ำฝน (ภาพที่ ๑)

๒. พอค้าตีเมีย

พอค้าตีเมียสามารถพบได้ในป่าเบญจพรรณที่มีลักษณะค่อนข้างเย็นและชุ่มชื้น ไม่ได้พบตามป่าทั่วไป สภาพพื้นที่ที่พบมีลักษณะเป็นดินทรายมีหินและกรวดซึ่งทำให้ยอดและลำต้นสามารถแทงโผล่มาได้ง่าย โดยพอค้าตีเมียพบเจริญเติบโตได้ดีในช่วงฤดูฝนช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม และพบมากทางภาคเหนือในพื้นที่ป่าชั้น ลำธาร ลำห้วย

ในพื้นที่ป่าชุมชนทาป่าเปา ลำพูน ทีมวิจัยสำรวจพบผักพอค้าตีเมียเจริญเติบโตอยู่ในดินทรายปนหินจำนวนมาก หลายต้นกำลังแทงยอดเล็กๆ โผล่ออกมาจากดินหลายต้นเจริญเป็นต้นที่โตเต็มที่แผ่ใบสวยงาม การเก็บพอค้าตีเมียชาวบ้านนิยมเก็บเฉพาะต้นที่ยอดกำลังคลี่ใบอ่อนเท่านั้น ต้นที่ใบกางเต็มที่แล้วก็จะปล่อยให้ทิ้งไว้ในป่าเพื่อขยายพันธุ์ต่อไป (ภาพที่ ๒)



ภาพที่ ๒ สภาพพื้นที่เก็บผักพอค้าตีเมียจากป่าชุมชนทาป่าเปา จ. ลำพูน

สำหรับพอค้าตีเมียจากห้วยแม่ปิงที่จังหวัดแม่ฮ่องสอนพบว่าต้นพอค้าตีเมียจำนวนมากเจริญเติบโตในลำห้วยเก่าชุ่มน้ำมีทั้งต้นอ่อนและต้นเก่าที่โตเต็มที่แล้ว (ภาพที่ ๓) ซึ่งเป็นสภาพพื้นที่คล้ายกับพอค้าตีเมียที่พบจากห้วยแม่จ๋าที่ขุนยวม (ภาพที่ ๔) ขณะที่พอค้าตีเมียจากป่าแม่ลาน้อยและป่าแม่สะเรียงจะพบเห็นได้จากเนินเขาที่ด้านล่างมีร่องน้ำไหลผ่าน (ภาพที่ ๕ และ ๖) และเป็นที่น่าสังเกตว่าบริเวณที่ผักพอค้าตีเมียเจริญเติบโตอยู่มักพบพืชจำพวกกระเจียวหรือพืชตระกูลขิงชนิดอื่นๆ ขึ้นอยู่ด้วยเสมอ ซึ่งแสดงว่าพื้นที่นั้นเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ จึงมีพืชหลากหลายชนิดเจริญเติบโตได้ดี



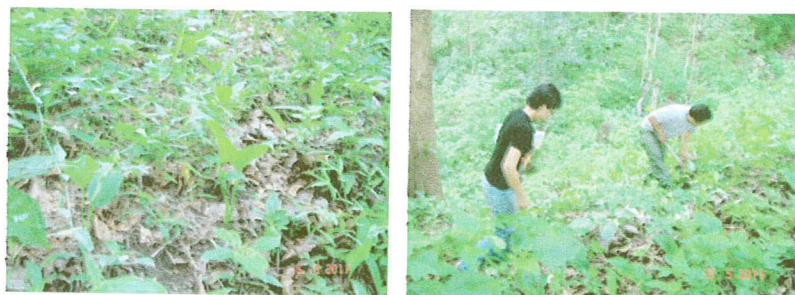
ภาพที่ ๓ สภาพพื้นที่เก็บผักพ่อดำตีเมียจากห้วยแม่ปิงป่าเมืองปาย จ. แม่ฮ่องสอน



ภาพที่ ๔ สภาพพื้นที่เก็บผักพ่อดำตีเมียจากห้วยแม่จำป่าขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน



ภาพที่ ๕ สภาพพื้นที่เก็บผักพ่อดำตีเมียจากป่าแม่ลาน้อย จ. แม่ฮ่องสอน



ภาพที่ ๖ สภาพพื้นที่เก็บผักพ่อดำตีเมียจากป่าแม่สะเรียง จ. แม่ฮ่องสอน

๓. ผักกูด

การสำรวจครั้งนี้สามารถพบผักกูดจากแหล่งธรรมชาติได้ในพื้นที่บริเวณลำห้วยที่มีน้ำไหลผ่านตลอดปี สภาพป่าบริเวณนั้นจะค่อนข้างเย็น ชื้น และมีแสงแดดส่องผ่าน ซึ่งผักกูดสามารถขึ้นอยู่ได้ในพื้นที่ห่างจากลำห้วยประมาณ ๑-๑๐ เมตรในที่มีความชื้นสูง

ผักกูดที่พบในพื้นที่ป่าเมี่ยงเป็นบริเวณที่อยู่ในศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ดเป็นบริเวณที่ชุ่มชื้นเพราะอยู่ติดกับลำห้วยขนาดใหญ่ที่มีน้ำไหลผ่านตลอดเวลาจึงมีผักกูดขึ้นอยู่จำนวนมากทั้งต้นแก่และต้นใหม่ที่เกิดจากไหลของต้นเก่า (ภาพที่ ๓) ซึ่งสภาพพื้นที่ที่มีผักกูดเจริญเติบโตอยู่นั้นจะเหมือนกับพื้นที่ปางลันแม่แตงที่ด้านหลังก็มีลำห้วยขนาดใหญ่ไหลผ่าน (ภาพที่ ๔) และผักกูดที่พบบริเวณห้วยตองก็มีลำห้วยขนาดเล็กไหลผ่าน ผักกูดจากพื้นที่ห้วยน้ำกาดก็มีลำห้วยน้ำกาดขนาดใหญ่ไหลผ่าน (ภาพที่ ๕) รวมทั้งผักกูดที่เก็บมาจากขุนยวมที่ขึ้นอยู่ในใกล้ลำห้วยขนาดใหญ่ (ภาพที่ ๑๐) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าผักกูดสามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ใกล้แหล่งน้ำที่มีน้ำไหลผ่านตลอดเวลา



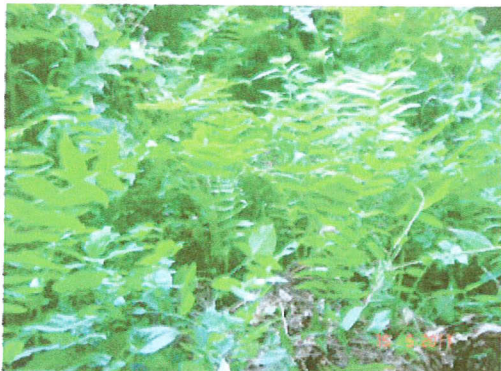
ภาพที่ ๓ สภาพพื้นที่บริเวณที่เก็บผักกูดและต้นผักกูดจากป่าเมี่ยงดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่



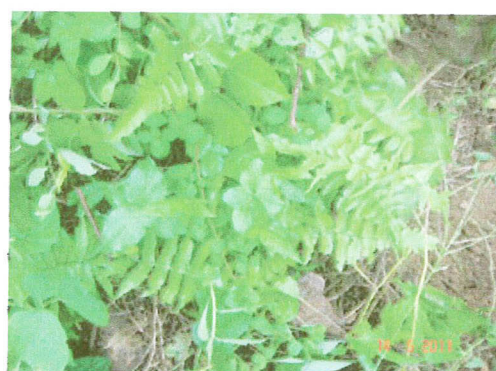
ภาพที่ ๔ สภาพพื้นที่บริเวณที่เก็บผักกูดที่ปางลันแม่แตง จ. เชียงใหม่



ภาพที่ ๙ สภาพพื้นที่เก็บผักกูดและต้นผักกูดจากห้วยตองแม่วาง จ. เชียงใหม่



ภาพที่ ๑๐ สภาพพื้นที่บริเวณที่เก็บผักกูดที่ขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน



ภาพที่ ๑๑ สภาพพื้นที่บริเวณที่เก็บผักกูดและผักกูดจากห้วยน้ำกวด จ. แม่ฮ่องสอน

๑.๒ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสัณฐานวิทยาของผักพื้นบ้าน

การเก็บข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสัณฐานวิทยาของผักพื้นบ้านทั้งสามชนิด ได้แก่ มะกอก พอค้าตีเมีย และผักกูด เป็นการเก็บข้อมูลลักษณะใบ ลักษณะผล รูปทรงผล รูปทรงใบ การเจริญเติบโต เป็นต้น ซึ่งแยกอธิบายตามผักพื้นบ้านแต่ละชนิดดังนี้

๑. มะกอก

ลักษณะทั่วไป

มะกอกป่ามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spondias pinnata* Kurz. อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae เรียกทั่วไปว่า Hog Plum มะกอกเป็นพืชขนาดใหญ่ ที่มีลำต้นสูง ความสูงของต้นมะกอกอาจสูงได้ถึง ๑๐-๑๕ เมตร ลำต้นมีกิ่งก้านจำนวนมาก ออกดอกและติดผลในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคม ยอดหรือใบอ่อนใช้รับประทานในรูปผักสด ส่วนผลใช้ในการปรุงอาหารหลายชนิด



ภาพที่ ๑๒ ลักษณะทั่วไปของต้นมะกอกหรือมะกอกป่า

ลักษณะใบ

ใบเป็นแบบใบประกอบ รูปขนนกหรือขอบขนาน ก้านใบมีจำนวน ๑๐-๑๑ ใบย่อย ใบอ่อนมีสีน้ำตาล ใบแก่มีสีเขียวหรือสีเขียวกเข้ม นิยมนำยอดหรือใบอ่อนมารับประทานสด รสเปรี้ยวอมฝาด



ภาพที่ ๑๓ ลักษณะยอดและใบของต้นมะกอก

ลักษณะดอก

การออกดอกของมะกอกพบว่า มะกอกออกดอกเป็นช่อตามปลายกิ่งหรือตามกิ่งก้าน ดอกมีสีเขียวยอมเหลือง หรือ ขาวอมเหลือง เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ขนาดเล็ก ระยะเวลาตั้งแต่เกิดตาดอกจนถึงดอกบาน ใช้เวลาประมาณ ๒-๓ สัปดาห์ ดอกจะทยอยบานเป็นรุ่นๆ จึงทำให้ ต้นมะกอก ๑ ต้น มีดอกหลายชุด

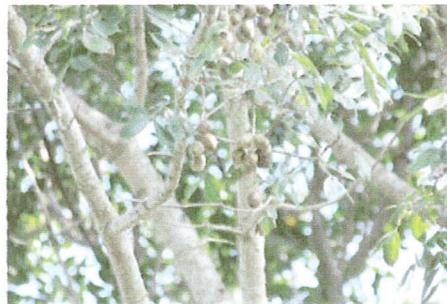
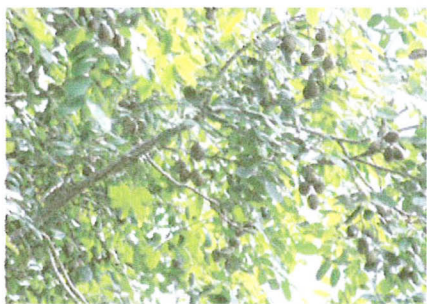


ภาพที่ ๑๔ ลักษณะดอกของมะกอก

ลักษณะผล

ผลมีลักษณะเป็นช่อ หนึ่งช่อหรือมีได้หลายผล แต่โดยประมาณมี ๔-๑๐ ผล ซึ่งขึ้นกับจำนวนดอกที่มีการพัฒนาต่อจนเป็นผล รูปทรงผลส่วนใหญ่มีลักษณะรี และไข่ มีบางต้นพันธุ์ที่มีผลรูปทรงคล้ายไข่กลับ และทรงกลม ซึ่งรูปทรงของผลที่มีหลายแบบขึ้นกับลักษณะเฉพาะของต้นพันธุ์ โดยผลมะกอกมีขนาดตั้งแต่เล็ก (ความกว้างผลประมาณ ๒-๓ ซม.) จนถึงขนาดใหญ่ (ความกว้างผลประมาณ ๔-๕ ซม.) และจากการสำรวจพบว่า มะกอกมีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาในส่วนของผลมาว่าเป็นขนาดผล รูปทรงผล ซึ่งขนาดของผลมะกอกที่แตกต่างกันอาจมีสาเหตุจากสภาพพื้นที่และความอุดมสมบูรณ์ของดินหรืออาจเป็น

พันธุ์กรรมของมะกอกเอง แต่ในส่วนของความแตกต่างของรูปทรงผลนั้นอาจมีผลมาจากลักษณะทางพันธุ์กรรมของมะกอกนั้นๆ ผลมะกอกเป็นผลเดี่ยว เปลือกนอกผลที่ยังไม่สุกมีสีเขียว หรือสีเขียวเข้ม สีผิวไม่สม่ำเสมอ มีจุดหรือแต้มสีน้ำตาล หรือน้ำตาลดำ ผิวของผลบางครั้งอาจเจอลักษณะคล้ายแผ่นฟิล์มบางสีขาวหุ้ม ผลจึงมีสีเขียวหม่น ผลแก่มีสีเขียวปนเหลือง ผลสุกมีสีเหลืองอมน้ำตาล ผิวนุ่ม เนื้อผลนุ่มมีกลิ่นหอม มีรสชาติเปรี้ยวอมฝาด (ภาพที่ ๑๕ และ ๑๖)



ภาพที่ ๑๕ ลักษณะการติดผลและข้อผล



ภาพที่ ๑๖ ลักษณะผลมะกอก

ลักษณะเมล็ด

เมล็ดมะกอกเป็นเมล็ดเดี่ยวแข็ง ผิวของเมล็ดมีลักษณะขรุขระ คล้ายเส้นใยแข็งหรือเลียนปกคลุมเมล็ด เมล็ดมะกอกส่วนใหญ่มีรูปทรงรี และไข แต่โดยทั่วไปรูปทรงของเมล็ดขึ้นกับรูปทรงของผลซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละต้นพันธุ์ (ภาพที่ ๑๗)



ภาพที่ ๑๗ ลักษณะและรูปร่างของเมล็ดมะกอก

๒. พ้อคำดีเมีย

ลักษณะทั่วไป

สำหรับพ้อคำดีเมียมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Selaginella argentea* (Wall ex. Hook & Grew) Spring อยู่ในวงศ์ Selaginellaceae จัดเป็นเครือญาติใกล้ชิดของเฟิน ลักษณะเป็นพืชกึ่งล้มลุกขนาดเล็ก ความสูงประมาณ ๑๕-๕๐ ซม. ลำต้นพอมบาง ลำต้นตั้งตรง มีเหง้าไหลทอดไปกับพื้น การเก็บพ้อคำดีเมียไปรับประทานนั้นชาวบ้านจะตัดส่วนลำต้นและยอดทั้งหมดที่โผล่พ้นดินออกมา (ภาพที่ ๑๘ และ ๑๙)



ภาพที่ ๑๘ ต้นพ้อคำดีเมียจากป่าและยอดพ้อคำดีเมียที่จำหน่ายในตลาด



ภาพที่ ๑๙ ลักษณะลำต้นและยอดของพ่อดำดีเมีย

ลักษณะใบ

ใบเป็นใบประกอบและมีใบประกอบย่อยขนาดเล็กจำนวนมาก ใบมีสีเขียวอ่อน ปนกับเขียวเข้ม มันวาว ก้านใบมีขน ดันที่เจริญเติบโตเต็มที่และใบกางเต็มที่ที่มีความสวยงามสามารถปลูกเป็นพืชประดับได้ จากการสำรวจพ่อดำดีเมียจากแต่ละแหล่งพบว่า ลักษณะใบไม่แตกต่างกันรวมถึงลักษณะของรูปร่าง รูปทรง ขนาดต้นจากแต่ละแหล่งคล้ายคลึงกัน



ภาพที่ ๒๐ ลักษณะใบของพ่อดำดีเมีย

๓. ผักกูด

ลักษณะทั่วไปของผักกูด

กูดกินหรือผักกูดมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Diplazium esculentum* (Retz.) Swartz. อยู่ในวงศ์ Athyriaceae มีชื่อที่ใช้เรียกในต่างประเทศว่า Small Vegetable fern ผักกูดเป็นเฟินชนิดที่กินได้ มีลำต้นเป็นเหง้า (Rhizomes) แบบตั้งตรง โดยความสูงทั่วไปอาจสูงได้ถึง ๖๐ ซม. (Hoshizaki and Moran, ๒๐๐๑) สำหรับในประเทศไทยอาจสูงกว่า ๑ เมตร ขยายพันธุ์โดยใช้สปอร์จากซอไรและไหล ความสูงของต้นสำหรับต้นที่เจริญเต็มที่อาจสูงถึง ๑ เมตร

ลำต้นและใบปกคลุมด้วยเกล็ดที่มีขนาด ๙×๑.๓ มม. สีนํ้าตาลดำ มีจักฟันที่ขอบ ก้านใบยาวประมาณ ๖๐ ซม. ใบมีขนาดแตกต่างกันไป ใบประกอบแบบขนนก ๒ ชั้น ซอไรเกิดขึ้นเกือบตลอดความยาวของเส้นใบย่อย เมื่อแก่จะแตกฟูและเชื่อมกับซอไรด้านที่เกิดตรงกันข้าม

ลักษณะของซอไร

ซอไรของผักกูดจะเกิดหลังใบตามแนวเส้นใบ เมื่อยังอ่อนจะมีสีขาวพอกแต่จะมีสีนํ้าตาลหรือดำและหลุดร่วงลงดินเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็เกิดต้นอ่อนขึ้นมา ซึ่งต้นอ่อนสามารถจะเกิดได้อีกทางหนึ่งคือการเกิดจากตารากซึ่งจะเกิดเป็นต้นอ่อนเล็กๆบริเวณรอบลำต้นดังภาพที่ ๒๑ (ประทุมพรและคณะ ๒๕๕๑)

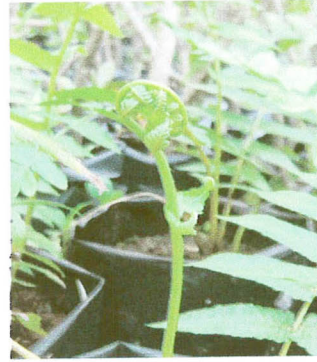


ภาพที่ ๒๑ การเกิดซอไรของผักกูด

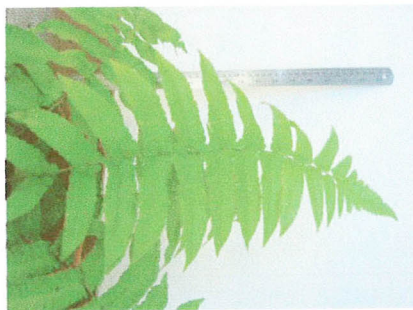
ลักษณะฟรอนด์

ก้านใบมีสีออกดำที่ฐานฟรอนด์ของผักกูดมีลักษณะเป็นก้านโผล่จากลำต้น ส่วนปลายมีวงงอและจะพัฒนาเป็นใบ (ภาพที่ ๒๒) ใบจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างตามอายุของต้น โดยฟรอนด์ที่อายุน้อยจะเป็นใบประกอบแบบขนนกที่มีใบย่อยขนาดกว้าง (ภาพที่ ๒๓) ฟรอนด์ต่อมาจะเป็นแบบขนนกสองชั้นที่มีใบย่อยชั้นที่สองหรือสามที่แคบกว่า (ภาพที่ ๒๔) สำหรับฟรอนด์ขนาดใหญ่มีใบแบบขนนกสองชั้น (ภาพที่ ๒๕) โดยผักกูดจากห้วยตอง ปางลัน ห้วยน้ำกาด ถ้ำปลาและเมืองปอนพบฟรอนด์อายุน้อยที่มีใบแบบขนนกชั้นเดียวและใบแบบขนนกสองชั้นที่มีใบย่อยชั้นที่สองหรือสาม ส่วนผักกูดจากป่าเมี่ยงและขุนยวมพบว่า ต้นที่นำมามีทั้งต้นอ่อนและต้นโตเต็มที่ได้พบใบที่เป็นใบแบบขนนกสองชั้นมากกว่าใบแบบขนนกชั้นเดียวและจากการปลูกเลี้ยงพบว่า ใบของผักกูดจะมีสองแบบได้แก่ ใบชนิดที่สร้างซอไรสำหรับใช้เพื่อการขยายพันธุ์และใบชนิดปกติที่ไม่สร้างซอไร สำหรับผักกูดที่เก็บรวบรวมมาจากแต่ละแหล่งพบว่า

มีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกัน โดยแตกต่างกันเพียงรูปแบบของใบเพราะ
ลักษณะรูปแบบของใบบ่งบอกถึงอายุของต้นพันธุ์ที่เก็บรวบรวมมาปลูก



