รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยเรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของผักพื้นบ้าน (ระยะที่ ๑)

Genetic diversity and biochemical activities test of indigenous vegetables (phase ๑)

จัดทำโดย

๑. นางประทุมพร ยิ่งธงชัย

๒. นางพรรัตน์ ศิริคำ

๓. นายพงศธร ธรรมถนอม

๔. นางสาวบาจรีย์ ฉัตรทอง

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๕

คำนำ

ผักพื้นบ้านที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนมีมากมายหลากหลายชนิด ส่วนใหญ่นำมาใช้เป็นอาหาร โดยนิยมนำส่วนต่างๆมาปรุงเป็นอาหาร ผักพื้นบ้านเหล่านี้มีทั้งที่เป็นพืชปลูกและพืชป่าและมักเป็นผักตามฤดูกาล ผักพื้นบ้านทุกชนิดนอกจากมีคุณค่าทางอาหารแล้วยังมีสรรพคุณในการเป็นสมุนไพรรักษาโรค ซึ่งคุณค่าในการรักษาโรคนี้ถูกใช้โดยภูมิปัญญาของชาวบ้านมาเป็นระยะเวลาอันยาวนาน ดังนั้นการศึกษาวิจัยผักพื้นบ้านควรได้รับการสนับสนุนอย่างจริงจังรวมทั้งควรอนุรักษ์ให้คงอยู่ในสังคมไทยตลอดไป ปัจจุบันมีผักพื้นบ้านหลายชนิดที่มีรายงานด้านการรักษาโรคต่างๆ และสิ่งที่น่าสนใจคือผักพื้นบ้านไทยหลายชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในร่างกายได้ สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้นำผักพื้นบ้านมาศึกษาเพียง ๔ ชนิดได้แก่ ผักฮ้วน (*Dregea volubilis* Stapf.) ผักเชียงดา (*Gymnema inodorum* Dence.) ถั่วแปบ (*Dolichos lablab* Linn.) และเพกา (*Oroxylum indicum* (L.) Vent.) โดยทั้งผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายด้วยมีคุณค่าทางอาหารและยารักษาโรค โดยมีรายงานว่าผักทั้งสี่ชนิดมีศักยภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระอยู่ในระดับสูง ทำให้มีโอกาสที่จะมีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ ด้วยคุณค่าเหล่านี้จึงทำให้ผักพื้นบ้านทั้งสี่ชนิดนี้มีความน่าสนใจและมีแนวโน้มว่าเป็นพืชที่มีอนาคตที่ดีในทางเศรษฐกิจ ดังนั้นผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา จึงเป็นพืชทางเลือกในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าและความสำคัญของผักพื้นบ้านให้มากขึ้น แต่ด้วยผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา ที่พบในพื้นที่ภาคเหนือยังไม่พบรายงานการศึกษาทางด้านความหลากหลายด้านสายพันธุ์มาก่อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องสำรวจ เก็บรวบรวมตัวอย่างจากหลายพื้นที่ เพื่อเก็บข้อมูลทางสัณฐานวิทยา การกระจายพันธุ์ และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ รวมทั้งวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการสำหรับการเป็นอาหาร และสกัดสารจากผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา สำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้านความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เพื่อพัฒนาและเพิ่มคุณค่าผักพื้นบ้านในการเป็นสมุนไพรเพื่อใช้ทางการแพทย์ต่อไป

คณะนักวิจัย

ธันวาคม ๒๕๕๕

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๕๕

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อพุฒ คุณแม่ศรีพรรณ กันทพนม ขอบคุณคุณชณทัต สิงห์บ้านหาด คุณชัยอนันต์ โพธิพฤกษ์ คุณโสภณ บุญธรรมและเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวงทุกท่าน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คุณพรรณี ศรีเรือน และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เกษตรกรและทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้ให้ลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างผักพื้นบ้านจำนวน ๔ ชนิดได้แก่ ผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา ในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน เพื่อนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมี โดยเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา พฤกษศาสตร์ และนิเวศวิทยา ขณะที่ตัวอย่างของใบและผลนำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ และหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังนำสารสกัดของตัวอย่างใบและผลมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมี ผลจากการวิจัยพบว่าผักทั้ง ๔ ชนิดนั้นเป็นพืชปลูกและเจริญเติบโตได้ในสภาพพื้นที่ทั่วไป ดังนั้นลักษณะนิเวศวิทยาแหล่งอาศัยของผักแต่ละชนิดไม่ได้มีความแตกต่างกัน ด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤกษศาสตร์พบว่าผักฮ้วนแต่ละต้นพันธุ์มีลักษณะของต้น ลักษณะใบและดอกไม่แตกต่างกัน ส่วนผักเชียงดาก็มีลักษณะต้นและดอกไม่แตกต่างกัน ยกเว้นความแตกต่างในรูปทรงของใบที่มีทั้งใบใหญ่กว้างและใบรียาว สำหรับถั่วแปบมีลักษณะต้นและใบที่ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นสีดอกที่พบมีทั้งสีขาวและสีม่วง อีกทั้งลักษณะผลมีรูปทรงและขนาดแตกต่างกัน ขณะที่เพกามีลักษณะต้น ใบและผลคล้ายกันแต่มีลักษณะดอกต่างกัน ด้านการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีรวมทั้งคุณค่าทางโภชนาการพบว่า ดอกของผักฮ้วนมีปริมาณโซเดียม แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมสูงและยังประกอบด้วยวิตามินเอ วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และวิตามินบี๑ สำหรับฝักถั่วแปบมีปริมาณโปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมสูงและประกอบด้วยวิตามินอี วิตามินบี๑ ขณะที่ฝักเพกามีปริมาณโซเดียม แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม วิตามินเอ วิตามินอี และเบต้าแคโรทีนสูง ส่วนปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดที่พบในดอกผักฮ้วนและฝักเพกาสูงกว่าฝักถั่วแปบ สำหรับการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์พบว่า ผักฮ้วนจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ที่เหมาะสมจำนวน ๑๐ ชนิด มีเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมเท่ากับ ๖๔.๐๘ ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ระหว่าง ๐.๖๗–๐.๘๑ และค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ ๐.๗๙๘๐๘ แสดงถึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรผักฮ้วนอยู่ในระดับปานกลาง สำหรับผักเชียงดาจำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ที่เหมาะสมจำนวน ๑๒ ชนิด พบว่าผักเชียงดามีเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมเท่ากับ ๖๖.๕๐ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ระหว่าง ๐.๖๔–๐.๗๘ และค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ ๐.๘๒๑๒๔ แสดงให้เห็นว่ายังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรผักเชียงดาแต่อยู่ในระดับปานกลาง ขณะที่ถั่วแปบจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ ๘ ชนิดพบว่า มีเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมเท่ากับ ๕๒.๐๐ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ระหว่าง ๐.๗๓–๐.๘๘ และค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ

๐.๓๙๘๑๑ แสดงถึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรถั่วแปบอยู่ในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ ส่วนเพกาจำนวน ๔ ต้นพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ ๑๑ ชนิดพบว่ามีเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมเท่ากับ ๕๑.๑๑ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ระหว่าง ๐.๕๙–๐.๗๓ และค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ ๐.๘๗๔๗๘ แสดงถึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรเพกาอยู่ระดับปานกลาง ผลการศึกษาสรุปว่าผักพื้นบ้านแต่ละชนิดมีความผันแปรทางพันธุกรรมแม้ว่าต้นพันธุ์ส่วนใหญ่มีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกัน โดยผักเชียงดา เพกา และผักฮ้วนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าถั่วแปบ

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของผักทั้งสามชนิดพบว่า สารสกัดหยาบจากการต้มน้ำของฝักถั่วแปบ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทดสอบ HT–๒๙ และสารสกัดด้วย methanol ของฝักถั่วแปบ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทดสอบ HL–๖๐ ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่างพืชที่นำมาทำการทดสอบโดยมีค่า IC๕๐ = ๐.๕๓±๐.๒๓ และ ๐.๔๔±๐.๐๘ mg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากถั่วแปบด้วยการต้มน้ำแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ HT–๒๙ ได้ดีกว่า Irinothecan ซึ่งเป็น positive control ถึง ๑.๐๔ เท่า ขณะที่สารสกัดหยาบจากถั่วแปบด้วย methanol แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ HL–๖๐ ได้ดีกว่า Doxorubicin ซึ่งเป็น positive control ๑.๔๓ เท่า ในขณะที่สารสกัดของผักที่นำมาทดสอบทุกชนิดไม่เป็นพิษเฉียบพลันต่อเซลล์ทดสอบ และจากการติดตามการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งพบว่า สารสกัดทั้งสองแบบที่ความเข้มข้น ๒๐ mg/ml สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT–๒๙ เกิด morphological changes ได้ภายใน ๔ ชั่วโมง โดยพบว่า เซลล์มีการเกาะกันเป็นก้อนและ nuclei มีการหดตัวรวมเป็นก้อนอย่างชัดเจนภายในเวลา ๔๘ ชั่วโมง และพบเซลล์ในลักษณะ single large vesicle ได้ภายในเวลา ๗๒ ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบจากฝักถั่วแปบต้มน้ำที่ความเข้มข้น ๒๐ mg/ml เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT–๒๙ เกิด DNA fragmentation ได้ที่เวลา ๒๔ ชั่วโมง ขณะที่สารสกัดหยาบจากใบถั่วแปบต้มน้ำ ที่ความเข้มข้น ๒๐ mg/ml แสดงฤทธิ์ชักนำให้เซลล์มะเร็ง HL–๖๐ เข้าสู่กระบวนการ apoptosis โดยสามารถตรวจพบ DNA fragmentation ได้ภายในเวลา ๗ วัน สำหรับสารสกัดหยาบจากผักชนิดอื่นแสดงให้เห็นฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฤทธิ์ชักนำให้เซลล์เกิด apoptosis ได้แตกต่างกัน ซึ่งควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์เพื่อพัฒนาและใช้ประโยชน์จากผักพื้นบ้านสำหรับเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

Abstract

Survey and sampling of four indigenous vegetables; *Dregea volubilis* Stapf., *Gymnema inodorum* Dence., *Dolichos lablab* Linn. and *Oroxylum indicum* (L.) Vent. in the upper north of Thailand. Collected plant samples were used for genetic diversity assessment and biochemical activities tests. Morphological, botanical characters and ecological included nutritional value were also studied. The leaf samples were analyzed for DNA fingerprinting to determine their genetic diversity. Moreover, the vegetable extracts were used for testing the biochemical effects. The results revealed that four indigenous vegetables were cultivated plants which grow easily in every area. The ecology and habitat of the accessions in each species were similar. The morphological and botanical characters of *Dregea volubilis* accessions such as stems and leaves characters were similar. While the *Gymnema inodorum* accessions were similar in stem, flower but leaves were different in shape, blade and long. For the accessions of *Dolichos lablab*, there were similar in stems and leaves but flowers were white and purple. Fruits were different forms of shape and size. While *Oroxylum indicum* accessions were similar in stems, leaves and fruits but flowers were different in size and color. For the nutritional value of vegetables, three plants were analyzed. The results found that young flowers of *Dregea volubilis* were high in sodium, calcium, iron, phosphorus potassium and it also composted of vitamin A, E, B1 and beta carotene. While *Dolichos lablab*'s fruits (pods) were high in protein, calcium, phosphorus, potassium and composted of vitamin E and B1. For the fruits (pods) of *Oroxylum indicum* were high in sodium, calcium, iron, phosphorus potassium, vitamin A, E, and beta carotene. The total antioxidant was high in *Dregea volubilis* and *Oroxylum indicum* while *Dolichos lablab* was low. For DNA fingerprinting analysis, ISSR technique was used to identify four indigenous vegetables. The result revealed that 12 accessions of *Dregea volubilis* Stapf. were analyzed by 10 primers, 64.08 % were polymorphic bands. The similarity coefficient was ranged from 0.67-0.81 and the cophenetic correlation was 0.79808, which indicated that medium levels of genetic variation in the populations. For *Gymnema inodorum* Dence., 11 accessions were analyzed by twelve primers, 66.50% were polymorphic bands. The similarity coefficient was ranged from 0.64-0.78 and the cophenetic correlation was 0.82124 which indicated that medium level of the genetic diversity in the populations. While 13 accessions of *Dolichos lablab* Linn. were analyzed by 8 primers, 52.00 % were polymorphic bands. The similarity coefficient was ranged from 0.73-0.88 and the cophenetic correlation was 0.79811.

The level of genetic diversity in the populations was medium to relatively low. The last plant, 4 accessions of *Oroxylum indicum* were analyzed by eleven primers, 51.11 % were polymorphic bands. The similarity coefficient was ranged from 0.59-0.73 and the cophenetic correlation was 0.87478 which indicated that the level of genetic diversity in the populations was also medium. This analysis was concluded that four vegetable species collected from different areas showed genetic variation despite their similar appearance. However, *Dregea volubilis*, *Oroxylum indicum* and *Gymnema inodorum* were high level of genetic diversity than *Dolichos lablab*.

For the biochemical activities tests, the extracts of *Dolichos lablab* pods showed the highest anti-proliferation activities (IC50 = 0.53$\pm$0.23 mg/ml, 1.04 times stronger than Irinothecan] and IC50 = 0.44$\pm$0.08 mg/ml, 1.43 times stronger than Doxorubicin]) according to the hot water extracts treated to HT-29 and the methanolic extracts treated to HL-60, respectively. The others plant extracts were not showed acute cytotoxicity. The concentration at 20 mg/ml of the hot water and the methanolic extracts of *Dolichos lablab* pods induced morphological changes, single large vesicle (within 72 hours) and clumping (within 4 hours). DNA fragmentation was induced by the concentration at 20 mg/ml of hot water extract of *Dolichos lablab* pods, not the methanolic extract, within 24 hours in HT-29 and within 7 days in HL-60. The results from this study can be applied for the development and use of the indigenous vegetables for pharmaceutical or neutraceutical products.

สารบาญเรื่อง

	หน้า
คำนำ	๒
กิตติกรรมประกาศ	๓
บทคัดย่อ	๔
สารบาญตาราง	๙
สารบาญภาพ	๑๑
บทนำ	๑๕
วัตถุประสงค์	๑๘
ระเบียบวิธีการวิจัย	๑๘
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	๒๖
สรุปผล	๑๐๕
บรรณานุกรม	๑๐๗
ภาคผนวก	๑๐๙

สารบาญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

๑. รหัสต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านที่รวบรวมมาจากจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ๑๙
๒. ผักฮ้วนจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ๒๐
๓. ผักเชียงดาจำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ๒๑
๔. ถั่วแปบจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ๒๑
๕. เพกาจำนวน ๔ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ๒๒
๖. จำนวนต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านที่รวบรวมมาจากพื้นที่เชียงใหม่และลำพูน ๒๖
๗. ลักษณะทางปริมาณของฝักถั่วแปบที่รวบรวมจากพื้นที่เชียงใหม่และลำพูน ๔๔
๘. ลักษณะทางปริมาณของถั่วแปบจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์ ๔๔
๙. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผักฮ้วน ๔๕
๑๐. ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant) ของผักฮ้วน ๔๖
๑๑. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของถั่วแปบ ๔๖
๑๒. ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant) ของถั่วแปบ ๔๗
๑๓. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของเพกา ๔๗
๑๔. ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant) ของเพกา ๔๘
๑๕. ไพร์เมอร์จำนวน ๑๐ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักฮ้วน จำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ ๕๕
๑๖. ไพร์เมอร์จำนวน ๑๒ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักเชียงดา จำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์ ๕๕
๑๗. ไพร์เมอร์จำนวน ๘ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วแปบ จำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์ ๕๖
๑๘. ไพร์เมอร์จำนวน ๑๑ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเพกา จำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์ ๕๖
๑๙. เปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วนเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ชนิดต่างๆ ๖๑
๒๐. ค่า similarity matrix ของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์ ๖๓
๒๑. เปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของผักเชียงดาเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ชนิดต่างๆ ๖๙
๒๒. ค่า similarity matrix ของผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์ ๗๐

๒๓. เปอร์เซ็นต์โพลิมอฟีซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ชนิดต่างๆ ๗๕
๒๔. ค่า similarity matrix ของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์ ๗๖
๒๕. เปอร์เซ็นต์โพลิมอฟีซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของเพกาเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ชนิดต่างๆ ๘๒
๒๖. ค่า similarity matrix ของเพกา ๔ ต้นพันธุ์ ๘๓
๒๗. การแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HT–๒๙ ของสารทดสอบโดยอาศัย MTT assay ๘๕

สารบาญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

๑. ผักฮ้วนที่ปลูกไว้ในสวนเกษตรกรอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ๒๗
๒. ผักเชียงดาจากสวนเกษตรกร จ. ลำพูน ๒๘
๓. ผักเชียงดาที่ปลูกตามริมรั้วของชาวบ้านในพื้นที่ลำพูน ๒๘
๔. ถั่วแปบที่ปลูกในสวนของเกษตรกรในพื้นที่เชียงใหม่ ๒๙
๕. เพกาที่ปลูกในสวนของเกษตรกรในพื้นที่เชียงใหม่ ๒๙
๖. ลักษณะทั่วไปของผักฮ้วนหรือผักฮ้วนหมู ๓๐
๗. ลักษณะลำต้นผักฮ้วนที่เป็นเถาเลื้อย ๓๐
๘. ลักษณะยอดและใบอ่อนของผักฮ้วน ๓๑
๙. ลักษณะใบผักฮ้วน ๓๑
๑๐. ลักษณะดอกของผักฮ้วน ๓๒
๑๑. ลักษณะผลของผักฮ้วน ๓๒
๑๒. ลักษณะของเมล็ดผักฮ้วน ๓๓
๑๓. ลักษณะลำต้นของผักเชียงดา ๓๓
๑๔. ลักษณะยอดและใบเชียงดา ๓๔
๑๕. ลักษณะใบของผักเชียงดาที่พบจากการสำรวจ ก. ใบรีกว้าง ข. ใบรียาว ๓๔
๑๖. ลักษณะช่อดอกของผักเชียงดา ๓๕
๑๗. ลักษณะดอกของผักเชียงดา ๓๕
๑๘. ลักษณะต้นถั่วแปบ ๓๖
๑๙. ลักษณะใบถั่วแปบ ๓๖
๒๐. ลักษณะสีดอกของถั่วแปบที่พบจากการสำรวจ ก. ดอกม่วง ข. ดอกขาว ๓๗
๒๑. ลักษณะการติดฝักของถั่วแปบ ๓๗
๒๒. ลักษณะของฝักถั่วแปบที่พบจาการสำรวจ ๓๘
๒๓. เมล็ดถั่วแปบที่พบจากการสำรวจ ๓๙
๒๔. ลักษณะต้นของเพกา ๔๐
๒๕. ลักษณะใบของเพกา ๔๐
๒๖. ลักษณะดอกเพกาที่พบจาการสำรวจ ๔๑
๒๗. ลักษณะดอกเพกาที่พบจากการสำรวจ ก. โคนดอกยาว ข. โคนดอกสั้น ๔๑
๒๘. ลักษณะเกสรตัวผู้ (ก) และเกสรตัวเมีย(ข) ๔๒
๒๙. ลักษณะการเกิดฝักของเพกา ๔๒

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

๓๐. ฝักเพกาที่เก็บจากต้นพันธุ์ ๔๓

๓๑. ลักษณะเมล็ดเพกา ๔๓

๓๒. ท่อนพันธุ์ผักฮ้วนสำหรับการปักชำ ๔๙

๓๓. ผักฮ้วนต้นใหม่ที่ได้จากการปักชำกิ่ง ๔๙

๓๔. กิ่งชำผักเชียงดาที่กำลังพัฒนาเป็นต้นใหม่ ๔๙

๓๕. ฝักและเมล็ดถั่วแปบสำหรับปลูกและขยายพันธุ์ ๕๐

๓๖. เมล็ดเพกาสำหรับปลูกและขยายพันธุ์ ๕๑

๓๗. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ๕๓

๓๘. ดีเอ็นเอจากผักฮ้วนและผักเชียงดาเช็คคุณภาพโดยการทำอิเลกโทรโฟรีซิส ๕๓

๓๙. ดีเอ็นเอจากถั่วแปบและเพกาเช็คคุณภาพโดยการทำอิเลกโทรโฟรีซิส ๕๔

๔๐. การทำอิเลกโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอของผักพื้นบ้าน ๕๗

๔๑. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๐๗ ๕๘

๔๒. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๐๘ ๕๘

๔๓. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๑๑ ๕๘

๔๔. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๒๔ ๕๙

๔๕. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๒๕ ๕๙

๔๖. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๓๐ ๕๙

๔๗. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๕๗ ๖๐

๔๘. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๖๔ ๖๐

๔๙. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๖๖ ๖๐

๕๐. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๘๑ ๖๑

๕๑. Dendrogram ของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๐ ชนิด ๖๒

๕๒. Cophenetic Correlation ของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๐ ชนิด ๖๔

๕๓. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๑๐ ๖๕

๕๔. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๑๑ ๖๕

๕๕. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๑๘ ๖๕

๕๖. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๒๖ ๖๖

๕๗. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๒๗ ๖๖

๕๘. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๓๐ ๖๖

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

๕๙. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๔ ๖๗
๖๐. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๕ ๖๗
๖๑. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๕๗ ๖๗
๖๒. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๖๔ ๖๘
๖๓. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๖๖ ๖๘
๖๔. รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๘๑ ๖๘
๖๕. Dendrogram ของผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๒ ชนิด ๗๐
๖๖. Cophenetic Correlation ของผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๒ ชนิด ๗๑
๖๗. รูปแบบแถบดีเอ็นเอถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๐๘ ๗๒
๖๘. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๐๙ ๗๒
๖๙. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๐ ๗๓
๗๐. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๕ ๗๓
๗๑. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๖ ๗๓
๗๒. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๕ ๗๔
๗๓. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๘๐ ๗๔
๗๔. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๘๑ ๗๔
๗๕. Dendrogram ของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๘ ชนิด ๗๖
๗๖. Cophenetic Correlation ของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๘ ชนิด ๗๗
๗๗. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๐ ๗๘
๗๘. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๑ ๗๘
๗๙. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๒ ๗๙
๘๐. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๘ ๗๙
๘๑. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๕ ๗๙
๘๒. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๖ ๘๐
๘๓. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๔ ๘๐
๘๔. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๕ ๘๐
๘๕. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๔๑ ๘๑
๘๖. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๕๗ ๘๑
๘๗. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๖๔ ๘๑

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

๘๘. Dendrogram ของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๑ ชนิด ๘๓
๘๙. Cophenetic Correlation ของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๑ ชนิด ๘๔
๙๐. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ โดยสารสกัดผักฮ้วนหมูด้วยการต้มน้ำ ๘๖
๙๑. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๖๐ โดยสารสกัดผักฮ้วนหมูด้วย methanol ๘๗
๙๒. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๖๐ โดยสารสกัดฝักถั่วแปบด้วยการต้มน้ำ ๘๘
๙๓. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๖๐ โดยสารสกัดฝักถั่วแปบด้วย methanol ๘๙
๙๔. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๖๐ โดยสารสกัดใบถั่วแปบด้วยการต้มน้ำ ๙๐
๙๕. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๖๐ โดยสารสกัดใบถั่วแปบด้วย methanol ๙๑
๙๖. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๖๐ โดยสารสกัดฝักเพกาด้วยการต้มน้ำ ๙๒
๙๗. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๖๐ โดยสารสกัดฝักเพกาด้วย methanol ๙๓
๙๘. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ โดยสารสกัดผักฮ้วนหมูด้วยการต้มน้ำ ๙๔
๙๙. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ โดยสารสกัดผักฮ้วนหมูด้วย methanol ๙๕
๑๐๐. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ โดยสารสกัดฝักถั่วแปบด้วยการต้มน้ำ ๙๖
๑๐๑. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ โดยสารสกัดฝักถั่วแปบด้วย methanol ๙๗
๑๐๒.การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ โดยสารสกัดใบถั่วแปบด้วยการต้มน้ำ ๙๘
๑๐๓. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ โดยสารสกัดใบถั่วแปบด้วย methanol ๙๙
๑๐๔. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ โดยสารสกัดฝักเพกาด้วยการต้มน้ำ ๑๐๐
๑๐๕. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ โดยสารสกัดฝักเพกาด้วย methanol ๑๐๑
๑๐๖. ผลการชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิด DNA fragmentation ที่ ๒๔ ชั่วโมง ๑๐๒
๑๐๗. ผลการชักนำให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เกิด DNA fragmentation ที่ ๗ วัน ๑๐๓

บทนำ

ผักพื้นบ้านที่นำมาเป็นอาหารมีหลายชนิด ด้วยมีคุณค่าทางโภชนาการ อุดมด้วยวิตามิน แร่ธาตุที่สำคัญ รวมทั้งการนำส่วนต่างๆของพืชมาใช้ในการเป็นสมุนไพรรักษาโรคตามตำรายาพื้นบ้าน (สถาบันการแพทย์แผนไทย, ๒๕๔๒) ศักยภาพของผักพื้นบ้านไทยหลายชนิดในการต้านสารอนุมูลอิสระนั้นพบว่า ได้มีงานศึกษาวิจัยและนำข้อมูลมาเผยแพร่กันอย่างต่อเนื่อง เกศศิณี และคณะ (๒๕๔๔) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านไทยจำนวน ๑๔๙ ชนิดซึ่งรวบรวมมาจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ โดยนำมาสกัดด้วยเมธานอลและวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี β-carotene bleaching ทำให้สามารถจำแนกศักยภาพผักพื้นบ้านได้เป็น ๓ กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่ง เป็นผักที่มีศักยภาพสูง ได้แก่ ผักฮ้วน ถั่วแปบ เพกา เชียงดา สะแล ผักหนาม ผักหวานป่า เป็นต้น กลุ่มที่สองเป็นผักที่มีศักยภาพปานกลาง ได้แก่ ผักหวานบ้าน ผักปลัง ดอกขจร เป็นต้น กลุ่มที่สาม เป็นผักศักยภาพต่ำ ได้แก่ บวบ กะบุก เป็นต้น ซึ่งข้อมูลจากงานวิจัยผักพื้นบ้านเหล่านี้เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับงานวิจัยด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม งานด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชและการพัฒนางานด้านพืชสมุนไพรเพื่อใช้รักษาโรค รวมทั้งงานวิจัยด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

ผักฮ้วน (*Dregea volubilis* Stapf.) ผักพื้นบ้านทางภาคเหนือ ลำต้นมีลักษณะเป็นเถาเลื้อย ใช้ได้ทั้งยอดอ่อน ใบอ่อน และดอก มีรสขมเล็กน้อย ชาวบ้านทางเหนือนิยมใช้ประกอบอาหาร ได้แก่ แกงผักฮ้วนใส่ปลาแห้ง มีคุณค่าทั้งทางอาหารและมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรค โดยพบว่า ยอด ให้คุณค่าทางอาหารได้แก่ เส้นใย แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก เบต้า-แคโรทีน ไนอาซิน วิตามินเอ วิตามินบี ๑ วิตามินบี ๒ วิตามินซี ส่วนสรรพคุณทางสมุนไพร ช่วยบรรเทาความร้อนในร่างกาย ทำให้เจริญอาหาร ราก ใช้ดับพิษร้อน พิษไข้ พิษไข้กาฬ ขับปัสสาวะ เถา ขับปัสสาวะ ดับพิษร้อน ถอนพิษไข้ แก้ดีกำเริบ ใบ แก้ฝีภายใน แก้พิษต่างๆ ขับปัสสาวะ (ข้อมูล online, http://vegatableinthailand.com)

ผักเชียงดา (*Gymnema inodorum* Dence.) ลักษณะลำต้นเป็นไม้เถาเลื้อย ใบมีสีเขียวเข้ม เป็นผักพื้นบ้านทางภาคเหนือที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ชาวบ้านนิยมนำยอดอ่อนและใบอ่อนของผักเชียงดา มารับประทานในรูปผักสด มีรสขมอ่อนๆ ลวกกินกับน้ำพริก แกงใส่ปลาแห้ง และมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงมาก มีคุณค่าทางโภชนาการ มีวิตามินซี เบต้าแคโรทีน และวิตามินเอ นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุและสารโภชนาการอื่นๆ เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เส้นใยอาหาร โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยสรรพคุณยาทางภาคเหนือใช้ใบรักษาไข้และหวัด ขณะที่มีรายงานการวิจัยพบสาร gymnemic acid ในส่วนของใบ ทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึม

และลดระดับน้ำตาลในเลือดจึงนำมาเป็นยาใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน (ข้อมูล online, http://www.abhaiherb.com/)

ถั่วแปบ (*Dolichos lablab* Linn.) อยู่ในตระกูลเดียวกับ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วพู ลักษณะเป็นเถาเลื้อย มีขนอ่อนตามลำต้นและใบ ดอกมีสีขาว ชมพู หรือม่วงแตกต่างกันไป ฝักอ่อนสีเขียวหรือเขียวปนม่วง หรือม่วง เมล็ดมีหลายสี ชาวบ้านทางภาคเหนือนิยมนำไปปรุงอาหารได้หลาย เช่น แกงถั่วแปบ แกงแค ลวกจิ้มน้ำพริก เป็นต้น ถั่วแปบพบว่ามีสารอาหารทางโปรตีนสูง คาร์โบไฮเดรท (กลูโคส กาแลคโตส และกลูตามิเนส) ไขมันชนิดฟอสฟาไทด์ แร่ธาตุ ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส สังกะสี รวมไปถึงวิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี กรดแพนโรทีนิค ลำต้นของถั่วแปบยังพบว่ามีสารแคโรทีน หรือเบต้าแคโรทีน และสาร ลูติน (Lutein) นอกจากด้านอาหารแล้วยังมีประโยชน์ด้านยารักษาโรค โดยใช้เป็นสมุนไพรบำรุงร่างกาย แก้อ่อนเพลีย บำรุงธาตุ แก้ไข้ แก้อาการแพ้ และพบว่ามีสาร ไฟโตฮีแมคกลูตินิน (Phytohemagglutinine) ที่ช่วยในการเร่งการผลิตเม็ดเลือดขาวของร่างกาย รวมทั้งด้านการช่วยยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยน้ำถั่วแปบถูกนำมาใช้เป็นยาเสริมในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับเคมีบำบัด แพทย์แผนโบราณจีนมีความเห็นว่า ถั่วแปบมีฤทธิ์อุ่น รสหวาน ช่วยบำรุงม้ามและกระเพาะอาหาร แก้คอแห้ง ระงับอาเจียน ระงับอาการท้องร่วง ดับร้อน ถอนพิษ แก้อาการเมาค้าง ตลอดจนประจำเดือนมาผิดปกติ (ข้อมูล online, http://th.wikipedia.org/; http://www.sk-hospital.com)

เพกา (*Oroxylum indicum* (L.) Vent.) เป็นไม้ยืนต้น ฝักมีลักษณะแบน ยาว คล้ายลิ้นห้อยอยู่ที่ปลายกิ่ง ทางภาคเหนือเรียก มะลิดไม้ หรือลิดไม้ นิยมนำฝักอ่อนและดอก มาปรุงอาหารหลายชนิด ได้แก่ ยำ ลวกจิ้มน้ำพริก ผัด เป็นต้น ในฝักเพกามีวิตามินซีสูงมากถึง ๔๘๔ มิลลิกรัม/๑๐๐ กรัม วิตามินเอ ๘,๒๒๑ มิลลิกรัมใน ๑๐๐ กรัม ขณะที่สรรพคุณทางสมุนไพรใช้เปลือกเพกาแก้งูสวัด รากฝนทาแก้ฝี ใบใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของยาเขียว มีสรรพคุณฝาดขม ต้มน้ำดื่มแก้ปวดข้อ ปวดท้อง รากมีรสฝาดขมร้อน เป็นยาบำรุงธาตุ ขับเสมหะ ขับน้ำออกจากร่างกาย เป็นยาแก้ท้องร่วง ฝนกับน้ำปูนใสทาแก้อักเสบฟกบวม เปลือกต้น รสฝาดเย็น ขมเล็กน้อย สมานแผล แก้น้ำเหลืองเสีย เมล็ดต้มกินเป็นยาระบาย แก้ไอ ขับเสมหะ และมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พบว่า สารสกัดที่ได้จากเปลือกต้น มีฤทธิ์ช่วยลดการอักเสบ การแพ้ และยังมีฤทธิ์ที่ยับยั้งการบีบตัวของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้สารที่สกัดได้จากรากเพกามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการอักเสบ (ข้อมูล online, http://www.abhaiherb.com/)

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะต่างๆภาย นอกยังไม่เพียงพอ ปัจจุบันได้มีการนำงานวิจัยทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เพื่อยืนยันความถูกต้องได้แก่ การวิเคราะห์และตรวจสอบ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีแต่เทคนิคที่นิยมได้แก่ อาร์เอพีดี (RAPD ; Random Amplified Polymorphic DNA) อาร์เอฟแอลพี (RFLP ; Restriction Fragment Length Polymorphism) เอเอฟแอลพี (AFLP ; Amplified Fragment Length Polymorphism) เอสเอสอาร์ (SSR ; Simple Sequence Repeats) และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (Inter–Simple Sequence Repeats) รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) โดยแต่ละเทคนิคก็มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน สำหรับงานวิจัยในโครงการนี้จะใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์เป็นเทคนิคใหม่ที่มีขั้นตอนคล้ายอาร์เอพีดี สามารถใช้ได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายมากกว่าเทคนิคอาร์เอพีดีเล็กน้อยแต่มีความแม่นยำกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี เนื่องจากลำดับเบสของไพร์เมอร์ได้มาจากส่วนของไมโครแซทเทอร์ไลท์ (เทคนิคเอสเอสอาร์) ซึ่งทำให้เกิดโพลิมอร์พิซึมสูง จึงทำให้มีศักยภาพในการวิเคราะห์ที่ดีกว่าอาร์เอพีดี งานวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ พบว่าส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในงานศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิดได้แก่ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกพันธุ์ปลูกในประเทศจีน (Lijun และ Xuexlao, ๒๐๑๒) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสมุนไพร *Jatropha curcas* ในประเทศมาเลเซีย (Camelllia, *et al.*, ๒๐๑๒) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ endangered *Kirengeshoma palmata* Yatabe ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านของประเทศจีนและญี่ปุ่น (Zhang *et al.*, ๒๐๐๖) การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของ endangered quillwort ในประเทศจีน (Chen, *et al*, ๒๐๐๖) และมีการนำไปบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกของพืช *Olea europaea L.* (Terzpoulos *et al.,* ๒๐๐๕) นอกจากนี้ยังสามารถนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของผักกูด พ่อค้าตีเมีย และมะกอกป่า ซึ่งเป็นผักพื้นบ้านทางภาคเหนือของประเทศไทย (ประทุมพร และคณะ, ๒๕๕๔) อีกทั้งยังมีรายงานการใช้ ISSR วิเคราะห์พันธุกรรมของพืชอีกหลายชนิด

ในส่วนคุณสมบัติการเป็นพืชสมุนไพรนั้น พืชพื้นบ้านหลายชนิดมีสรรพคุณทางยาโดยมีการนำมาใช้รักษาโรคได้ และปัจจุบันมีรายงานการนำพืชพื้นบ้านมาทดสอบทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและพบว่า พืชพื้นบ้านหลายชนิดมีศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ โดยมีรายงานการวิจัยด้าน cytotoxic activity ของ essential oil ที่ได้จาก พืชสมุนไพร ๑๗ ชนิด เมื่อทำการทดสอบในเซลล์มะเร็ง ๒ แบบ คือ P๓๘๘ (mouse leukemia) และ KB (human mouth epidermal carcinoma) พบว่า essential oil แทบทุกตัวมีค่า $IC_{๕๐}$ ต่ำซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบได้ดี บางตัวมีความสามารถสูงกว่า positive control ของการทดลอง (๕–Fluorouracil (๕–FU), Vincristine และ Methotrexate (MTX)) เช่น Sweet basil oil มีความสามารถดังกล่าวดีที่สุด (ค่า

IC_{50} ต่ำที่สุดในกลุ่ม) ที่ ๐.๐๓๖๒ mg/ml (ต่ำกว่า ๕-FU ๑๒.๗ เท่า แต่ดีกว่า Vincristine ๓.๑๙ เท่า) เมื่อทำการทดสอบในเซลล์มะเร็ง P๓๘๘ และ Guava leaf oil มีความสามารถดังกล่าวดีที่สุดที่ ๐.๐๓๗๙ mg/ml (ดีกว่า Vincristine ๔.๓๗ เท่า) เมื่อทำการทดสอบในเซลล์มะเร็ง KB ข้อมูลเบื้องต้นนี้ แสดงศักยภาพของสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรในการนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง (Manosroi *et al.*, ๒๐๐๕) และยังมีรายงานว่า aqueous extract ของใบที่เพิ่งผลิจาก willow (*Salix safsaf*) ซึ่งเป็นพืชในสกุล Salix (Saliceae) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง *in vitro* และ *in vivo* โดยหนูที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งด้วยการได้รับ Ehrlich Ascites Carcinoma Cells (EACC) เข้าไปใน intraperitoneal cavity มีการลุกลามของเซลล์มะเร็งลดลงและอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดนี้ (Eishemy *et. al.*,๒๐๐๗) สำหรับในส่วนของผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา นอกจากคุณค่าทางสมุนไพรแล้วยังพบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระสูง (เกศศิณี และคณะ, ๒๕๔๔) ดังนั้นทั้งผักฮ้วน ถั่วแปบ และเพกา จึงถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของงานสมุนไพรไทย

วัตถุประสงค์

๑. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การกระจายพันธุ์ และการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา

๒. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี รวมทั้งคุณค่าทางอาหารและโภชนาการของผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกาแต่ละสายพันธุ์

๓. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งให้เกิด apoptosis เพื่อนำผลวิจัยที่ได้ไปพัฒนางานทางการแพทย์

ระเบียบวิธีการวิจัย

๑. <u>การเก็บตัวอย่างผักพื้นบ้านและเก็บข้อมูลเบื้องต้น</u>

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ในช่วงระหว่างเดือนมกราคม ๒๕๕๓ ถึง เดือนกันยายน ๒๕๕๔ โดยเก็บ

รวบรวมต้นพันธุ์ กิ่งพันธุ์ ส่วนของใบ ยอด และผล โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ ลักษณะ สี ขนาด รูปทรงของใบและผล โดยที่ต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านทั้งสี่ชนิดที่เก็บรวบรวมมาได้มีรหัสต้นพันธุ์คือ แหล่งเก็บ (สถานที่เก็บหรืออำเภอ) ลำดับต้นที่เก็บ/พื้นที่เก็บ (จังหวัด) ดังตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ รหัสต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านที่รวบรวมมาจากจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน

พื้นที่	สัญลักษณ์พื้นที่	สัญลักษณ์แหล่งที่เก็บ	รหัสต้นพันธุ์
จ. เชียงใหม่			
อ. เมือง		M	M no. /CM
อ. สารภี	CM	SP	SP no. /CM
อ. สันป่าตอง		SPT	SPT no. /CM
อ. ดอยหล่อ		DL	DL no. /CM
อ. สันทราย		SS	SS no. /CM
อ. แม่ริม		MR	MR no. /CM
อ. ฝาง		F	F no. /CM
จ. ลำพูน			
อ. เวียงหนองร่อง		BT	NR no. /L
อ. แม่ทา	L	MT	MT no. /L

๒. <u>การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการ</u>

วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี คุณค่าทางอาหารและโภชนาการของผักพื้นบ้านทั้งสามชนิด เช่น ปริมาณวิตามินต่างๆได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินบี วิตามินอี ธาตุอาหารต่างๆ และปริมาณแอนติออกซิแดนซ์ทั้งหมด โดยผักฮ้วนวิเคราะห์จากส่วนของใบและดอก ถั่วแปบใช้ส่วนของผล เพกาใช้ส่วนของผล ยกเว้นผักเชียงดาในระยะที่ ๑ อยู่ระหว่างการขยายพันธุ์และปลูกต้นพันธุ์ในแปลงทดลอง ซึ่งจะทำเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในระยะที่ ๒ โดยตัวอย่างผักทั้งสามชนิดได้ส่งไปตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA) จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีใช้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ การวิเคราะห์ปริมาณแอนติออกซิแดนซ์ทั้งหมดใช้วิธี DPPH method

