



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์  
โครงการวิจัยเรื่อง

ความหลากหลาย การกระจายพันธุ์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของ  
ผักและผลไม้พื้นบ้านเพื่อการใช้ประโยชน์ด้านอาหารและ  
สมุนไพรอย่างยั่งยืน (ระยะที่ 1)

Diversity, distribution and biochemical characteristics of  
some indigenous vegetables and fruits to the sustainable  
use of food and herb (phase 1)

คณะผู้วิจัย

1. ดร. ประทุมพร ยิ่งงชัย
2. นางพรรรัตน์ ศิริคำ
3. นายพงศธร ธรรมณอม
4. ดร. บาจริย์ ฉัตรทอง

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2558

## คำนำ

พื้นที่ภาคเหนือตอนบนมีพืชพื้นบ้านมากมายหลากหลายชนิด มีทั้งเป็นพืชปลูกและพืชป่า พืชเหล่านี้ส่วนใหญ่ให้ผลผลิตตามฤดูกาล โดยมีการนำส่วนต่างๆมาเป็นอาหาร ผักและผลไม้พื้นบ้านหลายชนิดมีคุณค่าทั้งการเป็นอาหารและเป็นสมุนไพรรักษาโรค การศึกษาวิจัยพืชพื้นบ้านจึงมีประโยชน์ในหลายๆด้าน ปัจจุบันมีการนำพืชพื้นบ้านหลายชนิดมาศึกษาถึงคุณค่าทางโภชนาการและสรรพคุณทางด้านยาสมุนไพร ดังนั้นผักพื้นบ้านจึงเป็นทางเลือกหนึ่งของกลุ่มผู้รักสุขภาพ ที่นิยมบริโภคผักและผลไม้ เนื่องจากผักและผลไม้พื้นบ้านมีสรรพคุณทางยาเสริมกับคุณค่าทางอาหารจึงเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค สำหรับสรรพคุณของผักพื้นบ้านสามารถใช้รักษาโรคต่างๆทั่วไป เช่น สามารถลดความดัน ลดไขมัน หรือใช้ลดเบาหวาน แต่ในงานวิจัยนี้ศึกษาคุณค่าทางอาหารหรือคุณค่าทางโภชนาการ และคุณค่าทางสมุนไพรโดยนำสารสกัดหยาบจากพืชมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในร่างกายเท่านั้น เนื่องจากปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นโรคที่พบมากโดยเกิดขึ้นทั้งในเด็ก ผู้ใหญ่และผู้สูงอายุ ซึ่งถ้าหากมีแนวทางป้องกันได้ก็จะเป็นผลดีต่อคนในสังคม สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาพืชพื้นบ้านจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ฝอยทอง ผักหนาม ผักแปม สะแล มะแฟน และมะโจ๊ก ซึ่งเป็นทั้งผักและผลไม้พื้นบ้าน โดยพืชบางชนิดมีรายงานผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการและมีรายงานว่ามีส่วนต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับสูง ขณะที่พืชบางชนิดถูกจัดให้เป็นวัชพืชที่ไม่มีคุณค่าและความสำคัญ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำพืชเหล่านี้มาศึกษาเพื่อเพิ่มมูลค่าและความสำคัญให้มากขึ้น อีกทั้งเพื่อช่วยพัฒนาและเพิ่มคุณค่าของพืชพื้นบ้านในการเป็นสมุนไพรเพื่อนำไปใช้ทางการแพทย์ต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2558 และสนับสนุนครุภัณฑ์สำหรับทำวิจัย

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน คุณาคักตากุล หัวหน้าหน่วยวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และผู้ประสานงานศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวงที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่และครุภัณฑ์สำหรับทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อพุฒ และคุณแม่ศรีพรรณ กันทพนม ขอขอบคุณ คุณภาพพร ยิ่งธงชัย คุณชนทัต สิงห์บ้านหาด และ คุณปิยนุช ยอดเพชร ที่ช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณพรรณี ศรีเรื่อน และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง เกษตรกร และทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้ให้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะนักวิจัย

มีนาคม 2559

## บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างผักและผลไม้พื้นบ้านจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ฝอยทอง ผักหนาม ผักแปม สะแล มะแฟน และมะใจัก ในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน เพื่อศึกษาความหลากหลาย การกระจายพันธุ์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของพืชเหล่านี้ โดยมีการเก็บข้อมูลลักษณะทาง สัณฐานวิทยา พฤกษศาสตร์ และ คุณค่าทางโภชนาการ และนำไปพิจาณาหาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมด้วยการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ รวมทั้งนำสารสกัดของพืชมาทดสอบคุณสมบัติ ทางชีวเคมี ผลจากการวิจัยพบว่า ผักทั้ง 3 ชนิด เป็นพืชปลูกที่มีการเจริญเติบโตได้ง่าย และปลูกได้ทั่วไป ยกเว้นฝอยทองที่พบได้ตามพื้นที่รกร้างและใช้ส่วนของลำต้นปลูกพืชชนิด อื่น ผักหนามพบในที่ชุ่มชื้นและเย็นมีการกระจายพันธุ์อยู่ตามริมแม่น้ำและลำคลอง ขณะที่ผัก แปมและสะแล เป็นพืชปลูกมีการกระจายพันธุ์และเจริญเติบโตได้ในสภาพพื้นที่ทั่วไป ส่วนมะแฟน และมะใจัก เป็นไม้ผลที่เจริญเติบโตในป่า ไม่พบทั่วไป การกระจายพันธุ์ของพืชจึงเป็นไปตาม ถิ่นที่อยู่อาศัย สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤกษศาสตร์พบว่า ฝอยทอง เป็นพืชไร่ใบ มีลำต้นสีเหลืองอ่อนถึงสีส้ม ดอกและผลมีขนาดเล็กมากและมีอวบน้ำ พิเศษสำหรับแทงเข้าไปในพืชอาศัยเพื่อดูดกินธาตุอาหาร จากการสำรวจและเก็บตัวอย่าง พบว่า มีอยู่สองกลุ่ม ได้แก่ ลำต้นขนาดใหญ่และลำต้นขนาดเล็ก ซึ่งมีลักษณะของดอกและผล แตกต่างกัน ขณะที่ผักแปมไม่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยา ส่วนผักหนามมีความ แตกต่างกันที่รูปทรงใบ ขนาดลำต้นเล็กหรือใหญ่ขึ้นกับความอุดมสมบูรณ์ของดินที่เจริญอยู่ สำหรับสะแลพบความแตกต่างที่ดอกซึ่งแยกเป็นต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ส่วนมะแฟน พบ เพียง 1 ตัวอย่าง ขณะที่มะใจัก ไม่พบตัวอย่าง จึงต้องรอสำรวจทั้งมะแฟนและมะใจักในระยะที่ 2 ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการพบว่า ฝอยทองประกอบด้วยธาตุอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะโพแทสเซียม และฟอสฟอรัสที่มีปริมาณสูง รวมทั้งมีวิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ส่วนผักหนามมีปริมาณฟอสฟอรัสและแคลเซียมสูง มีวิตามินเอ วิตามินอี วิตามินบี 1 และ วิตามินบี 2 สำหรับปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดที่พบในฝอยทองใหญ่ และผักหนาม เท่ากับ 215 และ 22.40 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ขณะที่ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด ที่พบใน ฝอยทองใหญ่ และผักหนามเท่ากับ 9.38 และ 15.48 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

สำหรับการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอ เอสเอสอาร์พบว่า ฝอยทอง จำนวน 36 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิดมี เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 97.84 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ระหว่าง 0.09–1.00 และค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.99435 โดยสามารถแบ่งฝอยทองได้เป็น 2 กลุ่ม หรือสองชนิด ชัดเจน และตัวอย่างฝอยทองในแต่ละชนิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ สำหรับการ

เลือกไฟร์เมอร์ที่เหมาะสม เพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของผักแปม ผักหนาม และสะแล จากไฟร์เมอร์จำนวน 70 ชนิด พบว่า มีไฟร์เมอร์จำนวน 8 ชนิด จากไฟร์เมอร์จำนวน 70 ชนิดที่เหมาะสมกับผักแปม สำหรับไฟร์เมอร์ที่เหมาะสมกับผักหนามมีจำนวน 7 ชนิด และไฟร์เมอร์ที่เหมาะสมกับสะแลมี จำนวน 15 ชนิด

ส่วนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ชักนำให้เซลล์มะเร็ง เกิดการตายแบบ apoptosis พบว่า จากการติดตามการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ทดสอบ U-937 เมื่อถูก treat ด้วยสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากพืชทดสอบ ที่ความเข้มข้นและช่วงเวลาต่างกัน ลักษณะของเซลล์แบบ apoptotic bodies ถูกพบตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการทดสอบด้วยสารสกัดความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของผักแปมและสะแล บัอมทั้งที่สกัดด้วยน้ำและ เอทานอล และพบในปริมาณมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปจนถึง 96 ถึง 120 ชั่วโมง (4-5 วัน) ของการทดสอบ ขณะที่สารสกัดทั้ง 2 แบบของฝอยทองเล็ก ทำให้เซลล์ U-937 มีลักษณะเหมือนเซลล์ที่ตายแบบ necrosis อย่างไรก็ตามพบว่า สารสกัดจากฝอยทองเล็กสามารถชักนำให้ U-937 เกิด DNA fragmentation ได้ที่ 6 ชั่วโมงของการทดสอบซึ่งเร็วที่สุดในกลุ่มพืชที่ใช้ในการทดสอบนี้ ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสะแลบัอม และสะแลยาวแสดงฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ U-937 เข้าสู่ apoptosis pathway ได้ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เริ่มพบที่ 72 ชั่วโมง (3 วัน) ของการทดสอบและพบมากขึ้น ที่ความเข้มข้นสารทดสอบ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 96 ชั่วโมง (4 วันของการทดสอบ) โดยลักษณะ apoptotic bodies ถูกพบมากกว่า single large vesicle

### Abstract

Survey and sampling of six indigenous plants; *Cuscuta* spp. (Dodder), *Eleutherococcus trifolius* (Pak Pam), *Lasia spinose* (Pak Nham), *Broussonetia Kurzii* (Salae), *Protium serratum* (Ma Fan) and *Schleichera oleosa* (Ma Jok) in the upper north of Thailand. Collected plant samples were used for study in diversity, distribution and biochemical characteristics. Morphological and botanical characters included nutritional value were also studied. The leaf samples were analyzed for DNA fingerprinting to determine their genetic diversity. Moreover, the plant extracts were used for testing the biochemical effects. The results revealed that three indigenous vegetables were cultivated plants which grow easily in every area. The ecology and habitat of the sample in each species were similar. The morphological and botanical characters of six plants found that dodders were parasitic herbs which grow easily in every area. Dodders were leafless, lack of chlorophyll and yellowish to orange stem. Their flowers and seeds were very small and they had haustoria to penetrate their hosts for nutrients. Two groups of dodders were found from survey and sampling: Big stem dodder and small one. They were also different in flowers and fruits characters. While *Eleutherococcus trifolius* (Pak Pam) samples were similar in morphological characters and the samples of *Lasia spinose* (Pak Nham) were dissimilarity in leaf shape. *Broussonetia Kurzii* (Salae) samples were dissimilarity in flower type which separated male and female plants. *Protium serratum* (Ma Fan) found only one plant while *Schleichera oleosa* (Ma Jok) was not found. For the nutritional value of vegetables, only two plants were analyzed. The nutritional value of big dodder stem was found most nutrients and high in potassium, phosphorus and composed of vitamin A, B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> while young leaves of *Lasia spinose* (Pak Nham) were high in phosphorus, calcium and also composed of vitamin A, E, B<sub>1</sub>, and B<sub>2</sub>. Total antioxidant of big dodder stem and young leaves of *Lasia spinose* (Pak Nham) was 215.0 and 22.40 mg/ 100 g, respectively. However, total polyphenol was 9.38 และ 15.48 mg/g in big dodder stem and young leaves of *Lasia spinose* (Pak Nham). ISSR technique of DNA fingerprinting analysis was used to identify indigenous plants. Thirty six samples of dodders were analyzed by 6 primers, 97.84 % were polymorphic bands. The similarity coefficient was ranged from 0.09–1.00 and the cophenetic correlation was 0.99435. The result indicated that 36

samples of dodders were clearly divided into two groups or two species related to morphological characters and the level of genetic diversity in each group was low. Seventy primers were used to screen the DNA samples of another plants. Primers that produced clear, amplified bands, reproducibility, reliability and high polymorphism were selected for ISSR analysis. The results revealed that 7 primers out of 70 primers were selected for *Eleutherococcus trifolius* (Pak Pam), 8 primers for *Lasia spinose* (Pak Nham) and 15 primers were selected for *Broussonetia Kurzii* (Salae).

The objectives of biochemical activities tests were to investigate apoptosis induction (morphological changes and DNA fragmentation induction) of the crude extract from indigenous plants. The U-937's morphological changes, apoptotic bodies, were detected within 24 hours using 4 mg/ml of *Eleutherococcus trifolius* (Pak Pam) and *Broussonetia Kurzii* (Salae Pom) (both water and ethanoic extractions) and increase within 96–120 hours exposure time. Although, the morphological of U-937 treated with water or ethanoic extracts of small dodder after 24 hours exposure time gives necrotic cells. DNA fragmentation was induced within 6 hours after those cells treated with water or ethanoic extracts of “small dodder”, which is the strongest DNA fragmentation induction activity of those experimental plants extracts. Both water and ethanoic extracts of “Salae Pom” and “Salae Yao” (1 mg/ml) induced the DNA fragmentation within 72 hours exposure time, less treated concentration but longer exposure time. Almost of the morphological changes detected in this study was apoptotic bodies, meanwhile “Single large vesicle”, another apoptotic induced morphologies of cells, were majority for the others plants extracts.

## สารบัญเรื่อง

|                        | หน้า |
|------------------------|------|
| คำนำ                   | 2    |
| กิตติกรรมประกาศ        | 3    |
| บทคัดย่อ               | 4    |
| สารบัญตาราง            | 9    |
| สารบัญภาพ              | 11   |
| บทนำ                   | 14   |
| วัตถุประสงค์           | 17   |
| ระเบียบวิธีการวิจัย    | 17   |
| ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล | 27   |
| สรุปผล                 | 94   |
| บรรณานุกรม             | 96   |
| ภาคผนวก                | 99   |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                            | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. รหัสต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านที่รวบรวมมาจากแต่ละพื้นที่                                                               | 18   |
| 2. ชนิดของพืชและตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ                                                             | 19   |
| 3. ไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของฝอยทอง                                                     | 22   |
| 4. ไพรเมอร์จำนวน 8 ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักแปม                                                     | 23   |
| 5. ไพรเมอร์จำนวน 7 ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักหนาม                                                    | 23   |
| 6. ไพรเมอร์จำนวน 15 ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสะแล                                                      | 24   |
| 7. จำนวนต้นพันธุ์พืชที่รวบรวมมาจากพื้นที่ภาคเหนือตอนบน                                                              | 27   |
| 8. ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant ) และปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol) ของฝอยทองเส้นใหญ่ | 45   |
| 9. ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของฝอยทองเส้นใหญ่                                                                 | 45   |
| 10. ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant ) และปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol) ของผักหนาม       | 46   |
| 11. ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของผักหนาม                                                                       | 46   |
| 12. เพอร์เซ็นต์โพลีเมอพิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของฝอยทองเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆ                          | 54   |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่                                                                    | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. ตีเอ็นเอจากฝอยทองโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส                              | 21   |
| 2. ตีเอ็นเอจากผักหนาม สะแล และผักแปมโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส              | 21   |
| 3. ฝอยทองที่พบบริเวณบ้านของชาวบ้านที่ อ.สารภี จ. เชียงใหม่                | 28   |
| 4. ฝอยทองที่พบบริเวณร่องน้ำโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ | 28   |
| 5. ฝอยทองที่พบบริเวณสวนของชาวบ้านที่ ต.สารภี อ. สารภี จ. เชียงใหม่        | 29   |
| 6. ผักแปมที่ชาวบ้านปลูกไว้ใน อ. สารภี จ. เชียงใหม่                        | 29   |
| 7. ผักหนามที่เจริญเติบโตตามริมคลองใน อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่               | 30   |
| 8. สะแลที่ปลูกในสวนของเกษตรกร อ. สารภี จ. เชียงใหม่                       | 31   |
| 9. ลักษณะลำต้นของฝอยทองเส้นใหญ่                                           | 32   |
| 10. ลักษณะลำต้นของฝอยทองเส้นเล็ก                                          | 32   |
| 11. Haustoria ของต้นฝอยทองเส้นใหญ่                                        | 33   |
| 12. Haustoria ของต้นฝอยทองเส้นเล็ก                                        | 33   |
| 13. ลักษณะช่อดอกและดอกของฝอยทองลำต้นแบบเส้นใหญ่                           | 34   |
| 14. ลักษณะเกสรตัวผู้และอับละอองเรณูของฝอยทองลำต้นแบบเส้นใหญ่              | 34   |
| 15. ลักษณะช่อดอกและดอกของฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็ก                           | 34   |
| 16. ลักษณะเกสรตัวผู้และอับละอองเรณูของฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็ก              | 35   |
| 17. ลักษณะผลของฝอยทองลำต้นแบบเส้นใหญ่                                     | 35   |
| 18. ลักษณะผลของฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็ก                                     | 36   |
| 19. ลักษณะเมล็ดของฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็ก                                  | 36   |
| 20. ลักษณะลำต้นของผักแปม                                                  | 37   |
| 21. ลักษณะใบของผักแปม                                                     | 37   |
| 22. ลักษณะช่อดอกและดอกของผักแปม                                           | 38   |
| 23. ลักษณะต้นผักหนาม                                                      | 38   |
| 24. ลักษณะรูปทรงใบผักหนาม                                                 | 39   |
| 25. ลักษณะดอกของผักหนาม                                                   | 40   |
| 26. ลักษณะใบของสะแล ลักษณะผลและเมล็ดของผักหนาม                            | 40   |
| 27. ลักษณะต้นของสะแลที่กำลังออกดอก                                        | 41   |
| 28. ลักษณะใบของสะแล                                                       | 41   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่                                                              | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| 29. ลักษณะช่อดอกสะแลที่ออกมาจากกิ่งก้าน                             | 42   |
| 30. ลักษณะดอกสะแลต้นเพศเมีย                                         | 42   |
| 31. ลักษณะดอกสะแลต้นเพศผู้                                          | 42   |
| 32. ลักษณะต้นของมะแฟน                                               | 43   |
| 33. ลักษณะใบของมะแฟน                                                | 43   |
| 34. ลักษณะผล เนื้อผลและเมล็ดของมะแฟน                                | 44   |
| 35. การปักชำกิ่งฝักแปม                                              | 47   |
| 36. ต้นฝักแปมจากกิ่งชำกำลังแตกยอดใหม่                               | 48   |
| 37. ต้นฝักหนามที่นำไปขยายพันธุ์                                     | 48   |
| 38. ต้นฝักหนามที่มียอดใหม่                                          | 49   |
| 39. การปักชำกิ่งสะแล                                                | 49   |
| 40. ต้นมะแฟนขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด                                     | 50   |
| 41. การทำอิเล็กโทรไฟริซิสของพืชพื้นบ้าน                             | 51   |
| 42. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไฟร์เมอร์ UBC-808                  | 52   |
| 43. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไฟร์เมอร์ UBC-811                  | 52   |
| 44. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไฟร์เมอร์ UBC-835                  | 52   |
| 45. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไฟร์เมอร์ UBC-853                  | 53   |
| 46. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไฟร์เมอร์ UBC-864                  | 53   |
| 47. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไฟร์เมอร์ UBC-878                  | 53   |
| 48. Dendrogram ของฝอยทองจากไฟร์เมอร์ 6 ชนิด                         | 55   |
| 49. Cophenetic Correlation ของฝอยทอง 36 ตัวอย่างจากไฟร์เมอร์ 6 ชนิด | 56   |
| 50. รูปแบบแถบดีเอ็นเอฝักแปมจากไฟร์เมอร์ UBC-811 และ 825             | 57   |
| 51. รูปแบบแถบดีเอ็นเอฝักแปมจากไฟร์เมอร์ UBC-826 และ 834             | 57   |
| 52. รูปแบบแถบดีเอ็นเอฝักแปมจากไฟร์เมอร์ UBC-835 และ 840             | 58   |
| 53. รูปแบบแถบดีเอ็นเอฝักแปมจากไฟร์เมอร์ UBC-864 และ 880             | 58   |
| 54. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-824                 | 59   |
| 55. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-845                 | 60   |
| 56. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-853                 | 60   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่                                                                                                                                               | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 57. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-857                                                                                                  | 61   |
| 58. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-864                                                                                                  | 61   |
| 59. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-866                                                                                                  | 62   |
| 60. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-878                                                                                                  | 62   |
| 61. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-811 และ UBC-818                                                                                         | 63   |
| 62. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-822 และ UBC-824                                                                                         | 64   |
| 63. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-825 และ UBC-826                                                                                         | 64   |
| 64. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-830 และ UBC-834                                                                                         | 65   |
| 65. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-835 และ UBC-841                                                                                         | 65   |
| 66. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-843 และ UBC-844                                                                                         | 66   |
| 67. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-845 และ UBC-857                                                                                         | 66   |
| 68. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-866                                                                                                     | 67   |
| 69. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากผักหนาม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล.                         | 70   |
| 70. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากผักหนาม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล.                     | 72   |
| 71. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากฝอยทองเส้นเล็ก ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล.                  | 74   |
| 72. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากฝอยทองเส้นเล็ก ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล.              | 76   |
| 73. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากผักแปม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล.                          | 78   |
| 74. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากผักแปม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน | 80   |
| 75. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากสะแลป้อม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล.                        | 82   |
| 76. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากสะแลป้อม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล.                    | 84   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่                                                                                                                               | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 77. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัด<br>ด้วยน้ำจากสะแลยาว ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล.     | 86   |
| 78. การเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัด<br>ด้วยเอทานอลจากสะแลยาว ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. | 88   |
| 79. การชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืช<br>ที่ 6 ชั่วโมง (ผักหนาม ฝอยทองเล็ก ผักแปม)             | 91   |
| 80. การชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืช<br>ที่ 24 ชั่วโมง (ผักหนาม ฝอยทองเล็ก ผักแปม)            | 91   |
| 81. การชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืช<br>ที่ 48 ชั่วโมง (ผักหนาม ฝอยทองเล็ก ผักแปม)            | 92   |
| 82. การชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืช<br>ที่ 72 ชั่วโมง (ผักหนาม ฝอยทองเล็ก ผักแปม)            | 92   |
| 83. การชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืช<br>ที่ 72 ชั่วโมง (สะแลยาว และสะแลป้อม)                  | 93   |
| 84. การชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืช<br>ที่ 96 ชั่วโมง (สะแลยาว และสะแลป้อม)                  | 93   |

## บทนำ

พืชพื้นบ้านที่นำมาเป็นอาหารมีหลายชนิด ด้วยมีคุณค่าทางโภชนาการ อุดมด้วยวิตามิน แร่ธาตุที่สำคัญและยังปลอดภัยจากสารเคมีต่างๆเพราะเป็นพืชที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติ อีกทั้งส่วนต่างๆของพืชยังได้นำมาใช้ในการเป็นสมุนไพรรักษาโรคตามตำรายาพื้นบ้าน สำหรับศักยภาพของผักและผลไม้พื้นบ้านไทยที่ได้มีการทดสอบในการต้านสารอนุมูลอิสระนั้นพบว่า ได้มีงานศึกษาวิจัยและนำข้อมูลมาเผยแพร่กันอย่างต่อเนื่อง อาทิ เกศศิริ และคณะ (2544) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านไทยจำนวน 149 ชนิดซึ่งรวบรวมมาจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ โดยนำมาสกัดด้วยเมทานอลและวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี  $\beta$ -carotene bleaching ทำให้สามารถจำแนกศักยภาพผักพื้นบ้านได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่ง เป็นผักที่มีศักยภาพสูง ได้แก่ ผักฮ้วน ถั่วแปบ เพกา เชียงดา สะแล ผักหนาม ผักหวานป่า เป็นต้น กลุ่มที่สองเป็นผักที่มีศักยภาพปานกลาง ได้แก่ ผักหวานบ้าน ผักปลั่ง ดอกขจร เป็นต้น กลุ่มที่สาม เป็นผักศักยภาพต่ำ ได้แก่ บวบ กะบูก เป็นต้น ซึ่งข้อมูลจากงานวิจัยพืชพื้นบ้านเหล่านี้ เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับงานวิจัยด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม งานด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชและการพัฒนางานด้านพืชสมุนไพรเพื่อใช้รักษาโรค รวมทั้งงานวิจัยด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

สำหรับข้อมูลด้านการเป็นอาหารและสมุนไพรของผักและผลไม้พื้นบ้านจำนวน 6 ชนิดที่จะทำวิจัยครั้งนี้พบว่ามีข้อมูลทั่วไปดังนี้ ฝอยทอง หรือ เครือเขาคำ (*Cuscuta chinensis* Lam.) เป็นพืชพื้นบ้านที่พบได้ทั่วไป ลำต้นมีลักษณะเป็นเส้นกลม ยาว สีเหลือง เลื้อยเกาะพันกับต้นไม้อื่น ต้นอ่อนนำมาลวก ต้ม หรือรับประทานสดกับน้ำพริก มีทั้งคุณค่าทางอาหารและมีสรรพคุณทางสมุนไพร โดยพบว่า ส่วนของต้น แก้วร้อนใน ดับพิษไข้ แก้วพิษอาเจียนเป็นเลือด ใจเป็นเลือด แผลเรื้อรัง แก้วผ้าหรือผดผื่นจากอากาศร้อน เมล็ดช่วยบำรุงตับและไต แก้วปวดเอว ปวดขา แก้วกระหาย ขับเหงื่อ เป็นต้น (วัชรวิ, 2548)

ผักหนาม (*Lasia spinosa* (L.) Thw.) เป็นผักพื้นบ้าน อายุหลายปี พบตามบริเวณริมแม่น้ำ ลำคลอง หนองบึง ที่ชุ่มชื้น ผักหนามจะแทงยอดจากเหง้าที่อยู่ใต้ดิน ทุกส่วนของต้นมีหนาม ใบมีหลายรูปแบบ ชาวบ้านนำยอดและต้นไปลวกหรือนึ่งกินกับน้ำพริกและทำเป็นแกงหรือผัดก็ได้ ผักหนามมีคุณค่าทางอาหารได้แก่ เส้นใย แคลเซียม ฟอสฟอรัส วิตามินต่างๆ สำหรับสรรพคุณด้านสมุนไพรพบว่า เหง้าใช้เป็นยาขับเสมหะ น้ำต้มใช้อาบแก้คันตามตัวที่เกิดจากพิษไข้ หัด และโรคผิวหนัง น้ำต้มจากรากใช้อาบเด็กแรกเกิด และต้มแก้เจ็บคอ (ยิ่งยง, 2551; คณิต และคณะ, 2553)

ผักแปม (*Eleutherococcus trifolius* (L.) S.Y.Hu) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก มีหนามกระจายทั่วลำต้น พบได้ตามภาคเหนือและภาคอีสาน ชาวบ้านมักนำเอาส่วนของยอดมารับประทาน โดยนำมาแกง หรือรับประทานสดเป็นเครื่องเคียงกับอาหารประเภทลาบ สำหรับสรรพคุณสมุนไพรพบว่า น้ำต้มจากเปลือกต้นหรือเปลือกที่ยางหรืออบแล้วแช่ในแอลกอฮอล์ใช้ดื่มแก้โรคผอมแห้งและโรคประสาท (วัชร, 2548)

สะแล (*Broussonetia Kurzii* (Hook.f.) Corner) เป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อย พบได้ทั่วไปทางภาคเหนือตามป่าและบ้านเรือนชาวบ้าน นิยมนำดอกมาปรุงอาหารประเภทแกงต่างๆ สะแลมีทั้งคุณค่าทางอาหารและการเป็นสมุนไพรพื้นบ้านโดยเปลือกและใบนำมาต้มแก้อาการบวมอันเกิดจากโรคไต หัวใจพิการน้ำเหลืองเสีย (เต็ม, 2544)

มะแพน (*Protium serratum* Engl.) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง พบได้ตามป่าเบญจพรรณทั่วไป ใบอ่อนและผลสุกรับประทานได้ ผลมีลักษณะค่อนข้างกลมมน เปลือกผลเป็นสีแดงภายในผลมีเนื้อนุ่มสีขาวและมีเมล็ด เมล็ดจะแข็ง ผลมีรสเปรี้ยวอมหวาน สรรพคุณทางสมุนไพรพบว่า ใช้รากสดหรือแห้งนำมาต้มเพื่อดื่มแก้พิษไข้และเป็นยาถอนพิษต่างๆ (เต็ม, 2544; วิทย์, 2548; คณิต และคณะ, 2553) เดิมสามารถพบต้นมะแพนได้ทั่วไปแต่ปัจจุบันพบว่ามะแพนมีจำนวนลดลงมากเพราะมีตัดไม้ทำลายป่ามากขึ้น

มะโจ๊ก (*Schleichera oleosa* (Lour.) Oken) เป็นไม้ต้นผลัดใบสูงถึง 25 เมตร พบทั่วไปตามป่าเบญจพรรณ เป็นผลไม้ป่าที่ปัจจุบันพบได้น้อยลง ผลรูปทรงกลมหรือรูปไข่ ขนาดเล็ก ผลแก่สีน้ำตาล นิยมรับประทานสดมีรสเปรี้ยวและรสเปรี้ยวอมหวาน สรรพคุณด้านสมุนไพรพบว่า น้ำต้มจากเปลือกต้นใช้ดื่มแก้ฝีหนอง (คณิต และคณะ, 2553)

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้น การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะต่างๆภายนอกยังไม่เพียงพอ ปัจจุบันได้มีการนำงานวิจัยทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เพื่อยืนยันความถูกต้องได้แก่ การวิเคราะห์และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีแต่เทคนิคที่นิยมได้แก่ เอเอฟแอลพี (AFLP ; Amplified Fragment Length Polymorphism) เอสเอสอาร์ (SSR ; Simple Sequence Repeats) และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (Inter-Simple Sequence Repeats) รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) โดยแต่ละเทคนิคก็มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน เทคนิคไอเอสเอสอาร์เป็นเทคนิคใหม่ สามารถใช้ได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว เนื่องจากลำดับเบสของไพรเมอร์ได้มาจากส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ (เทคนิคเอสเอสอาร์) ซึ่งทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมสูง จึงทำให้มีศักยภาพในการวิเคราะห์ที่ดี สำหรับงานวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ พบว่าส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในงานศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิดได้แก่ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะหาดไม้ผลพื้นเมืองในเขต

ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย (Yingthongchai *et al.*, 2014) การวิเคราะห์ endangered *Kirengeshoma palmata* Yatabe ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านของประเทศจีนและญี่ปุ่น (Zhang *et al.*, 2006) การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของ endangered quillwort ในประเทศจีน (Chen, *et al.*, 2006) และมีการนำไปบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกของพืช *Olea europaea* L. (Terzpoulos *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของผักกูด พ้อคำดีเมีย มะกอกป่า ถั่วแปบ ผักฮ้วนหมู และเพกาซึ่งเป็นผักพื้นบ้านทางภาคเหนือของประเทศไทย (ประทุมพร และคณะ, 2554; 2557)

