รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์จีโนมและสารเคมีในพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

โดย ศาสตราจารย์อรุณรัตน์ ฉวีราช และคณะ

15 กรกฎาคม 2558

สัญญาเลขที่ RSA5580054

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์จีโนมและสารเคมีในพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

ศ.ดร.อรุณรัตน์ ฉวีราช มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.รุ่งลาวัลย์ สุดมูล มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ดร.ธวัดชัย ธานี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยขอนแก่นไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุนเงินทุนในโครงการวิจัยนี้ภายใต้ทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สัญญาเลขที่ RSA5580054

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA5580054

ชื่อโครงการ: การวิเคราะห์จีโนมและสารเคมีในพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

นักวิจัย: อรุณรัตน์ ฉวีราช มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รุ่งลาวัลย์ สุดมูล มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ธวัดชัย ธานี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

E-mail Address: raccha@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 16 กรกฎาคม 2555 – 15 กรกฎาคม 2558

พลู *Piper betle* เป็นพืชที่คนไทยรู้จักและใช้มาช้านาน มีสารเคมีสำคัญหลายอย่างซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัฑณ์มากมาย พลูจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญแต่ในการปลูกมักประสบปัญหารากเน่า ใบเน่า และใบจุด จากการสำรวจและศึกษาพืชสกุลพริกไทยมากว่า 12 ปี ทำให้ทราบว่าประเทศไทยมีพืชสกุลนี้กว่า 43 ชนิด ดังนั้นจึงควรมีการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลนี้และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในพืชบางชนิด เนื่องจากมักมีการนำพืชมาใช้แบบแปรรูปเป็นสมุนไพรหรือประกอบในผลิตภัณฑ์อื่นดังนั้นจึงได้สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดเพื่อใช้ในการระบุชนิดชิ้นส่วนพืช พืชที่ยังอ่อนหรือพืชแปรรูป จากบริเวณ *mat*K gene, *rbc*L gene และ *psb*A-*trn*H spacer สำหรับพืชสกุลพริกไทย 36 ชนิดที่เก็บตัวอย่างได้ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ทั้งสิ้น 190 accessions ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดเนื่องจากภายในชนิดเดียวกันมีค่าต่ำ มีเพียงพลูชนิดเดียวที่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมบริเวณ *mat*K gene สูงถึง 0.386 ทั้งนี้อาจเนื่องจากพลูเป็นพืชเศรษฐกิจและมีการปลูกเลี้ยงโดยมนุษย์ซึ่งให้ปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตปัจจัยเหล่านั้นจึงมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลู ในระหว่างชนิดพืชค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมีประสิทธิภาพในการระบุชนิดเช่นเดียวกัน โดยบริเวณ *mat*K gene มีค่าระหว่าง 0.002 ถึง 0.486 มีเพียง 8 คู่ ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วยบริเวณ *mat*K gene แต่สามารถระบุชนิดได้ด้วยบริเวณ *rbc*L gene หรือ *psb*A-*trn*H spacer จากการสำรวจชนิดยังได้พบว่ามีพืชอีก 8 ชนิด ที่มีกลิ่นเหมือนพลู ได้แก่ *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum*, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve*, *P. tricolor* และ *P. yinkiangense* ซึ่งคาดว่าจะมีสารเคมีที่สำคัญคล้ายกับพลูจึงได้สกัดกสารจากพืชทั้ง 9 ชนิด และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารที่เหมือนในพลู ได้แก่ eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, germacrene A and germacrene D และ sesquiterpenes และได้นำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรค พบว่า สารสกัด *P. rubroglandulosum* และ *P. yinkiangense* ที่ไม่เจือจางมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* สารสกัด *P. betloides* ที่ไม่เจือจาง และสารสกัด *P. maculaphyllum* ทุกระดับความเข้มข้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ

Staphylococcus aureus ดังนั้น *P. maculaphyllum* จึงเป็นพืชที่น่าสนใจที่สุดเนื่องจากสารสกัดที่เจือจางก็สามารถยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคหลายชนิดในมนุษย์ได้ ต่อมาได้ประเมินปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 9 ชนิด พบว่าพลูให้ปริมาณสูงที่สุด คือ 2.73 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ขณะที่พืชป่าที่ให้ปริมาณสูงสุดคือ *P. tricolor* ได้ 0.76 มิลลิลิตร/กิโลกรัม สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ eugenol/isoeugenol, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene, L-linalool, α-terpineol, β-terpineol, β-selinene, butylated hydroxytoluene, trans-caryophyllene, α-caryophyllene, germacrene D และ β-elemene