๓. <u>การขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมต้นพันธุ์</u>

ทำการขยายพันธุ์ผักฮ้วนและผักเชียงดาโดยการปักชำกิ่ง ส่วนถั่วแปบและเพกาขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด แล้วนำต้นพันธุ์ที่ได้มาปลูกรวบรวมไว้ในเรือนเพาะชำและแปลงทดลองเพื่อขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมาก โดยใบอ่อนจากต้นพันธุ์ในเรือนเพาะชำนำใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ ขณะที่ส่วนยอด ใบและผลนำไปใช้ในการสกัดสารสมุนไพร

๔. <u>การศึกษาพันธุกรรมพืชในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล</u>

<u>การศึกษาทางด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ</u>

๑.๑ ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับผักทั้งสี่ชนิด

ขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอสามารถทำได้หลายวิธีการ สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ชุดสกัดจากไคเจนที่มีชื่อการค้าว่า DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบของผักฮ้วน ผักเชียงดา เพกา ขณะที่ถั่วแปบสกัดดีเอ็นเอจากทั้งส่วนใบและเปลือกผล ดังตารางที่ ๒,๓,๔ และ ตารางที่๕

ตารางที่ ๒ ผักฮ้วนจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผักฮ้วน (No.)	รหัสต้นพันธุ์	แหล่งที่เก็บ (Location)	พื้นที่เก็บ (Area)
๑.	DL๐๑/CM	สวนเกษตรกร อ. ดอยหล่อ	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๒.	SPT๐๑/CM	สวนเกษตรกร อ. สันป่าตอง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๓.	SP๐๑/CM	สวนเกษตรกร ต. ท่ากว้าง อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๔.	SP๐๒/CM	สวนเกษตรกร ต. ท่ากว้าง อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๕.	SP๐๓/CM	สวนเกษตรกร ต. สารภี อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๖.	SP๐๕/CM	สวนเกษตรกร ต. สารภี อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๗.	SP๐๖/CM	สวนเกษตรกร ต. สารภี อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๘.	SP๐๗/CM	สวนเกษตรกร ต. สารภี อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๙.	SP๐๘/CM	สวนเกษตรกร ต. สารภี อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๑๐.	SP๑๐/CM	สวนเกษตรกร ต. สารภี อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๑๑.	SP๑๕/CM	สวนเกษตรกร ต. สารภี อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๑๒.	SS๐๑/CM	สวนเกษตรกร อ. สันทราย	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)

ตารางที่ ๓ ผักเชียงดาจำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เชียงดา (No.)	รหัสต้นพันธุ์	แหล่งที่เก็บ (Location)	พื้นที่เก็บ (Area)
๑.	SP๐๑/CM	สวนเกษตรกร อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๒.	SP๐๒/CM	สวนเกษตรกร อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๓.	SP๐๔/CM	สวนเกษตรกร อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๔.	SP๐๗/CM	สวนเกษตรกร อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๕.	SP๐๙/CM	สวนเกษตรกร อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๖.	SP๑๐/CM	สวนเกษตรกร อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๗.	SP๑๑/CM	สวนเกษตรกร อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๘.	SS๐๑/CM	สวนเกษตรกร อ. สันทราย	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๙.	NR๐๑/L	สวนเกษตรกร อ. เวียงหนองล่อง	ลำพูน (LAMPHUN)
๑๐.	NR๐๒/L	สวนเกษตรกร อ. เวียงหนองล่อง	ลำพูน (LAMPHUN)
๑๑.	NR๐๓/L	สวนเกษตรกร อ. เวียงหนองล่อง	ลำพูน (LAMPHUN)

ตารางที่ ๔ ถั่วแปบจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ถั่วแปบ (No.)	รหัสต้นพันธุ์	แหล่งที่เก็บ (Location)	พื้นที่เก็บ (Area)
๑.	SP๐๑/CM	สวนผักเกษตรกร ต. สารภี อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๒.	SP๐๒/CM	สวนผักเกษตรกร ต. สารภี อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๓.	SP๐๓/CM	สวนผักเกษตรกร ต. ท่ากว้าง อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๔.	SP๐๔/CM	สวนผักเกษตรกร ต. ท่ากว้าง อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๕.	SP๐๕/CM	สวนผักเกษตรกร ต. ท่ากว้าง อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๖.	SP๐๖/CM	สวนผักเกษตรกร ต. ท่ากว้าง อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๗.	SP๐๗/CM	สวนผักเกษตรกร ต. ท่ากว้าง อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๘.	SPT๐๑/CM	สวนผักเกษตรกรบ้านสัน อ. สันป่าตอง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๙.	SPT๐๒/CM	สวนผักเกษตรกรบ้านสัน อ. สันป่าตอง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๑๐.	SPT๐๓/CM	สวนผักเกษตรกรบ้านสัน อ. สันป่าตอง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๑๑.	F๐๑/CM	สวนผักเกษตรกร อ. ฝาง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๑๒.	MR๐๑/CM	สวนผักเกษตรกร อ. แม่ริม	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๑๓.	MT๐๒/L	สวนผักเกษตรกรบ้านเหมืองจี้ อ. แม่ทา	ลำพูน (LAMPHUN)

ตารางที่ ๕ เพกาจำนวน ๔ ต้นพันธุ์ที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เพกา (No.)	รหัสต้นพันธุ์	แหล่งที่เก็บ (Location)	พื้นที่เก็บ (Area)
๑.	SP๐๓/CM	สวนเกษตรกร อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๒.	SP๐๔/CM	สวนเกษตรกร อ. สารภี	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๓.	SPT๐๑/CM	สวนเกษตรกร อ. สันป่าตอง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)
๔.	M๐๑/CM	สวนเกษตรกร อ. เมือง	เชียงใหม่ (CHIANG MAI)

๓.๒ การเช็คคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

การเช็คคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอทำโดยใช้วิธีการอิเลกโทรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น ๐.๘% ใน ๐.๕XTBE โดยมีดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นเป็นตัวเทียบและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แล้วนำดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณที่ดีมาเจือจางความเข้มข้นให้เหมาะสมเพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

๓.๓ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอของผักแต่ละชนิดจากแหล่งต่างๆที่สกัดได้ มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR) โดยเลือก Thermal Cycle ที่เหมาะสมแล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยหลักการ PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ PCR Master mix solution (*i*–Taq) สำเร็จรูป และคัดเลือก Primer ที่เหมาะสมจาก UBC Primer (The University of British Columbia) จำนวน ๕๐ ชนิด เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยบันทึก จำนวนแถบ การเกิดแถบ การมี หรือไม่มีแถบ จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีการแทนค่า ไม่มีแถบ เท่ากับ ๐ และมีแถบ เท่ากับ ๑ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS pc ver. ๒.๒

๕. <u>การทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน</u>

๕.๑ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยอาศัย MTT assay

๕.๒ การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis

–การติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ทดสอบ (morphological changes)

–การติดตามการเกิด DNA fragmentation

การทำสารสกัดหยาบ

สกัดสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของผักฮ้วน ถั่วแปบ และเพกาด้วยกรรมวิธีที่เหมาะสมได้แก่ การต้มด้วยน้ำร้อน และการสกัดด้วยตัวทำละลายอนินทรีย์ (เมทานอลเข้มข้น ๙๙.๙๙%) โดยนำส่วนของพืชใบหรือยอดอ่อน นำมาล้างทำความสะอาดและอบแห้งที่อุณหภูมิ ๕๐ °C จนกว่าจะแห้งกรอบและน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง (ประมาณ ๗ วัน) จากนั้นนำมาปั่นให้เป็นผงละเอียด

การต้มด้วยน้ำร้อน ทำได้โดยนำผงละเอียดน้ำหนักประมาณ ๑๐๐–๒๐๐ กรัม ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา ๓๐ นาที แล้วนำส่วนของน้ำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหย (evaporation) และสารสกัดหยาบ (crude extract)ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –๒๐°c ตลอดการทดลอง

การสกัดด้วย methanol ทำโดยนำผงละเอียดน้ำหนักประมาณ ๑๐๐–๒๐๐ กรัม มาบ่ม(incubate) กับสารละลายเมทานอลเข้มข้น ๙๙.๙๙% (๑๐๐% methanol) ปริมาตร ๑๐๐ มล. (ml) เป็นระยะเวลา ๒–๓ วัน แล้วนำส่วนของสารละลายเมธานอล มาทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหย แล้วนำสายละลายเมธานอลที่ได้จากการกลั่นระเหยนำกลับไปบ่มกับผงหรือตะกอนของสารสกัดอีกครั้ง จากนั้นนำกลับมากลั่นอีกครั้งหนึ่ง สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –๒๐ °C ตลอดการทดลอง

๕.๑ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยอาศัย MTT assay

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ๒ ชนิดที่ได้มาจาก American Type Culture Collection (ATCC), USA. คือ HTB–๓๘; Cololectal adenocarcinoma (HT–๒๙) และ คือ CCL–๒๔๐; human promyelocytic leukemia cell (HL–๖๐) โดยอาศัย MTT assay เซลล์ดังกล่าวถูกนำมาเพาะเลี้ยงและนำไปใช้ทดสอบโดยอาศัยวิธีมาตรฐาน ATCC, USA.) โดย HT–๒๙ ถูกเพาะเลี้ยงใน McCoy'๕A (Invitrogen, USA.) supplemented with ๑.๐ mM Glutamax®, ๑.๐ mM Sodium pyruvate, ๑๐% FCS และ ๑x Penicellin/Streptomycin ขณะที่ HL–๖๐ ถูกเพาะเลี้ยงใน Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM, Invitrogen, USA.) ที่เติมด้วย ๑.๐ mM Glutamax®, ๑.๐ mM Sodium pyruvate, ๑๐% FCS และ ๑x Penicellin/Streptomycin

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เริ่มด้วยการนำเซลล์ในระยะ Log phase ออกจาก flask ที่เพาะเลี้ยงด้วยการทำ Trypsinization ด้วย ๐.๒๕% Trypsin จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ด้วยการย้อมสี ๐.๕% Trypan blue) แล้วใส่เซลล์ที่ได้ที่ ๕,๐๐๐ cells/well ของ ๙๖ wells cell culture cluster (Corning, USA.) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมหลุมละ

๑๐๐ µl จากนั้นเพาะเลี้ยงที่ ๓๗ °C, ๕% CO_2 incubator ประมาณ ๑-๒ วันหรือจนกว่าได้เซลล์ที่มีการเจริญเติบโตประมาณ ๘๐% confluence จากนั้นนำสารสกัดต่างๆจากผักพื้นบ้านซึ่งเตรียมเป็น working solution ที่ ๒๐, ๒.๐, ๐.๒ และ ๐.๐๒ mg/ml (ทำ serial dilution ด้วย incomplete DMEM) มาเติมลงในแต่ละหลุม (แทนที่อาหารเลี้ยงเชื้อเดิมซึ่งดูดออกทิ้งไปก่อนหน้านี้ และใส่ลงไปที่ ๑๐% v/v ของปริมาตรสุดท้ายใหม่ เช่น หลุมที่ใส่สารสกัดจากผักที่เตรียมเป็น ๒๐ mg/ml จะกลายเป็นความเข้มข้นสุดท้าย ๒ mg/ml เป็นต้น) ดังนั้นใน ๑ ชุดการทดลองสารสกัดแต่ละชนิดจะถูกทดสอบ ๔ ความเข้มข้นๆละ ๓ หลุม และมี negative control ของชุดคือหลุมที่เซลล์ไม่ถูกทดสอบด้วยสารใดๆ อย่างน้อย ๑ แถว (๑๒ หลุม) positive control ของการทดสอบเมื่อใช้ HT-๒๙ คือ Irinothecan และเมื่อใช้ HL-๖๐ คือ Doxorubicin จากนั้นบ่มเพาะที่ ๓๗ °C, ๕% CO_2 incubator นาน ๑ วัน

ในขั้นตอนของการย้อมสีและการวัด เติมสารละลายของ ๕ mg/ml MTT/TE buffer ปริมาตร ๕๐ µl ลงในแต่ละหลุม บ่มเพาะที่ ๓๗ °C, ๕% CO_2 incubator ประมาณ ๓-๔ ชั่วโมง นำมาดูดเอาส่วนของสารละลายในแต่ละหลุมออกทิ้ง จากนั้นละลายตะกอน formazan ซึ่งอยู่ที่ก้นหลุมด้วย DMSO เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา ๑๐ นาทีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ๕๔๐ nm นำค่าที่บันทึกได้มาคำนวณค่า % cytotoxicity จาก

$$\%\text{cytotoxicity} = [๑-(\text{O.D.}_{๕๔๐}\ \text{treat}/\text{O.D.}_{๕๔๐}\ \text{control})] \times ๑๐๐$$

เมื่อ

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

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

แล้วนำค่า % cytotoxicity ที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์กับแต่ละความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ลากตัดแกน X ของกราฟที่แสดงค่า cytotoxicity ที่ ๕๐% ว่าอยู่ที่ความเข้มข้นเท่าได้ ค่าความเข้มข้นที่ได้คือค่า IC๕๐ (mg/ml) ซึ่งแสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ทดสอบตายลงครึ่งหนึ่ง ใช้เป็นค่าเปรียบเทียบความแรงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในระหว่างสารทดสอบด้วยกัน

๕.๒ <u>การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis</u>

-การติดตามการเกิด morphological changes ของเซลล์มะเร็งทดสอบ

โดยนำเซลล์มะเร็งมาเพาะเลี้ยงใน ๒๔ wells cell culture cluster (Costar, USA.) ที่ ๑๐,๐๐๐ cells/well ตามเงื่อนไขและวิธีการเหมือนที่อ้างอิงข้างต้น เซลล์พร้อมใช้ในการทดสอบเมื่อเจริญเติบโตถึง ๘๐% confluence โดยถูกทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสม (เช่น ที่ความเข้มข้นสุดท้าย ๒.๐ mg/ml เป็นเวลา ๔ และ ๒๔ ชั่วโมง เป็น

ต้น) และติดตามการเกิด Morphological changes แบบ apoptotic body และ single large vesicle ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่เข้าสู่กระบวนการ apoptosis ขณะเดียวกันการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์แบบอื่นๆ เช่น การหดตัวลง รูปร่างที่บิดเบี้ยว การเกิด nuclear condensation และการเห็นเศษเซลล์ที่แตกกระจายอยู่ทั่วไป จะถูกบันทึกด้วยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

–การติดตามการเกิด DNA fragmentation ของเซลล์มะเร็งทดสอบ

ทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งใน ๒๔ wells cell culture cluster (Costar, USA.) ที่ ๑๐,๐๐๐ cells/well ตามเงื่อนไขและวิธีการเหมือนที่อ้างอิงข้างต้น เซลล์พร้อมใช้ในการทดสอบเมื่อเจริญเติบโตถึง ๘๐% confluence โดยถูกทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสม (เช่น ที่ความเข้มข้นสุดท้าย ๒.๐ mg/ml เป็นเวลา ๔ และ ๒๔ ชั่วโมง เป็นต้น) และติดตามการเกิด DNA fragmentation ซึ่งเป็นข้อมูลยืนยันความสามารถของสารสกัดนั้นๆที่มีต่อการชักนำให้เซลล์ทดสอบเกิด apoptosis ด้วยการแตกเซลล์ทดสอบด้วย lysis buffer จากนั้น treat ด้วย ๑.๐ mg/ml proteinaseK บ่มเพาะที่ ๕๐°C นาน ๓–๔ ชั่วโมง จากนั้นทำ heat inactivation ที่ ๘๐°C นาน ๑๐ นาที แล้วเติมด้วย ๑.๐ mg/ml RNaseA บ่มที่อุณหภูมิ ๓๗°C นาน ๑–๒ ชั่วโมง ทำ salting out แล้วปั่นตกตะกอนที่ ๑๔,๐๐๐ rpm นาน ๑๐ นาที (ที่อุณหภูมิต่ำ) ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนจะละลายตะกอน DNA กลับด้วย TE buffer pH ๘.๔ จากนั้นทำ electrophoresis โดยใช้ ๑.๕% agarose (Vivantis, USA.) ด้วย ๑x TAE buffer แล้วถ่ายรูปเพื่อบันทึกผลการทดลอง

<u>สถานที่ดำเนินการ/เก็บข้อมูล</u>

พื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ห้องปฏิบัติการสาขาพืชสวน และห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

๑. การสำรวจและเก็บข้อมูลเบื้องต้น

ทำการสำรวจผักพื้นบ้านได้แก่ ผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน ในช่วงเดือนมกราคม ๒๕๕๕ ถึงเดือนสิงหาคม ๒๕๕๕ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ผักทั้งสี่ชนิดกำลังมีการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ ดอกและผล ซึ่งช่วงเวลาการออกสำรวจและเก็บข้อมูลของผักพื้นบ้านแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของผักแต่ละชนิดด้วย โดยถั่วแปบเป็นพืชชนิดแรกที่ได้ดำเนินการสำรวจในช่วงเดือนมกราคม ๒๕๕๕ เนื่องจากถั่วแปบออกดอกติดผลช่วงธันวาคม–กุมภาพันธ์ สำหรับผักฮ้วนเริ่มออกดอกติดผลช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน ๒๕๕๕ ขณะที่ผักเชียงดาสามารถเก็บใบได้ตลอดปี แต่ในช่วงฤดูฝนประมาณเดือนพฤษภาคม–กรกฎาคม ผักเชียงดามีการแตกใบอ่อนและมีใบใหม่เกิดขึ้นจำนวนมากทำให้สามารถเก็บมาทำวิจัยต่างๆได้ดี ยกเว้นเพกาที่ออกดอกติดผลช่วงเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม ทำให้เพกาเป็นพืชที่วางแผนการทำงานวิจัยได้ค่อนข้างยากเพราะอยู่ช่วงปลายปีงบประมาณเก่าและต้นปีของงบประมาณวิจัยใหม่ มีผลให้การเก็บตัวอย่างต้นพันธุ์และการทดลองทำได้ไม่สะดวก จึงได้จำนวนตัวอย่างค่อนข้างน้อย สำหรับการเก็บตัวอย่างผักในระยะที่ ๑ ทำการเก็บตัวอย่างในพื้นที่เชียงใหม่และลำพูนเพื่อนำมาศึกษาวิจัยก่อนเนื่องจากงานวิจัยนี้ทำกับผักหลายชนิด ซึ่งช่วงการให้ผลผลิตของผักแต่ละชนิดแตกต่างกัน หากจำนวนตัวอย่างมากเกินไปการทดลองในหลายส่วนจะไม่แล้วเสร็จในระยะเวลาที่กำหนด พื้นที่จังหวัดอื่นจึงทำการเก็บตัวอย่างในระยะที่ ๒

ตารางที่ ๖ จำนวนต้นพันธุ์ผักพื้นบ้านที่รวบรวมมาจากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน

ชนิดของผัก	จำนวนต้นพันธุ์
ผักฮ้วน/ผักอ้วนหมู	๓๒
ผักเชียงดา	๓๕
ถั่วแปบ	๓๐
เพกา	๑๙

โดยจังหวัดเชียงใหม่ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ อำเภอสารภี (SP) อำเภอเมือง (M) อำเภอสันทราย (SS) อำเภอแม่ริม (MR) อำเภอสันป่าตอง (SPT) และ อำเภอฝาง (F) สำหรับจังหวัดลำพูนมี ๒ พื้นที่ ได้แก่ อำเภอแม่ทา (MT) และอำเภอเมือง (M)

๑.๑ สภาพพื้นที่และนิเวศวิทยา

โดยจากการสำรวจพบผักพื้นบ้านทั้ง ๔ ชนิดเจริญเติบโตอยู่ในสภาพพื้นที่ไม่แตกต่างกันมากนักเนื่องจากผักทั้ง ๔ ชนิดเป็นผักพื้นบ้านที่เดิมเป็นพืชที่พบตามป่า แต่ได้ถูกนำออกมาปลูกโดยชาวบ้านทำให้ปัจจุบันไม่ต้องเก็บจากป่าแล้ว ดังนั้นนิเวศวิทยาและแหล่งอาศัยของผักทั้ง ๔ ชนิดนี้จึงกลายเป็นพื้นที่สวนครัวตามบ้านเรือนชาวบ้าน ชาวบ้านหรือเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมปลูกผักเหล่านี้ไว้ในบริเวณบ้านหรือบริเวณสวนผลไม้ใกล้ๆบ้าน ซึ่งสภาพพื้นที่และนิเวศวิทยาของผักพื้นบ้านแต่ละชนิดสามารถอธิบายได้ดังนี้

๑. ผักฮ้วน

ผักฮ้วนเป็นไม้เถาเลื้อย อายุหลายปี เกษตรกรหรือชาวบ้านนิยมปลูกไว้บริเวณสวนหลังบ้าน หรือตามริมรั้ว เพื่อที่จะให้ลำต้นที่เป็นเถาเลื้อยได้ใช้รั้วหรือต้นไม้ยืนต้นอื่นเป็นที่ค้ำยันให้เถาผักฮ้วนได้เจริญเติบโตและให้ผลผลิต เกษตรกรส่วนใหญ่มักปลูกไว้สวนหลังบ้านหรือข้างสระน้ำ ซึ่งดูแลได้ง่าย ผักฮ้วนเป็นผักพื้นบ้านที่ไม่ต้องมีการใช้ยากำจัดศัตรูพืช ง่ายต่อการดูแลและมีราคาแพงเพราะในช่วงการออกดอกราคากิโลกรัมละประมาณ ๒๐๐ บาท (ภาพที่ ๑)

ภาพที่ ๑ ผักฮ้วนที่ปลูกไว้ในสวนเกษตรกรอำเภอสันทรายจังหวัดเชียงใหม่

๒. ผักเชียงดา

ผักเชียงดาเป็นพืชยืนต้น อายุหลายปีและเป็นไม้เถาเช่นเดียวกับผักฮ้วน สภาพพื้นที่ปลูกจะเป็นสวนหลังบ้าน สวนครัวหรือปลูกริมรั้ว แต่เดิมชาวบ้านมักปลูกไว้เพื่อปรุงอาหาร แต่ปัจจุบันได้มีการนำใบและยอดมาแปรรูปเป็นสมุนไพร ทำให้ผักเชียงดาได้รับความนิยมมากขึ้น เกษตรกรจึงเปลี่ยนมาปลูกผักเชียงดามากขึ้นโดยเน้นปลูกผักเชียงดาเพื่อจำหน่าย จึงนิยมปลูกในแปลงและมีไม้ทำเป็นค้างให้ผักเชียงดาเลื้อยเพื่อสะดวกในการเก็บเกี่ยวผลผลิต สำหรับการ

ดูแลรักษานั้นไม่ยุ่งยาก เพราะเป็นผักพื้นบ้านที่เจริญเติบโตได้ง่าย ไม่ต้องใช้ยากำจัดศัตรูพืช สำหรับราคาจำหน่ายกิโลกรัมละ ๘๐-๑๐๐ บาท ผักเชียงดาจึงสร้างรายได้จำนวนมากให้แก่เกษตรกร (ภาพที่ ๒ และ ๓)

ภาพที่ ๒ ผักเชียงดาจากสวนเกษตรกร จ. ลำพูน

ภาพที่ ๓ ผักเชียงดาที่ปลูกตามริมรั้วของชาวบ้านในพื้นที่ลำพูน

๓. ถั่วแปบ

สภาพพื้นที่ในการปลูกถั่วแปบ เนื่องจากปัจจุบันถั่วแปบเป็นพืชปลูกไม่ใช่พืชป่าที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ แม้ว่าถั่วแปบเป็นพืชที่ให้ผลผลิตตามฤดูกาลแต่สภาพพื้นที่ที่ถั่วแปบมีการเจริญเติบโตพบว่า ถั่วแปบสามารถปลูกได้ตามสภาพพื้นที่ทั่วไปเพราะเป็นพืชที่ใช้น้ำน้อย และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในทุกสภาพแวดล้อม ไม่ต้องการการดูแลเอาใจใส่ ชาวบ้านหรือเกษตรกรนิยมปลูกทิ้งไว้ตามริมรั้วหรือตามสวน หรือพื้นที่รกร้าง โดยลำต้นถั่วแปบจะเลื้อยไปตามพื้นดินหรือพันกับต้นไม้อื่นๆ ฝักถั่วแปบราคากิโลกรัมละ ๔๐-๖๐ บาทจึงมีเกษตรกรหลายรายที่ปลูกไว้จำหน่าย (ภาพที่ ๔)

ภาพที่ ๔ ถั่วแปบที่ปลูกในสวนของเกษตรกรในพื้นที่เชียงใหม่

๔. เพกา

เพกาเป็นพืชยืนต้นขนาดกลาง อายุหลายปี ออกดอกผลตามฤดูกาล สภาพพื้นที่ในการปลูกเพกาพบว่า ชาวบ้านนิยมปลูกไว้ตามริมรั้วบ้าน ริมถนน หรือหลังบ้าน และตามสวนผลไม้ เพกาบางต้นเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ โดยเกิดจากเมล็ดที่ร่วงหล่นจากฝักแก่ของต้นเก่าที่อยู่ในสวน เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็พัฒนาเป็นเพกาต้นเล็กและเจริญเติบโตขึ้นมาเป็นเพกาต้นใหญ่แล้วพร้อมที่จะให้ผลผลิตต่อไป เพกาจึงเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ง่ายไม่ต้องคอยดูแลเอาใจใส่เหมือนพืชอื่น ชาวบ้านนิยมนำส่วนดอกและฝักอ่อนมาปรุงอาหาร ฝักเพการาคาค่อนข้างสูงโดยเฉลี่ยราคาต่อฝักประมาณ ๑๕-๓๐ บาทขึ้นอยู่กับขนาดของฝัก ในส่วนของการวิจัยความสูงของต้นเพกาและจำนวนฝักต่อต้น เป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการเก็บข้อมูลและการทดลอง เพราะเพกาบางต้นมีฝักเพียง ๑-๒ ฝัก บางต้นไม่ติดฝักเลย บางต้นสูงจนไม่สามารถเก็บทั้งใบ ดอกและฝักได้ การเก็บข้อมูลต่างๆจึงทำได้ค่อนข้างยาก (ภาพที่ ๕)

ภาพที่ ๕ เพกาที่ปลูกในสวนลำไยของเกษตรกรในพื้นที่เชียงใหม่

๑.๒ <u>ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสัณฐานวิทยาของผักพื้นบ้าน</u>

การเก็บข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสัณฐานวิทยาของผักพื้นบ้านทั้งสี่ชนิด ได้แก่ ผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบและเพกา เป็นการเก็บข้อมูลลักษณะใบ ลักษณะผล รูปทรงผล รูปทรงใบ การเจริญเติบโตทั่วไป เป็นต้น ซึ่งแยกอธิบายตามผักพื้นบ้านแต่ละชนิดดังนี้

๑. **ผักฮ้วน**

ลักษณะทั่วไป

ผักฮ้วนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dregea volubilis* Stapf. อยู่ในวงศ์ Asclepiadaceae เป็นผักพื้นบ้านทางภาคเหนือ ลำต้นมีลักษณะเป็นเถาเลื้อย เถามียางสีขาว จัดเป็นไม้ยืนต้นอายุหลายปี มีผลผลิตตลอดปีแต่นิยมเก็บเกี่ยวผลผลิตตามฤดูกาลในช่วงที่มีดอกอ่อน โดยนิยมนำยอดอ่อนและดอกอ่อนมาปรุงอาหาร อาหารที่ปรุงมักมีรสขมเล็กน้อยซึ่งอาหารที่ชาวบ้านทางภาคเหนือนิยมใช้ผักฮ้วนประกอบอาหาร ได้แก่ แกงผักฮ้วนใส่ปลาแห้ง (ภาพที่ ๖ และ ๗)

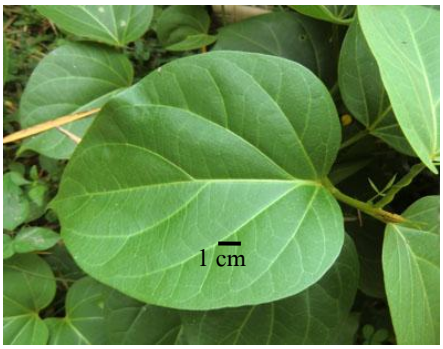
ภาพที่ ๖ ลักษณะทั่วไปของผักฮ้วนหรือผักฮ้วนหมู

ภาพที่ ๗ ลักษณะลำต้นผักฮ้วนที่เป็นเถาเลื้อย

ลักษณะใบ

ใบเป็นใบเดี่ยว รูปร่างกลม ปลายใบแหลม ใบอ่อนมีสีเขียวอ่อนหรือเขียวขี้ม้า ใบแก่มีสีเขียวหรือสีเขียวเข้ม ใบมีขนาดใหญ่ ขอบใบเรียบ ฐานใบเว้าเข้าหากัน เส้นใบเห็นชัดเจน ใบเป็นมัน คล้ายรูปหัวใจหรือใบโพธิ์ นิยมนำยอดหรือใบอ่อนและดอกอ่อนมาปรุงอาหารรับประทาน ใบอ่อนมีขน (ภาพที่ ๘ และ ๙)

ภาพที่ ๘ ลักษณะยอดและใบอ่อนของผักฮ้วน



ภาพที่ ๙ ลักษณะใบผักฮ้วน

ลักษณะดอก

การออกดอกของผักฮ้วนพบว่า ออกดอกเป็นช่อตามปลายกิ่ง ตามข้อและซอกใบ ดอกมีสีเขียวอมเหลือง สีเขียวอ่อน หรือ ขาวอมเหลือง กลีบดอก ๕ กลีบ แต่ละช่อมีดอกย่อยมากกว่า ๒๐ ดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ขนาดเล็กประมาณ ๐.๕–๑.๐ เซนติเมตร เวลาบานกลีบดอกจะกางออก (ภาพที่ ๑๐)

ภาพที่ ๑๐ ลักษณะดอกของผักฮ้วน

ลักษณะผล

ผลมีลักษณะเป็นฝักคู่รูปหอก ด้านบนฝักป้าน ด้านล่างเรียวเล็ก ปลายตัด มีสีเขียวอ่อน เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ขนาดความยาวประมาณ ๑๐ เซนติเมตร หนึ่งฝักจะประกอบไปด้วยเมล็ดจำนวนมาก (ภาพที่ ๑๑)

ภาพที่ ๑๑ ลักษณะผลของผักฮ้วน

ลักษณะเมล็ด

เมล็ดผักฮ้วนเป็นเมล็ดขนาดเล็ก ลักษณะแบนและบาง มีน้ำหนักเบามาก ปลิวได้ง่าย เมล็ดผักฮ้วนด้านบนจะมีเส้นใยสีขาวติดอยู่และจะเป็นตัวพาเมล็ดลอยได้มีลมพัด (ภาพที่ ๑๒)

ภาพที่ ๑๒ ลักษณะของเมล็ดผักฮ้วน

๒. **ผักเชียงดา**

ลักษณะทั่วไป

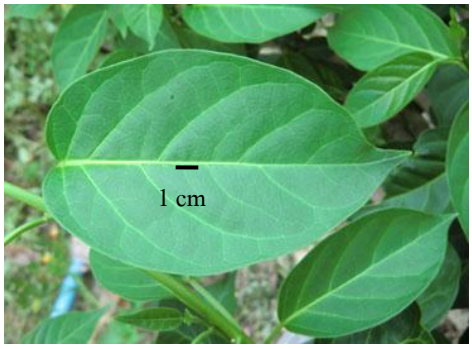
สำหรับผักเชียงดามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gymnema inodorum* Dence. อยู่ในวงศ์ Aclepiadaceae ลักษณะเป็นไม้ยืนต้น อายุหลายปี ลักษณะลำต้นเป็นไม้เถาเลื้อย ทุกส่วนของต้นมียางสีขาว ขนาดของลำต้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ ๑–๓ ซม. เป็นผักพื้นบ้านทางภาคเหนือที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ชาวบ้านนิยมนำยอดอ่อนและใบอ่อนของผักเชียงดามารับประทานในรูปผักสด มีรสขมอ่อนๆ ใช้ลวกกินกับน้ำพริก หรือแกงใส่ปลาแห้ง (ภาพที่ ๑๓)

ภาพที่ ๑๓ ลักษณะลำต้นของผักเชียงดา

ลักษณะใบ

ใบเดี่ยว ใบมีสีเขียวเข้ม เห็นเส้นใบชัดเจน ใบเรียงเป็นคู่ตรงข้ามกัน ขอบใบเรียบ ปลายเรียวแหลม ฐานใบมน ผิวใบเรียบ ไม่มีขน จากการสำรวจพบทั้งต้นพันธุ์ที่มีใบรูปรีแผ่นใบกว้าง ปลายใบแหลม และต้นพันธุ์ที่ใบมีรูปรี แผ่นใบแคบยาว ปลายใบแหลม ส่วนใหญ่พบต้นพันธุ์ที่มีใบรีกว้างมากกว่า (ภาพที่ ๑๔ และ ๑๕)

ภาพที่ ๑๔ ลักษณะยอดและใบเชียงดา



ก.

ข.

ภาพที่ ๑๕ ลักษณะใบของผักเชียงดาที่พบจากการสำรวจ
ก. ใบรีกว้าง ข. ใบรียาว

ลักษณะดอก

ดอกออกเป็นช่อ ช่อดอกหนึ่งช่อประกอบด้วยดอกจำนวนมาก ช่อดอกเกิดตามยอดและซอกใบ ดอกมีสีเขียวอ่อน หรือเขียวปนเหลือง ขนาดเล็ก กลีบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อน จำนวน ๕ กลีบ ดอกอ่อนชาวบ้านบางพื้นที่นำไปปรุงอาหาร (ภาพที่ ๑๔ และ ๑๕)

ภาพที่ ๑๖ ลักษณะช่อดอกของผักเชียงดา

ภาพที่ ๑๗ ลักษณะดอกของผักเชียงดา

๓. **ถั่วแปบ**

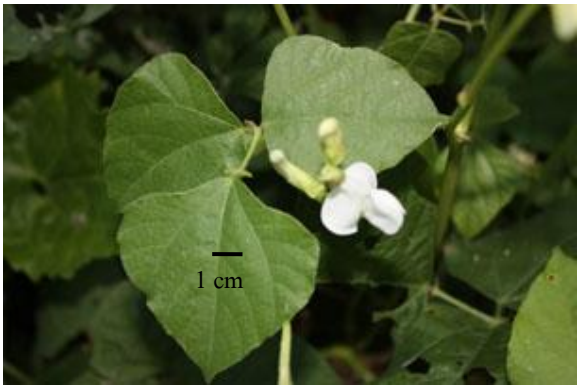
ลักษณะทั่วไปของถั่วแปบ

ถั่วแปบมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dolichos lablab* Linn. อยู่ในวงศ์ Leguminosae–Papilionoideae อยู่ในตระกูลเดียวกับ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วพู ชาวบ้านทางภาคเหนือนิยมนำไปปรุงอาหารได้หลาย เช่น แกงถั่วแปบ แกงแค ลวกจิ้มน้ำพริก เป็นต้น ลำต้นเป็นเถาเลื้อย มีขนอ่อนขึ้นตามลำต้นและใบ เป็นพืชล้มลุกแต่มีอายุข้ามปี (ภาพที่ ๑๘)

ภาพที่ ๑๘ ลักษณะต้นถั่วแปบ

ลักษณะใบ

ใบถั่วแปบเป็นใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อยสามใบ ใบย่อยรูปไข่ โคนใบป้าน ปลายใบแหลมมีหูใบย่อย มีขนอ่อนขึ้นตามใบ ใบมีสีเขียว เขียวหม่นหรือเขียวอ่อน (ภาพที่ ๑๙)



ภาพที่ ๑๙ ลักษณะใบถั่วแปบ

ลักษณะดอก

ดอกลักษณะคล้ายดอกถั่วทั่วไป ดอกมีสีขาว ชมพู หรือม่วงแตกต่างกันไปตามต้นพันธุ์ ดอกเป็นดอกช่อออกที่ซอกใบ ดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกสีม่วง หรือสีขาว รูปดอกถั่ว (ภาพที่ ๒๐)

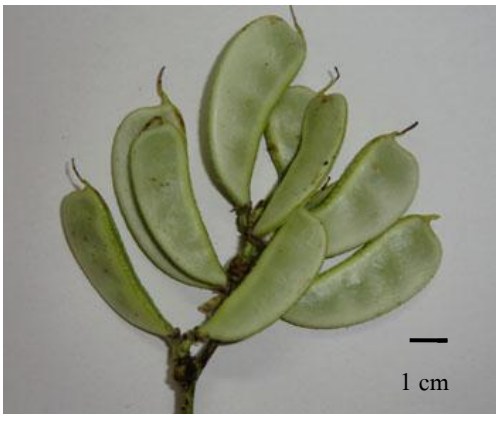
ก.

ข.