ภาพที่ ๒๒ พรอนต์ของผักกูด



ภาพที่ ๒๓ ใบประกอบแบบขนนก



ภาพที่ ๒๔ ใบประกอบแบบขนนกชั้นเดียวและใบประกอบแบบขนนกสองชั้น

๑.๓ คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของผักพื้นบ้าน

คุณสมบัติทางกายภาพและลักษณะทางปริมาณของผักพื้นบ้านนั้นส่วนใหญ่บันทึกลักษณะที่สะดวกในการเก็บข้อมูลเท่านั้นได้แก่ การเก็บข้อมูลของผลและเมล็ดมะกอก โดยนำผลมะกอกต้นพันธุ์ละ ๑๐-๒๐ ผลจากทุกแหล่ง รวม ๕๑ ต้นพันธุ์มาวัดขนาดและชั่งน้ำหนักผลและหาค่าเฉลี่ยความกว้างผล ความยาวผล น้ำหนักผลและน้ำหนักของเมล็ดของทุกต้นพันธุ์จากตารางที่ ๘ พบว่าผลมะกอก ๕๑ ต้นพันธุ์ที่มาจากพื้นที่เชียงใหม่จำนวน ๑๔ ต้นพันธุ์ลำพูนจำนวน ๒๖ ต้นพันธุ์ และลำปางจำนวน ๓ ต้นพันธุ์ มีลักษณะทางปริมาณที่แตกต่างกันไป จากการเปรียบเทียบขนาดผลของแต่ละต้นพันธุ์พบว่า แต่ละต้นพันธุ์มีขนาดผลแตกต่างกัน บางต้นพันธุ์มีผลขนาดเล็ก บางต้นพันธุ์มีผลขนาดใหญ่ ผลจึงมีขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงใหญ่ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณน้ำหนัก โดยความกว้างผลเฉลี่ยอยู่ระหว่าง ๒๘.๘๓-๓๙.๔๕ มม. ความยาวผลเฉลี่ยอยู่ระหว่าง ๓๖.๒๓-๕๕.๘๓ มม. น้ำหนักผลเฉลี่ยอยู่ระหว่าง ๑๒.๕๘-๔๔.๓๘ กรัม และ น้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง ๔.๘๖-๑๕.๙๔ กรัม ซึ่งมะกอกต้นพันธุ์ที่มีน้ำหนักผลเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ ๑๒.๕๘ กรัมอยู่ในพื้นที่ลำปางและต้นมะกอกที่มีน้ำหนักผลเฉลี่ยมากที่สุดคือ ๔๔.๓๘ กรัมอยู่ในพื้นที่เชียงใหม่ (ตารางที่ ๘) ขณะที่ตารางที่ ๙ แสดงลักษณะทางปริมาณของผลมะกอกจำนวน ๑๔ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และภาพที่ ๒๕ แสดงให้เห็นลักษณะและรูปร่างของผลมะกอกจำนวน ๑๔ ต้นพันธุ์ด้วย

ตารางที่ ๘ ลักษณะทางปริมาณของผลมะกอกจำนวน ๕๑ ต้นพันธุ์แบ่งตามพื้นที่

พื้นที่	ความกว้างผล (มม.)	ความยาวผล (มม.)	น้ำหนักผล (กรัม)	น้ำหนักเมล็ด (กรัม)
CM	๒๘.๘๓-๓๙.๔๕	๓๓.๕๖-๕๕.๘๓	๑๓.๑๓-๔๔.๓๘	๔.๘๖-๑๕.๙๔
L	๒๓.๓๓-๓๕.๓๕	๓๖.๒๓-๕๑.๑๑	๑๒.๕๘-๓๖.๐๐	๕.๘๑-๑๔.๓๖
LP	๓๐.๓๖-๓๖.๐๓	๔๐.๑๘-๕๓.๘๘	๒๑.๐๖-๓๓.๘๕	๕.๙๘-๑๒.๑๓
รวม	๒๘.๘๓-๓๙.๔๕	๓๖.๒๓-๕๕.๘๓	๑๒.๕๘-๔๔.๓๘	๔.๘๖-๑๕.๙๔

ตารางที่ ๙ ลักษณะทางปริมาณของผลมะกอกจำนวน ๑๘ ต้นพันธุ์

รหัส ต้นพันธุ์	น้ำหนักผล* (กรัม)	น้ำหนักเมล็ด (กรัม)	ความกว้าง (มม.)	ความยาว (มม.)	ขนาดผล	รูปทรง
M๒/CM	๓๓.๒±๓.๑	๑๒.๐±๑.๑	๓๓.๗±๐.๘๔	๔๓.๖±๑.๑	ใหญ่	ไข่
MW๔/CM	๒๕.๕±๑.๑	๗.๖±๐.๕	๓๕.๐±๐.๖	๔๐.๒±๑.๓	กลาง	ทรงกลม
SP๑/CM	๒๓.๐±๓.๓	๑๑.๗±๑.๕	๓๔.๕±๐.๙	๔๓.๕±๑.๗	กลาง	รี
SP๓/CM	๑๕.๕±๒.๐	๔.๘±๐.๙	๒๘.๘±๑.๒	๓๓.๕±๒.๒	กลาง	ไข่
SP๑๐/CM	๓๕.๕±๑.๐	๑๓.๒±๑.๑	๓๕.๙±๑.๓	๕๐.๐±๐.๗	ใหญ่	ไข่กลับ
L๑	๑๒.๕±๑.๗	๖.๑±๑.๗	๒๓.๗±๑.๐	๓๖.๒±๑.๓	เล็ก	ไข่
L๖	๒๖.๒±๓.๔	๕.๘±๐.๖	๓๔.๒±๑.๓	๔๓.๙±๒.๔	กลาง	รี
L๙	๑๘.๕±๒.๙	๗.๓±๑.๘	๒๙.๗±๒.๘	๓๙.๕±๑.๑	เล็ก	รี
L๑๑	๓๑.๒±๓.๓	๑๔.๗±๑.๙	๓๔.๓±๑.๓	๕๐.๑±๒.๖	ใหญ่	รี
L๑๕	๒๓.๓±๒.๒	๙.๕±๑.๒	๓๒.๕±๑.๑	๔๒.๙±๑.๘	กลาง	ไข่
L๑๙	๒๙.๖±๒.๕	๙.๙±๑.๐	๓๔.๕±๑.๔	๔๙.๑±๑.๗	ใหญ่	รีอ้วน
L๒๑	๑๘.๕±๒.๓	๘.๕±๒.๐	๓๐.๓±๑.๓	๓๙.๕±๑.๘	กลาง	ไข่
L๒๕	๓๐.๑±๑.๖	๙.๑±๑.๑	๓๔.๘±๑.๐	๔๖.๔±๑.๓	ใหญ่	ไข่
LP๑	๒๖.๖±๔.๓	๑๐.๗±๑.๘	๓๒.๘±๑.๗	๔๕.๐±๒.๖	กลาง	รี
LP๒	๓๓.๘±๓.๒	๑๒.๑±๑.๑	๓๖.๐±๑.๓	๔๓.๘±๒.๑	ใหญ่	รีอ้วน
LP๔	๒๖.๔±๑.๘	๘.๙±๐.๖	๓๒.๕±๑.๑	๔๓.๙±๑.๒	กลาง	ไข่
LP๕	๒๕.๑±๒.๔	๘.๖±๑.๑	๓๓.๕±๐.๗	๔๒.๒±๐.๙	กลาง	ไข่
LP๖	๒๘.๕±๒.๔	๑๑.๗±๑.๓	๓๕.๕±๐.๖	๔๐.๑±๑.๓	กลาง	ไข่

* ขนาดใหญ่ : น้ำหนักผล ≥ 30.0 กรัม, ขนาดกลาง : น้ำหนักผล ๒๐.๐-๒๙.๙ กรัม, ขนาดเล็ก : น้ำหนักผล < 20.0 กรัม

ขนาดใหญ่ : ความกว้าง > 35.0 มม., ขนาดกลาง : ความกว้าง ๓๐.๐-๓๕.๐ มม., ขนาดเล็ก : ความกว้าง < 30.0 มม.

ขนาดใหญ่ : ความยาว > 40.0 มม., ขนาดกลาง : ความยาว ๓๐.๐-๓๕.๐ มม., ขนาดเล็ก : ความยาว < 30.0 มม.

					
M๒/CM	MW๔/CM	SP๑/CM	SP๓/CM	SP๑๐/CM	L๑
					
L๖	L๙	L๑๑	L๑๕	L๑๙	L๒๑
					
L๒๕	LP๑	LP๒	LP๔	LP๕	LP๖

ภาพที่ ๒๕ ผลมะกอกจำนวน ๑๔ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ด้านคุณสมบัติทางเคมีของผักแต่ละชนิดนั้น ได้มีการนำตัวอย่างผักที่เก็บได้จากบางแหล่งเท่านั้นไปวิเคราะห์เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆต้องใช้ผักปริมาณมาก ในขณะที่ผักจากแหล่งต่างๆที่คณะผู้วิจัยเก็บได้บางแหล่งมีปริมาณไม่มาก และไม่เพียงพอ ซึ่งมะกอกวิเคราะห์จาก ส่วนของผล(เนื้อและเปลือก) และส่วนยอด(ยอดอ่อนและใบอ่อน) ผักกูดวิเคราะห์จากส่วนพรอนด์และใบอ่อน ขณะที่พ่อดำดีเมียววิเคราะห์จากต้นอ่อนและใบอ่อน ดังนั้นผักที่นำไปวิเคราะห์ได้แก่ ผลมะกอกจากเชียงใหม่ (M๑/CM) ผลมะกอกจากสวนลำไยสารภี (SP๒/CM) และยอดมะกอกจากสวนลำไยสารภี (SP๓/CM) ผักพ่อดำดีเมียวจากป่าชุมชนทาป่าเปา ลำพูน (L๑) ผักกูดจากแม่วาง เชียงใหม่ (MW/CM) และผักกูดจากอำเภอเมืองแม่ฮ่องสอน (M/MH) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ดังในตารางที่ ๙ และ ๘ โดยพบว่า มะกอกมีทั้งพลังงาน ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต โยอาหาร น้ำตาล โซเดียม ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักแล้วยังมี แคลเซียม วิตามินซี เบต้าแคโรทีน วิตามินเอ วิตามินอี วิตามินบี๑ วิตามินบี ๒ เป็นองค์ประกอบด้วย และจากรายการที่วิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผลมะกอกทั้งสองแหล่ง

พบว่า มีองค์ประกอบทางโภชนาการหลายอย่างใกล้เคียงกันยกเว้นปริมาณโปรตีน แคลเซียม และวิตามินซีของผลมะกอกจากสวนลำไยสารภี (SP๒/CM) มีน้อยกว่าผลมะกอกจากเชียงใหม่ (M๑/CM) ขณะที่ปริมาณน้ำตาล เบตาแคโรทีนและวิตามินเอของผลมะกอกจากสวนลำไยสารภี (SP๒/CM) มีมากกว่าผลมะกอกจากเชียงใหม่ (M๑/CM) ในส่วนของยอดมะกอกจากสารภี (SP๓/CM) พบว่ามีปริมาณองค์ประกอบส่วนใหญ่มีน้อยกว่าผลมะกอกทั้งสองแหล่ง จากตารางที่ ๑๐ สรุปว่าผลมะกอกทั้งสองแหล่งมีปริมาณโซเดียม แคลเซียม และวิตามินซีสูง ซึ่งอาจสูงกว่าผักและผลไม้ชนิดอื่นอีกหลายชนิด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดของผลมะกอกจากสวนลำไยสารภี (SP๒/CM) ผลมะกอกจากเชียงใหม่ (M๑/CM) และยอดมะกอกจากสวนลำไยสารภี (SP๓/CM) พบว่าทั้งสามตัวอย่างมีปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดสูงมาก โดยเฉพาะผลมะกอกจากเชียงใหม่ (M๑/CM) ที่มีปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดสูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีปริมาณโซเดียม แคลเซียม และวิตามินซี สูงที่สุดด้วย (ตารางที่ ๑๐ และตารางที่ ๑๑)

ตารางที่ ๑๐ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของมะกอก*

รายการวิเคราะห์	ผลมะกอกจาก SP๒/CM (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)	ผลมะกอกจาก M๑/CM (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)	ยอดมะกอกจาก SP๓/CM (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)
พลังงานทั้งหมด	๖๗.๔๐ กิโลแคลอรี	๗๕.๕๒ กิโลแคลอรี	๖๘.๘๖ กิโลแคลอรี
พลังงานจากไขมัน	๒.๕๒ กิโลแคลอรี	๑.๘๐ กิโลแคลอรี	๔.๘๖ กิโลแคลอรี
ไขมันทั้งหมด	๐.๒๘ กรัม	๐.๒๐ กรัม	๐.๕๔ กรัม
ไขมันอิ่มตัว	๐.๑๖ กรัม	๐.๐๙ กรัม	๐.๕๔ กรัม
โปรตีน	๐.๘๔ กรัม	๒.๓๓ กรัม	๒.๙๑ กรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	๑๕.๓๘ กรัม	๑๕.๓๕ กรัม	๑๓.๐๙ กรัม
ใยอาหาร	๘.๒๑ กรัม	๙.๗๗ กรัม	๘.๘๙ กรัม
น้ำตาล	๕.๗๒ กรัม	๒.๙๖ กรัม	๑.๐๗ กรัม
โซเดียม	๒๑.๕๓ มิลลิกรัม	๒๑.๘๘ มิลลิกรัม	๕.๗๒ มิลลิกรัม
แคลเซียม	๑๔๗.๘๐ มิลลิกรัม	๑๗๔.๙๐ มิลลิกรัม	๙๗.๒๕ มิลลิกรัม
เหล็ก	๐.๖๒ มิลลิกรัม	๐.๙๐ มิลลิกรัม	๐.๖๕ มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	ไม่ได้วิเคราะห์	ไม่ได้วิเคราะห์	๖๗.๗๔ มิลลิกรัม
โพแทสเซียม	ไม่ได้วิเคราะห์	ไม่ได้วิเคราะห์	๓๔๒.๒๐ มิลลิกรัม

เบต้าแคโรทีน	๓๖.๓๐ ไมโครกรัม	๑๖.๘๕ ไมโครกรัม	ไม่ได้วิเคราะห์
วิตามิน เอ (Retinol equivalent)	๖.๐๕ ไมโครกรัม	๒.๘๑ ไมโครกรัม	๐.๘๙ ไมโครกรัม
วิตามิน อี (α-Tocopheral)	๓.๑๓ มิลลิกรัม	๓.๔๘ มิลลิกรัม	๒.๑๒ มิลลิกรัม
วิตามิน บี๑	๐.๐๑ มิลลิกรัม	๐.๐๑ มิลลิกรัม	๐.๐๑ มิลลิกรัม
วิตามิน บี๒	<๐.๐๒๕ มิลลิกรัม	<๐.๐๒๕ มิลลิกรัม	๐.๐๑๕ มิลลิกรัม
วิตามิน ซี	๙๔.๙๕ มิลลิกรัม	๑๓๔.๙๐ มิลลิกรัม	๐.๐ มิลลิกรัม
ความชื้น	๘๒.๓๑ กรัม	๘๐.๔๐ กรัม	๘๒.๔๕ กรัม
เถ้า	๑.๑๙ กรัม	๑.๓๒ กรัม	๑.๐๑ กรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

ตารางที่ ๑๑ ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant) ของมะกอก*

ตัวอย่างมะกอก	ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด
ผล M๑/CM	๓,๐๑๔ มิลลิกรัม
ผล SP๒/CM	๒,๘๒๘ มิลลิกรัม
ยอด SP๓/CM	๒,๓๓๕ มิลลิกรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

สำหรับผักพ้อคำตี้เมียนำมาวิเคราะห์เพียงแหล่งเดียวคือ ป่าทาป่าเปา จ. ลำพูน (L๑) เนื่องจากแหล่งอื่นมีปริมาณไม่เพียงพอ ซึ่งพบว่าปริมาณองค์ประกอบหลักทั่วไปเหมือนผักอื่นโดยมีปริมาณเหล็ก โพแทสเซียม ฟอสฟอรัสและแคลเซียมอยู่ในเกณฑ์สูง ส่วนค่าอื่นๆและปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด มีปริมาณน้อยกว่ายอดมะกอกเมื่อเปรียบเทียบกัน (ตารางที่ ๑๒ และ ๑๓)

ตารางที่ ๑๒ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผักพ้อคำตี้เมียน*

รายการวิเคราะห์	พ้อคำตี้เมียนจาก L๑ (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)	รายการวิเคราะห์	พ้อคำตี้เมียนจาก L๑ (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)
พลังงานทั้งหมด	๓๒.๑๙ กิโลแคลอรี	ฟอสฟอรัส	๔๒.๒๒ มิลลิกรัม

พลังงานจากไขมัน	๒.๔๓ กิโลแคลอรี	โพแทสเซียม	๒๓๘.๘๐ มิลลิกรัม
ไขมันทั้งหมด	๐.๒๓ กรัม	วิตามิน เอ	๐.๐๐ มิลลิกรัม
โปรตีน	๒.๐๓ กรัม	วิตามิน อี	๐.๐๖ มิลลิกรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	๕.๓๓ กรัม	วิตามิน บี๑	๐.๐๑ มิลลิกรัม
ใยอาหาร	๒.๙๘ กรัม	วิตามิน บี๒	๐.๐๐๘ มิลลิกรัม
น้ำตาล	๑.๘๓ กรัม	วิตามิน ซี	๐.๐๐ มิลลิกรัม
โซเดียม	๕.๘๒ กรัม	ความชื้น	๙๑.๑๓ กรัม
แคลเซียม	๒๐.๑๙ มิลลิกรัม	เถ้า	๑.๑๒ กรัม
เหล็ก	๑.๘๔ มิลลิกรัม		

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

ตารางที่ ๑๓ ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant) ของผักพ้อคำตี้เมีย*

ตัวอย่างพ้อคำตี้เมีย	ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด
L๑	๖๒.๒๖ มิลลิกรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

ตารางที่ ๑๔ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผักกูด*

รายการวิเคราะห์	ผักกูดจาก CM (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)	ผักกูดจาก MH (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)
พลังงานทั้งหมด	๓๓.๓/๔ กิโลแคลอรี	๒๕.๓/๑ กิโลแคลอรี
พลังงานจากไขมัน	๒.๓/๐ กิโลแคลอรี	๒.๔๓ กิโลแคลอรี
ไขมันทั้งหมด	๐.๓๐ กรัม	๐.๒๓ กรัม
โปรตีน	๔.๐๙ กรัม	๒.๖๐ กรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	๓.๖๓ กรัม	๓.๒๒ กรัม
ใยอาหาร	๔.๑๔ กรัม	๒.๘๐ กรัม
น้ำตาล	- กรัม	- กรัม
โซเดียม	๑๐.๙๐ กรัม	๑.๒๓ กรัม
แคลเซียม	๑๘.๓/๙ มิลลิกรัม	๑๖.๔๙ มิลลิกรัม

เหล็ก	๐.๘๒ มิลลิกรัม	๐.๔๘ มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	๓/๒.๓๒ มิลลิกรัม	๓/๓.๙๕ มิลลิกรัม
โพแทสเซียม	๕๐๓/๓/๐ มิลลิกรัม	๓๖๕.๒๐ มิลลิกรัม
วิตามิน เอ	๐.๐๐ มิลลิกรัม	๐.๐๐ มิลลิกรัม
วิตามิน อี	๐.๙๙ มิลลิกรัม	๐.๔๘ มิลลิกรัม
วิตามิน บี๑	๐.๐๐ มิลลิกรัม	๐.๐๔ มิลลิกรัม
วิตามิน บี๒	๐.๐๓ มิลลิกรัม	๐.๐๓ มิลลิกรัม
วิตามิน ซี	๐.๐๐ มิลลิกรัม	๐.๐๐ มิลลิกรัม
ความชื้น	๙๐.๓๕ กรัม	๙๒.๓/๒ กรัม
เถ้า	๑.๕๙ กรัม	๑.๑๙ กรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

ตารางที่ ๑๕ ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant) ของผักกูด*

ตัวอย่างผักกูด	ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด
MW/CM	๒๑๑.๙๒ มิลลิกรัม
M/MH	๘๓.๓/๑ มิลลิกรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

จากตารางที่ ๑๕ ซึ่งแสดงคุณค่าทางโภชนาการของผักกูดจากสองแหล่งได้แก่ ผักกูดจากแม่ฮ่องสอนและผักกูดจากแม่ฮ่องสอนจังหวัดเชียงใหม่พบว่า ทั้งสองแหล่งมีองค์ประกอบทางคุณค่าทางโภชนาการไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นปริมาณของโปรตีน แคลเซียม เหล็ก และโพแทสเซียม ที่ผักกูดจากแม่ฮ่องสอนจังหวัดเชียงใหม่มีมากกว่าผักกูดจากแม่ฮ่องสอน รวมทั้งมีปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดมากกว่าผักกูดจากแม่ฮ่องสอนอีกด้วย (ตารางที่ ๑๕) ที่เป็นเช่นนี้อาจขึ้นอยู่กับความสดใหม่ของพรรณที่นำไปวิเคราะห์เพราะผักกูดจากแม่ฮ่องสอนใช้เวลาเดินทางนานกว่าจะส่งตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์เนื่องจากระยะทางจากแม่ฮ่องสอนถึงเชียงใหม่ค่อนข้างไกล นอกจากนี้ อาจมีผลจากสภาพนิเวศวิทยาและความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ที่เป็นแหล่งเก็บเนื่องจากพื้นที่แม่ฮ่องสอนที่ผักกูดเจริญเติบโตเป็นลำห้วยที่ไหลมาจากภูเขาสูงที่มีสภาพส่วนใหญ่เป็นหินและดินแดงมีความอุดมสมบูรณ์น้อยเมื่อเทียบกับผักกูดจากแม่ฮ่องสอนที่เจริญเติบโตข้างลำห้วยที่พื้นที่โดยรอบมีความอุดมสมบูรณ์เพราะเป็นพื้นที่ชุ่มชื้นมีต้นไม้ใหญ่ปกคลุม

๓. การขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมต้นพันธุ์

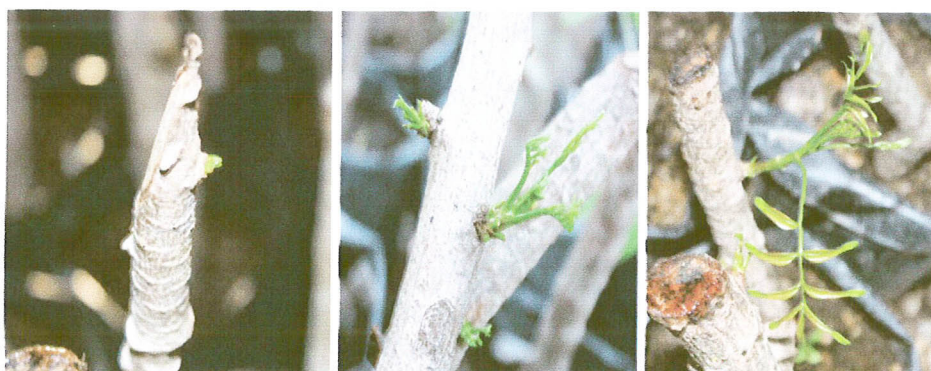
หลังจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นพันธุ์แล้วก็นำเอาส่วนที่ขยายพันธุ์ได้ของผักพื้นบ้านแต่ละชนิดมาปลูกรวบรวมไว้สำหรับใช้ในงานวิจัย ซึ่งผักพื้นบ้านแต่ละชนิดก็มีการขยายพันธุ์ที่แตกต่างกันไปตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤกษศาสตร์ของผักชนิดนั้น