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสามารถเสนอได้ว่ามนุษย์สามารถผลิตยาจากพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลูทั้ง 8 ชนิดนี้ได้ทั้งในระดับท้องถิ่นและระดับอุตสาหกรรม จากที่ปัจจุบันใช้ได้เพียงพลูชนิดเดียว ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าพืชทั้ง 8 ชนิดนี้มีศักยภาพในทางอุตสาหกรรมเช่นเดียวกับพลู นอกจากนี้แล้วพืชทั้ง 8 ชนิดยังเป็นพืชป่าซึ่งมีความแข็งแรง ทนต่อโรค แตกกิ่งและใบได้มากกว่าพลูอีกด้วย การใช้พืชหลากหลายชนิดเป็นแนวทางการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืนและยังนำไปสู่การจัดการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติอีกด้วย

คำหลัก: เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด, น้ำมันหอมระเหย, พืชสกุลพริกไทย, พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู, พฤกษเคมี

Abstract

Project Code:	RSA5580054	
Project Title:	Analysis of genomics and chemicals in betel-like-scented *Piper* species	
Investigators:	Arunrat Chaveerach	Khon Kaen University
	Runglawan Sudmoon	Khon Kaen University
	Tawatchai Tanee	Mahasarakham University
E-mail Address:	raccha@kku.ac.th	
Project Period:	16 July 2012 – 15 July 2015	

Piper betle (Piperaceae) or betel leaf, known locally as “Phlu” has been used by people in Thailand for chewing for a long time. It contains economically important chemicals used in several household products. However, it was reported that root rot, leaf rot and leaf spot are important problems for its cultivations. Over the past 12 years of our researches on *Piper* species, we found that there are more than 43 species. Therefore, the plants should be DNA barcoding constructed and screened for their chemical constituents. As of the *Piper* species are usually used in processed forms for medicines and other products, barcode construction using *mat*K gene, *rbc*L gene and *psb*A-*trn*H spacer regions has been done for serving identification of plant parts, young plants and modified forms in 36 collected species. The 190 sequence accessions have been recorded in GenBank. At intraspecific levels, the genetic distances are most effective for a species identification starting from same sequence or no difference in each species to very low distance values. Only *P. betle* posted the highest values at 0.386 of *mat*K gene, this may be because it is an economic and cultivated species, so is supported growth factors from human affected on its genetic distance. The genetic distances at interspecific level are also most effective for different species identification by *mat*K gene ranged from 0.002 to 0.486, excepted for eight species-pair which could be identified by each of the other two regions without of combination. There are some plants other than *P. betle* that possess a betel-like scent, viz. *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum*, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve*, *P. tricolor*, and *P. yinkiangense*. It was expected that these plants would contain similar useful chemicals as betel, their extracts were screened for the chemical contents by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The extracts contain some important chemical substances that are similar to the betel extract, namely, eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, germacrene A and germacrene D, and sesquiterpenes. Different dilutions of these extracts were tested for inhibitory activity

against pathogenic bacteria and fungi. Effectiveness against *Pseudomonas aeruginosa* was found with undiluted *P. rubroglandulosum* and *P. yinkiangense* extracts, and effectiveness against *Staphylococcus aureus* was observed with undiluted *P. betloides* extract and all concentrations of *P. maculaphyllum* extract. Therefore, the most interesting species is *P. maculaphyllum*, as it was effective against *S. aureus*, which causes many human diseases. Volatile oil quantity and chemical components were detected in the nine species by GC-MS. The oil quantity is highest in the cultivated *P. betle* species at 2.73 mL/kg, while wild species had a highest amount at 0.76 mL/kg in *P. tricolor*. Substances found in a satisfactory amount include eugenol/isoeugenol, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene, L-linalool, α-terpineol, β-terpineol, β-selinene, butylated hydroxytoluene, trans-caryophyllene, α-caryophyllene, germacrene D, and β-elemene.

From the chemical constituents and the extract activities, it is suggested that human population can benefit from both local and industrial medicines produced from the eight betel-like-scented *Piper* species, which to date have only been produced from betel leaves. The results also indicate that the eight plant species would have as high a potential as *P. betle* for industrial purposes. Moreover, as the plants are wild species they have a greater vigor, thus growing well and with more branching than betel. The diverse *Piper* species studied and documented are important for sustainable uses and can enable conservation management of natural resouces.