ภาพที่ ๒๐ ลักษณะสีดอกของถั่วแปบที่พบจากการสำรวจ ก. ดอกม่วง ข. ดอกขาว

ลักษณะผล

ผลของถั่วแปบเรียกเป็นฝัก ค่อนข้างแบน ปลายผลมีติ่งหรือจงอย ฝักถั่วแปบมีหลายลักษณะและรูปทรงทั้งแบนสั้น ยาว ขึ้นกับต้นพันธุ์ สำหรับถั่วแบบที่พบจากการสำรวจรูปทรงส่วนใหญ่จะมีลักษณะแบน มีทั้งสั้นและยาว บางต้นพันธุ์ฝักนูนยาว โค้ง เป็นต้น ฝักมีสีเขียว สีเขียวอ่อนหรือสีเขียวปนม่วง หรือสีม่วง (ภาพที่ ๒๑ และ ๒๒)



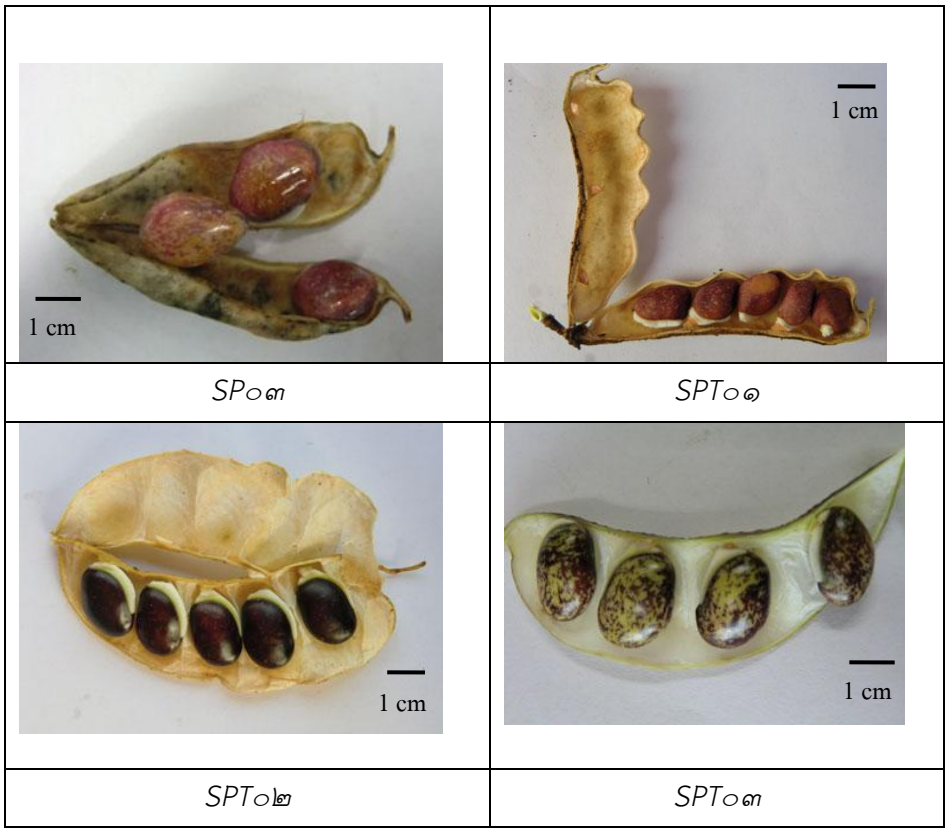
ภาพที่ ๒๑ ลักษณะการติดฝักของถั่วแปบ

SPo๑	SPo๒	SPo๓
SPo๔	SPo๕	SPo๖
SPo๗	SPTo๑	SPTo๒
SPTo๓	Lo๑	SPo๘

ภาพที่ ๒๒ ลักษณะของฝักถั่วแปบที่พบจากการสำรวจ

ลักษณะเมล็ด

เมล็ดของถั่วแปบ ลักษณะรูปไต คล้ายเมล็ดถั่วทั่วไป มีหลายสีตั้งแต่สีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม สีเทา สีดำ ลาย เป็นต้น เมล็ดมีหลายขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ ขึ้นกับลักษณะฝัก โดยในแต่ละฝักจะมีเมล็ดประมาณ ๓–๖ เมล็ดต่อฝัก (ภาพที่ ๒๓)



ภาพที่ ๒๓ เมล็ดถั่วแปบที่พบจากการสำรวจ

๔. เพกา

ลักษณะทั่วไปของเพกา

เพกามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oroxylum indicum* (L.) Vent.) อยู่ในวงศ์ Bignoniaceae ลักษณะเป็นไม้ยืนต้น อายุหลายปี ค่อนข้างสูง ความสูงของต้นประมาณ ๓–๑๐ เมตร ทางภาคเหนือเรียก มะลิดไม้ หรือลิดไม้ นิยมนำฝักอ่อนและดอก มาปรุงอาหารหลายชนิด ได้แก่ ยำ ลวกจิ้มน้ำพริก ผัด เป็นต้น

ภาพที่ ๒๔ ลักษณะต้นของเพกา

ลักษณะใบ

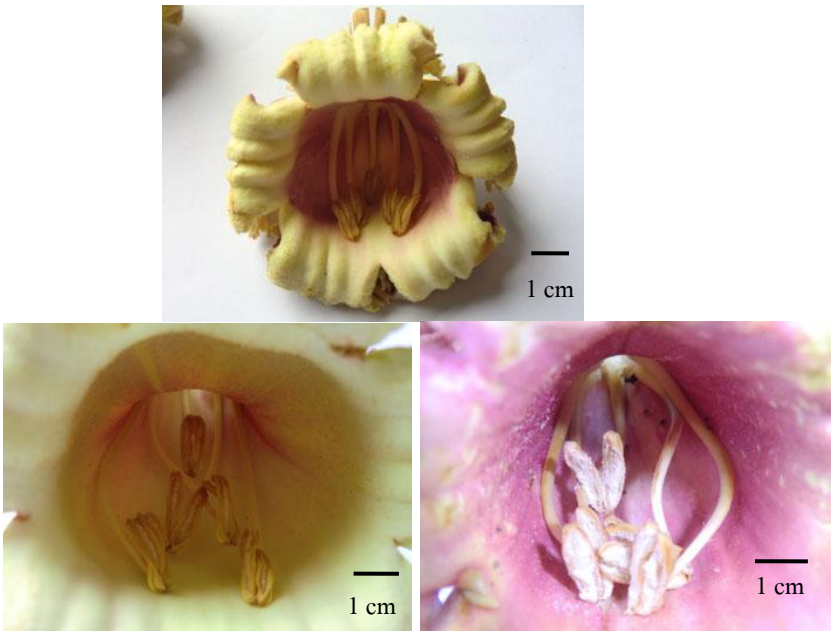
เพกามีใบขนาดใหญ่ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกสามชั้น ใบมีสีเขียวเข้ม ใบย่อยรูปไข่หรือรูปรี ใบเรียงตรงข้าม มีจำนวนมากตรงปลายกิ่ง (ภาพที่ ๒๓)

ภาพที่ ๒๕ ลักษณะใบของเพกา

ลักษณะดอก

ดอกเพกามีลักษณะคล้ายรูปแตร กลีบดอกเชื่อมติดกัน ปลายกลีบดอกแผ่บาน ย่นเล็กน้อย ปลายกลีบมีสีเหลือง เหลืองอ่อน หรือชมพู ตัวกลีบที่เชื่อมกันเป็นหลอดด้านนอกมีสีม่วงเข้ม หรือม่วงอ่อน กลีบมีสีเหลืองอ่อน ชมพู หรือม่วงอ่อน ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้จำนวน ๕ อัน สีขาวหรือเหลืองอ่อน เกสรตัวเมียสีเหลือง มีละอองเกสรสีขาว หรือ

เหลืองอ่อนจำนวนมาก สำหรับดอกเพกาจากการสำรวจพบว่า ส่วนของโคนดอกมีทั้งยาวและสั้นขึ้นกับต้นพันธุ์ (ภาพที่ ๒๖ ภาพที่ ๒๗ และภาพที่ ๒๘)

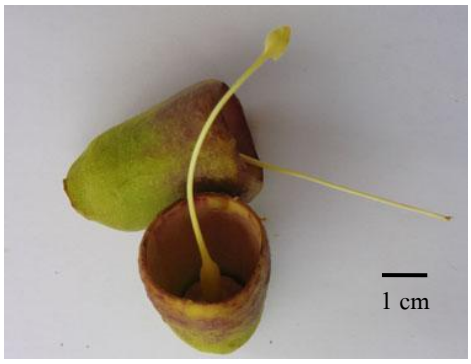


ภาพที่ ๒๖ ลักษณะดอกเพกาที่พบจาการสำรวจ

ก. ข.

ก. ข.

ภาพที่ ๒๗ ลักษณะดอกเพกาที่พบจากการสำรวจ ก. โคนดอกยาว ข. โคนดอกสั้น

ก


ข

ภาพที่ ๒๘ ลักษณะเกสรตัวผู้ (ก) และเกสรตัวเมีย(ข)

ลักษณะผล

ผลของเพกาเรียกว่าฝัก ฝักเพกามีสีเขียว เขียวเข้ม หรือเขียวปนม่วง ลักษณะแบน ยาว คล้ายลิ้นห้อยอยู่ที่ปลายยอด ฝักมีหลายขนาดขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของต้น โดยทั่วไปเพกาหนึ่งต้นมีจำนวนฝักไม่เกิน ๑๕ ฝัก แต่อย่างไรก็ตามจำนวนฝักขึ้นกับความอุดมสมบูรณ์ของต้น (ภาพที่ ๒๙ และ ภาพที่ ๓๐)

ภาพที่ ๒๙ ลักษณะการเกิดฝักของเพกา

ภาพที่ ๓๐ ฝักเพกาที่เก็บจากต้นพันธุ์

ลักษณะเมล็ด

ฝักเพกาเมื่อแก่และแห้งจะปล่อยเมล็ดที่มีลักษณะบางแบน ขนาดเล็กและเบามาก ปลิวหรือหล่นตามลมลงมา เมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อน หรือสีเงินมันวาว ลักษณะคล้ายรูปหยดน้ำ (ภาพที่ ๓๑)

ภาพที่ ๓๑ ลักษณะเมล็ดเพกา

๑.๓ <u>คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของผักพื้นบ้าน</u>

คุณสมบัติทางกายภาพและลักษณะทางปริมาณของผักพื้นบ้านนั้นส่วนใหญ่บันทึกลักษณะที่สะดวกในการเก็บข้อมูลเท่านั้นได้แก่ ความกว้างผล ความยาวผล น้ำหนัก เป็นต้น ในงานวิจัยนี้บันทึกเพียงลักษณะของฝักถั่วแปบเท่านั้นเพราะแต่ละต้นพันธุ์มีฝักปริมาณมาก โดยสุ่มมา ๑๕–๒๕ ฝักต่อต้นพันธุ์ ผลที่ได้ดังตารางที่ ๘ และ ตารางที่ ๙

ตารางที่ ๗ ลักษณะทางปริมาณของฝักถั่วแปบจำนวน ๓๐ ต้นพันธุ์

ตัวอย่าง	ความกว้างฝัก (มม.)	ความยาวฝัก (ซม.)	น้ำหนักฝัก (กรัม)
ฝักถั่วแปบ	๑๑.๙๑–๒๘.๔๗	๖.๓๐–๑๖.๗๖	๒.๒๒–๑๓.๗๙

ตารางที่ ๘ ลักษณะทางปริมาณของฝักถั่วแปบจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์

ลำดับ	รหัสต้นพันธุ์	น้ำหนักผล (กรัม)	ความกว้าง (มม.)	ความยาว (ซม.)
๑	SP๐๑/CM	๕.๙๒±๐.๙๕	๑๕.๓๗±๐.๘๕	๑๔.๐๖±๐.๕๑
๒	SP๐๒/CM	๖.๐๗±๐.๗๔	๑๖.๕๖.๐±๐.๗๖	๑๔.๒๑±๐.๔๗
๓	SP๐๓/CM	๒.๕๒±๐.๔๓	๑๑.๙๑±๐.๙๗	๖.๓๓±๐.๓๙
๔	SP๐๔/CM	๑๐.๑±๑.๔๖	๒๕.๗๕±๑.๘๙	๑๐.๐๓±๐.๖๖
๕	SP๐๕/CM	๔.๖๔±๐.๘๗	๑๖.๓๔±๐.๗๘	๑๑.๙๘±๐.๖๔
๖	SP๐๖/CM	๖.๖๐±๑.๑๐	๑๔.๕๙±๑.๖๓	๑๓.๖๗±๐.๕๕
๗	SP๐๗/CM	๑๐.๐๓±๒.๑๑	๑๔.๗๕±๒.๒๑	๑๖.๗๖±๑.๔๔
๘	SPT๐๑/CM	๔.๔๔±๐.๔๙	๒๐.๐๐±๑.๑๑	๗.๗๑±๐.๒๘
๙	SPT๐๒/CM	๔.๓๙±๐.๔๗	๑๒.๑๐±๑.๑๐	๖.๐๔±๐.๒๘
๑๐	SPT๐๓/CM	๕.๕๔±๐.๗๔	๑๗.๐๖±๑.๒๐	๙.๙๐±๐.๔๑
๑๑	F๐๑/CM	๑๓.๗๙±๑.๖๕	๒๘.๔๗±๑.๑๘	๑๐.๙๑±๐.๕๙
๑๒	MR๐๑/CM	๑๒.๓๘±๑.๒๓	๒๖.๓๐±๑.๐๕	๙.๕๕±๐.๘๑
๑๓	MT๐๒/L	๓.๗๘±๐.๔๐	๑๘.๕๒±๐.๘๗	๖.๔๒±๐.๔๓

จากตารางที่ ๗ และ ตารางที่ ๘ ข้อมูลของความกว้าง ความยาว และน้ำหนักฝักถั่วเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้บ่งบอกลักษณะภายนอกด้านขนาดและรูปทรงของฝักถั่วแปบ ซึ่งพบว่าฝักถั่วแปบแต่ละต้นพันธุ์มีความแตกต่างกันในด้านขนาดและรูปร่าง เช่น ต้นพันธุ์ SP๐๓/CM มีน้ำหนักเบา (๒.๕๒±๐.๔๓) และขนาดของฝักเล็ก ขณะที่ F๐๑/CM มีน้ำหนักของฝักมากที่สุด (๑๓.๗๙±๑.๖๕) และมีขนาดของฝักใหญ่ที่สุด

สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผักพื้นบ้านแต่ละชนิด ทำโดยส่งตัวอย่างผักที่เก็บจากบางพื้นที่และบางต้นพันธุ์เท่านั้นไปวิเคราะห์เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆต้องใช้ตัวอย่างผักประมาณ ๒ กิโลกรัม ในขณะที่ต้นพันธุ์ผักที่

เก็บจากพื้นที่ต่างๆมีปริมาณผลผลิตไม่เพียงพอ โดยผักฮ้วนวิเคราะห์จากส่วนของดอกอ่อนที่มีใบอ่อนติดมาบ้างนิดหน่อย ส่วนถั่วแปบและเพกาวิเคราะห์จากฝัก สำหรับผักเชียงดางานวิจัยระยะที่๑ นี้ไม่ได้นำตัวอย่างส่งวิเคราะห์เนื่องจากรอเก็บผลผลิตจากต้นพันธุ์ที่ปลูกไว้ในแปลงทดลองจึงจะส่งวิเคราะห์ในระยะที่ ๒ ดังนั้นตัวอย่างผักที่นำไปวิเคราะห์ได้แก่ ดอกอ่อนผักฮ้วน (SP๐๑) จากสวนเกษตรกรตำบลท่ากว้าง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ ฝักถั่วแปบดอกม่วง (SP๐๑/CM) และ ฝักถั่วแปบดอกขาว (SP๐๒/CM) จากแปลงทดลองของโครงการและฝักเพกาจากสวนเกษตรกรอำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่

ผลจากการวิเคราะห์ผักฮ้วนดังตารางที่ ๙ และ ๑๐ โดยพบว่า ยอดและดอกของผักฮ้วนมีปริมาณโซเดียม ๕.๒๐ มิลลิกรัม แคลเซียม ๑๒๕.๐๐ มิลลิกรัม เหล็ก ๑.๑๒ มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส ๕๙.๔๖ มิลลิกรัม และโพแทสเซียม ๔๗๔.๐๐ มิลลิกรัม ซึ่งปริมาณธาตุอาหารเหล่านี้ในผักฮ้วนจัดว่าอยู่ในปริมาณที่สูง และผักฮ้วนยังประกอบด้วยวิตามินเอ ๐.๐๖ ไมโครกรัม วิตามินอี ๐.๓๗ มิลลิกรัม เบต้าแคโรทีน ๐.๓๗ ไมโครกรัม และวิตามินบี๑ ๐.๐๓ มิลลิกรัม ผลจากการวิเคราะห์นี้ผักฮ้วนจึงเป็นผักพื้นบ้านที่มีคุณค่าทางอาหารสูง

ส่วนปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดที่พบในดอกผักฮ้วนเท่ากับ ๑๑๙.๒๒ มิลลิกรัม ซึ่งจัดว่าผักฮ้วนมีสารต้านอนุมูลอิสระในระดับค่อนข้างสูงและควรนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง

ตารางที่ ๙ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผักฮ้วน*

รายการวิเคราะห์	ผักฮ้วน SP๐๑ (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)	รายการ วิเคราะห์	ผักฮ้วน SP๐๑ (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)
พลังงานทั้งหมด	๕๑.๑๐ กิโลแคลอรี	ฟอสฟอรัส	๕๙.๔๖ มิลลิกรัม
พลังงานจากไขมัน	๖.๖๖ กิโลแคลอรี	โพแทสเซียม	๔๗๔.๐๐ มิลลิกรัม
ไขมันทั้งหมด	๐.๗๔ กรัม	วิตามิน เอ	๐.๐๖ ไมโครกรัม
โปรตีน	๓.๖๗ กรัม	วิตามิน อี	๐.๓๗ มิลลิกรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	๘.๔๔ กรัม	วิตามิน บี๑	๐.๐๓ มิลลิกรัม
ใยอาหาร	๔.๗๘ กรัม	วิตามิน บี๒	น้อยมาก
น้ำตาล	๒.๒๘ กรัม	วิตามิน ซี	น้อยมาก
โซเดียม	๕.๒๐ มิลลิกรัม	เบต้าแคโรทีน	๐.๓๗ ไมโครกรัม
แคลเซียม	๑๒๕.๐๐ มิลลิกรัม	ความชื้น	๘๕.๗๙ กรัม
เหล็ก	๑.๑๒ มิลลิกรัม	เถ้า	๑.๓๖ กรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

ตารางที่ ๑๐ ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant) ของผักฮ้วน*

ตัวอย่าง	ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด
ผักฮ้วน SP๑	๑๑๙.๒๒ มิลลิกรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

ตารางที่ ๑๑ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของถั่วแปบ*

รายการวิเคราะห์	ถั่วแปบ SP๐๑/CM (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)	ถั่วแปบ SP๐๒/CM (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)
พลังงานทั้งหมด	๖๗.๘๓ กิโลแคลอรี	๗๘.๒๔ กิโลแคลอรี
พลังงานจากไขมัน	๐.๒๗ กิโลแคลอรี	๐.๓๖ กิโลแคลอรี
ไขมันทั้งหมด	๐.๐๓ กรัม	๐.๐๔ กรัม
โปรตีน	๖.๔๘ กรัม	๖.๐๗ กรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	๑๐.๔๑ กรัม	๑๓.๔๐ กรัม
ใยอาหาร	๕.๒๑ กรัม	๕.๗๐ กรัม
น้ำตาล	๑.๐๗ กรัม	๐.๙๓ กรัม
โซเดียม	๐.๗๑ มิลลิกรัม	๑.๘๔ มิลลิกรัม
แคลเซียม	๕๗.๑๒ มิลลิกรัม	๖๓.๓๕ มิลลิกรัม
เหล็ก	๐.๘๐ มิลลิกรัม	๐.๘๗ มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	๔๙.๗๔ มิลลิกรัม	๕๒.๖๗ มิลลิกรัม
โพแทสเซียม	๓๘๙.๐๐ มิลลิกรัม	๓๗๗.๐๐ มิลลิกรัม
วิตามิน เอ	น้อยมาก	น้อยมาก
วิตามิน อี	๐.๐๘ มิลลิกรัม	๐.๐๘ มิลลิกรัม
วิตามิน บี๑	๐.๐๖ มิลลิกรัม	๐.๐๗ มิลลิกรัม
วิตามิน บี๒	น้อยกว่า ๐.๐๒๕ มิลลิกรัม	น้อยกว่า ๐.๐๒๕ มิลลิกรัม
วิตามิน ซี	น้อยมาก	น้อยมาก
ความชื้น	๘๒.๒๕ กรัม	๗๙.๕๗ กรัม
เถ้า	๐.๘๓ กรัม	๐.๙๒ กรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

สำหรับถั่วแปบนำมาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการจำนวน ๒ ต้นพันธุ์ (ตารางที่ ๑๑) คือ ฝักถั่วแปบ SP๐๑/CM และ SP๐๒/CM เนื่องจากแหล่งอื่นมีปริมาณไม่เพียงพอ ซึ่งพบว่ามีปริมาณองค์ประกอบหลักทั่วไปเหมือนผักอื่นโดยฝักถั่วแปบทั้งสองตัวอย่างมีปริมาณโปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมอยู่ในเกณฑ์สูงและยังประกอบด้วยวิตามินอี และวิตามินบี๑ เมื่อเปรียบเทียบสองตัวอย่างพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมาก

ตารางที่ ๑๒ ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant) ของถั่วแปบ*

ตัวอย่างถั่วแปบ	ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด
SP๐๑/CM	๑๙.๕๔ มิลลิกรัม
SP๐๒/CM	๑๕.๕๘ มิลลิกรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

ส่วนปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดของฝักถั่วแปบทั้งสองตัวอย่างมีปริมาณน้อยคือเท่ากับ ๑๙.๕๔ มิลลิกรัม (SP๐๑/CM) และ ๑๕.๕๘ มิลลิกรัม (SP๐๒/CM) และมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับยอดและดอกอ่อนของผักฮ้วน (ตารางที่ ๑๒)

ตารางที่ ๑๓ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของเพกา*

รายการวิเคราะห์	เพกา (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)	รายการวิเคราะห์	เพกา (หน่วย ต่อ ๑๐๐ กรัม)
พลังงานทั้งหมด	๔๙.๘๐กิโลแคลอรี	ฟอสฟอรัส	๓๗.๖๘ มิลลิกรัม
พลังงานจากไขมัน	๒.๑๖ กิโลแคลอรี	โพแทสเซียม	๑๙๔.๐๐มิลลิกรัม
ไขมันทั้งหมด	๐.๒๔ กรัม	วิตามิน เอ	๒.๕๖ ไมโครกรัม
โปรตีน	๒.๒๙ กรัม	วิตามิน อี	๐.๖๕ มิลลิกรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	๙.๖๑ กรัม	วิตามิน ซี	๑๑.๑๗ มิลลิกรัม
ใยอาหาร	๓.๙๗ กรัม	เบต้าแคโรทีน	๑๕.๓๕ ไมโครกรัม
น้ำตาล	๕.๓๕ กรัม	ความชื้น	๘๗.๐ กรัม
โซเดียม	๓.๗๐ มิลลิกรัม	เถ้า	๐.๘๖ กรัม
แคลเซียม	๔๖.๕๖ มิลลิกรัม		
เหล็ก	๑.๒๘ มิลลิกรัม		

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของผักเพกา ที่ได้มาจากสวนเกษตรกรในตำบลสารภี จังหวัดเชียงใหม่ (ตารางที่ ๑๓) พบปริมาณโซเดียม ๓.๗๐ มิลลิกรัม แคลเซียม ๔๖.๕๖ มิลลิกรัม เหล็ก ๑.๒๘ มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส ๓๗.๖๘ มิลลิกรัม โพแทสเซียม ๑๙๔.๐๐มิลลิกรัม วิตามินเอ ๒.๕๖ ไมโครกรัม วิตามินอี ๐.๖๕ มิลลิกรัม และเบต้าแคโรทีน ๑๕.๓๕ ไมโครกรัม ธาตุอาหารและวิตามินเหล่านี้อยู่ในเกณฑ์สูงแสดงถึงผักเพกามีคุณค่าทางอาหารสูง

สำหรับปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดของผักเพกา พบว่ามีปริมาณค่อนข้างสูงเท่ากับ ๑๕๙.๐๐ มิลลิกรัม ดังตารางที่๑๔ ซึ่งสูงกว่าผักฮ้วนเล็กน้อย (๑๑๙.๒๒ มิลลิกรัม) และสูงกว่าถั่วแปบทั้งสองตัวอย่าง

ตารางที่ ๑๔ ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด (Total Antioxidant) ของเพกา*

ตัวอย่าง	ปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมด
เพกา	๑๕๙.๐๐ มิลลิกรัม

*ที่มา ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร (LCFA)

๓. การขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมต้นพันธุ์

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นพันธุ์แล้วก็นำเอาส่วนที่ขยายพันธุ์ได้ของผักพื้นบ้านแต่ละชนิดมาปลูกรวบรวมไว้สำหรับใช้ในงานวิจัย ซึ่งผักพื้นบ้านแต่ละชนิดก็มีการขยายพันธุ์ที่แตกต่างกันไปตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤกษศาสตร์ของผักชนิดนั้น

๓.๑ ผักฮ้วนหมู

ผักฮ้วนหมูหรือผักฮ้วนสามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี วิธีที่นิยมคือการเพาะเมล็ดและการปักชำกิ่ง แต่เนื่องจากการเพาะเมล็ดมีข้อเสียคือทำให้ได้ต้นใหม่ที่ไม่ตรงตามพันธุ์ ในงานวิจัยนี้จึงทำการขยายพันธุ์โดยวิธีการปักชำกิ่ง ดังนั้นหลังจากการสำรวจ การเก็บตัวอย่างผักฮ้วนจึงเก็บส่วนของผลและกิ่งจากต้นเพื่อนำมาใช้ขยายพันธุ์และปลูกรวบรวมพันธุ์ ซึ่งกิ่งที่ใช้ปักชำยาวประมาณ ๒๐ เซนติเมตร และปักชำลงบนวัสดุเพาะที่ประกอบด้วยทรายและขี้เถ้าแกลบ พอกิ่งชำมีการพัฒนาสร้างยอด ใบและรากจึงย้ายไปปลูกในกระถางที่มีดินปลูก โดยระยะเวลาการปักชำกิ่งใช้เวลาประมาณหนึ่งเดือนถึงเดือนครึ่งจึงย้ายปลูกได้ (ภาพที่ ๓๒ และ ๓๓)

ภาพที่ ๓๒ ท่อนพันธุ์ผักฮ้วนสำหรับการปักชำ

ภาพที่ ๓๓ ผักฮ้วนต้นใหม่ที่ได้จากการปักชำกิ่ง

๓.๒ ผักเชียงดา

การขยายพันธุ์ผักเชียงดาสามารถทำได้โดยปักชำกิ่งวิธีการเหมือนการชำผักฮ้วน กิ่งที่ตัดออกมาก็นำมาปักชำในถุงดำ รดน้ำให้ชุ่มอยู่เสมอจากนั้นประมาณ ๔–๖ สัปดาห์ ยอดใหม่ก็จะแทงออกมาแล้วพัฒนาเป็นต้นพันธุ์เชียงดาที่จะเจริญเติบโตต่อไป (ภาพที่ ๓๔)

ภาพที่ ๓๔ กิ่งชำผักเชียงดาที่กำลังพัฒนาเป็นต้นใหม่

๓.๓ ถั่วแปบ

การปลูกรวบรวมถั่วแปบจากต้นที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ โดยนำส่วนของเมล็ดมาเพาะใส่ถุงดำเพื่อขยายพันธุ์และเก็บรวบรวมไว้ ซึ่งถั่วแปบนิยมขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ชาวบ้านจะเก็บฝักถั่วแปบที่แก่และแห้งแล้วไว้ปลูกขยายพันธุ์ในปีต่อไป (ภาพที่ ๓๕) เมล็ดถั่วแปบถูกนำไปเพาะในถุงดำที่มีขี้เถ้าแกลบและทรายผสมอยู่ในอัตราส่วนเท่ากัน รดน้ำให้ชุ่ม ประมาณ ๑ สัปดาห์ก็แทงยอดอ่อนโผล่ขึ้นมา พอต้นอ่อนอายุได้ประมาณ ๒–๓ สัปดาห์ก็ย้ายไปปลูกในแปลงทดลองได้ หรืออีกวิธีทำโดยขุดหลุมในแปลงทดลองแล้วนำเมล็ดถั่วแปบใส่ลงไปในหลุมๆ ละ ๒–๓ เมล็ดแล้วรดน้ำให้ชุ่ม ประมาณ ๑ สัปดาห์ถั่วแปบก็งอกขึ้นมา แล้วคอยถอนต้นอ่อนให้เหลือหลุมละต้น เลือกต้นที่แข็งแรงไว้เพื่อง่ายต่อการดูแลต่อไป

ภาพที่ ๓๕ ฝักและเมล็ดถั่วแปบสำหรับปลูกและขยายพันธุ์

๓.๔ เพกา

สำหรับเพกา โดยธรรมชาติขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดที่ร่วงหล่นจากฝักแก่และแห้งที่ห้อยอยู่ตามต้น เมื่อเมล็ดหล่นลงสู่ดินและได้รับความชื้นที่เหมาะสม เมล็ดก็จะงอกและพัฒนาเป็นเพกาต้นเล็กๆเกิดขึ้นตามพื้นที่ที่เมล็ดร่วงหล่นเอง หากต้องการเพาะเมล็ดเองก็นำเมล็ดจากฝักแก่และแห้งมาวางในถุงดำที่มีขี้เถ้าแกลบและทรายผสมกัน เมื่อผ่านไปประมาณ ๓–๔ สัปดาห์ก็จะได้เพกาต้นใหม่เกิดขึ้น แล้วพอต้นเพกาเจริญเติบโตเต็มที่ก็สามารถย้ายต้นเพกาต้นใหม่ไปปลูกในสวนได้ (ภาพที่ ๓๖)

ภาพที่ ๓๖ เมล็ดเพกาสำหรับปลูกและขยายพันธุ์

๔. การศึกษาด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

๓.๑ <u>การเก็บตัวอย่างผักพื้นบ้าน</u>

การเก็บตัวอย่างผักพื้นบ้านเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอนั้น สำหรับผักพื้นบ้านทั้ง ๔ ชนิดได้เก็บส่วนของใบอ่อนมาเก็บรักษาไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิลบ ๒๐ องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ สำหรับผักฮ้วนสกัดดีเอ็นเอ จำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่สุ่มมาจากต้นพันธุ์ที่ได้จากการสำรวจ ขณะที่ผักเชียงดาสกัดดีเอ็นเอสุ่มมา จำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์ ส่วนถั่วแปบสกัดดีเอ็นเอสุ่มมา จำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์ และเพกาสกัดดีเอ็นเอจำนวน ๔ ต้นพันธุ์ (ตารางที่ ๒, ๓, ๔ และ ๕)

<u>๓.๒ การสกัดดีเอ็นเอจากส่วนใบผัก</u>

สำหรับผักพื้นบ้านทั้งสามชนิดสามารถใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมได้หลายชนิดแต่ชุดสกัดที่ใช้แล้วได้ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่ดีได้แก่ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ซึ่งสามารถใช้ได้กับใบอ่อนจนถึงใบแก่ ดังนั้นในงานวิจัยจึงใช้ชุดสกัดนี้กับใบของผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบ และเพกา

<u>ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)</u> (ประทุมพร และพรรัตน์, ๒๕๔๙ และ ๒๕๕๔) มีรายละเอียดดังนี้ (ภาพที่ ๓๗)

๑. บดใบอ่อนจำนวน ๑๐๐ มิลลิกรัม ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด ๑.๕ มล.
๒. เติม บัฟเฟอร์ AP๑ จำนวน ๔๐๐ ไมโครลิตร และใส่ RNase A จำนวน ๔ ไมโครลิตร (๑๐๐ mg/ml)
๓. นำไปบ่มในน้ำอุณหภูมิ ๖๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๐ นาที พลิกกลับไปมา ๒–๓ ครั้ง

๔. เติม บัพเฟอร์ AP๒ จำนวน ๑๓๐ ไมโครลิตร เขย่า และ บ่มในน้ำแข็งนาน ๕ นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ ๒๐,๐๐๐ x g นาน ๕ นาที

๕. ย้ายส่วนใสใส่ลงไปใน QIAshredder Mini spin Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ ๒๐,๐๐๐ x g นาน ๒ นาที

๖. ย้ายส่วนใสที่กรองได้ไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ (ประมาณ ๔๕๐ ไมโครลิตร)

๗. ใส่บัพเฟอร์ AP๓/E ลงไปในหลอดทดลอง จำนวน ๑.๕ เท่า ผสมให้เข้ากัน (ประมาณ ๖๗๕ ไมโครลิตร)

๘. นำส่วนผสมจำนวน ๖๕๐ ไมโครลิตรใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ ๖,๐๐๐ x g นาน ๑ นาที แล้วทิ้งส่วนผสม จากนั้นนำส่วนผสมที่เหลือกรองผ่านซ้ำอีกจนหมด

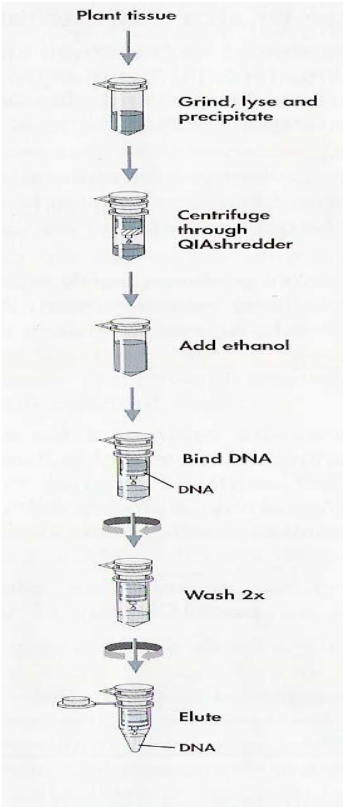
๙. นำเอา DNeasy Mini Spin Colum มาวางในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติมบัพเฟอร์ AW ลงไป ๕๐๐ ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๖,๐๐๐ x g นาน ๑ นาที ทิ้งส่วนใสที่กรองได้

๑๐. เติมบัพเฟอร์ AW ลงไปจำนวน ๕๐๐ ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๒๐,๐๐๐ x g นาน ๒ นาที ทิ้งส่วนใส

๑๑. ย้าย DNeasy Mini Spin Colum ไปวางในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติมบัพเฟอร์ AE จำนวน ๑๐๐ ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน ๕ นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๖,๐๐๐ x g นาน ๑ นาที

๑๒. ทำซ้ำในข้อ ๑๑. อีกครั้ง แล้วเก็บส่วนใสที่ได้สำหรับนำไปใช้ต่อไป

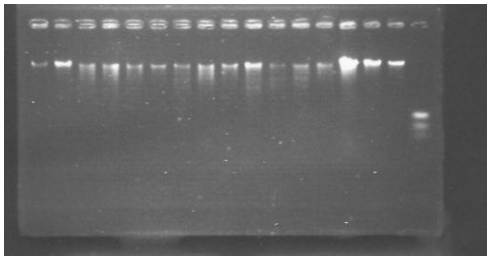
สำหรับดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด จะนำไปเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ –๒๐ องศาเซลเซียส เพื่อที่จะนำไปทำ PCR และวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป



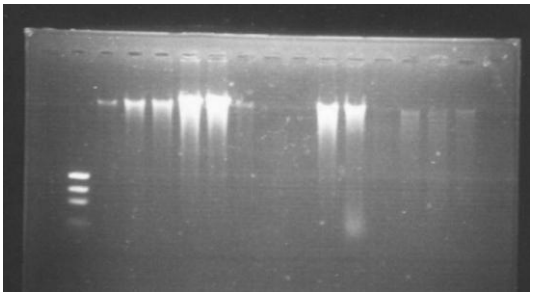
ภาพที่ ๓๗ ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

๓.๓ <u>การเช็คคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ</u>

การเช็คคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบและเพกา ทำโดยใช้การทำอิเลกโทรโฟรีซิสด้วย อากาโรส เจล (agarose gel) ความเข้มข้น ๐.๘% โดยใช้ ๐.๕XTBE บัฟเฟอร์ แล้วนำดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณที่ดีมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นประมาณ ๑๐–๒๐ ng เพื่อใช้ในทำการ PCR ต่อไป (ภาพที่ ๓๘ และ ๓๙)



ภาพที่ ๓๘ ดีเอ็นเอจากผักฮ้วนและผักเชียงดาเช็คคุณภาพโดยการทำอิเลกโทรโฟรีซิส



ภาพที่ ๓๙ ดีเอ็นเอจากถั่วแปบและเพกาเช็คคุณภาพโดยการทำอิเลกโทรโฟรีซิส

๓.๔ <u>การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)</u>

การทำ PCR ใช้ ๒x PCR Master mix (*i*–Taq) (*iNtron* Biotechnology, Inc) โดยเติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดีเอ็นเอต้นแบบ (ความเข้มข้น ๑๐–๒๐ ng) และไพร์เมอร์ (primer) (ความเข้มข้น ๐.๒ micromoles) ซึ่งไพร์เมอร์ที่ใช้มีจำนวนเบส ๑๗–๑๘ ตัว (๑๗–๑๘ base oligonucleotide primers ของ UBC) โดยใช้เครื่อง PCR ชนิด Gradient Palm–Cycler

จากการทดสอบหา Thermal Cycle condition ที่เหมาะสมกับการทำ PCR นั้นพบว่าได้ Cycle condition ที่เหมาะสมสามารถใช้กับ ผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบและเพกา คือ

Cycle condition : ๙๔ °C ๕ min

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

๗๒ °C ๗ min

๓.๕ <u>การคัดเลือกไพร์เมอร์ (Primer) ที่เหมาะสม</u>

การคัดเลือกไพร์เมอร์ที่เหมาะสมได้ใช้การสุ่มจากไพร์เมอร์ของ UBC (The University of British Columbia) จำนวน ๕๐ ชนิด ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ที่มีจำนวน ๑๗–๑๘ เบส พบว่าจากการคัดเลือกมีไพร์เมอร์จำนวน ๑๑ ชนิดใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักฮ้วนได้ดี จำนวน ๑๐ ชนิดใช้กับผักเชียงดา จำนวน ๑๒ ชนิด และจำนวน ๘ ชนิดใช้กับถั่วแปบ ส่วนเพกาใช้ไพร์เมอร์จำนวน ๑๑ ชนิด (ตารางที่ ๑๕, ๑๖, ๑๗ และ ตารางที่ ๑๘)

การทดสอบไพร์เมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ดีเอ็นเอของผักแต่ละชนิดจำนวน ๒–๓ แหล่ง หรือ ๒–๓ ต้นพันธุ์มาทำ PCR กับไพร์เมอร์ที่เลือกไว้แล้วนำเอา PCR product ที่ได้มาเช็คด้วยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น ๐.๘% ใน ๐.๕XTBE บัฟเฟอร์ (ประทุมพร และพรรัตน์, ๒๕๔๙ และ ๒๕๕๔)

ตารางที่ ๑๕ ไพร์เมอร์จำนวน ๑๐ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักฮ้วนจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์

รหัส Primer	ลำดับเบส ๕′ to ๓′*
UBC–๘๐๗	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC–๘๐๘	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC–๘๑๑	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC–๘๒๔	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC–๘๒๕	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC–๘๓๐	TGT GTG TGT GTG TGT GG
UBC–๘๕๗	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
UBC–๘๖๔	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC–๘๖๖	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
UBC–๘๘๑	GGG TGG GGT GGG GTG

* R= A,G Y=C,T

ตารางที่ ๑๖ ไพร์เมอร์จำนวน ๑๒ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผักเชียงดา จำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์

รหัส Primer	ลำดับเบส ๕′ to ๓′*
UBC–๘๑๐	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC–๘๑๑	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC–๘๑๘	CAC ACA CAC ACA CAC AG
UBC–๘๒๖	ACA CAC ACA CAC ACA CC
UBC–๘๒๗	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC–๘๓๐	TGT GTG TGT GTG TGT GG
UBC–๘๓๔	GGA GAG GAG AGG AGA
UBC–๘๓๕	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC–๘๕๗	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
UBC–๘๖๔	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC–๘๖๖	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
UBC–๘๘๑	GGG TGG GGT GGG GTG

* R= A,G Y=C,T

ตารางที่ ๑๗ ไพร์เมอร์จำนวน ๘ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วแปบ จำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์

รหัส Primer	ลำดับเบส ๕′ to ๓′*
UBC–๘๐๘	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC–๘๐๙	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC–๘๑๐	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC–๘๒๕	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC–๘๒๖	ACA CAC ACA CAC ACA CC
UBC–๘๓๕	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC–๘๖๔	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC–๘๘๐	GGA GAG GAG AGG AGA

* R= A,G Y=C,T

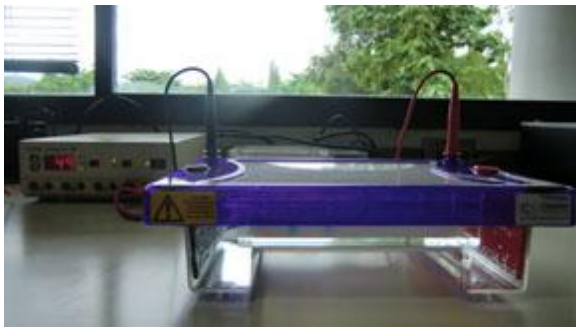
ตารางที่ ๑๘ ไพร์เมอร์จำนวน ๑๑ ชนิดที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเพกาจำนวน ๔ ต้นพันธุ์

รหัส Primer	ลำดับเบส ๕′ to ๓′*
UBC–๘๑๐	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC–๘๑๑	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC–๘๑๒	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC–๘๑๘	CAC ACA CAC ACA CAC AG
UBC–๘๒๕	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC–๘๒๖	ACA CAC ACA CAC ACA CC
UBC–๘๓๔	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC–๘๓๕	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC–๘๔๑	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
UBC–๘๕๗	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
UBC–๘๖๔	ATG ATG ATG ATG ATG ATG

* R= A,G Y=C,T

๔.๖ <u>การทำอิเลกโทรโฟรีซิสของ PCR Product</u>

การทำอิเลกโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรส เจล ที่ความเข้มข้น ๑.๕% ใน ๐.๕X TBE บัพเฟอร์ และ ใช้ GeneRuler™ ๑๐๐ bp Plus DNA PCR Ladder (Fermentas) เป็น marker (ภาพที่ ๔๐) และย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น ๐.๕ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และถ่ายรูปเพื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมจากโปรแกรม NTSYSpc ver. ๒.๒ (Rohlf, ๒๐๐๕) (ประทุมพร และคณะ, ๒๕๕๔)

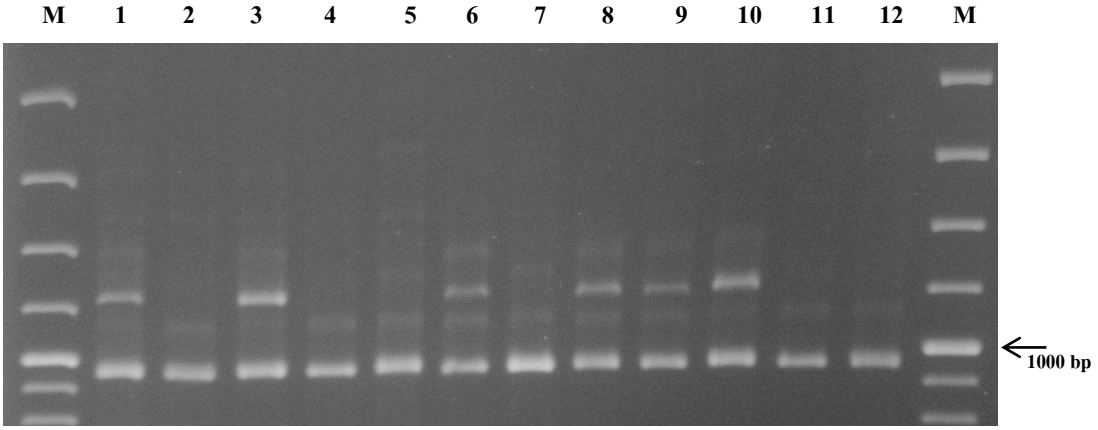


ภาพที่ ๔๐ การทำอิเลกโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอของผักพื้นบ้าน