ส่วนคุณสมบัติในการเป็นพืชสมุนไพรนั้นพบว่า พืชพื้นบ้านหลายชนิดมีสรรพคุณทางยาโดยมีการนำมาใช้รักษาโรคได้ ฝอยทอง ผักหนาม ผักแปม และสะแล ก็เช่นเดียวกันที่นอกจากคุณค่าในการเป็นสมุนไพรรักษาโรคทั่วไปแล้วยังพบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ในปริมาณที่สูง (เกศศิณี และคณะ, 2544) และปัจจุบันมีรายงานการนำพืชพื้นบ้านที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมาทดสอบทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งแล้วพบว่าพืชพื้นบ้านหลายชนิดมีศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดังเช่น รายงานการวิจัยด้าน cytotoxic activity ของ essential oil ที่ได้จาก พืชสมุนไพร 17 ชนิด เมื่อทำการทดสอบในเซลล์มะเร็ง 2 แบบ คือ P388 (mouse leukemia) และ KB (human mouth epidermal carcinoma) พบว่า essential oil แทบทุกตัวมีค่า  $IC_{50}$  ต่ำซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบได้ดี บางตัวมีความสามารถสูงกว่า positive control ของการทดลอง (5-Fluorouracil (5-FU), Vincristine และ Methotrexate (MTX)) เช่น Sweet basil oil มีความสามารถดังกล่าวดีที่สุด (ค่า  $IC_{50}$  ต่ำที่สุดในกลุ่ม) ที่ 0.0362 มก./มล. (ต่ำกว่า 5-FU 12.7 เท่า แต่ดีกว่า Vincristine 3.19 เท่า) เมื่อทำการทดสอบในเซลล์มะเร็ง P388 และ Guava leaf oil มีความสามารถดังกล่าวดีที่สุด ที่ 0.0379 มก./มล. (ดีกว่า Vincristine 4.37 เท่า) เมื่อทำการทดสอบในเซลล์มะเร็ง KB ข้อมูลเบื้องต้นนี้ แสดงศักยภาพของสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรในการนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง (Manosroi *et al.*, 2005) สำหรับฝอยทองมีรายงานการวิจัยทางการแพทย์ว่า ถูกลำบากใช้ในการรักษา tumors แบบการแพทย์พื้นบ้านของบังคลาเทศ (Costa-Lotufo *et al.*, 2005) และยังมีรายงานถึงการนำเอาฝอยทองไปใช้ในการรักษาอาการบวม (oedema) อาการดีซ่าน (jaundice) โดย Hossan และคณะ (2009) นอกจากนี้ Suresh และคณะ (2011) ยังได้ทดสอบฤทธิ์ anti-inflammatory และ anti-cancer activities ของพืชสกุลใกล้เคียงกันกับฝอยทองคือ *Cuscuta reflexa* แบบ *in vitro* ในเซลล์มะเร็ง murine macrophage cell line RAW264.7 ซึ่งพบว่า สารสกัดสามารถลดปริมาณ  $TNF-\alpha$  และ COX-2 ใน RAW264.7 cells ที่ถูก induced ด้วย LPS และสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง Hep3B เกิด apoptosis ขณะที่ Yang และคณะ (2011) ได้รายงานการศึกษาสาร

สกัดด้วยน้ำจากเมล็ดของฝอยทองซึ่งเดิมพบในสูตรยาแผนโบราณของเกาหลีอยู่แล้ว ซึ่งพบว่าแสดงฤทธิ์ osteogenic activity ได้ใน human osteoblast-like MG-63 cells ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็น bone-forming drugs ได้ สำหรับผักแปม (*Acanthopanax trifoliatum*) มีรายงานว่า Sithisarn และคณะ (2011) ได้นำส่วนของใบผักแปมที่สกัดด้วยวิธี decoction หรือการต้มแบบวนว่า สารสกัดมีการแสดงฤทธิ์ antioxidant activity สูงโดยจากการทำ TLC แสดงให้เห็นว่า ค่าแอนติออกซิแดนท์นั้นเนื่องมาจาก สารประกอบประเภท rutin และ chlorogenic acid ในผักแปม ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าว ฝอยทอง ผักหนาม ผักแปม สะแล รวมทั้ง มะแฟน และมะโจ๊ก นอกจากจะมีความศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมและองค์ประกอบทางชีวเคมีแล้ว ยังจะมื่อนำการพืชเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของงานสมุนไพรไทยด้วย

### วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การกระจายพันธุ์ และการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักและผลไม้พื้นบ้าน
2. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี คุณค่าทางอาหารและโภชนาการของผักและผลไม้พื้นบ้าน
3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งให้เกิด apoptosis เพื่อนำผลวิจัยที่ได้ไปพัฒนางานทางการแพทย์

### ระเบียบวิธีการวิจัย

#### 1. การเก็บตัวอย่างพืชพื้นบ้านและเก็บข้อมูลเบื้องต้น

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างฝอยทอง ผักหนาม ผักแปม สะแล มะแฟน และมะโจ๊ก ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน ในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2557 ถึง เดือนกันยายน 2558 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ผักทั้งสี่ชนิดกำลังมีการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ ดอกและผล ซึ่งช่วงเวลาการออกสำรวจและเก็บข้อมูลของพืชพื้นบ้านดังกล่าวขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดด้วย โดยฝอยทองเป็นพืชชนิดแรกที่ทำการศึกษาและเก็บตัวอย่าง เนื่องจากพบเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ลำต้นมีสีเหลืองปกคลุมต้นไม้อื่น เห็นได้

ชัดเจน ส่วนผักหนาม ผักแปม เป็นพืชที่มีอายุยาวนานเกิน 1 ปี นิยมรับประทานยอดอ่อน จึงเก็บได้ตลอดทั้งปี ขณะที่สะแล เป็นที่นิยมรับประทานดอกอ่อน จึงต้องเก็บตัวอย่างดอกอ่อนในช่วงธันวาคม-กุมภาพันธ์ ส่วน มะแฟน และมะใจัก เป็นไม้ผลลำต้นสูงใหญ่ ไม่นิยมนำมาปลูก จึงพบได้ตามป่าเท่านั้น ทำให้การเก็บตัวอย่างของมะแฟนและมะใจักทำได้ลำบาก ดังนั้นการเก็บรวบรวมต้นพันธุ์ กิ่งพันธุ์ ส่วนของใบ ยอด และผล ในระยะที่ 1 จึงทำได้กับพืชบางชนิด ในพื้นที่เชียงใหม่เป็นส่วนใหญ่ และพื้นที่อื่นบางตัวอย่าง โดยบันทึก การกระจายพันธุ์ ลักษณะทางสัณฐาน อาทิ ลักษณะต้น สี ขนาด รูปทรงของใบ ดอกและผล โดยที่ต้นพันธุ์ผักและผลไม้พื้นบ้านที่เก็บรวบรวมมาได้มีรหัสต้นพันธุ์คือ แหล่งเก็บ (สถานที่เก็บหรืออำเภอ) ลำดับต้นที่เก็บ/พื้นที่เก็บ (จังหวัด) ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** รหัสต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านที่รวบรวมมาจากแต่ละพื้นที่

| พื้นที่       | พื้นที่เก็บ  | รหัสต้นพันธุ์ |
|---------------|--------------|---------------|
| จ. เชียงใหม่  | อ. เมือง     | M no. /CM     |
|               | อ. สวรรค์    | SP no. /CM    |
|               | อ. สันป่าตอง | SPT no. /CM   |
|               | อ. สันทราย   | SS no. /CM    |
|               | อ. แม่ริม    | MR no. /CM    |
|               | อ. ดอยสะเก็ด | DSK no. /CM   |
|               | อ. พร้าว     | P no. /CM     |
|               | อ. แม่แตง    | MT no. /CM    |
| จ. ลำพูน      | ลำพูน        | L no.         |
| จ. ลำปาง      | ลำปาง        | LP no.        |
| จ. แพร่       | แพร่         | PH no.        |
| จ. น่าน       | น่าน         | N no.         |
| จ. เชียงราย   | เชียงราย     | CR no.        |
| จ. แม่ฮ่องสอน | แม่ฮ่องสอน   | MH no.        |

## **2. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการ**

วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี คุณค่าทางอาหารและโภชนาการของพืชพื้นบ้านบางชนิด เช่น ปริมาณวิตามินต่างๆ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินบี วิตามินอี ธาตุอาหารต่างๆ และปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด โดยวิเคราะห์จากส่วนของยอด ใบ และผลของพืชในโครงการบางชนิดที่มีจำนวนผลผลิตเพียงพอ โดยส่งตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์

ที่ห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA) จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีใช้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ การวิเคราะห์ปริมาณแอนติออกซิแดนซ์ทั้งหมดใช้วิธี DPPH method

### 3. การขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมต้นพันธุ์

งานวิจัยในระยะที่ 1 ทำการขยายพันธุ์ผักแปมและสะแลโดยการปักชำกิ่ง ผักหนามใช้การแยกเหง้า มะแฟนขยายพันธุ์ด้วยการปักชำกิ่งและการเพาะเมล็ด หลังจากขยายพันธุ์แล้วนำต้นพันธุ์ที่ได้มาปลูกรวบรวมไว้ในเรือนเพาะชำและแปลงทดลองเพื่อขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมาก โดยใบอ่อนจากต้นพันธุ์ใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ ขณะที่ส่วนของยอด ใบ ดอก และผลนำไปใช้ในการทำสารสกัดหยาบ

### 4. การศึกษาทางด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างพืชพื้นบ้าน

การเก็บตัวอย่างพืชพื้นบ้านเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอนั้น ได้เก็บส่วนของใบหรือใบอ่อนมาเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ ในระยะที่ 1 นี้ทำการสกัดดีเอ็นเอได้ดังนี้ ฝอยทองสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 49 ตัวอย่าง ผักหนามสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 20 ตัวอย่าง/แหล่ง ผักแปมสกัดดีเอ็นเอจำนวน 15 ตัวอย่าง สะแลสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 20 ตัวอย่าง และมะแฟนสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 1 ต้นพันธุ์ ส่วนมะโจ๊กไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ชนิดของพืชและตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

| ชนิดของพืช | จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่สกัดดีเอ็นเอ | จำนวนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ |
|------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|
| ฝอยทอง     | 49                                  | 36                                           |
| ผักหนาม    | 20                                  | 8                                            |
| ผักแปม     | 15                                  | 5                                            |
| สะแล       | 18                                  | 4                                            |
| มะแฟน      | 1                                   | -                                            |

#### 4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากผักทั้งสี่ชนิด

ผักพื้นบ้านเหล่านี้สามารถใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมได้หลายชนิดแต่ชุดสกัดที่ใช้แล้วได้ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่ดี ได้แก่ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ซึ่งสามารถใช้ได้กับใบอ่อนจนถึงใบแก่ ดังนั้นในงานวิจัยจึงใช้ชุดสกัดนี้กับฝอยทอง ผักแปม ผักหนาม สะแล และมะแฟน โดยสกัดดีเอ็นเอจากใบ ซึ่งใช้ทั้งใบอ่อน และใบแก่

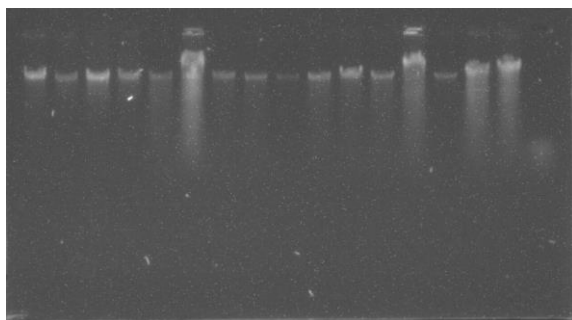
ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (ประทุมพร และพรรัตน์, 2549 และ 2554) มีรายละเอียดดังนี้

1. บดใบอ่อนจำนวน 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำบัฟเฟอร์ AP1 จำนวน 400 ไมโครลิตร และใส่ RNase A จำนวน 4 ไมโครลิตร (100 mg/ml)
3. นำไปบ่มในน้ำอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที พลิกกลับไปมา 2-3 ครั้ง
4. เติมน้ำบัฟเฟอร์ AP2 จำนวน 130 ไมโครลิตร เขย่า และ บ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 20,000 x g นาน 5 นาที
5. ย้ายส่วนใสใส่ลงไปใน QIAshredder Mini spin Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 x g นาน 2 นาที
6. ย้ายส่วนใสที่กรองได้ไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ (ประมาณ 450 ไมโครลิตร)
7. ใส่บัฟเฟอร์ AP3/E ลงไปในหลอดทดลอง จำนวน 1.5 เท่า ผสมให้เข้ากัน (ประมาณ 675 ไมโครลิตร)
8. นำส่วนผสมจำนวน 650 ไมโครลิตรใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 x g นาน 1 นาที แล้วทิ้งส่วนผสม จากนั้นนำส่วนผสมที่เหลือกรองผ่านซ้ำอีกจนหมด
9. นำเอา DNeasy Mini Spin Colum มาวางในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติมน้ำบัฟเฟอร์ AW ลงไป 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 x g นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่กรองได้
10. เติมน้ำบัฟเฟอร์ AW ลงไปจำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 x g นาน 2 นาที ทิ้งส่วนใส

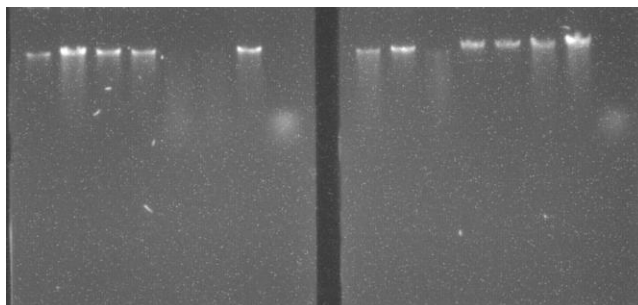
11. ย้าย DNeasy Mini Spin Column ไปวางในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติม บัฟเฟอร์ AE จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่  $6,000 \times g$  นาน 1 นาที
12. ทำซ้ำในข้อ 11. อีกครั้ง แล้วเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะนำไปทำ PCR และวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

#### 4.3 การเช็คคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

การเช็คคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของฝอยทอง ผักแปม ผักหนาม สะแล มะแฟน โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย อะกาโรส เจล (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8% โดยใช้ 0.5XTBE บัฟเฟอร์ โดยมีดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นเป็นตัวเปรียบเทียบและวัดปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แล้วนำดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณที่ดีมาเจือจางความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10-20 นาโนกรัม เพื่อใช้ในการทำ PCR ต่อไป (ภาพที่ 1 และ 2)



ภาพที่ 1 ดีเอ็นเอจากฝอยทองโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพที่ 2 ดีเอ็นเอจากผักหนาม สะแล และผักแปมโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

#### 4.4 การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)

การทำ PCR ใช้ 2x PCR Master mix (*i*-Taq) (*i*Ntron Biotechnology, Inc) และ ๒x Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO CO., LTD) โดยเติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดีเอ็นเอต้นแบบ (ความเข้มข้น 10–20 นาโนกรัม) และไพรเมอร์ (primer) (ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมล) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้มีจำนวนเบส 17–18 ตัว (17–18 base oligonucleotide primers ของ UBC) โดยใช้เครื่อง PCR ชนิด Gradient Palm–Cycler

จากการทดสอบหา Thermal Cycle condition ที่เหมาะสมกับการทำ PCR นั้นพบว่าได้ Cycle condition ที่เหมาะสมสำหรับพืชพื้นบ้านเหล่านี้ คือ

Cycle condition: 94 °C 4 min

94 °C 30 sec, 52 °C 45 sec, 72 °C 120 sec : 35 cycles

72 °C 7 min

#### 4.5 การคัดเลือกไพรเมอร์ (Primer) ที่เหมาะสม

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้การสุ่มจากไพรเมอร์ของ UBC (The University of British Columbia) จำนวน 70 ชนิด ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีจำนวน 17–18 เบส พบว่าจากการคัดเลือกมีไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิดใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของฝอยทองได้ดี ผักแปมจำนวน 8 ชนิด และใช้กับผักหนามจำนวน 7 ชนิด ส่วนสะแลใช้ไพรเมอร์ จำนวน 15 ชนิด (ตารางที่ 3, 4, 5 และ ตารางที่ 6)

**ตารางที่ 3** ไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของฝอยทอง

| รหัส Primer | ลำดับเบส 5' to 3'*      |
|-------------|-------------------------|
| UBC-808     | AGA GAG AGA GAG AGA GC  |
| UBC-811     | GAG AGA GAG AGA GAG AT  |
| UBC-835     | AGA GAG AGA GAG AGA GYC |
| UBC-853     | TCT CTC TCT CTC TCT CRT |
| UBC-864     | ATG ATG ATG ATG ATG ATG |
| UBC-878     | GGA TGG ATG GAT GGAT    |

\* R= A,G

Y=C,T

ตารางที่ 4 ไพร์เมอร์จำนวน 8 ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักแปม

| รหัส Primer | ลำดับเบส 5' to 3'*      |
|-------------|-------------------------|
| UBC-811     | GAG AGA GAG AGA GAG AT  |
| UBC-825     | ACA CAC ACA CAC ACA CT  |
| UBC-826     | ACA CAC ACA CAC ACA CC  |
| UBC-834     | AGA GAG AGA GAG AGA GYT |
| UBC-835     | AGA GAG AGA GAG AGA GYC |
| UBC-840     | GAG AGA GAG AGA GAG AYT |
| UBC-848     | CAC ACA CAC ACA CAC ARG |
| UBC-864     | ATG ATG ATG ATG ATG ATG |
| UBC-880     | GGA GAG GAG AGG AGA     |

\* R= A,G

Y=C,T

ตารางที่ 5 ไพร์เมอร์จำนวน 7 ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักหนาม

| รหัส Primer | ลำดับเบส 5' to 3'*      |
|-------------|-------------------------|
| UBC-824     | TCT CTC TCT CTC TCT CG  |
| UBC-845     | CTC TCT CTC TCT CTC TRG |
| UBC-853     | TCT CTC TCT CTC TCT CRT |
| UBC-857     | ACA CAC ACA CAC ACA CYG |
| UBC-864     | ATG ATG ATG ATG ATG ATG |
| UBC-866     | CTC CTC CTC CTC CTC CTC |
| UBC-878     | GGA TGG ATG GAT GGA T   |

\* R= A,G

Y=C,T

ตารางที่ 6 โพรเมอร์จำนวน 15 ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสะแล

| รหัส Primer | ลำดับเบส 5' to 3'*      |
|-------------|-------------------------|
| UBC-811     | GAG AGA GAG AGA GAG AT  |
| UBC-818     | CAC ACA CAC ACA CAC AG  |
| UBC-822     | TCT CTC TCT CTC TCT CA  |
| UBC-824     | TCT CTC TCT CTC TCT CG  |
| UBC-825     | ACA CAC ACA CAC ACA CT  |
| UBC-830     | TGT GTG TGT GTG TGT GG  |
| UBC-834     | GGA GAG GAG AGG AGA     |
| UBC-835     | AGA GAG AGA GAG AGA GYC |
| UBC-841     | GAG AGA GAG AGA GAG AYC |
| UBC-843     | CTC TCT CTC TCT CTC TRA |
| UBC-844     | CTC TCT CTC TCT CTC TRC |
| UBC-845     | CTC TCT CTC TCT CTC TRG |
| UBC-850     | GTG TGT GTG TGT GTG TYC |
| UBC-857     | ACA CAC ACA CAC ACA CYG |
| UBC-866     | CTC CTC CTC CTC CTC CTC |

\* R= A,G

Y=C,T

#### 4.6 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดจากแหล่งต่างๆ ที่สกัดได้มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR) โดยเลือก Thermal Cycle ที่เหมาะสมแล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยหลักการ PCR (Polymerase Chain Reaction) แล้ว นำ PCR product ที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วนำเจลที่ได้มาถ่ายรูปเพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยบันทึก จำนวนแถบ การเกิดแถบ การมี หรือไม่มีแถบ โดยมีการแทนค่า ไม่มีแถบ เท่ากับ 0 และมีแถบ เท่ากับ 1 วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS pc ver. 2.2 (Rohlf, 2005)

## 5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

งานวิจัยนี้เป็นระยะที่ 1 ได้ทดสอบสารสกัดจากลำต้นของฝอยทอง ใบและก้านใบของ ผักหนาม ใบของผักแปม และดอกของสะแล โดยทำการทดสอบดังนี้

5.1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืชทดสอบ

5.2 การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ทดสอบ (morphological changes)

5.3 การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis โดยการติดตามการเกิด DNA fragmentation

### 5.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืชทดสอบ

การทำสารสกัดหยาบ

สกัดสารสกัดหยาบจากพืชด้วยการสกัดด้วยน้ำ หรือ เอทานอล (เอทานอล) โดยนำ ส่วนของลำต้น ใบหรือยอดอ่อน และดอกอ่อน ของแต่ละพืช มาล้างทำความสะอาดและ อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้งกรอบและน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง (ประมาณ 7 วัน) จากนั้นนำมามบให้เป็นผงละเอียด แล้วนำไปแช่สกัดด้วยน้ำ หรือเอทานอล จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยการทำ evaporation จนได้ crude extracts เก็บไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส

### 5.2 การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis โดยติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็งทดสอบ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง U-937 (Human pleural effusion monocytes) ใน 24 wells cell culture cluster (Costar, USA.) ที่ 10,000 cells/well ตามเงื่อนไขและวิธีการเหมือนที่ อ้างอิงจาก พงศธร (2552) โดยเซลล์จะพร้อมใช้ในการทดสอบเมื่อเจริญเติบโตถึง 80% confluence นำมาทดสอบด้วยสารสกัดน้ำและเอทานอลจากพืชทั้ง 5 ชนิด ทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในช่วงเวลา 6, 24, 48, 72, 96, และ 120 ชั่วโมงและติดตาม การเกิด Morphological changes แบบ apoptotic body และ single large vesicle ซึ่งเป็น ลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่เข้าสู่กระบวนการ apoptosis ขณะเดียวกันการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ของเซลล์แบบอื่นๆ อาทิ การหดตัวลง รูปร่างที่บิดเบี้ยว การเกิด nuclear condensation และ เศษเซลล์ที่แตกกระจายอยู่ทั่วไป จะถูกบันทึกด้วยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้ในการ วิเคราะห์ต่อไป

### 5.3 การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis โดยการติดตามการเกิด DNA fragmentation ของเซลล์มะเร็งทดสอบ

เซลล์มะเร็งจะถูกเพาะเลี้ยงใน 24 wells cell culture cluster (Costar, USA.) ที่ 10,000 cells/well ตามเงื่อนไขและวิธีการเหมือนที่อ้างอิงจาก พงศธร (2552) เซลล์จะพร้อมใช้ในการทดสอบเมื่อเจริญเติบโตถึง 80% confluence โดยนำมาทดสอบด้วยสารสกัดน้ำและ เอทานอล จากพืชทั้ง 5 ชนิด ทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในช่วงเวลา 6, 24, 48, 72, 96, และ 120 ชั่วโมง และติดตามการเกิด DNA fragmentation ซึ่งเป็นข้อมูลยืนยันความสามารถของสารสกัดนั้นๆที่มีต่อการชักนำให้เซลล์ทดสอบเกิด apoptosis ด้วยการแตกเซลล์ทดสอบด้วย lysis buffer จากนั้น treat ด้วย 1 มก./มล. proteinase-K บ่มเพาะที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นทำ heat inactivation ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ว treat ด้วย 1 มก./มล. RNase-A บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทำ salting out แล้วปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที (ที่อุณหภูมิต่ำ) ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนจะละลายตะกอน DNA ที่ได้ด้วย TE buffer pH. 8.4 จากนั้นทำ electrophoresis โดยใช้ 2.0% agarose (Vivantis, USA.) และ 1x TAE buffer ถ่ายรูปเพื่อบันทึกผลการทดลอง

### สถานที่ดำเนินการเก็บข้อมูล

พื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน แม่ฮ่องสอน และเชียงราย  
 ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สถาบันวิจัย  
 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ห้องปฏิบัติการสาขาพืชสวน และห้องปฏิบัติการกลางคณะ  
 เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

### 1. การเก็บตัวอย่างและเก็บข้อมูล

สำหรับการวิจัยระยะที่ 1 ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่าง รวมทั้งเก็บข้อมูลเบื้องต้นของ ผักและผลไม้พื้นบ้าน ได้แก่ ฝอยทอง ผักแปม ผักหนาม สะแล มะแพนและมะใจัก จากพื้นที่ภาคเหนือตอนบนโดยเก็บตัวอย่างพืชในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และมีจังหวัดอื่นบ้างบางตัวอย่าง เริ่มเก็บในช่วงเดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2556 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่พืชดังกล่าวกำลังมีการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ ดอกและผล สำหรับช่วงเวลาการเก็บข้อมูลขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิด ดังนั้นการดำเนินงานวิจัยกับพืชหลายชนิดที่มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในช่วงเวลาวิจัย จึงต้องใช้ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างค่อนข้างมากและมีผลต่อระยะเวลาของการทดลองอื่นที่ต้องดำเนินการวิจัย ทำให้เป็นข้อเสียเพราะการเก็บตัวอย่างของพืชบางชนิดไม่ทันกับช่วงเวลาที่ให้ผลผลิต อีกทั้งบางพืชไม่มีผลผลิตหรือผลผลิตน้อยไม่เพียงพอต่อการนำมาวิจัย ได้แก่ มะแพนที่พบเพียง 1 ตัวอย่างในป่าบ้านแม่กำปอง อ. แม่ฮอน จ. เชียงใหม่ ส่วนมะใจักยังไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ โดยทั้งมะแพนและมะใจัก เป็นไม้ผลพื้นเมืองที่ส่วนใหญ่จะพบเจริญเติบโตอยู่ในป่า ทำให้การเก็บตัวอย่างทำได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นตัวอย่างพืชที่เก็บได้จึงเป็นผักพื้นเมืองที่พบได้ทั่วไป (ตารางที่ 7) สำหรับในระยะที่ 2 งานวิจัยจะดำเนินการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากระยะที่ 1

ตารางที่ 7 จำนวนต้นพันธุ์พืชที่รวบรวมมาจากพื้นที่ภาคเหนือตอนบน

| ชนิดของพืช | จำนวนต้นพันธุ์ |
|------------|----------------|
| ฝอยทอง     | 77             |
| ผักแปม     | 15             |
| ผักหนาม    | 20             |
| สะแล       | 18             |
| มะแพน      | 1              |

#### 1.1 สภาพพื้นที่ นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์

จากการสำรวจพืชพื้นบ้านทั้ง 6 ชนิด พบว่า พืชแต่ละชนิดจะมีลักษณะการเจริญเติบโตอยู่ในสภาพพื้นที่ไม่แตกต่างกันมากนัก สำหรับพืชที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติ ได้แก่ ผักหนามและฝอยทอง ส่วนผักแปมและสะแล เป็นผักพื้นบ้านที่เดิมเป็นพืชที่พบตามป่า แต่ได้ถูกนำออกมาปลูกโดยชาวบ้านทำให้ปัจจุบันไม่ต้องเก็บจากป่าแล้ว ดังนั้นนิเวศวิทยาและแหล่งอาศัยของผัก

ทั้ง 2 ชนิดนี้จึงเป็นพื้นที่ปลูกผักของชาวบ้าน ชาวบ้านนิยมปลูกผักเหล่านี้ไว้ในบริเวณบ้านหรือบริเวณสวนผลไม้ใกล้ๆบ้าน ขณะที่มะแฟนและมะโจ๊ก เป็นพืชที่เจริญเติบโตในป่า ซึ่งสภาพพื้นที่ นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ของพืชพื้นบ้านแต่ละชนิดสามารถอธิบายได้ดังนี้

### 1. ฝอยทอง

ฝอยทองเป็นผักพื้นบ้านที่ชาวบ้านบางพื้นที่นำมารับประทานเป็นอาหารและสมุนไพร โดยใช้ลวกรับประทานกับน้ำพริก ขณะที่การเกษตรจัดให้ฝอยทองเป็นวัชพืชเนื่องจากฝอยทองเป็นพืชพาราสิตที่อาศัยดูดกินน้ำและอาหารจากพืชชนิดอื่นเพื่อการเจริญเติบโต เกษตรกรจึงมีการกำจัดและทำลายทิ้งเพราะจะทำให้พืชที่ปลูกมีผลผลิตลดลงหรือตายไป ฝอยทองที่เก็บรวบรวมมาได้ส่วนใหญ่จึงเป็นฝอยทองที่เจริญเติบโตอยู่ตามต้นไม้ในป่ารกข้างถนนหรือสวนรกร้างที่มีพืชอื่นอาศัยอยู่และมีเพียง 2-3 ตัวอย่างที่พบอยู่ตามบริเวณบ้านและบริเวณสวนของเกษตรกร (ภาพที่ 3-5) ซึ่งจำนวนตัวอย่างฝอยทองที่เก็บมาได้แสดงดังตารางที่ 7



ภาพที่ 3 ฝอยทองที่พบริมรั้วบ้านของชาวบ้านที่ อ. สารภี จ. เชียงใหม่



ภาพที่ 4 ฝอยทองที่พบบริเวณร่องน้ำโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่



ภาพที่ 5 ฝอยทองที่พบร้วสวนของชาวบ้านที่ ต. สารภี อ. สารภี จ. เชียงใหม่

## 2. ผักแปม

ผักแปมเป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อย ขนาดเล็ก มีอายุหลายปี พบการกระจายพันธุ์ทั่วไปทั้งริมน้ำและพื้นที่ทั่วไปในป่า ชาวบ้านเก็บยอดอ่อนและใบอ่อนรับประทานเป็นผักสดคู่กับอาหารพวกลาบต่างๆ หรือนำไปแกง ยอดอ่อนและใบอ่อนมีกลิ่นหอมฉุน ปัจจุบันมีการนำมาปลูกตามบ้านและสวนของชาวบ้าน สภาพพื้นที่ปลูกมักเป็นสวนหลังบ้านและสวนครัว การดูแลรักษาไม่ยุ่งยากเพราะเป็นผักพื้นบ้านที่เจริญเติบโตได้ง่าย ไม่ต้องใช้ยากำจัดศัตรูพืช ราคาจำหน่าย กิโลกรัมละ 30-40 บาท ผักแปมเดิมมีผลผลิตในตลาดค่อนข้างน้อยเพราะชาวบ้านมักปลูกไว้รับประทานเอง แต่ปัจจุบันนี้ชาวบ้านเริ่มมีการปลูกไว้เพื่อจำหน่ายบ้างแต่ยังปลูกไม่แพร่หลายเนื่องจากลำต้นและกิ่งก้านของผักแปมมีหนามแหลม ทำให้ยากต่อการเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผักแปมที่ชาวบ้านปลูกไว้ใน อ. สารภี จ. เชียงใหม่

### 3. ผักหนาม

ในธรรมชาติมักพบผักหนามเจริญเติบโตอยู่ตามริมน้ำ ลำคลอง และพื้นที่ชุ่มชื้น จึงพบการกระจายพันธุ์อยู่ตามริมแม่น้ำลำคลองและเป็นพืชที่เจริญเติบโตเองตามธรรมชาติ ไม่ต้องดูแลเอาใจใส่ ชาวบ้านนิยมเก็บยอดตามริมน้ำไปปรุงอาหาร เช่น ยอดอ่อนหรือใบอ่อนนำไปลวกจิ้มน้ำพริก นำไปแกงหรือจ่อผักหนาม ไม่นิยมรับประทานสดเพราะมีสารประกอบที่เป็นพิษพวกไซยาไนด์จึงต้องผ่านการปรุงให้สุก ผักหนามในตลาดราคากิโลกรัมละ 40-60 บาท ผักหนามเดิมชาวบ้านไม่นิยมนำมาปลูกแต่ปัจจุบันเริ่มมีปริมาณลดลงเพราะตามแม่น้ำลำคลองเริ่มมีการปรับปรุงและพัฒนาให้ทันสมัยโดยการวางท่อคอนกรีต ทำให้พื้นดินด้านข้างริมน้ำที่มีผักหนามถูกขุดทิ้งไป ชาวบ้านจึงมีการนำมาปลูกไว้รับประทานและเพื่อจำหน่ายบ้าง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ผักหนามที่เจริญเติบโตตามริมคลองใน อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่

### 4. สะแล

สะแลเป็นพืชพวกไม้พุ่มกึ่งเลื้อย อายุหลายปี ออกดอกผลตามฤดูกาล สะแลพบได้ตามป่าเบญจพรรณทั่วไป มีการกระจายพันธุ์ในป่าโดยพบได้มากในป่าทางภาคเหนือ ปัจจุบันมีการนำไปเป็นพืชปลูกตามบ้านเรือน สภาพพื้นที่ในการปลูกสะแลพบว่า ชาวบ้านนิยมปลูกไว้ในสวนหลังบ้านและในสวนผลไม้ สะแลเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ง่ายไม่ต้องคอยดูแลเอาใจใส่มาก ชาวบ้านนิยมนำช่อดอกอ่อนมาปรุงอาหาร เช่น แกงสะแลใส่ปลาแห้ง ช่อดอกอ่อนสะแลตอนเพิ่งเริ่มออกใหม่ ราคาค่อนข้างสูงจำหน่ายในตลาดราคากิโลกรัมละ 150-200 บาท ทำให้มีเกษตรกรนำสะแลไปปลูกไว้เพื่อจำหน่าย สร้างรายได้เสริม (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 สะแลที่ปลูกในสวนของเกษตรกร อ. สารภี จ. เชียงใหม่