๓.๑ มะกอก

มะกอกป่าสามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี วิธีที่นิยมคือการเพาะเมล็ดและการปักชำกิ่ง แต่เนื่องจากการเพาะเมล็ดมีข้อเสียคือทำให้ได้ต้นใหม่ที่ไม่ตรงตามพันธุ์ ในงานวิจัยนี้จึงทำการขยายพันธุ์โดยวิธีการปักชำกิ่ง ดังนั้นหลังจากการสำรวจ การเก็บตัวอย่างมะกอกจึงเก็บส่วนของผลและกิ่งมะกอกจากต้นเพื่อนำมาใช้ขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมพันธุ์ ซึ่งกิ่งที่ใช้ปักชำยาวประมาณหนึ่งฟุตและปักชำลงบนวัสดุเพาะที่ประกอบด้วยทรายและขี้เถ้าแกลบ พอกิ่งชำมีการพัฒนาสร้างยอด ใบและรากจึงย้ายไปปลูกในกระถางที่มีดินปลูก โดยระยะเวลาการปักชำกิ่งใช้เวลาประมาณหนึ่งเดือนถึงเดือนครึ่งจึงย้ายปลูกได้ (ภาพที่ ๒๖-๒๘)



ภาพที่ ๒๖ ท่อนพันธุ์มะกอกสำหรับการปักชำ



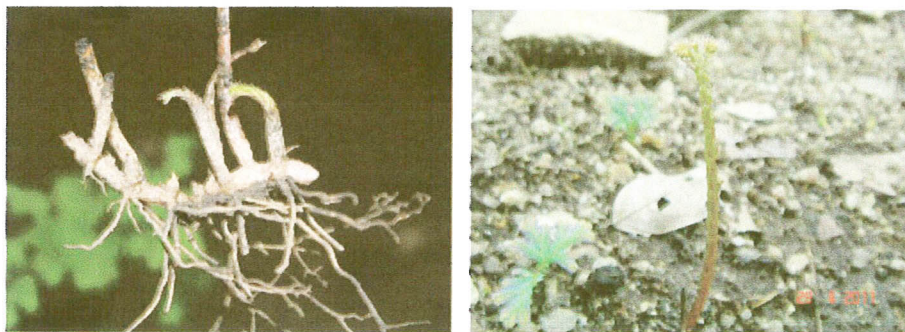
ภาพที่ ๒๗ การพัฒนาของตาข้างบนกิ่งชำมะกอก



ภาพที่ ๒๘ ต้นมะกอกใหม่ที่ได้จากการปักชำกิ่ง

๓.๒ พ้อคำดีเมีย

การขยายพันธุ์พ้อคำดีเมียสามารถทำได้โดยการแยกเหง้าที่มีต้นใหม่เกิดขึ้น เหง้าที่ตัดออกมาก็นำมาปลูกใส่กระถางหรือถุงดำไว้ รดน้ำให้ชุ่มอยู่เสมอจากนั้นประมาณ ๒ สัปดาห์ยอดใหม่ก็จะแทงออกมาแล้วพัฒนาเป็นพ้อคำดีเมียต้นเล็กๆพร้อมที่จะเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้การแยกเหง้าที่เก็บมาจากป่าแล้วปลูกลงกระถางเพื่อรอดต้นใหม่ (ภาพที่ ๒๙)

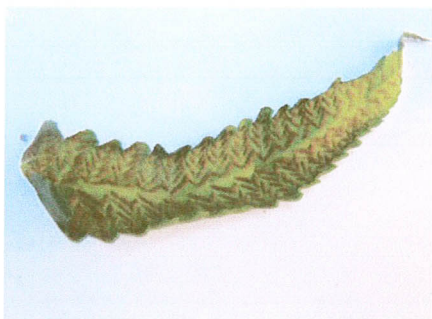


ภาพที่ ๒๙ เหง้าของพ้อคำดีเมียที่และยอดที่กำลังพัฒนาเป็นต้นใหม่

๓.๓ ผักกูด

การปลูกรวบรวมผักกูดจากต้นที่เก็บมาจากพื้นที่แต่ละแหล่ง โดยนำมาปลูกใส่กระถางและถุงดำรวบรวมไว้ ซึ่งผักกูดสามารถขยายพันธุ์ได้สองวิธีคือ การขยายพันธุ์โดยใช้ซอไรที่เกิดขึ้นหลังใบ เมื่อซอไรแก่จะหล่นลงพื้นดินแล้วเมื่อได้ความชื้นก็จะเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ต้นเล็กๆเกิดขึ้นใกล้ต้นเก่าหรือบริเวณเดียวกับต้นเก่า อีกวิธีคือการตัดต้นใหม่ที่เกิดขึ้นบนไหลของ

ต้นเก่ามาปลูกในถุงดำ (ภาพที่ ๓๐) งานวิจัยนี้ใช้การแยกกอจากต้นแม่พันธุ์เดิมแล้วนำมา
ปลูกลงถุงดำเพื่อเก็บรวบรวมไว้โดยแยกตามแหล่งพื้นที่เก็บ (ภาพที่ ๓๑ และ ๓๒)



ภาพที่ ๓๐ ซอไรสำหรับขยายพันธุ์และ ผักกูดต้นใหม่ที่มาจากไหลของต้นเก่า



ภาพที่ ๓๑ ผักกูดที่มาจากชุมชนแม่ฮ่องสอนปลูกรวบรวมไว้ในถุงดำ



ภาพที่ ๓๒ ผักกูดที่มาจากปางสน แม่แตง

๔. การศึกษาด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

๓.๑ การเก็บตัวอย่างผักพื้นบ้าน

การเก็บตัวอย่างผักพื้นบ้านเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอนั้น สำหรับผักพื้นบ้านทั้งสามชนิดได้เก็บส่วนของใบอ่อนมาเก็บรักษาไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ ๒๐ องศาเซลเซียส เพื่อบริการสกัดดีเอ็นเอ สำหรับมะกอกสกัดดีเอ็นเอ จำนวน ๑๘ ต้นพันธุ์ที่สุ่มมาจากพื้นที่สำรวจ ๖ แหล่ง ขณะที่ผักกูดสกัดดีเอ็นเอ จำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่สุ่มมาจากพื้นที่สำรวจ ๓ แหล่ง ส่วนพ้อคำดีเมียดสกัดดีเอ็นเอ จำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่สุ่มมาจากพื้นที่สำรวจ ๖ แหล่ง (ตารางที่ ๒, ๓ และ ๔)

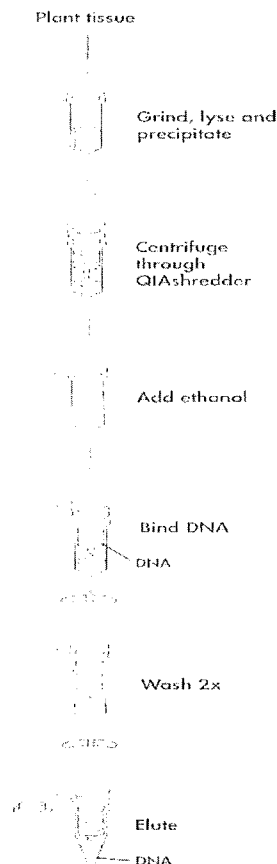
๓.๒ การสกัดดีเอ็นเอจากส่วนใบผัก

สำหรับผักพื้นบ้านทั้งสามชนิดสามารถใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมได้หลายชนิดแต่ชุดสกัดที่ใช้แล้วได้ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่ดีได้แก่ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ซึ่งสามารถใช้ได้กับใบอ่อนจนถึงใบแก่ ดังนั้นในงานวิจัยจึงใช้ชุดสกัดนี้กับใบของมะกอก พ้อคำดีเมียดและผักกูด

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (ประทุมพร และพรรัตน์, ๒๕๕๙) มีรายละเอียดดังนี้ (ภาพที่ ๓๓)

๑. บดใบอ่อนจำนวน ๑๐๐ มิลลิกรัม ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด ๑.๕ มล.
๒. เติม บัฟเฟอร์ AP๑ จำนวน ๔๐๐ ไมโครลิตร และใส่ RNase A จำนวน ๔ ไมโครลิตร (๑๐๐ mg/ml)
๓. นำไปบ่มในน้ำอุณหภูมิ ๖๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๐ นาที พลิกกลับไปมา ๒-๓ ครั้ง
๔. เติม บัฟเฟอร์ AP๒ จำนวน ๑๓๐ ไมโครลิตร เขย่า และ บ่มในน้ำแข็งนาน ๕ นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ ๒๐,๐๐๐ x g นาน ๕ นาที
๕. ย้ายส่วนใสใส่ลงใน QIAshredder Mini spin Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ ๒๐,๐๐๐ x g นาน ๒ นาที
๖. ย้ายส่วนใสที่กรองได้ไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ (ประมาณ ๔๕๐ ไมโครลิตร)
๗. ใส่บัฟเฟอร์ AP๓/E ลงไปในหลอดทดลอง จำนวน ๑.๕ เท่า ผสมให้เข้ากัน (ประมาณ ๖๗๕ ไมโครลิตร)
๘. นำส่วนผสมจำนวน ๖๕๐ ไมโครลิตรใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ ๖,๐๐๐ x g นาน ๑ นาที แล้วทิ้งส่วนผสม จากนั้นนำส่วนผสมที่เหลือกรองผ่านซ้ำอีกจนหมด

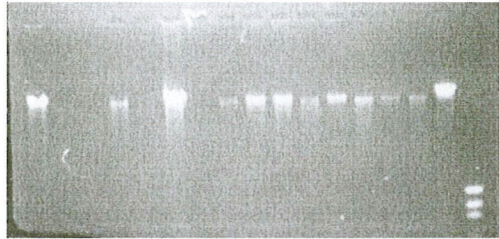
๙. นำเอา DNeasy Mini Spin Column มาวางในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติม บัฟเฟอร์ AW ลงไป ๕๐๐ ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๖,๐๐๐ x g นาน ๑ นาที ที่อุณหภูมิที่กรองได้
๑๐. เติมบัฟเฟอร์ AW ลงไปจำนวน ๕๐๐ ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๒๐,๐๐๐ x g นาน ๒ นาที ที่อุณหภูมิ
๑๑. ย้าย DNeasy Mini Spin Column ไปวางในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติม บัฟเฟอร์ AE จำนวน ๑๐๐ ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน ๕ นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๖,๐๐๐ x g นาน ๑ นาที
๑๒. ทำซ้ำในข้อ ๑๑. อีกครั้ง แล้วเก็บส่วนใสที่ได้สำหรับนำไปใช้ต่อไป สำหรับดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด จะนำไปเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -๒๐ องศาเซลเซียส เพื่อที่จะนำไปทำ PCR และวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป



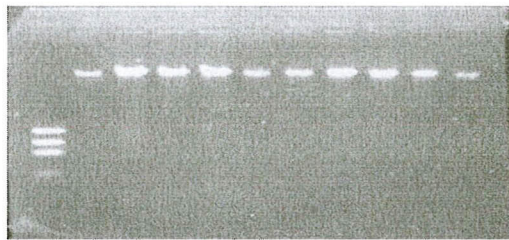
ภาพที่ ๓๓ ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

๓.๓ การเช็คคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

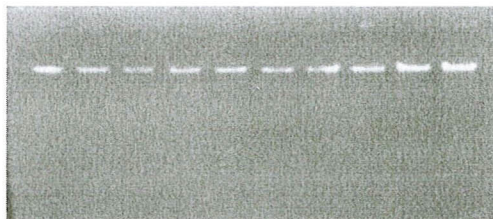
การเช็คคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของมะกอก ผักกูด และผักพ้อคำดีเมีย ทำโดยใช้การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย อากาโรส เจล (agarose gel) ความเข้มข้น ๐.๘% โดยใช้ ๐.๕XTBE บัฟเฟอร์ แล้วนำดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณที่ดีมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นประมาณ ๑๐-๒๐ ng เพื่อใช้ในการทำการ PCR ต่อไป (ภาพที่ ๓๔, ๓๕ และ ๓๖)



ภาพที่ ๓๔ ดีเอ็นเอจากมะกอกเช็คคุณภาพโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพที่ ๓๕ ดีเอ็นเอจากผักกูดเช็คคุณภาพโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพที่ ๓๖ ดีเอ็นเอจากผักพ้อคำดีเมียเช็คคุณภาพโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

๓.๔ การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)

การทำ PCR ใช้ชุดสำเร็จรูป puRe Taq Ready –To–Go PCR Beads (ของ Amersham Biosciences) โดยเติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดีเอ็นเอต้นแบบ (ความเข้มข้น ๑๐-๒๐ ng) และ ไพร์เมอร์ (primer) (ความเข้มข้น ๐.๒ micromoles) ซึ่งไพร์เมอร์ที่ใช้มีจำนวน

เบส ๑๓-๑๘ ตัว (๑๓-๑๘ base oligonucleotide primers ของ UBC) โดยใช้เครื่อง PCR ชนิด Gradient Palm-Cycler

จากการทดสอบหา Thermal Cycle condition ที่เหมาะสมกับการทำ PCR นั้นพบว่าได้ Cycle condition ที่เหมาะสมกับมะกอกและผักพ้อคำดีเมีย คือ

Cycle condition : ๙๔ °C ๕ min

๙๔ °C ๓๐ sec, ๕๐ °C ๔๕ sec, ๗๒ °C ๑๒๐ sec : ๓๕ cycles

๗๒ °C ๓ min

Cycle condition ที่เหมาะสมกับผักกูด คือ

Cycle condition : ๙๔ °C ๕ min

๙๔ °C ๓๐ sec, ๕๒ °C ๔๕ sec, ๗๒ °C ๑๒๐ sec : ๔๐ cycles

๗๒ °C ๕ min

๓.๕ การคัดเลือกไพรเมอร์ (Primer) ที่เหมาะสม

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้ใช้การสุ่มจากไพรเมอร์ของ UBC (The University of British Columbia) จำนวน ๑๐๐ ชนิด ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีจำนวน ๑๓-๑๘ เบส พบว่าจากการคัดเลือกมีไพรเมอร์จำนวน ๓ ชนิดใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะกอกได้ดี และจำนวน ๑๒ ชนิดใช้กับพ้อคำดีเมีย ส่วนผักกูดใช้ไพรเมอร์ จำนวน ๓ ชนิด (ตารางที่ ๑๖)

การทดสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ดีเอ็นเอของผักแต่ละชนิดจำนวน ๒ แหล่งมาทำ PCR กับไพรเมอร์ที่เลือกไว้แล้วนำเอา PCR product ที่ได้มาเช็คด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น ๐.๘% ด้วย ๐.๕XTBE บัฟเฟอร์ (ประทุมพร และพรรัตน์, ๒๕๔๙)

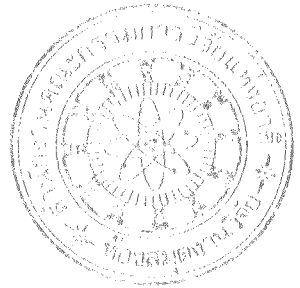
ตารางที่ ๑๖ ไพรเมอร์จำนวน ๓ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะกอกจำนวน

๑๘ ต้นพันธุ์

รหัส Primer	ลำดับเบส ๕' to ๓'*
UBC-๘๐๓'	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC-๘๐๘	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC-๘๐๙'	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC-๘๑๒	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC-๘๓๔	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC-๘๖๔	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC-๘๘๐	GGA GAG GAG AGG AGA

* B = C, G, T D = A, G, T H = A, C, T V = A, C, G

ตารางที่ ๑๗ ไพร์เมอร์จำนวน ๑๒ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักพ้อคำดีเมีย
จำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์



รหัส Primer	ลำดับเบส ๕' to ๓'*
UBC-๘๐๗	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC-๘๐๘	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC-๘๐๙	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC-๘๑๐	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC-๘๑๑	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC-๘๑๗	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
UBC-๘๒๕	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC-๘๓๔	GGA GAG GAG AGG AGA
UBC-๘๔๘	CAC ACA CAC ACA CAC ARG
UBC-๘๖๔	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC-๘๖๖	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
UBC-๘๙๐	VHV GTG TGT GTG TGT GT

* B = C, G, T D = A, G, T H = A, C, T V = A, C, G

ตารางที่ ๑๘ ไพร์เมอร์จำนวน ๓ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักกูด
จำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์

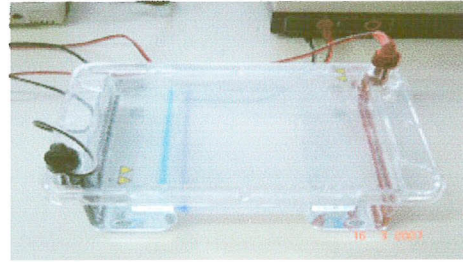
รหัส Primer	ลำดับเบส ๕' to ๓'*
UBC-๘๖๔	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC-๘๓/๓	GAC AGA CAG ACA GAC A
UBC-๘๘๐	GGA GAG GAG AGG AGA

* B = C, G, T D = A, G, T H = A, C, T V = A, C, G

๔.๖ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของ PCR Product

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ อะกาโรส เจล ที่ความเข้มข้น ๑.๕% ใน ๐.๕X TBE บัฟเฟอร์ และ ใช้ EZ load ๑๐๐ bp PCR Molecular Ruler (Bio-Rad) เป็น marker (ภาพที่ ๓๗) และย้อมเจลด้วย

สารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น ๑๐ มก./มล. แล้วนำไปส่องภายใต้แสง
 คลื่นตราชูไวโอเลต และถ่ายรูปเพื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความ
 คล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมจากโปรแกรม NTSYSpc ver. ๒.๒ (Rohlf, ๒๐๐๐)
 (ประทุมพร และพรรัตน์, ๒๕๔๙; ประทุมพร และคณะ, ๒๕๕๐)

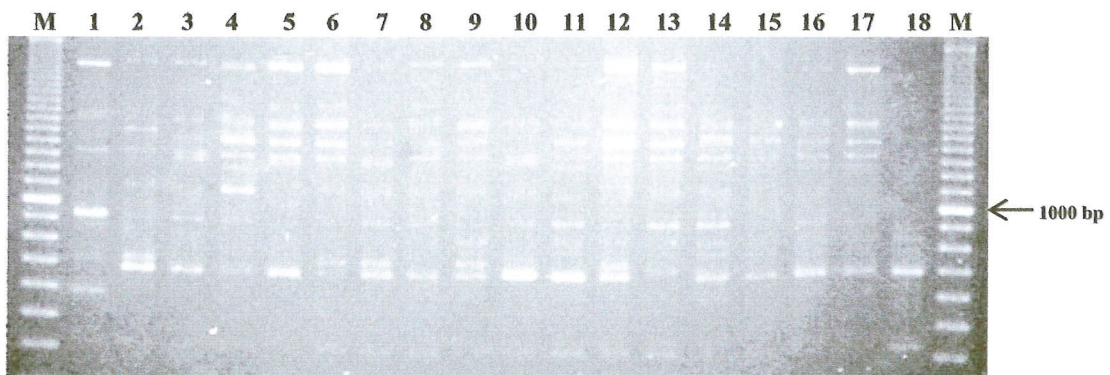


ภาพที่ ๓๓/ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอของผักพื้นบ้าน

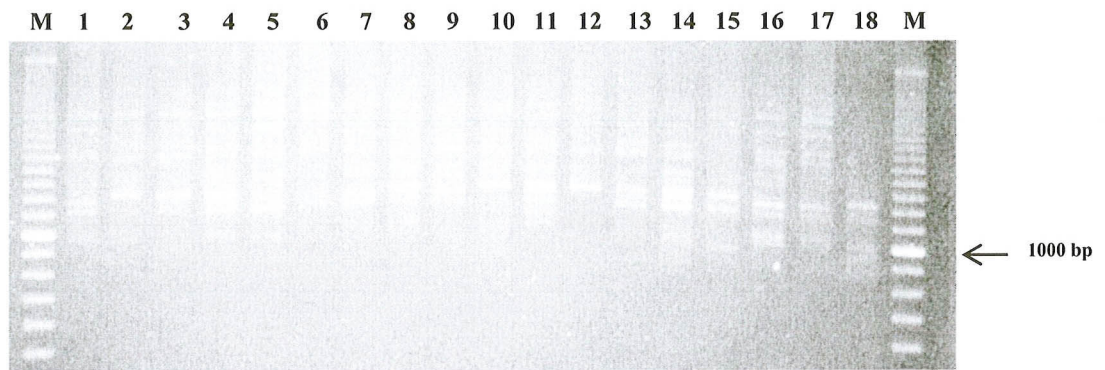
๔.๓/ การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

๑. มะกอก

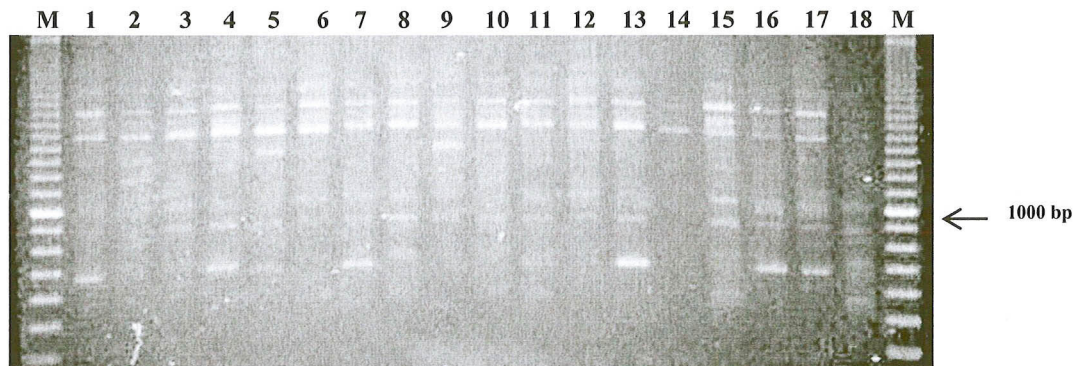
นำดีเอ็นเอของมะกอกจำนวน ๑๔ ต้นพันธุ์มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์
 UBC จำนวน ๗ ชนิดที่คัดเลือกจากไพรเมอร์จำนวน ๙๐ ชนิด ซึ่งไพรเมอร์แต่ละชนิดแสดงแถบ
 ดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่
 แสดงออกนี้สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มมะกอกแต่ละต้นพันธุ์จากแต่ละแหล่ง ว่ามีความคล้ายคลึง
 กันหรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้าย
 คลึงกันทางพันธุกรรมของมะกอกที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ
 Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN