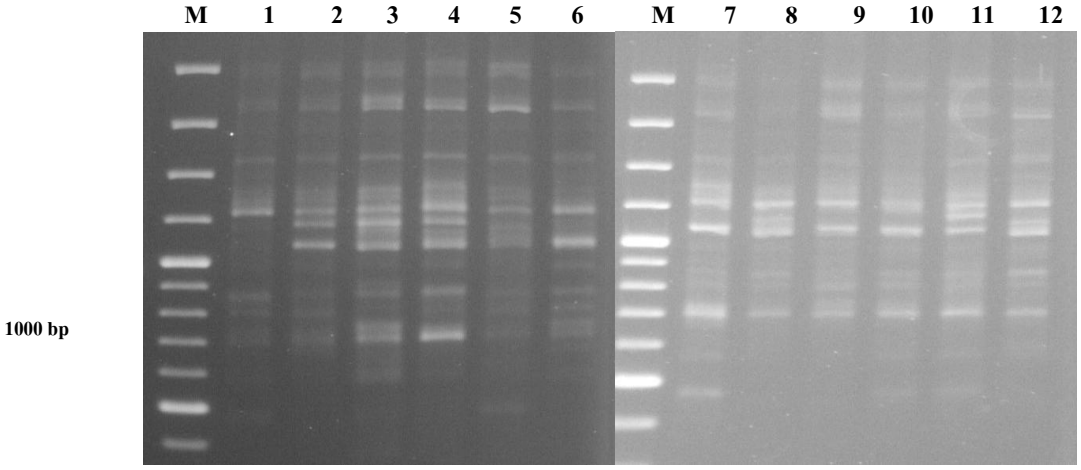
๔.๗ <u>การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ</u>

๑. ผักฮ้วน

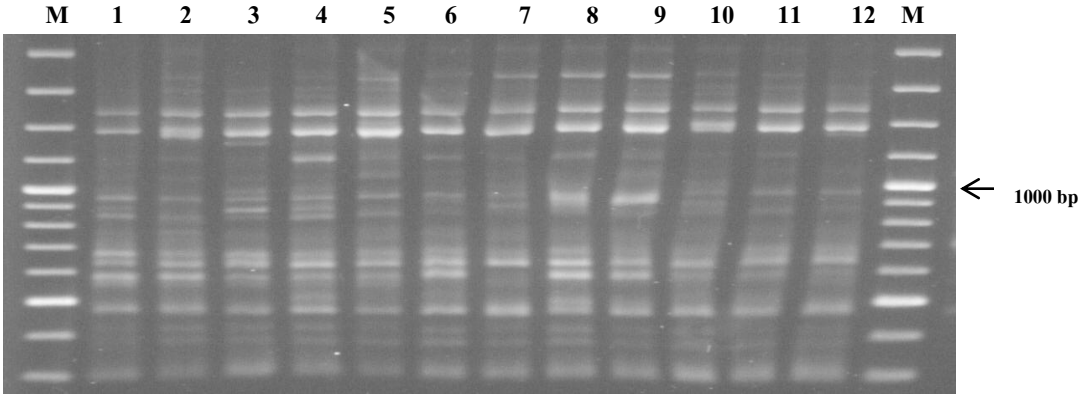
นำดีเอ็นเอของผักฮ้วนจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ UBC จำนวน ๑๐ ชนิดที่คัดเลือกจากไพร์เมอร์จำนวน ๕๐ ชนิด ซึ่งไพร์เมอร์แต่ละชนิดแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกนี้ สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มผักฮ้วนแต่ละต้นพันธุ์ว่ามีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของผักฮ้วนที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN



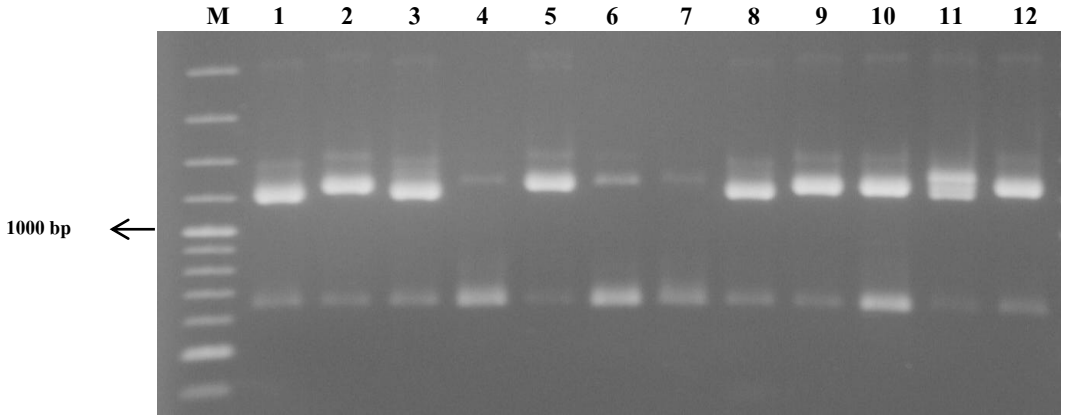
ภาพที่ ๔๑ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๐๗



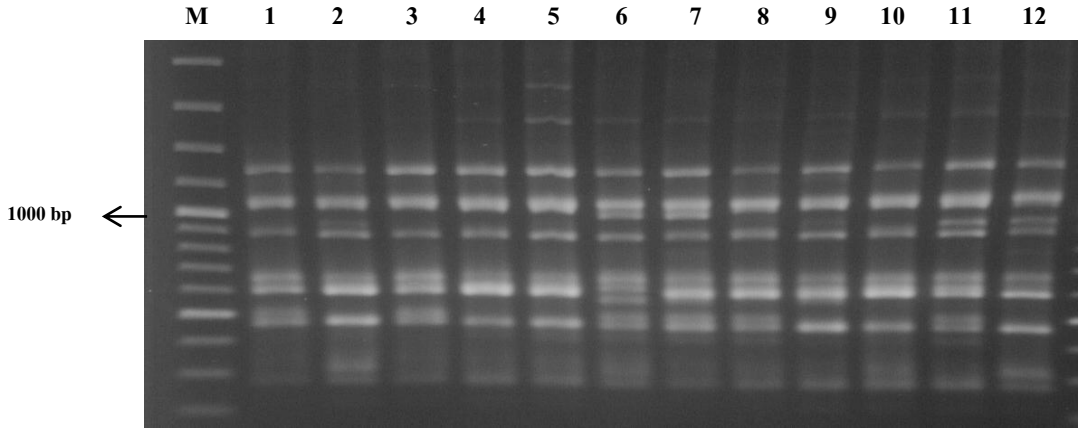
ภาพที่ ๔๒ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๐๘



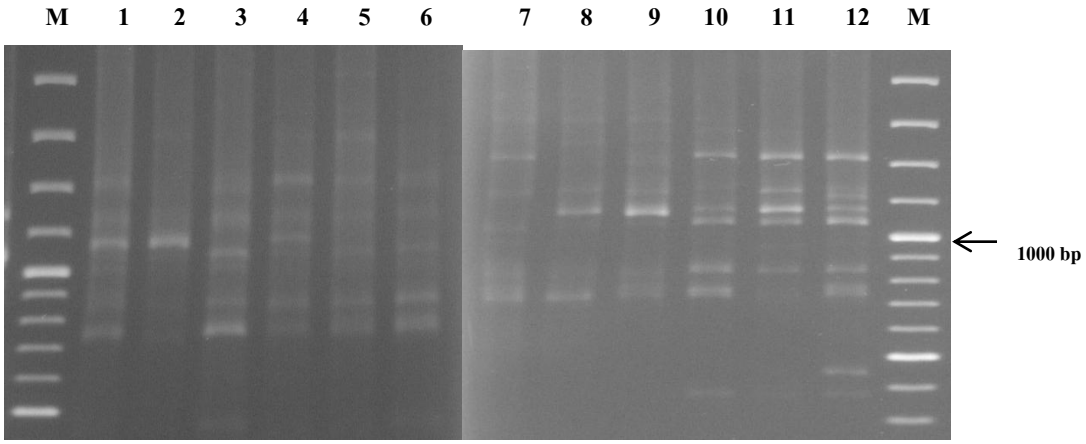
ภาพที่ ๔๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๑



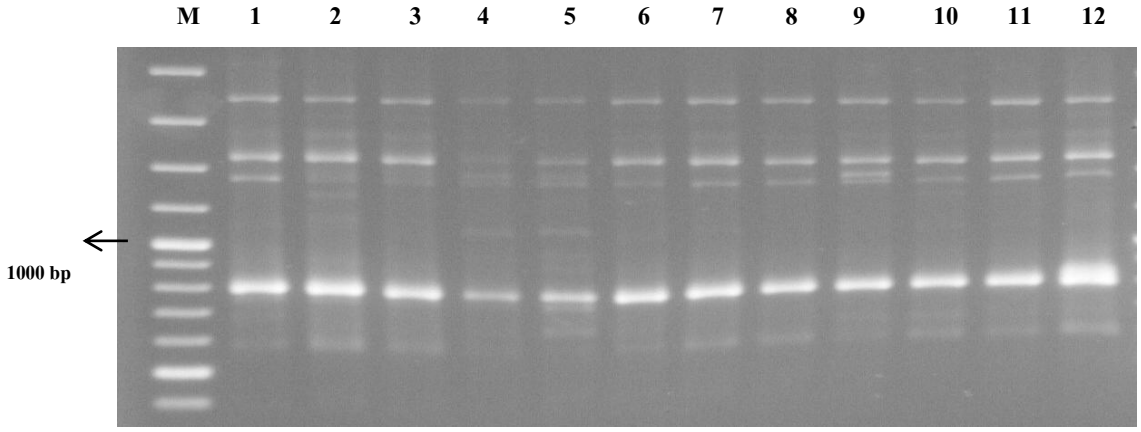
ภาพที่ ๔๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๔



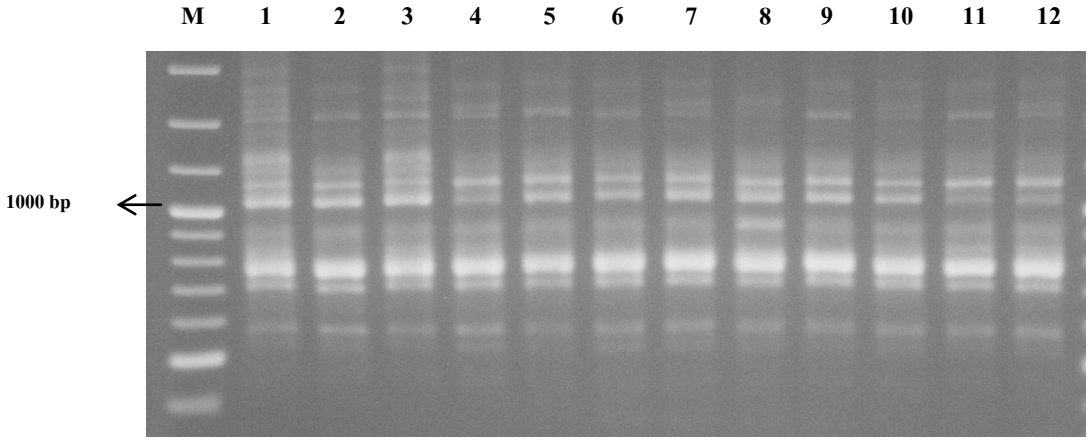
ภาพที่ ๔๕ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๕



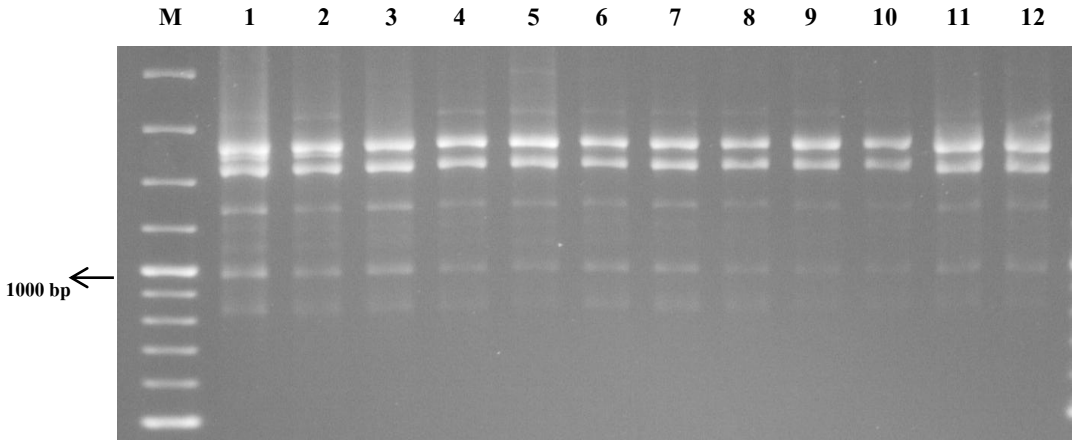
ภาพที่ ๔๖ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๐



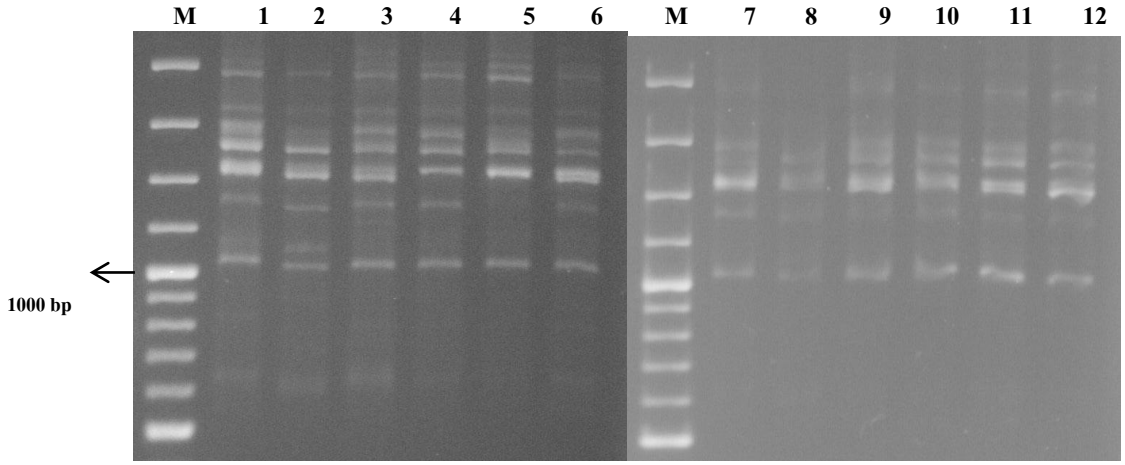
ภาพที่ ๔๗ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๕๗



ภาพที่ ๔๘ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๖๔



ภาพที่ ๔๙ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๖๖

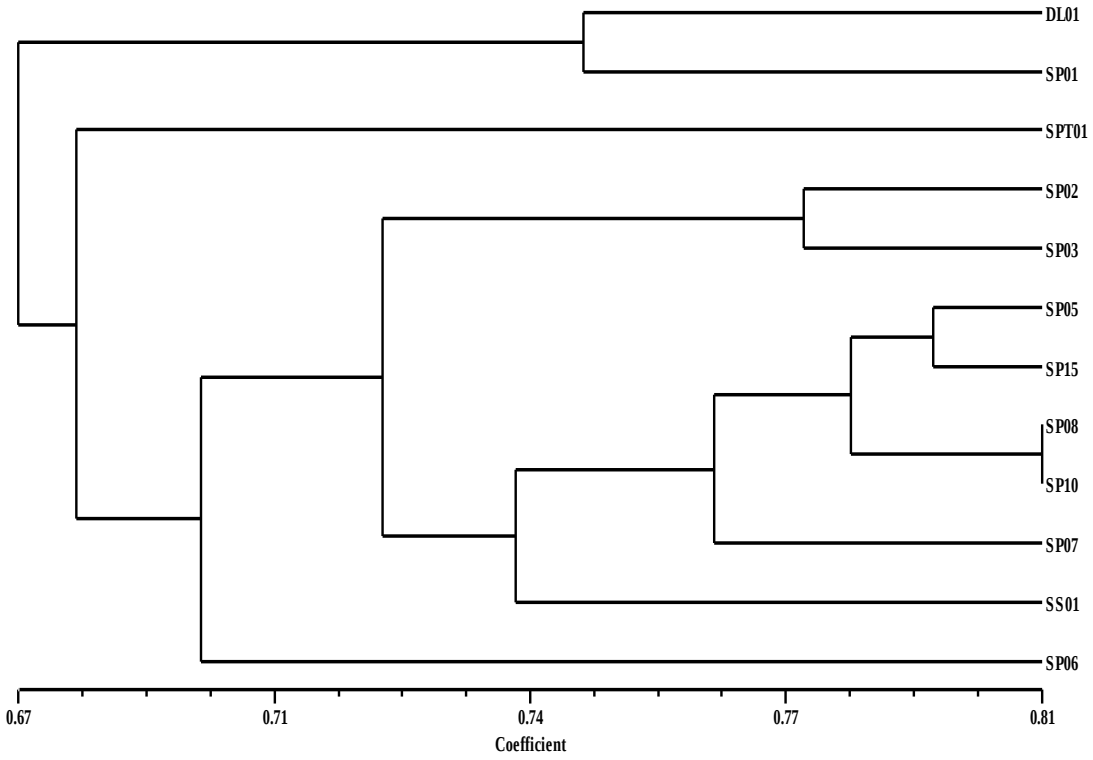


ภาพที่ ๕๐ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๘๑

ตารางที่ ๑๙ เปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วนเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ชนิดต่างๆ

ชนิดของไพร์เมอร์	จำนวนแถบรวม (Total band)	จำนวนแถบต่าง (Polymorphic band)	จำนวนแถบเหมือน (Monomorphic band)	% โพลิมอฟิซึม (% Polymorphism)
๘๐๗	๕	๓	๒	๖๐.๐๐
๘๐๘	๒๑	๑๗	๔	๘๐.๙๕
๘๑๑	๒๘	๑๙	๙	๖๗.๘๕
๘๒๔	๗	๕	๒	๗๑.๔๒
๘๒๕	๑๘	๑๓	๕	๗๒.๒๒
๘๓๐	๑๑	๙	๒	๘๑.๘๑
๘๕๗	๑๔	๘	๖	๕๗.๑๔
๘๖๔	๑๖	๗	๙	๔๓.๗๕
๘๖๖	๙	๑	๘	๑๑.๑๑
๘๘๑	๑๓	๙	๔	๖๙.๒๓
รวม	๑๔๒	๙๑	๕๑	๖๔.๐๘

จากภาพที่ ๔๑–๕๐ และตารางที่ ๑๙ การใช้ไพร์เมอร์ชนิดต่างๆจำนวน ๑๐ ชนิดได้แก่ UBC–๘๐๗ UBC–๘๐๘ UBC–๘๑๑ UBC–๘๒๔ UBC–๘๒๕ UBC–๘๓๐ UBC–๘๕๗ UBC–๘๖๔ UBC–๘๖๖ และ UBC–๘๘๑ เมื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอผักฮ้วนจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์พบว่ามีแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด ๑๔๒ แถบ เป็นแถบที่เหมือนกันจำนวน ๕๑ แถบและแถบที่ต่างกันจำนวน ๙๑ แถบ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึม (% polymorphism) เท่ากับ ๖๔.๐๘ และมีจำนวนแถบเฉลี่ย ๑๔.๒ แถบต่อไพร์เมอร์ ผลของแถบดีเอ็นเอและเปอร์เซ็นต์ความต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถบอกได้ว่า ต้นพันธุ์ผักฮ้วนมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมไม่สูงมาก เมื่อนำทุกไพร์เมอร์ มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมร่วมกันในรูปแบบ Dendrogram ค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้สามารถแสดงการจัดกลุ่มและจำแนกประชากรผักฮ้วนได้ โดยผักฮ้วนบางต้นพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากไม่สามารถแยกออกจากกันได้ขณะที่ต้นพันธุ์ผักฮ้วนที่มีความแตกต่างกันจะแยกออกจากกันให้เห็นอย่างชัดเจน

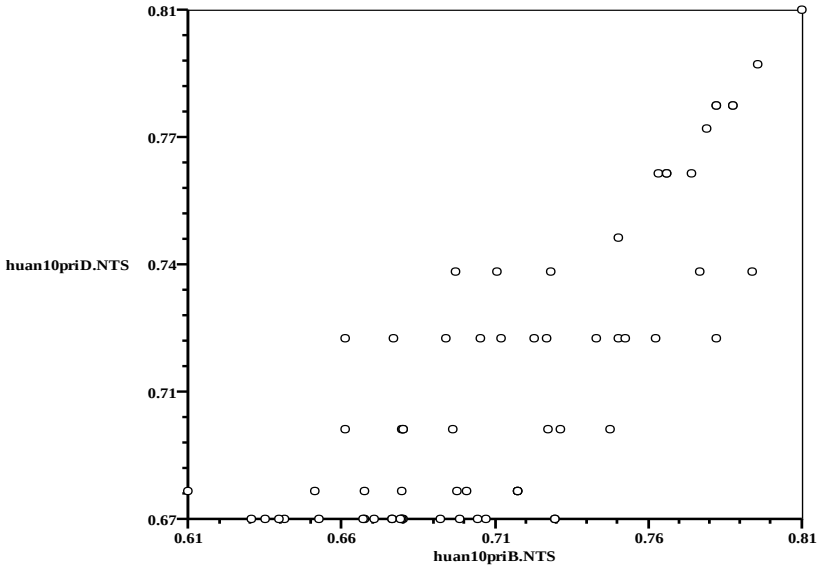


ภาพที่ ๕๑ Dendrogram ของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๐ ชนิด

ตารางที่ ๒๐ ค่า similarity matrix ของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์

	DL01	SPT01	SP01	SP02	SP03	SP05	SP06	SP07	SP08	SP10	SP15	SS01
DL01	1.000											
SPT01	0.673	1.000										
SP01	0.748	0.626	1.000									
SP02	0.637	0.697	0.664	1.000								
SP03	0.631	0.676	0.673	0.777	1.000							
SP05	0.689	0.664	0.701	0.748	0.709	1.000						
SP06	0.636	0.606	0.695	0.676	0.693	0.724	1.000					
SP07	0.663	0.647	0.676	0.673	0.691	0.761	0.728	1.000				
SP08	0.676	0.714	0.726	0.724	0.780	0.786	0.676	0.763	1.000			
SP10	0.676	0.714	0.704	0.750	0.702	0.786	0.676	0.772	0.808	1.000		
SP15	0.667	0.714	0.726	0.740	0.760	0.794	0.745	0.763	0.780	0.780	1.000	
SS01	0.649	0.694	0.676	0.720	0.657	0.725	0.657	0.694	0.708	0.775	0.792	1.000

สำหรับ Dendrogram และ ค่า similarity matrix (ภาพที่ ๕๑ และตารางที่ ๒๐)ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของผักฮ้วนจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์โดยใช้ไพร์เมอร์ ๑๐ ชนิดร่วมกันพบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง ๐.๖๗-๐.๘๑ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ผักฮ้วนจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์สามารถจัดกลุ่มและจำแนกออกจากกันได้ที่ค่าสัมประสิทธิ์ที่ ๐.๘๑ โดยผักฮ้วนแต่ละต้นพันธุ์ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์กันอย่างเด่นชัดกับพื้นที่เก็บ ยกเว้น ผักฮ้วนต้นพันธุ์ SP๐๘/CM และ SP๑๐/CM ที่แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมและไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ ๐.๘๑ ซึ่งเป็นไปได้ว่าทั้งสองตัวอย่างอาจมีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมในเชิงเครือญาติหรือมีการพัฒนามาจากสายต้นเดียวกัน เพราะต้นพันธุ์ทั้งสองต้นมาจากพื้นที่เก็บเดียวกันแต่ต่างสวนคือที่สวนเกษตรกร ๒ แห่งในตำบลสารภี จังหวัดเชียงใหม่ แล้วทั้งสองต้นยังมีความสัมพันธ์กันใกล้ชิดกับกับผักฮ้วนต้นพันธุ์ SP๐๕/CM และ SP๑๕/CM ซึ่งเป็นต้นพันธุ์ที่เก็บมาจากพื้นที่ใกล้เคียงกัน ส่วนต้นพันธุ์อื่นมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมกันแต่อยู่ในระดับปานกลาง ดังแสดงตามภาพที่ ๕๑

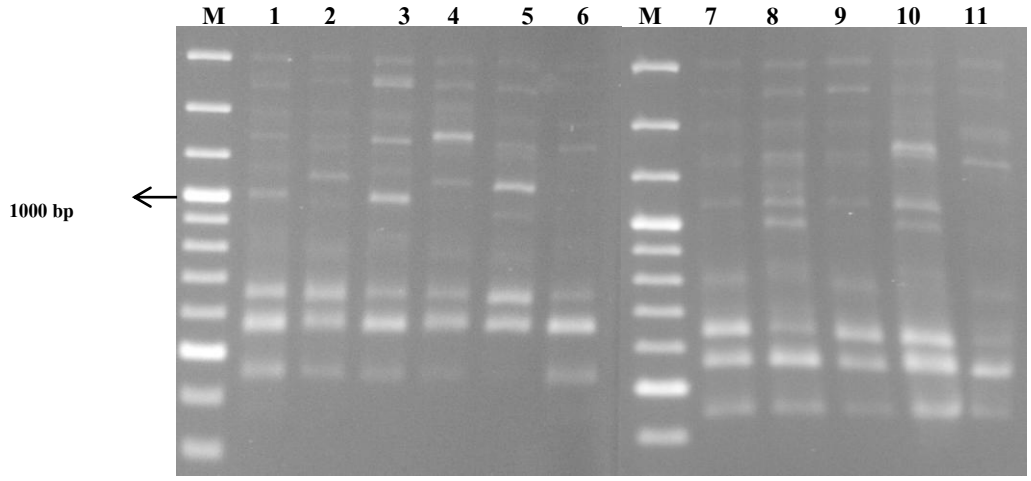


ภาพที่ ๕๒ Cophenetic Correlation ของผักฮ้วน ๑๒ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๐ ชนิด

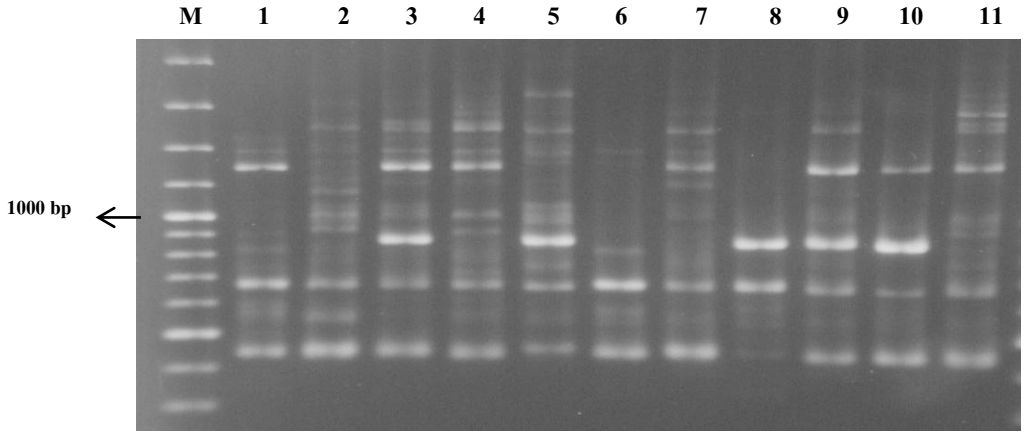
จากภาพที่ ๕๒ เป็นค่าสหสัมพันธ์ (Cophenetic Correlation (r)) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการกระจายข้อมูลแถบดีเอ็นเอของผักฮ้วนจำนวน ๑๒ ต้นพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ ๑๐ ชนิด ซึ่งมีค่า Cophenetic Correlation (r) เท่ากับ ๐.๗๙๘๐๘ โดย Cophenetic Correlation (r) ที่มีค่าค่อนข้างสูงบ่งบอกถึงการกระจายของข้อมูลดีเอ็นเอที่ดีและมีความน่าเชื่อถือสูง

๒. ผักเชียงดา

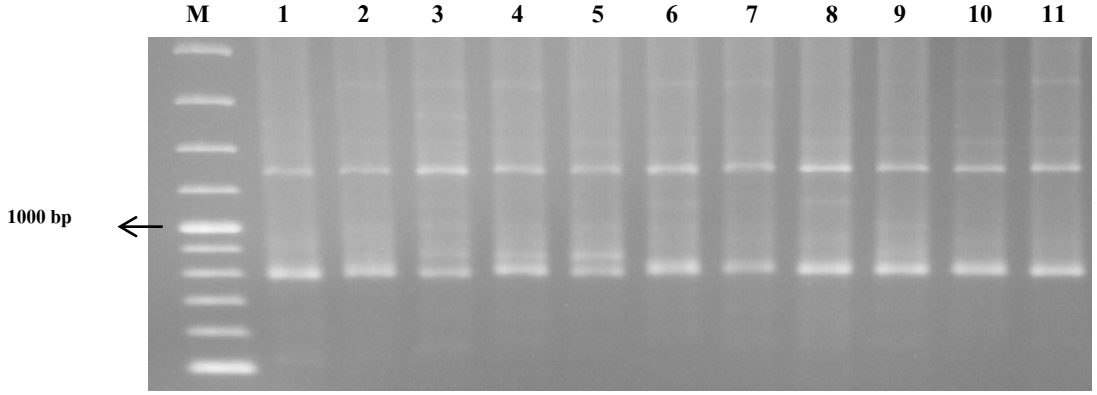
นำดีเอ็นเอของผักเชียงดาจำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ UBC จำนวน ๑๒ ชนิดที่คัดเลือกจากไพร์เมอร์จำนวน ๕๐ ชนิด ซึ่งไพร์เมอร์แต่ละชนิดแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกนี้สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มผักเชียงดาแต่ละต้นพันธุ์จากแต่ละพื้นที่ ว่ามีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของผักเชียงดาที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN



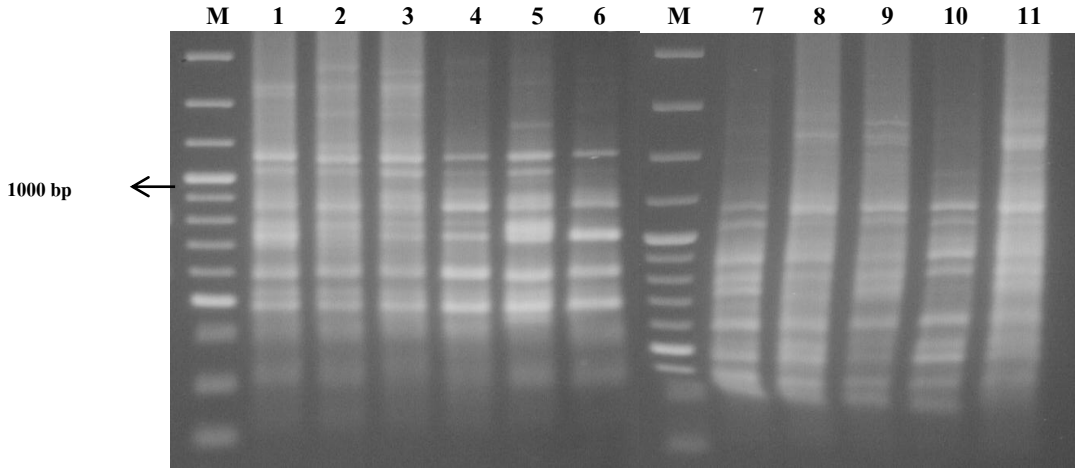
ภาพที่ ๕๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๐



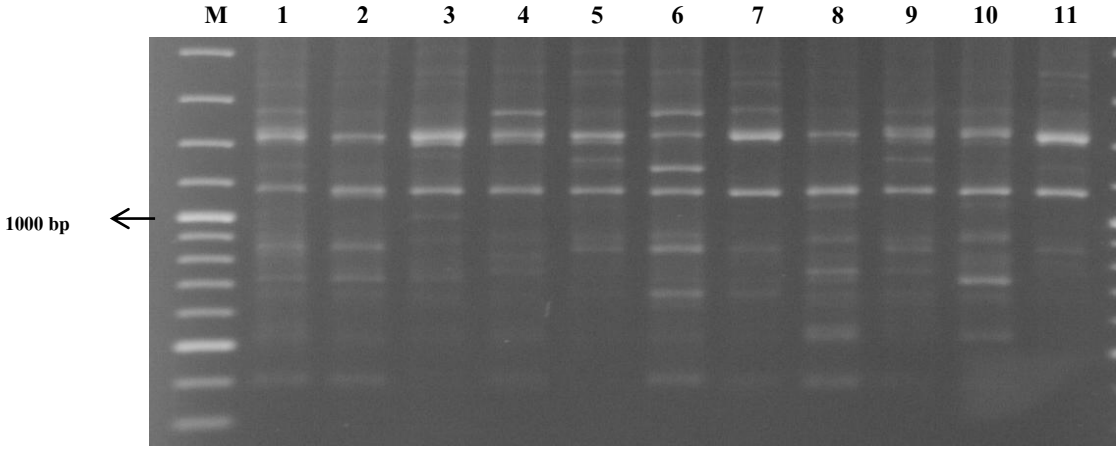
ภาพที่ ๕๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๑



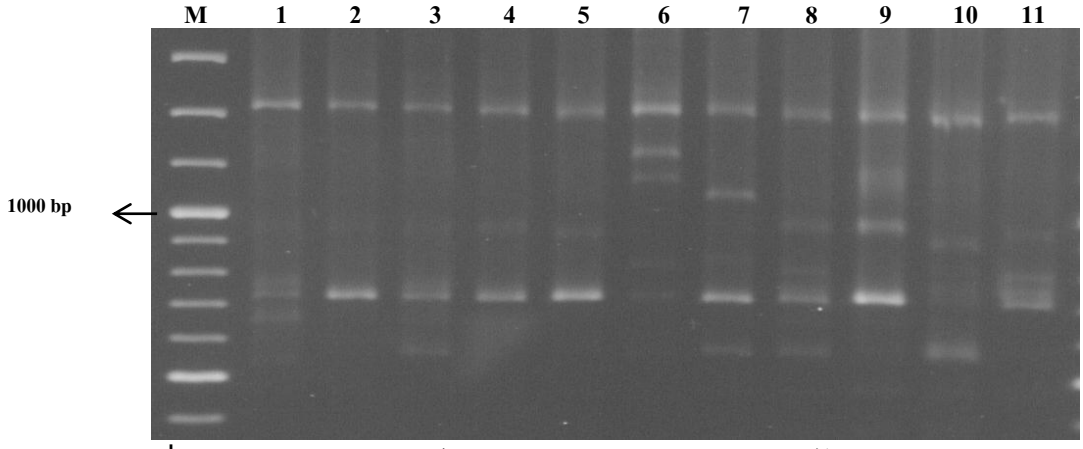
ภาพที่ ๕๕ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๘



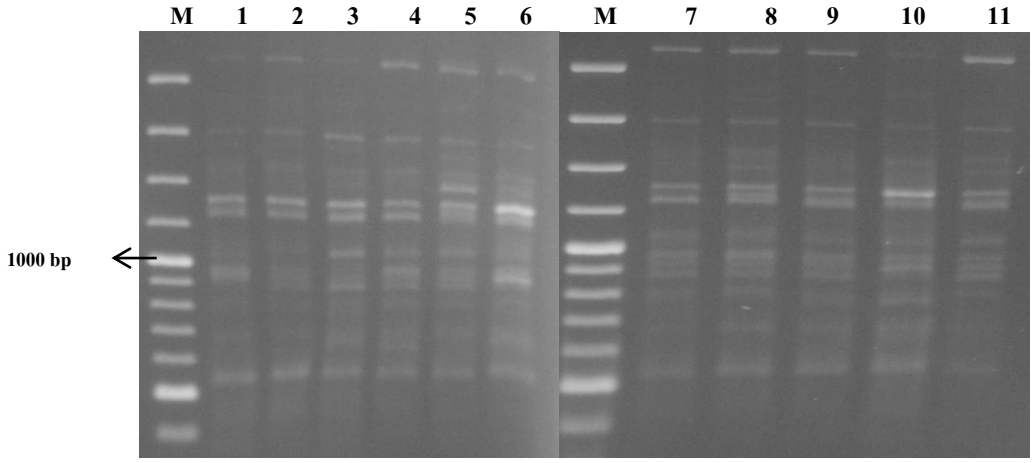
ภาพที่ ๕๖ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๖



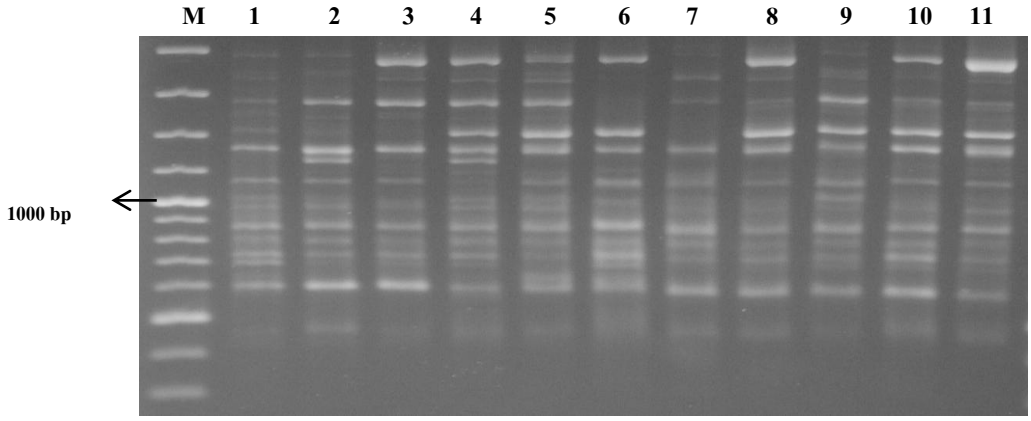
ภาพที่ ๕๗ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๗



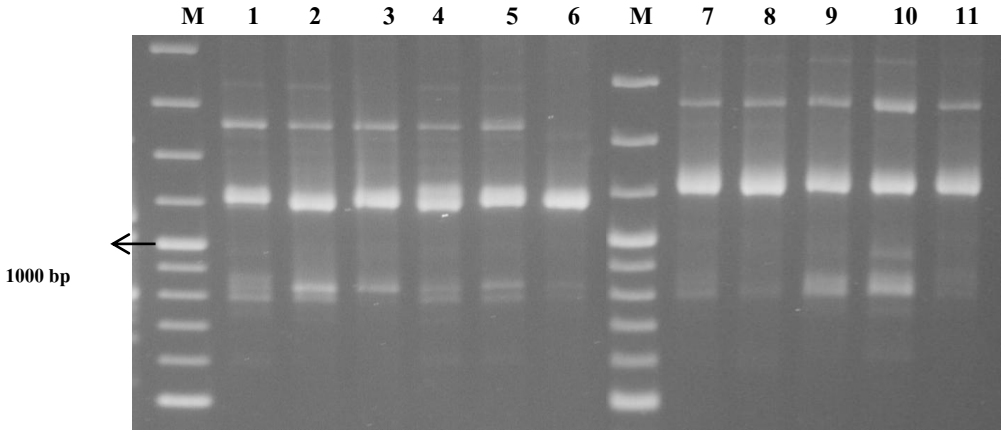
ภาพที่ ๕๘ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๐



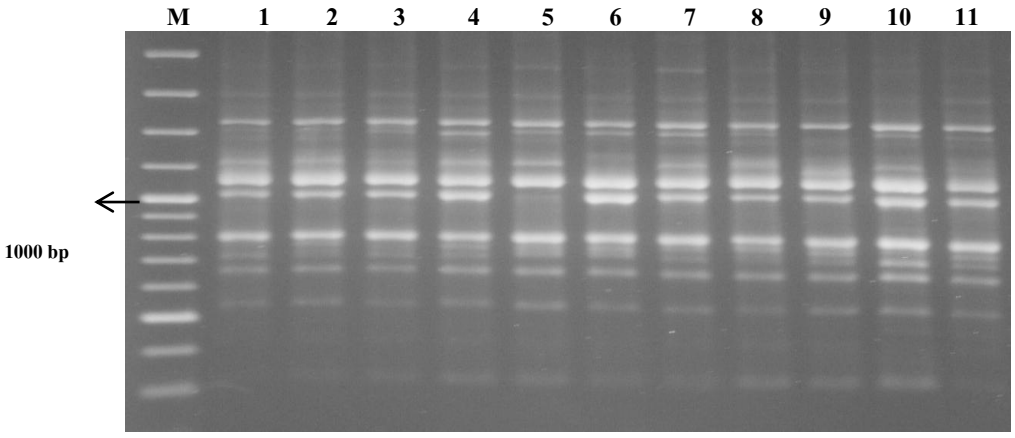
ภาพที่ ๕๙ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๔