## 5. มะแฟน

มะแฟนเป็นไม้ผลยืนต้นขนาดกลาง ให้ผลผลิตตามฤดูกาล สภาพพื้นที่อยู่อาศัยพบว่าการเจริญเติบโตอยู่ในป่าเบญจพรรณ ชาวบ้านไม่นิยมนำมาปลูกจึงมีการกระจายพันธุ์อยู่ในป่า พอถึงช่วงผลแก่ ชาวบ้านมักเข้าไปเก็บจากป่ามาจำหน่าย ราคา กิโลกรัมละ 20-30 บาท แต่ผลผลิตที่จำหน่ายมีปริมาณน้อย เนื่องจากมีความยากลำบากในการเก็บเกี่ยวและหาได้ยาก ซึ่งจากการเก็บตัวอย่างในงานวิจัยนี้สามารถเก็บได้เพียงตัวอย่างเดียว เนื่องจากมีอุปสรรคในการเข้าป่าที่ค่อนข้างลำบาก และการเก็บพืชจากป่าต้องมีการขออนุญาตจากส่วนงานของกรมอุทยานสัตว์ป่าและพันธุ์พืช ชาวบ้านที่บ้านแม่กำปอง อ.แม่ฮอน จ.เชียงใหม่ จึงช่วยเก็บตัวอย่างของใบและผลมาให้ศึกษาวิจัย

### 1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสัณฐานวิทยาของพืชพื้นบ้าน

การเก็บข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสัณฐานวิทยาของพืชพื้นบ้าน 5 ชนิด เป็นการเก็บข้อมูลลักษณะใบ ลักษณะผล รูปทรงผล รูปทรงใบ การเจริญเติบโตทั่วไป เป็นต้น ซึ่งแยกอธิบายตามพืชพื้นบ้านแต่ละชนิดดังนี้

#### 1. ฝอยทอง

ลักษณะทั่วไป

ฝอยทองมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cuscuta* spp. อยู่ในวงศ์ Convolvulaceae (Yuncker, ๑๙๓๒) ฝอยทองเป็นพืชที่มีลำต้นมีลักษณะกลมเป็นเถาเลื้อย ผิวเรียบ ไม่มีใบ เถามีหลายสี

ได้แก่ สีเหลืองทอง สีเหลืองปนเขียว สีเหลืองส้ม มักเลื้อยพันกับพืชอาศัยชนิดต่างๆ และเจริญเติบโตได้จากดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชอาศัยโดยใช้อวัยวะพิเศษที่เรียกว่า haustoria แทงเข้าไปในกิ่งก้านและใบของพืชอาศัยซึ่งพืชอาศัยที่พบส่วนใหญ่เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ อาทิ ต้นชา สกเกี้ยน ต้นลำไย ต้นพุทรา ปอสา และพืชที่มีใบเลี้ยงคู่ต่างๆ เป็นต้น ฝอยทองที่พบจากการสำรวจมีอยู่ 2 กลุ่มได้แก่ ฝอยทองที่ลำต้นเป็นเถาเส้นเล็กๆ เส้นผ่าศูนย์กลางขนาดประมาณ 0.5–1.3 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ลำต้นเป็นเถาเส้นใหญ่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดประมาณ 1.8–3.5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 9–12)



ภาพที่ 9 ลักษณะลำต้นของฝอยทองเส้นใหญ่



ภาพที่ 10 ลักษณะลำต้นของฝอยทองเส้นเล็ก



ภาพที่ 11      Haustoria ของต้นฝอยทองเส้นใหญ่



ภาพที่ 12      Haustoria ของต้นฝอยทองเส้นเล็ก

### ลักษณะดอก

ดอกของฝอยทองลำต้นแบบเส้นใหญ่ ดอกออกเป็นช่อเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดอกมีลักษณะเป็นหลอด ปลายดอกแยกออกจากกัน มีกลีบดอกสีขาวค่อนข้างหนาจำนวน 5 กลีบ ดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5–3.5 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้มี 5–6 อัน อับละอองเรณูมีสีส้มเหลือง ก้านชูอับละอองเรณูมีขนาดสั้นและติดอยู่ระหว่างกลีบดอก ส่วนฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็กเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ดอกเป็นช่อแบบกระจุก มีดอกย่อยจำนวนมาก ลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลมขนาดเล็กมาก ดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.0–3.0 มิลลิเมตร มีกลีบดอกสีขาวบาง จำนวน 5 กลีบ เกสรตัวผู้มี 5 อัน อับละอองเรณูสีเหลือง เมื่อดอกบานก้านชูอับละอองเรณูยาวโผล่พ้นกลีบดอก (ภาพที่ 13–16)



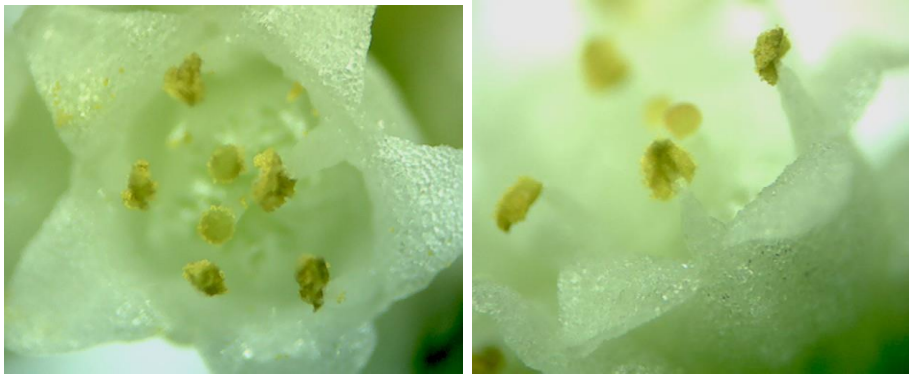
ภาพที่ 13 ลักษณะช่อดอกและดอกของฝอยทองลำต้นแบบเส้นใหญ่



ภาพที่ 14 ลักษณะเกสรตัวผู้และอับละอองเรณูของฝอยทองลำต้นแบบเส้นใหญ่



ภาพที่ 15 ลักษณะช่อดอกและดอกของฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็ก



ภาพที่ 16 ลักษณะเกสรตัวผู้และอับละอองเรณูของฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็ก

### ลักษณะผล

ผลของฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็กมีลักษณะกลม หรือค่อนข้างกลม ผลอ่อนมีสีเขียวอ่อน ผลแก่มีสีเขียวหรือสีเขียวเข้ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.35 เซนติเมตร เมื่อแก่และแห้งมีสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลอ่อน ภายในประกอบด้วยเมล็ดสีน้ำตาลอ่อน หรือสีน้ำตาลดำ รูปไข่ ขนาดประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ในผล 1 ผลมีประมาณ 3-4 เมล็ด ส่วนผลของฝอยทองลำต้นแบบเส้นใหญ่มีลักษณะกลม สีเขียว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.50-0.85 เซนติเมตร ออกดอกช่วงเดือนกันยายน ถึง พฤศจิกายน (ภาพที่ 17-19) จากการสำรวจพบฝอยทองลำต้นแบบเส้นใหญ่ติดผลเพียง 3 ตัวอย่าง ขณะที่ตัวอย่างส่วนใหญ่ที่เก็บมายังไม่ติดผล อาจเป็นเพราะช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างไม่ได้อยู่ในช่วงออกดอกและติดผล นอกจากนี้ ตัวอย่างที่ติดผลหลังจากสำรวจแล้วจะกลับไปเก็บผลแก่เพื่อนำเมล็ดมาศึกษา ไม่สามารถทำได้ เพราะชาวบ้านมีการทำลายทิ้งจึงไม่สามารถเก็บเมล็ดได้ ซึ่งต่างกับฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็กที่ติดดอกออกผลจำนวนมาก



ภาพที่ 17 ลักษณะผลของฝอยทองลำต้นแบบเส้นใหญ่



ภาพที่ 18 ลักษณะผลของฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็ก



ภาพที่ 19 ลักษณะเมล็ดของฝอยทองลำต้นแบบเส้นเล็ก

## 2. ผักแปม

### ลักษณะทั่วไป

ผักแปมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Eleutherococcus trifolius* (L.) S.Y.Hu อยู่ในวงศ์ Araliaceae ลักษณะเป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อย ขนาดเล็ก อายุหลายปี ลักษณะลำต้นเป็นเถาเลื้อย ทั้งลำต้น กิ่งก้านและใบมีหนามแหลม ขนาดของลำต้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1-3 เซนติเมตร ความสูงอาจถึง 2-3 เมตร ขึ้นกับปลายยอดที่เลื้อย (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 ลักษณะลำต้นของผักแปม

#### ลักษณะใบ

ใบมีสีเขียว ใบเป็นใบประกอบแบบนิ้วมือ มี 5 ใบย่อย ขอบใบเป็นรูปฟันเลื่อย ใบย่อยแต่ละใบขนาดไม่เท่ากัน ใบย่อยรูปไข่ หรือรูปหอก ใบมีขนหรือหนามสีขาวขนาดเล็กขึ้นตามเส้นใบทั้งด้านบนและด้านใต้ใบ (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ลักษณะใบของผักแปม

#### ลักษณะดอก

ดอกออกเป็นช่อแบบซี่ร่ม ช่อดอกหนึ่งช่อประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก จากที่สำรวจพบดอก 1 ช่อว่ามีจำนวนดอกตั้งแต่ 17-43 ดอก ขึ้นอยู่กับขนาดของช่อดอก ดอกมีสีเขียวอ่อน หรือเขียวปนเหลือง ขนาดเล็กประมาณ 2.0-3.0 มิลลิเมตร ก้านดอกมีความยาวประมาณ 0.7-1.2 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร ก้านช่อ

ดอกมีความยาวประมาณ 2.3–4.0 เซนติเมตร ขนาดประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ช่อดอกเกิดตามยอดและซอกใบ (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 ลักษณะช่อดอกและดอกของผักแปม

### 3. ผักหนาม

ลักษณะทั่วไป

ผักหนามมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lasia spinosa* (L.) Thw. อยู่ในวงศ์ Araceae เป็นพืชล้มลุก พบตามบริเวณริมแม่น้ำ ลำคลอง ที่ชุ่มชื้น ยอดแทงขึ้นมาจากเหง้าที่อยู่ใต้ดิน สามารถแตกไหลเพื่อเป็นต้นใหม่ได้ ทุกส่วนของต้นมีหนาม ต้นสูงได้ถึง 1.5 เมตร (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ลักษณะต้นผักหนาม

### ลักษณะใบ

ใบผักหนามมีสีเขียวเข้ม เป็นใบเดี่ยว มีหลายรูปทรงและหลายขนาด มีทั้งใบรูปหัวใจ ใบเป็นแฉก ใบหยักเป็นรูปต่างๆ ใบมีหนามโดยเฉพาะด้านใต้ใบ ผักหนามหนึ่งต้นจะมีใบ 1-3 ใบ ก้านใบกลมและยาวได้ถึง 1 เมตร (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ลักษณะรูปทรงใบผักหนาม

### ลักษณะดอก

ดอกของผักหนามมีลักษณะเป็นช่อ ก้านดอกยาว กาบหุ้มช่อดอกสีม่วงแดงหรือสีน้ำตาลม่วง ปลายแหลมยาวหุ้มดอกไว้ ดอกย่อยรวมกันแต่งเป็นรูปทรงกระบอก สีชมพูม่วง ยาวประมาณ 3-4 ซม. ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ออกดอกช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ลักษณะดอกของผักหนาม

#### ลักษณะผล

ผลของผักหนาม หลังจากดอกได้รับการผสมแล้วก็พัฒนาเป็นผลอยู่บนก้านดอก ผลค่อนข้างกลม ผิวขรุขระ สีเขียว ผลแก่สีน้ำตาล เมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 ลักษณะผลและเมล็ดของผักหนาม

#### 4. สะแล

##### ลักษณะทั่วไป

สะแลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Broussonetia Kurzii* (Hook.f.) Corner อยู่ในวงศ์ Moraceae ลักษณะเป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อย อายุหลายปี มีการผลัดใบเพื่อออกดอก ลำต้นแตกกิ่งก้านจำนวนมาก (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 ลักษณะต้นของสะแลที่กำลังออกดอก

#### ลักษณะใบ

สะแลมีใบสีเขียวเข้ม ออกตามกิ่งเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ใบเป็นรูปไข่ ยาว ปลายใบมีลักษณะเป็นติ่งแหลม โคนใบมน ขอบใบหยัก ใบจะร่วงก่อนที่ออกดอก (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ลักษณะใบของสะแล

#### ลักษณะดอก

การออกดอกของสะแล ปกติสะแลออกดอกช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ โดยใบสะแลจะร่วงแล้วดอกจะขึ้นมาแทนตรงส่วนยอดและใบ จากการสำรวจดอกสะแลมีอยู่ 2 แบบ คือ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย แยกกันอยู่คนละต้น ดอกเพศเมียจะมีค่อนข้างกลมสีเขียว

เข็ม ออกเป็นช่อแยกแขนง (สะแลป้อม) ดอกเพศผู้เป็นช่อเชิงหลั่น ค่อนข้างยาว (สะแลยาว)  
(ภาพที่ 29-30)



ภาพที่ 29 ลักษณะดอกสะแลที่ออกมาจากกิ่งก้าน



ภาพที่ 30 ลักษณะดอกสะแลต้นเพศเมีย



ภาพที่ 31 ลักษณะดอกสะแลต้นเพศผู้

## 5. มะแฟน

### ลักษณะทั่วไป

มะแฟนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Protium serratum* Engl. อยู่ในวงศ์ Burseraceae  
ลักษณะเป็นไม้ยืนต้น อายุหลายปี ค่อนข้างสูง ความสูงของต้นประมาณ 15-20 เมตร พบได้ในป่าเบญจพรรณทั่วไป (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 ลักษณะต้นของมะแฟน

### ลักษณะใบ

มะแฟนมีใบสีเขียวเข้ม เป็นใบประกอบแบบขนนก ใบเรียวยาว ปลายมีติ่งแหลม ขอบใบเรียบ (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 ลักษณะใบของมะแฟน

### ลักษณะผลและเมล็ด

ผลของมะแฟนมีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร รสชาติเปรี้ยว ลักษณะผลค่อนข้างกลม ด้านบนแหลม สีม่วงแดง มีเนื้อผลสีขาวฟูติดกับเมล็ด มีเมล็ดประมาณ 2-3 เมล็ดต่อผล เมล็ดสีน้ำตาลอ่อนขนาดเล็กประมาณ 0.5 เซนติเมตร เปลือกหุ้มค่อนข้างแข็ง (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 ลักษณะผล เนื้อผลและเมล็ดของมะแฟน

## 2. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการ

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผักพื้นบ้านแต่ละชนิด ทำโดยส่งตัวอย่างผักที่เก็บจากบางพื้นที่และบางต้นพันธุ์เท่านั้นไปวิเคราะห์เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ต้องใช้ตัวอย่างผักน้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม ในงานวิจัยระยะที่ 1 นี้ได้ทำการวิเคราะห์เพียง 2 พืช ที่มีปริมาณของตัวอย่างเพียงพอ คือ ฝอยทองและผักหนาม สำหรับผักแปม และสะแล มีปริมาณตัวอย่างไม่เพียงพอสำหรับวิเคราะห์ เนื่องจากตัวอย่างส่วนใหญ่นำไปใช้ในการอบเพื่อทำสารสกัดหยาบสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ส่วนมะแฟนได้ตัวอย่างผลมาน้อยมากไม่เพียงพอสำหรับการทดลองใดๆ การวิเคราะห์

องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของฝอยทองนั้นใช้ส่วนของลำต้นและยอดของฝอยทองเส้นใหญ่ (SP01) ขณะที่ผักหนามใช้ส่วนของยอดและใบอ่อน (L01)

ผลจากการวิเคราะห์ฝอยทองเส้นใหญ่ดังตารางที่ 8 และ 9 โดยพบว่า ปริมาณแอนติออกซิแดนซ์ทั้งหมดที่พบเท่ากับ 215 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และปริมาณโพลีฟีนอล 9.38 มิลลิกรัมต่อกรัม จึงจัดว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระในระดับค่อนข้างสูง ส่วนด้านคุณค่าทางโภชนาการ ของฝอยทองเส้นใหญ่ต่อน้ำหนัก 100 กรัม พบว่ามีปริมาณโซเดียม 12.86 มิลลิกรัม แคลเซียม 26.80 มิลลิกรัม เหล็ก 0.468 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 45.40 มิลลิกรัม และโพแทสเซียม 226.20 มิลลิกรัม โปรตีน 1.40 กรัม ซึ่งปริมาณธาตุอาหารเหล่านี้ที่พบจัดว่าอยู่ในปริมาณที่สูง และยังมีวิตามินประกอบด้วยวิตามิน เอ 1.18 ไมโครกรัม และวิตามินบี 2 0.25 มิลลิกรัม จากผลจากการวิเคราะห์นี้พบว่า ฝอยทองที่เป็นพืชปาราลิต หรือวัชพืช มีคุณค่าทางโภชนาการไม่น้อยกว่าพืชพื้นบ้านชนิดอื่น

**ตารางที่ 8** ปริมาณแอนติออกซิแดนซ์ทั้งหมด (Total Antioxidant ) และปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol) ของฝอยทองเส้นใหญ่\*

| ตัวอย่าง    | ปริมาณแอนติออกซิแดนซ์ทั้งหมด (มก. /100 ก.) | ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (มก. / ก.) |
|-------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|
| ฝอยทอง SP01 | 215.00                                     | 9.38                              |

\*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

**ตารางที่ 9** ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของฝอยทองเส้นใหญ่\*

| รายการวิเคราะห์ (หน่วย ต่อ 100 ก.) | SP01  | รายการวิเคราะห์ (หน่วย ต่อ 100 ก.) | SP01   |
|------------------------------------|-------|------------------------------------|--------|
| โปรตีน (ก.)                        | 1.40  | เหล็ก (มก.)                        | 0.468  |
| คาร์โบไฮเดรต (ก.)                  | 9.31  | ฟอสฟอรัส (มก.)                     | 45.40  |
| ใยอาหาร (ก.)                       | 5.08  | โพแทสเซียม (มก.)                   | 226.20 |
| น้ำตาล (ก.)                        | 2.59  | วิตามิน เอ (มคก.)                  | 1.18   |
| โซเดียม (มก.)                      | 12.86 | วิตามิน บี 1 (มก.)                 | 0.03   |
| แคลเซียม (มก.)                     | 26.8  | วิตามิน บี 2 (มก.)                 | 0.025  |

\*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

สำหรับผลจากการวิเคราะห์ผักหนาม (L01) ดังตารางที่ 10 และ 11 โดยพบว่า ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดที่พบในยอดและใบอ่อน เท่ากับ 22.40 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด 15.48 มิลลิกรัมต่อกรัม จัดว่าผักหนามมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูงในส่วนของปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด ส่วนด้านคุณค่าทางโภชนาการ ยอดและใบอ่อนของผักหนามมีปริมาณโซเดียม 14.10 มิลลิกรัม แคลเซียม 75.40 มิลลิกรัม เหล็ก 0.89 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 37.60 มิลลิกรัม และโพแทสเซียม 353.60 มิลลิกรัม ซึ่งปริมาณธาตุอาหารเหล่านี้ที่พบในผักหนามจัดว่าอยู่ในปริมาณที่สูงโดยเฉพาะ โพแทสเซียมและแคลเซียม นอกจากนี้ผักหนามยังมีวิตามินประกอบด้วยวิตามิน เอ 2.31 ไมโครกรัม วิตามินอี 1.22 มิลลิกรัม วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ผลจากการวิเคราะห์นี้ ผักหนามจึงเป็นผักพื้นบ้านที่มีคุณค่าทางอาหารสูง

**ตารางที่ 10** ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant ) และปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol) ของผักหนาม\*

| ตัวอย่าง    | ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (มก. /100 ก.) | ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (มก. / ก.) |
|-------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|
| ผักหนาม L01 | 22.40                                      | 15.48                             |

\*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

**ตารางที่ 11** ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของผักหนาม\*

| รายการวิเคราะห์ (หน่วย ต่อ 100 ก.) | L01   | รายการวิเคราะห์ (หน่วย ต่อ 100 ก.) | L01    |
|------------------------------------|-------|------------------------------------|--------|
| โปรตีน (ก.)                        | 2.20  | ฟอสฟอรัส (มก.)                     | 37.60  |
| คาร์โบไฮเดรต (ก.)                  | 2.54  | โพแทสเซียม (มก.)                   | 353.60 |
| ใยอาหาร (ก.)                       | 1.93  | วิตามิน เอ (มคก.)                  | 2.31   |
| น้ำตาล (ก.)                        | -     | วิตามิน อี (มก.)                   | 1.22   |
| โซเดียม (มก.)                      | 14.1  | วิตามิน บี1 (มก.)                  | 0.028  |
| แคลเซียม (มก.)                     | 75.40 | วิตามิน บี2 (มก.)                  | 0.022  |
| เหล็ก (มก.)                        | 0.89  |                                    |        |

\*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

### 3. การขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมต้นพันธุ์

ในระยะที่ 1 หลังจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นพันธุ์แล้วก็นำเอาส่วนที่ขยายพันธุ์ได้ของผักพื้นบ้านแต่ละชนิดมาปลูกรวบรวมไว้เพื่อทำการวิจัยทั้งในระยะที่ 1 และสำหรับการวิจัยในระยะที่ 2 ซึ่งผักพื้นบ้านแต่ละชนิดก็มีการขยายพันธุ์ที่แตกต่างกันไปตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤกษศาสตร์ของผักชนิดนั้น

#### 3.1 ฝอยทอง

การขยายพันธุ์ของฝอยทองทั่วไปใช้เมล็ด หรือส่วนของลำต้นที่ขาดเป็นท่อนๆ ฝอยทองเป็นพืชปาราลิต และเป็นวัชพืชที่มีการขยายพันธุ์ได้รวดเร็วมากถ้าอาศัยอยู่กับพืชที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง ฝอยทองต้องดูดน้ำและอาหารจากพืชอาศัยเพื่อการเจริญเติบโต พืชอาศัยของฝอยทองมีหลากหลายชนิด จากงานวิจัยนี้ไม่ได้ปลูกและเก็บรวบรวมต้นพันธุ์ของฝอยทองไว้เนื่องจากหากมีการแพร่กระจายพันธุ์ของฝอยทองเกิดขึ้นจะยุ่งยากในการจัดการภายหลัง

#### 3.2 ผักแปม

ผักแปมสามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี วิธีที่นิยมคือการเพาะเมล็ดและการปักชำกิ่ง แต่เนื่องจากการสำรวจยังไม่พบผักแปมที่ติดเมล็ด อีกทั้งการเพาะเมล็ดมีข้อเสียคือทำให้ได้ต้นใหม่ที่ไม่ตรงตามพันธุ์ ในงานวิจัยนี้จึงทำการขยายพันธุ์โดยวิธีการปักชำกิ่ง ดังนั้นในระยะที่ 1 หลังจากเก็บตัวอย่างผักแปม ได้นำส่วนของกิ่งมาขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมพันธุ์ ซึ่งกิ่งที่ใช้ปักชำยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร และปักชำลงบนวัสดุเพาะที่ประกอบด้วยทรายและขี้เถ้า แกลบ พอกิ่งชำมีการพัฒนาร่างยอด ใบและรากจึงย้ายไปปลูกในกระถางที่มีดินปลูก โดยระยะเวลาการปักชำกิ่งใช้เวลาประมาณ 30-45 วัน จึงย้ายปลูกได้ ต้นใหม่จากกิ่งชำที่ได้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 35 และ 36)



ภาพที่ 35 การปักชำกิ่งผักแปม



ภาพที่ 36 ต้นผักแปมจากกิ่งชำกำลังแตกยอดใหม่

### 3.3 ผักหนาม

การขยายพันธุ์ผักหนามสามารถทำได้โดยการเพาะเมล็ดและการแยกเหง้าจากต้นเดิม จากงานวิจัยครั้งนี้ใช้การแยกส่วนเหง้ามาจากต้นเดิมและการนำเหง้าตัดเป็นท่อนมาปลูก ซึ่งทำได้ง่ายกว่าการเพาะเมล็ดเนื่องจากการสำรวจที่ผ่านมา พบจำนวนต้นผักหนามที่ติดผลน้อยมาก สำหรับระยะเวลาตั้งแต่การนำเหง้ามาปลูกจนแทงยอดใหม่ใช้เวลาประมาณ 30 วัน ยอดใหม่ก็แทงออกมาแล้วพัฒนาเป็นใบที่เจริญเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 14 วัน ผักหนามทั้งต้นจะมีใบประมาณ 1-3 ใบ (ภาพที่ 37-38)



ภาพที่ 37 ต้นผักหนามที่นำไปปลูก



ภาพที่ 38 ต้นผักหนามที่มียอดและใบใหม่

### 3.4 สะแล

สะแลขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด และการปักชำกิ่ง โดยทั่วไปชาวบ้านใช้การปักชำกิ่ง ในงานวิจัยนี้ขยายพันธุ์ด้วยการปักชำกิ่ง โดยนำกิ่งเพสลาดความยาวประมาณ 25-30 เซนติเมตร มาปักชำลงในถุงดำที่มีวัสดุเพาะที่ประกอบด้วยทรายและขี้เถ้าแกลบ พอกิ่งชำเกิดยอดและราก จึงย้ายต้นใหม่ไปปลูกในแปลง ระยะเวลาการปักชำประมาณ 45-60 วัน สำหรับในระยะที่ 1 สะแลที่สำรวจได้ เป็นสะแลที่มาจากสวนหรือตามบริเวณบ้านของชาวบ้านที่ปลูกไว้ เพื่อนำช่อดอกอ่อนมาปรุงอาหาร โดยต้นสะแลส่วนใหญ่เป็นต้นที่ให้ดอกเพศเมียซึ่งเป็นดอกชนิดที่ชาวบ้านนิยมนำมารับประทาน มีเพียงบางสวนที่ปลูกต้นที่ให้ดอกเพศผู้ ดังนั้นจึงไม่มีเมล็ดสะแลที่เกิดจากการผสมพันธุ์ของต้นเพศผู้และเพศเมียเลย งานนี้ทำได้เพียงเก็บรวบรวมกิ่งพันธุ์มาปักชำเพื่อปลูกรวบรวมและนำไปใช้งานทดลองส่วนอื่นๆต่อไป ซึ่งการปักชำกำลังอยู่ระหว่างดำเนินการในระยะที่ 2 (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 39 การปักชำกิ่งสะแล

### 3.5 มะแฟน

มะแฟนโดยธรรมชาติขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดที่ร่วงหล่นจากผลแก่อยู่บนต้น และที่นกกินผลและทิ้งเมล็ดลงมา เมื่อเมล็ดหล่นลงสู่พื้นดินและได้รับความชื้นที่เหมาะสม เมล็ดก็จะงอกและพัฒนาเป็นมะแฟนต้นเล็กๆเกิดขึ้นตามพื้นดินในป่า ในงานวิจัยนี้ได้นำเมล็ดจากผลแก่ที่ชาวบ้านเก็บมาให้จากป่าบ้านแม่กำปอง อ. แม่ฮอน จ. เชียงใหม่ มาทำการเพาะเมล็ดลงในถุงดำที่มีวัสดุเพาะประกอบด้วยทรายและขี้เถ้ากลบ ระยะเวลาตั้งแต่การเพาะเมล็ดจนถึงมีใบแท้คู่แรก ประมาณ 40-60 วัน เนื่องจากเมล็ดมะแฟนมีเปลือกแข็งจึงใช้เวลาค่อนข้างนาน เมื่อเมล็ดงอกและเจริญเป็นต้นมะแฟนขนาดเล็กจึงทำการย้ายลงในกระถาง ต้นมะแฟนที่กำลังเจริญเติบโตและสูงประมาณ 25-30 เซนติเมตร สามารถย้ายไปปลูกในแปลงได้ แต่ด้วยมะแฟนเป็นไม้ยืนต้นที่เจริญเติบโตในป่า การปลูกเพื่อให้ได้ผลผลิตอาจใช้เวลานาน 3-5 ปี ในงานวิจัยนี้จึงมีแต่การขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมไว้ในกระถางไม่มีการเก็บผลผลิต (ภาพที่ 40)



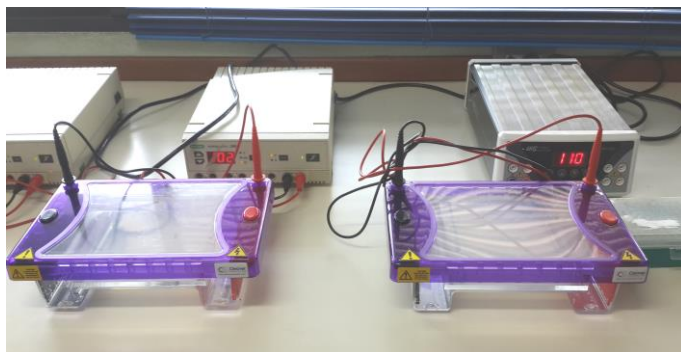
ภาพที่ 40 ต้นมะแฟนขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด

## 4. การศึกษาด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

### 4.1 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของ PCR Product

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ อะกาโรส เจล ที่ความเข้มข้น 1.5% ใน 0.5X TBE บัฟเฟอร์ และ ใช้ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA PCR Ladder (Fermentas) เป็น marker หรือ 100 bp DNA ladder H3 RTU (GeneDirex®) และ

ย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือใช้ Novel Juice (GeneDirex®) แล้วนำไปถ่ายภาพด้วยชุดถ่ายภาพเจลเพื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูล โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมจากโปรแกรม NTSYSpc ver. 2.2 (Rohlf, 2005) (ประทุมพร และคณะ, 2554)



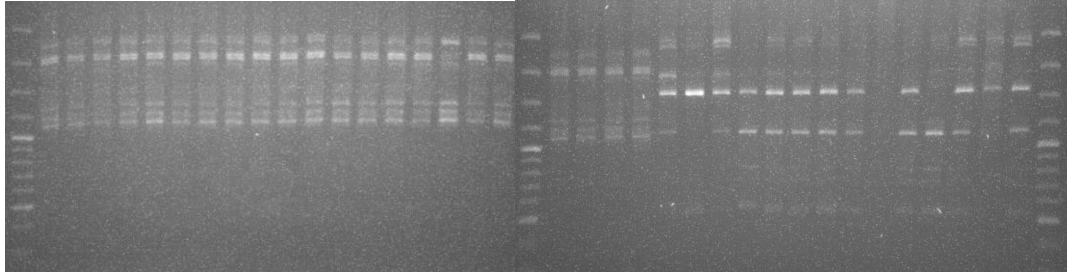
ภาพที่ 41 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของพืชพื้นบ้าน

## 4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

### 1. ฝอยทอง

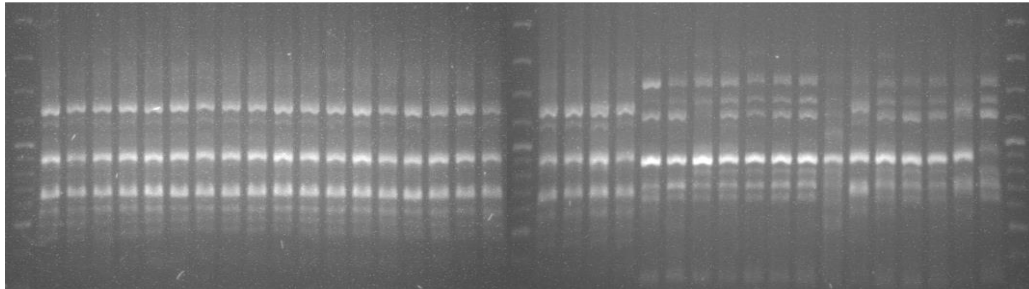
นำดีเอ็นเอของฝอยทองจำนวน 36 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ UBC จำนวน 6 ชนิด ที่คัดเลือกจากไพรเมอร์จำนวน 70 ชนิด ซึ่งไพรเมอร์แต่ละชนิดแสดงแถบ ดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ แสดงออกนี้ สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มฝอยทองแต่ละตัวอย่างว่ามีความคล้ายคลึงกันหรือ แตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน ทางพันธุกรรมของฝอยทองที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 M