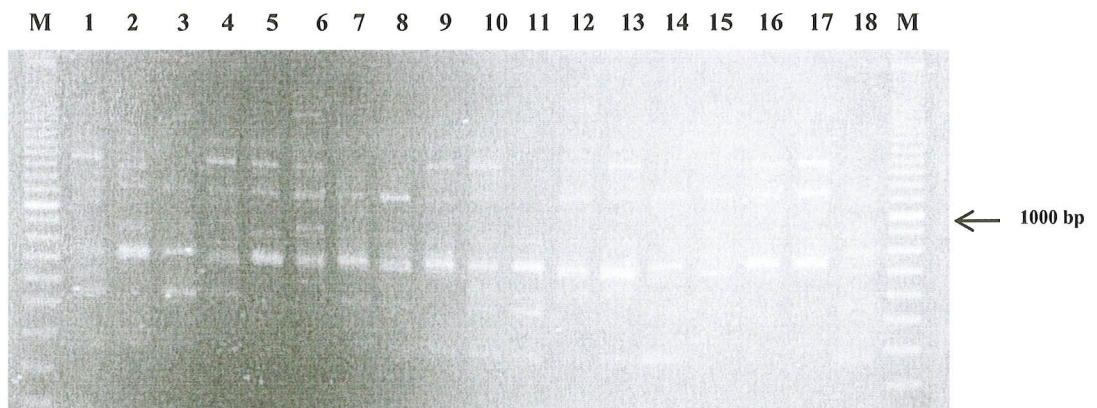
ภาพที่ ๓๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอมะกอก ๑๔ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๐๓/



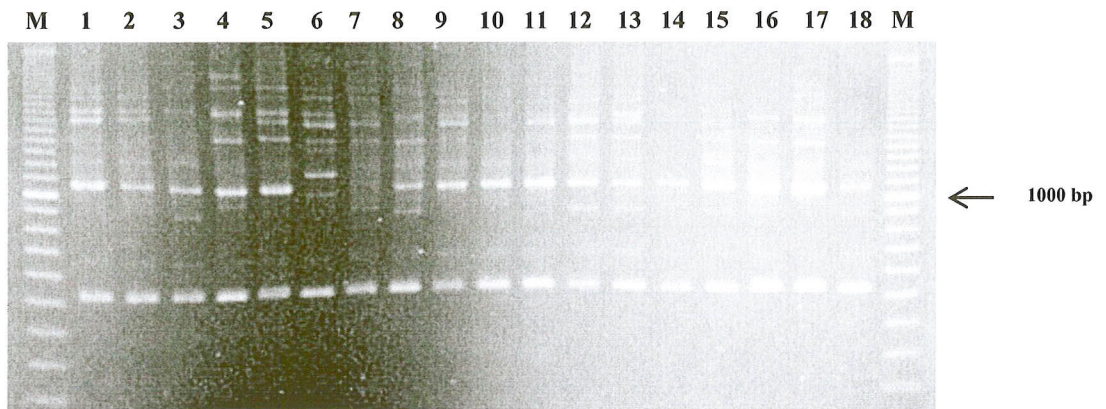
ภาพที่ ๓๙ รูปแบบแถบดีเอ็นเอมะกอก ๑๘ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๐๘



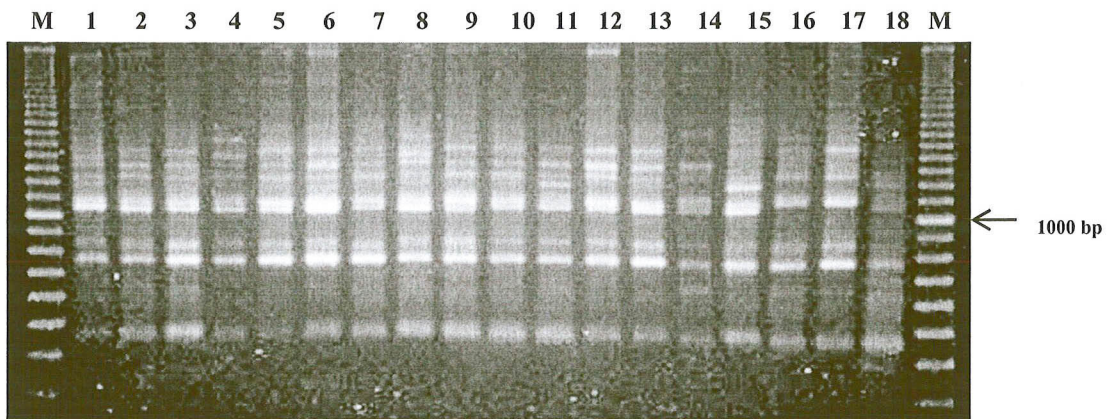
ภาพที่ ๔๐ รูปแบบแถบดีเอ็นเอมะกอก ๑๘ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๐๙



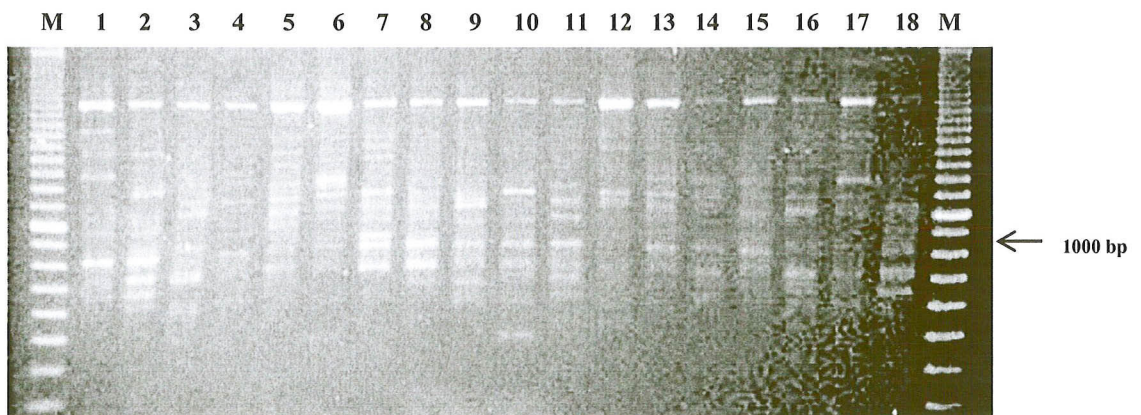
ภาพที่ ๔๑ รูปแบบแถบดีเอ็นเอมะกอก ๑๘ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๑๒



ภาพที่ ๔๒ รูปแบบแถบดีเอ็นเอมะกอก ๑๘ ต้นพันธุ์จากไฟร์เมอร์ UBC-๘๓๔



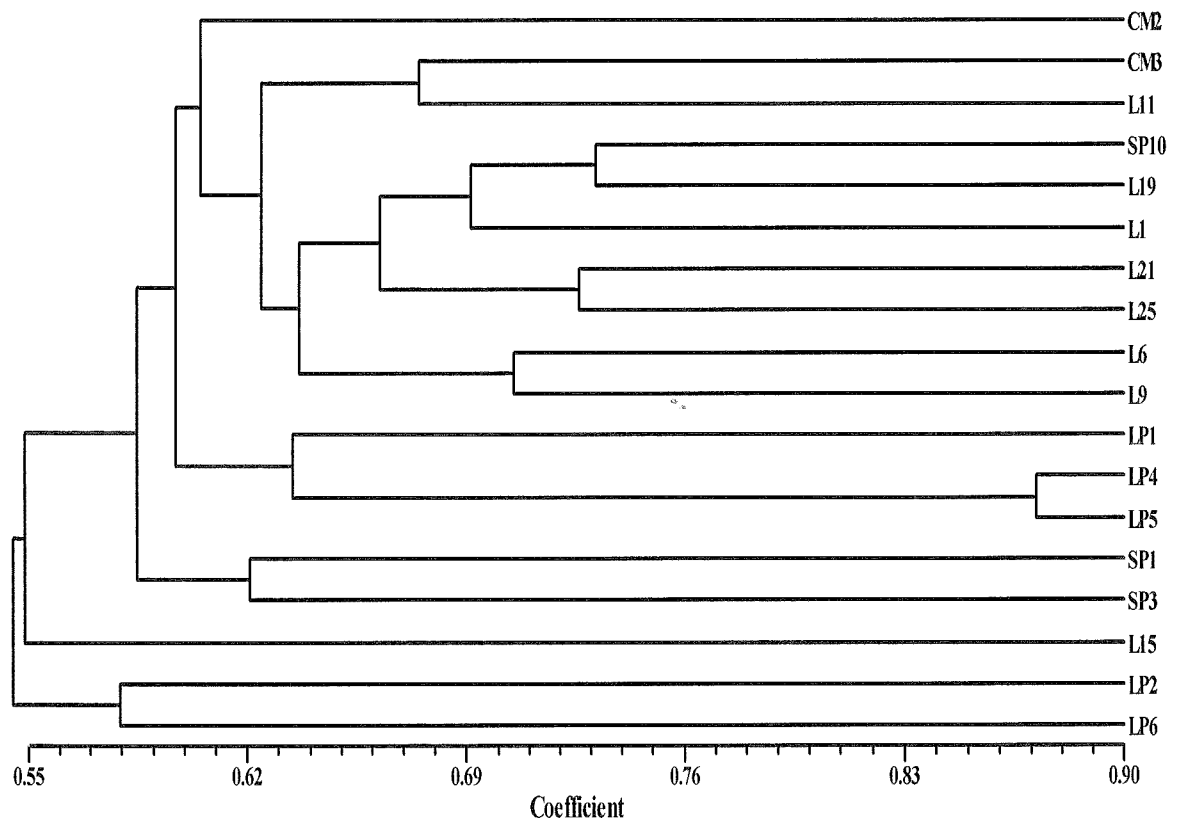
ภาพที่ ๔๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอมะกอก ๑๘ ต้นพันธุ์จากไฟร์เมอร์ UBC-๘๖๔



ภาพที่ ๔๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอมะกอก ๑๘ ต้นพันธุ์จากไฟร์เมอร์ UBC-๘๘๐

ตารางที่ ๑๙ เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมและจำนวนแถบตีเอ็นเอของมะกอกเมื่อวิเคราะห์ด้วย
ไพร์เมอร์ชนิดต่างๆ

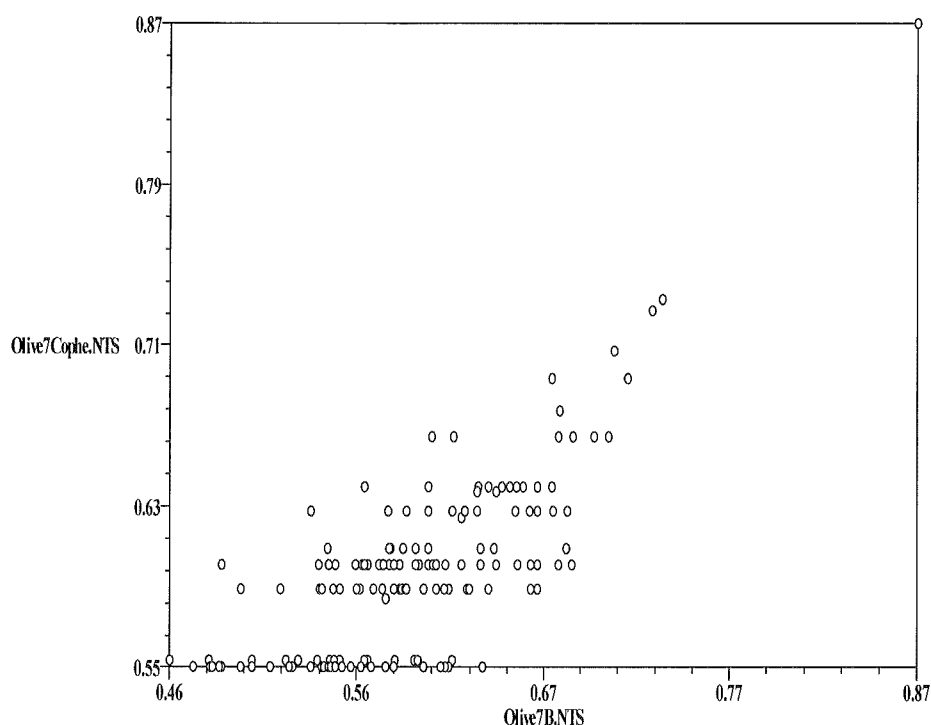
ชนิดของ ไพร์เมอร์	จำนวนแถบรวม (Total band)	จำนวนแถบต่าง (Polymorphic band)	จำนวนแถบเหมือน (Monomorphic band)	% โพลิมอร์ฟิซึม (% Polymorphism)
๘๐๓	๒๓	๑๙	๔	๘๒.๖๑
๘๐๘	๑๕	๑๒	๒	๘๕.๓/๑
๘๐๙	๑๖	๑๒	๔	๗๕.๐๐
๘๑๒	๑๓	๑๕	๒	๘๘.๒๓
๘๓๕	๑๘	๑๖	๒	๘๘.๘๘
๘๖๕	๑๙	๑๕	๔	๗๘.๙๕
๘๘๐	๒๓	๒๑	๒	๙๑.๓๐
รวม	๑๓๐	๑๑๐	๒๐	๘๔.๖๒



ภาพที่ ๔๕ Dendrogram ของมะกอก ๑๘ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๓ ชนิด

จากภาพที่ ๓๘-๔๔ และตารางที่ ๑๙ การใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆจำนวน ๗ ชนิดได้แก่ UBC-๘๐๓/ UBC-๘๐๘ UBC-๘๐๙ UBC-๘๑๒ UBC-๘๓๔ UBC-๘๖๔ และ UBC-๘๘๐ เมื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอมะกอกจำนวน ๑๘ ต้นพันธุ์พบว่า มีแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด ๑๓๐ แถบ เป็นแถบที่เหมือนกันจำนวน ๒๐ แถบและแถบที่ต่างกันจำนวน ๑๑๐ แถบ เมื่อคิดเป็น เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (% polymorphism) เท่ากับ ๘๔.๖๒ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์สามารถบ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะกอกได้ จากเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมของแถบดีเอ็นเอมะกอกที่มีค่าสูงสามารถบอกได้ว่ามะกอกแต่ละต้นพันธุ์มีแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่อันต่าง และมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม เมื่อนำทุกไพรเมอร์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมร่วมกันในรูปแบบ Dendrogram ค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้สามารถแสดงการจัดกลุ่มและจำแนกประชากรมะกอกจากแหล่งต่างๆได้ โดยมะกอกบางต้นพันธุ์หรือบางแหล่งที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากจะไม่สามารถแยกออกจากกัน ขณะที่มะกอกต้นพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันจะแยกออกจากกันให้เห็นชัดเจน

สำหรับ Dendrogram ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะกอกจำนวน ๑๘ ต้นพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ ๘ ชนิดร่วมกันพบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง ๐.๕๕-๐.๘๓ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า มะกอกจำนวน ๑๘ ต้นพันธุ์สามารถจัดกลุ่มและจำแนกออกจากกันได้ที่ค่าสัมประสิทธิ์ที่ ๐.๘๓ โดยมะกอกแต่ละต้นพันธุ์ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์กันอย่างเด่นชัดกับพื้นที่เก็บหรือแหล่งเก็บและลักษณะรูปทรงของผล รวมทั้งขนาดของผล ยกเว้น มะกอกต้นพันธุ์ LP๔ และ LP๕ ที่แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาจมีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมในเชิงเครือญาติหรือมีการพัฒนามาจากสายต้นเดียวกัน เพราะนอกจากต้นพันธุ์ทั้งสองมาจากแหล่งเก็บเดียวกันคือ หน่วยจัดการป่าแม่ยาวที่ห้างฉัตร จ. ลำปางแล้วยังมีรูปทรงของผลเป็นรูปไข่และมีผลขนาดกลางเหมือนกัน ส่วนมะกอกต้นพันธุ์อื่นมีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัด ดังแสดงตามภาพที่ ๔๕

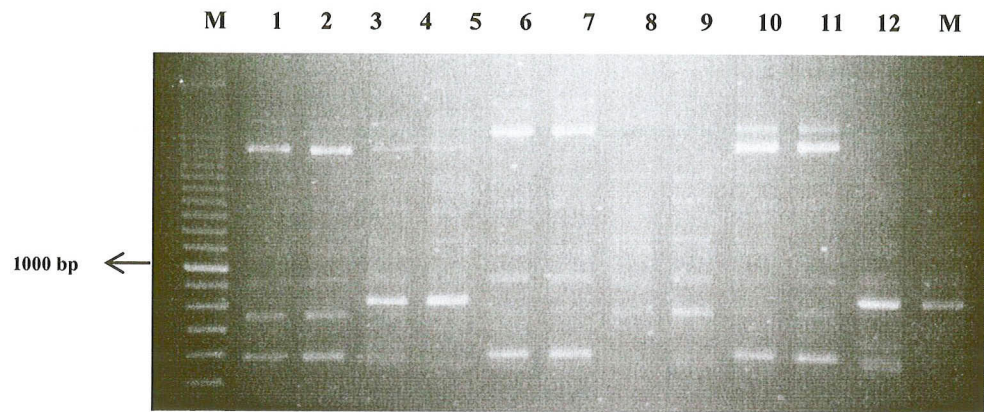


ภาพที่ ๔๖ Cophenetic Correlation ของมะกอก ๑๘ ต้นพันธุ์จากไฟร์เมอร์ ๓ ชนิด

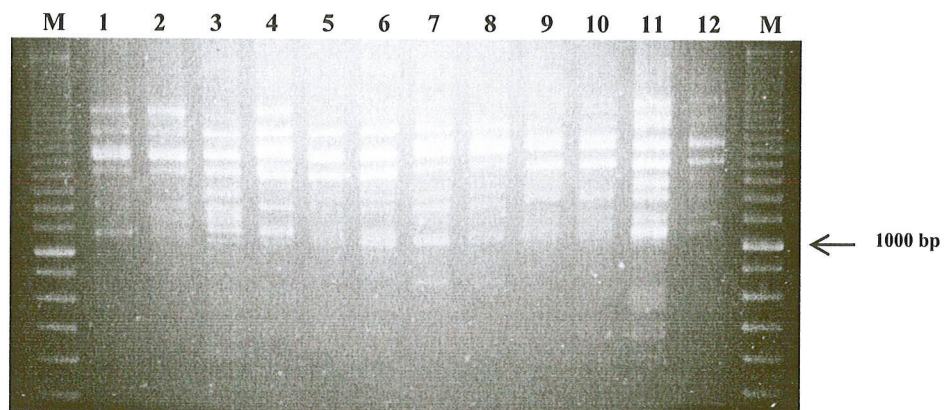
จากภาพที่ ๔๖ เป็นค่าสหสัมพันธ์ (Cophenetic Correlation (r)) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการกระจายข้อมูลแถบดีเอ็นเอของมะกอกจำนวน ๑๘ ต้นพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไฟร์เมอร์ ๓ ชนิด ซึ่งมีค่า Cophenetic Correlation (r) เท่ากับ ๐.๓๖๖๐๙ โดย Cophenetic Correlation (r) ที่มีค่าค่อนข้างสูงบ่งบอกถึงการกระจายของข้อมูลดีเอ็นเอที่ดีและมีความน่าเชื่อถือสูง

๒. พ้อคำติเมีย

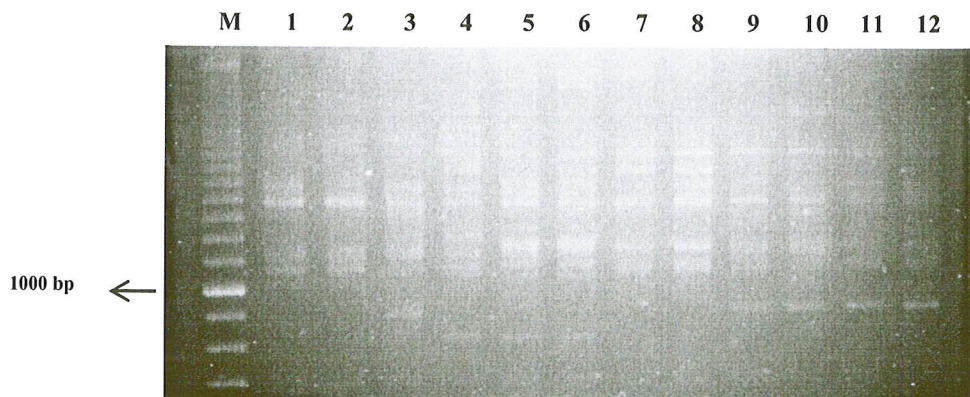
นำดีเอ็นเอของพ้อคำติเมียจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไฟร์เมอร์ UBC จำนวน ๑๒ ชนิดที่คัดเลือกจากไฟร์เมอร์จำนวน ๙๐ ชนิด ซึ่งไฟร์เมอร์แต่ละชนิดแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกนี้สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มพ้อคำติเมียแต่ละต้นพันธุ์จากแต่ละแหล่ง ว่ามีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของพ้อคำติเมียที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN