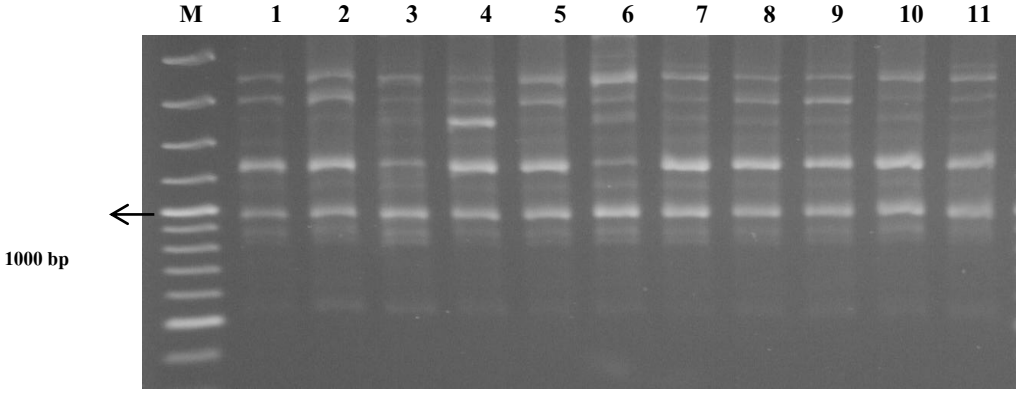
ภาพที่ ๖๐ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๕



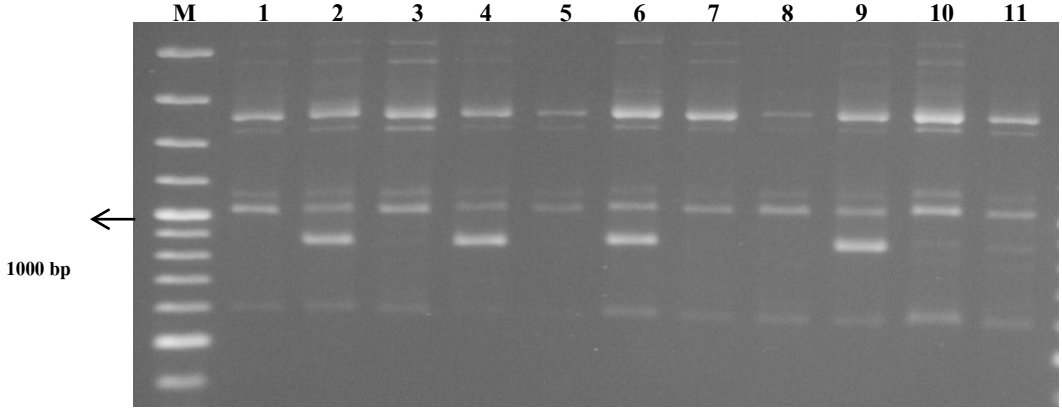
ภาพที่ ๖๑ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๕๗



ภาพที่ ๖๒ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๖๔



ภาพที่ ๖๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๖๖

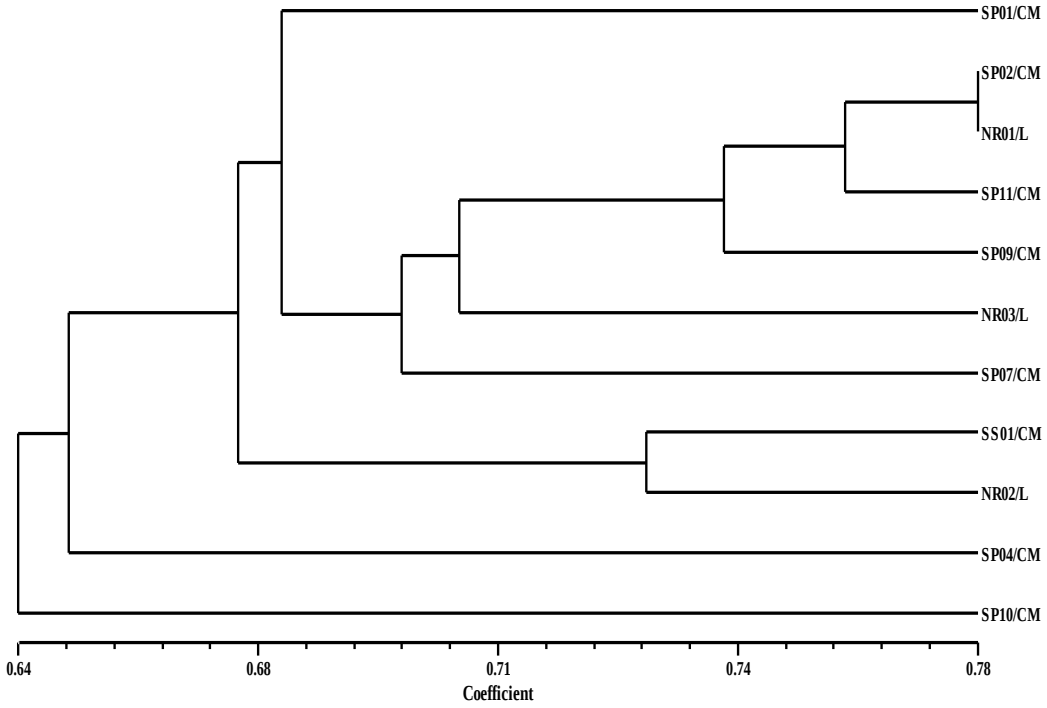


ภาพที่ ๖๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๘๑

ตารางที่ ๒๑ เปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของผักเชียงดา เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ชนิดต่างๆ

ชนิดของไพร์เมอร์	จำนวนแถบรวม (Total band)	จำนวนแถบต่าง (Polymorphic band)	จำนวนแถบเหมือน (Monomorphic band)	% โพลิมอฟิซึม (% Polymorphism)
๘๑๐	๒๑	๑๗	๔	๘๐.๙๕
๘๑๑	๒๓	๒๑	๒	๙๑.๓๐
๘๑๘	๑๑	๖	๕	๕๔.๕๔
๘๒๖	๒๐	๑๒	๘	๖๐.๐๐
๘๒๗	๒๑	๑๕	๖	๗๑.๔๒
๘๓๐	๑๖	๑๔	๒	๘๗.๕๐
๘๓๔	๑๘	๘	๑๐	๔๔.๔๔
๘๓๕	๒๐	๑๔	๖	๗๐.๐๐
๘๕๗	๑๒	๙	๓	๗๕.๐๐
๘๖๔	๑๘	๘	๑๐	๔๔.๔๔
๘๖๖	๑๖	๗	๙	๔๓.๗๕
๘๘๑	๑๓	๘	๕	๖๑.๕๓
รวม	๒๐๙	๑๓๙	๗๐	๖๖.๕๐

จากภาพที่ ๕๓–๖๔ และ ตารางที่ ๒๑ การใช้ไพร์เมอร์ชนิดต่างๆจำนวน ๑๒ ชนิดได้แก่ UBC–๘๑๐ UBC–๘๑๑ UBC–๘๑๘ UBC–๘๒๖ UBC–๘๒๗ UBC–๘๓๐ UBC–๘๓๔ UBC–๘๓๕ UBC–๘๕๗ UBC–๘๖๔ UBC–๘๖๖ และ UBC–๘๘๑ เมื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอผักเชียงดา จำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์พบว่า มีแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด ๒๐๙ แถบ เป็นแถบที่เหมือนกันจำนวน ๗๐ แถบ และแถบที่ต่างกันจำนวน ๑๓๙ แถบ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึม (% polymorphism) เท่ากับ ๖๖.๕๐ และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอต่อไพร์เมอร์เท่ากับ ๑๗.๔๑ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพร์เมอร์สามารถบ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของผักเชียงดาได้ ผลจากจำนวนแถบดีเอ็นเอและเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมพบว่า ต้นพันธุ์เชียงดามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลางไม่สูงมาก



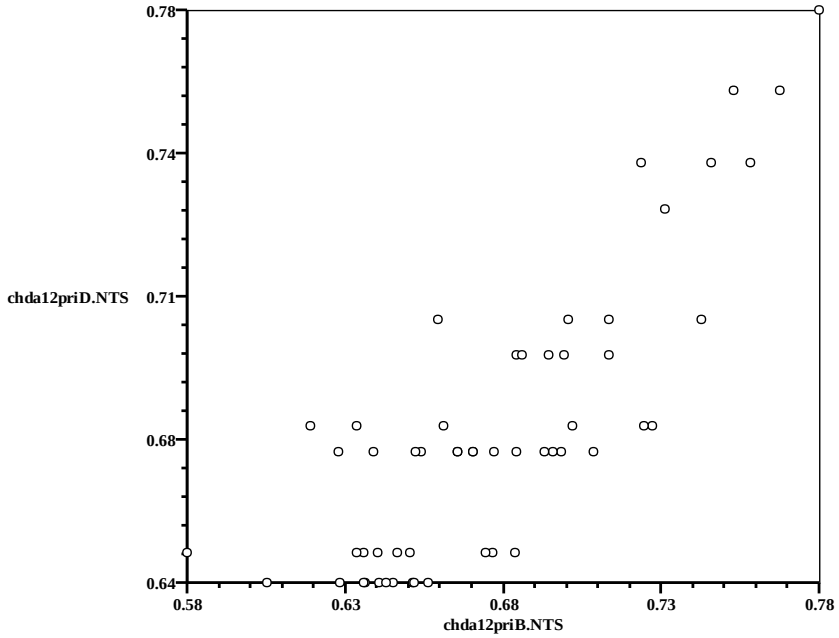
ภาพที่ ๖๕ Dendrogram ของผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๒ ชนิด

ตารางที่ ๒๒ ค่า similarity matrix ของผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์

	SP01	SP02	SP04	SP07	SP09	SP10	SP11	SS01	NR01	NR02	NR03
SP01	1.000										
SP02	0.727	1.000									
SP04	0.642	0.677	1.000								
SP07	0.621	0.699	0.648	1.000							
SP09	0.662	0.723	0.638	0.713	1.000						
SP10	0.642	0.647	0.608	0.638	0.638	1.000					
SP11	0.724	0.766	0.684	0.685	0.745	0.630	1.000				
SS01	0.641	0.678	0.652	0.630	0.708	0.653	0.655	1.000			
NR01	0.702	0.778	0.675	0.686	0.757	0.644	0.752	0.699	1.000		
NR02	0.671	0.654	0.635	0.667	0.667	0.658	0.671	0.730	0.685	1.000	
NR03	0.635	0.660	0.583	0.695	0.741	0.653	0.701	0.696	0.713	0.693	1.000

สำหรับภาพที่ ๖๕ และตารางที่ ๒๒ Dendrogram และค่า similarity matrix ของผักเชียงดา ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของผักเชียงดา จำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์โดยใช้ไพร์เมอร์ ๑๒ ชนิดร่วมกัน จากภาพแสดงถึงผักเชียงดาแต่ต้นละพันธุ์ที่โดยสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง ๐.๖๔-๐.๗๘

ซึ่งผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ผักเชียงดาจำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์สามารถจัดกลุ่มและจำแนกออกจากกันได้ที่ค่าสัมประสิทธิ์ที่ ๐.๗๘ โดยผักเชียงดาแต่ละต้นพันธุ์ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์กันอย่างเด่นชัดกับพื้นที่เก็บ ผักเชียงดา จำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมไม่มาก โดยพบว่า ต้นพันธุ์ SP๐๒/CM และ NR๐๑/L ซึ่งเก็บมาจากต่างพื้นที่แต่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ที่สัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ ๐.๗๘ ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าผักเชียงดาทั้งสองต้นพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมหรือมีความใกล้ชิดกันทางเครือญาติ ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เพราะอาจพัฒนามาจากสายต้นเดียวกันแล้วมีการกระจายพันธุ์ไปยังพื้นที่ต่างๆ สำหรับในส่วนของลักษณะใบที่มีความแตกต่างกันระหว่างใบรีอ้วนและใบรียาวพบว่าต้นพันธุ์ที่มีใบรียาวมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้แก่ ต้นพันธุ์ SS๐๑/CM และ NR๐๒/L ที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันขณะที่ SP๑๐/CM และ SP๐๔/CM ที่เป็นใบรียาวเหมือนกันต่างก็แยกกลุ่มออกมาจากต้นพันธุ์อื่น

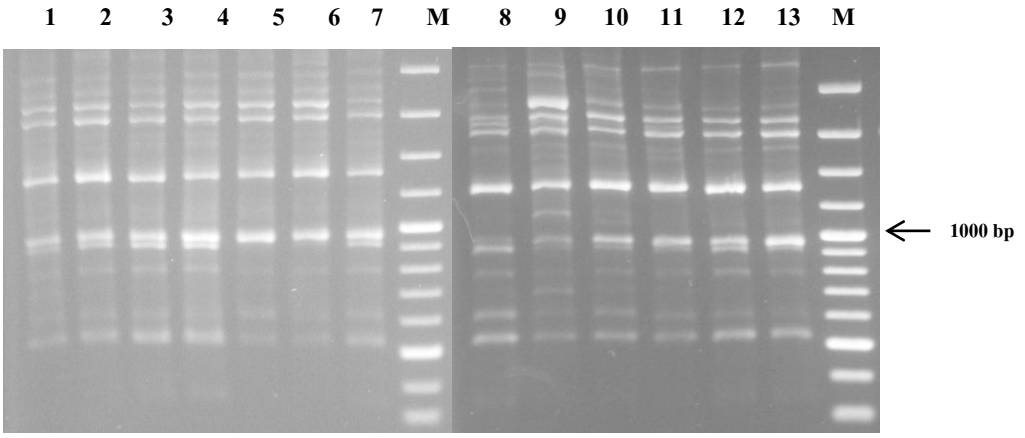


ภาพที่ ๖๖ Cophenetic Correlation ของผักเชียงดา ๑๑ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๒ ชนิด

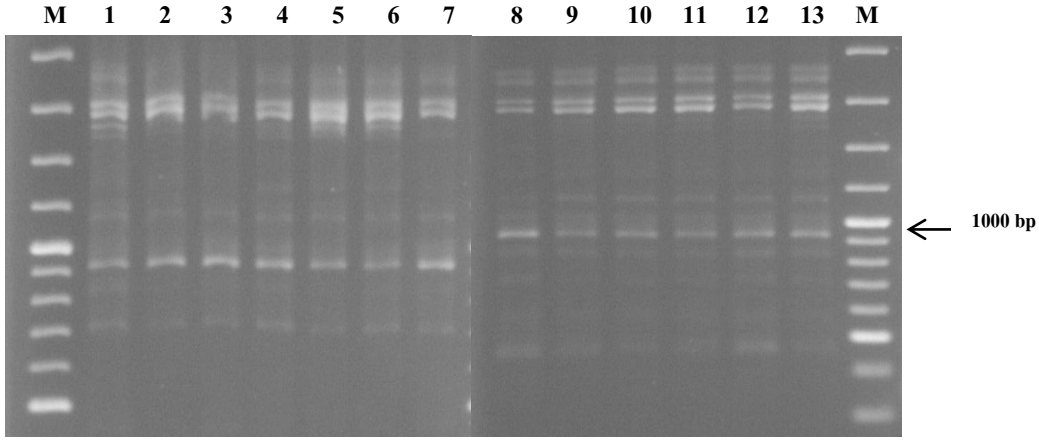
จากภาพที่ ๖๖ เป็นค่าสหสัมพันธ์ (Cophenetic Correlation (r)) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการกระจายข้อมูลแถบดีเอ็นเอของผักเชียงดา จำนวน ๑๑ ต้นพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ ๑๒ ชนิด ซึ่งมีค่า Cophenetic Correlation (r) เท่ากับ ๐.๘๒๑๒๔ แสดงถึงการกระจายข้อมูลดีเอ็นเอของผักเชียงดา ดีมากและมีความน่าเชื่อถือสูง

๓. ถั่วแปบ

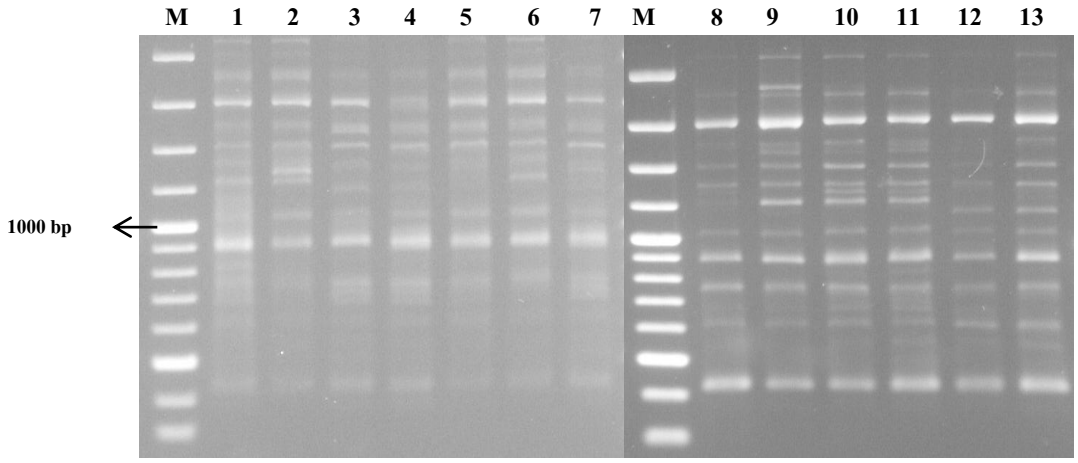
นำดีเอ็นเอของถั่วแปบจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ UBC จำนวน ๘ ชนิดที่คัดเลือกจากไพร์เมอร์จำนวน ๕๐ ชนิด ซึ่งไพร์เมอร์แต่ละชนิดแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกนี้สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มถั่วแปบแต่ละต้นพันธุ์จากแต่ละแหล่งว่ามีความคล้ายคลึงกัน หรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของถั่วแปบที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN



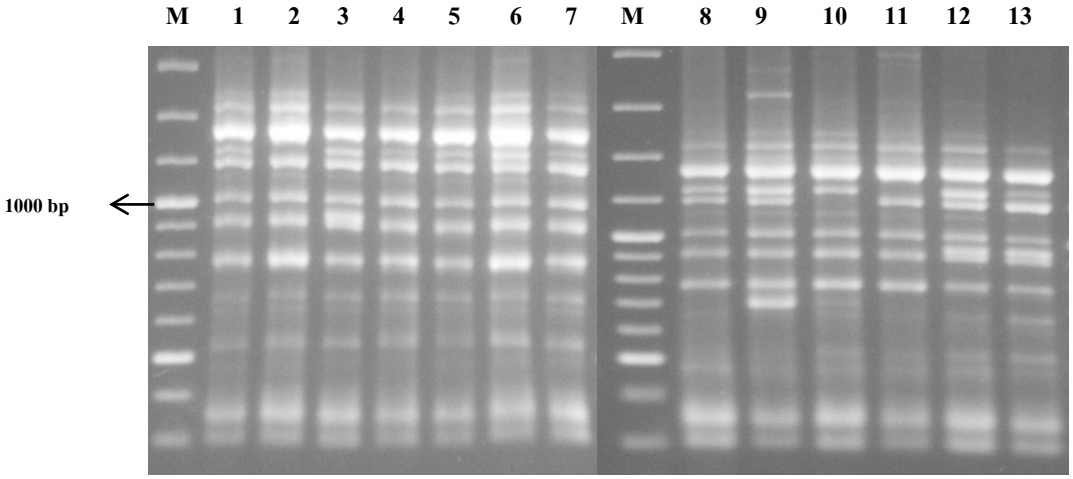
ภาพที่ ๖๗ รูปแบบแถบดีเอ็นเอถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๐๘



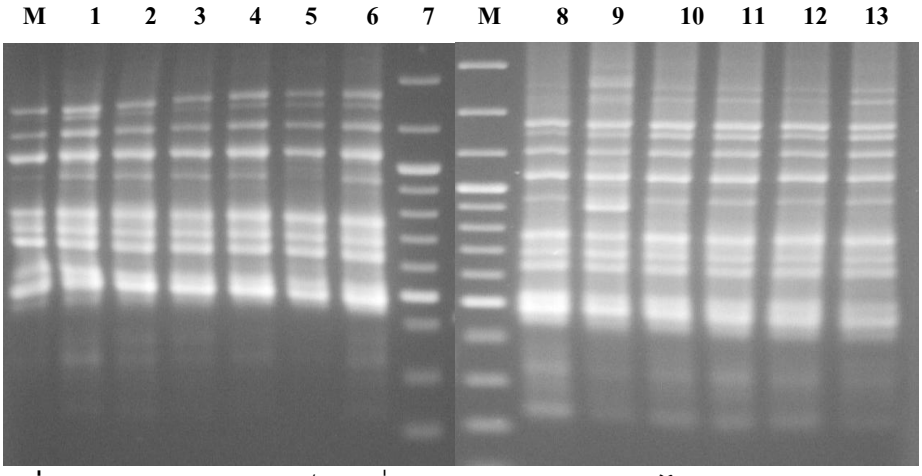
ภาพที่ ๖๘ รูปแบบแถบดีเอ็นเอถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๐๙



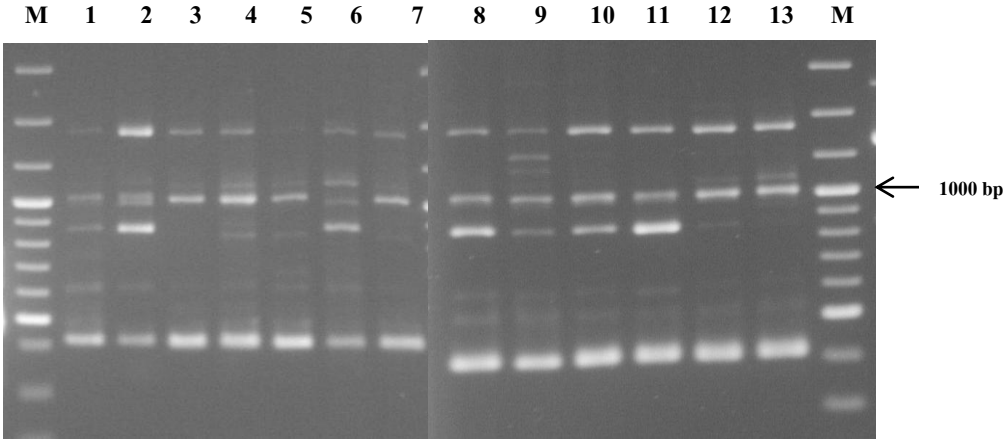
ภาพที่ ๖๙ รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๑๐



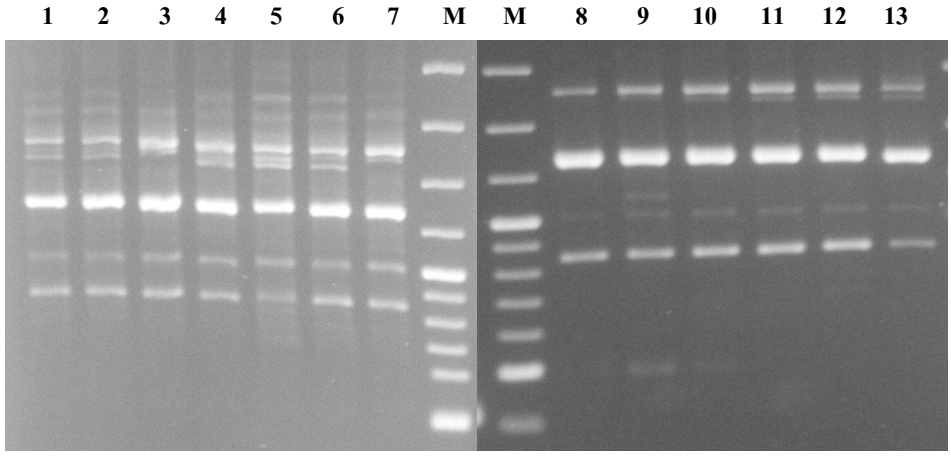
ภาพที่ ๗๐ รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๕



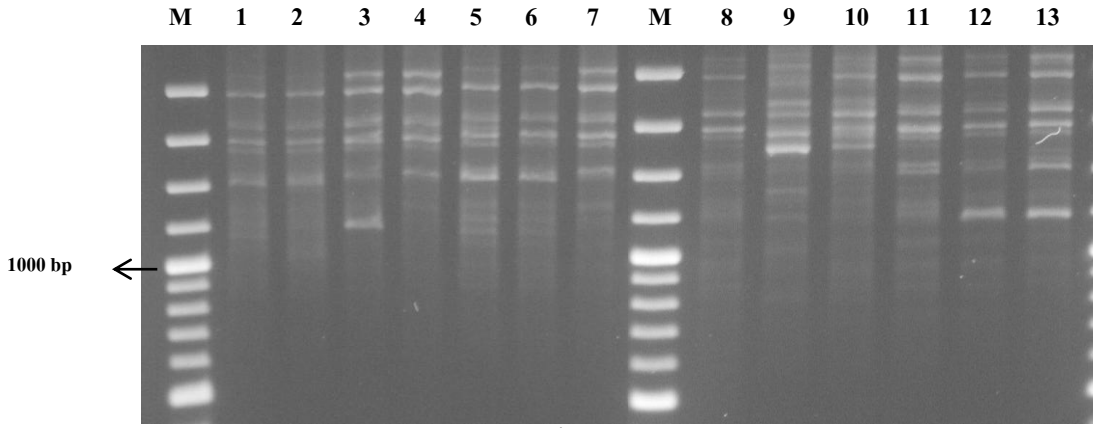
ภาพที่ ๗๑ รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๒๖



ภาพที่ ๗๒ รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๓๕



ภาพที่ ๗๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๘๐

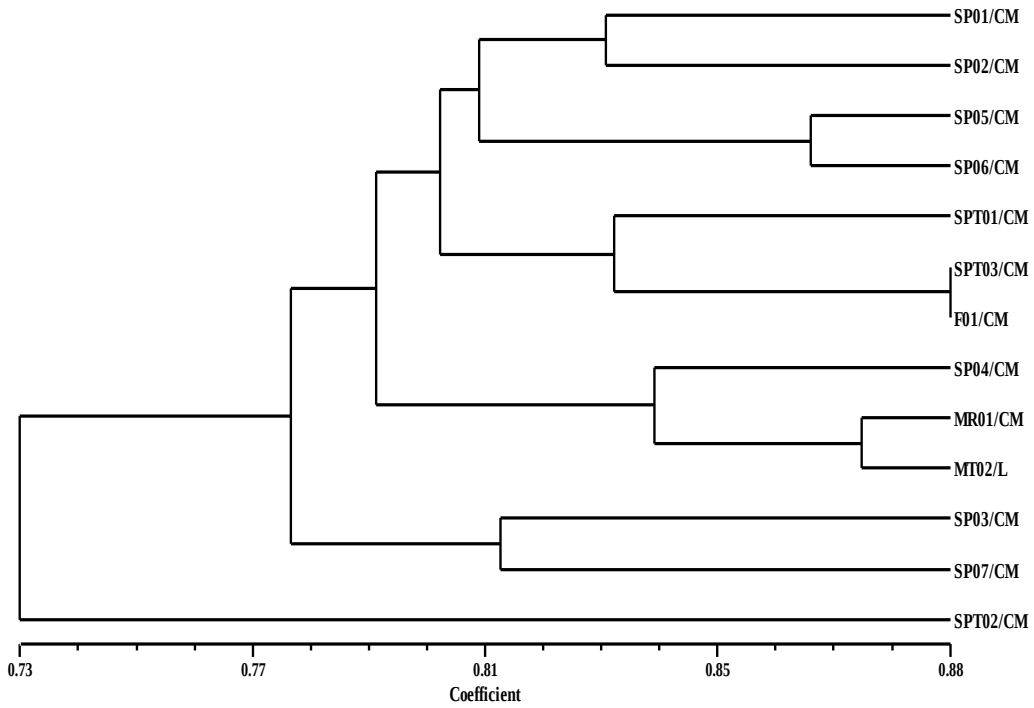


ภาพที่ ๗๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC–๘๘๑

ตารางที่ ๒๓ เปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ชนิดต่างๆ

ชนิดของไพร์เมอร์	จำนวนแถบรวม (Total band)	จำนวนแถบต่าง (Polymorphic band)	จำนวนแถบเหมือน (Monomorphic band)	% โพลิมอฟิซึม (% Polymorphism)
๘๐๘	๑๖	๗	๙	๔๓.๗๕
๘๐๙	๑๓	๕	๘	๓๘.๔๖
๘๑๐	๒๒	๑๑	๑๑	๕๐.๐๐
๘๒๕	๑๖	๘	๘	๕๐.๐๐
๘๒๖	๑๖	๘	๘	๕๐.๐๐
๘๓๕	๑๕	๑๑	๔	๗๓.๓๓
๘๘๐	๗	๓	๔	๔๒.๘๕
๘๘๑	๒๐	๑๒	๘	๖๐.๐๐
รวม	๑๒๕	๖๕	๖๐	๕๒.๐๐

จากภาพที่ ๖๗–๗๔ และตารางที่ ๒๓ การใช้ไพร์เมอร์ชนิดต่างๆจำนวน ๘ ชนิดได้แก่ UBC–๘๐๘ UBC–๘๐๙ UBC–๘๑๐ UBC–๘๒๕ UBC–๘๒๖ UBC–๘๓๕ UBC–๘๘๐ และ UBC–๘๘๑ เมื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอถั่วแปบจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์พบว่า มีแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด ๑๒๕ แถบ เป็นแถบที่เหมือนกันจำนวน ๖๐ แถบและแถบที่ต่างกันจำนวน ๖๕ แถบ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึม (% polymorphism) เท่ากับ ๕๒.๐๐ จำนวนแถบต่อไพร์เมอร์เท่ากับ ๑๕.๖๒ แถบ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพร์เมอร์สามารถบ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วแปบได้ เมื่อนำทุกไพร์เมอร์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมร่วมกัน พบว่า ฝักถั่วแปบมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ



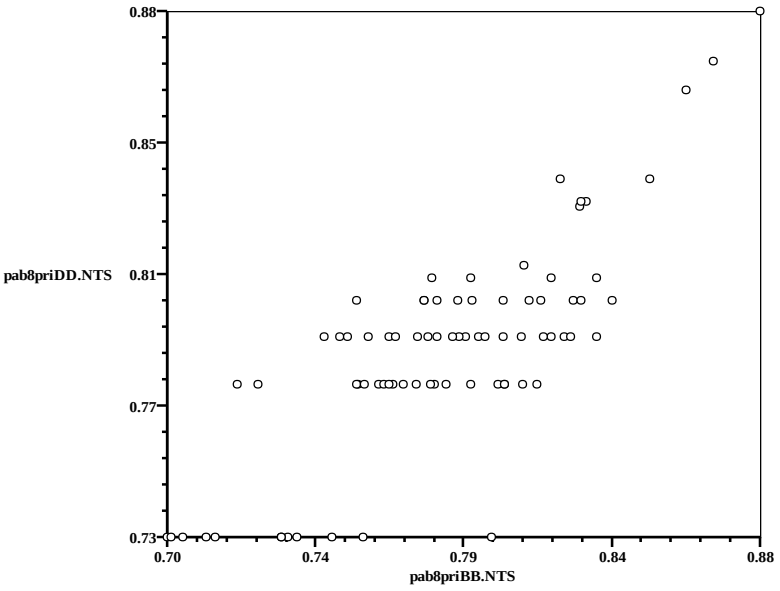
ภาพที่ ๗๕ Dendrogram ของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๘ ชนิด

ตารางที่ ๒๔ ค่า similarity matrix ของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์

	SP01	SP02	SP03	SP04	SP05	SP06	SP07	SPT01	SPT02	SPT03	F01	MR01	MT02
SP01	1.000												
SP02	0.828	1.000											
SP03	0.804	0.777	1.000										
SP04	0.823	0.796	0.802	1.000									
SP05	0.819	0.781	0.758	0.833	1.000								
SP16	0.794	0.833	0.720	0.792	0.862	1.000							
SP07	0.758	0.760	0.811	0.810	0.786	0.782	1.000						
SPT01	0.826	0.789	0.804	0.768	0.779	0.758	0.794	1.000					
SPT02	0.710	0.713	0.698	0.703	0.736	0.734	0.734	0.760	1.000				
SPT03	0.812	0.779	0.765	0.783	0.804	0.783	0.766	0.830	0.800	1.000			
F01	0.828	0.794	0.772	0.825	0.838	0.816	0.781	0.828	0.750	0.885	1.000		
MR01	0.798	0.748	0.814	0.850	0.790	0.752	0.769	0.780	0.739	0.804	0.819	1.000	
MT02	0.788	0.755	0.768	0.822	0.816	0.777	0.726	0.770	0.699	0.761	0.810	0.870	1.000

สำหรับภาพที่ ๗๕ และตารางที่ ๒๔ Dendrogram และค่า similarity matrix ของถั่วแปบที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์โดยใช้ไพร์เมอร์ ๘ ชนิด

ร่วมกันพบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง ๐.๗๓–๐.๘๘ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ถั่วแปบจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ และสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ได้พบว่า ถั่วแปบทั้ง ๑๓ ต้นพันธุ์สามารถจัดกลุ่มความใกล้ชิดกันได้คือกลุ่มที่๑ ต้นพันธุ์ SP๐๑/CM และ SP๐๒/CM ที่มีลักษณะฝักกลมเล็กและยาวเหมือนกัน กลุ่มที่ ๒ ต้นพันธุ์ SP๐๕/CM และ SP๐๖/CM กลุ่มที่ ๓ ได้แก่ SPT๐๑/CM SPT๐๓/CM และ F๐๑/CM ที่มีลักษณะฝักแบนเหมือนกัน โดยเฉพาะ SPT๐๓/CM และ F๐๑/CM ที่ไม่สามารถแยกจากกันได้ที่ค่าสัมประสิทธิ์ ๐.๘๘ โดยกลุ่มที่ ๔ SP๐๔/CM MR๐๑/CM และ MT๐๒/L ที่มีลักษณะฝักแบนเหมือนกัน ขณะที่ SP๐๓/CM SP๐๗/CM และ SPT๐๒/CM ซึ่งมีลักษณะของฝักแตกต่างกันจึงมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน สำหรับสีของดอกไม่สามารถแยกความแตกต่างกันได้อย่างเด่นชัด

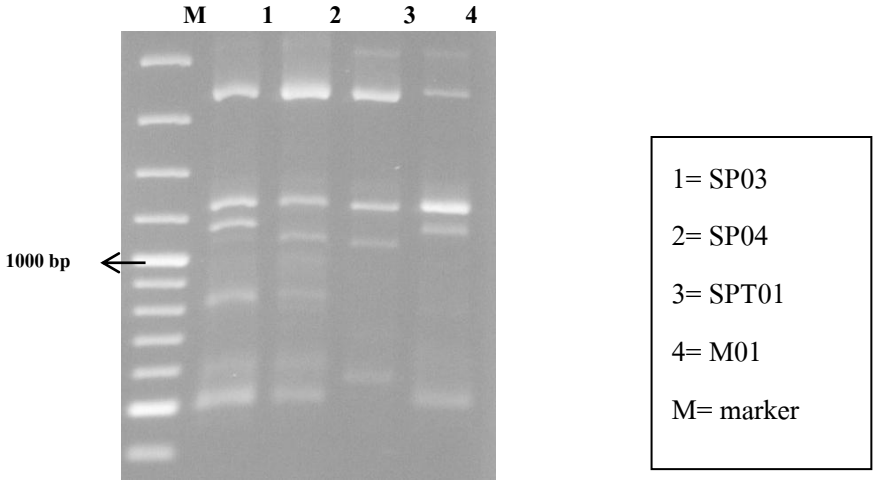


ภาพที่ ๗๖ Cophenetic Correlation ของถั่วแปบ ๑๓ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๘ ชนิด

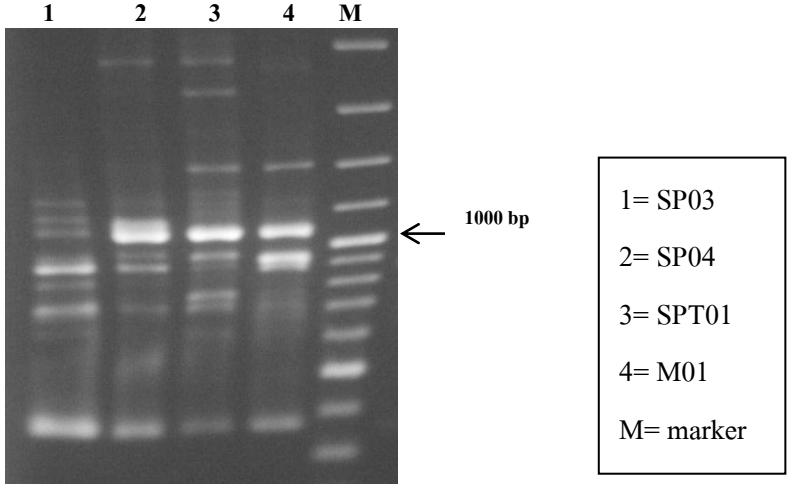
จากภาพที่ ๗๖ เป็นค่าสหสัมพันธ์ (Cophenetic Correlation (r)) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการกระจายข้อมูลแถบดีเอ็นเอของถั่วแปบจำนวน ๑๓ ต้นพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ ๘ ชนิดซึ่งมีค่า Cophenetic Correlation (r) เท่ากับ ๐.๗๙๘๑๑ แสดงว่ามีกระจายของข้อมูลดีเอ็นเอถั่วแปบที่ดีและมีความน่าเชื่อถือสูง

๔. เพกา

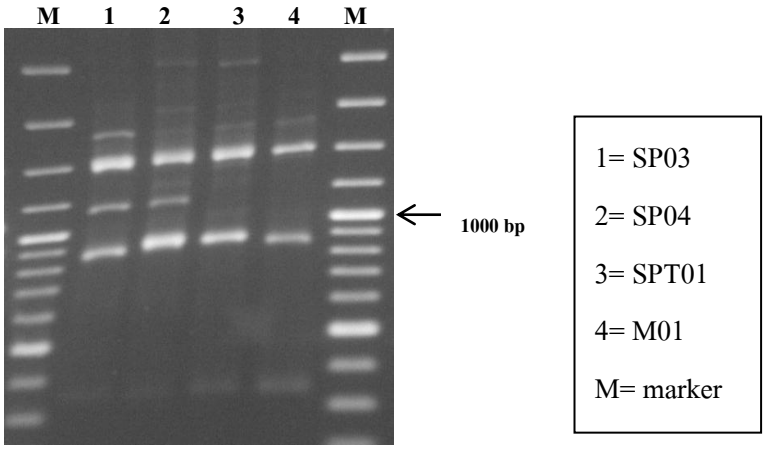
นำดีเอ็นเอของเพกาจำนวน ๔ ต้นพันธุ์มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ UBC จำนวน ๑๑ ชนิดที่คัดเลือกจากไพร์เมอร์จำนวน ๕๐ ชนิด ซึ่งไพร์เมอร์แต่ละชนิดแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบโดยมีทั้งแถบที่เหมือนกันและแถบที่แตกต่างกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกนี้สามารถนำไปใช้จัดกลุ่มเพกาแต่ละต้นพันธุ์จากแต่ละแหล่งว่ามีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากหรือน้อย โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้าย คลึงกันทางพันธุกรรมของเพกาที่แสดงในรูปแบบของ Dendrogram ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard และจัดกลุ่มโดยวิธีของ SAHN



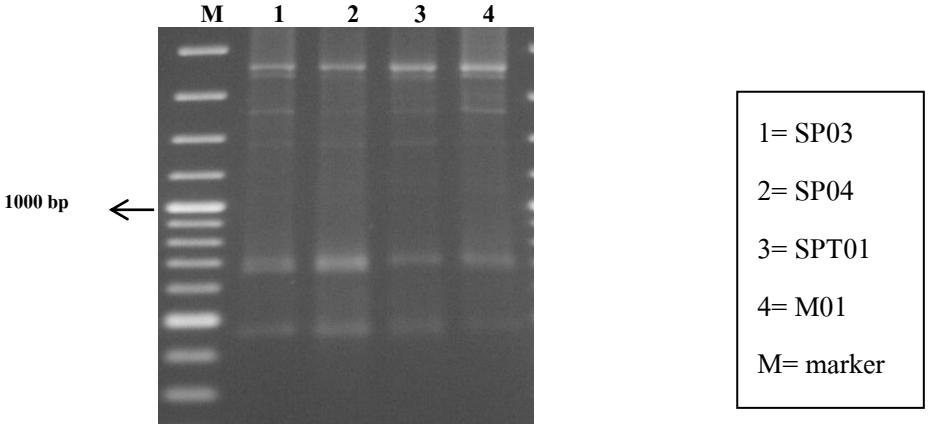
ภาพที่ ๗๗ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๑๐