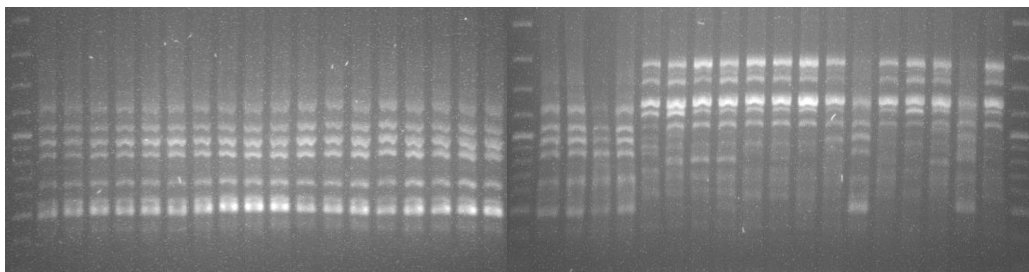
ภาพที่ 42 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไพรเมอร์ UBC-808

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 M



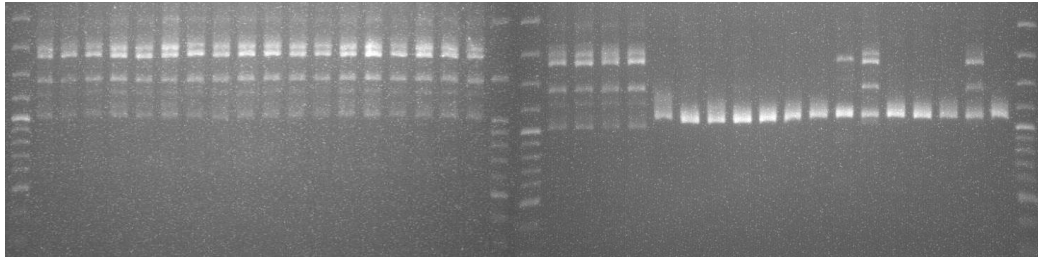
ภาพที่ 43 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไพรเมอร์ UBC-811

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 M



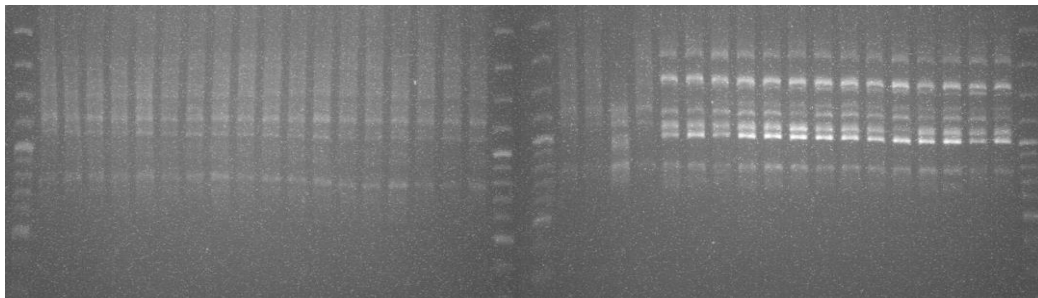
ภาพที่ 44 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไพรเมอร์ UBC-835

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 MM 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 M



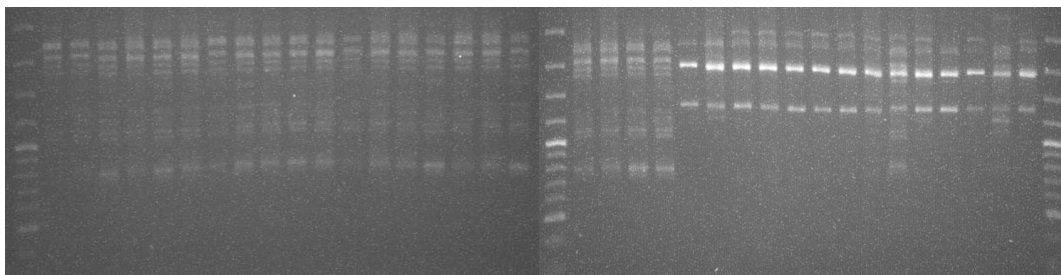
ภาพที่ 45 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไพรเมอร์ UBC-853

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M M 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 M



ภาพที่ 46 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไพรเมอร์ UBC-864

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 M

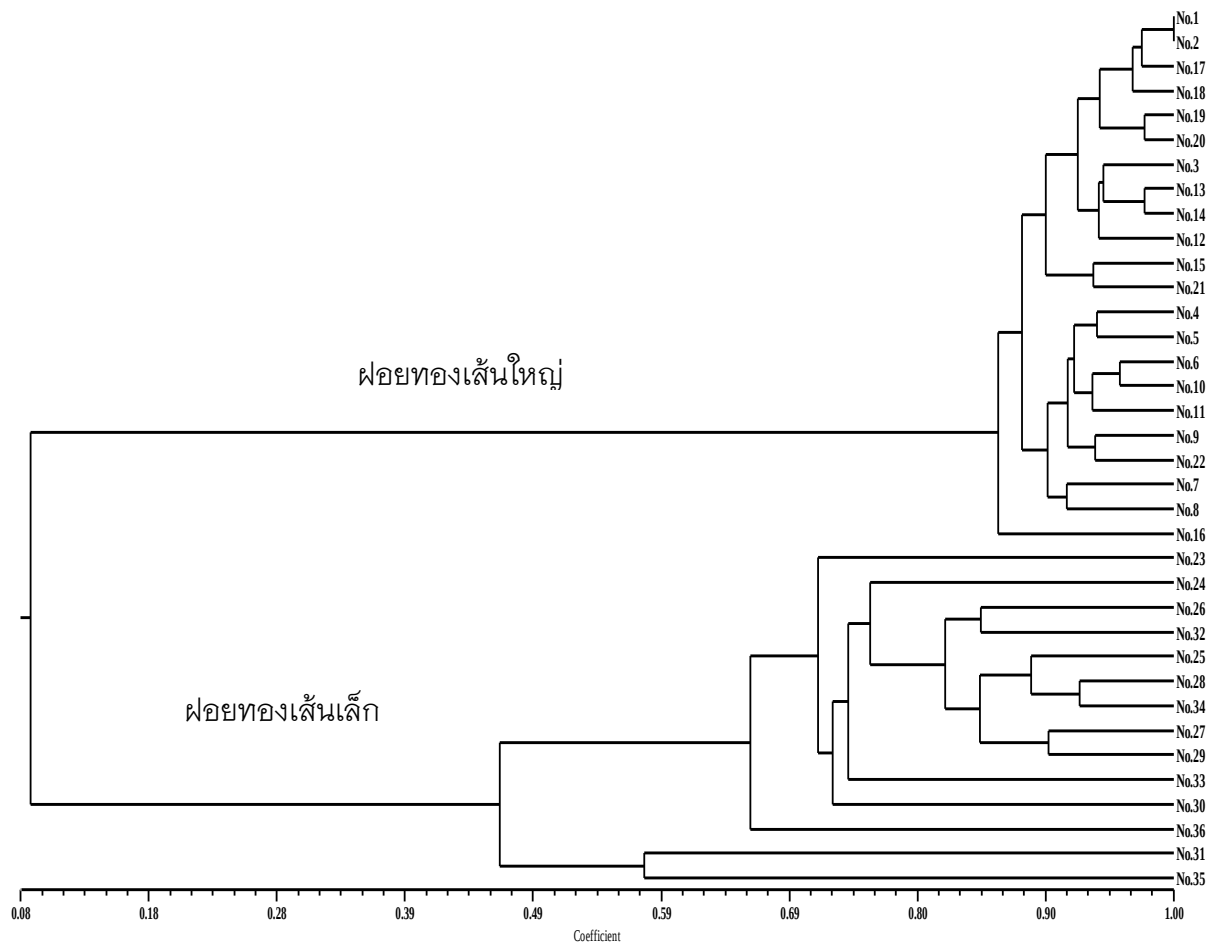


ภาพที่ 47 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจากไพรเมอร์ UBC-878

จากภาพที่ 42-47 และตารางที่ 12 การใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ UBC-808 UBC-811 UBC-835 UBC-853 UBC-864 และ UBC-878 เมื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอฝอยทอง จำนวน 36 ตัวอย่างพบว่า มีแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 93 แถบ เป็นแถบที่เหมือนกันจำนวน 2 แถบและแถบที่ต่างกันจำนวน 89 แถบ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (% polymorphism) เท่ากับ 97.84 และมีจำนวนแถบเฉลี่ย 15.50 แถบต่อไพรเมอร์ ผลของแถบดีเอ็นเอและเปอร์เซ็นต์ความต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถบอกได้ว่า ฝอยทองมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน เมื่อนำทุกไพรเมอร์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมร่วมกันในรูปแบบ Dendrogram ค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้สามารถแสดงการจัดกลุ่มและจำแนกประชากรฝอยทองได้ โดยฝอยทองที่นำมาจำแนกสามารถแยกได้เป็นสองชนิด แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างฝอยทองในชนิดเดียวกันกลับมีความคล้ายคลึงกันหรือมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมาก

**ตารางที่ 12** เปอร์เซนต์โพลิมอร์ฟิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของฝอยทองเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆ

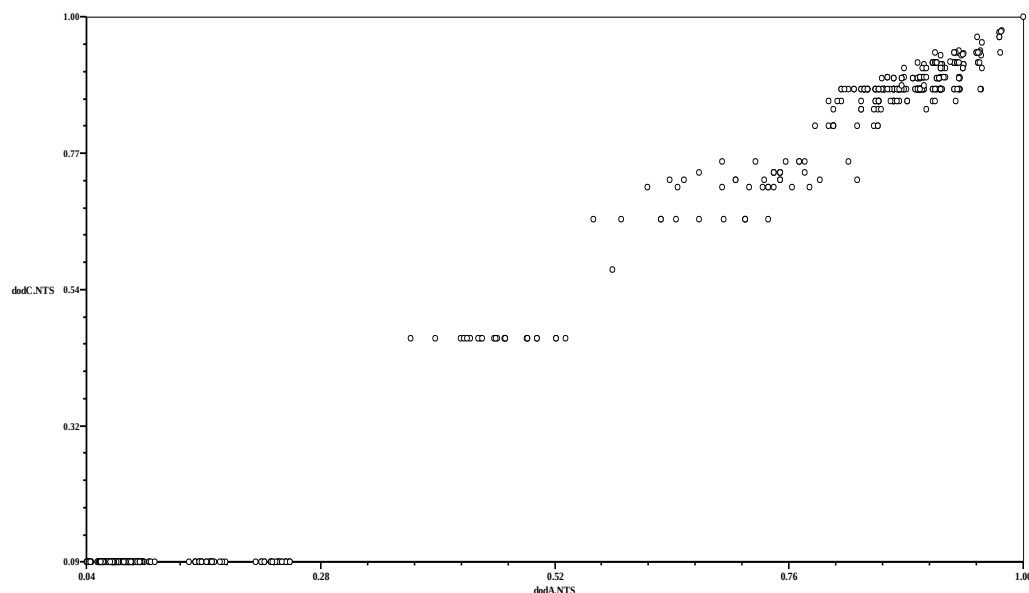
| ชนิดของ<br>ไพรเมอร์ | จำนวนแถบรวม<br>(Total band) | จำนวนแถบต่าง<br>(Polymorphic<br>band) | จำนวนแถบเหมือน<br>(Monomorphic<br>band) | % โพลิมอร์ฟิซึม<br>(% Polymorphism) |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|
| 808                 | 13                          | 13                                    | 0                                       | 100.00                              |
| 811                 | 21                          | 21                                    | 0                                       | 100.00                              |
| 835                 | 19                          | 18                                    | 1                                       | 94.73                               |
| 853                 | 11                          | 11                                    | 0                                       | 100.00                              |
| 864                 | 15                          | 14                                    | 1                                       | 93.33                               |
| 878                 | 14                          | 14                                    | 0                                       | 100.00                              |
| รวม                 | 93                          | 89                                    | 2                                       | 97.84                               |



ภาพที่ 48 Dendrogram ของฝอยทองจากโพร์เมอร์ 6 ชนิด

สำหรับ Dendrogram และ ค่า similarity matrix (ภาพที่ 48) ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของฝอยทองจำนวน 36 ตัวอย่างโดยใช้โพร์เมอร์ 6 ชนิดร่วมกันพบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.09–1.00 ซึ่งผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ฝอยทองสามารถจัดกลุ่มและจำแนกชนิดได้สองกลุ่มหรือสองชนิดอย่างชัดเจนที่ค่าสัมประสิทธิ์ที่ 0.47 ฝอยทองแต่ละตัวอย่างไม่ได้แสดงความสัมพันธ์กับพื้นที่เก็บ ซึ่งเป็นไปได้ว่าตัวอย่างฝอยทองภายในกลุ่มอาจมีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมในเชิงเครือญาติหรือมีการพัฒนามาจากสายต้นเดียวกัน เพราะมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมน้อยจึงทำให้ตัวอย่างฝอยทองในแต่ละชนิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ฝอยทองกลุ่มที่มีลำต้นเป็นเถาเส้นเล็กมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันมากกว่าฝอยทองกลุ่มที่มีลำต้นเถาเส้นใหญ่ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทำให้ยืนยันได้ว่า ฝอยทองลำต้นเส้นใหญ่กับลำต้นเส้นเล็กที่พบจากการสำรวจในงานวิจัยครั้งนี้เป็นฝอยทองคนละชนิด

กันโดยฝอยทองเส้นใหญ่เป็นชนิด *Cuscuta reflexa* Roxb. ส่วนฝอยทองชนิดลำต้นเส้นเล็กเป็น *Cuscuta chinensis* Lam.



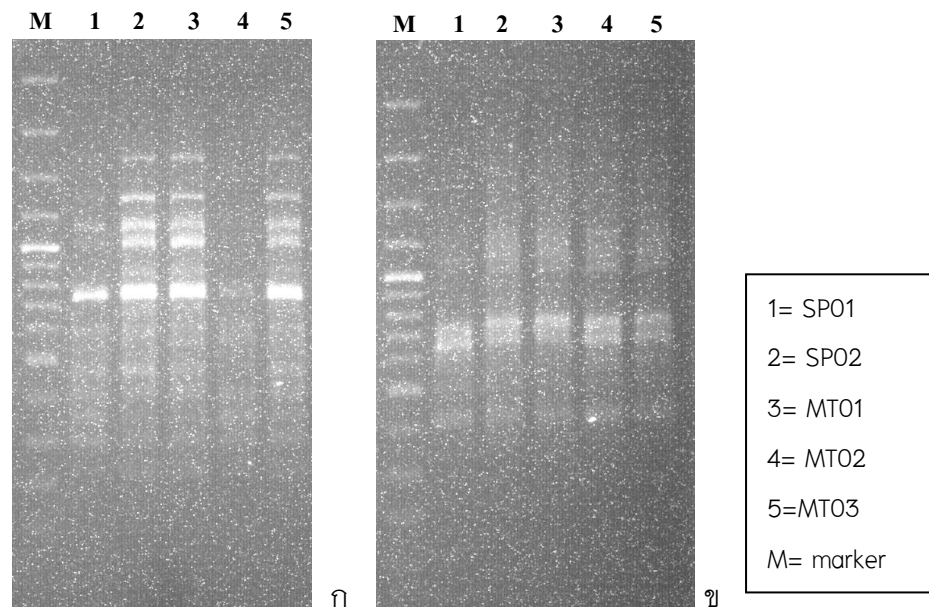
ภาพที่ 49 Cophenetic Correlation ของฝอยทอง 36 ตัวอย่างจากไพรเมอร์ 6 ชนิด

จากภาพที่ 49 เป็นค่าสหสัมพันธ์ (Cophenetic Correlation ( $r$ )) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการกระจายข้อมูลแถบดีเอ็นเอของฝอยทองจำนวน 36 ตัวอย่างที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด ซึ่งมีค่า Cophenetic Correlation ( $r$ ) เท่ากับ 0.99435 โดย Cophenetic Correlation ( $r$ ) ที่มีค่าสูงบ่งบอกถึงการกระจายของข้อมูลดีเอ็นเอที่ดีและมีความน่าเชื่อถือสูง

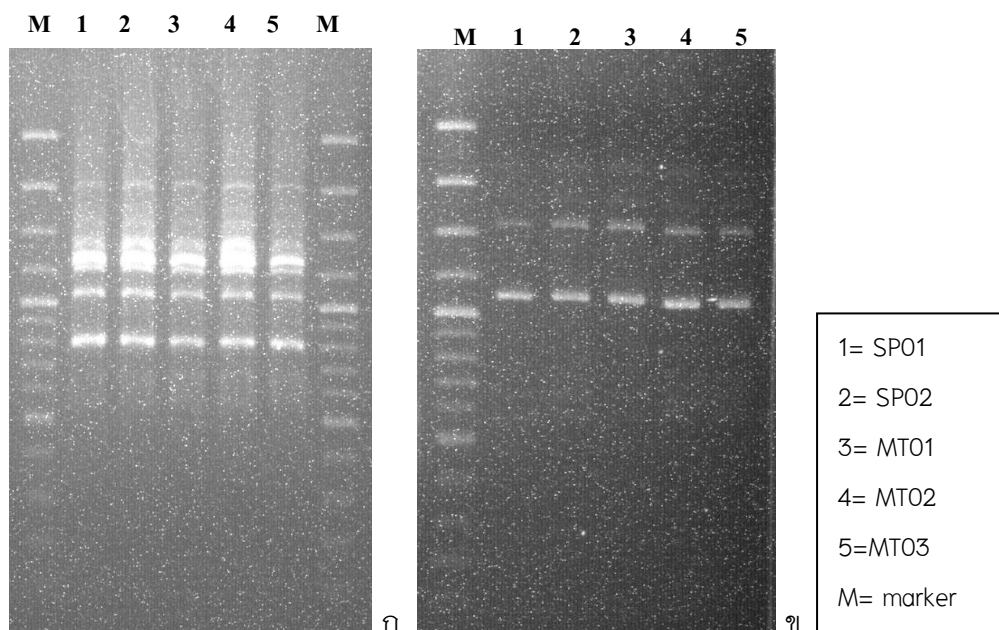
## 2. ผักแปม

นำดีเอ็นเอของผักแปมจำนวน 5 ตัวอย่างมาทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่า มีไพรเมอร์ UBC จำนวน 8 ชนิด ที่คัดเลือกได้จากไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 70 ชนิด ซึ่งไพรเมอร์แต่ละชนิดได้แก่ UBC-811 UBC-825 UBC-826 UBC-834 UBC-835 UBC-840 UBC-864 และ UBC-880 แสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบ โดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกนี้ สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มผักแปมแต่ละตัวอย่างว่ามีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN

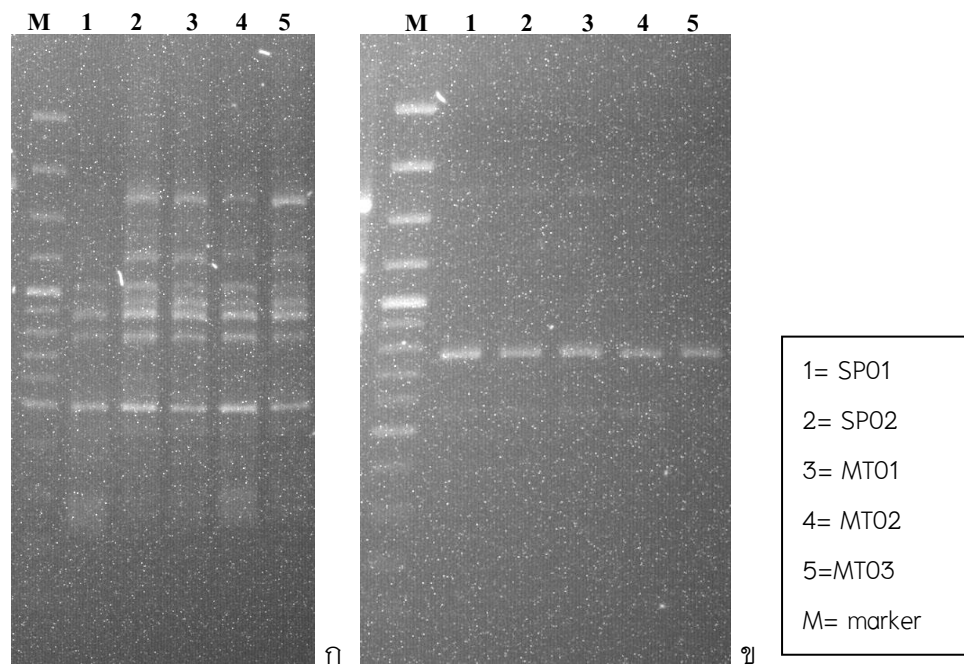
สำหรับในงานวิจัยระยะที่ 1 นี้ จำนวนตัวอย่างของผักแปมที่เก็บได้จากการสำรวจมีจำนวนเพียง 15 ตัวอย่างและได้มาจากพื้นที่เก็บที่ใกล้เคียงกัน จึงได้ดำเนินงานวิจัยเฉพาะหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในระยะที่ 2 ต่อไป ซึ่งจำนวนตัวอย่างที่น้อยเป็นอุปสรรคที่สำคัญของงานด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม (ภาพที่ 50-53)



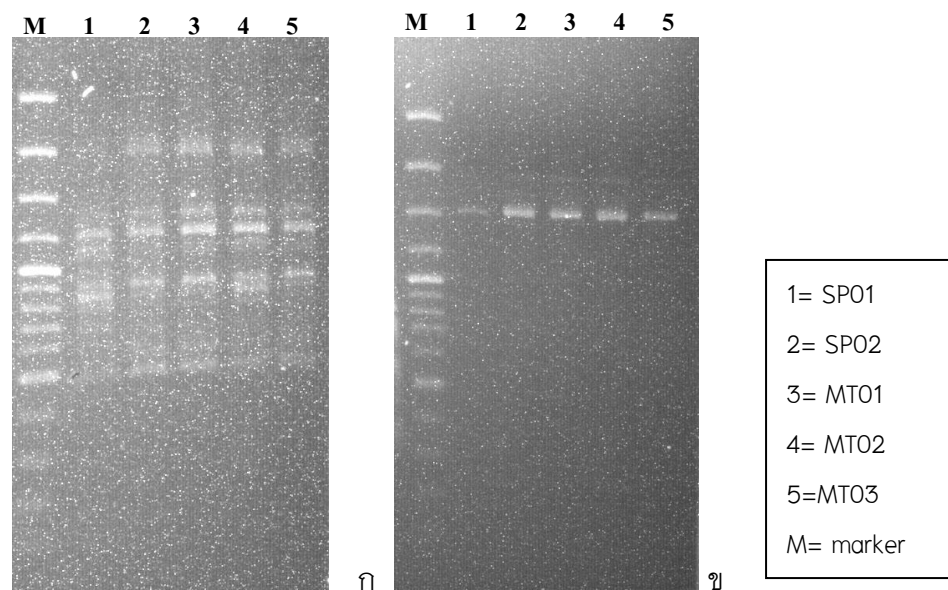
ภาพที่ 50 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักแปมจากไพรเมอร์ UBC-811 (ก) และ UBC-825 (ข)



ภาพที่ 51 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักแปมจากไฟร์เมอร์ UBC-826 (ก) และ UBC-834 (ข)



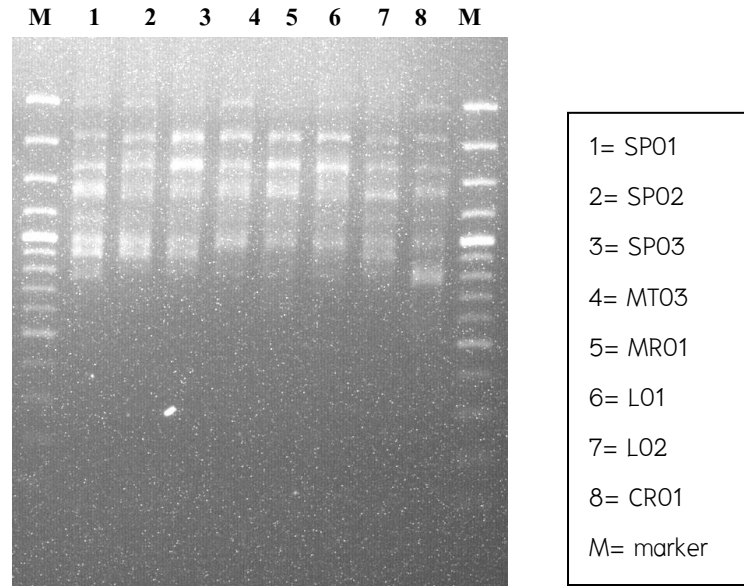
ภาพที่ 52 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักแปมจากไฟร์เมอร์ UBC-835 (ก) และ UBC-840 (ข)



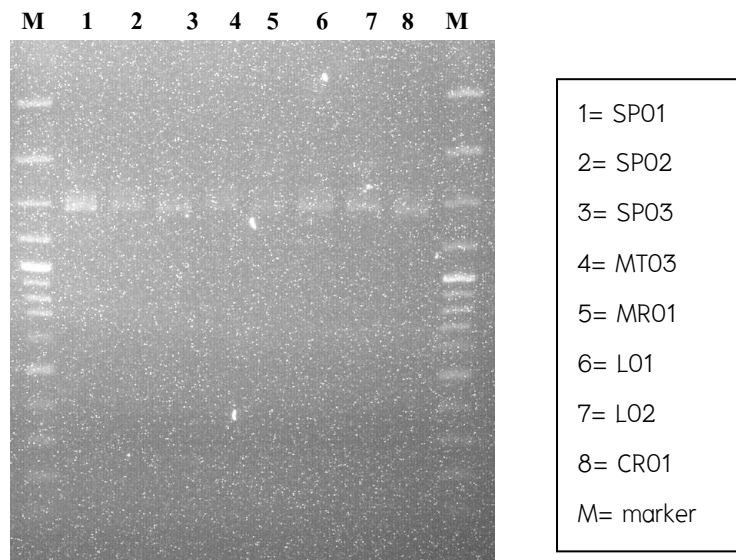
ภาพที่ 53 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักแปมจากไฟร์เมอร์ UBC-864 (ก) และ UBC-880 (ข)

### 3. ผักหนาม

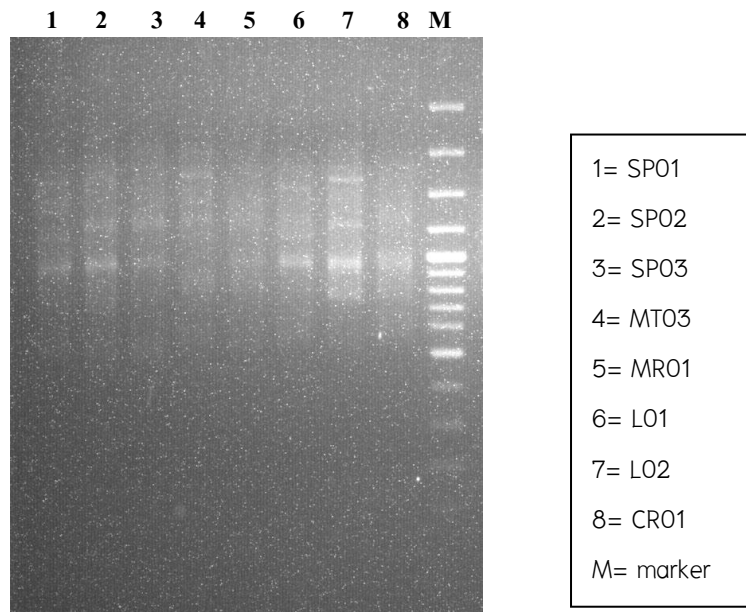
นำดีเอ็นเอของผักหนามจำนวน 8 ตัวอย่าง (SP01, SP02, SP03, MT01, MR01, L01, L02, CR01) มาทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่ามีไพรเมอร์ UBC จำนวน 7 ชนิดที่คัดเลือกมาจากไพรเมอร์จำนวน 70 ชนิด ได้แก่ UBC-824 UBC-845 UBC-853 UBC-857 UBC-864 UBC-866 และ UBC-878 ที่เหมาะสม ซึ่งไพรเมอร์แต่ละชนิดแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกนี้สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มผักหนามแต่ละตัวอย่างว่ามีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN สำหรับงานวิจัยนี้ สํารวจและเก็บตัวอย่างผักหนามได้เพียง 20 ตัวอย่าง หลายตัวอย่างมาจากพื้นที่ใกล้เคียงกันหรือแม่น้ำสายเดียวกัน ทำให้มีจำนวนตัวอย่างไม่เพียงพอที่จะวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (ภาพที่ 54-60)



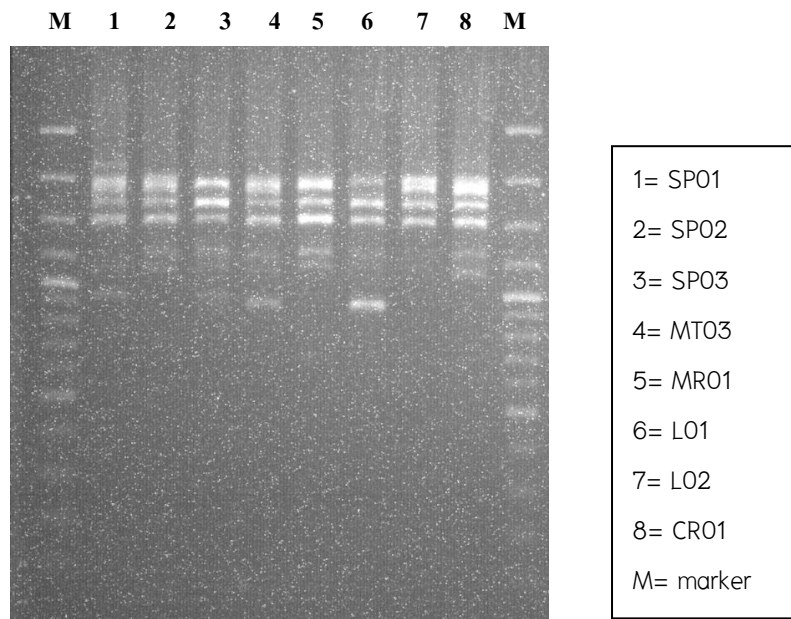
ภาพที่ 54 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไพรเมอร์ UBC-824



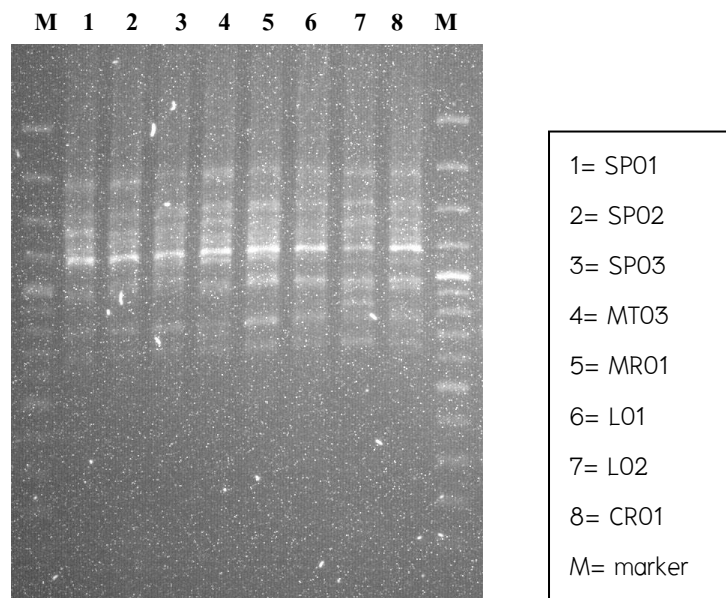
ภาพที่ 55 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-845