Keywords : betel-like-scented *Piper* species, DNA barcode, essential oil, phytochemicals, *Piper* species

สรุปย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ คือ 1) เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดสำหรับพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย 2) เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลูเทียบกับพลู *Piper betle* 3) เพื่อประเมินน้ำมันหอมระเหย (essential oils) จากพืชเหล่านี้ และ 4) เพื่อหาแหล่งวัตถุดิบสำหรับสารเคมีที่สำคัญ เช่น chavicol, eugenol, myristicin, piperine, และ safrole ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าหรือเทียบเท่ากับพลู จึงได้ตรวจเอกสารและสำรวจข้อมูลที่เกี่ยวข้องในการวิจัยจากแหล่งที่มีการใช้พืชสกุลพริกไทยทั้งในแง่เป็นอาหาร ยารักษาโรค ปลูกประดับและใช้ในประเพณีหรือพิธีกรรม ได้เดินทางไปศึกษาการใช้พืชกลุ่มนี้ในภูมิภาคต่างๆ ทำให้ทราบว่าพลูสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พลูเหลืองหรือพลูนวล และพลูเขียว พืชสกุลพริกไทยที่รู้จักกันดีทั่วทุกภูมิภาคและมีการนำมาใช้ประโยชน์ ได้แก่ พลู พริกไทย *P. nigrum* ชะพลู *P. sarmentosum* ดีปลี *P. retrofractum* พริกหาง *P. longum* และพลูป่า *P. rubroglandulosum* โดยมีสรรพคุณทางสมุนไพรหลายประการ เช่น แก้ปวดฟัน แก้ปวดท้อง แก้ลมพิษ ขับลม ขับเสมหะ บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ และบำรุงโลหิต

เก็บตัวอย่างพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยได้ทั้งสิ้น 36 ชนิด สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดจากบริเวณ *mat*K gene, *rbc*L gene และ *psb*A-*trn*H spacer ได้สำเร็จในเกือบทุกชนิด มีเพียงสองชนิดคือ *P. montium* และ *P. rubroglandulosum* (♀) ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณ *mat*K gene ได้ บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเหล่านี้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Piper+Thailand) ทั้งสิ้น 190 accessions พบว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ *mat*K gene ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเหมาะสมต่อการนำมาใช้ระบุชนิด มีเพียงบางชนิดที่ต้องระบุชนิดด้วยบริเวณ *rbc*L gene หรือ *psb*A-*trn*H spacer

จากการประเมินด้วยการดมพบว่าพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลูมี 8 ชนิด ได้แก่ พลูดอยสุเทพ *P. betloides* พลูลงยา *P. crocatum* พลูลงยา *P. maculaphyllum* พลูป่า *P. rubroglandulosum* พลูขน *P. semiimmersum* พลูชมพู *P. submultinerve* พลูสามสี *P. tricolor* และพลูจีน *P. yinkiangense* จึงได้เก็บตัวอย่างพลูและพืชเหล่านี้รวม 9 ชนิด มาสกัดสารเคมีโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เฮกเซน (hexane) และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารที่สำคัญในพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลู ได้แก่ eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, germacrene A, germacrene D และ sesquiterpenes ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้พบในพลูด้วย ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชทั้ง 9 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* โดย แบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ที่นำมาทดสอบนี้ เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้มาก ในประเทศเขตร้อน พบว่าชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ *P. rubroglandulosum* เพศผู้, *P. yinkiangense*, *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* โดยสารสกัด *P. rubroglandulosum* และ *P. yinkiangense* ที่ไม่เจือจางมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัด *P. betloides* ที่ไม่เจือจาง และสาร

สกัด *P. maculaphyllum* ที่ทุกระดับการเจือจางมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* โดยฤทธิ์การยับยั้งเหล่านี้มีค่าสูงกว่าสารสกัดจากพลูในการทดลองเดียวกัน พืชที่น่าสนใจที่สุดคือ *P. maculaphyllum* เนื่องจากแม้ความเข้มข้นต่ำก็มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์หลายโรค นอกจากนี้ยังได้กลั่นน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 9 ชนิด โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ เพื่อเทียบสัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยเทียบกับน้ำหนักใบสดจากพืชแต่ละชนิด พบว่าพลูให้น้ำมันหอมมากที่สุด คือ 2.73 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ขณะที่พืชป่าที่ให้ปริมาณสูงสุดคือ *P. tricolor* ได้ 0.76 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ส่วนชนิดที่ให้น้ำมันหอมน้อยที่สุดคือพลูลลงยา *P. crocatum* ซึ่งได้เพียง 0.03 มิลลิลิตร/กิโลกรัม สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ eugenol/isoeugenol, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene, L-linalool, α-terpineol, β-terpineol, β-selinene, butylated hydroxytoluene, trans-caryophyllene, α-caryophyllene, germacrene D และ β-elemene