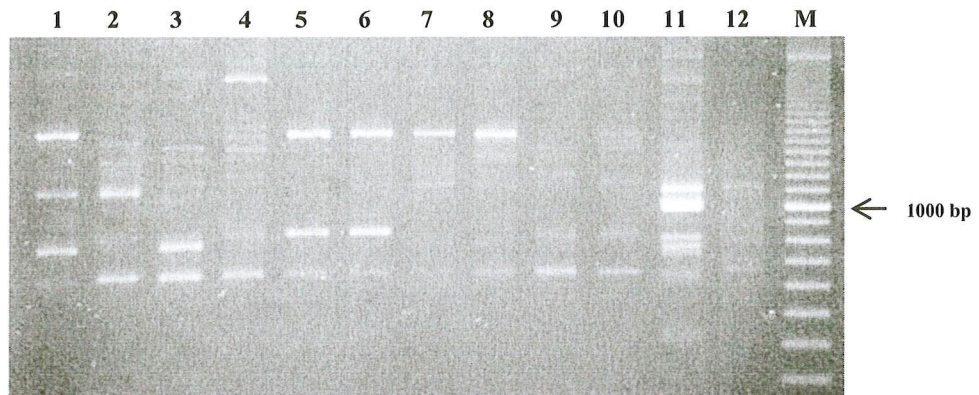
ภาพที่ ๔๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอพอลิเมอร์ ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๐๓



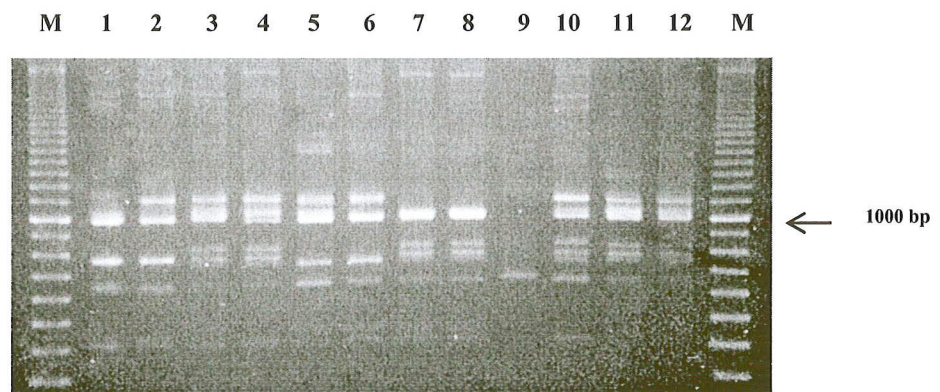
ภาพที่ ๔๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอพอลิเมอร์ ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๐๔



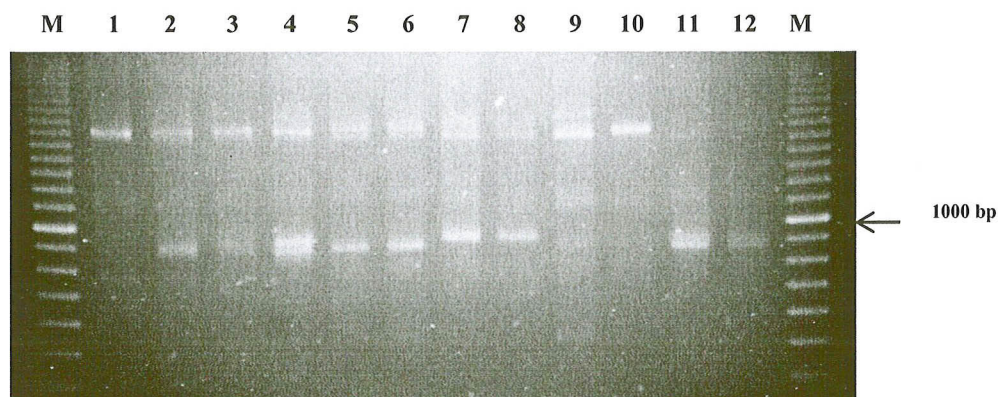
ภาพที่ ๔๕ รูปแบบแถบดีเอ็นเอพอลิเมอร์ ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๐๕



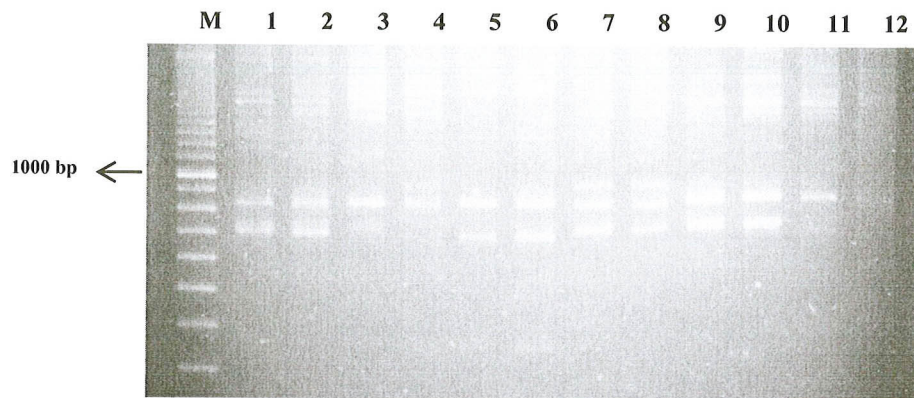
ภาพที่ ๕๐ รูปแบบแถบดีเอ็นเอพอลิเมอร์ ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๑๐



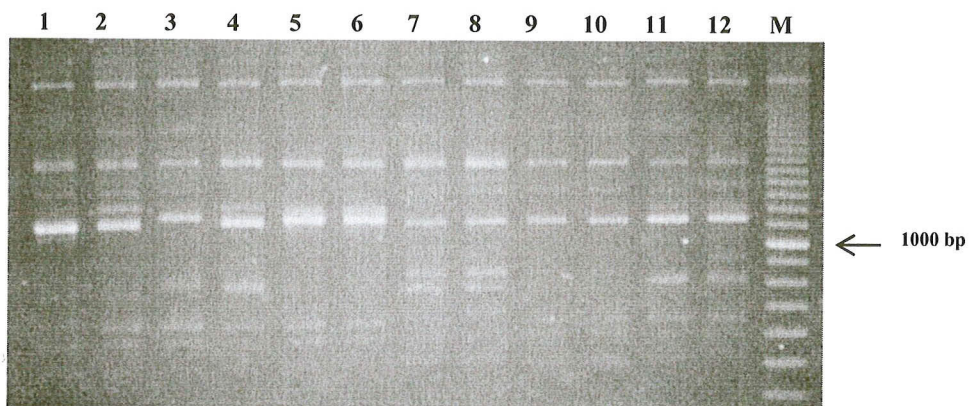
ภาพที่ ๕๑ รูปแบบแถบดีเอ็นเอพอลิเมอร์ ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๑๑



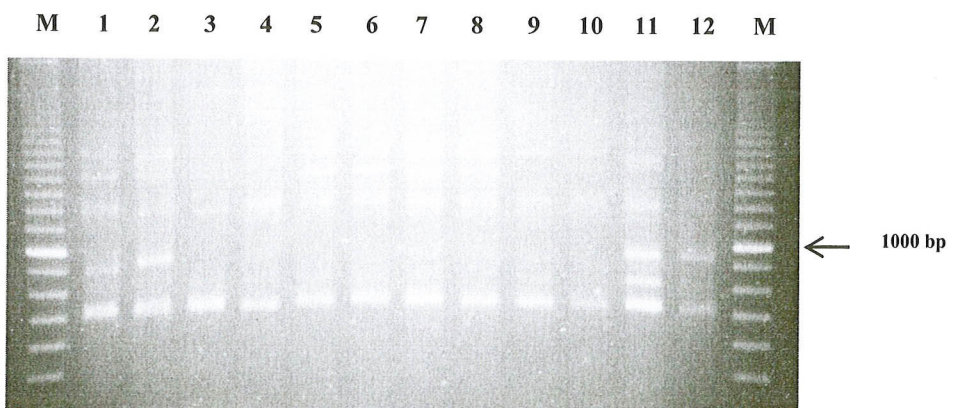
ภาพที่ ๕๒ รูปแบบแถบดีเอ็นเอพอลิเมอร์ ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๑๓



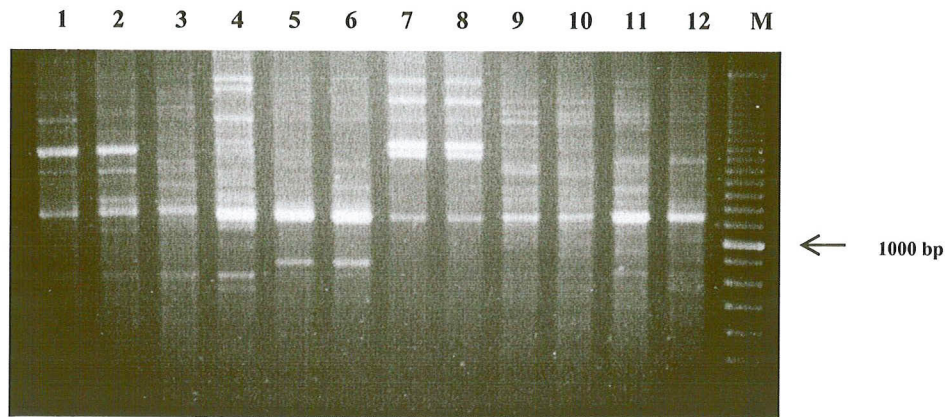
ภาพที่ ๕๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอฟอคำตี้เมีย ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๒๕



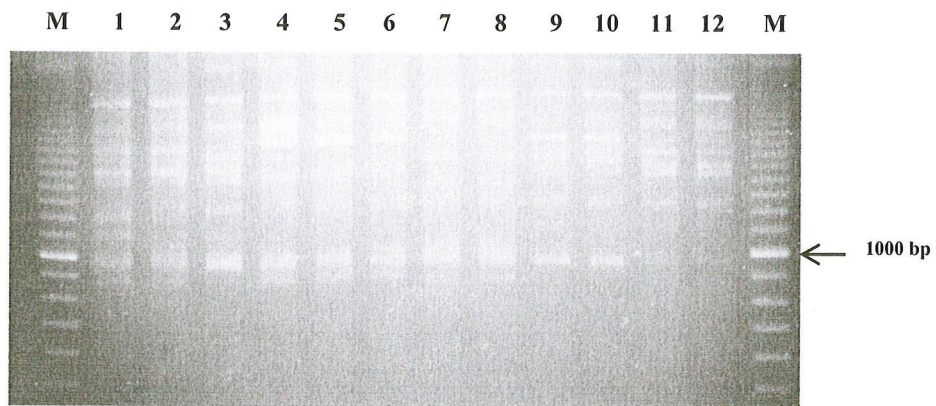
ภาพที่ ๕๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอฟอคำตี้เมีย ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๓๔



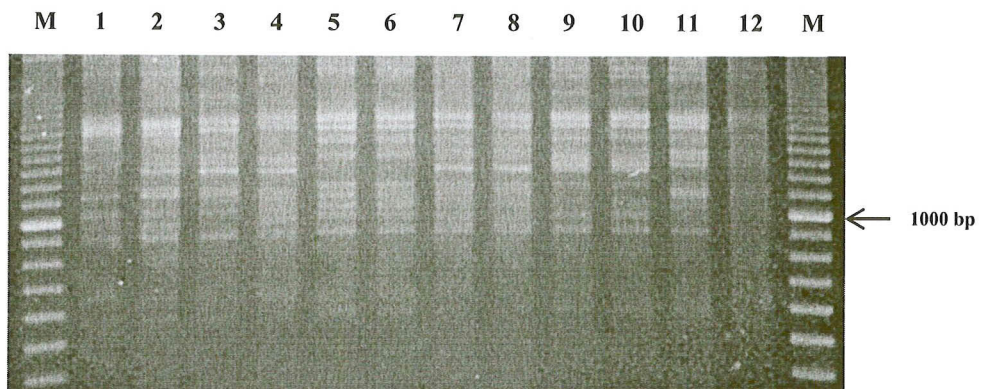
ภาพที่ ๕๕ รูปแบบแถบดีเอ็นเอฟอคำตี้เมีย ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๔๔



ภาพที่ ๕๖ รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๖๔



ภาพที่ ๕๗ รูปแบบแถบดีเอ็นเอพ่อค้าตีเมีย ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๖๖

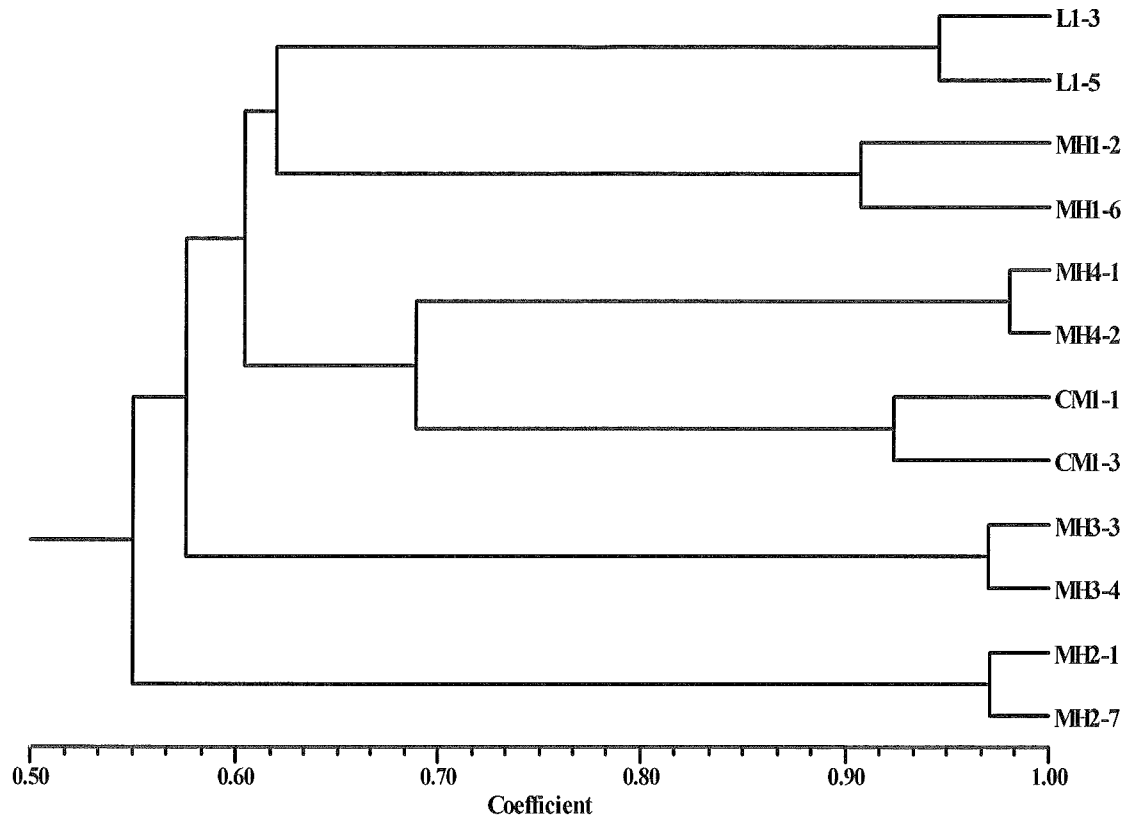


ภาพที่ ๕๘ รูปแบบแถบดีเอ็นเอพ่อค้าตีเมีย ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ UBC-๘๙๐

ตารางที่ ๒๐ เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของพ่อค้าตีเมียเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆ

ชนิดของ ไพรเมอร์	จำนวนแถบรวม (Total band)	จำนวนแถบต่าง (Polymorphic band)	จำนวนแถบเหมือน (Monomorphic band)	% โพลิมอร์ฟิซึม (% Polymorphism)
๔๐๓/	๒๑	๑๖	๕	๗๖.๑๙
๔๐๔	๑๖	๑๒	๔	๗๕.๐๐
๔๐๙	๒๒	๑๓	๕	๗๗.๒๗
๔๑๐	๒๒	๒๑	๑	๙๕.๔๕
๔๑๑	๒๑	๑๓	๔	๘๐.๙๕
๔๑๓/	๑๕	๑๑	๔	๗๓.๓๓
๔๒๕	๒๐	๑๘	๒	๙๐.๐๐
๔๓๔	๒๓	๑๖	๓	๖๙.๕๖
๔๔๘	๒๑	๑๔	๓	๖๖.๖๖
๔๖๔	๒๕	๑๙	๖	๗๖.๐๐
๔๖๖	๒๒	๑๓	๙	๕๙.๐๙
๔๙๐	๒๓	๑๒	๑๑	๕๒.๑๗
รวม	๒๕๑	๑๑๐	๒๐	๗๔.๑๐

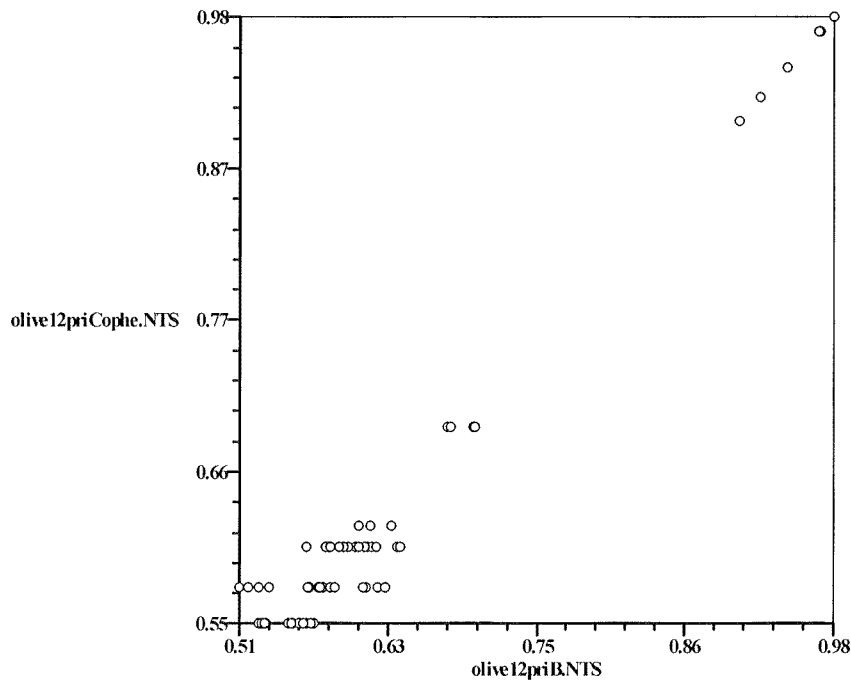
จากภาพที่ ๔๓-๕๘ และ ตารางที่ ๒๐ การใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆจำนวน ๑๒ ชนิด ได้แก่ UBC-๔๐๓ UBC-๔๐๔ UBC-๔๐๙ UBC-๔๑๐ UBC-๔๑๑ UBC-๔๑๓ UBC-๔๒๕ UBC-๔๓๔ UBC-๔๔๘ UBC-๔๖๔ UBC-๔๖๖ และ UBC-๔๙๐ เมื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอพ่อค้าตีเมียจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์พบว่า มีแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด ๒๕๑ แถบ เป็นแถบที่เหมือนกันจำนวน ๖๕ แถบและแถบที่ต่างกันจำนวน ๑๘๖ แถบ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (% polymorphism) เท่ากับ ๗๔.๑๐ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์สามารถบ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของพ่อค้าตีเมียได้ เมื่อนำทุกไพรเมอร์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมร่วมกัน ค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จะสามารถจัดกลุ่มและจำแนกประชากรพ่อค้าตีเมียด้านพันธุ์ต่างๆจากแต่ละแหล่งได้ โดยพ่อค้าตีเมียบางต้นพันธุ์หรือบางแหล่งที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมากจะไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ขณะที่พ่อค้าตีเมียบางต้นพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมจะแยกกันให้เห็นอย่างเด่นชัด



ภาพที่ ๕๙ Dendrogram ของพ่อดำตีเมีย ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ ๑๒ ชนิด

สำหรับภาพที่ ๕๙ Dendrogram ของพ่อดำตีเมียที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพ่อดำตีเมียจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ ๔ ชนิดร่วมกัน จากภาพแสดงถึงพ่อดำตีเมียแต่ต้นละพันธุ์ที่แยกกันอย่างชัดเจนตามแหล่งเก็บ และสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง ๐.๕๕-๐.๙๔ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์แสดงค่าสัมประสิทธิ์ที่สูง ทำให้สามารถอธิบายได้ว่าพ่อดำตีเมียจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมไม่มากนัก โดยต้นพันธุ์ที่มาจากแหล่งเดียวกันสามารถจัดกลุ่มกันได้ชัดเจนตามแหล่งเก็บได้แก่ กลุ่มที่ ๑ ต้นพันธุ์พ่อดำตีเมียดันที่ ๓ และต้นที่ ๕ จากป่าชุมชนทาป่าเปา (L๑) กลุ่มที่ ๒ ต้นพันธุ์พ่อดำตีเมียดันที่ ๒ และต้นที่ ๖ จากห้วยแม่ปิง (MH๑) กลุ่มที่ ๓ ต้นพันธุ์พ่อดำตีเมียดันที่ ๑ และต้นที่ ๒ จากแม่สะเรียง (MH๔) กลุ่มที่ ๔ ต้นพันธุ์พ่อดำตีเมียดันที่ ๑ และต้นที่ ๓ จากโป่งกุ่ม (CM๑) กลุ่มที่ ๕ ต้นพันธุ์พ่อดำตีเมียดันที่ ๓ และต้นที่ ๔ จากแม่ลาน้อย (MH๓) และกลุ่มที่ ๖ ต้นพันธุ์ต้นที่ ๑ และต้นที่ ๗ จากห้วยแม่จ๋า ขุนยวม (MH๒) ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าพ่อดำตีเมียแต่ละต้นพันธุ์ที่เก็บมาจากแหล่ง

เดียวกันมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูงมากแสดงถึงต้นพันธุ์ที่เก็บมามีความสัมพันธ์กันทางเครือญาติหรือพัฒนาการมาจากสายต้นเดียวกัน