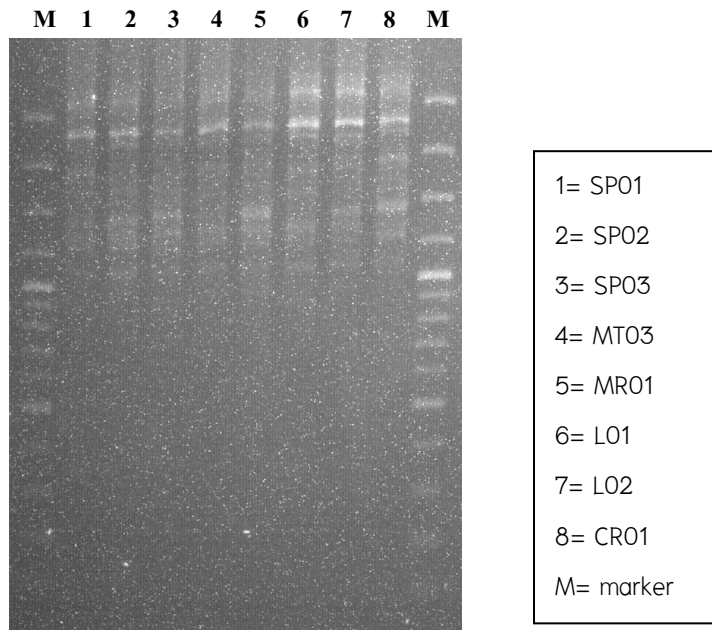
ภาพที่ 56 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-853



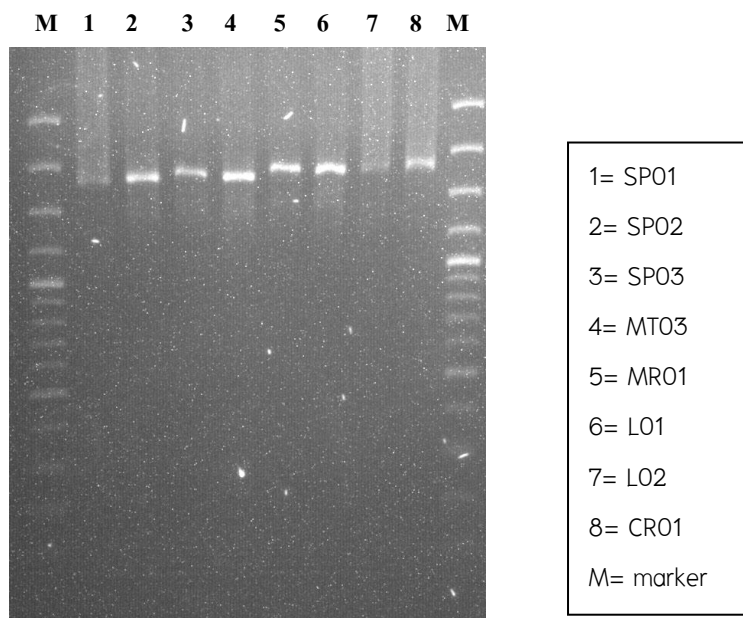
ภาพที่ 57 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-857



ภาพที่ 58 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-864



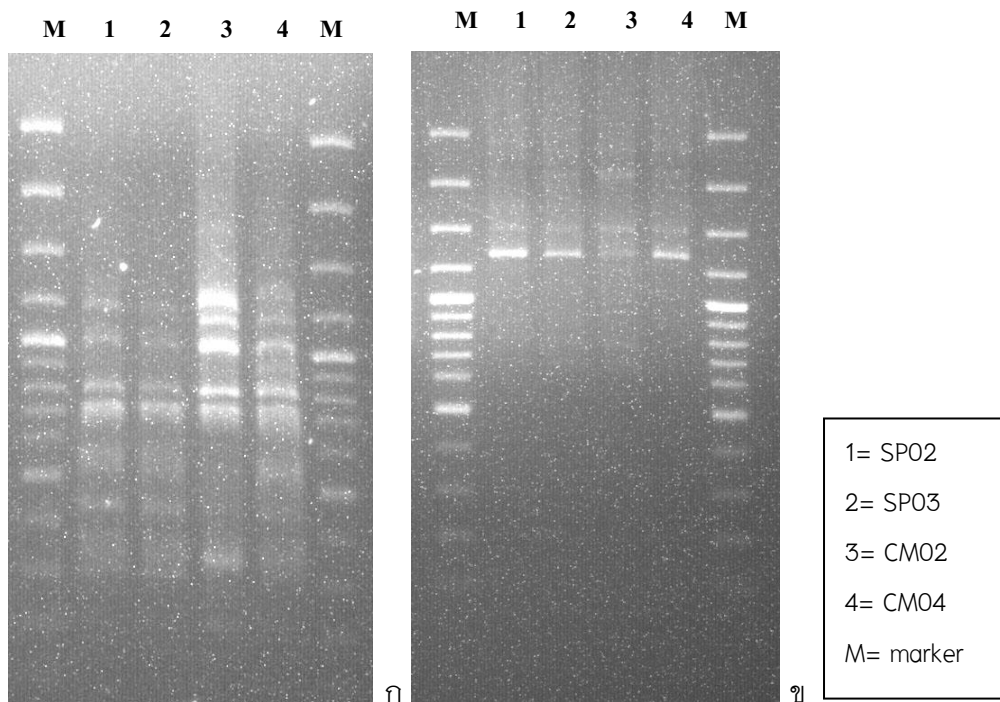
ภาพที่ 59 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-866



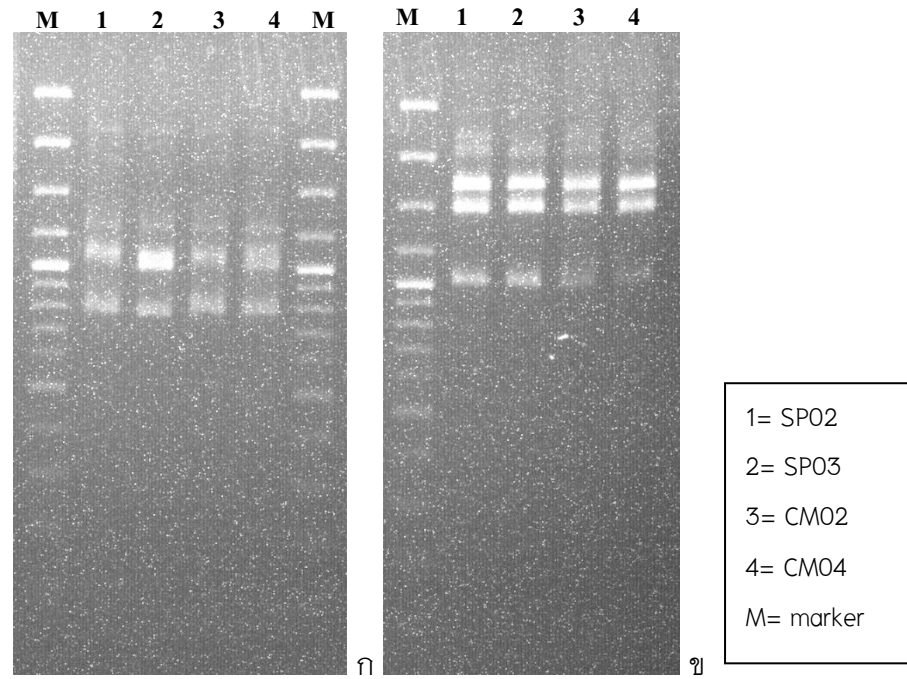
ภาพที่ 60 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักหนามจากไฟร์เมอร์ UBC-878

#### 4. สะแล

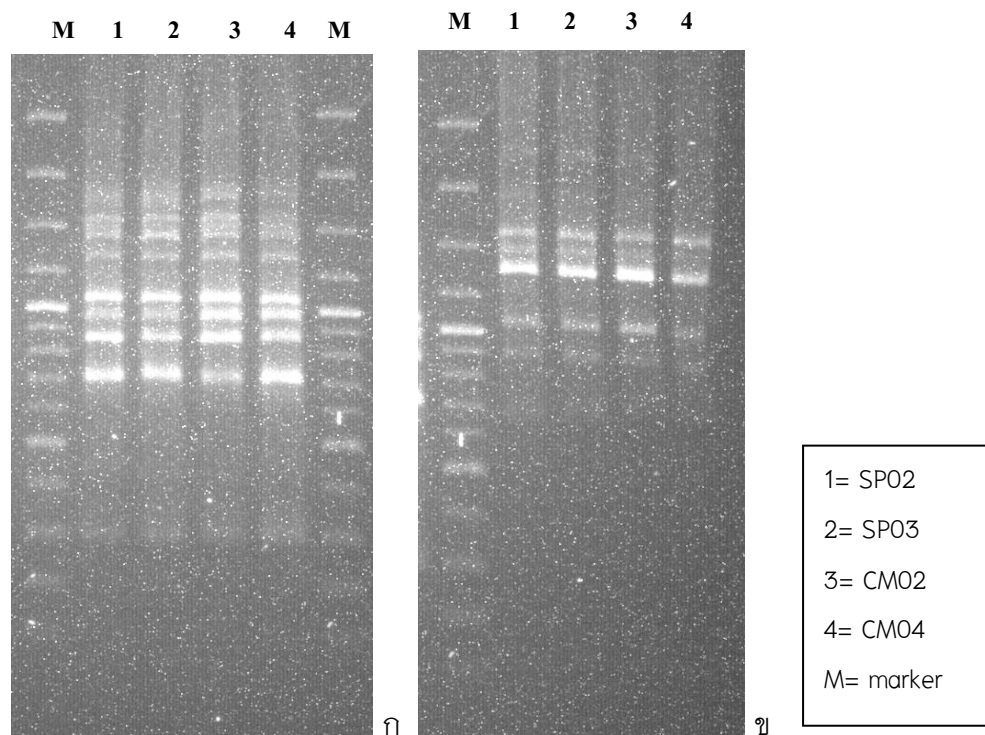
นำดีเอ็นเอของสะแลจำนวน 4 ตัวอย่าง (SP02, SP03, CM02, CM04) ที่มีทั้งสะแลเพศผู้และสะแลเพศเมีย มาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าจากไพรเมอร์ UBC จำนวน 70 ชนิดมีไพรเมอร์ จำนวน 15 ชนิดที่คัดเลือกไว้ว่ามีความเหมาะสม ซึ่งไพรเมอร์แต่ละชนิดแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกนี้สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มสะแลแต่ละตัวอย่างว่า มีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย แต่สำหรับงานวิจัยระยะที่ 1 มีจำนวนตัวอย่างสะแลที่เก็บมาได้จำนวนไม่มากและอยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกันจึงจะมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมในระยะที่ 2 (ภาพที่ 61-68)



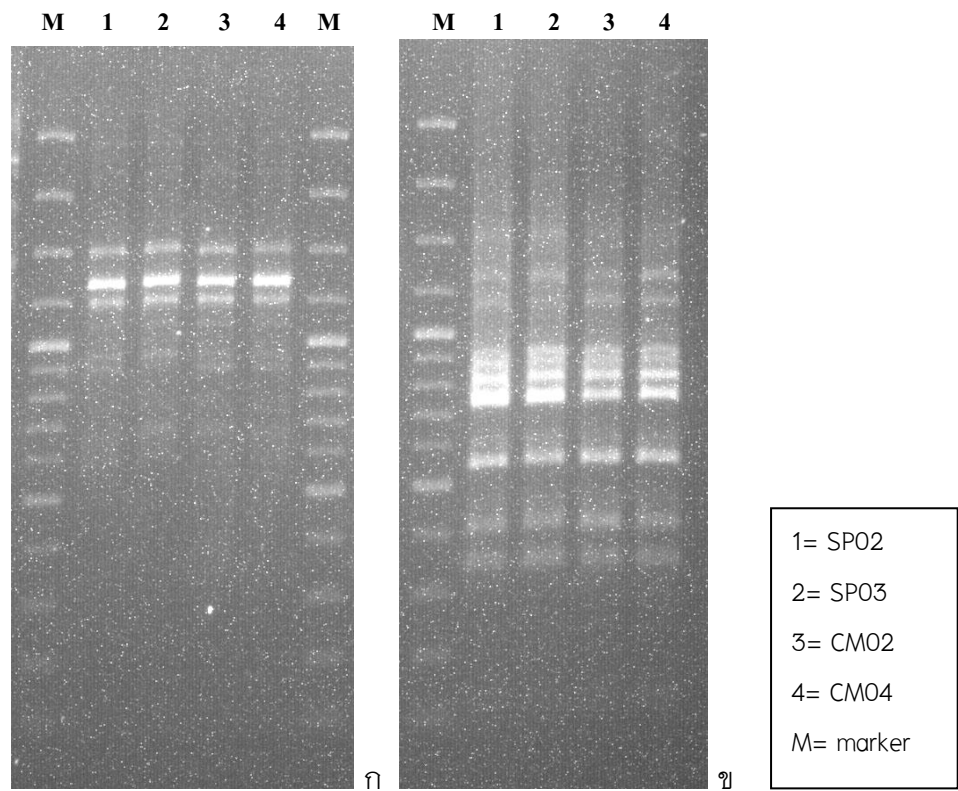
ภาพที่ 61 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไพรเมอร์ UBC-811 (ก) และ 818 (ข)



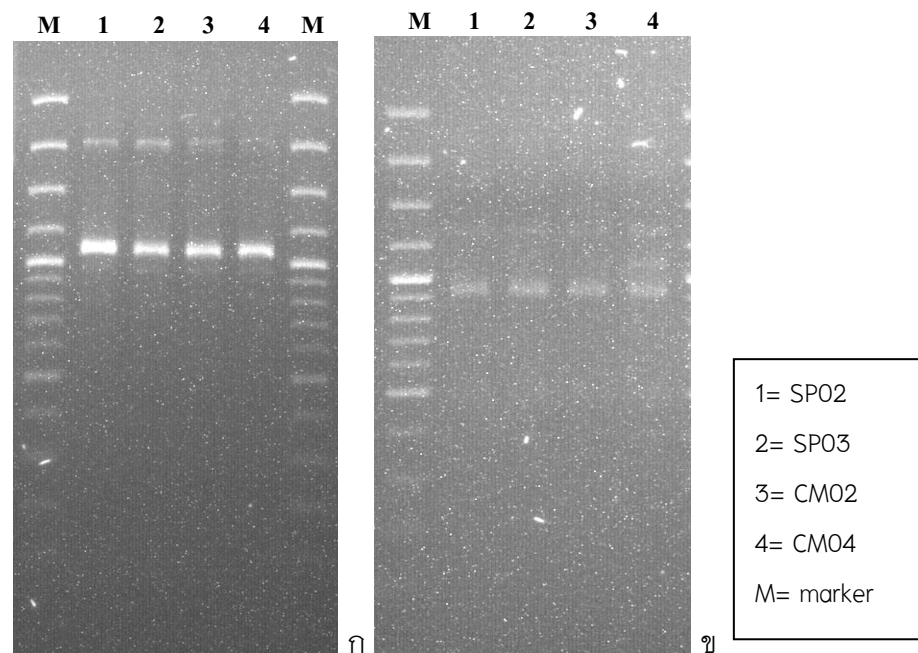
ภาพที่ 62 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสไลด์จากไฟร์เมอร์ UBC-822 (ก) และ 824 (ข)



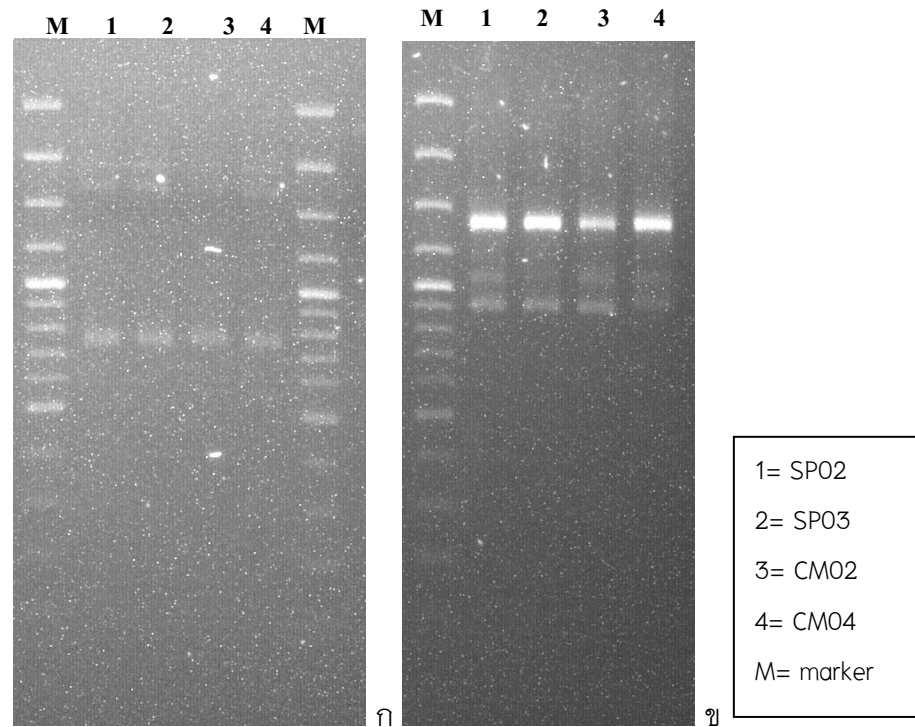
ภาพที่ 63 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสไลด์จากไฟร์เมอร์ UBC-825 (ก) และ 830 (ข)



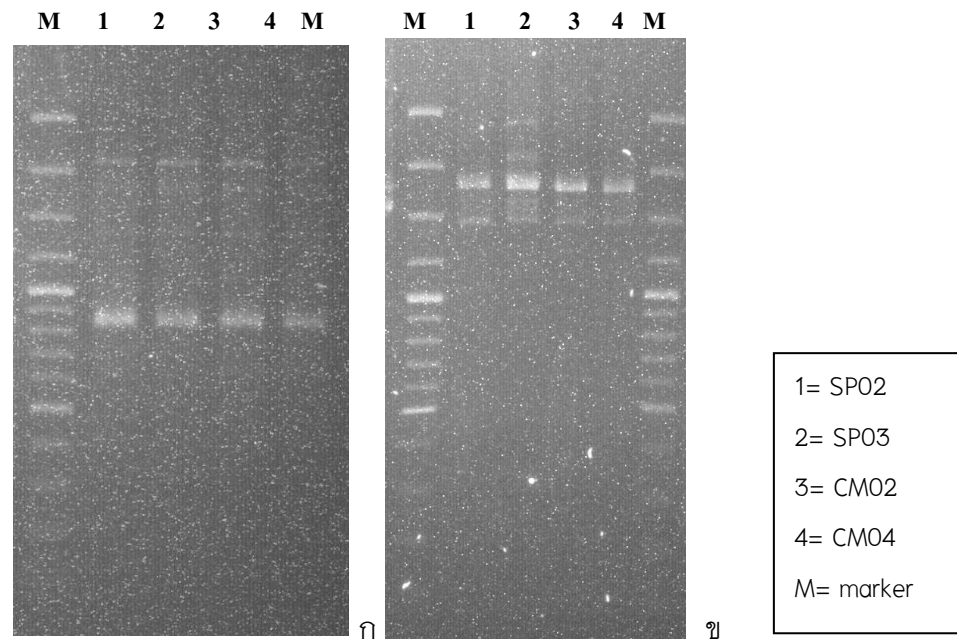
ภาพที่ 64 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-834 (ก) และ 835 (ข)



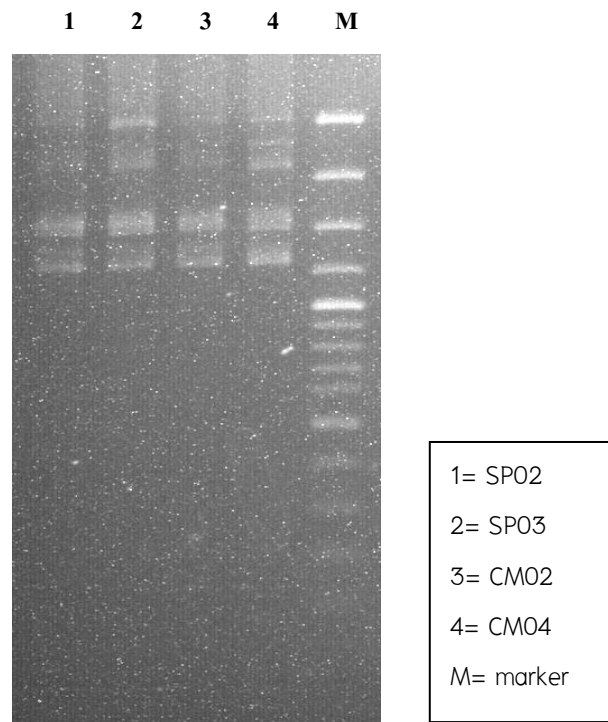
ภาพที่ 65 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-841 (ก) และ 843 (ข)



ภาพที่ 66 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-844 (ก) และ 845 (ข)



ภาพที่ 67 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-850 (ก) และ 857 (ข)



ภาพที่ 68 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของสะแลจากไฟร์เมอร์ UBC-866

## 5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

### 5.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืช

จากการวิจัยได้ผลิตสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากยอดและใบอ่อนผักหนาม ลำต้นฝอยทองเส้นเล็ก ใบผักแปม ดอกอ่อนของสะแลป้อมและสะแลยาว มาอบแห้งที่ 50°C ในตู้อบจนแห้งกรอบและน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงอีก (ประมาณ 5-7 วัน) แล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียด และนำผงที่ได้ไปแช่สกัดด้วยน้ำหรือเอทานอล จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยการระเหย (evaporation) จนได้สารสกัดหยาบ (crude extracts)

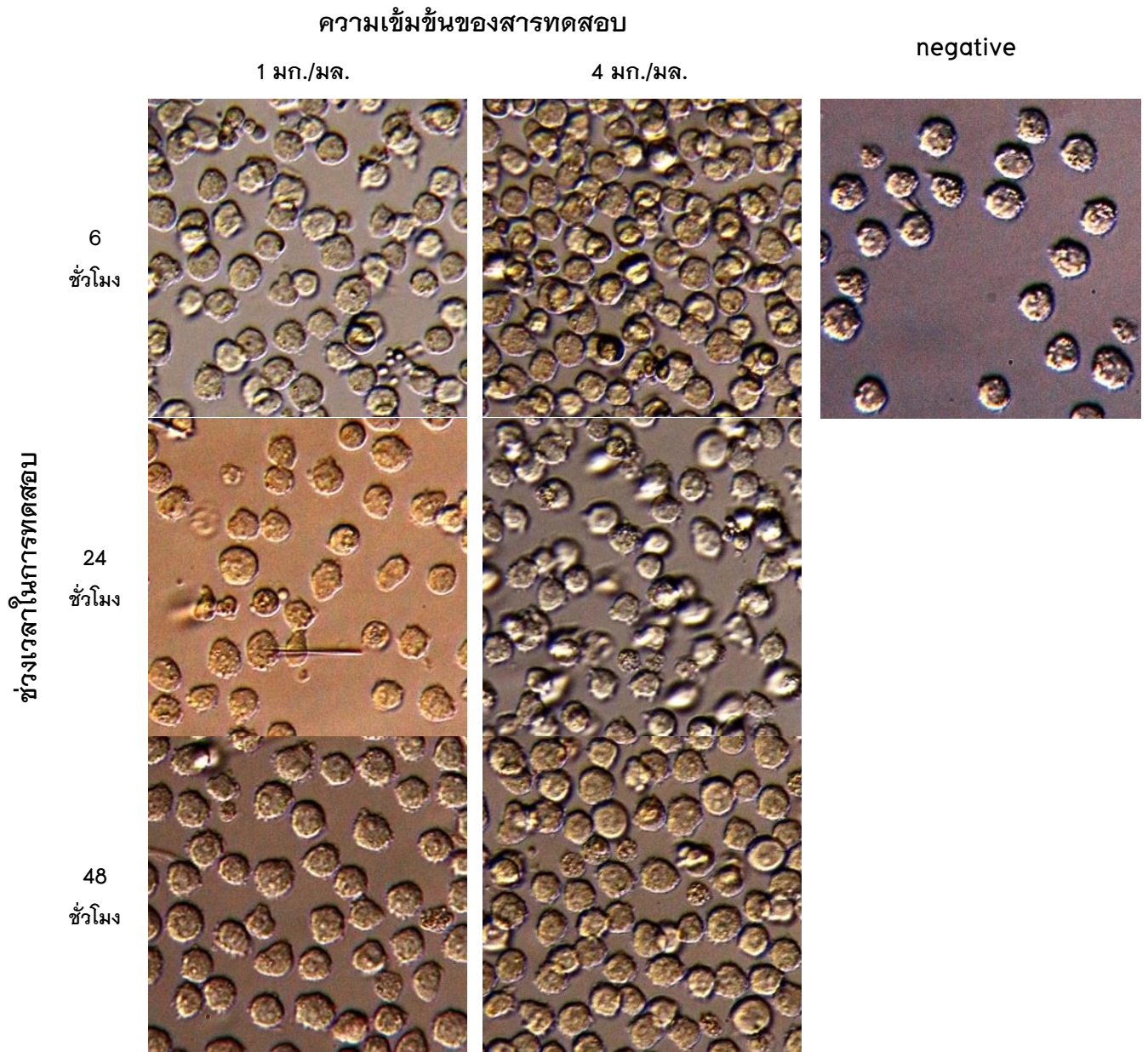
## 5.2 การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis โดยติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็งทดสอบ

เซลล์ที่กำลังเข้าสู่กระบวนการ apoptosis จะมีลักษณะเฉพาะหลายประการที่แสดงออกแตกต่างจากเซลล์ปกติและเซลล์ที่กำลังจะตายด้วยกระบวนการอื่น เช่น necrosis การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์จนทำให้เกิดลักษณะภายนอกจำเพาะหลายประการ เกิดจากการถูกกระตุ้นของโปรตีนหลายตัวที่ทำลายโครงสร้างของเซลล์ ทำให้เกิด cytoskeleton collapse ส่งผลให้เซลล์มะเร็งประเภทยึดเกาะ (adherent) สูญเสียส่วนของเซลล์ที่ยื่นออกไปและใช้ในการยึดเกาะกับภาชนะเลี้ยง เซลล์จะหดตัวจนเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า apoptotic bodies มองเห็นเป็นเซลล์ที่พองที่ organelles ของมันเองออกไปไว้ใน compartment เล็กๆ ที่เกิดจากการคอดลงของผนังเซลล์เป็นจุดๆ ารายรอบเซลล์เดิม ในอีกกรณีหนึ่งอาจเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า single large vesicle คือการโป่งออกของผนังเซลล์ด้านหนึ่งเป็นก้อนใหญ่และส่วนของ protoplasm จากเซลล์เดิมถูกผลักมาไว้ในส่วนนี้ ขณะที่ organelles และ nucleus จะถูกผลักมารวมกันในด้านตรงข้าม single large vesicle เป็นลักษณะของเซลล์ที่ถูกศึกษา และเสนอเป็นทฤษฎีโดย Zhang และคณะในปี 2005 ว่าเป็นลักษณะที่เรียกว่า partitioning apoptosis คือ apoptosis ที่อาจอาศัย apoptosis pathway เดิม (classical pathway) แต่เพียงบางส่วนในการชักนำให้เซลล์เกิดการตาย ขณะที่การเกิด DNA fragmentation ถือเป็นข้อมูลสำคัญและมีน้ำหนักที่สุดที่จะแสดงถึงฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดนั้นๆ การเกิด DNA fragmentation เนื่องมาจากการบวนการ apoptosis ในเซลล์ถูกกระตุ้นผ่านการทำงานของโปรตีนตัวกลางหลายตัว รวมถึง Caspase-Activated DNase (CAD) ซึ่งทำให้เกิดการแตกทำลายของ DNA และสามารถตรวจติดตามได้ด้วยการทำ DNA electrophoresis

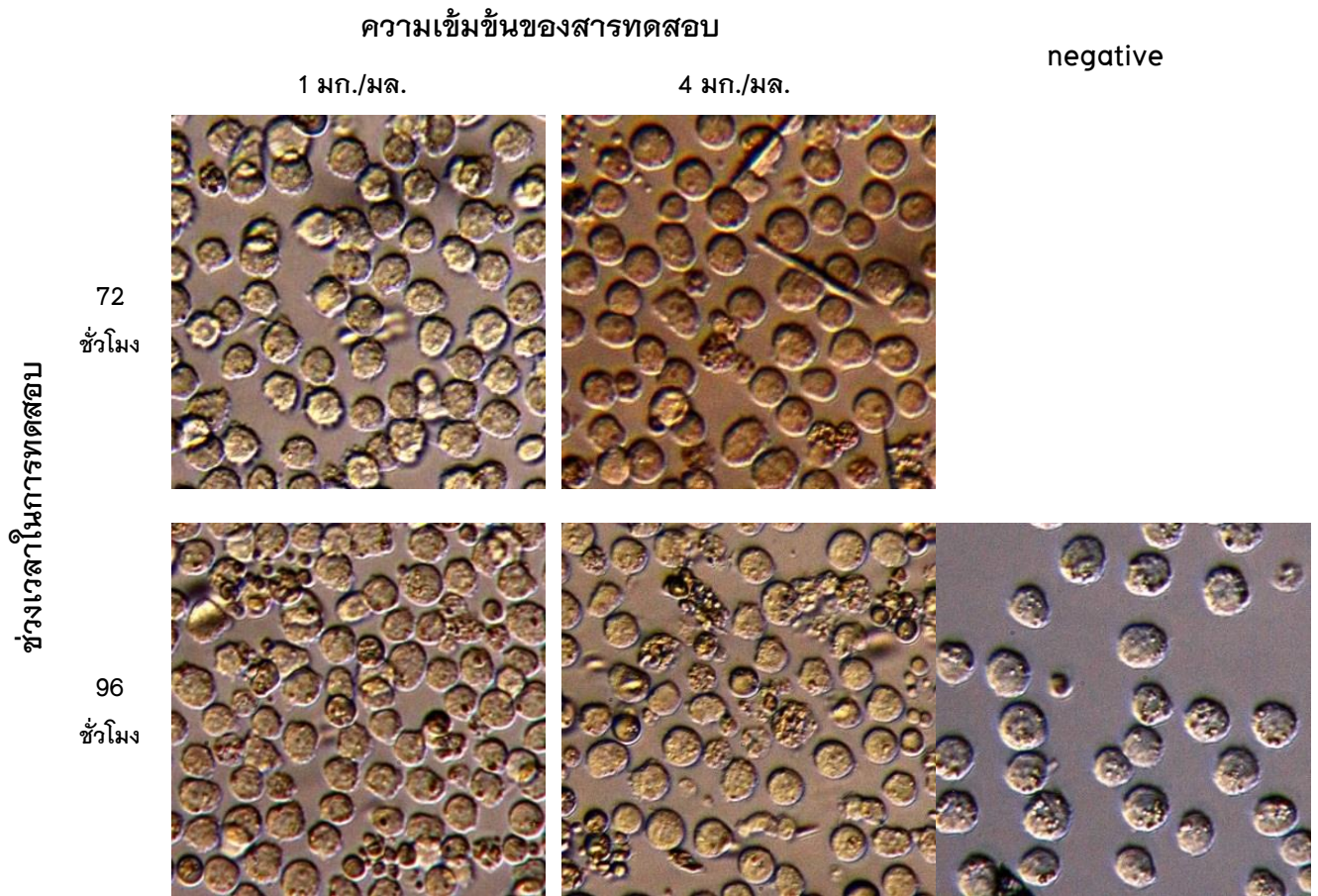
จากการติดตามการเกิด Morphological changes แบบ apoptotic body และ single large vesicle ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่เข้าสู่กระบวนการ apoptosis ผ่านการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์วัตถุ 40 เท่า และรูปที่แสดงผ่านการขยายขนาดด้วยโปรแกรม Adobe CS8 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ได้ผลการวิจัยดังภาพที่ 75-84

จากการติดตามการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ทดสอบ U-937 เมื่อนำไปทดสอบด้วยสารสกัดจากน้ำและเอทานอลของพืชพื้นบ้าน ที่ความเข้มข้นและช่วงเวลาต่างกัน พบลักษณะของเซลล์แบบ apoptotic bodies ถูกพบตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการทดสอบด้วยสารสกัดความเข้มข้น 4 มก./มล. ของผักแปมและสะแลบ้อมทั้งที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล และพบในปริมาณมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปจนถึง 96 ถึง 120 ชั่วโมง (4-5 วัน) ของการทดสอบ ขณะที่สารสกัดทั้ง 2 แบบของฝอยทองเส้นเล็ก ทำให้เซลล์ U-937 มีลักษณะเหมือนเซลล์ที่ตายแบบ necrosis อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลการสังเกตนี้ไปเทียบกับผลการชักนำให้เกิด