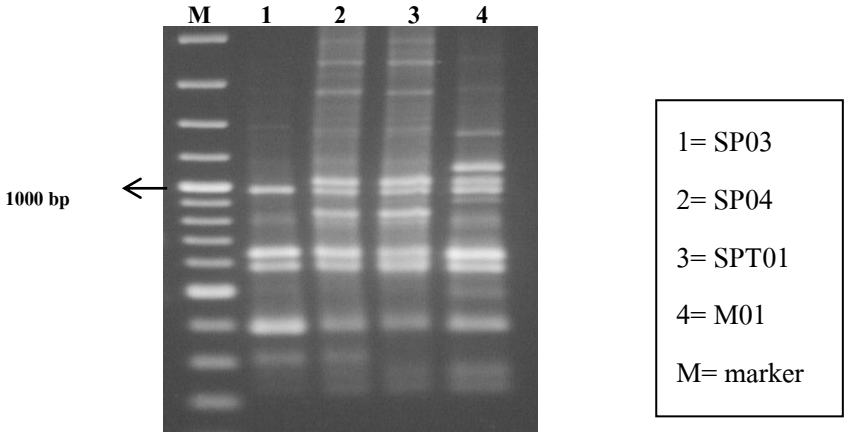
ภาพที่ ๗๘ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๑๑



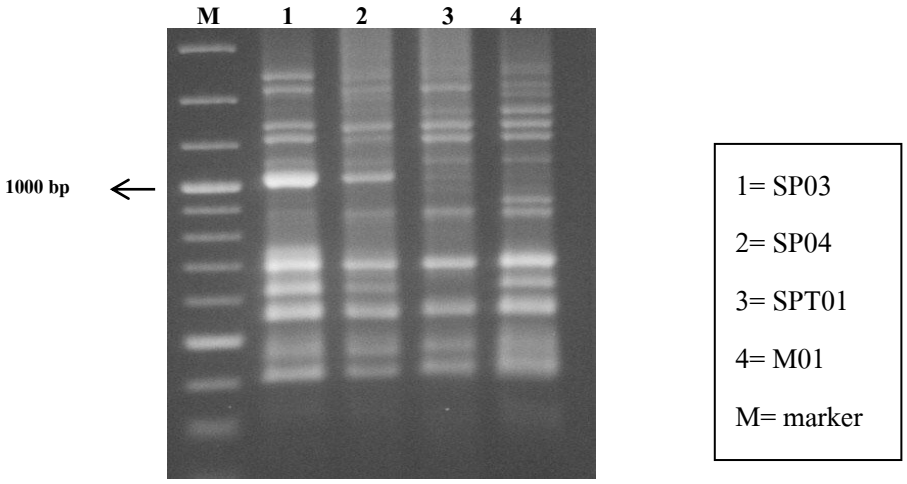
ภาพที่ ๗๙ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๑๒



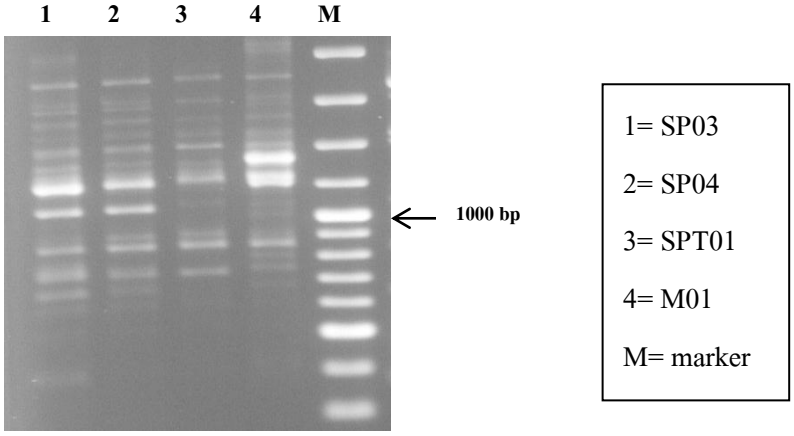
ภาพที่ ๘๐ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๑๘



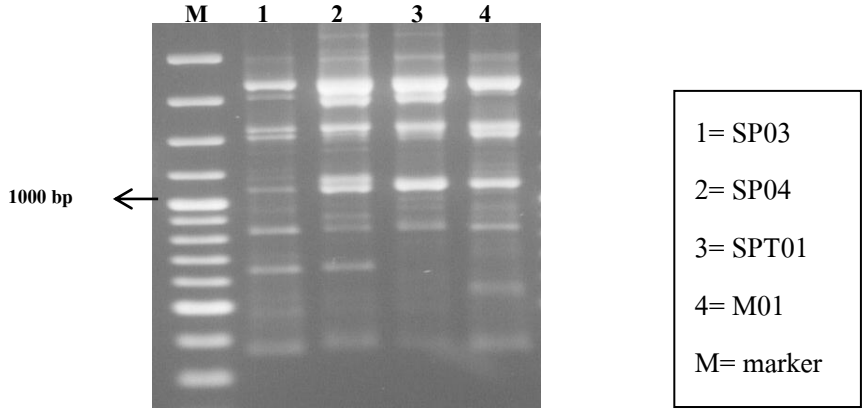
ภาพที่ ๘๑ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๒๕



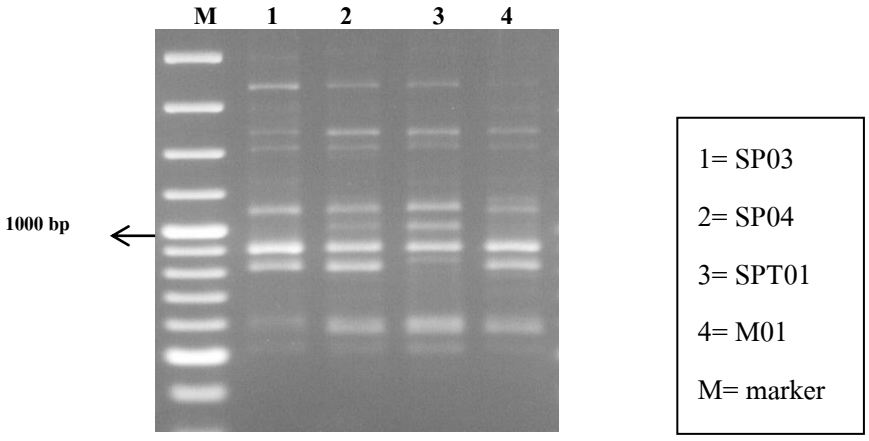
ภาพที่ ๘๒ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๒๖



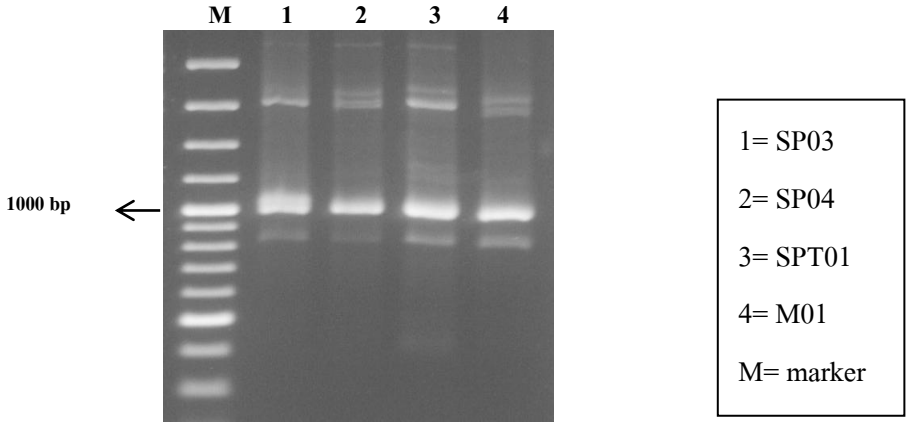
ภาพที่ ๘๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๓๔



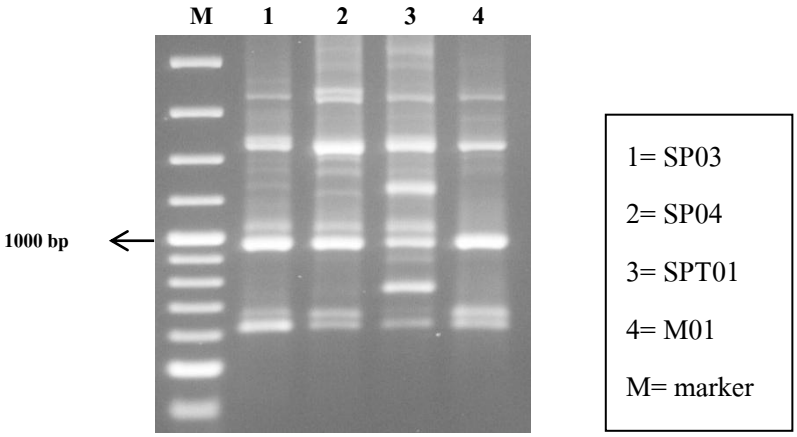
ภาพที่ ๘๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๓๕



ภาพที่ ๘๕ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๔๑



ภาพที่ ๘๖ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๕๗

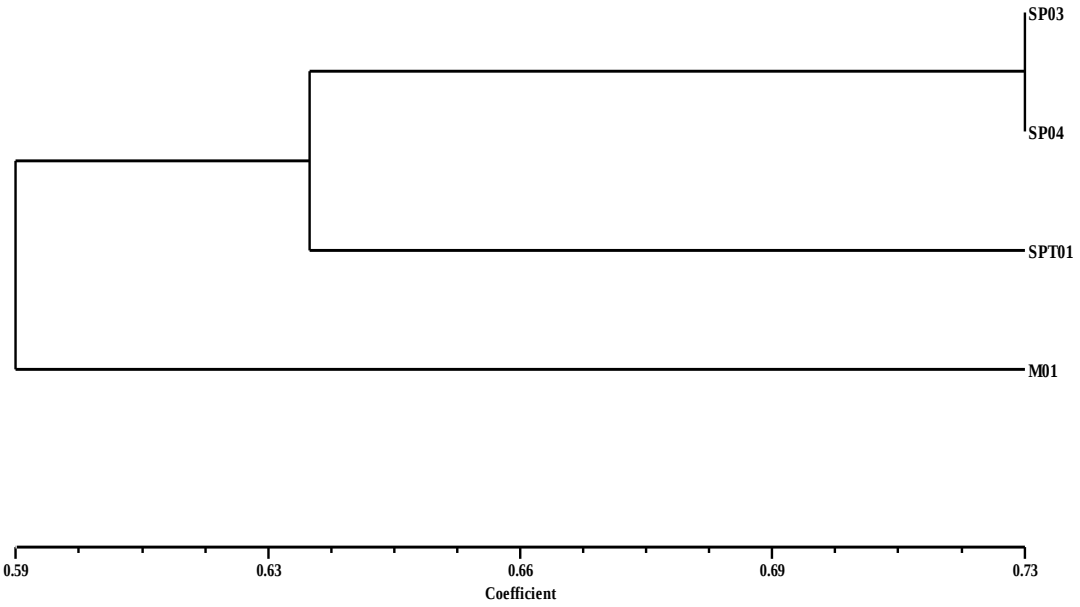


ภาพที่ ๘๗ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ UBC-๘๖๔

ตารางที่ ๒๕ เปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมและจำนวนแถบดีเอ็นเอของเพกาเมื่อวิเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ชนิดต่างๆ

ชนิดของไพร์เมอร์	จำนวนแถบรวม (Total band)	จำนวนแถบต่าง (Polymorphic band)	จำนวนแถบเหมือน (Monomorphic band)	% โพลิมอฟิซึม (% Polymorphism)
๘๑๐	๑๖	๑๔	๒	๘๗.๕๐
๘๑๑	๑๘	๑๒	๖	๖๖.๖๖
๘๑๒	๘	๕	๓	๖๒.๕๐
๘๑๘	๘	๒	๖	๒๕.๐๐
๘๒๕	๒๓	๑๒	๑๑	๕๒.๑๗
๘๒๖	๑๘	๘	๑๐	๔๔.๔๔
๘๓๔	๑๙	๙	๑๐	๔๗.๓๖
๘๓๕	๒๐	๑๑	๙	๕๕.๐๐
๘๔๑	๑๒	๕	๗	๔๑.๖๖
๘๕๗	๑๙	๑๓	๖	๖๘.๔๒
๘๖๔	๑๙	๑๔	๕	๗๓.๖๘
รวม	๑๘๐	๙๒	๘๘	๕๑.๑๑

จากภาพที่ ๗๗–๘๗ และตารางที่ ๒๕ การใช้ไพร์เมอร์ชนิดต่างๆจำนวน ๑๑ ชนิด วิเคราะห์ดีเอ็นเอเพกาจำนวน ๔ ต้นพันธุ์พบว่า มีแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด ๑๘๐ แถบ เป็นแถบที่เหมือนกันจำนวน ๘๘ แถบและแถบที่ต่างกันจำนวน ๙๒ แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึม (% polymorphism) เท่ากับ ๕๑.๑๑ จำนวนแถบต่อไพร์เมอร์เท่ากับ ๑๖.๓๖ แถบ ผลของแถบดีเอ็นเอและเปอร์เซ็นต์โพลิมอฟิซึมของเพกาแสดงถึงความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของเพกาอยู่ในระดับปานกลาง

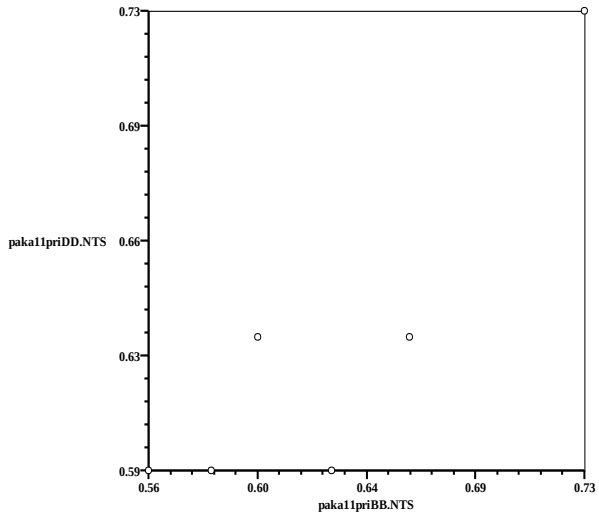


ภาพที่ ๘๘ Dendrogram ของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๑ ชนิด

ตารางที่ ๒๖ ค่า similarity matrix ของเพกา ๔ ต้นพันธุ์

	SP03	SP04	SPT01	M02
SP03	1.000			
SP04	0.728	1.000		
SPT01	0.601	0.660	1.000	
M02	0.630	0.583	0.599	1.000

สำหรับภาพที่ ๘๘ Dendrogram และค่า similarity matrix (ตารางที่ ๒๖) ของเพกาที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจำนวน ๔ ต้นพันธุ์โดยใช้ไพร์เมอร์ ๑๑ ชนิดร่วมกันพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง ๐.๕๙–๐.๗๓ และที่ค่าสัมประสิทธิ์ ๐.๗๓ ต้นพันธุ์ SP๐๓ และ SP๐๔ ไม่สามารถแยกจากกันได้อาจมาจากความใกล้ชิดกันทางเครือญาติโดยทั้งสองต้นเจริญเติบโตอยู่บริเวณใกล้เคียงกันภายในสวนเดียวกันและพัฒนามาจากสายต้นเดียวกัน ขณะที่ต้น SPT๐๑ มีลักษณะดอกคล้ายกับต้น SP๐๓ และ SP๐๔ ส่วนต้นที่ M๐๑ มีลักษณะดอกที่แตกต่างจากต้นอื่นๆคือมีส่วนโคนดอกสั้นและดอกมีสีขาวปนเหลืองต่างจากต้นอื่นที่มีดอกสีชมพูปนม่วง ผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า เทคนิคนี้สามารถใช้วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเพกาได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ ๘๙ Cophenetic Correlation ของเพกา ๔ ต้นพันธุ์จากไพร์เมอร์ ๑๑ ชนิด

จากภาพที่ ๘๙ เป็นค่าสหสัมพันธ์ (Cophenetic Correlation (r)) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการกระจายข้อมูลแถบดีเอ็นเอของเพกาจำนวน ๔ ต้นพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ ๑๑ ชนิดซึ่งมีค่า Cophenetic Correlation (r) เท่ากับ ๐.๘๗๔๗๘ แสดงว่ามีกระจายของข้อมูลดีเอ็นเอเพกาที่ดีและมีความน่าเชื่อถือสูง

๕. <u>การทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน</u>

๕.๑ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยอาศัย MTT assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ และเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ ของสารสกัดของโครงการวิจัยฯ แสดงดังตารางที่ ๒๗

ตารางที่ ๒๗ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ ของสารทดสอบโดยอาศัย MTT assay

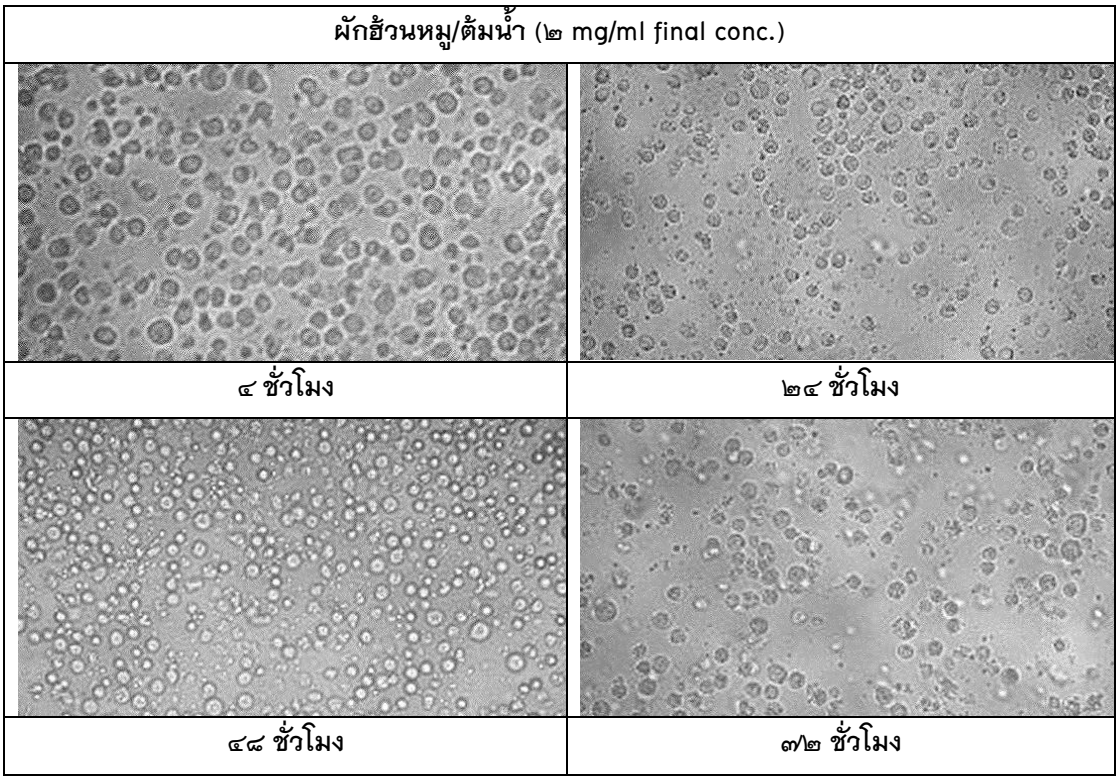
พืช	วิธีสกัด	IC_{50} (mg/ml)	
		HT-๒๙	HL-๖๐
ผักฮ้วน	ต้มน้ำ	๑.๓๘±๐.๑๒	๑.๙๘±๐.๑๐
	methanol	๐.๙๔±๐.๐๙	๐.๘๔±๐.๐๙๘
ผักถั่วแปบ	ต้มน้ำ	๐.๕๓±๐.๒๓	๐.๗๑±๐.๑๐
	methanol	๐.๖๔±๐.๑๑	๐.๔๔±๐.๐๘
ใบถั่วแปบ	ต้มน้ำ	๑.๖๓+๐.๔๓	๑.๗๒+๐.๐๔
	methanol	๑.๙๔+๐.๑๒	๒.๐+๐.๐๓
ผักเพกา	ต้มน้ำ	๑.๗๖+๐.๔๓	๑.๗๓+๐.๑๒
	methanol	๑.๘๔+๐.๑๐	๐.๘๖+๐.๐๔
Irinothecan		๐.๕๕±๐.๑๒	-
Doxorubicin		-	๐.๖๓±๐.๐๕

สารสกัดหยาบจากผักถั่วแปบด้วยการต้มน้ำและด้วย methanol แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทดสอบ HT-๒๙ และ HL-๖๐ ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่างพืชที่นำมาทำการทดสอบด้วยค่า IC๕๐ = ๐.๕๓±๐.๒๓ และ ๐.๔๔±๐.๐๘ mg/ml ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบจากถั่วแปบด้วยการต้มน้ำแสดงฤทธิ์ดังกล่าวดีกว่า Irinothecan ซึ่งเป็น positive control สำหรับเซลล์ HT-๒๙ ที่ ๑.๐๔ เท่าขณะที่สารสกัดหยาบจากถั่วแปบด้วยการ methanol แสดงฤทธิ์ดังกล่าวดีกว่า Doxorubicin ซึ่งเป็น positive control สำหรับเซลล์ HL-๖๐ ที่ ๑.๔๓ เท่า โดยภาพรวมสารสกัดของผักที่นำมาทำการทดสอบทุกชนิดไม่เป็นพิษเฉียบพลันต่อเซลล์ทดสอบ

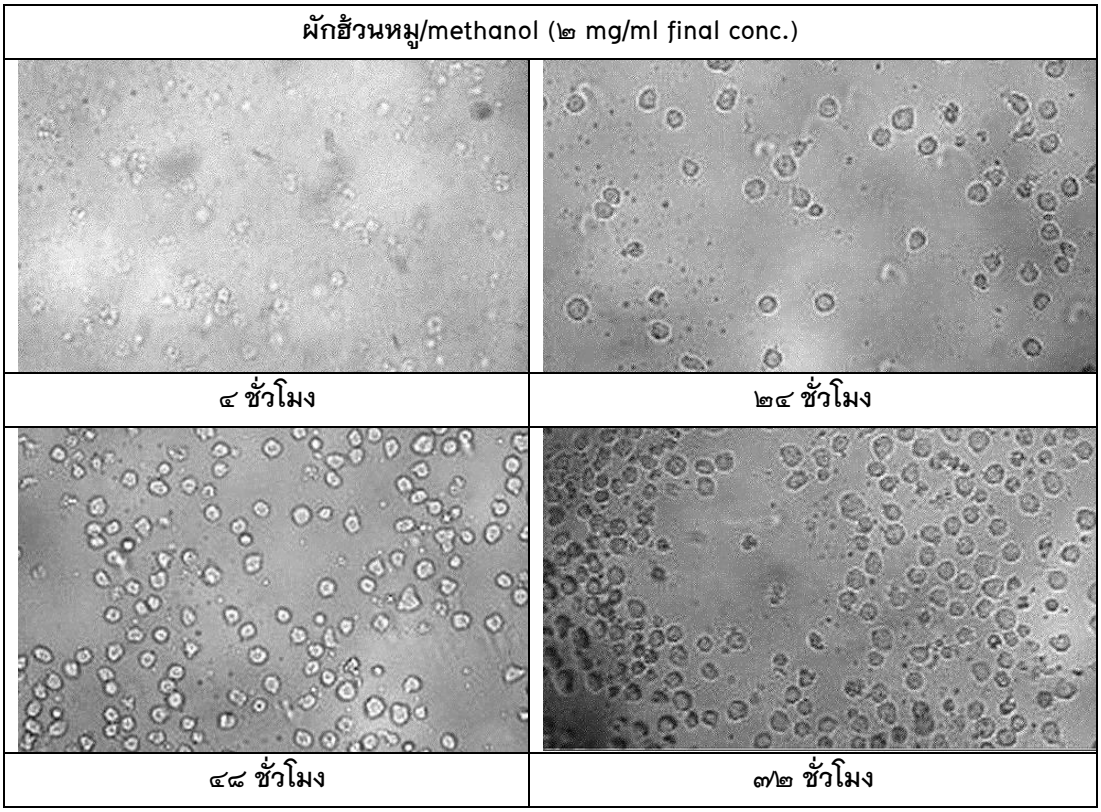
๕.๒ การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis

-การติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ทดสอบ (morphological changes)

ผลการติดตามการเกิด apoptotic body และ single large vesicle ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงดังภาพ

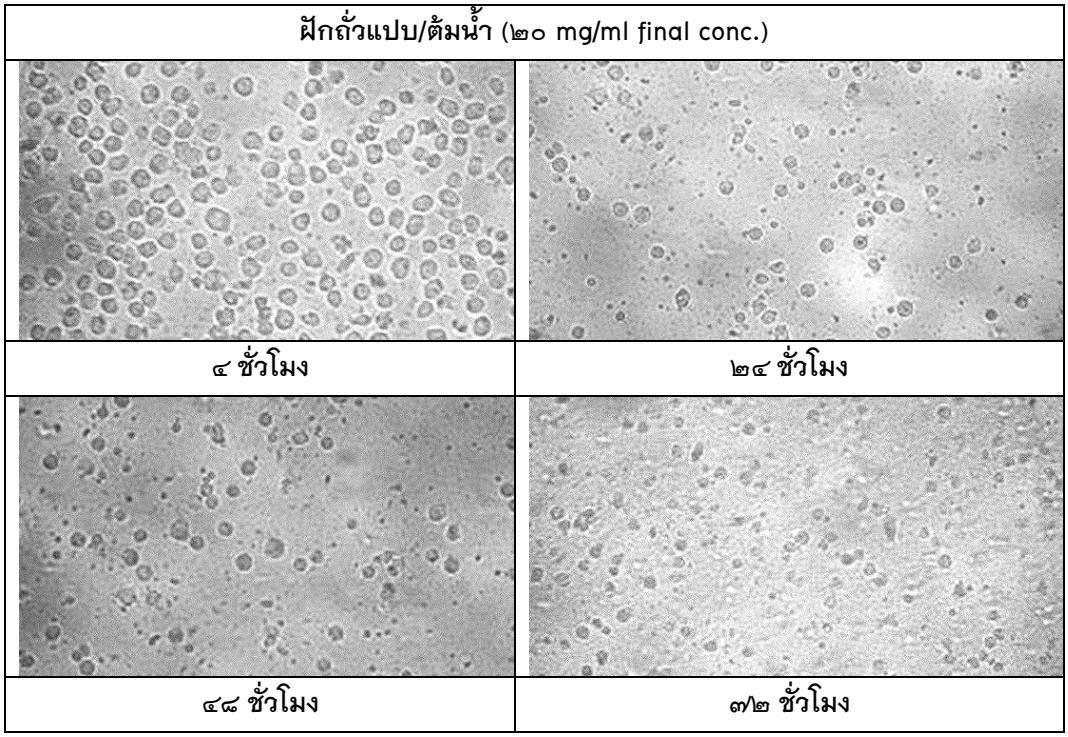


ภาพที่ ๙๐ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากผักฮ้วนหมูด้วยการต้มน้ำ สารทดสอบปริมาณ ๒ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

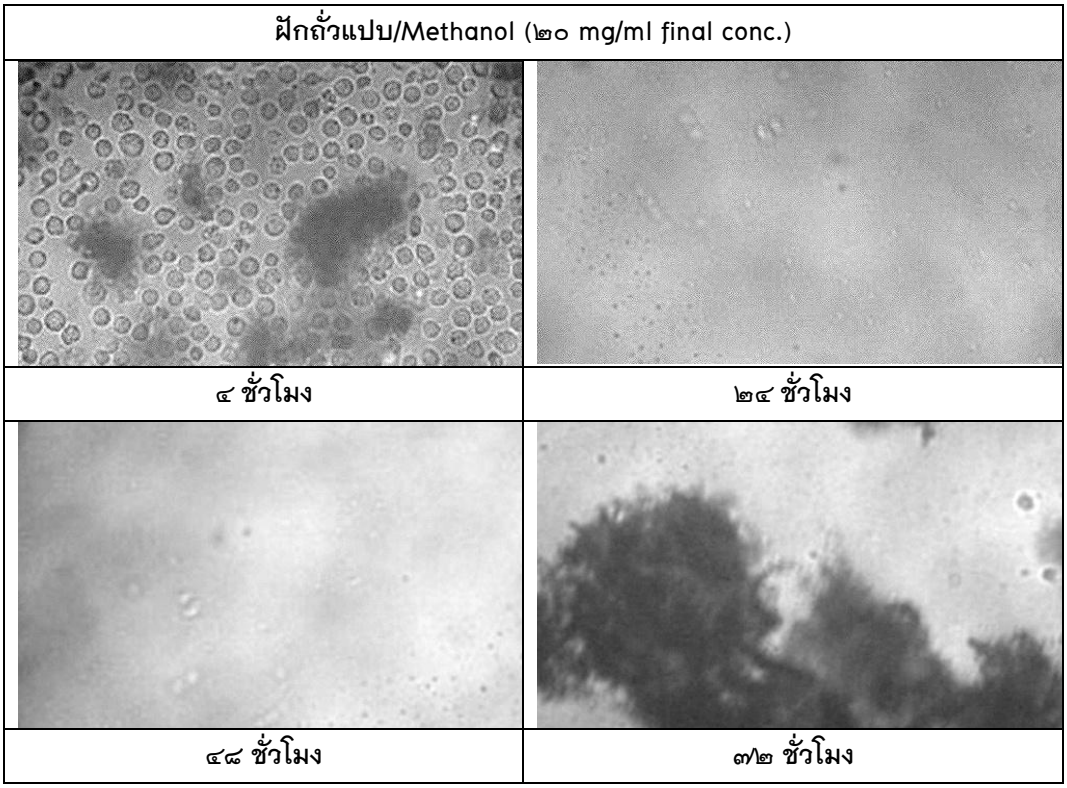


ภาพที่ ๙๑ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากผักฮ้วนหมูด้วย methanol สารทดสอบปริมาณ ๒ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

จากการติดตามการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (morphological changes) พบว่าสารสกัดจากผักฮ้วน/ต้มน้ำ ที่ ๒ mg/ml สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เกิด morphological changes ได้ภายใน ๗๒ ชั่วโมง ซึ่งสามารถตรวจพบเซลล์ที่มีลักษณะ single large vesicle ได้เป็นจำนวนมาก เซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกตินอกจากนั้น จะมีลักษณะขอบที่ไม่กลม บิดเบี้ยว และเริ่มเห็น nuclei formation ได้แต่ไม่ชัดเจน ภายใน ๒๔ ชั่วโมงของการทดสอบ ขณะที่สารสกัดผักฮ้วน/methanol ที่ความเข้มข้น ๒ mg/ml เท่ากัน ไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเซลล์ HL-๖๐ ได้ จนถึง ๗๒ ชั่วโมง



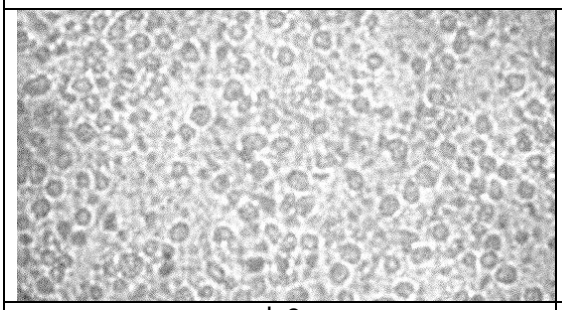
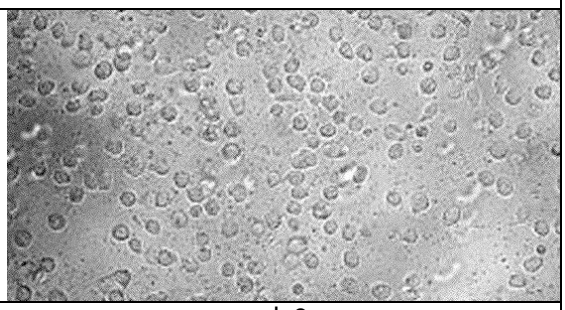
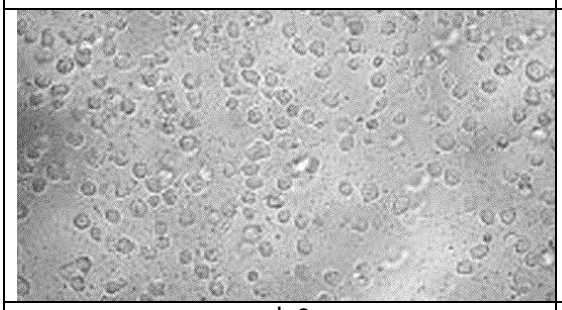
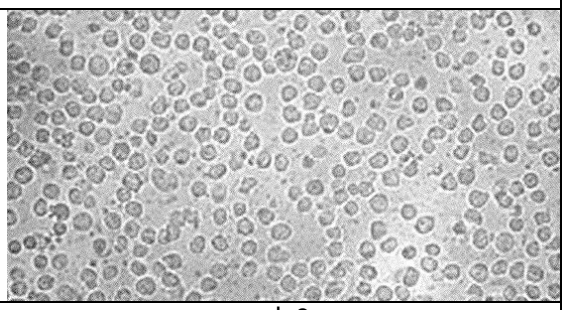
ภาพที่ ๙๒ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากฝักถั่วแปบด้วยการต้มน้ำ สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า



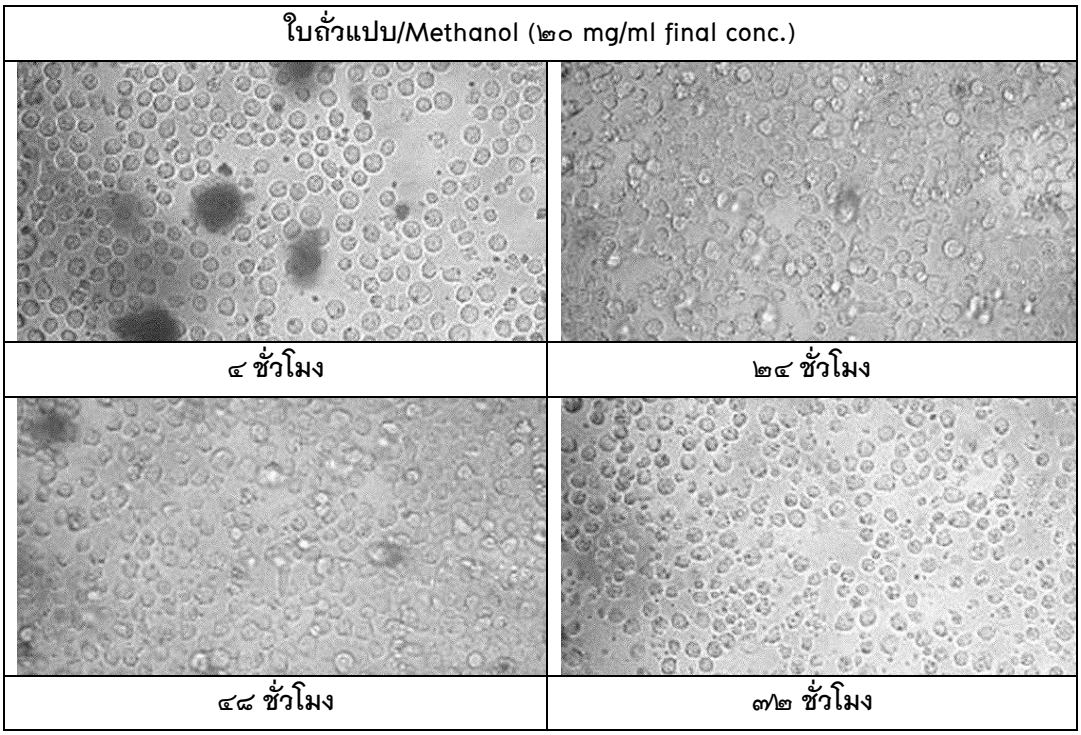
ภาพที่ ๙๓ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากฝักถั่วแปบด้วย methanol สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

ลักษณะสำคัญประการหนึ่งของสารสกัดหยาบจากถั่วแปบ โดยเฉพาะสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วย methanol คือการชักนำให้เซลล์มะเร็งทดสอบเกิดการเกาะตัวเป็นก้อนขนาดใหญ่ (clumping) ลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สารสกัดทั้งสองแบบสามารถทำให้เซลล์เกิด clumping ได้ภายใน ๒๔ ชั่วโมง และพบเห็นได้มากเมื่อทดสอบด้วยสารสกัด methanol ที่ ๗๒ ชั่วโมง ซึ่งจากการสังเกตพบว่าเซลล์ที่เกิด clumping มาจากประชากรของเซลล์ส่วนหนึ่งโดยเมื่อเกิดการรวมตัวกันแล้วพบลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากภาพถ่ายจะเห็นเป็นเงา ไม่เห็นเส้นขอบของเซลล์ชัดเจน) ส่วนเซลล์ที่ไม่เกิด clumping อาจมีการตายเมื่อเวลาผ่านไป โดยเห็นเป็นเซลล์ที่เสียรูปร่าง แตก เป็นเศษกระจายทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออาจจะรอดพ้นจากการตาย

กลับมาเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอีกครั้ง ซึ่งในกรณีหลังนี้สังเกตได้จาก HL-๖๐ ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดฝักถั่วแปบ/methanol โดยที่ความเข้มข้นที่ลดลง ๑๐ เท่า (๒ mg/ml) เหตุการณ์ในลักษณะเดิมนี้ยังเกิดอยู่แต่พบปริมาณน้อยลง

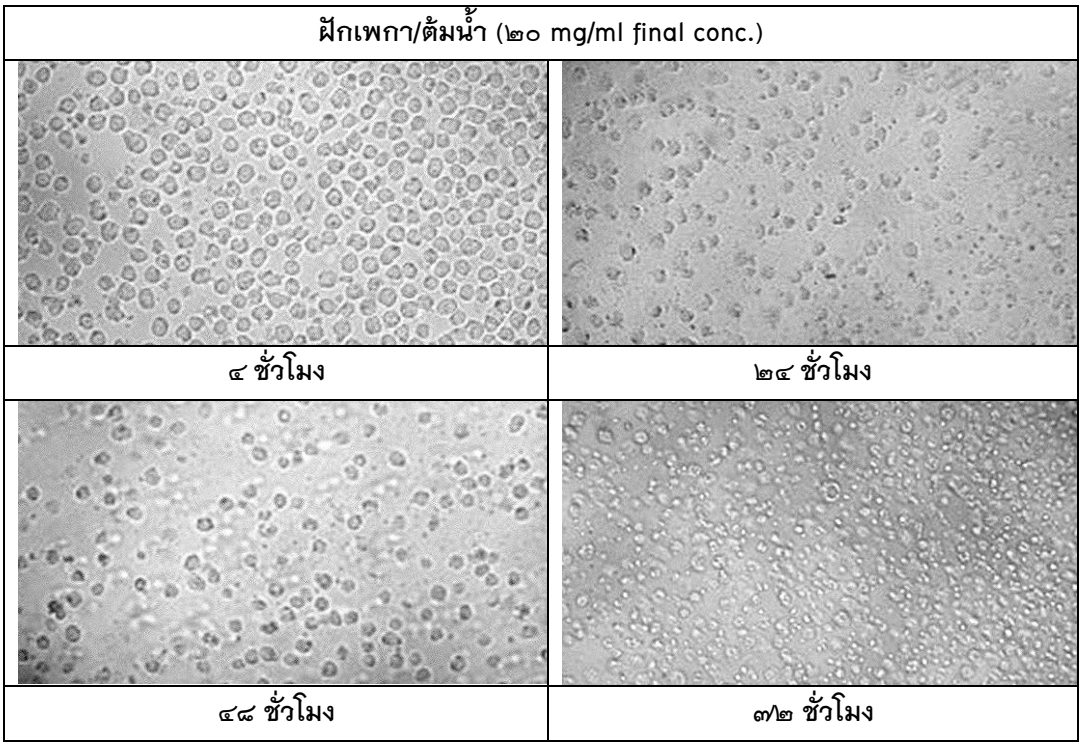
ใบถั่วแปบ/ต้มน้ำ (๒๐ mg/ml final conc.)	
	