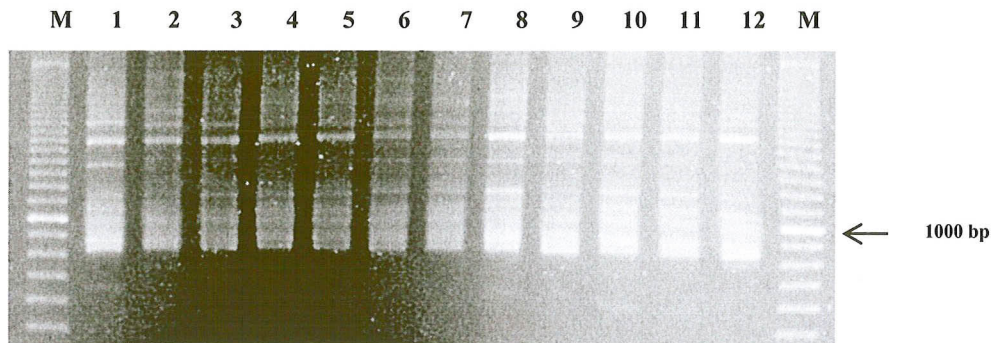
ภาพที่ ๖๐ Cophenetic Correlation ของพ่อค้าตีเมีย ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร่เมอ
๑๒ ชนิด

จากภาพที่ ๖๐ เป็นค่าสหสัมพันธ์ (Cophenetic Correlation (r)) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการกระจายข้อมูลแถบดีเอ็นเอของพ่อค้าตีเมียจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพร่เมอ ๑๒ ชนิด ซึ่งมีค่า Cophenetic Correlation (r) เท่ากับ ๐.๙๘๑๙๗ แสดงถึงการกระจายข้อมูลดีเอ็นเอของพ่อค้าตีเมียดีมากและมีความน่าเชื่อถือสูง

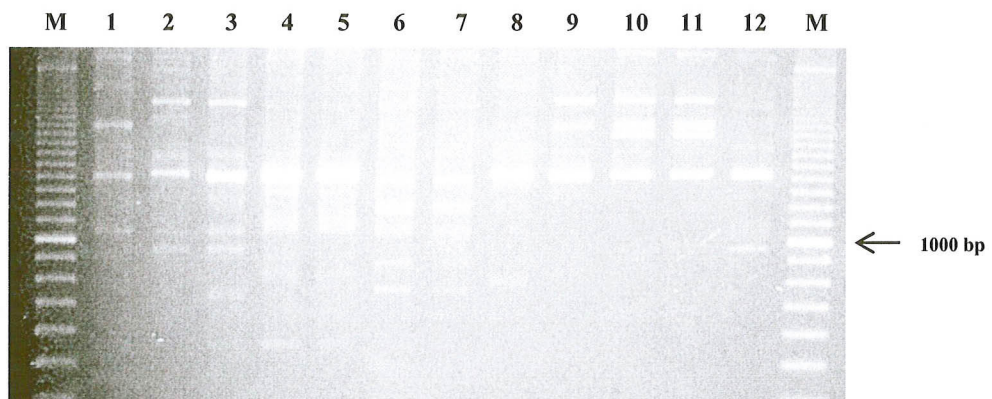
๓. ผักกูด

นำดีเอ็นเอของผักกูดจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์มาวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพร่เมอ UBC จำนวน ๓ ชนิดที่คัดเลือกจากไพร่เมอจำนวน ๙๐ ชนิด ซึ่งไพร่เมอแต่ละชนิดแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกนี้สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มผักกูดแต่ละต้นพันธุ์จากแต่ละแหล่งว่ามีความคล้ายคลึงกัน หรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้าย

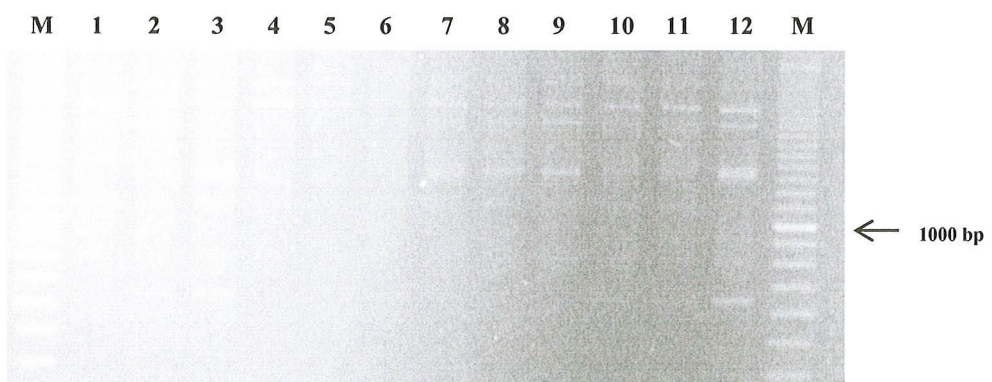
คลัสติ้งทางพันธุกรรมของผักกูดที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN



ภาพที่ ๖๑ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักกูด ๑๒ ต้นพันธุ์จากไฟร์เมอร์ UBC-๘๖๔



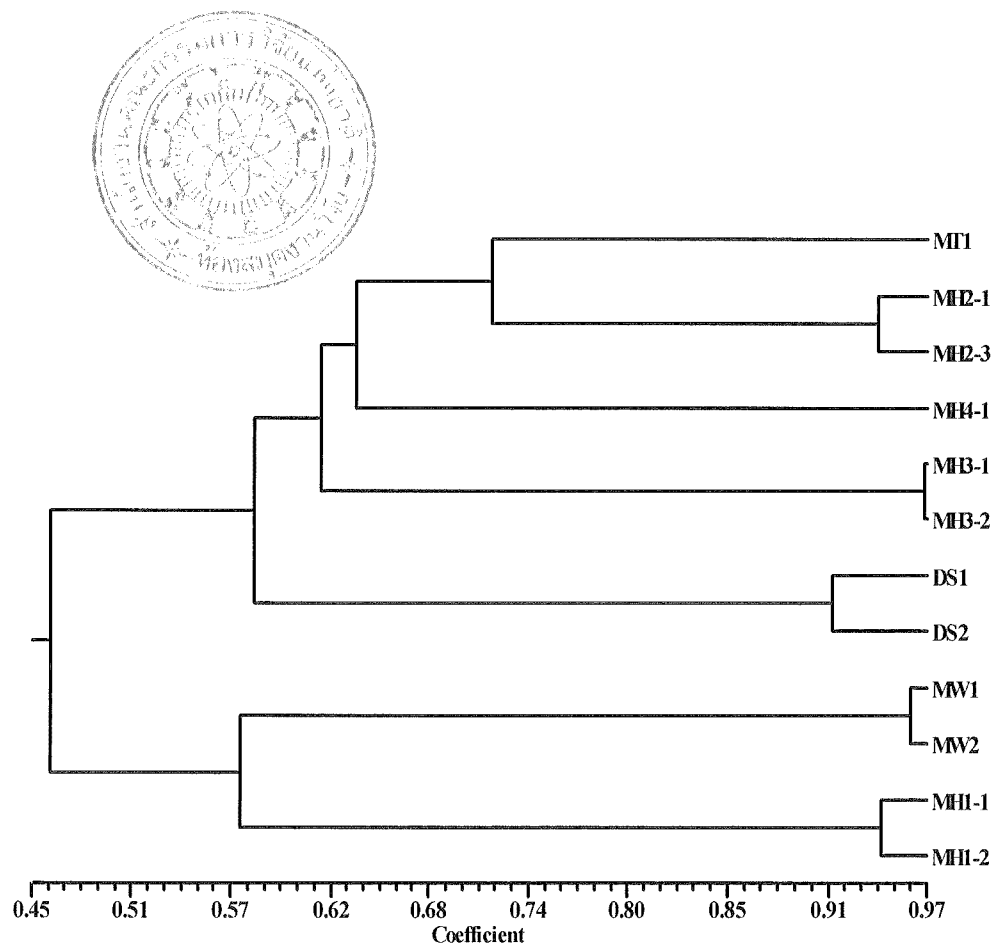
ภาพที่ ๖๒ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักกูด ๑๒ ต้นพันธุ์จากไฟร์เมอร์ UBC-๘๓/๓



ภาพที่ ๖๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักกูด ๑๒ ต้นพันธุ์จากไฟร์เมอร์ UBC-๘๘๐

ตารางที่ ๒๑ เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของผักกูดเมื่อวิเคราะห์ด้วย
ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ

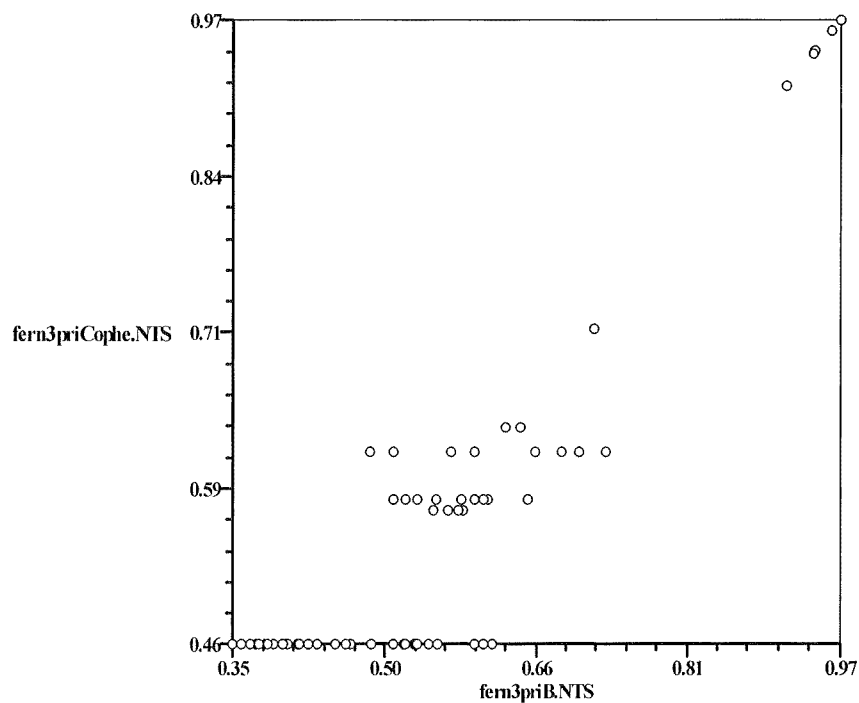
ชนิดของ ไพรเมอร์	จำนวนแถบรวม (Total band)	จำนวนแถบต่าง (Polymorphic band)	จำนวนแถบเหมือน (Monomorphic band)	% โพลิมอร์ฟิซึม (% Polymorphism)
๘๖๕	๑๙	๑๒	๗	๖๓.๑๕
๘๓/๓	๒๕	๒๓	๒	๙๒.๐๐
๘๘๐	๑๕	๑๑	๔	๗๓.๓๓
รวม	๕๙	๔๖	๑๓	๗๗.๙๖



ภาพที่ ๖๔ Dendrogram ของผักกูด ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพรเมอร์ ๓ ชนิด

จากภาพที่ ๖๑-๖๓ และตารางที่ ๒๑ การใช้ไฟร์เมอร์ชนิดต่างๆจำนวน ๓ ชนิดได้แก่ UBC-๘๖๔ UBC-๘๗๓ และ UBC-๘๘๐ เมื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอฝักกุ๊ดจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์พบว่า มีแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด ๕๙ แถบ เป็นแถบที่เหมือนกันจำนวน ๑๓ แถบและแถบที่ต่างกันจำนวน ๔๖ แถบ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (% polymorphism) เท่ากับ ๗๗.๙๖ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไฟร์เมอร์สามารถบ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝักกุ๊ดได้ เมื่อนำทุกไฟร์เมอร์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมร่วมกัน ค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้สามารถจัดกลุ่มและจำแนกประชากรฝักกุ๊ดต้นพันธุ์ต่างๆจากแต่ละแหล่งได้ โดยต้นพันธุ์ฝักกุ๊ดบางแหล่งที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมากไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ขณะที่ต้นพันธุ์ฝักกุ๊ดที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมจะแยกกันได้ชัดเจน

สำหรับภาพที่ ๖๔ Dendrogram ของฝักกุ๊ดที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของฝักกุ๊ดจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์โดยใช้ไฟร์เมอร์ ๓ ชนิดร่วมกันพบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง ๐.๔๖-๐.๙๗ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ฝักกุ๊ดจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์จาก ๗ แหล่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมไม่มากนัก โดยทั้ง ๑๒ ต้นพันธุ์สามารถจำแนกออกจากกันเป็น ๓ กลุ่มได้ชัดเจนตามแหล่งเก็บได้แก่ ต้นพันธุ์ฝักกุ๊ดจากปางสันแม่แดง (MT) ต้นพันธุ์ฝักกุ๊ดจากถ้ำปลาแม่ฮ่องสอน (MH๒) ต้นพันธุ์ฝักกุ๊ดจากเมืองปอนแม่ฮ่องสอน (MH๔) ต้นพันธุ์ฝักกุ๊ดจากขุนยวมแม่ฮ่องสอน (MH๓) ต้นพันธุ์ฝักกุ๊ดจากป่าเมี่ยงดอยสะเก็ด (DS) ต้นพันธุ์ฝักกุ๊ดจากห้วยตองแม่วาง (MW) และต้นพันธุ์ฝักกุ๊ดจากห้วยน้ำกุดแม่ฮ่องสอน (MH๑) แม้ว่าสามารถจำแนกแหล่งเก็บออกจากกันได้ แต่ต้นพันธุ์ที่อยู่ในแหล่งเดียวกันกลับมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูงมาก แสดงถึงต้นพันธุ์ที่เก็บมามีความสัมพันธ์กันทางเครือญาติหรือพัฒนาการมาจากสายต้นเดียวกัน โดยเฉพาะต้นพันธุ์ที่ ๑ และต้นพันธุ์ที่ ๒ จากขุนยวมแม่ฮ่องสอน (MH๓) ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้จึงเป็นไปได้ว่าทั้งสองต้นพันธุ์มาจากสายต้นเดียวกัน



ภาพที่ ๖๕ Cophenetic Correlation ของผักกูด ๑๒ ต้นพันธุ์จากไฟร์เมอร์ ๓ ชนิด

จากภาพที่ ๖๕ เป็นค่าสหสัมพันธ์ (Cophenetic Correlation (r)) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการกระจายข้อมูลแถบดีเอ็นเอของผักกูดจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไฟร์เมอร์ ๓ ชนิด ซึ่งมีค่า Cophenetic Correlation (r) เท่ากับ ๐.๘๙๕๔๔ แสดงว่ามีกระจายของข้อมูลดีเอ็นเอผักกูดที่ดีมากและมีความน่าเชื่อถือสูง

๕.การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งและความสามารถในการชักนำให้เกิด apoptosis

๕.๑ เซลล์มะเร็ง, การเลี้ยงและการดูแลรักษา

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบคือเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colon adenocarcinoma, HT-๒๙, ATCC; HT-๓๘) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (Promyelocytic Leukemia, HL-๖๐, ATCC; CCL-๒๔๐) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งชนิดเกาะ (adherent cells) และลอย (floating cells) ตามลำดับ วิธีการเลี้ยงและการดูแลรักษาซึ่งต้องอาศัยเทคนิคปราศจากเชื้อตลอดการทดลองประกอบด้วย

กรณีของ HT-๒๙ ซึ่งเป็นเซลล์เกาะ นำเซลล์ที่เก็บไว้เป็น stock ใน liquid nitrogen tank มาละลายและเลี้ยงใน ๗.๕ cm^๒ cell culture flask ใน complete DMEM/McCoy's ๕A (๑:๑), ๑๐% FCS ปริมาตร ๑.๕ ml โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวที่ ๓๗ °C ใน ๕% CO₂ incubator จนกว่าพบการเจริญเติบโตประมาณ ๗๐-๘๐% ของพื้นที่ flask หรือประมาณ ๒-๓ วัน จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในกรณีที่ต้องการเลี้ยงเซลล์เหล่านั้นไว้โดยยังไม่นำไปทดลองต้องทำ trypsinization แล้วฉีดชะล้างส่วนของเซลล์โดยใช้ pasteur pipette หากต้องการเก็บเซลล์เหล่านี้ไว้เป็น stock ต้องดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ปนอยู่ออกมาปั่นให้ได้ตะกอนของเซลล์มะเร็ง ในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ ๔๐๐๐ rpm, ๕ min อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนของเซลล์ที่ได้ด้วย cryopreservation medium ถ่ายลงหลอด cryo tube ขนาด ๑.๕ ml เพื่อเก็บไว้ใน liquid nitrogen tank ในระยะเวลานาน เซลล์ดังกล่าวถูกนำมาตรวจสอบความสมบูรณ์พร้อมในการเจริญเติบโตและการปนเปื้อนทุกๆครึ่งปี ด้วยการนำออกมาเพาะเลี้ยง กรณีของ HL-๖๐ ซึ่งเป็นเซลล์ลอย ทำเช่นเดียวกับกรณีของ HT-๒๙ แต่ไม่ต้องทำ trypsinization และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ HL-๖๐ คือ IMDM, ๑๐%FCS ในระหว่างวงรอบของการทำการทดสอบ เซลล์ที่ถูกเลี้ยงใน ๕% CO₂ incubator ถูกเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำเซลล์ไปใช้ในการทดสอบไม่เกิน ๓ สัปดาห์ (หลังจาก ๓ สัปดาห์ จะนำเซลล์ซึ่งเก็บไว้เป็น stock ตั้งต้นมาเพาะเลี้ยงใหม่แทนเซลล์มะเร็ง passage ต้นๆถูกเก็บกลับไปเป็น stock ใน liquid nitrogen tank ทุกครั้งที่เอาเซลล์ต้นทางออกมาใช้ โดย cell pellet ที่รวบรวมได้จาก flask เพาะเลี้ยงถูกนำไปละลายกลับใน cryopreservation medium [๙๐% (v/v) faetal calf serum และ ๑๐% (v/v) DMSO] จากนั้นนำไปทำให้เย็นด้วยอัตราประมาณ ๑ °C / ๑ นาที ในตู้เย็น -๘ °C ข้ามคืน จึงค่อยนำมาเก็บใน liquid nitrogen tank อีกครั้งหนึ่ง

ในกรณีที่ต้องการนำเซลล์ไปทำการทดสอบต่อ นำ cell suspension ที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ ๕,๐๐๐ rpm, ๔ °C, ๕ min ส่วนของ pellet ที่ได้ถูกนำไปละลายกลับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมตามปริมาตรที่ต้องการอีกครั้ง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมสี ๐.๒๕% trypan blue บน haematocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และคำนวณกลับเพื่อหาปริมาณของเซลล์ทดสอบ (จำนวนเซลล์/ml) จากนั้นนำเซลล์ลงเลี้ยงในแต่ละหลุมของ ๙๖ wells cell culture plate ที่ ๑๐,๐๐๐ เซลล์/หลุม (สำหรับการทำ SRB assay) หรือของ ๒๔ wells cell culture plate ที่ ๕๐,๐๐๐ เซลล์/หลุม (สำหรับ apoptosis induction assay) และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจนได้ปริมาตรที่ต้องการ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่ ๓๗ °C, ๕% CO₂ incubator ข้ามคืน

๕.๒ สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

ชนิดของผักพื้นบ้านและสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ มะกอก พอดีดีเมีย และผักกูด ใช้ส่วนของใบและยอดนำมาทำสารสกัดหยาบจากน้ำคั้น

สารสกัดส่วนที่เป็นผงแห้งจากน้ำคั้น เตรียมโดยนำส่วนของใบและยอดอ่อนมาเด็ดและล้างทำความสะอาด จากนั้นปั่นจนละเอียดโดยใช้เครื่องบดไฟฟ้า โดยอาจมีการเติมน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยเพื่อช่วยในการปั่น จากนั้นกรองเอาแต่ส่วนที่เป็นน้ำด้วยผ้าขาวบาง ๑ ครั้ง นำสารละลายที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ ๔๐๐๐ rpm, ๑๐ °C แยกส่วนที่เป็นน้ำออกมารองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ ๑ จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย evaporator สารที่ได้ในขั้นตอนนี้มีลักษณะข้นเหนียว ถูกเก็บไว้ที่ ๔ °C ตลอดการทดลอง เมื่อนำมาใช้ทดสอบต้องละลายด้วยน้ำกลั่นเพื่อเตรียมเป็นความเข้มข้นตั้งต้นที่ ๕ mg/ml ก่อนนำไปกรองผ่าน cellulose acetate membrane ซึ่งมีขนาดของ pore size ๐.๒ micron เพื่อให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปทำ serial dilution ตามความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งใช้ในการทดสอบกับเซลล์มะเร็งต่อไป

๕.๓ การทดสอบสารสกัดและการออกแบบการทดลอง

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยอาศัย MTT assay และการทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์เกิด apoptosis ประกอบด้วย ๒ ส่วนหลัก คือ การทดสอบเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัด และการติดตามปัจจัยจำเพาะบางประการซึ่งแตกต่างกันในรายละเอียดของแต่ละการทดลอง

ในส่วนของการทดสอบเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัด โดยนำเซลล์มะเร็งที่เตรียมได้ใน cell culture plate เรียบร้อยแล้วมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้งหนึ่ง โดยเติม complete media ที่เหมาะสมตามปริมาตรที่ต้องการ จากนั้นนำไปบ่มที่ ๓๗ °C ใน ๕% CO₂ incubator ประมาณ ๑-๓ ชั่วโมงก่อนจะทำการทดสอบด้วยสารสกัดต่างๆต่อไป

ความเข้มข้นของสารสกัดที่จะทำการทดสอบจะอยู่ในช่วง ๐.๐๐๒ – ๐.๒ mg/ml ในการทดลอง MTT assay เซลล์มะเร็งใน ๑ plate ถูกแบ่งออกเป็น ๔ กลุ่มตามแนวตั้ง (กลุ่มละ ๓ หลุม) ต่อ ๑ ความเข้มข้นของสารทดสอบ และทำการทดสอบที่ ๔ ความเข้มข้นใน plate เดียวกันต่อสารสกัด ๑ ชนิด (๑ แถวทดสอบสารสกัดได้ ๑ ชนิดและนับเป็น ๑ ซ้ำหรือชุดของการทดลอง) โดยมี negative control ซึ่งคือเซลล์มะเร็งที่ไม่ถูกทดสอบด้วยสารใดๆ อย่างน้อย ๖ หลุมต่อ ๑ ชุดการทดลองและ positive control ของการทดลองใช้ Irinotecan การทดลองทำอย่างน้อย ๒ ซ้ำหรือชุดใน ๒ วันที่ต่างกัน