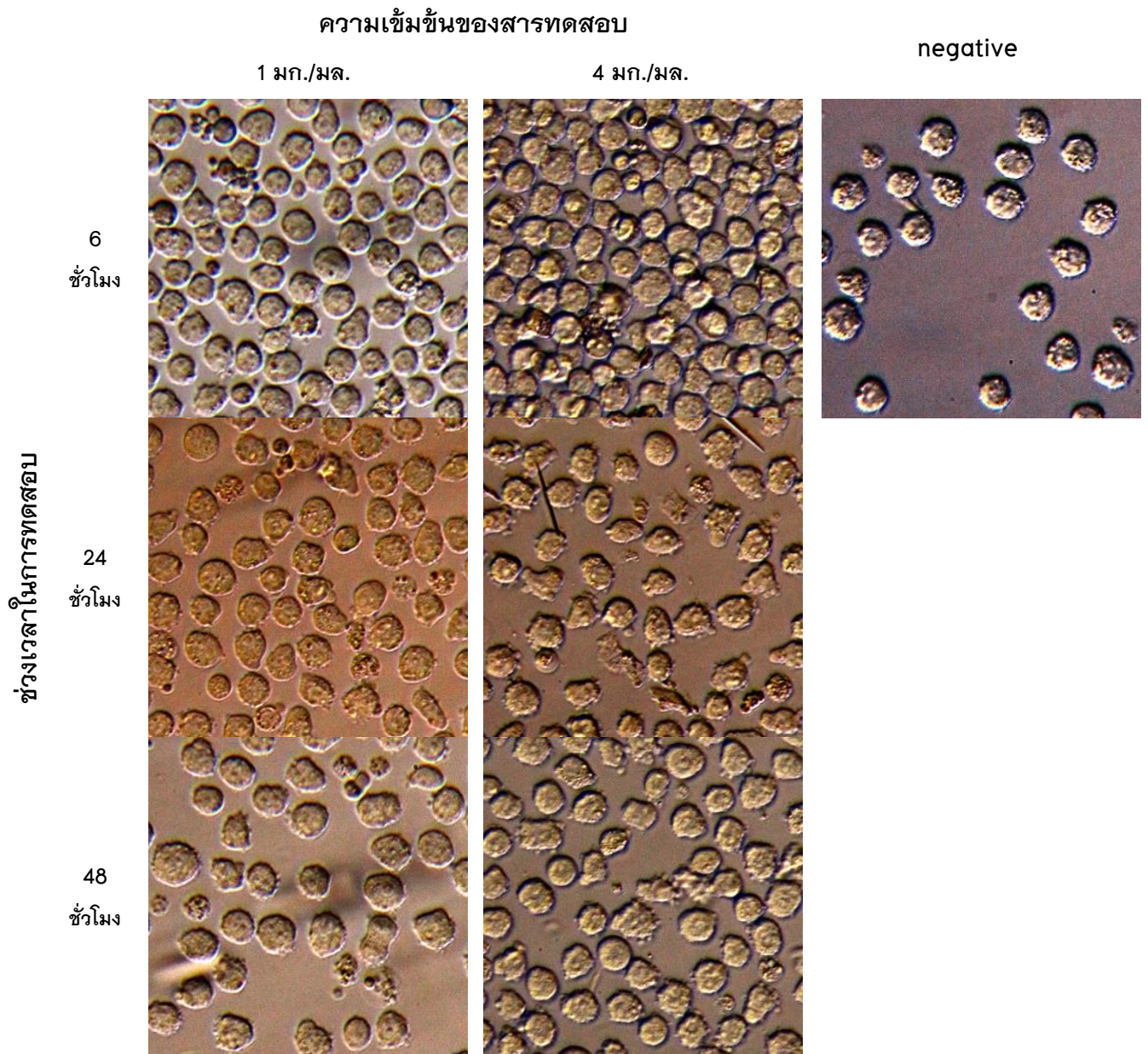
DNA fragmentation พบว่า สารสกัดจากฝอยทองเล็กสามารถชักนำให้ U-937 เกิด DNA fragmentation ได้ที่ 6 ชั่วโมงของการทดสอบซึ่งเร็วที่สุดในกลุ่มพืชที่ใช้ในการทดสอบนี้ ซึ่งที่เวลา 6 ชั่วโมง ลักษณะของเซลล์ U-937 ที่สังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์ ยังดูเป็นปกติอยู่ (เปรียบเทียบกับรูปร่างของ U-937 ที่เป็น negative control) ในงานวิจัยครั้งนี้ ลักษณะ apoptotic bodies ถูกพบมากกว่า Single large vesicle (แม้ว่า ลักษณะของเซลล์ทั้งสองแบบต่างก็เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเข้าสู่ apoptosis pathway เหมือนกัน) ซึ่งจะต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของพืชว่า มีความแตกต่างจากพืชพื้นบ้านชนิดอื่นที่เคยทำการทดสอบในโครงการวิจัยที่ผ่านมาหรือไม่อย่างไร หรือเป็นเพราะความแตกต่างของชนิดของเซลล์ทดสอบซึ่งเป็นสาเหตุของรูปแบบการตอบสนองที่ต่างกัน ขณะที่รูปร่างของเซลล์ U-937 ที่เป็น negative control จะกลม ค่อนข้างใส และไม่เห็นการรวมตัวของ organelles ในเซลล์ ในช่วงเวลาต่างๆของการทดสอบ



**ภาพที่ 69** แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วย สารสกัดด้วยน้ำจากผักหนาม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



**ภาพที่ 69** (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากผักหนาม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



**ภาพที่ 70** แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากผักหนาม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน

ความเข้มข้นของสารทดสอบ

1 มก./มล.

4 มก./มล.

negative

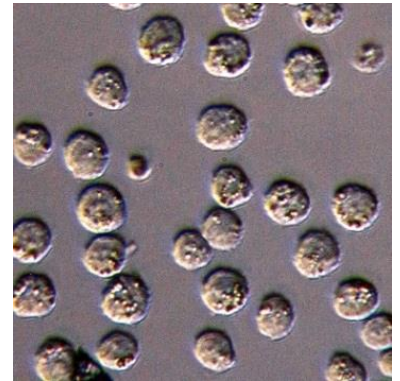
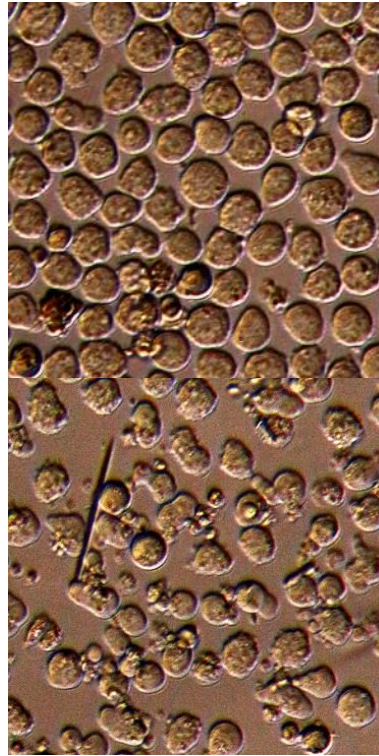
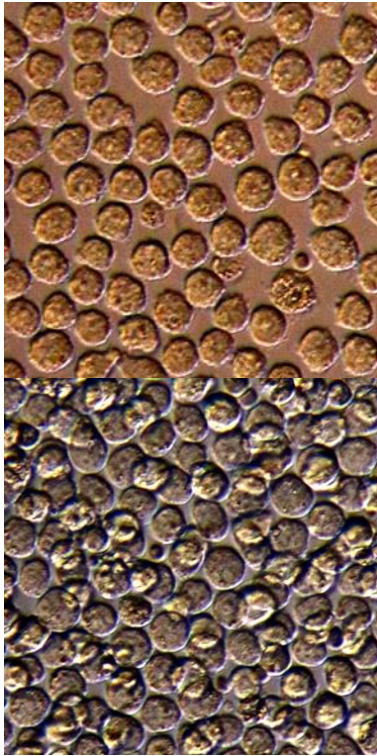
ช่วงเวลาในการทดสอบ

72

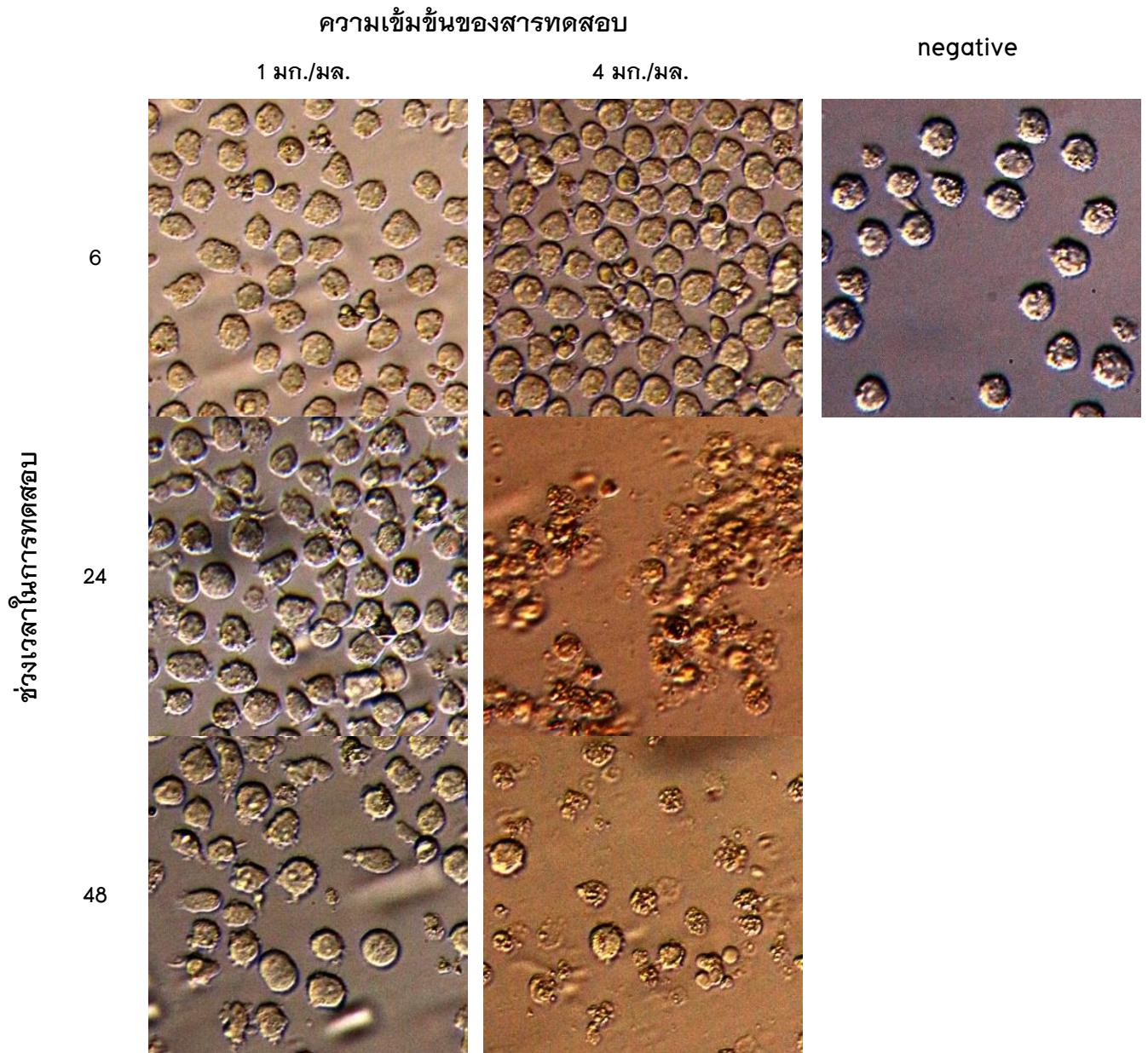
ชั่วโมง

96

ชั่วโมง



ภาพที่ 70 (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากผักหนาม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



ภาพที่ 71 แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากฝอยทองเล็ก ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน

ความเข้มข้นของสารทดสอบ

1 มก./มล.

4 มก./มล.

negative

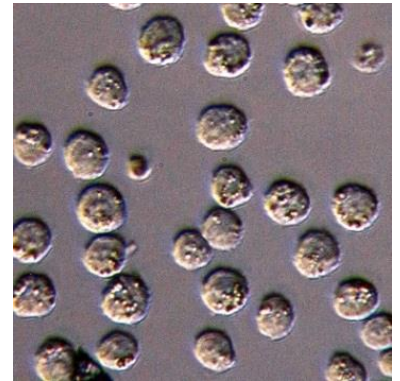
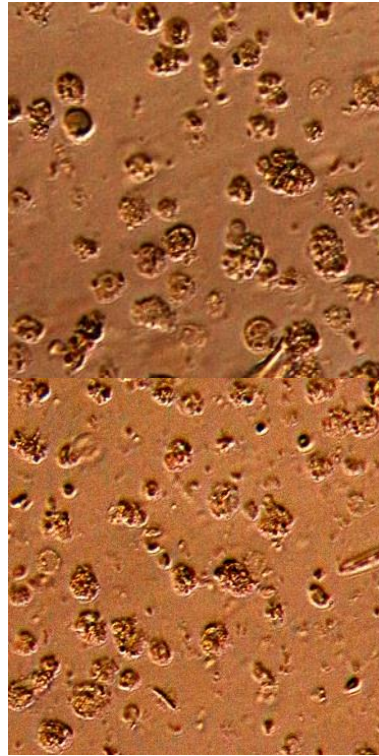
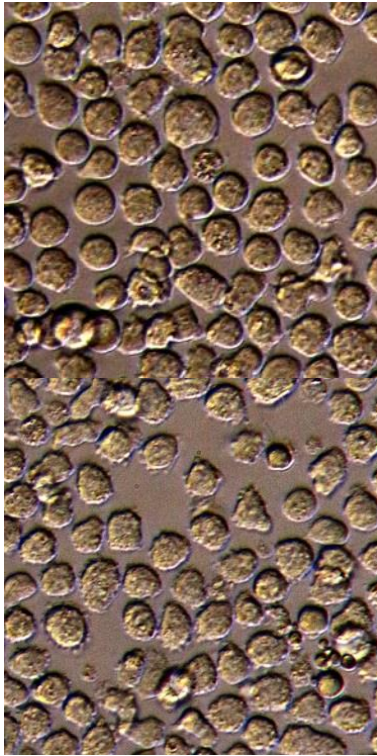
ช่วงเวลาในการทดสอบ

72

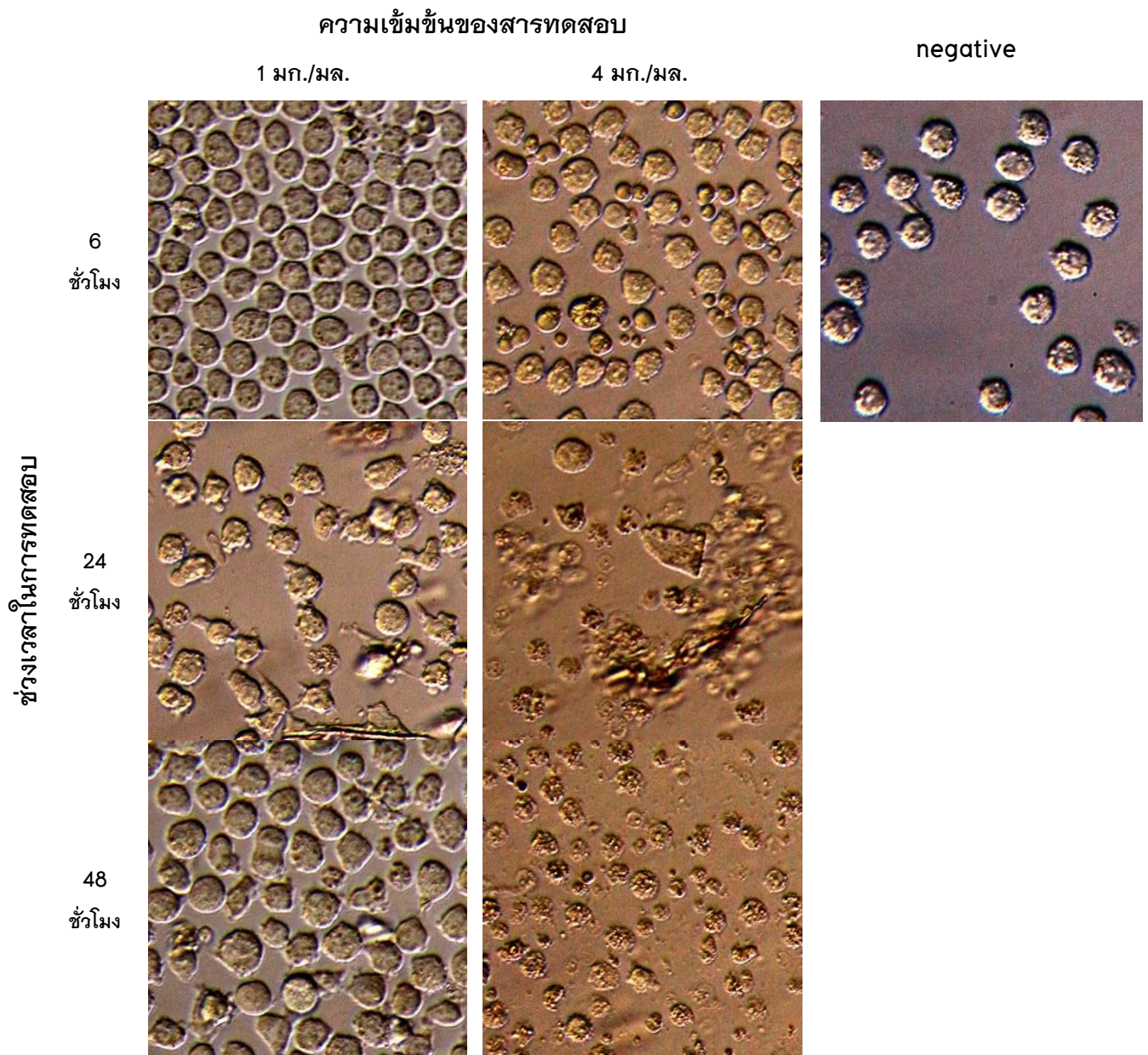
ชั่วโมง

96

ชั่วโมง



ภาพที่ 71 (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากฝอยทองเล็ก ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



**ภาพที่ 72** แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากฝอยทองเล็ก ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน

ความเข้มข้นของสารทดสอบ

1 มก./มล.

4 มก./มล.

negative

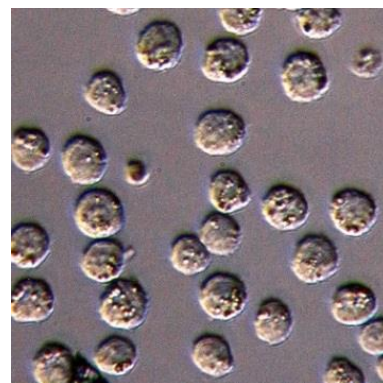
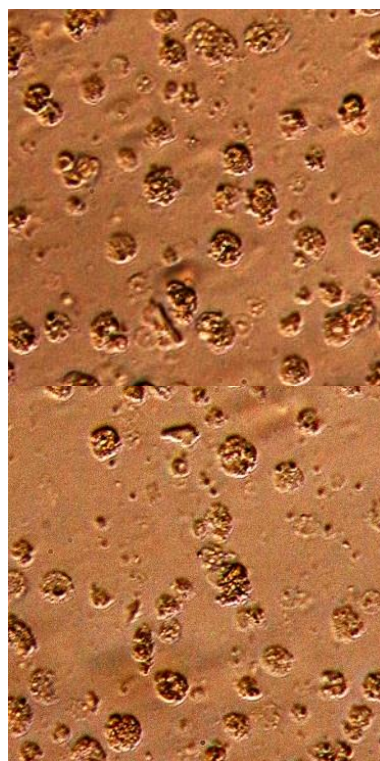
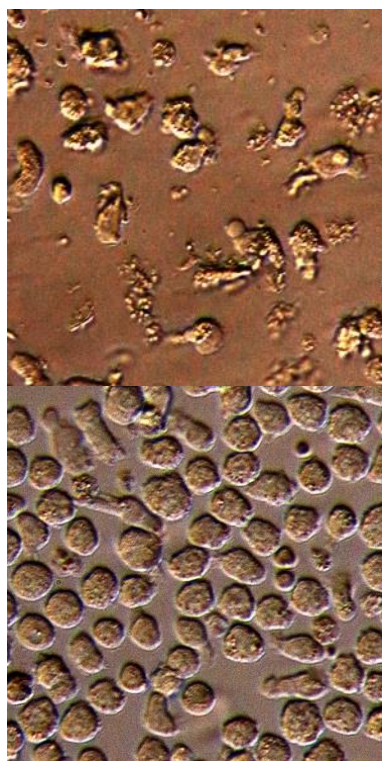
ช่วงเวลาในการทดสอบ

72

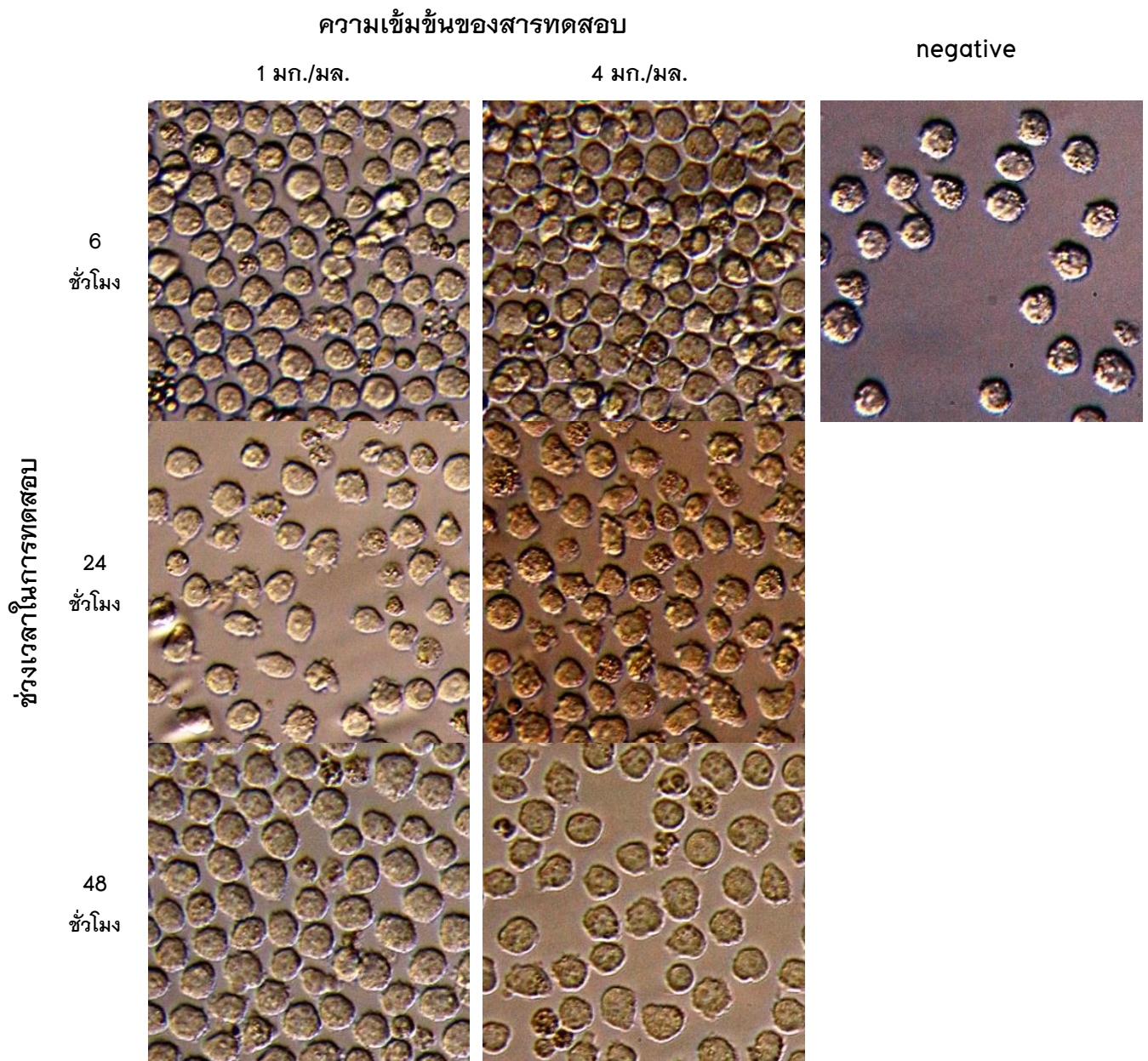
ชั่วโมง

96

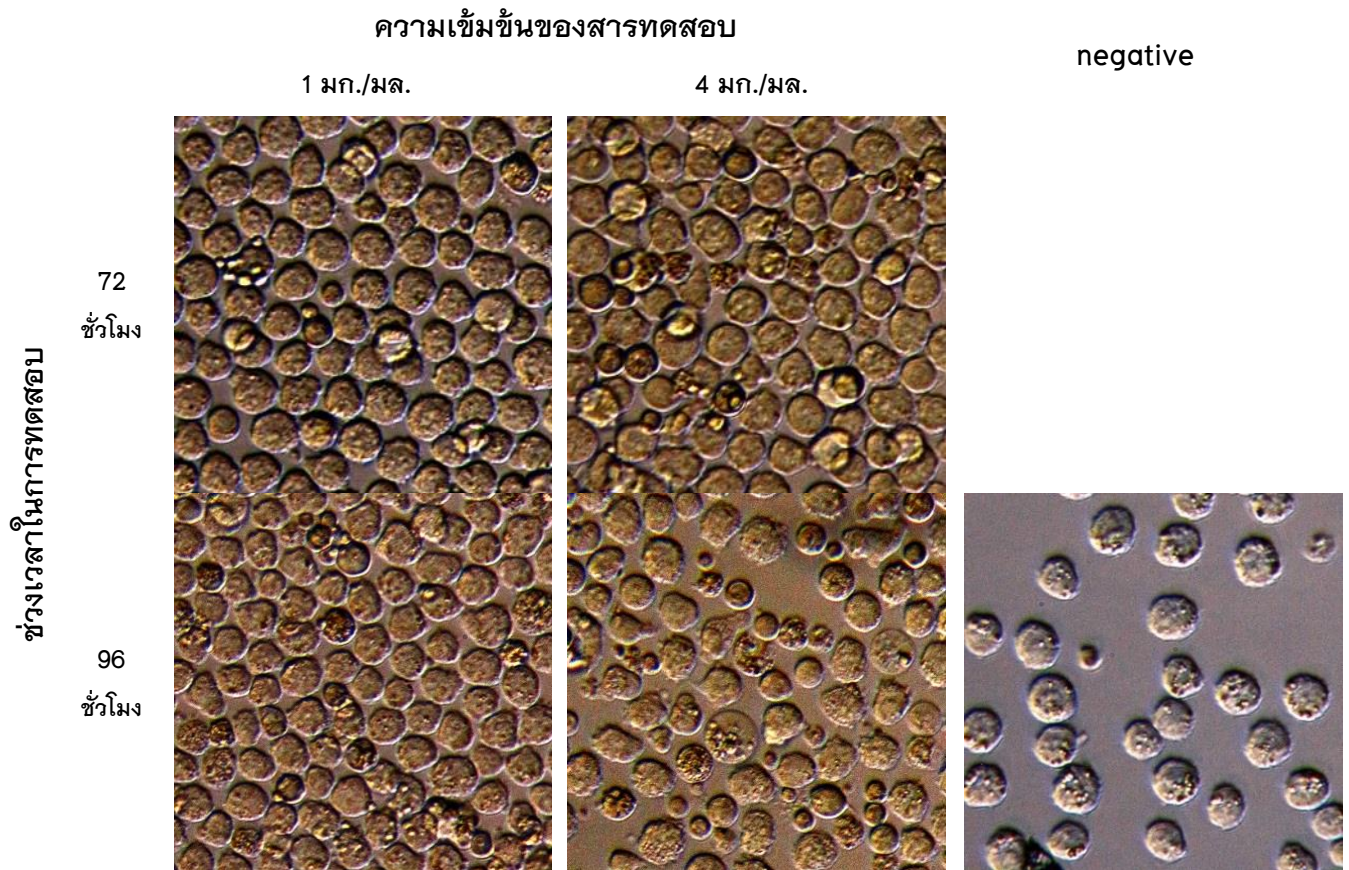
ชั่วโมง



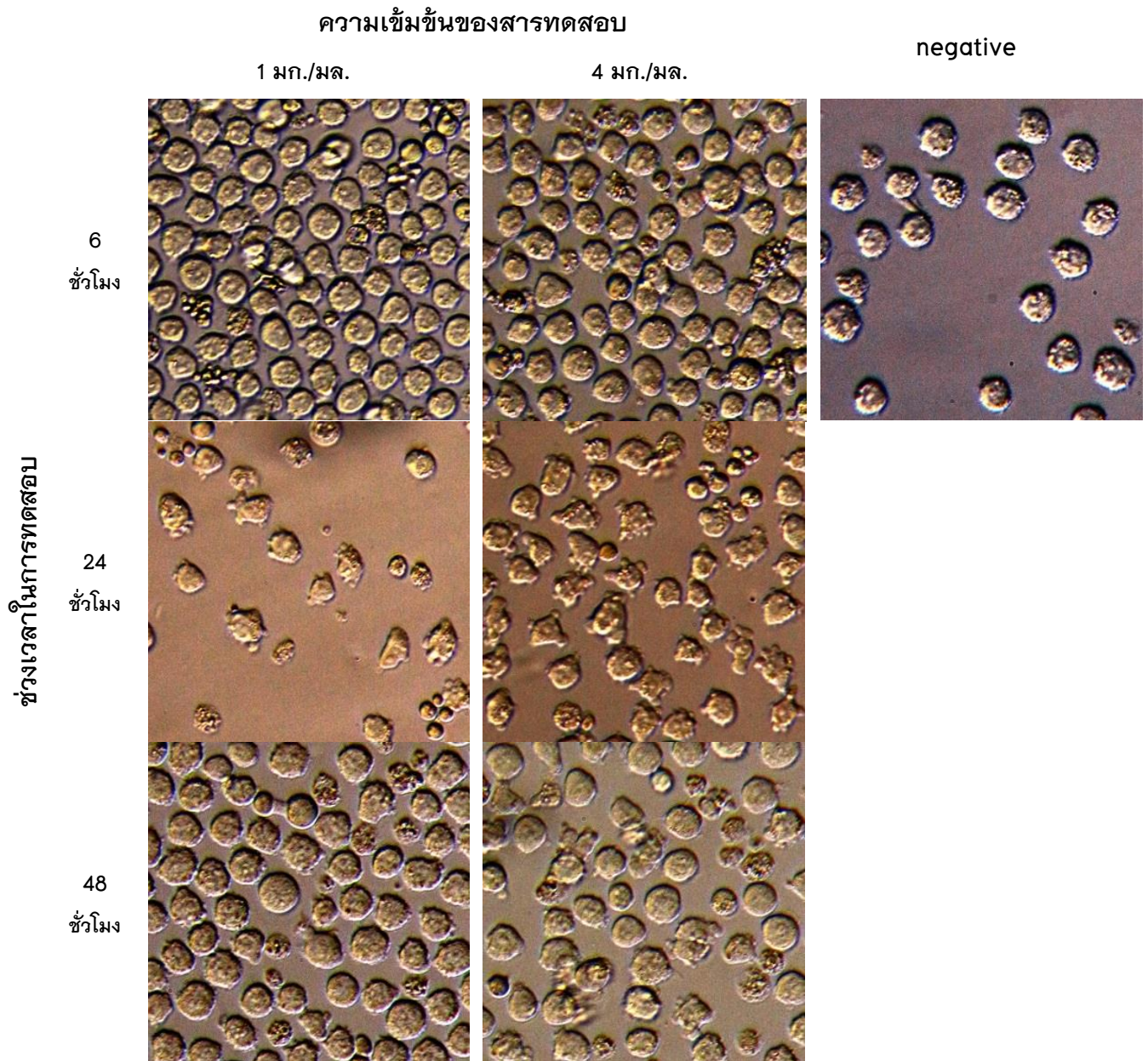
ภาพที่ 72 (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากฝอยทองเล็ก ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



**ภาพที่ 73** แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วย สารสกัดด้วยน้ำจากผักแปม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



ภาพที่ 73 (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากผักแปม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



ภาพที่ 74 แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากผักแปม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน

ความเข้มข้นของสารทดสอบ

1 มก./มล.