๔ ชั่วโมง	**๒๔ ชั่วโมง**
	
๔๘ ชั่วโมง	**๗๒ ชั่วโมง**

ภาพที่ ๙๔ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากใบถั่วแปบด้วยการต้มน้ำ สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

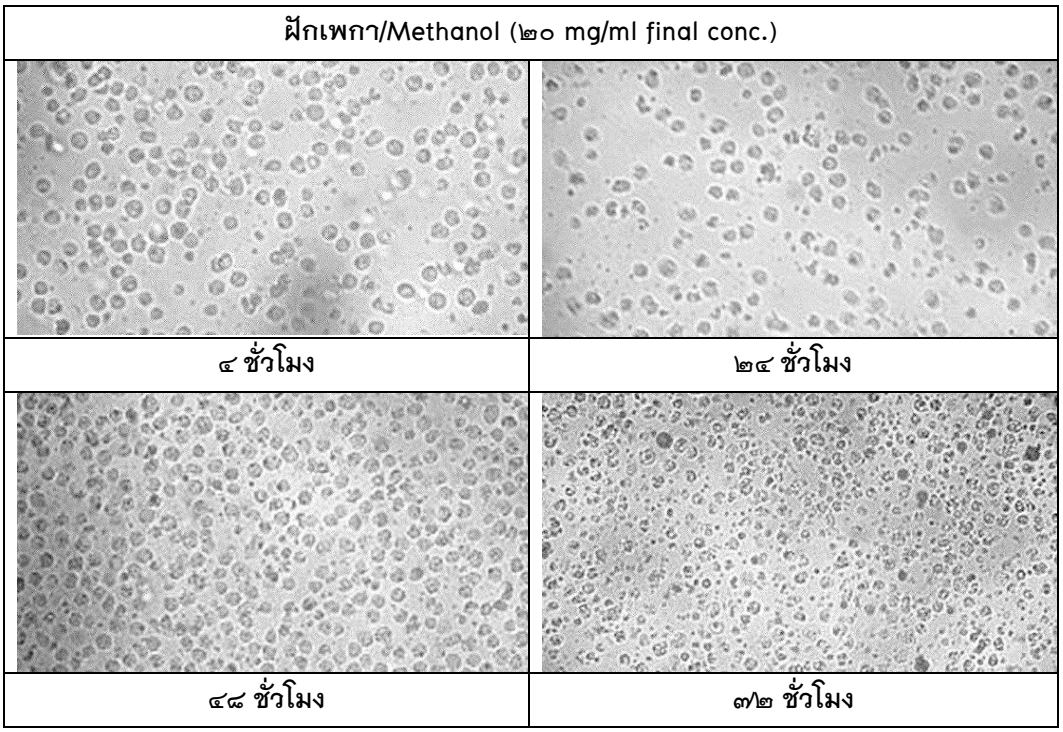


ภาพที่ ๙๕ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากใบถั่วแปบด้วย methanol สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

สารสกัดจากใบถั่วแปบ/ต้มน้ำ และที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น ๒๐ mg/ml ทำให้เกิด clumping ได้ภายใน ๔ ชั่วโมงของการทดสอบ โดยจะพบในเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด methanol มากกว่า และเหมือนกันกับที่พบในสารสกัดจากฝักของถั่วแปบ ส่วนของเซลล์ที่ไม่เกิด clumping จะสามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวต่อไปได้เมื่อเวลาผ่านไป

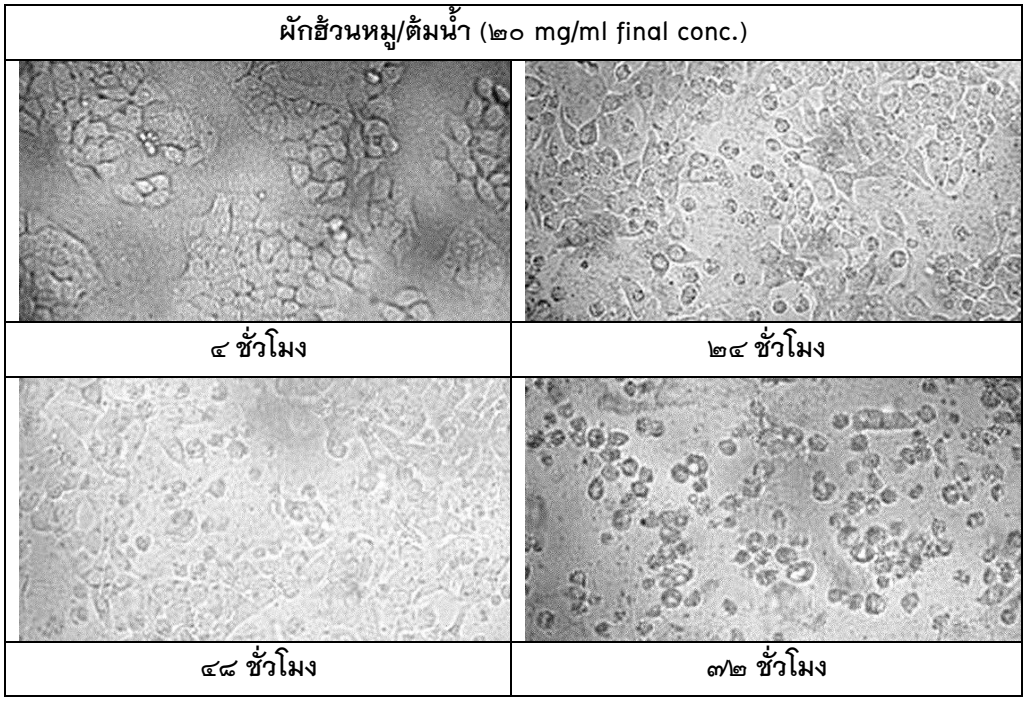


ภาพที่ ๙๖ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากฝักเพกาด้วยการต้มน้ำ สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

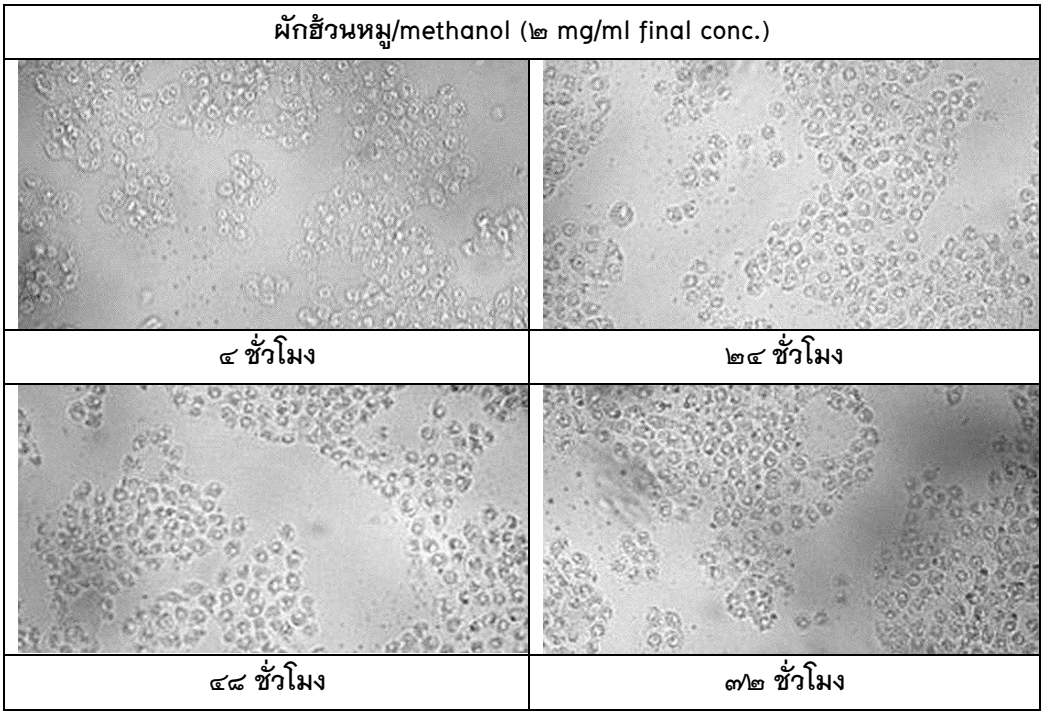


ภาพที่ ๙๗ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากฝักเพกาด้วย methanol สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

สารสกัดจากฝักเพกา/ต้มน้ำ และฝักเพกา/methanol ที่ความเข้มข้น ๒๐ และ ๒ mg/ml ไม่สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่เข้าได้กับเซลล์ที่กำลังเข้าสู่กระบวนการ apoptosis ในลักษณะ time dependent เซลล์ทดสอบมีจำนวนลดลงเนื่องจากการตายเพราะสารสกัดที่ ๔ ชั่วโมงแรกของการทดสอบ จากนั้นเซลล์กลับฟื้นตัวและเพิ่มจำนวนกลับมาเป็นปกติ ไม่สามารถตรวจพบลักษณะใดๆที่เข้าได้กับเซลล์ที่กำลังเข้าสู่กระบวนการ apoptosis



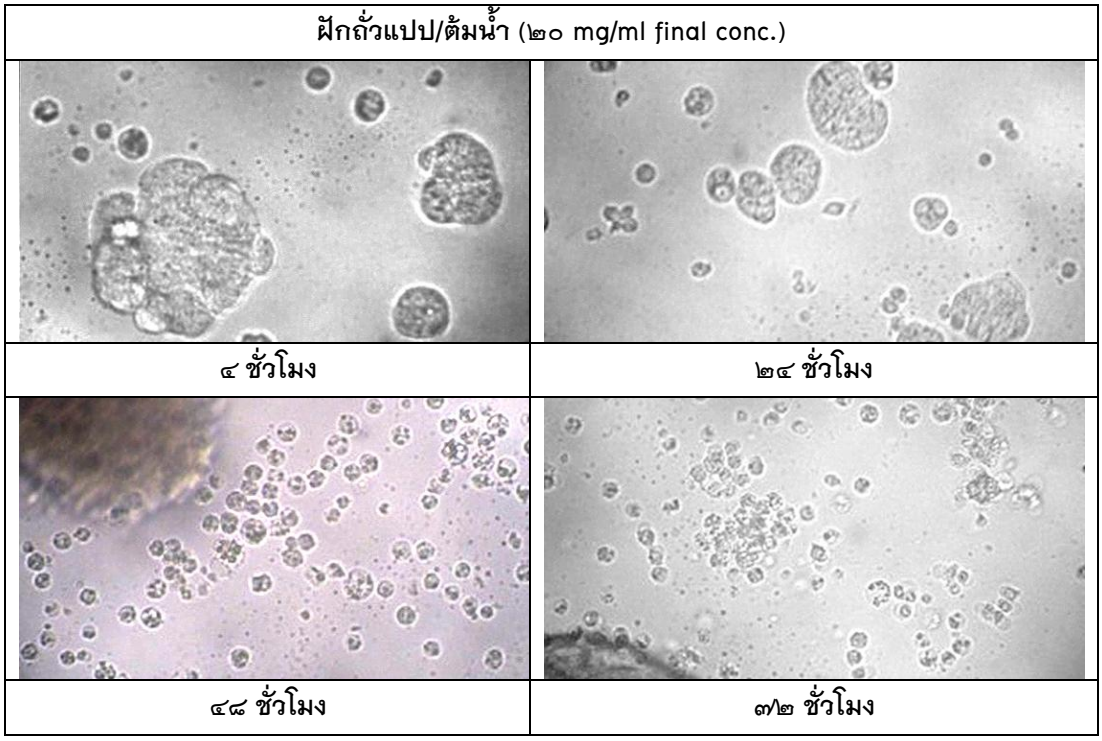
ภาพที่ ๙๘ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากผักฮ้วนหมูด้วยการต้มน้ำ สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า



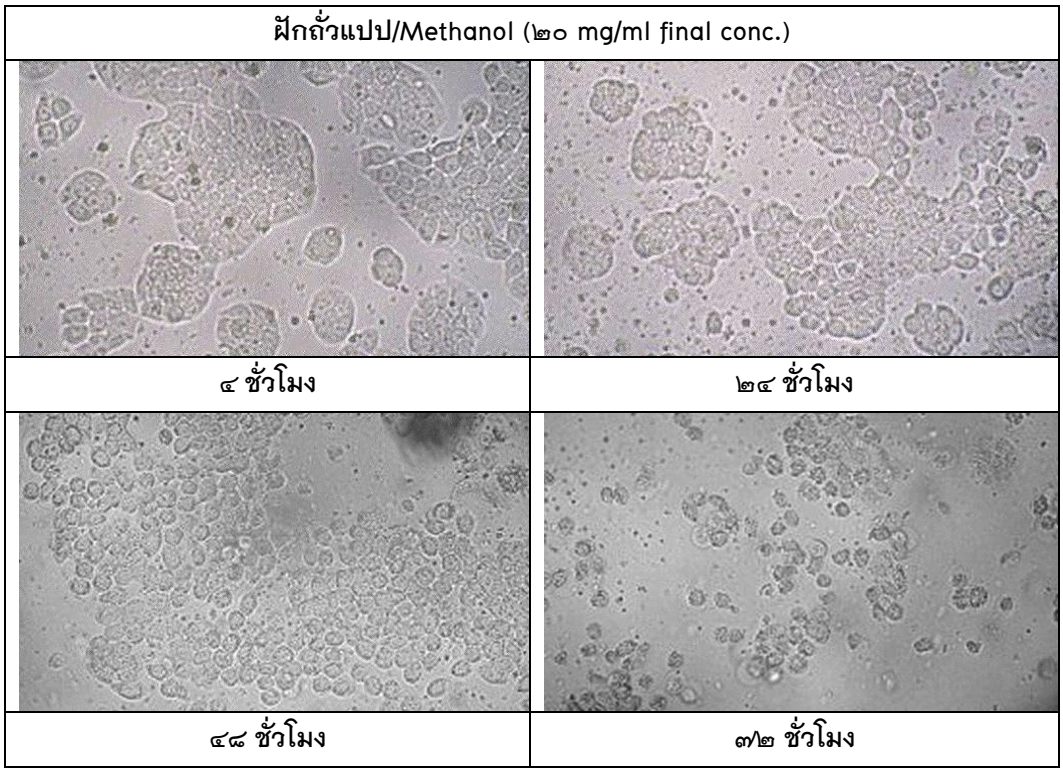
ภาพที่ ๙๙ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากผักฮ้วนหมูด้วย methanol สารทดสอบปริมาณ ๒ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

จากการติดตามการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (morphological changes) พบว่าสารสกัดจากผักฮ้วนหมู/ต้มน้ำที่ ๒๐ mg/ml สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิด morphological changes ได้ภายใน ๗๒ ชั่วโมง โดยตรวจพบรูปร่างของเซลล์ที่หดสั้น กลม เกิด nuclei formation ตั้งแต่ ๔๘ ชั่วโมงและสังเกตได้ชัดเจนขึ้นภายใน ๗๒ ชั่วโมง ขณะที่สารสกัดข้างต้นที่ความเข้มข้นน้อยกว่า ๑๐ เท่า (๒ mg/ml) ไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเซลล์ HT-๒๙ ได้ ขณะที่ สารสกัดจากผักฮ้วนหมู/methanol ที่ความเข้มข้นที่ ๒ mg/ml (น้อยการสารทดสอบจากการต้มน้ำ ๑๐ เท่า) เสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิดการเปลี่ยนแปลงคล้ายกันได้ตั้งแต่ ๔ ชั่วโมงแรกของการทดสอบ (เซลล์หดสั้น กลมและพบ nuclei formation) ขณะที่สารสกัดข้างต้นที่ความเข้มข้นมากกว่า ๑๐ เท่า (๒๐ mg/ml) ไม่สามารถทำให้

เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเซลล์ HT-๒๙ ได้อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบจากผักฮ้วนหมูทั้งสองแบบ ไม่สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เสียรูปเนื่องจาก cytoskeleton collapse, single large vesicle หรือ apoptotic bodies ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ของเซลล์ที่กำลังเข้าสู่ apoptosis



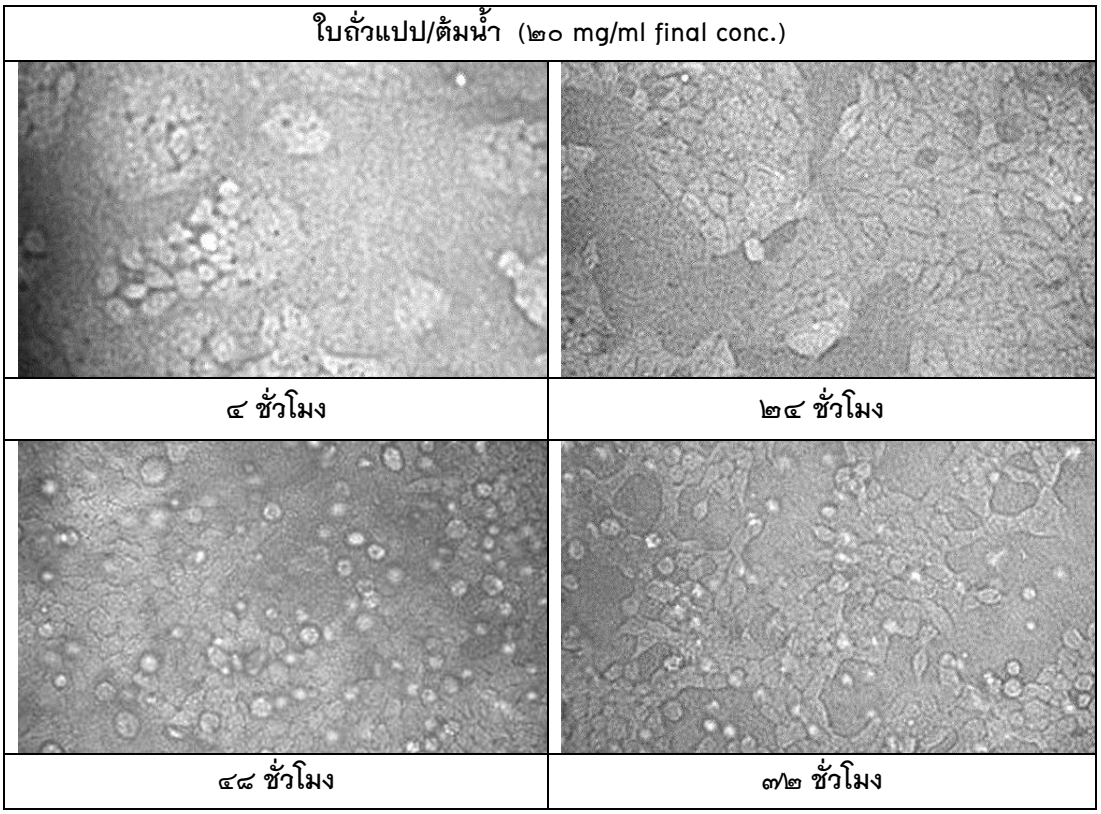
ภาพที่ ๑๐๐ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากฝักถั่วแปบด้วยการต้มน้ำ สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า



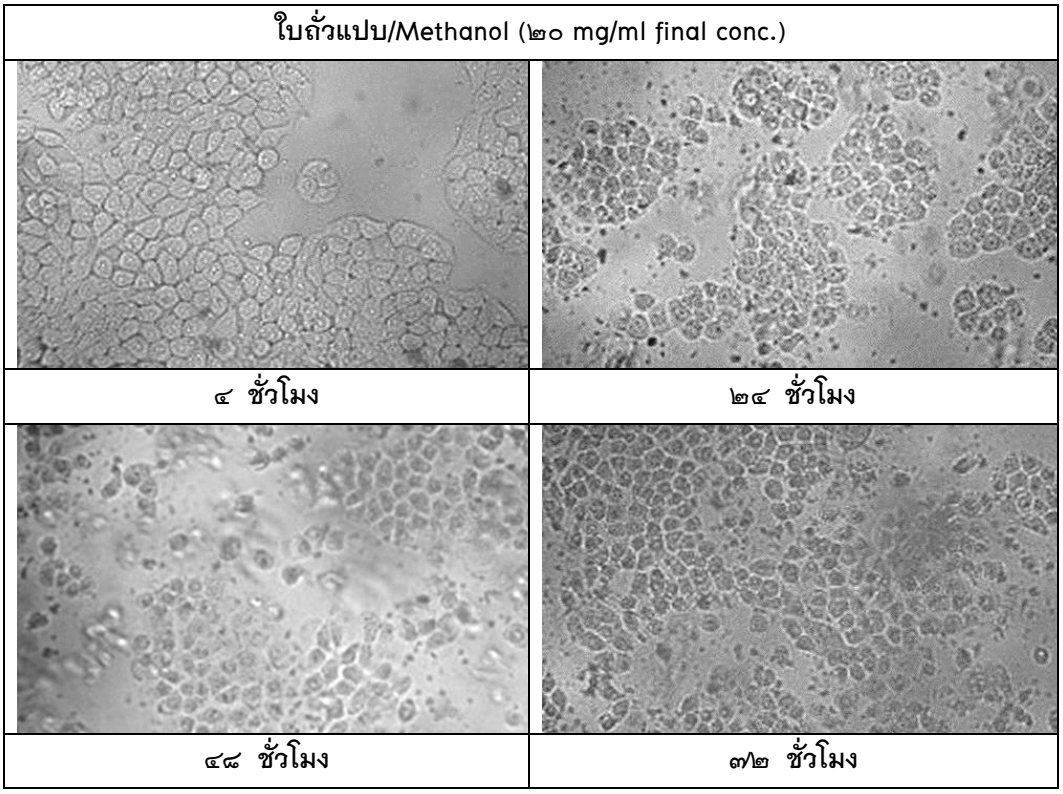
ภาพที่ ๑๐๑ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากฝักถั่วแปบด้วย methanol สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

จากการติดตามการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง (morphological changes) พบว่าสารสกัดจากฝักถั่วแปบ/ต้มน้ำและฝักถั่วแปบ/methanol ที่ ๒๐ mg/ml สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิด morphological changes ได้ภายใน ๔ ชั่วโมง โดยลักษณะเด่นเมื่อทดสอบ HT-๒๙ ด้วยสารสกัดหยาบฝักถั่วแปบ/ต้มน้ำ ที่ไม่พบในการทดสอบด้วยสารสกัดอื่นๆจากการทดลองในครั้งนี้ คือการเกิด clumping หรือการที่เซลล์หลุดมารวมตัวจับกันเป็นก้อน ซึ่งเป็นลักษณะเบื้องต้นประการหนึ่งของเซลล์ที่เข้าสู่กระบวนการ apoptosis หลังจากนั้นพบลักษณะ nuclei formation ได้ชัดเจนภายใน ๔๘ ชั่วโมง และพบ single large vesicle ได้ภายใน ๗๒ ชั่วโมง ขณะที่สารสกัดหยาบฝักถั่วแปบ/ methanol ชักนำให้เซลล์ HT-๒๙ เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ไม่ชัดเจนเท่าสารสกัดหยาบจากการต้มน้ำ โดยพบว่าเซลล์เสียโครงสร้างการยึดเกาะ

(pseudopodium) ชัดเจนภายใน ๔๘ ชั่วโมง โดยเซลล์เริ่มหดกลมเข้าและตายมากขึ้นภายใน ๗๒ ชั่วโมง และสามารถพบเซลล์ในลักษณะ single large vesicle ได้ด้วย สารสกัดหยาบทั้งสองชนิดนี้ที่ความเข้มข้นลดลง ๑๐ เท่า (๒ mg/ml) ไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเซลล์ HT-๒๙ ได้

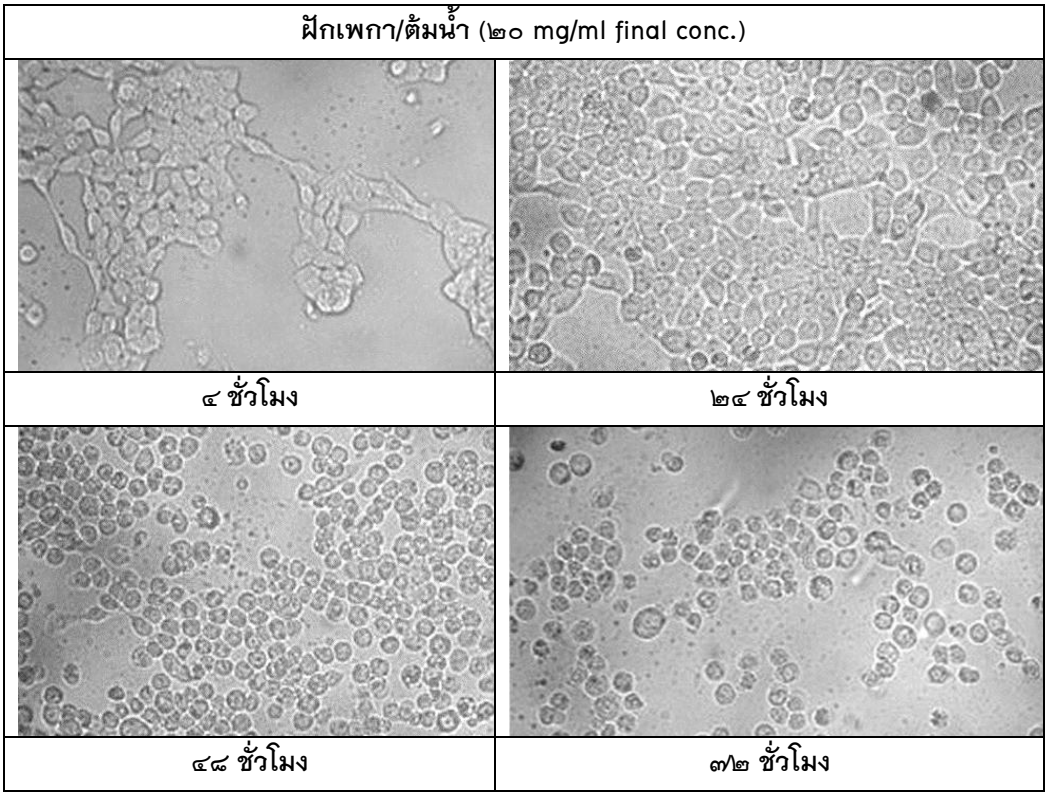


ภาพที่ ๑๐๒ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากใบถั่วแปบด้วยการต้มน้ำ สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

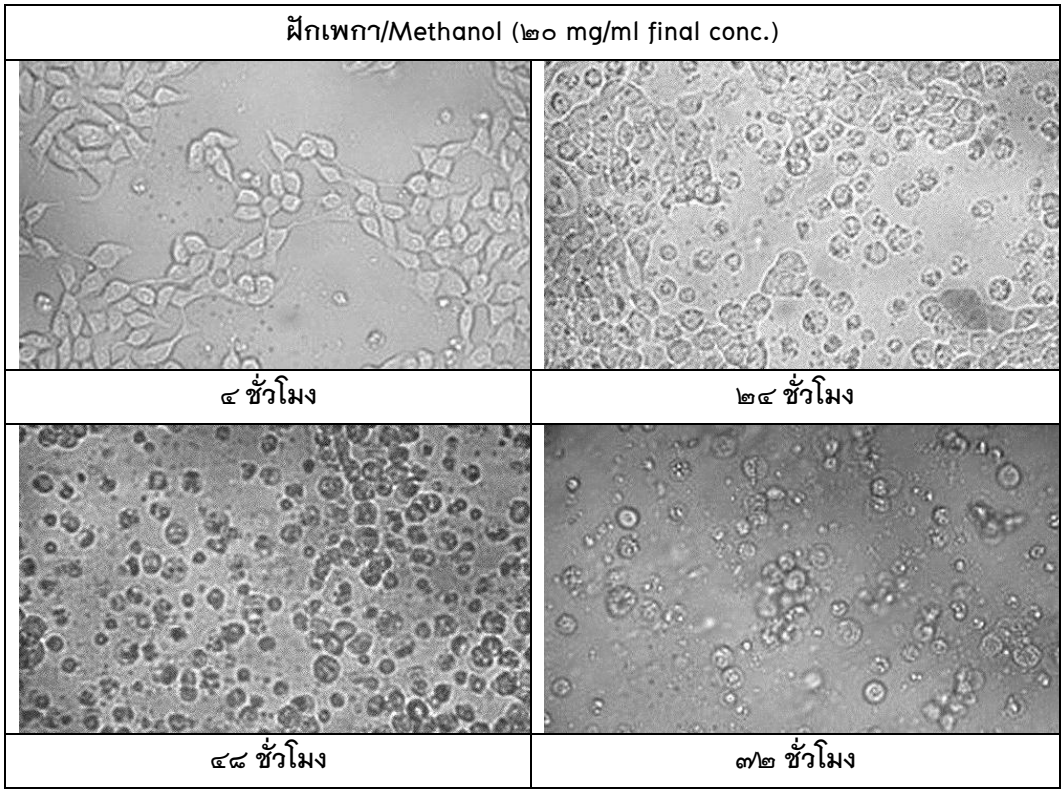


ภาพที่ ๑๐๓ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากใบถั่วแปบด้วย methanol สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

สารสกัดจากใบถั่วแปบ/ต้มน้ำ ที่ความเข้มข้น ๒๐ และ ๒ mg/ml ไม่สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ที่เข้าได้กับเซลล์ที่กำลังเข้าสู่กระบวนการ apoptosis เซลล์ทดสอบมีการเจริญเติบโตดี โดยเฉพาะภายใน ๔๘ ชั่วโมง พบเซลล์ที่มีลักษณะเจริญซ้อนขึ้นด้านบน พร้อมที่จะหลุดออกจากบริเวณเดิม เพื่อไปเจริญเติบโตในที่ใหม่ ขณะที่สารสกัดหยาบจากใบถั่วแปบ/methanol ที่ ๒๐ mg/ml สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิด morphological changes ได้ในลักษณะ time dependent โดยจะสังเกตลักษณะการหดตัวของเซลล์และ nuclei formation ได้ชัดเจน ภายใน ๗๒ ชั่วโมง ขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นในการทดสอบลดลง ๑ ๐เท่า (๒ mg/ml) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะยับยั้งการเจริญเติบโตของ HT-๒๙



ภาพที่ ๑๐๔ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากฝักเพกาด้วยการต้มน้ำ สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

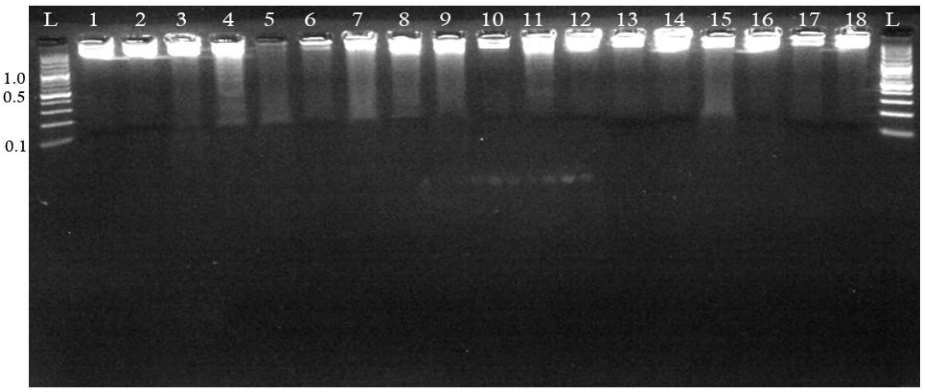


ภาพที่ ๑๐๕ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เนื่องมาจากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากฝักเพกาด้วย methanol สารทดสอบปริมาณ ๒๐ mg/ml ถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ a) ๔ ชั่วโมง, b) ๒๔ ชั่วโมง, c) ๔๘ ชั่วโมง และ d) ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

สารสกัดจากฝักเพกา/ต้มน้ำ และฝักเพกา/methanol ที่ความเข้มข้น ๒๐ mg/ml สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ที่เข้าได้กับเซลล์ที่กำลังเข้าสู่กระบวนการ apoptosis ในลักษณะ time dependent ภายใน ๗๒ ชั่วโมง พบว่าเซลล์ทดสอบหดตัวมาก เกิด nuclei formation และพบเซลล์ในลักษณะ single large vesicle ได้ประปราย และมากกว่าที่พบเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบฝักถั่วแปบ/ต้มน้ำ ที่ ๒๐ mg/ml ในทางตรงข้ามสารสกัดหยาบจากฝักเพกาทั้งสองแบบที่ความเข้มข้นน้อยลง ๑๐ เท่า (๒ mg/ml) ไม่มีผลชักนำให้ HT-๒๙ เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์

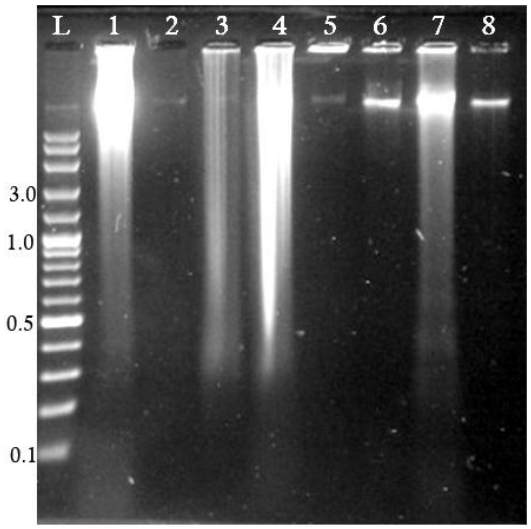
–การติดตามการเกิด DNA fragmentation ของเซลล์มะเร็งทดสอบ

จากการทำการทดสอบชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT–๒๙ และ HL–๖๐ เกิดกระบวนการ apoptosis และแสดงด้วยการเกิด DNA fragmentation ด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ โดยผู้ทำการวิจัยได้ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น ที่มากกว่าค่า IC๕๐ ของสารสกัดแต่ละตัว (๒๐ mg/ml) และที่ใกล้เคียงกับค่า IC๕๐ (๒ mg/ml) หรือลดลง ๑๐ เท่าจากค่าแรกเพื่อดูผลการชักนำแบบเฉียบพลัน (ทดสอบที่ ๑ และ ๔ ชั่วโมง) และผลระยะยาว (๑ – ๗ วัน) ตามลำดับ จากการทำการทดลองทั้งหมด พบว่าสารสกัดที่สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT–๒๙ เกิด DNA fragmentation ได้แสดงดังภาพที่ ๑๐๖ และ ๑๐๗



ภาพที่ ๑๐๖ แสดงผลการชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT–๒๙ เกิด DNA fragmentation ที่ ๒๔ ชั่วโมง L; ๑๐๐ bp DNA Ladder (Vivantis, USA.) หน่วยเป็น kilobases ตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเซลล์ทดสอบนำมา run ใน ๑.๕% agarose gel ด้วย ๐.๕xTBE electrophoresis buffer มีดังนี้

๑)	เซลล์ HT–๒๙ ปกติ (negative control)	๑๐)	–
๒)	เซลล์ HT–๒๙ ปกติ (negative control)	๑๑)	๒๐ mg/ml ฝักถั่วแปป/ต้มน้ำ
๓)	๒๐ mg/ml ผักฮ้วน/ต้มน้ำ	๑๒)	๒ mg/ml ฝักถั่วแปป/ต้มน้ำ
๔)	๒ mg/ml ผักฮ้วน/ต้มน้ำ	๑๓)	๒๐ mg/ml ฝักถั่วแปป/methanol
๕)	๒๐ mg/ml ผักฮ้วน/methanol	๑๔)	๒ mg/ml ฝักถั่วแปป/methanol
๖)	๒ mg/ml ผักฮ้วน/methanol	๑๕)	๒๐ mg/ml ใบถั่วแปป/ต้มน้ำ
๗)	–	๑๖)	๒ mg/ml ใบถั่วแปป/ต้มน้ำ
๘)	–	๑๗)	๒๐ mg/ml ใบถั่วแปป/methanol
๙)	–	๑๘)	๒ mg/ml ใบถั่วแปป/methanol



ภาพที่ ๑๐๗ แสดงผลการชักนำให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เกิด DNA fragmentation ที่ ๗ วัน L; ๑๐๐ bp DNA Ladder (Vivantis, USA.) หน่วยเป็น Kb (kilobases) ตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเซลล์ทดสอบนำมา run ใน ๑.๕% agarose gel ด้วย ๐.๕xTBE electrophoresis buffer มีดังนี้

๑)	๒๐ mg/ml ผักฮ้วน/ต้มน้ำ	๕)	๒๐ mg/ml ฝักถั่วแปป/ต้มน้ำ
๒)	๒๐ mg/ml ผักฮ้วน/methanol	๖)	๒๐ mg/ml ฝักถั่วแปป/methanol
๓)	-	๗)	๒๐ mg/ml ใบถั่วแปป/ต้มน้ำ
๔)	-	๘)	๒๐ mg/ml ใบถั่วแปป/methanol

จากผลการทดลองพบสารสกัดหลายชนิดที่สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เกิด DNA fragmentation ได้ที่ ๒๔ ชั่วโมงของการทดสอบ ประกอบด้วยสารสกัดที่ ๒๐ mg/ml ของ ผักฮ้วนหมู/methanol, ฝักถั่วแปบ/ต้มน้ำ, ใบถั่วแปบ/ต้มน้ำ และใบถั่วแปบ/methanol และสารสกัดที่ ๒ mg/ml ของ ผักฮ้วนหมู/ต้มน้ำ ซึ่งแสดงว่าสารสกัดจาก ผักฮ้วนหมู/ต้มน้ำ แสดงฤทธิ์ชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ เข้าสู่กระบวนการ apoptosis ยืนยันได้ด้วยการตรวจพบ DNA fragmentation ได้ดีที่สุดในกลุ่ม ขณะที่สารสกัดจาก ใบถั่วแปบ/ต้มน้ำ ที่ ๒๐ mg/ml แสดงฤทธิ์ชักนำให้เซลล์มะเร็ง HL-๖๐ เข้าสู่กระบวนการ apoptosis ได้ แต่ต้องใช้เวลาถึง ๗ วันในการทดสอบ ซึ่งผลในส่วนนี้สอดคล้องกับผลจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งทดสอบและผลฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากฝักถั่วแปบทั้งการต้มน้ำและการสกัดด้วย methanol แสดงฤทธิ์ชักนำให้เซลล์มะเร็ง HT-๒๙ และ HL-๖๐ เข้าสู่กระบวนการ apoptosis ได้อย่างน่าสนใจ แม้ว่าสารสกัดจากผักฮ้วนหมูแสดงฤทธิ์อย่างเดียวกัน แต่เมื่อผนวกเข้ากับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งสอง

ชนิดนั้นแล้ว ทำให้สารสกัดหยาบจากฝักของถั่วแปบแสดงศักยภาพที่ดีและควรได้รับการศึกษาในเชิงลึกเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อุปโภคบริโภคที่เหมาะสมได้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

๑. ด้านสภาพพื้นที่และนิเวศวิทยาของ ผักฮ้วน ผักเชียงดา ถั่วแปบและเพกา มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมซึ่งอาศัยอยู่ตามป่าเบญจพรรณทั่วไป แต่เมื่อถูกนำออกจากป่ากลายเป็นพืชปลูก จึงมีสภาพนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยอยู่ในสภาพพื้นที่สวนเกษตร สวนครัว หรือตามสวนผลไม้ ซึ่งมีการดูแลเรื่องน้ำและธาตุอาหารจากเกษตรกร

๒. ด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤกษศาสตร์พบว่า ต้นพันธุ์ผักฮ้วนมีลักษณะใบรูปทรงใบ ลำต้นที่คล้ายคลึงกัน ส่วนต้นพันธุ์ผักเชียงดาพบว่าลักษณะอื่นๆคล้ายคลึงกันแตกต่างกันก็ในส่วนของรูปทรงใบที่มีทั้งใบรีกว้างและใบรียาว สำหรับถั่วแปบมีลักษณะใบและลำต้นคล้ายคลึงกันต่างกันในส่วนของรูปทรงฝักที่มีทั้งแบนใหญ่ แบนเล็ก ฝักกลมยาว ฝักกลมสั้น ขนาดฝักมีทั้งเล็กจนถึงใหญ่ และสีของดอกทั้งสีขาว สีม่วง ขณะที่เพกาแตกต่างกันในส่วนของดอกและสีดอก

๓. ด้านคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผักทั้งสามชนิดพบว่า ดอกของผักฮ้วนมีปริมาณโซเดียม แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมสูงและยังประกอบด้วยวิตามินเอ วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และวิตามินบี๑ สำหรับฝักถั่วแปบมีปริมาณโปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมและประกอบด้วยวิตามินอี วิตามินบี๑ ขณะที่ฝักเพกามีปริมาณโซเดียม แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม วิตามินเอ วิตามินอี และเบต้าแคโรทีนสูง ส่วนปริมาณแอนติออกซิแดนท์ทั้งหมดที่พบในดอกผักฮ้วนและฝักเพกาสูงกว่าฝักถั่วแปบ ผลจากการวิเคราะห์จึงส่งเสริมให้ผักทั้งสามชนิดมีคุณค่าในการบริโภค

๔. ด้านการขยายพันธุ์พบว่า ผักฮ้วนและผักเชียงดาขยายพันธุ์โดยใช้กิ่งชำและเมล็ด ส่วนถั่วแปบและเพกาขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด

๕. ด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่า ผักเชียงดา เพกา และผักฮ้วนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลาง ขณะที่ถั่วแปบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ

๖. ด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของสารสกัดจากผักอ้วน ถั่วแปบและเพกา พบว่า สารสกัดหยาบจากฝักถั่วแปบ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทดสอบ HT–๒๙ (สารสกัดจากการต้มน้ำ) และ HL–๖๐ (สารสกัดด้วย methanol) ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่างพืชที่นำมาทำการทดสอบ ขณะที่สารสกัดหยาบจากพืชชนิดอื่นแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฤทธิ์ชักนำให้เซลล์เกิด apoptosis ได้แตกต่างกันไป

๗. งานวิจัยนี้ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลในการพัฒนาไปเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร นอกจากนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยในผักพื้นบ้านหรือผัก

ชนิดอื่นได้และผลจากการวิจัยสามารถนำไปใช้กับงานวิจัยด้านอื่นได้แก่ งานวิจัยด้านการผลิตพืชสมุนไพร เป็นต้น

บรรณานุกรม

เกศศิณี ตระกูลทิวากร เพลินใจ ดังคณะกุล จันทร์เพ็ญ แสงประกาย จันทร์สุดา จริยวัฒน-วิจิตร พะยอม อัตถวิบูลย์กุล และบุญมา นิยมวิทย์. ๒๕๔๔. ศักยภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย.สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อมูล online, http://vegatableinthailand.com , http://www.abhaiherb.com/

ข้อมูล online , http://th.wikipedia.org/; http://www.sk-hospital.com

โชติอนันต์ และคณะ. ๒๕๕๐. รักษาโรคด้วยสมุนไพรใกล้ตัว. The Knowledge Center, กรุงเทพฯ. ๕๐๓ น.