ในการทดสอบความสามารถในการชักนำให้เกิด apoptosis ซึ่งประกอบด้วยการทดลองย่อยอีก ๓ การทดลองนั้น ในทุกการทดลองเริ่มจากเซลล์มะเร็งที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นและช่วงเวลาที่ใช้ในการทดสอบที่แตกต่างกันอย่างน้อย ๑ ความเข้มข้น ดังแสดงในแต่ละการทดลองต่อไป

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ๒ ชนิดที่ได้มาจาก American Type Culture Collection (ATCC), USA. คือ HTB-๓๘; Cololectal adenocarcinoma (HT-๒๙) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (Promyelocytic Leukemia, HL-๖๐, ATCC; CCL-๒๔๐) โดยใช้ MTT assay สารสกัดต่างๆจากพืชทดสอบ เตรียมเป็น working solution ที่ ๒๐, ๒, ๐.๒ และ ๐.๐๒ mg/ml (ทำ serial dilution ด้วย incomplete DMEM) ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบในแต่ละหลุมของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยง เติมน้ำไปคิดเป็น ๑๐% v/v ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดต่อหลุม ดังนั้นใน ๑ ชุดการทดลองสารสกัดแต่ละชนิดมีการทดสอบ ๓ ความเข้มข้นๆละ ๓ หลุม ที่ ๒, ๐.๒, ๐.๐๒ และ ๐.๐๐๒ mg/ml และมี negative control ของชุดซึ่งก็คือหลุมที่เซลล์ไม่ถูกทดสอบด้วยสารใดๆ อย่างน้อย ๑ แถว (๑๒ หลุม) positive control ของการทดสอบนี้คือ Irinotecan จากนั้นบ่มเพาะที่ ๓๗ °C, ๕%CO₂ incubator นาน ๑ วัน จากนั้นเติมน้ำละลายของ ๕ mg/ml MTT/TE buffer ปริมาตร ๕๐ ml ลงในแต่ละหลุม บ่มเพาะที่ ๓๗°C ๕%CO₂ incubator ประมาณ ๓-๔ ชั่วโมง นำมาดูดเอาส่วนของสารละลายในแต่ละหลุมออกทิ้ง จากนั้นละลายตะกอน formazan ที่ได้ด้วย DMSO เขย่าต่อเนื่องประมาณ ๑๐ นาทีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ๕๔๐ nm นำค่าที่บันทึกได้มาคำนวณค่า %cytotoxicity จาก %cytotoxicity = $[1 - (O.D._{๕๔๐} \text{ treat} / O.D._{๕๔๐} \text{ control})] \times 100$ เมื่อ

O.D. _{๕๔๐} treat = ค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๔๐ nm ของหลุมที่ใส่สารสกัด

O.D. _{๕๔๐} control = ค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๔๐ nm ของหลุม negative control

นำค่า % cytotoxicity ที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์กับแต่ละความเข้มข้นที่ทำการทดสอบลากตัดแกน X ของกราฟที่แสดงค่า cytotoxicity ที่ ๕๐% ว่าอยู่ที่ความเข้มข้นเท่าใด ค่าความเข้มข้นที่ได้คือค่า IC_{๕๐} (mg/ml) ซึ่งแสดงค่าความเข้มข้นที่จะทำให้เซลล์ทดสอบตายลงครึ่งหนึ่ง ใช้เป็นค่าเปรียบเทียบความแรงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในระหว่างสารทดสอบด้วยกัน

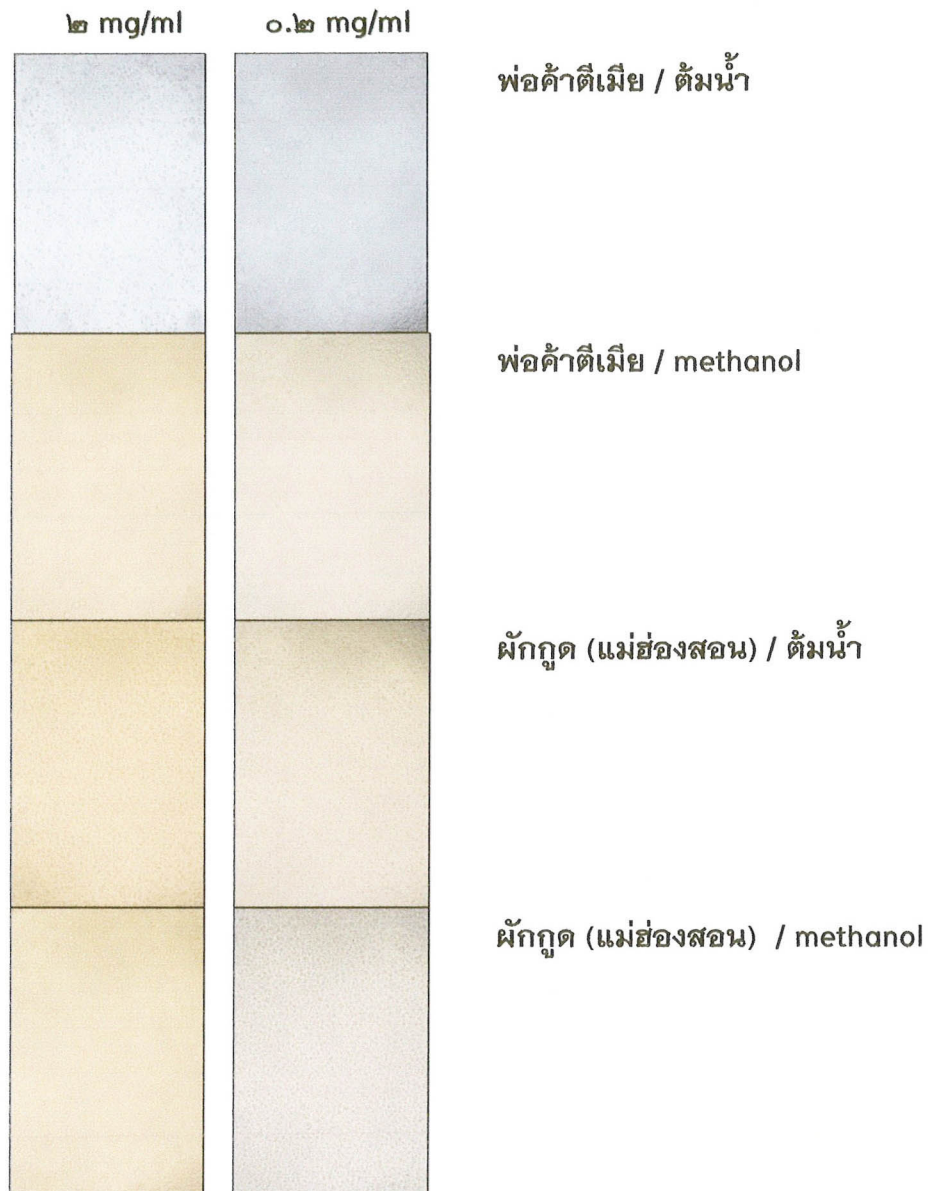
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ และ HL-๖๐ โดยสารสกัดต่างๆ แสดงดังตารางที่ ๒๒

ตารางที่ ๒๒ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ของสารทดสอบโดยอาศัย MTT assay

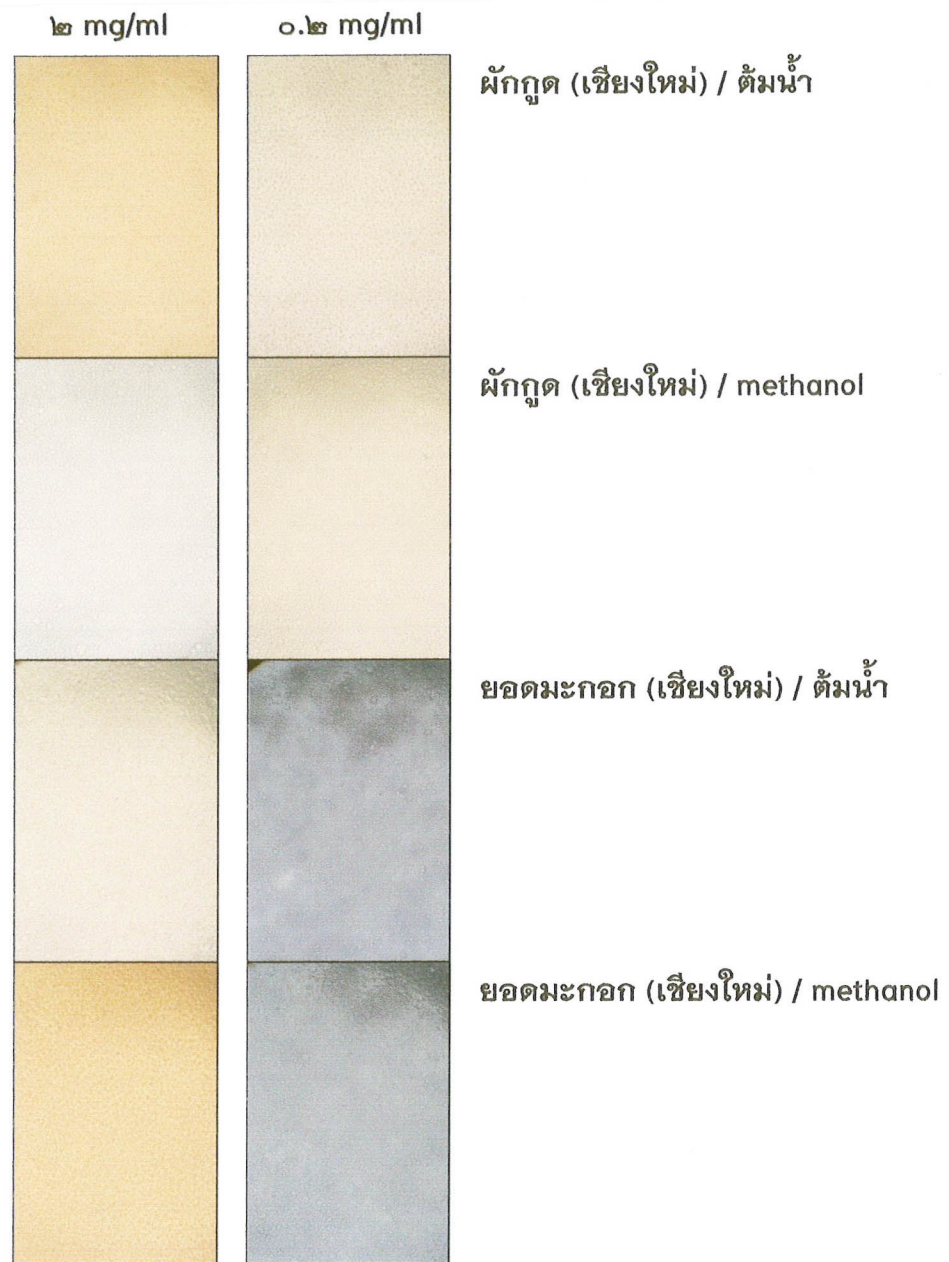
ผัก	วิธีการสกัด	IC _{๕๐} (mg/ml) HT-๒๙	IC _{๕๐} (mg/ml) HL-๖๐
พ่อดำตีเมีย (ลำพูน)	ต้มน้ำ	>๒	๑.๙๘
	สกัดด้วย methanol	>๒	๑.๓๒
ผักกูด (แม่ฮ่องสอน)	ต้มน้ำ	๑.๓๖	๑.๔๕
	สกัดด้วย methanol	๑.๖๙	๑.๔๔
ผักกูด (เชียงใหม่)	ต้มน้ำ	๑.๙๕	๑.๓๓
	สกัดด้วย methanol	๑.๙๒	๑.๓๙
มะกอก (เชียงใหม่)	ต้มน้ำ	>๒	๑.๘๘
	สกัดด้วย methanol	>๒	๑.๕๖
Irinothecan	-	>๒	>๒

๕.๔ การติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็งทดสอบ

โดยเซลล์มะเร็งถูกเพาะเลี้ยงใน ๒๔ wells cell culture cluster (Costar, USA.) ที่ ๕๐,๐๐๐ cells/well ตามเงื่อนไขและวิธีการเหมือนที่อ้างอิงในข้อ ๓.๓.๗ เซลล์พร้อมใช้ในการทดสอบเมื่อเจริญเติบโตถึง ๘๐% confluence โดยถูกทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสม และติดตามการเกิด morphological changes แบบ apoptotic body และ single large vesicle ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ ๖๖ แสดงการติดตาม morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HL-60 ในช่วงเวลา ๖ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ ที่ 2 และ 0.2 mg/ml (final concentration) และวิธีการสกัดสองวิธีที่ต่างกันคือการต้มน้ำและการสกัดด้วย methanol



ภาพที่ ๖๓/ แสดงการติดตาม morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ ในช่วงเวลา ๖ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ ที่ ๒ และ ๐.๒ mg/ml (final concentration) และวิธีการสกัดสองวิธีที่ต่างกันคือการต้มน้ำและการสกัดด้วย methanol



ภาพที่ ๖๘ แสดงการติดตาม morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HL-60 ในช่วงเวลา ๒๔ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ ที่ ๒ และ ๐.๒ mg/ml final concentration) และวิธีการสกัดสองวิธีที่ต่างกันคือการตัมน้ำและการสกัดด้วย methanol



ภาพที่ ๖๙ แสดงการติดตาม morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HL-60 ในช่วงเวลา ๒๔ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ ที่ ๒ และ ๐.๒ mg/ml final concentration) และวิธีการสกัดสองวิธีที่ต่างกันคือการต้มน้ำและการสกัดด้วย methanol



ภาพที่ ๓/๐ แสดงการติดตาม morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ในช่วงเวลา ๖ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ ที่ ๒ และ ๐.๒ mg/ml (final concentration) และวิธีการสกัดสองวิธีที่ต่างกันคือการต้มน้ำและการสกัดด้วย methanol



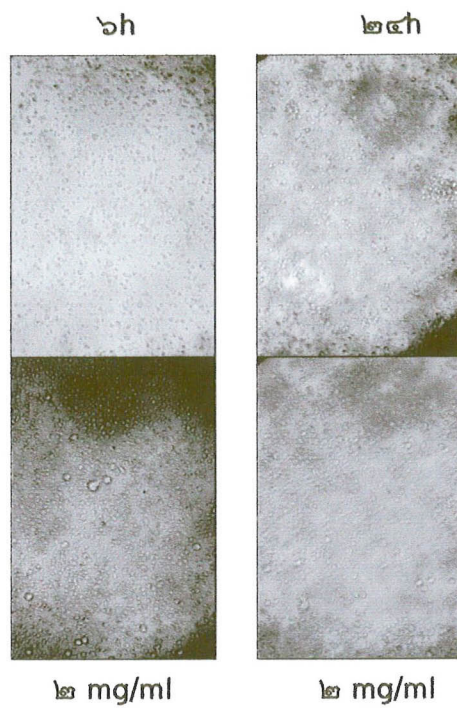
ภาพที่ ๓/๑ แสดงการติดตาม morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ในช่วงเวลา ๖ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ ที่ ๒ และ ๐.๒ mg/ml final concentration) และวิธีการสกัดสองวิธีที่ต่างกันคือการต้มน้ำและการสกัดด้วย methanol



ภาพที่ ๓/๒ แสดงการติดตาม morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ในช่วงเวลา ๒๔ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชฝั๊กต่างๆ ที่ ๒ และ ๐.๒ mg/ml (final concentration) และวิธีการสกัดสองวิธีที่ต่างกันคือการต้มน้ำและการสกัดด้วย methanol



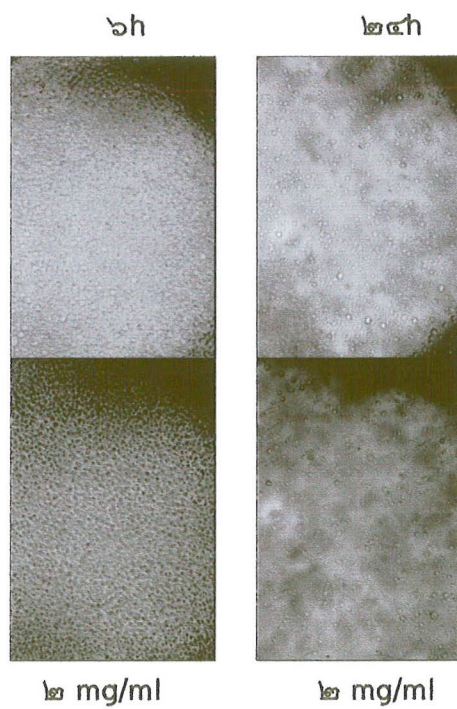
ภาพที่ ๓/๓ แสดงการติดตาม morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ในช่วงเวลา ๒๔ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ ที่ ๒ และ ๐.๒ mg/ml final concentration) และวิธีการสกัดสองวิธีที่ต่างกันคือการตมน้ำและการสกัดด้วย methanol



พ้อคำดีเมื่อย / ต้มน้ำ

HL-๖๐

พ้อคำดีเมื่อย / methanol

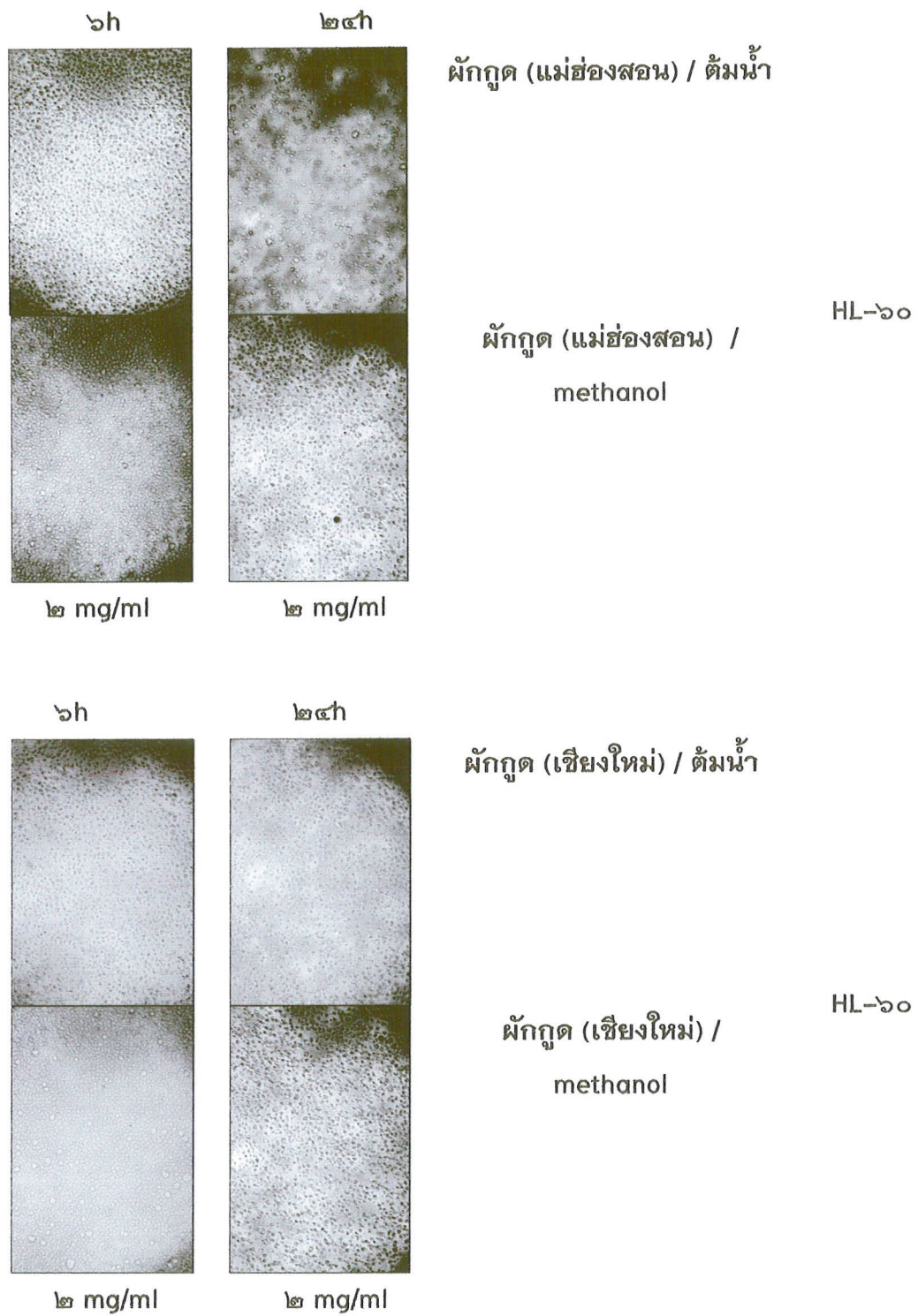


ยอดมะกอก (เซียงใหม่) / ต้มน้ำ

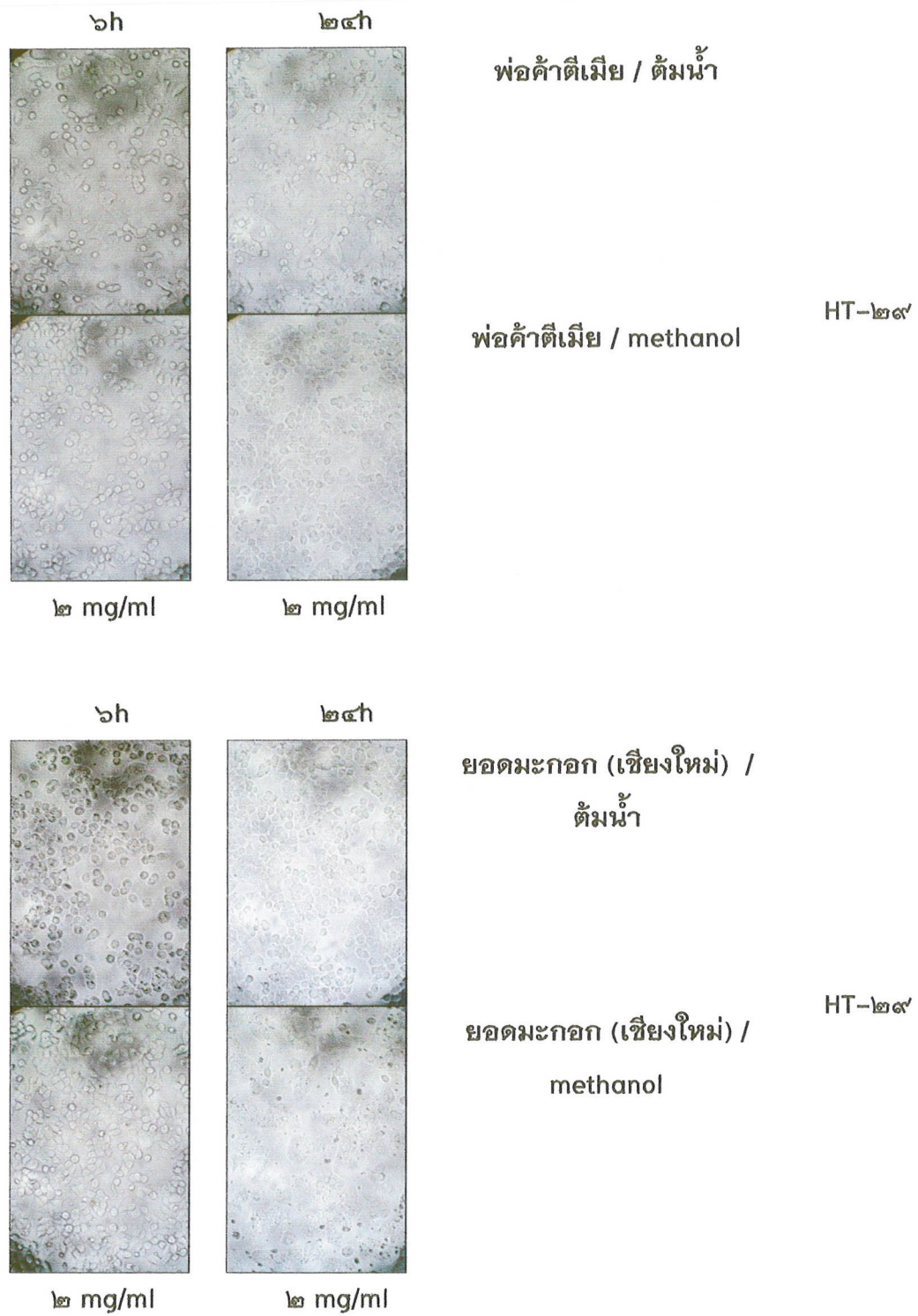
HL-๖๐

ยอดมะกอก (เซียงใหม่) /
methanol

ภาพที่ ๓/๔ แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ ที่ถูกชักนำด้วยสารสกัดจากเฟิร์นพ้อคำดีเมื่อยและยอดมะกอก (ต้มน้ำ และสกัดด้วย methanol) ที่ความเข้มข้น ๒ mg/ml ๖ และ ๒๔ h