4 มก./มล.

negative

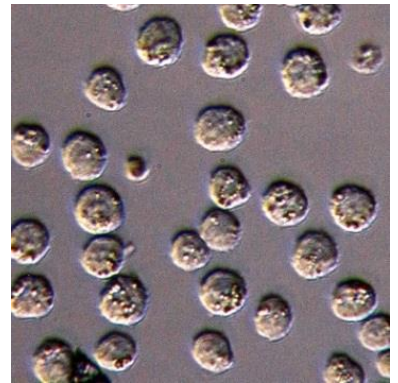
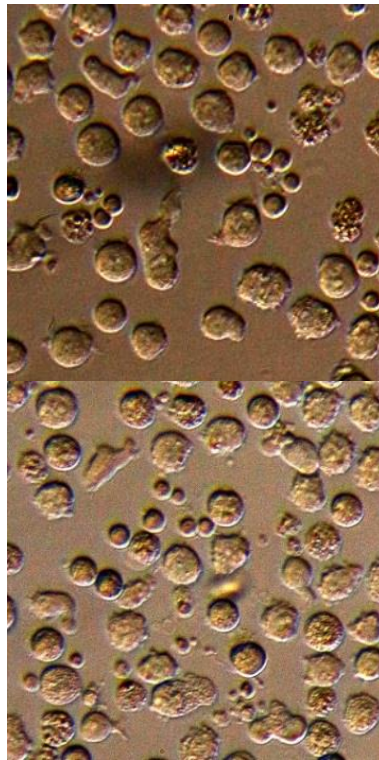
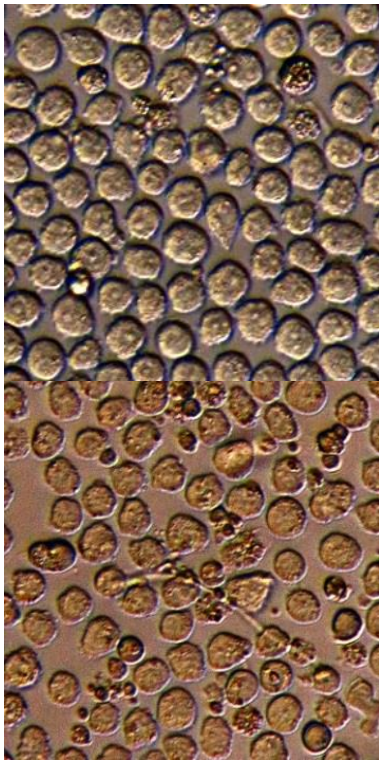
ช่วงเวลาในการทดสอบ

72

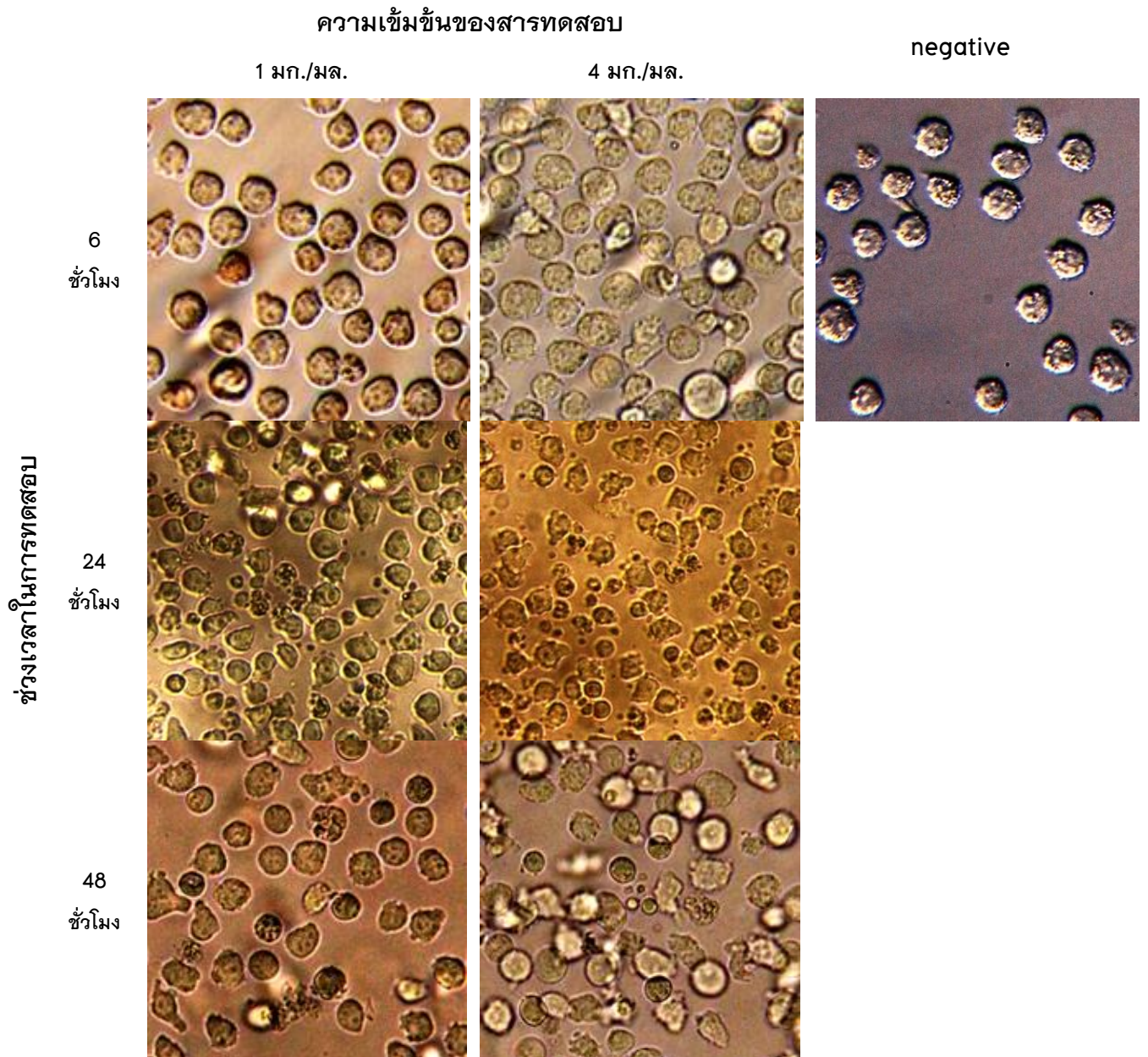
ชั่วโมง

96

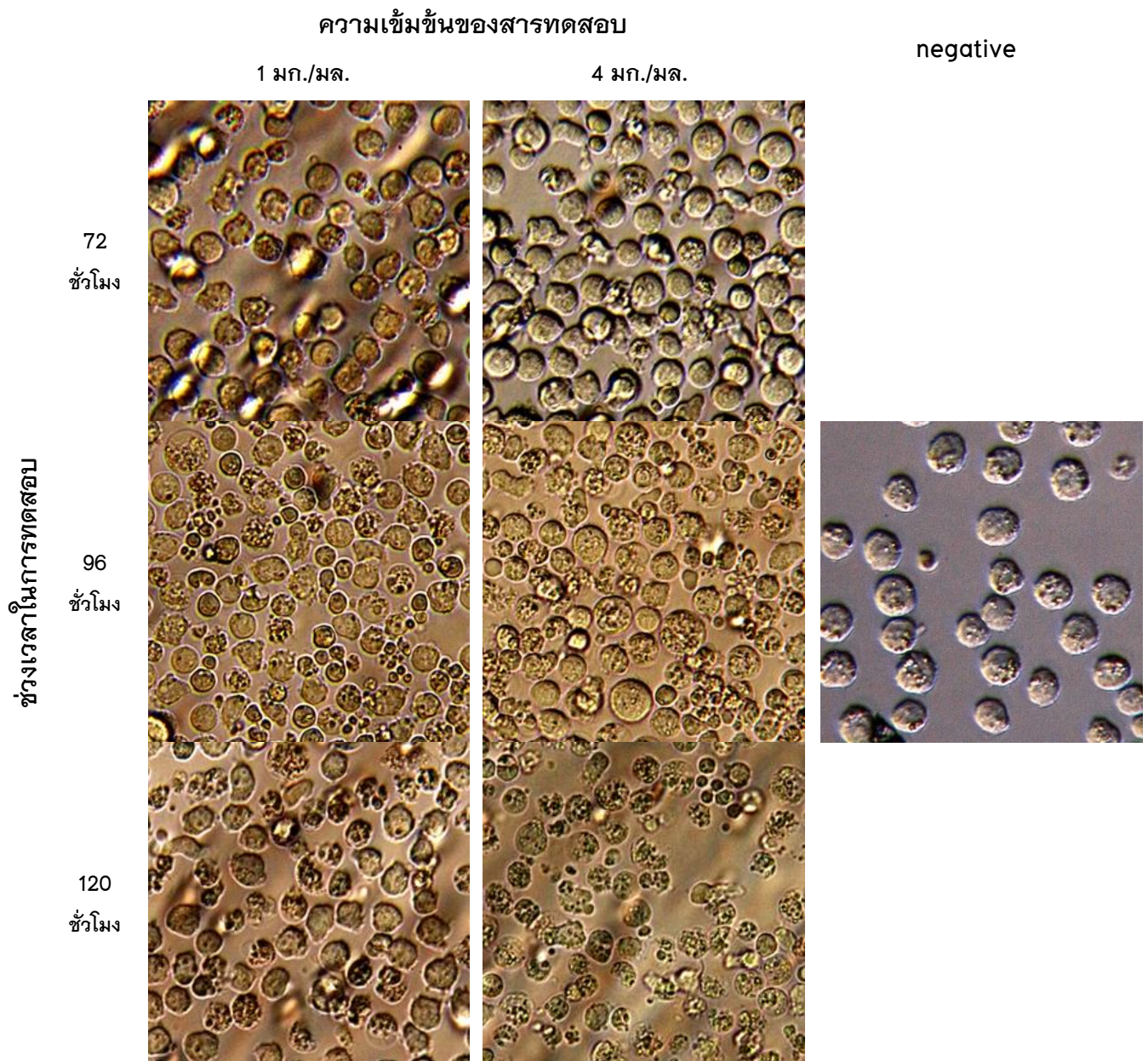
ชั่วโมง



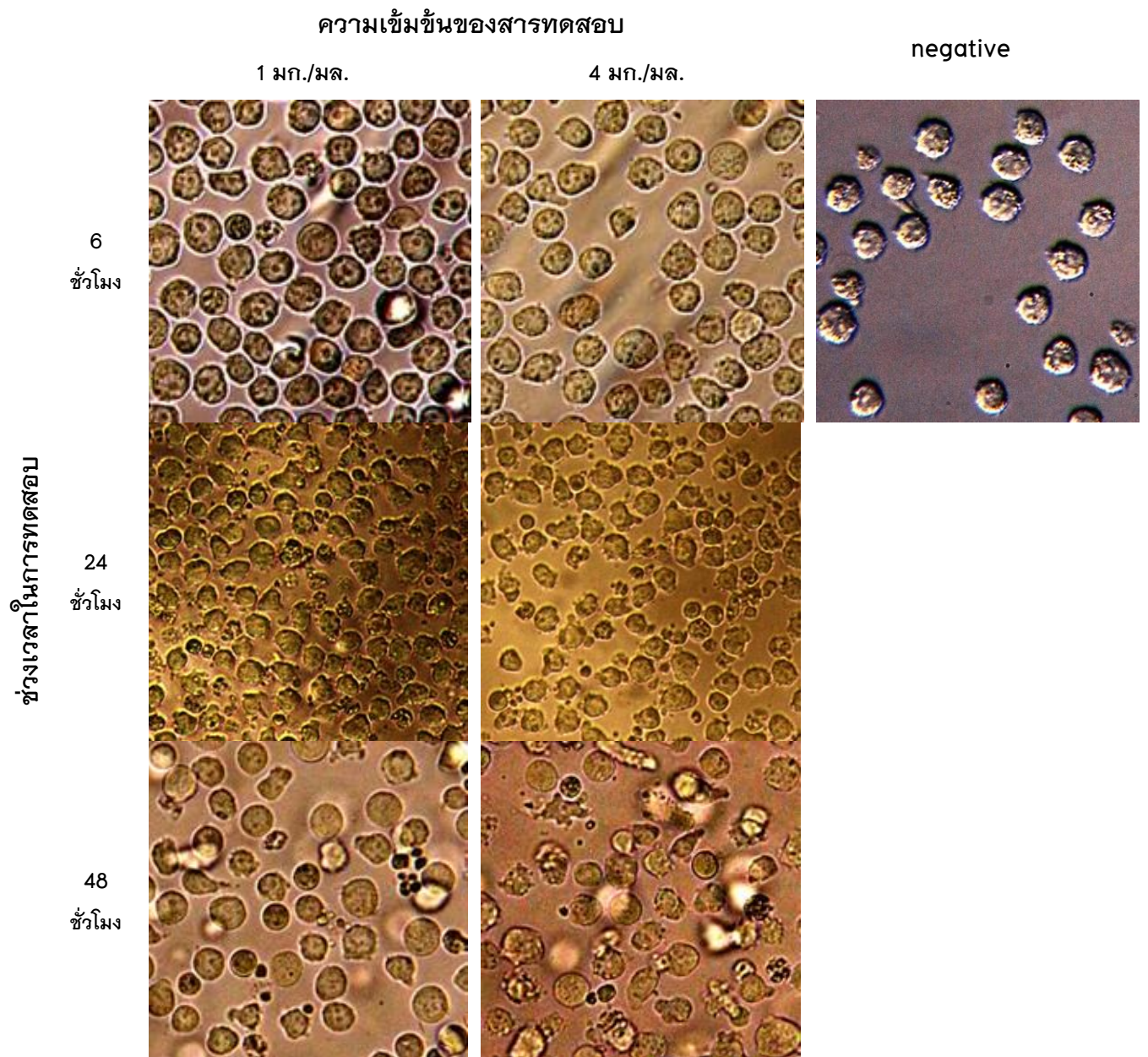
ภาพที่ 74 (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากผักแปม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



ภาพที่ 75 แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากสะแลป้อม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



ภาพที่ 75 (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากสะแลป้อม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



ภาพที่ 76 แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอล จากสะเลป้อม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน

ความเข้มข้นของสารทดสอบ

1 มก./มล.

4 มก./มล.

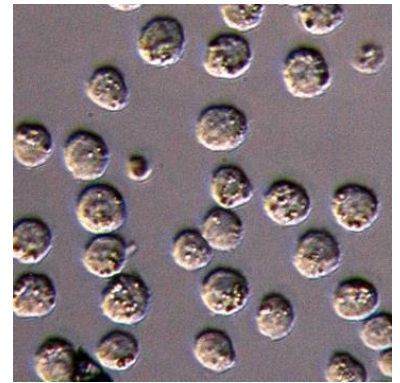
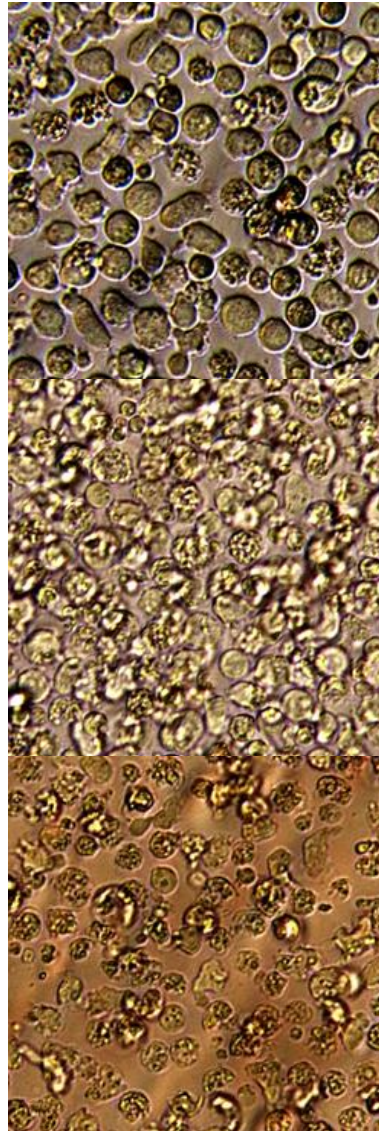
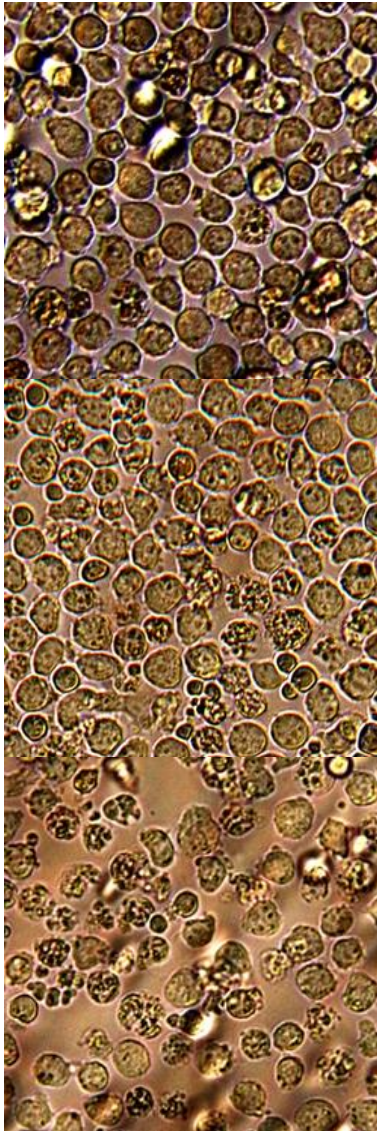
negative

ช่วงเวลาในการทดสอบ

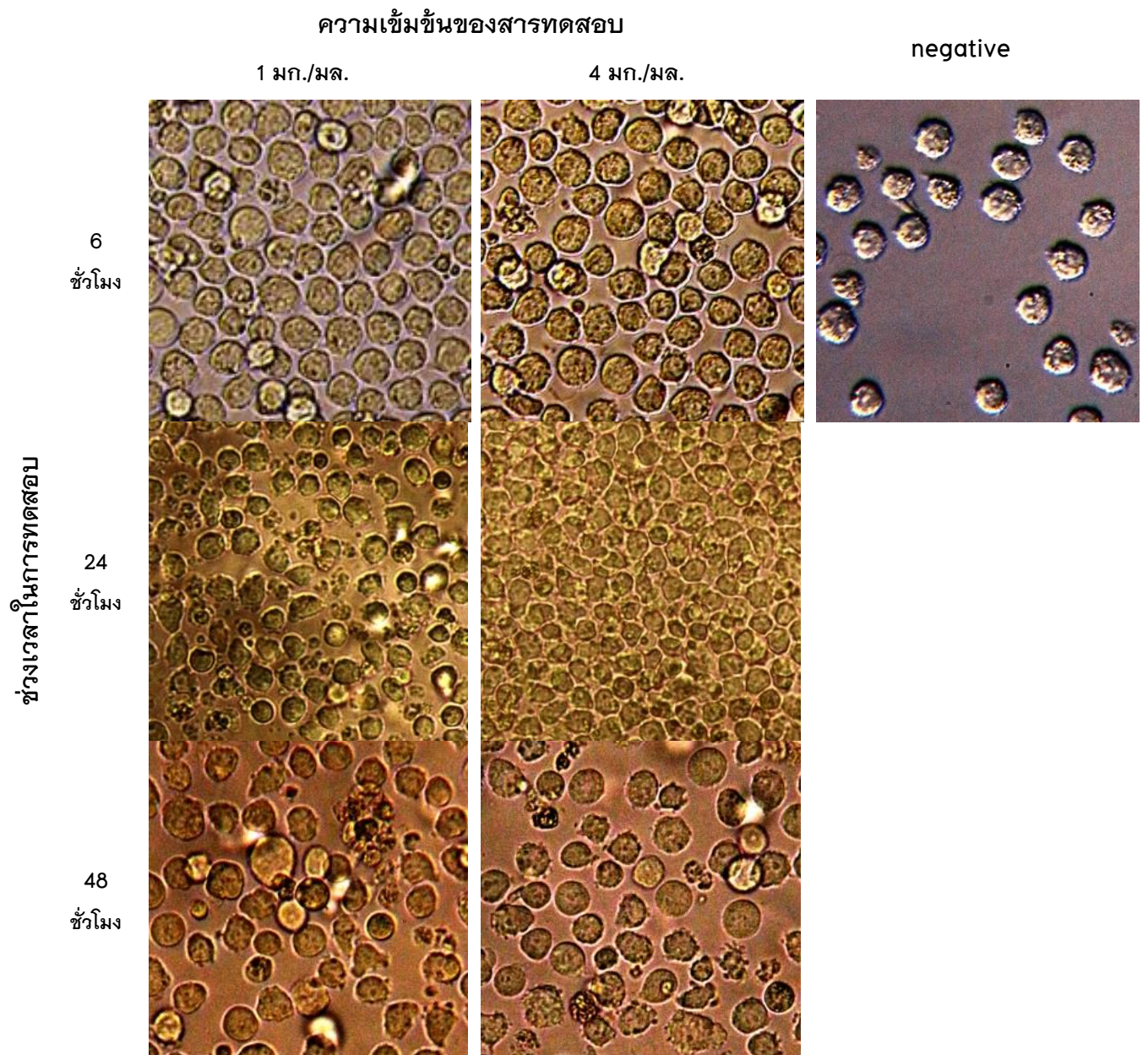
72  
ชั่วโมง

96  
ชั่วโมง

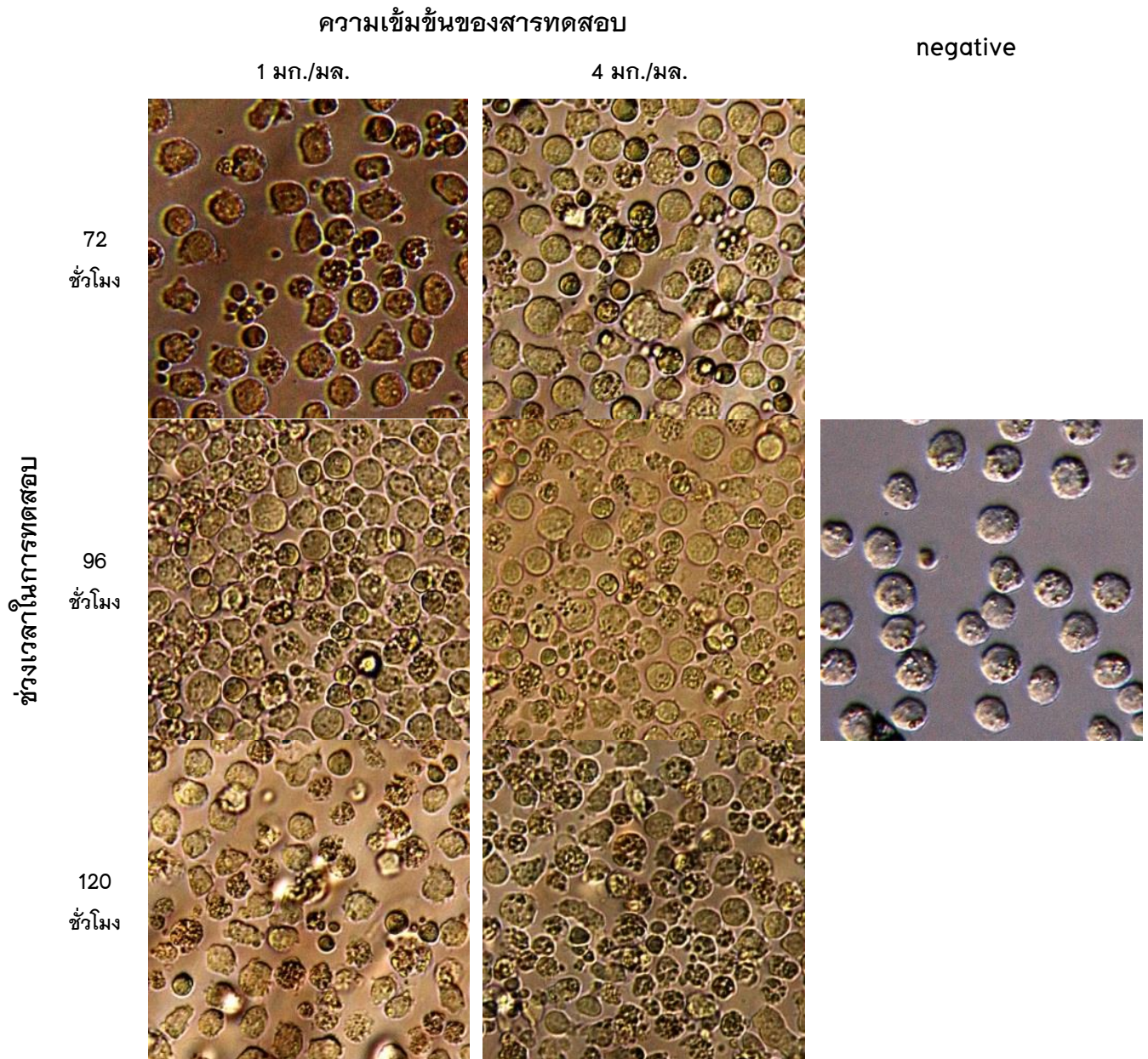
120  
ชั่วโมง



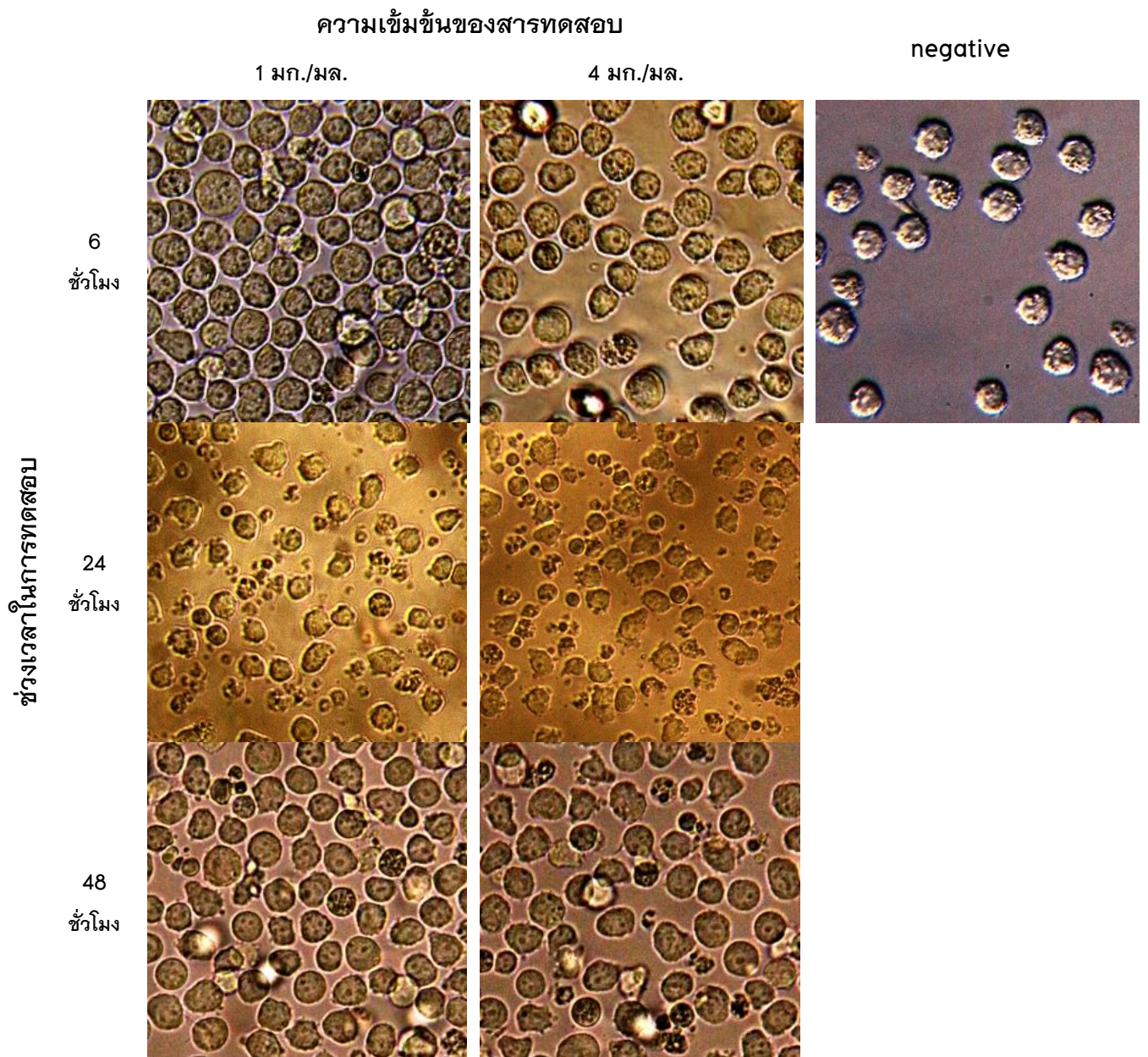
ภาพที่ 76 (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากสะเลป้อม ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



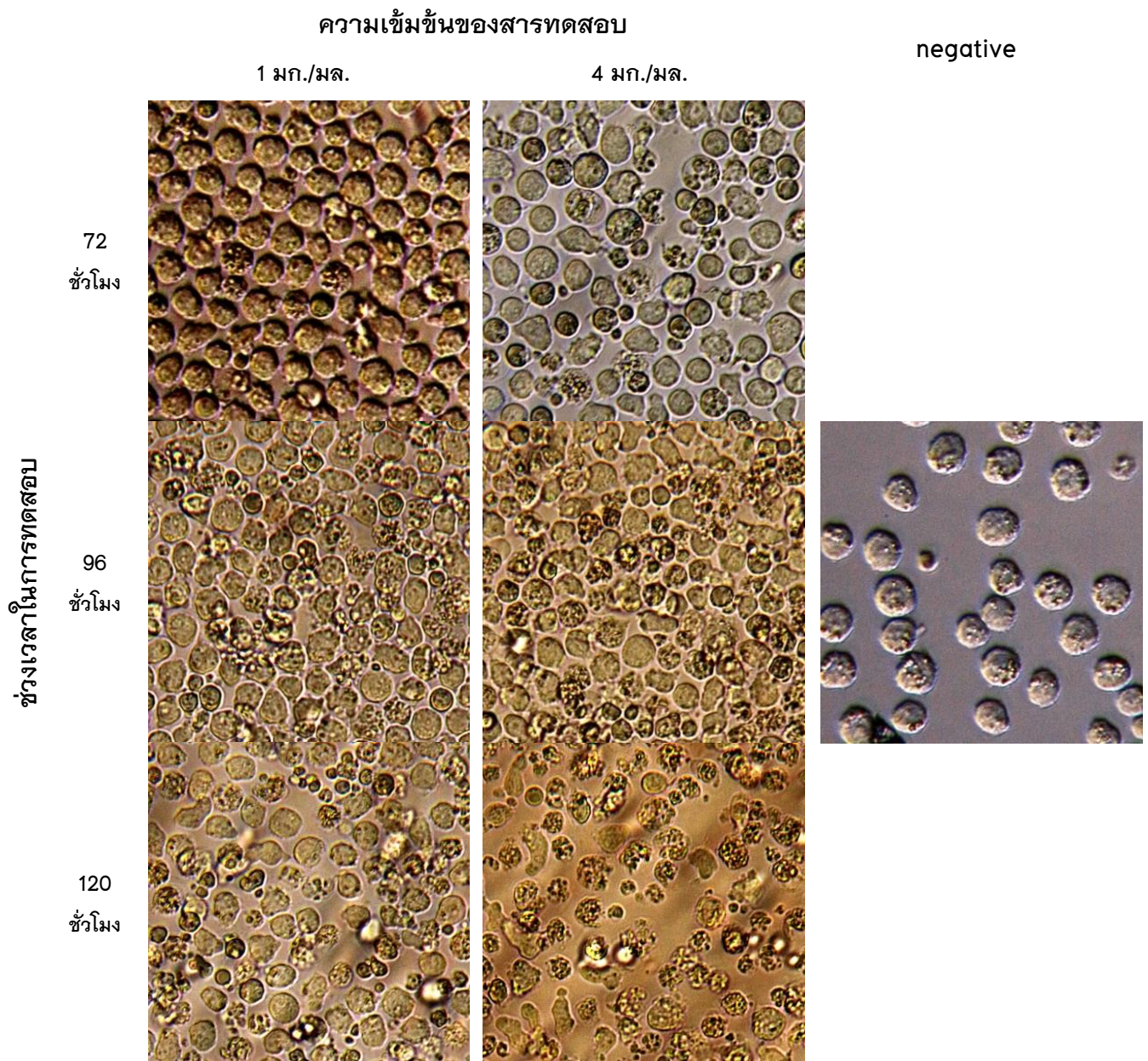
ภาพที่ 77 แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วย สารสกัดด้วยน้ำจากสะแลยาว ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