เต็ม สมิตินันท์. ๒๕๒๓. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรมป่าไม้, ๓๓๙ น.

ประทุมพร ยิ่งธงชัย พรรัตน์ ศิริคำ พงศธร ธรรมถนอม และ บาจารีย์ ฉัตรทอง. ๒๕๕๔. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวเคมีของผักพื้นบ้านไทย. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี ๒๕๕๔ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ๙๓ น.

ประทุมพร ยิ่งธงชัย และ พรรัตน์ ศิริคำ. ๒๕๔๙. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะหลอดโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๙ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ๕๘ น.

ประทุมพร ยิ่งธงชัย รัติกาล ยุทธศิลป์ และ พัชรินทร์ เก่งกาจ. ๒๕๔๙. การจำแนกวานิลลาโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. ว. วิทย.กษ. ๓๗(๖) (พิเศษ) : ๒๓๕-๒๓๘.

สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ๒๕๔๒. ผักพื้นบ้านภาคเหนือ. ๒๘๐ น.

สำนักพิมพ์แสงแดด.๒๕๔๘. ผักพื้นบ้าน อาหารไทย. บริษัทสำนักพิมพ์แสงแดด จำกัด กรุงเทพฯ. ๒๘๖ น.

Cavan, G., V. Potier, and S.R. Moss. 2000. Genetic diversity of weeds growing in continuous wheat. Weed Res. 40: 301-310.

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.

El-Shemy, H.A., Aboul-Enein, Aboul-Enein, K. M. and Fujita K. (2007). Willow Leaves' Extracts Contain Anti-Tumor Agents Effective against Three Cell Types. PLoS ONE | www.plosone.org , (1) 178: 1-5

Lijun, Ou. and Xuexiao, Z. 2012. Inter simle sequence repeat analysis of genetic diversity of five cultivated pepper species. Afr. J. Biotechnol. 11(4): 752-757.

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.

Mertz, O.,1999. Cultivation potential of two edible ferns, *Diplazium esculentum* and *Stenochlaena palustri s*. Tropical Agri. 76: 10-16.

Noor Camelllia, N. A., Thohirah lee, A., and Abdullah, N. A. P. 2012. Genetic relationships and diversity of *Jatropha curcas* accessions in Malaysia. Afr. J. of Biotechnol. 11(13): 3048-3054.

Rohlf, F. J. 2005. NTSYSpc : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.2. Exeter Software, Setauket, New York.

Terozopoulos, P. J., B. Kolano, P. J. Bebeli, P.J. Kaltsikes and I. Meetzidakis. 2005. Identifiaction of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. Hort. Sci. 105:45-51.

Zhang, X.-P., X.-H. Li and Y.-X. Qiu. 2005. Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China. Biochem. Syst. Ecol. In press.

ภาคผนวก

๑. รายชื่อสารเคมีสำคัญที่ต้องใช้ในงานวิจัย

๑.๑ สำหรับเตรียมบัพเฟอร์อิเลกโทรโฟรีซิส

–Tris base

– boric acid

– Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA)

– glacial acetic acid

–Tris hydrochloride

๑.๒ สำหรับสกัดดีเอ็นเอ และ PCR

–DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

– PCR Master mix solution (*i*–Taq)

๑.๓ สำหรับเตรียม Loading buffer

– bromphenol blue

– xylene cyanol

– glycerol

๑.๕ สารเคมีอื่นๆ

–Ethidium bromide

–Agarose

–DNA ladder

–Liquid nitrogen

๒. การเตรียมบัพเฟอร์ต่างๆที่ใช้ในการทำวิจัย

๒.๑ การเตรียม ๑๐x TBE (๑L) : ๑๐๘ g Tris base

๕๕ g boric acid

๔๐.๐ ml ๐.๕ M EDTA (pH ๘.๐)

๒.๒ การเตรียม ๐.๕ M EDTA pH ๘.๐ :

ชั่ง EDTA ๑๘.๖๑๒ g ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย เติม ๑๐ N NaOH หรือ NaOH แบบเม็ด ปรับ pH ให้ได้ ๘.๐ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น ๑๐๐ ml.

๒.๓ การเตรียม TE buffer (๑๐๐ ml.): ๑M Tris pH ๘.๐ ๑ ml.
๐.๕ EDTA pH ๘.๐ ๐.๒ ml.
น้ำกลั่น ๒ ครั้งที่นึ่งแล้ว ๙๘.๘ ml.

๒.๔ การเตรียม อะกาโรสเจล (Agarose gel)

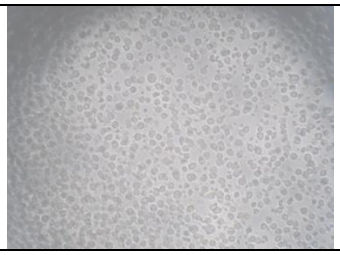
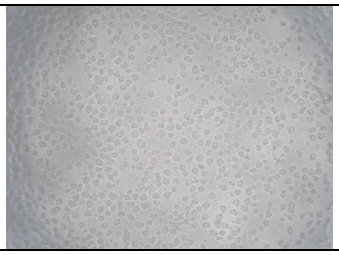
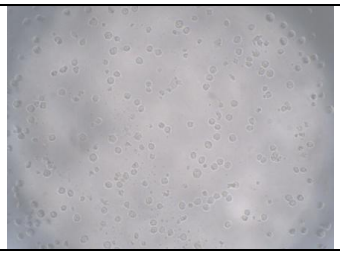
–Agarose gel ความเข้มข้น ๐.๘ % :

ชั่งอะกาโรส ๐.๘ g เติม TBE หรือ TAE buffe ๑๐๐ ml. หลอมโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราว ให้อะกาโรสละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ๕๐–๕๕ องศาเซนเซียส แล้วจึงเทลงในถาดเทเจล เสียบหวีลงตรงตำแหน่ง ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

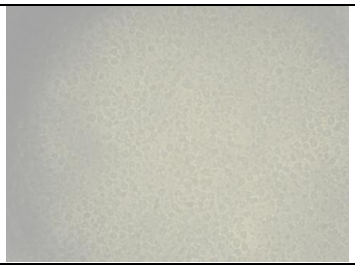
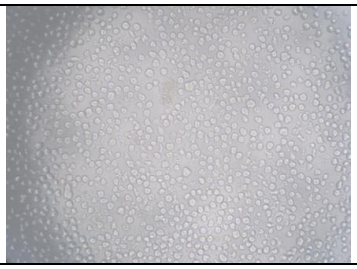
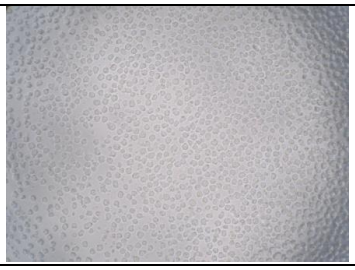
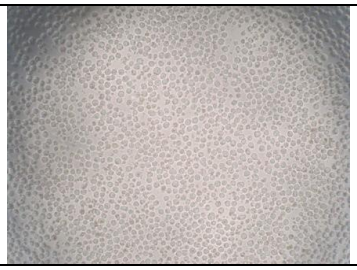
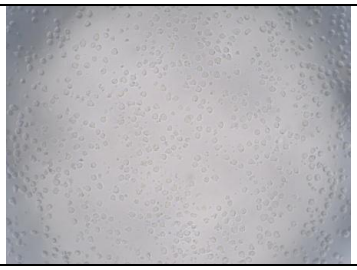
–Agarose gel ความเข้มข้น ๑.๕ % :

ชั่งอะกาโรส ๑.๕ g เติม TBE หรือ TAE buffe ๑๐๐ ml. หลอมโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราว ให้อะกาโรสละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ๕๐–๕๕ องศาเซนเซียส แล้วจึงเทลงในถาดเทเจล เสียบหวีลงตรงตำแหน่ง ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

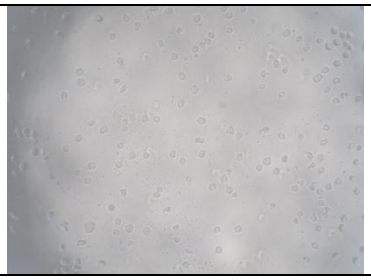
<u>ภาพประกอบ</u> ตอน ๑ แสดงภาพจากการติดตามการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ HL-๖๐ ที่ถูกทดสอบสอบด้วยสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้น ๒๐ และ ๒ mg/ml final concentration และติดตามสังเกต ๔ ช่วงเวลาคือ ๔, ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง

	20 mg/ml	**2 mg/ml**	
๔ ชั่วโมง			**ผักฮ้วนหมู/ ต้มน้ำ**
๔ ชั่วโมง			**ผักฮ้วนหมู/ methanol**
๔ ชั่วโมง			**ฝักถั่วแปบ/ ต้มน้ำ**

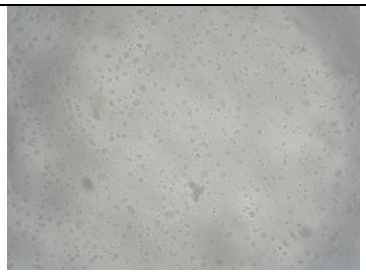
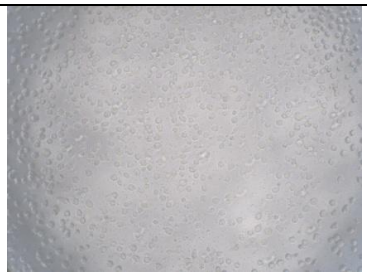
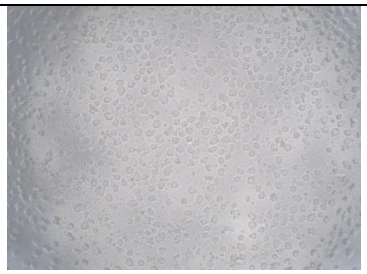
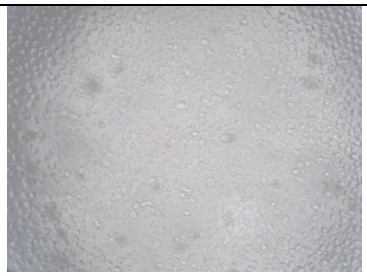
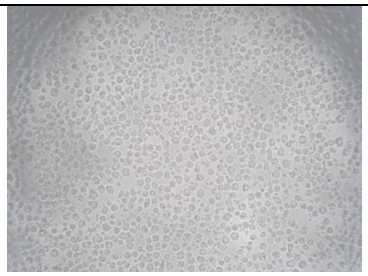
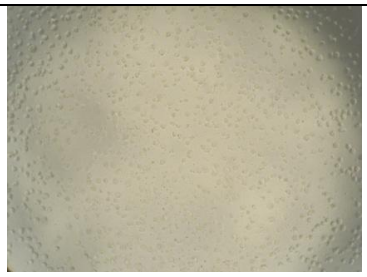
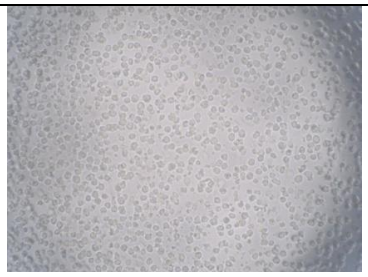
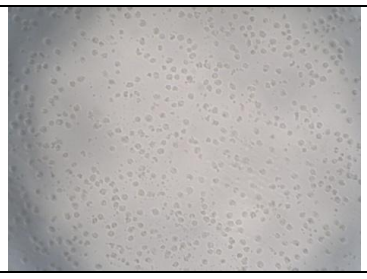
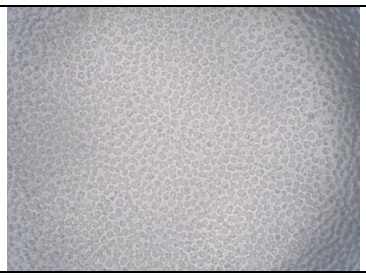
ภาพที่ ๑. แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๔ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๔ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ methanol
๔ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ ต้มน้ำ
๔ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ methanol
๔ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ ต้มน้ำ
๔ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ methanol

ภาพที่ ๒ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๔ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๒๔ ชั่วโมง			ผักฮ้วนหมู/ ต้มน้ำ
๒๔ ชั่วโมง			ผักฮ้วนหมู/ methanol
๒๔ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ ต้มน้ำ

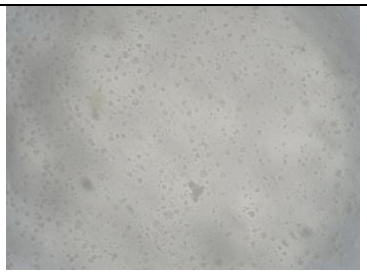
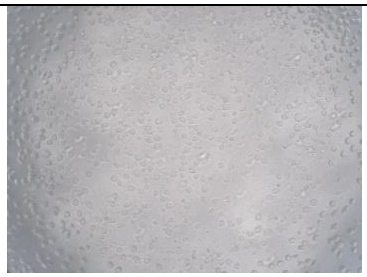
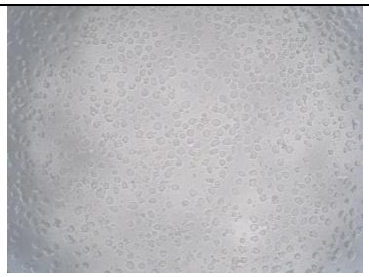
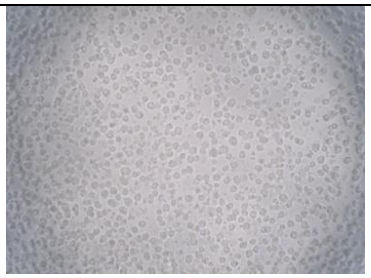
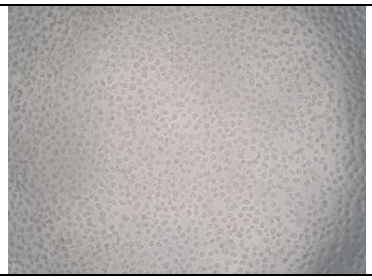
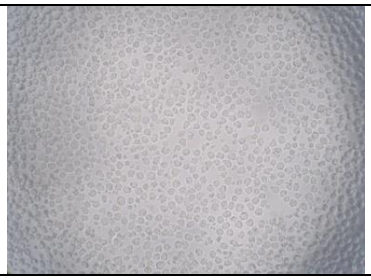
ภาพที่ ๓ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๒๔ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ methanol
๒๔ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ ต้มน้ำ
๒๔ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ methanol
๒๔ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ ต้มน้ำ
๒๔ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ methanol

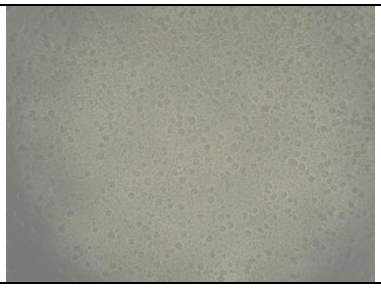
ภาพที่ ๔ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๔๘ ชั่วโมง			ผักฮ้วนหมู/ ต้มน้ำ
๔๘ ชั่วโมง			ผักฮ้วนหมู/ methanol
๔๘ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ ต้มน้ำ

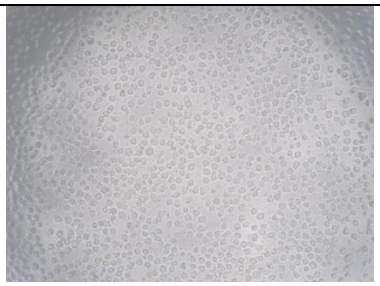
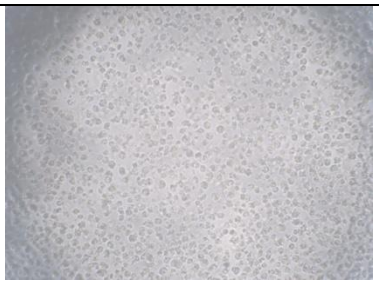
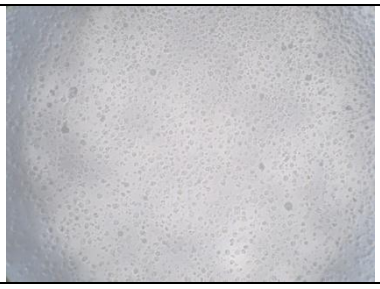
ภาพที่ ๕. แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๔๘ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ methanol
๔๘ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ ต้มน้ำ
๔๘ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ ต้มน้ำ
๔๘ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ methanol

ภาพที่ ๖ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL–๖๐ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

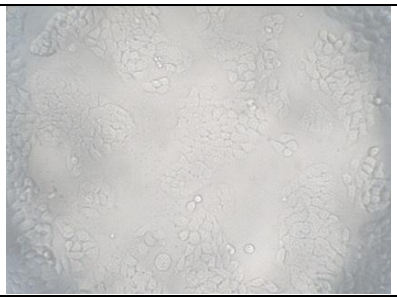
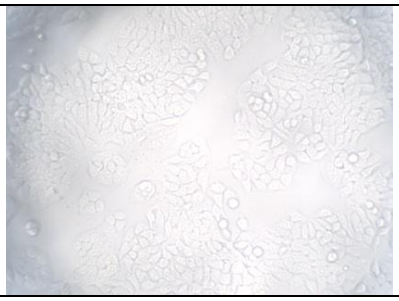
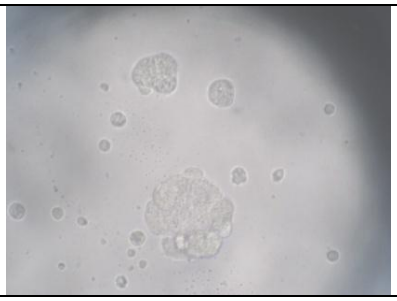
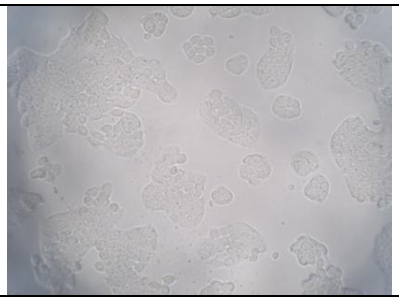
	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๗๒ ชั่วโมง			ผักฮ้วนหมู/ ต้มน้ำ
๗๒ ชั่วโมง			ผักฮ้วนหมู/ methanol
๗๒ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ ต้มน้ำ

ภาพที่ ๗/ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

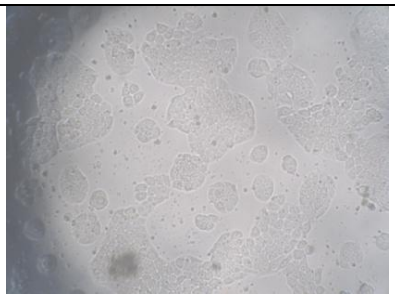
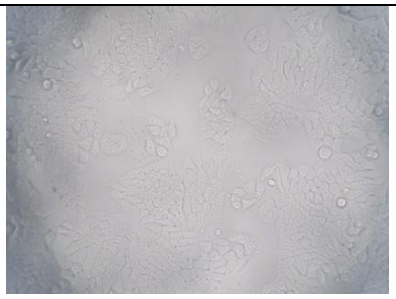
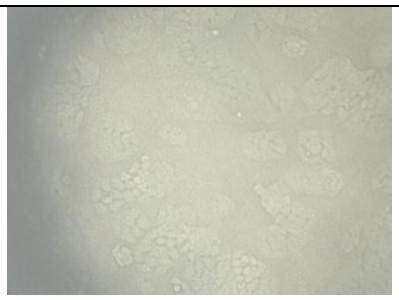
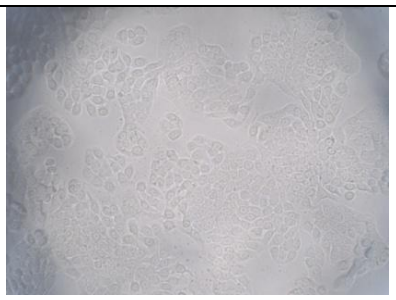
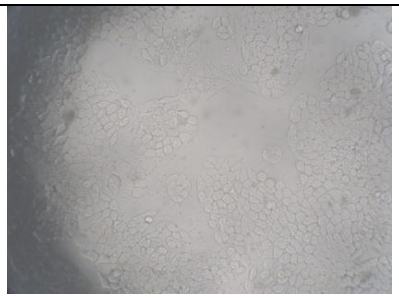
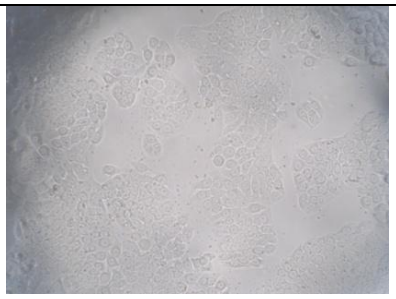
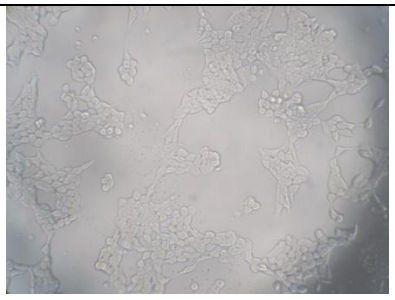
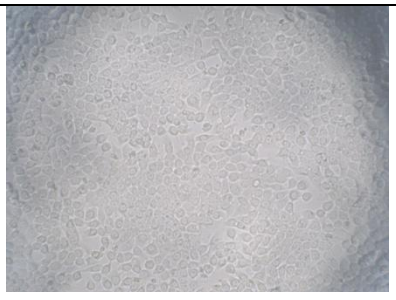
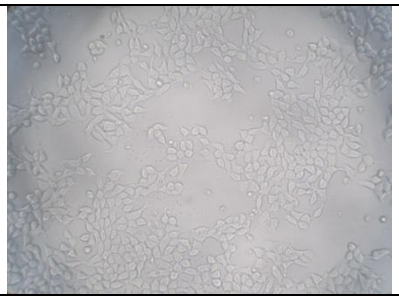
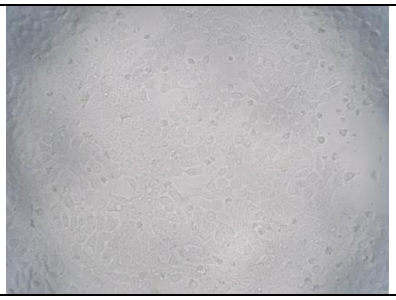
	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๗๒ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ methanol
๗๒ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ ต้มน้ำ
๗๒ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ methanol
๗๒ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ ต้มน้ำ
๗๒ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ methanol

ภาพที่ ๘. แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HL-๖๐ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

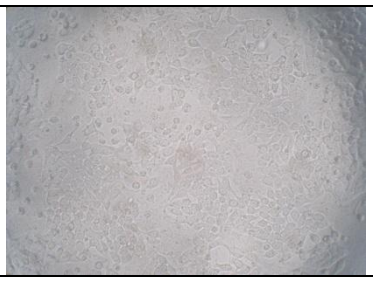
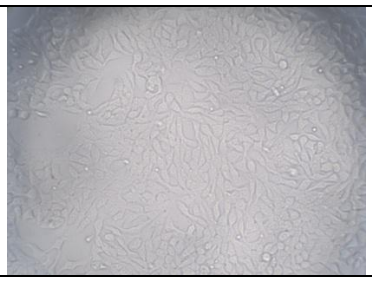
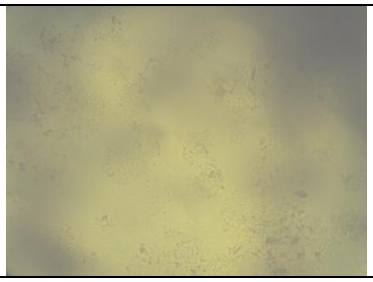
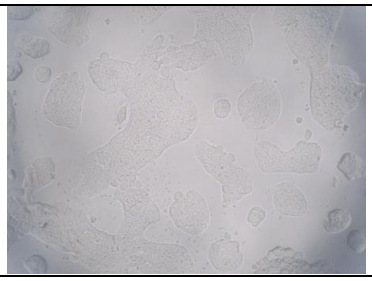
<u>ตอนที่ ๒</u> แสดงรูปจากการติดตามการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ HT-๒๙ ที่ถูกทดสอบสอบด้วยสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้น ๒๐ และ ๒ mg/ml final concentration และติดตามสังเกต ๔ ช่วงเวลาคือ ๔, ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง (hr.)

	๒๐ mg/ml	**๒ mg/ml**	
๔ ชั่วโมง			**ผักฮ้วนหมู/ต้มน้ำ**
๔ ชั่วโมง			**ผักฮ้วนหมู/ methanol**
๔ ชั่วโมง			**ฝักถั่วแปบ/ต้มน้ำ**

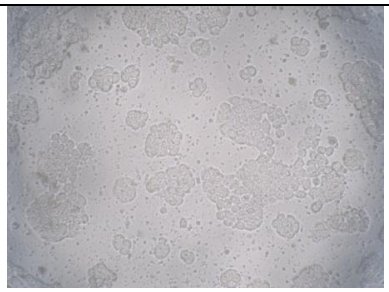
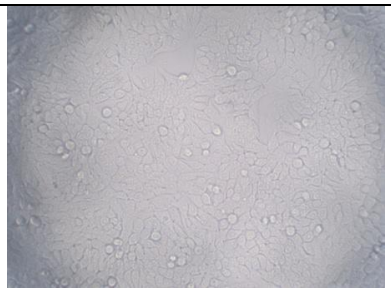
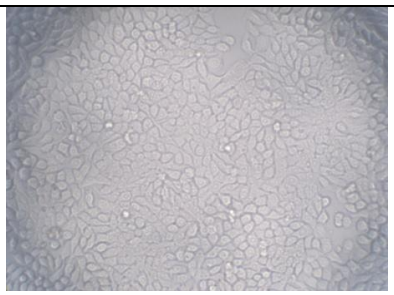
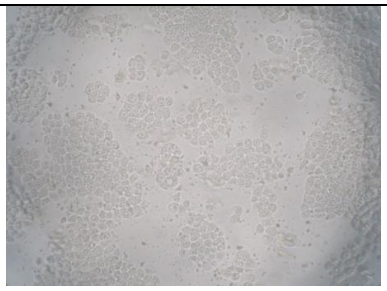
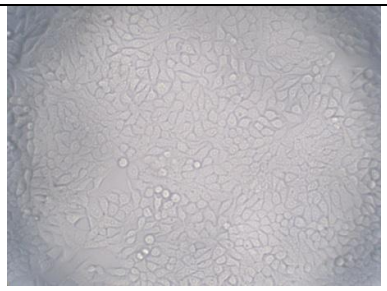
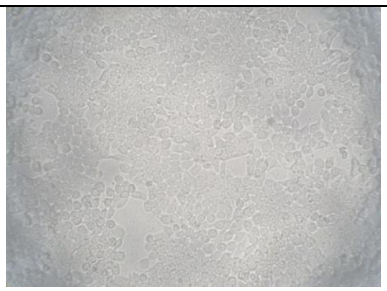
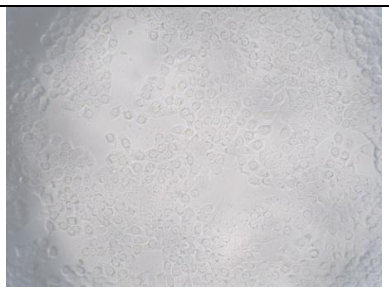
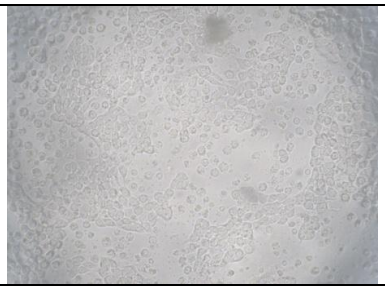
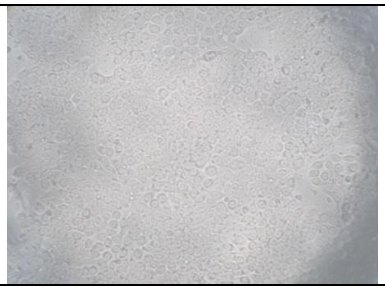
ภาพที่ ๙ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๔ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยายเท่า ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๔ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ methanol
๔ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ ต้มน้ำ
๔ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ methanol
๔ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ ต้มน้ำ
๔ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ methanol

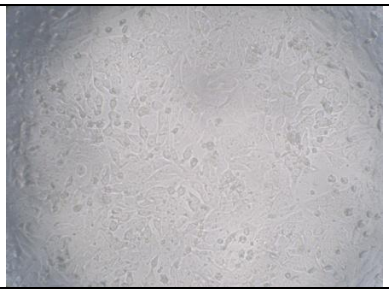
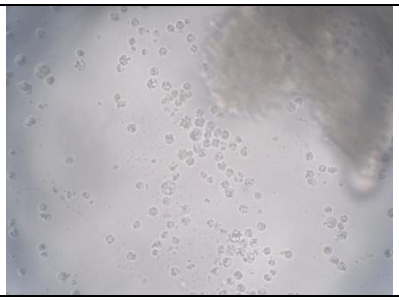
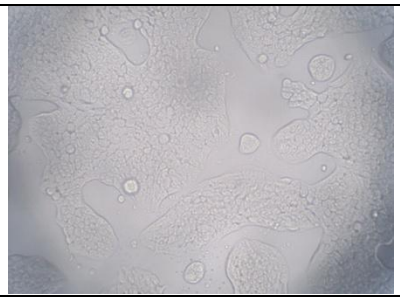
ภาพที่ ๑๐ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๔ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๕๐เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๒๔ ชั่วโมง			**ผักฮ้วนหมู/ ต้มน้ำ**
๒๔ ชั่วโมง			**ผักฮ้วนหมู/ methanol**
๒๔ ชั่วโมง			**ฝักถั่วแปบ/ ต้มน้ำ**

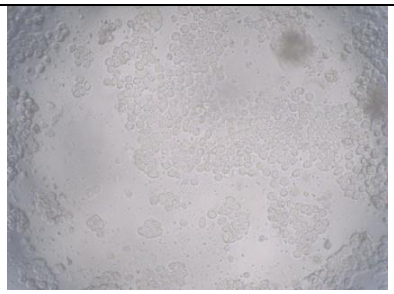
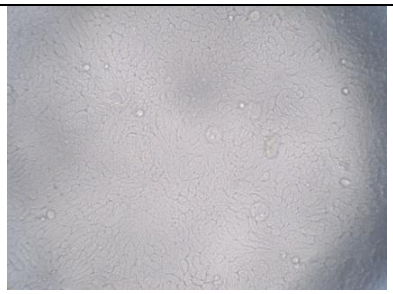
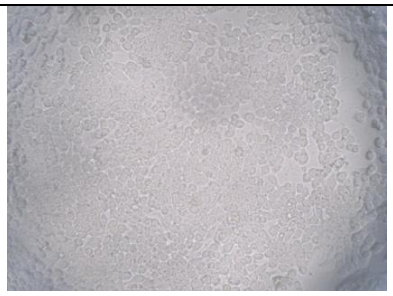
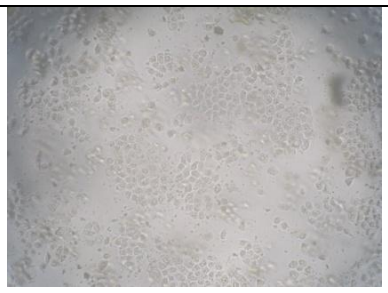
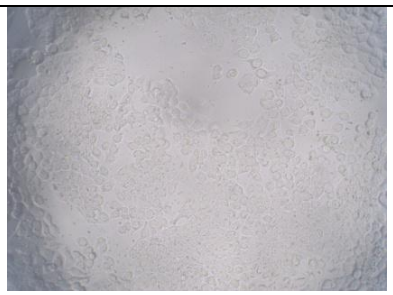
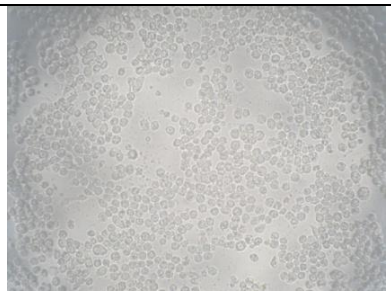
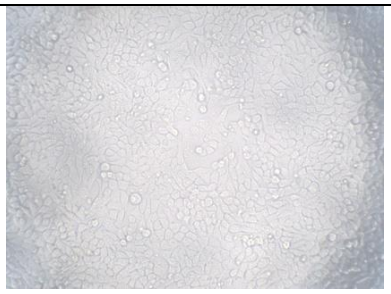
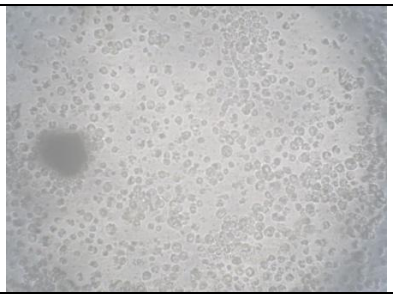
ภาพที่ ๑๑. แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๒๔ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปป/ methanol
๒๔ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ ต้มน้ำ
๒๔ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ methanol
๒๔ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ ต้มน้ำ
๒๔ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ methanol

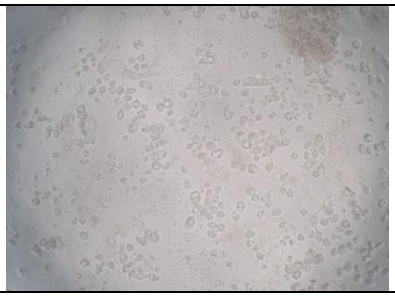
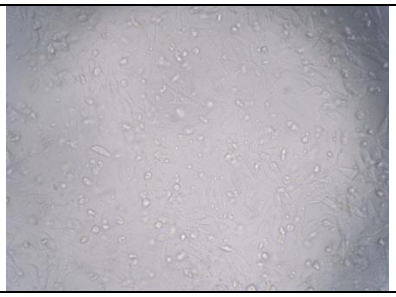
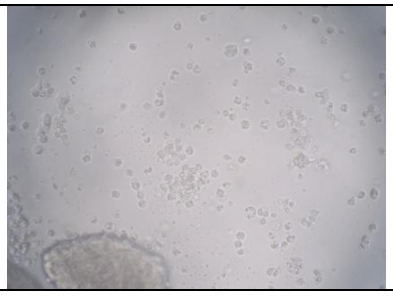
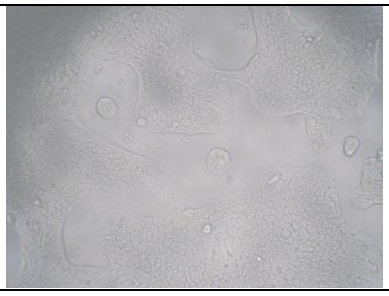
ภาพที่ ๑๒ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๔๘ ชั่วโมง			**ผักฮ้วนหมู/ ต้มน้ำ**
๔๘ ชั่วโมง			**ผักฮ้วนหมู/ methanol**
๔๘ ชั่วโมง			**ฝักถั่วแปบ/ ต้มน้ำ**

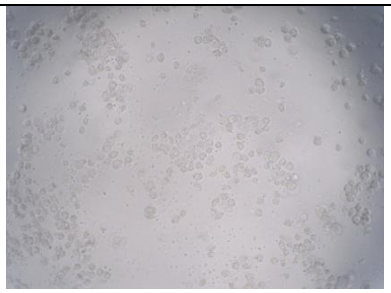
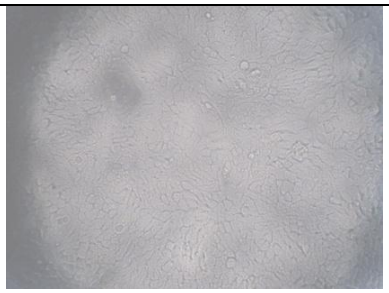
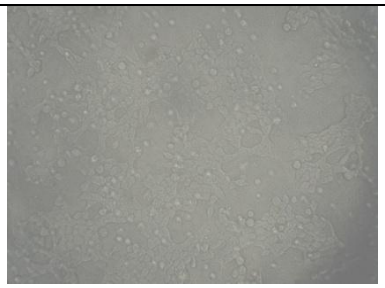
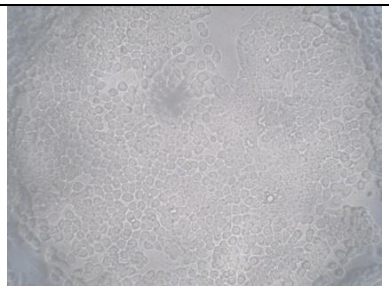
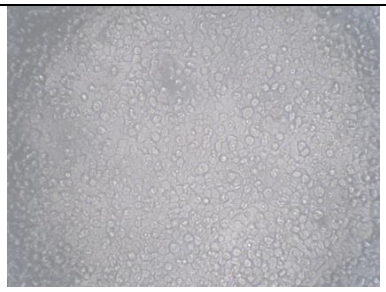
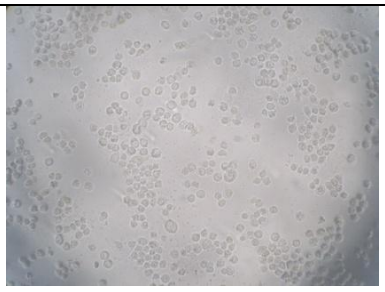
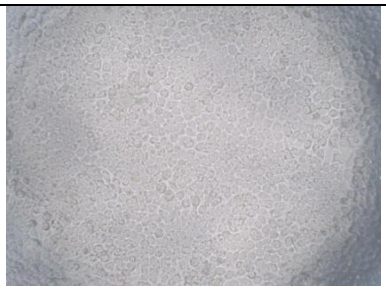
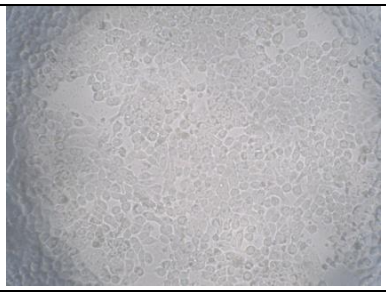
ภาพที่ ๑๓ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็น เวลา ๔๘ ชั่วโมง (ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๔๘ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ methanol
๔๘ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ ต้มน้ำ
๔๘ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ methanol
๔๘ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ ต้มน้ำ
๔๘ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ methanol

ภาพที่ ๑๔. แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๗๒ ชั่วโมง			ผักฮ้วนหมู/ ต้มน้ำ
๗๒ ชั่วโมง			ผักฮ้วนหมู/ methanol
๗๒ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ ต้มน้ำ

ภาพที่ ๑๕. แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า

	๒๐ mg/ml	๒ mg/ml	
๗๒ ชั่วโมง			ฝักถั่วแปบ/ methanol
๗๒ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ ต้มน้ำ
๗๒ ชั่วโมง			ใบถั่วแปบ/ methanol
๗๒ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ ต้มน้ำ
๗๒ ชั่วโมง			ฝักเพกา/ methanol

ภาพที่ ๑๖. แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological changes) ของเซลล์มะเร็ง HT-๒๙ จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่ ๒๐ และ ๒ mg/ml เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง ภาพที่ได้ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย ๔๐ เท่า