ภาพที่ ๓.๕ แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HL-60 ที่ถูกชักนำด้วยสารสกัดจากผักกูด เชียงใหม่และแม่ฮ่องสอน (ต้มน้ำ และสกัดด้วย methanol) ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml 6 และ 24 h



ภาพที่ ๓๖ แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ที่ถูกชักนำด้วยสารสกัดจากเฟิร์นพอลิเมอร์และยอคมะกอก (ต้มน้ำ และสกัดด้วย methanol) ที่ความเข้มข้น ๒ mg/ml ๖ และ ๒๔ h



ภาพที่ ๓/๓ แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ที่ถูกชักนำด้วยสารสกัดจากผักกูด เชียงใหม่และแม่ฮ่องสอน (ต้มน้ำ และสกัดด้วย methanol) ที่ความเข้มข้น ๒ mg/ml ๖ และ ๒๔ h

ผลการติดตามการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์มะเร็งทดสอบ HT-๒๙ และ HL-๖๐ ในลักษณะของการเกิด apoptotic bodies และ single large vesicle ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยสารสกัดจากพืชทั้งสามชนิด ซึ่งสกัดด้วยวิธีการต้มน้ำและการสกัดด้วย methanol แสดงดังภาพที่ ๖๖-๗๗ โดยภาพที่ ๖๖-๖๗ และ ๗๐-๗๑ แสดงการตอบสนองที่ ๖ ชั่วโมง ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ และ HT-๒๙ ตามลำดับและ ภาพที่ ๖๘-๖๙ และ ๗๒-๗๓ แสดงการตอบสนองที่ ๒๔ ชั่วโมง ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ และ HT-๒๙ ตามลำดับ

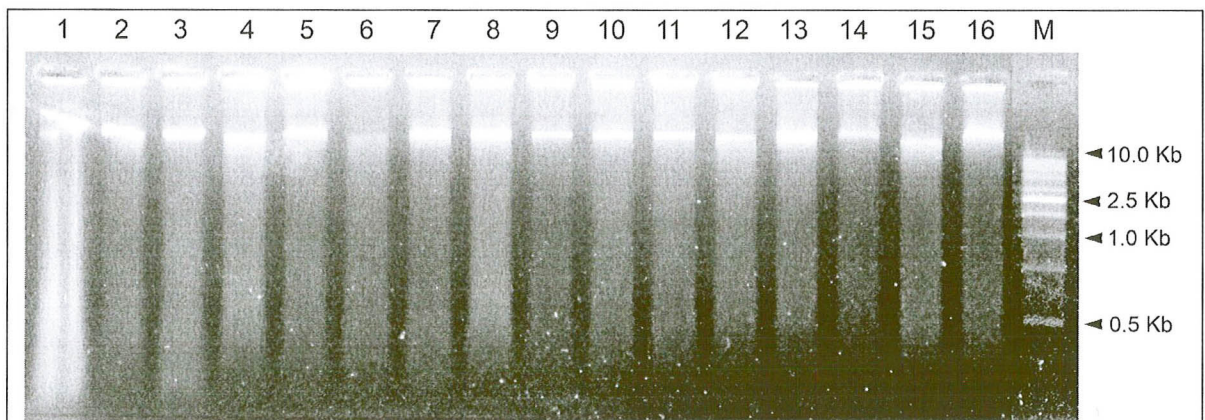
ขณะที่ภาพที่ ๗๔-๗๗ ได้นำผลการตอบสนองของเซลล์ทดสอบทั้งสองชนิดต่อสารที่นำมาทดสอบ ในสองช่วงเวลาที่ต่างกัน และที่ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถทำการทดสอบได้ (๒ mg/ml) พบว่าสารสกัดจากผักกูด ทั้งที่สกัดด้วยการต้มน้ำและด้วย methanol จากทั้งสองแหล่งคือจากแม่ฮ่องสอนและเชียงใหม่ (ภาพที่ ๗๗) มีแนวโน้มชะลอการเจริญเติบโต (เห็นได้จากรูปร่างของเซลล์ที่กลม ไม่แผ่ออก) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ได้มากกว่าสารสกัดอื่นๆที่นำมาทดสอบ (ที่ความเข้มข้น ๒ mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถทำการทดสอบและที่ ๖ ชั่วโมงของการทดสอบ) โดยเซลล์จะเริ่มแผ่ออกและแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหากสามารถเตรียมสารสกัดได้ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ อาจพบความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของสารสกัดจากผักกูดที่ได้จากสองแหล่ง (ฤดูกาลเดียวกัน, กันยายน ๒๕๕๔) ไม่มีความแตกต่างกันในด้านการยับยั้งการเจริญเติบโต และการชักนำให้เกิด morphological changes ในเซลล์มะเร็ง HT-๒๙

ในทางตรงข้าม ที่ความเข้มข้น ๒ mg/ml ของทุกสารสกัดที่นำมาทดสอบ มีแนวโน้มที่จะทำให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เจริญเติบโตได้ช้าลง เซลล์มีรูปร่างผิดปกติ คือบิดเบี้ยว มองเห็น nuclear condensation ได้มากขึ้น (เมื่อเวลาทดสอบมาถึง ๒๔ ชั่วโมง) โดยเฉพาะสารสกัดยอดมะกอกที่สกัดด้วย methanol (ภาพที่ ๗๔) สามารถทำให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ ที่ดูปกติลดจำนวนลงอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามก็ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ที่เข้าได้กับลักษณะของเซลล์ที่เกิด apoptosis

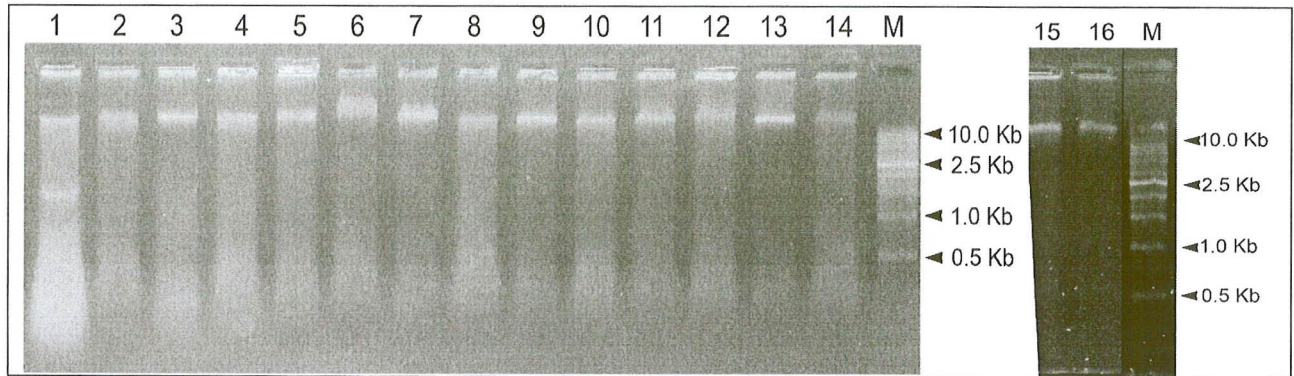
ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดทั้ง ๘ ชนิดที่นำมาทำการทดสอบ มีผลให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ ชลอการเจริญเติบโต ได้อย่างชัดเจน ขณะที่เฉพาะสารสกัดจากผักกูดจากทั้งสองแหล่งเท่านั้นที่สามารถชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ได้ชัดเจนมากกว่าสารสกัดจากพืชอีกสองชนิด อย่างไรก็ตามไม่พบว่าสารสกัดทั้ง ๘ ตัวอย่างที่นำมาทดสอบสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ และ HL-๖๐ เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ในลักษณะ apoptotic bodies หรือ single large vesicle ได้

๕.๕ การติดตามการเกิด DNA fragmentation ของเซลล์มะเร็งทดสอบ

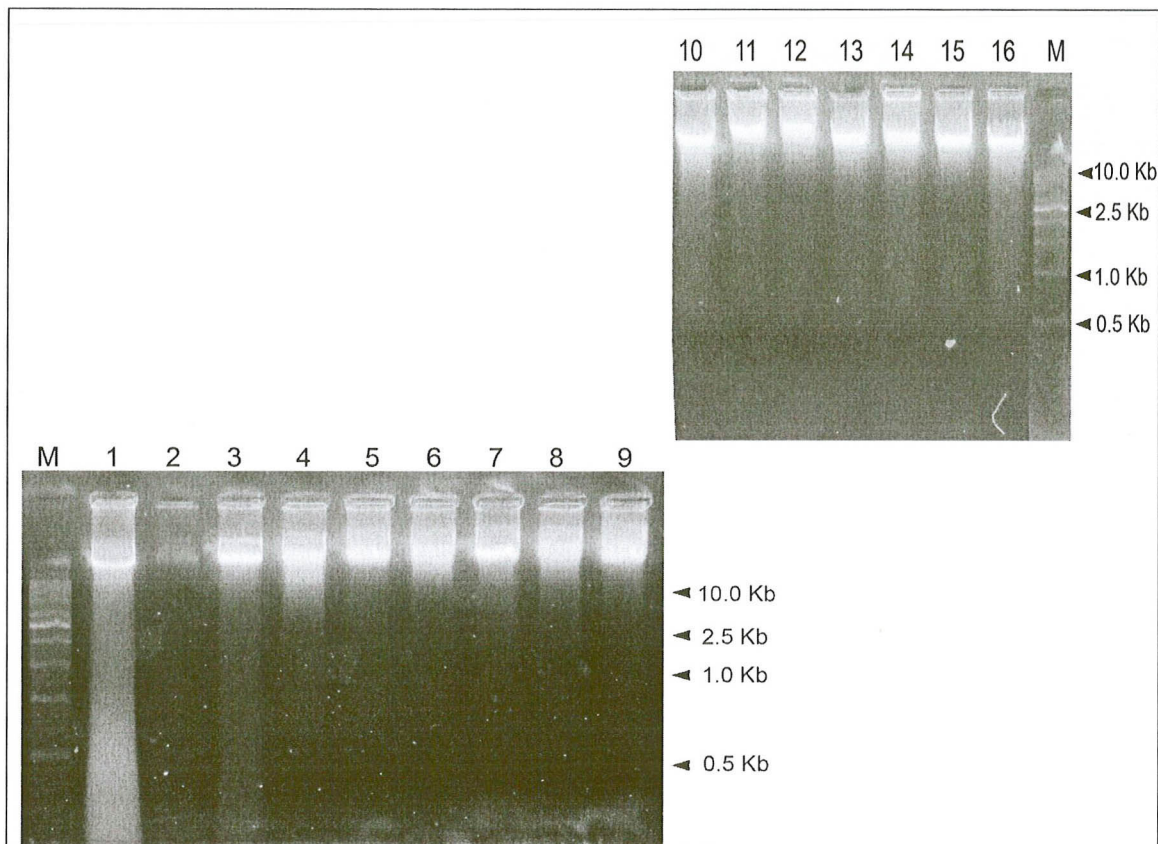
เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ผ่านมา เซลล์มะเร็งถูกเพาะเลี้ยงใน ๒๔ wells cell culture cluster (Costar, USA.) ที่ ๕๐,๐๐๐ cells/well โดยเงื่อนไขและวิธีการเหมือนที่อ้างอิงในข้อ ๓.๓.๓/ เซลล์พร้อมใช้ในการทดสอบเมื่อเจริญเติบโตจนครอบคลุม ๘๐% ของพื้นที่ flask ความเข้มข้นของสารสกัดและช่วงเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ระบุไว้ในคำอธิบายของแต่ละรูป ซึ่งผู้ทำการทดสอบได้ติดตามการเกิด DNA fragmentation ซึ่งเป็นข้อมูลยืนยันความสามารถของสารสกัดนั้นๆที่มีต่อการชักนำให้เซลล์ทดสอบเกิด apoptosis ด้วยการแตกเซลล์ทดสอบด้วย lysis buffer จากนั้น treat ด้วย ๑ mg/ml proteinase-K บ่มเพาะที่ ๕๐ °C นาน ๓-๔ ชั่วโมง (h) จากนั้นทำ heat inactivation ที่ ๘๐°C นาน ๑๐ min แล้ว treat ด้วย ๑ mg/ml RNase-A บ่มเพาะที่ ๓๗ °C นาน ๑-๒ ชั่วโมง (h) ทำ salting out แล้วปั่นตกตะกอนที่ ๑๔,๐๐๐ rpm นาน ๑๐ นาที (min) ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนจะละลายตะกอน DNA กลับด้วย TE buffer pH. ๘.๔ จากนั้นทำ electrophoresis โดยใช้ ๑.๘% agarose (Vivantis, USA.) และ ๑x TAE buffer ผลการทดลองมีรายละเอียดดังนี้ ภาพต่อไปนี้จะแสดงการติดตามการเกิด DNA fragmentation ของสารสกัดจากพืชผักต่างๆ ที่ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ (ภาพที่ ๓/๘ และ ๓/๙) และที่ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ (ภาพที่ ๔๐ และ ๔๑)



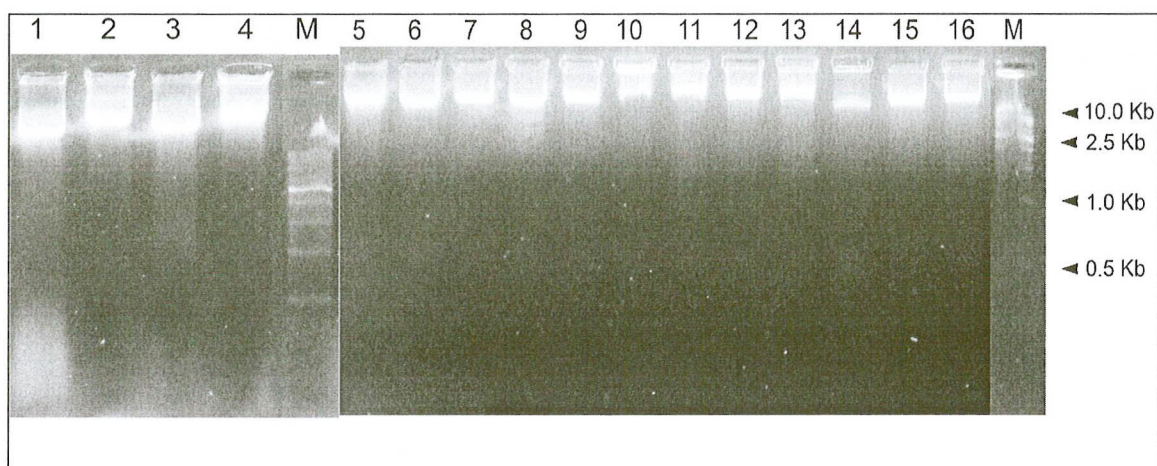
ภาพที่ ๓/๘ แสดงการชักนำให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เกิด DNA fragmentation ในช่วงเวลา ๖ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ เลขที่เป็นเลขคี่คือสารสกัดจากการต้มน้ำ ขณะที่เลขที่เป็นเลขคู่คือสารสกัดเดียวกันจากการสกัดด้วย methanol (ที่ ๒ mg/ml final concentration เท่ากัน) เลขที่ ๑ และ ๒ คือ เฟิร์นพอด้าตีเมีย, เลขที่ ๓ และ ๔ คือ ผักกูด (แม่ฮ่องสอน), เลขที่ ๕ และ ๖ คือ ผักกูด (เชียงใหม่), เลขที่ ๗ และ ๘ คือ ยอดมะกอก (เชียงใหม่), M คือ ๑ Kb DNA Ladder (Vivantis, Malaysia) เจลที่ใช้คือ ๑.๘% Agarose ใน ๐.๕xTBE electrophoresis buffer



ภาพที่ ๓๙ แสดงการชักนำให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เกิด DNA fragmentation ในช่วงเวลา ๒๔ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ เลนที่เป็นเลขคี่คือสารสกัดจากการต้มน้ำ ขณะที่เลนที่เป็นเลขคู่คือสารสกัดเดียวกันจากการสกัดด้วย methanol (ที่ ๒ mg/ml final concentration เท่ากัน) เลนที่ ๑ และ ๒ คือ เพียร์นพ้อดำตีเมียบ, เลนที่ ๓ และ ๔ คือ ผักกูด (แม่ฮ่องสอน), เลนที่ ๕ และ ๖ คือ ผักกูด (เชียงใหม่), เลนที่ ๗ และ ๘ คือ ยอดมะกอก (เชียงใหม่), M คือ ๑ Kb DNA Ladder (Vivantis, Malaysia) เจลที่ใช้คือ ๑.๘% Agarose ใน ๐.๕xTBE electrophoresis buffer



ภาพที่ ๘๐ แสดงการชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิด DNA fragmentation ในช่วงเวลา ๖ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ เลนที่เป็นเลขคี่คือสารสกัดจากการต้มน้ำ ขณะที่เลนที่เป็นเลขคู่คือสารสกัดเดียวกันจากการสกัดด้วย methanol (ที่ ๒ mg/ml final concentration เท่ากัน) เลนที่ ๑ และ ๒ คือ เฟิร์นพ่อค้าตีเมีย, เลนที่ ๓ และ ๔ คือ ผักกูด (แม่ฮ่องสอน), เลนที่ ๕ และ ๖ คือ ผักกูด (เชียงใหม่), เลนที่ ๗ และ ๘ คือ ยอดมะกอก (เชียงใหม่), M คือ ๑ Kb DNA Ladder (Vivantis, Malaysia) เจลที่ใช้คือ ๑.๘%



ภาพที่ ๘๑ แสดงการชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิด DNA fragmentation ในช่วงเวลา ๒๔ ชั่วโมง โดยสารสกัดจากพืชผักต่างๆ เลนที่เป็นเลขคี่คือสารสกัดจากการต้ม น้ำ ขณะที่เลนที่เป็นเลขคู่คือสารสกัดเดียวกันจากการสกัดด้วย methanol (ที่ ๒ mg/ml final concentration เท่ากัน) เลนที่ ๑ และ ๒ คือ เพียร์นพอด้าตีเมีย, เลนที่ ๓ และ ๔ คือ ผักกูด (แม่ฮ่องสอน), เลนที่ ๕ และ ๖ คือ ผักกูด (เชียงใหม่), เลนที่ ๗ และ ๘ คือ ยอดมะกอก (เชียงใหม่), M คือ ๑ Kb DNA Ladder (Vivantis, Malaysia) เจลที่ใช้คือ ๑.๘%

จากภาพสามารถสรุปผลการทดลองได้ว่า สารสกัดที่ได้จากการต้ม น้ำ และจากการสกัดด้วย methanol ของพืชผักที่นำมาทำการศึกษาลอง ซึ่งประกอบด้วย พอด้าตีเมีย ผักกูดจากแม่ฮ่องสอนและเชียงใหม่ และยอดมะกอกจากเชียงใหม่ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดทดลอง ๒ mg/ml ช่วงเวลาในการบ่มเพาะที่ ๖ และ ๒๔ ชั่วโมง ไม่สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งทั้ง HT-๒๙ และ HL-๖๐ เกิดการตายแบบ apoptosis โดยไม่สามารถตรวจติดตามการเกิด DNA fragmentation ได้ ในขณะที่ positive control คือ ๑ mg/ml Irinotecan และ ๑ mg/ml Doxorubicin ก็ไม่สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งทั้งสองเกิด DNA fragmentation ได้เช่นกัน