**ภาพที่ 77** (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากสะแลยาว ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน



ภาพที่ 78 แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากสะเลียว ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน

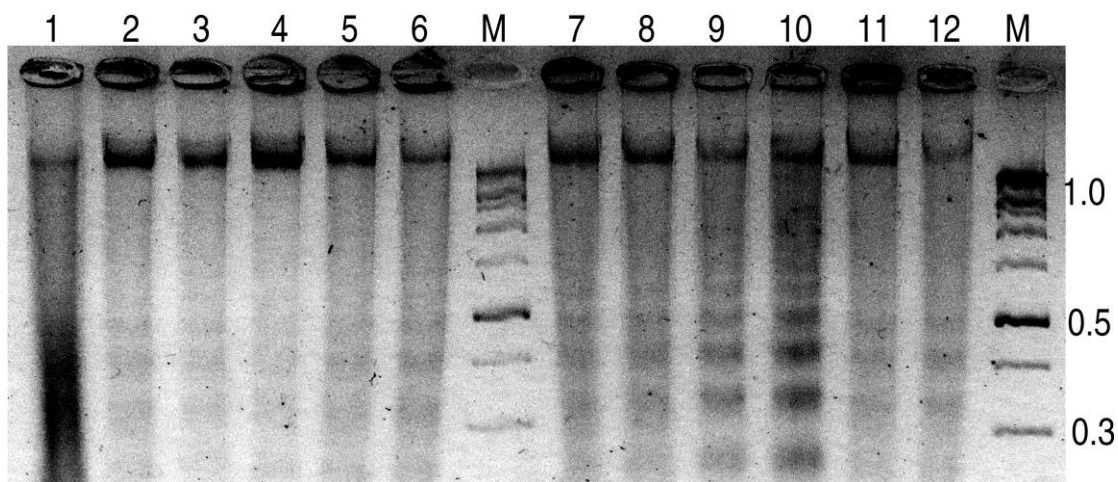


ภาพที่ 78 (ต่อเนื่อง) แสดงการติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็ง U-937 เมื่อถูกชักนำด้วยสารสกัดด้วยเอทานอลจากสะแลยาว ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล. ในระยะเวลาที่ต่างกัน

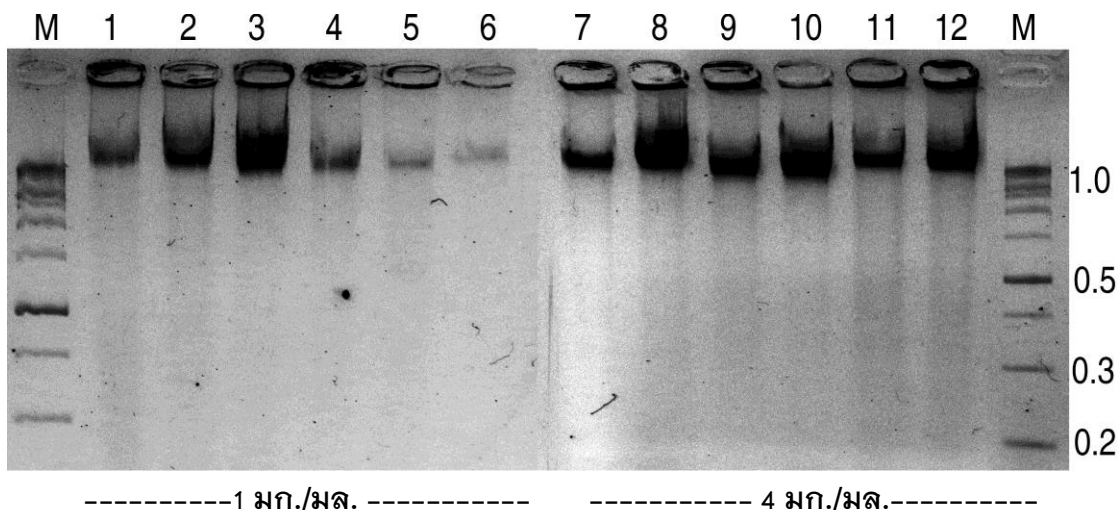
### 5.3 การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis โดย การติดตามการเกิด DNA fragmentation ของเซลล์มะเร็งทดสอบ

จากการติดตามการเกิด DNA fragmentation ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่เข้าสู่กระบวนการ apoptosis ผ่านทางการสกัด DNA จากเซลล์ทดสอบแล้วนำไปเคลื่อนที่ผ่านแผ่น agarose gel ในสนามไฟฟ้า พบว่า สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากผักหนาม ฝอยทองเล็ก และผักแปม แสดงฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ U-937 เข้าสู่ apoptosis pathway ได้ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ 1 มก./มล. และ 6 ชั่วโมงของการทดสอบซึ่งแรงที่สุดในกลุ่มพืชที่ใช้ทดสอบในโครงการวิจัยนี้ ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสะแลบ้อมและสะแลยาวแสดงฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ U-937 เข้าสู่ apoptosis pathway ได้ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ 1 มก./มล. เริ่มพบที่ 72 ชั่วโมง (3 วัน) ของการทดสอบและพบมากขึ้นที่ความเข้มข้นสารทดสอบ 4 มก./มล. ที่ 96 ชั่วโมง (4 วันของการทดสอบ)

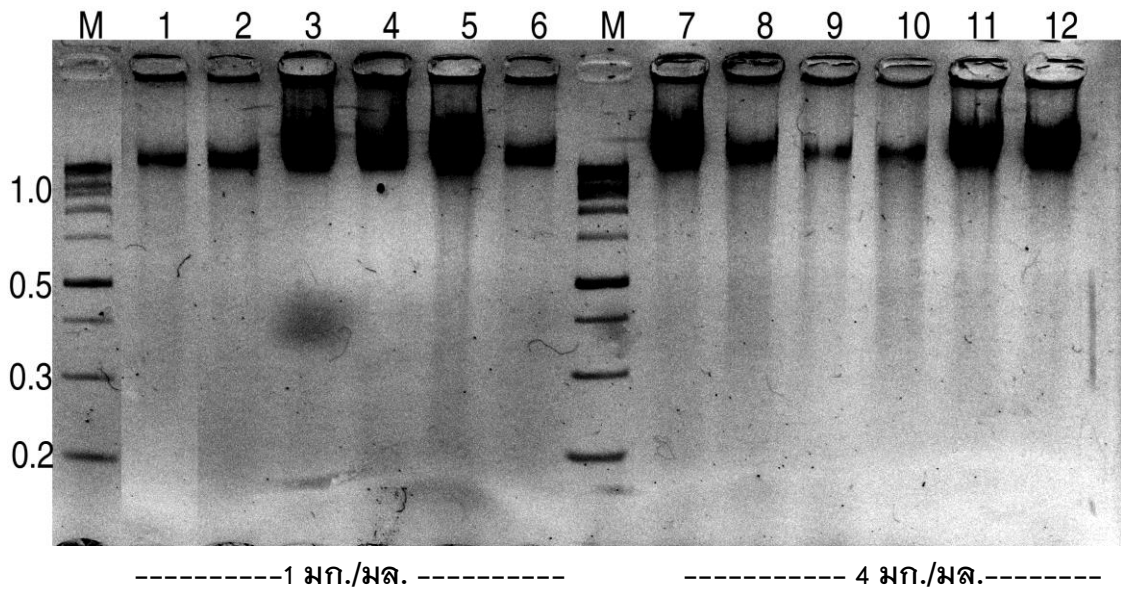
จากผลการทดลองพบว่า การเกิด morphological changes และ DNA fragmentation ของเซลล์ทดสอบเป็นไปในลักษณะที่ผันแปรตามความเข้มข้นและช่วงเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (dose and time dependent) เมื่อนำผลการทดสอบทั้ง 2 แบบมาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าสารสกัดด้วยน้ำและ เอทานอล จากพืชทั้ง 5 ชนิดที่รวบรวมมาคือ ผักหนาม ฝอยทองเล็ก ผักแปม สะแลบ้อมและสะแลยาว แสดงฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ U-937 เข้าสู่ apoptosis pathway ได้ด้วยฤทธิ์หรือความแรงที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามพบว่าการเปลี่ยนรูปร่างภายนอกของเซลล์ U-937 อันเนื่องมาจากถูก treat ด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นและช่วงเวลาต่างๆ จะเกิดตามหลังการเกิด DNA fragmentation ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้การทดสอบ cell morphological changes เป็นการ screen ฤทธิ์ความสามารถของสารสกัดจากพืชก่อนที่จะเลือกมาทดสอบ DNA fragmentation ได้ ทั้งที่เป็นการทดสอบที่ทำได้ง่ายกว่า แต่สามารถใช้เป็นผลการทดลองประกอบการตัดสินใจ ในการเลือกการทำการทดลองต่อไป อีกประการหนึ่ง การตรวจพบ DNA fragmentation เป็นหลักฐานสำคัญที่สุดเพื่อยืนยันว่าเซลล์ทดสอบเข้าสู่กระบวนการดังกล่าวจริง และเป็นข้อมูลสำคัญ ใช้ในการตัดสินใจทำการทดลองในเชิงลึกต่อไปว่า สารทดสอบนั้นๆ กระตุ้น protein intermediate ตัวใด (เช่น caspases, BAX เป็นต้น) งานวิจัยครั้งนี้ ลักษณะ apoptotic bodies ถูกพบมากกว่า Single large vesicle ซึ่งจะต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของพืชที่มีความแตกต่างจากพืชชนิดอื่นที่เคยทำการทดสอบในโครงการวิจัยที่ผ่านมาหรือไม่อย่างไร จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชที่รวบรวมมาทำการทดสอบทั้ง 10 ตัวอย่างนี้มีคุณสมบัติเด่นแตกต่างกันไป



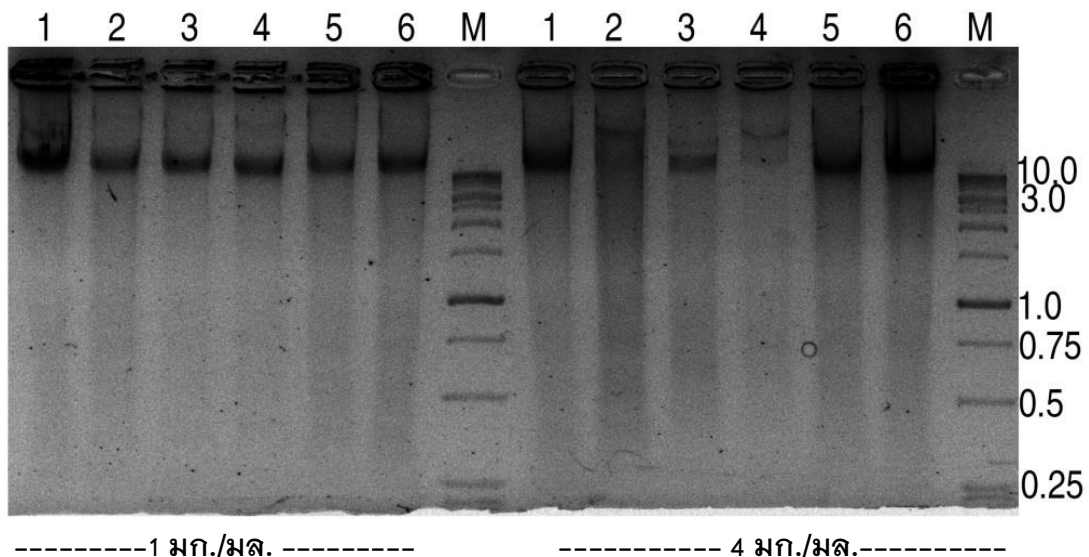
ภาพที่ 79 แสดงการชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่ 6 ชั่วโมง (1 และ 7; สารสกัดด้วยน้ำ/ผักหนาม, 2 และ 8; สารสกัดด้วยเอทานอล/ผักหนาม, 3 และ 9; สารสกัดด้วยน้ำ/ฟอยทองเล็ก, 4 และ 10; สารสกัดด้วยเอทานอล/ฟอยทองเล็ก, 5 และ 11; สารสกัดด้วยน้ำ/ผักแปม, 6 และ 12; สารสกัดด้วยเอทานอล/ผักแปม)



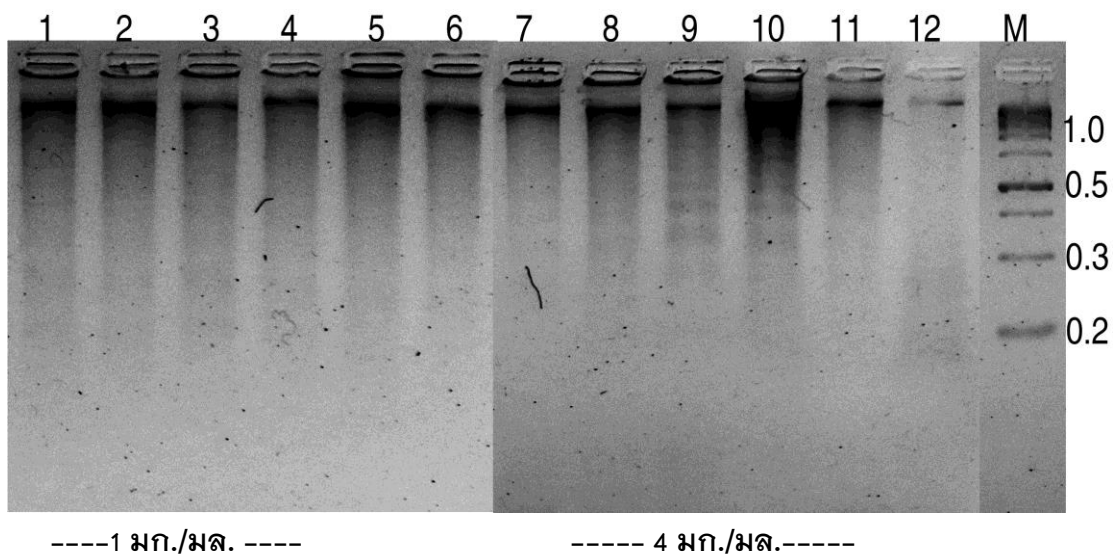
ภาพที่ 80 แสดงการชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง (1 และ 7; สารสกัดด้วยน้ำ/ผักหนาม, 2 และ 8; สารสกัดด้วยเอทานอล/ผักหนาม, 3 และ 9; สารสกัดด้วยน้ำ/ฟอยทองเล็ก, 4 และ 10; สารสกัดด้วยเอทานอล/ฟอยทองเล็ก, 5 และ 11; สารสกัดด้วยน้ำ/ผักแปม, 6 และ 12; สารสกัดด้วยเอทานอล/ผักแปม)



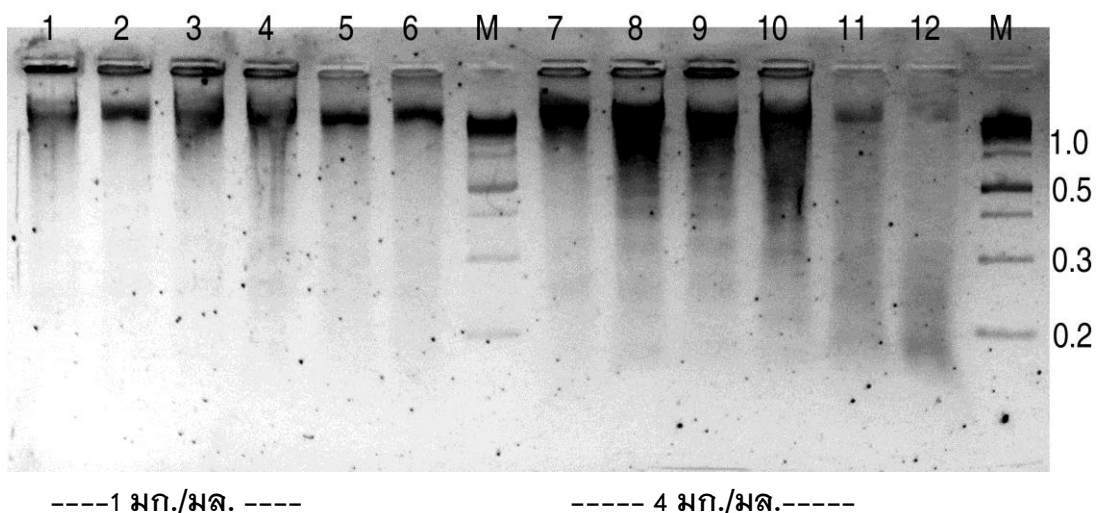
ภาพที่ 81 แสดงการชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่ 48 ชั่วโมง (1 และ 7; สารสกัดด้วยน้ำ/ผักหนาม, 2 และ 8; สารสกัดด้วยเอทานอล/ผักหนาม, 3 และ 9; สารสกัดด้วยน้ำ/ฟอยทองเล็ก, 4 และ 10; สารสกัดด้วยเอทานอล/ฟอยทองเล็ก, 5 และ 11; สารสกัดด้วยน้ำ/ผักแปม, 6 และ 12; สารสกัดด้วยเอทานอล/ผักแปม)



ภาพที่ 82 แสดงการชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่ 72 ชั่วโมง (1 และ 7; สารสกัดด้วยน้ำ/ผักหนาม, 2 และ 8; สารสกัดด้วยเอทานอล/ผักหนาม, 3 และ 9; สารสกัดด้วยน้ำ/ฟอยทองเล็ก, 4 และ 10; สารสกัดด้วยเอทานอล/ฟอยทองเล็ก, 5 และ 11; สารสกัดด้วยน้ำ/ผักแปม, 6 และ 12; สารสกัดด้วยเอทานอล/ผักแปม)



ภาพที่ 83 แสดงการชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่ 72 ชั่วโมง (1 และ 7; สารสกัดด้วยน้ำ/สะแลป้อม, 2 และ 8; สารสกัดด้วยเอทานอล/สะแลป้อม, 3 และ 9; สารสกัดด้วยน้ำ/สะแลยาว, 4 และ 10; สารสกัดด้วยเอทานอล/สะแลยาว, 5 และ 11; negative control, 6 และ 12; negative control)



ภาพที่ 84 แสดงการชักนำให้เกิด DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง U-937 ด้วยสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่ 96 ชั่วโมง (1 และ 7; สารสกัดด้วยน้ำ/สะแลป้อม, 2 และ 8; สารสกัดด้วยเอทานอล/สะแลป้อม, 3 และ 9; สารสกัดด้วยน้ำ/สะแลยาว, 4 และ 10; สารสกัดด้วยเอทานอล/สะแลยาว, 5 และ 11; negative control, 6 และ 12; negative control)

ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงคุณค่าและประโยชน์ที่ได้รับจากผักพื้นบ้านทั้งสี่ชนิดได้แก่ ฝอยทอง ผักแปม ผักหนาม และสะแล ทั้งในด้านการเป็นพืชอาหารและสมุนไพร งานวิจัยนี้มีประโยชน์และมีความสำคัญเพราะเป็นงานที่เริ่มศึกษากันอย่างจริงจัง อาทิ การรวบรวมต้นพันธุ์ ลักษณะพันธุ์ การศึกษาทางลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คุณค่าทางโภชนาการ นอกจากนี้พืชผักพื้นบ้านของไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวเคมีที่น่าสนใจ โดยเฉพาะฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ทดสอบเกิดการตายแบบ apoptosis ได้ดี ทั้งนี้งานวิจัยต่อไปจะได้ทำการศึกษาในเชิงลึก ถึงฤทธิ์เดียวกันนี้ และฤทธิ์อื่นๆ อาทิ immunomodulation activities เพื่อเป็นข้อมูลในการใช้ประโยชน์ทางยา หรือทางเครื่องสำอางต่อไป

### สรุปผลการทดลอง

1. ด้านสภาพพื้นที่ นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ของ ฝอยทอง กระจายพันธุ์ตามพื้นที่รกร้างและอาศัยอยู่กับพืชอาหาร ผักแปม ผักหนาม และสะแล มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมซึ่งอาศัยอยู่ตามป่าเบญจพรรณทั่วไป แต่เมื่อถูกนำออกจากป่ากลายเป็นพืชปลูก จึงมีสภาพนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยอยู่ในสภาพพื้นที่สวนเกษตร สวนครัว หรือตามสวนผลไม้ ซึ่งมีการดูแลเรื่องน้ำและธาตุอาหารจากเกษตรกร ส่วนมะแปมมีกระจายพันธุ์ตามแหล่งอาศัยในป่าเบญจพรรณทั่วไป

2. ด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤกษศาสตร์พบว่า ฝอยทองที่เก็บรวบรวมมีอยู่สองชนิดโดยมีลักษณะที่ความแตกต่างด้านลำต้น ลักษณะดอกและผล ขณะที่ผักแปมมีลักษณะคล้ายคลึงกัน ส่วนผักหนามมีลักษณะที่แตกต่างกันคือรูปทรงของใบที่มีหลายรูปแบบสำหรับสะแลมีลักษณะดอกที่แตกต่างกันเพราะมีดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่คนละต้น

3. ด้านคุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของฝอยทองและผักหนาม พบว่า ฝอยทองประกอบด้วยธาตุอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะโพแทสเซียม และฟอสฟอรัสที่มีปริมาณสูง รวมทั้งมีวิตามินเอ วิตามินบี ๑ วิตามินบี ๒ ส่วนผักหนามมีปริมาณฟอสฟอรัสและแคลเซียมสูง มีวิตามินเอ วิตามินอี วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 สำหรับปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดที่พบในฝอยทองใหญ่ และผักหนามเท่ากับ 215 และ 22.40 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ขณะที่ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด ที่พบในฝอยทองใหญ่ และผักหนามเท่ากับ 9.38 และ 15.48 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

4. ด้านการขยายพันธุ์พบว่า ฝอยทองขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและลำต้น ผักแปม สะแล และมะแพนขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและการปักชำกิ่ง ผักหนามขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและการแยกเหง้าหรือไหล

5. ด้านการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่า มีฝอยทองที่สามารถวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้เนื่องจากตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจมีจำนวนมาก ส่วนพืชอื่นได้แก่ ผักแปม ผักหนาม สะแล และมะแพน เก็บรวบรวมตัวอย่างได้จำนวนน้อยจึงได้ดำเนินการหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยพบว่าตัวอย่างฝอยทองสามารถแยกชัดเจนได้ 2 กลุ่มได้แก่ ฝอยทองเส้นเล็กและฝอยทองเส้นใหญ่สอดคล้องตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบ และตัวอย่างในแต่ละกลุ่มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ สำหรับผักแปมพบว่ามีไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 8 ชนิด ขณะที่ผักหนามพบไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 7 ชนิด ส่วนสะแลมีไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 15 ชนิด

6. ด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน พบว่า สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากพืชพื้นบ้านได้แก่ ฝอยทอง ผักแปม ผักหนาม และสะแล ที่ความเข้มข้น 1 และ 4 มก./มล.ในช่วงเวลาต่างกัน มีศักยภาพที่จะทำให้เซลล์ U-937 ซึ่งเป็นเซลล์ทดสอบมีการเปลี่ยนแปลงทั้งการพบลักษณะของเซลล์แบบ apoptotic bodies และการเกิด DNA fragmentation ซึ่งจะได้มีการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการวิจัยต่อไป

7. งานวิจัยในแต่ละการทดลองที่ดำเนินการในระยะที่ 1 มีข้อมูลหลายอย่างที่ยังไม่ครบถ้วนจึงจะมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในงานวิจัยระยะที่ 2 ให้มีข้อมูลที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้นเพื่อให้สามารถนำไปเผยแพร่และตีพิมพ์ในรูปแบบบทความทางวิชาการระดับนานาชาติ รวมทั้งเพื่อพัฒนางานวิจัยนำไปใช้ในการพัฒนาไปเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป นอกจากนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยในผักพื้นบ้านหรือผักชนิดอื่นได้และผลจากการวิจัยสามารถนำไปใช้กับงานวิจัยด้านอื่นได้แก่ งานวิจัยด้านการผลิตพืชสมุนไพร เป็นต้น

## บรรณานุกรม

- เกศศิณี ตระกูลทิวากร เพลินใจ ตังคณะกุล จันท์เพ็ญ แสงประกาย จันท์สุดา จริยวัฒน์ วิจิตร พะยอม อัดถวิบูลย์กุล และบุญมา นิยมวิทย์. 2544. ศักยภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรมป่าไม้, 379 น.
- ประทุมพร ยิ่งงชัย พรรัตน์ ศิริคำ พงศธร ธรรมณอม และ บาคารีย์ ฉัตรทอง. 2554. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของผักพื้นบ้านไทย. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2554 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 93 น.
- ประทุมพร ยิ่งงชัย พรรัตน์ ศิริคำ พงศธร ธรรมณอม และ บาคารีย์ ฉัตรทอง. 2556. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของผักพื้นบ้าน. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2556 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 127 น.
- พงศธร ธรรมณอม (๒๕๕๐) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ “การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการชักนำให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งในช่องปากและเซลล์มะเร็งระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์ ของ essential oil และสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรไทย (Cytotoxic and apoptosis induction activities of essential oil and extracts from Thai medicinal plants on KB and HeLa cell lines)” ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ทุนสนับสนุนจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี ๒๕๕๐)
- พงศธร ธรรมณอม (๒๕๕๒) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ การศึกษาศักยภาพของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง (The potential of essential oil and crude extract from Thai medicinal plants for cancer therapy) ศูนย์วิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ทุนสนับสนุนจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี ๒๕๕๒)
- วัชรวิ ประชาศรัยสรเดช. 2548. ผักพื้นเมือง เฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี 50 พรรษา 2 เมษายน 2548, กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 120 น.

- Chen, M.- C., X. Liu, J.-Y. Wang, G. W. Robert and Q.-F. Wang. (2005). Genetic variation within the endangered quillwort *Isoetes hypsophila* (Isoetaceae) in China as evidenced by ISSR analysis. *Aqua. Bot.* 82: 89–98.
- Costa-Lotufo, L. V., Khan, M. T. H., Ather, A., Wilke, D. V., Jimenez, P. C., Pessoa, C., and de Moraes, M. O. (2005). Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *J. of Ethnopharmacology*, 99 (1), 21–30.
- He, X., Yang, W., Ye, M., Wang, Q., & Guo, D. (2011). Differentiation of *Cuscuta chinensis* and *Cuscuta australis* by HPLC–DAD–MS analysis and HPLC–UV quantitation. *Planta medica*, 77 (17), 1950–1957.
- Hossan, M.S., A. Hanif, M. Khan, S. Bari, R. Jahan and M. Rahmatullah. (2009). Ethnobotanical survey of the Tripura tribe of Bangladesh. *American–Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3: 253–261.
- Manosroi, J., Dhumtanom. P. and Manosroi A. (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Letts*, 235: 114–120.
- Nakahara, K., Trakoontivakorn, G., Alzoreky, N. S., Ono, H., Onishi–Kameyama, M., & Yoshida, M. (2002). Antimutagenicity of some edible Thai plants, and a bioactive carbazole alkaloid, mahanine, isolated from *Micromelum minutum*. *J. of agricultural and food chemistry*, 50 (17): 4796–4802.
- Rohlf, F. J. 2005. NTSYSpc : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.2. Exeter Software, Setauket, New York.
- Sithisarn P, Jarikasem S. (2009). Antioxidant activity of *Acanthopanax trifoliatum*. *Med Princ Pract*; 18 (5):393–8. Epub 2009 Jul. 31.
- Spaulding, D.D. (2013). Key of the dodders (*Cuscuta*, Convolvulaceae) of Alabama and adjacent states. *Phytonueruron* 74: 1–15.
- Stefanović, S., Kuzmina, M., and Costea, M. (2007). Delimitation of major lineages within *Cuscuta* subgenus *Grammica* (Convolvulaceae) using plastid and nuclear DNA sequences. *Amer. J. Bot.*, 94(4): 568–589.

- Suresh V, Sruthi V, Padmaja B, Asha VV. (2011). In vitro anti-inflammatory and anti-cancer activities of *Cuscuta reflexa* Roxb. *J. Ethnopharmacol.* Apr. 12; 134(3): 872–7. Epub 2011, Feb. 1.
- Terzpoulos, P. J., B. Kolano, P. J. Bebeli, P.J. Kaltsikes and I. Meetzidakis. (2005). Identifiacion of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Hort. Sci.* 105:45–51.
- Yang HM, Shin HK, Kang YH, Kim JK. (2009). *Cuscuta chinensis* extract promotes osteoblast differentiation and mineralization in human osteoblast-like MG-63 cells. *J Med Food.* Feb; 12 (1): 85–92.
- Yen, F. L., Wu, T. H., Lin, L. T., & Lin, C. C. (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *J. of ethnopharmacol.*, 111 (1): 123–128.
- Yingthongchai, P., Naphrom, D., and Smitamana, P. (2014). Assessment of genetic diversity in *Elaeagnus latifolia* L. by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *International Journal of Agricultural Technology*, 10(3): 791–802.
- Yuncker, T. G. (1932). The genus *Cuscuta*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club.*, 18: 113–331.
- Zhang, X.-P., X.-H. Li and Y.-X. Qiu. (2006). Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China. *Biochem. Syst. Ecol.* 34 (1): 38–47.

## ภาคผนวก

### 1. รายชื่อสารเคมีสำคัญที่ต้องใช้ในงานวิจัย

#### 1.1 สำหรับเตรียมบัฟเฟอร์อิเล็กโทรโฟรีซิส

- Tris base
- boric acid
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA)

#### 1.2 สำหรับสกัดดีเอ็นเอ และ PCR

- DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
- PCR Master mix solution (*i*-Taq)

#### 1.3 สำหรับเตรียม Loading buffer

- bromphenol blue
- xylene cyanol
- glycerol

#### 1.5 สารเคมีอื่นๆ

- Ethidium bromide
- Agarose
- DNA ladder
- Liquid nitrogen

### 2. การเตรียมบัฟเฟอร์ต่างๆที่ใช้ในการทำวิจัย

#### 2.1 การเตรียม 10x TBE (1.0 ลิตร)

- Tris base ปริมาณ 108 กรัม
- Boric acid ปริมาณ 55 กรัม
- 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 40.0 มิลลิลิตร
- เติมน้ำกลั่นและปรับให้ได้ปริมาตร 1.0 ลิตร

## 2.2 การเตรียม 0.5 M EDTA pH 8.0:

ชั่ง EDTA 18.612 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย เติม 10 N NaOH หรือ NaOH แบบเม็ด ปรับพีเอช (pH) ให้ได้ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

## 2.3 การเตรียม TE buffer (100 มิลลิลิตร):

- 1.0 M Tris pH 8.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร
- 0.5 EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น 2 ครั้งที่ผ่านมาการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 98.8 มิลลิลิตร

## 2.4 การเตรียม อะกาโรสเจล (Agarose gel)

-Agarose gel ความเข้มข้น 0.8 % :

ชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม เติม TBE หรือ TAE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลอมโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราว ให้อะกาโรสละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น 50-55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดเทเจล เสียบหรือลงตรงตำแหน่ง ปล่อยให้เจลแข็งตัว ที่อุณหภูมิห้อง

-Agarose gel ความเข้มข้น 1.5 %:

ชั่งอะกาโรส 1.5 กรัม เติม TBE หรือ TAE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลอมโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราว ให้อะกาโรสละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น 50-55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดเทเจล เสียบหรือลงตรงตำแหน่ง ปล่อยให้เจลแข็งตัว ที่อุณหภูมิห้อง