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสามารถเสนอได้ว่าประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากพืชนี้ได้ทั้งการบริโภคในระดับท้องถิ่นหรือการปลูกเป็นจำนวนมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปแทนการใช้ใบพลูเพียงอย่างเดียวในกรณีที่พลูเกิดโรคหรือขาดแคลนในบางฤดู ผลการวิจัยยังชี้ให้เห็นว่าพืชทั้ง 8 ชนิดนี้มีศักยภาพในทางอุตสาหกรรมเช่นเดียวกับพลู นอกจากนี้แล้วพืชทั้ง 8 ชนิดยังเป็นพืชป่าซึ่งมีความแข็งแรง ทนต่อโรค แตกกิ่งและใบได้มากกว่าพลูอีกด้วย การใช้พืชหลากหลายชนิดเป็นแนวทางการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืนและยังนำไปสู่การจัดการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติอีกด้วย

ผลที่ได้จากการวิจัยนำไปสู่การผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย คือ สบู่ก้อน สบู่เหลว และสเปรย์ระงับกลิ่น เมื่อนำไปทดสอบโดยอาสาสมัครพบว่า สบู่ก้อนและสบู่เหลวมีคุณสมบัติลดอาการคันและการอักเสบของผิวหนังได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสเปรย์ระงับกลิ่น ช่วยลดกลิ่นเท้าได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน งานวิจัยนี้ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในฐานข้อมูลที่ สกว. ยอมรับทั้งสิ้น 5 เรื่อง โดย ตีพิมพ์แล้ว 1 เรื่อง อยู่ระหว่างการตีพิมพ์ 1 เรื่อง และกำลังส่งเพื่อรับพิจารณาให้ตีพิมพ์ อีก 3 เรื่อง

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	9
2.1 การเก็บตัวอย่าง	9
2.2 การสกัดและตรวจสอบดีเอ็นเอ	9
2.3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA Barcoding)	10
2.4 การสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลาย	12
2.5 การกลั่นและแยกน้ำมันหอมระเหยจากใบพลู	12
2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากพืชและน้ำมันหอมระเหย	12
2.7 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืช	13
บทที่ 3 ผลการวิจัย	15
3.1 การใช้ประโยชน์จากพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย	15
3.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทยที่พบในประเทศไทย	17
3.3 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากพืช	29
3.4 ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	44
3.5 ปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย	49
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	63
4.1 การใช้ประโยชน์พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย	63
4.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcoding)	63
4.3 องค์ประกอบทางเคมีของพลูและพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลู	64
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก ผลงานจากโครงการวิจัย	71

บทที่ 1
บทนำ

พรรณพฤกษชาติสกุลพริกไทย (genus *Piper*) นั้น เป็นพืชกลุ่มหนึ่งที่มีความน่าสนใจยิ่ง เนื่องจากหลายชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น เครื่องเทศ ยาสมุนไพร ยาฆ่าแมลง (Srivastava et al., 2001; Chaveerach et al., 2006a; Fan et al., 2011) พลู *Piper betle* เป็นชนิดหนึ่งที่เป็นที่รู้จักกันดี มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีความสำคัญ คือ คาวิคอล (chavicol) ซิเนออล (cineol) ยูจีนอล (eugenol) เป็นต้น (Yusoff et al., 2005; Misra et al., 2009) มีรายงานว่า ยูจีนอลมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและต้านการอักเสบ (Misra et al., 2009) จึงมีการนำพลูมาปลูกเพื่อการค้าอย่างแพร่หลาย แต่มีปัญหาในการปลูกคือ พลูมักจะเกิดโรคใบเน่าจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* Dast. (Silayoi et al., 1985; Banka and Teo, 2000) และใบจุดจากเชื้อแบคทีเรีย (Banka and Teo, 2000)

การสำรวจพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย (Chaveerach et al., 2008, อรุณรัตน์ ฉวีราชและคณะ, 2552) พบว่ามีบางชนิดที่มีกลิ่นเหมือนพลู ได้แก่ *P. betloides* Chaveer. & Tanomtong, *P. crocatum* Ruiz et Pavon, *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon, *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mokkamul, *P. semiimmersum* C.DC., *P. submultinerve* C.DC., *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon, *P. tricolor* Y.C.Tseng, and *P. yinkiangense* Y.C.Tseng ซึ่งล้วนเป็นพืชป่า เจริญเติบโตได้ดี แตกกิ่งและใบได้มาก และยังแข็งแรงมีความต้านทานต่อโรค นอกจากนี้บางชนิดยังมีกลิ่นแรงกว่าพลูอีกด้วย ดังนั้นจึงคาดว่าพืชเหล่านี้น่าจะมีศักยภาพเทียบเท่าหรือสูงกว่าพลูในแง่เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีสารเคมีสำคัญ

การศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านโดยการสำรวจ สังเกต และสัมภาษณ์ มีประโยชน์ในการรวบรวมข้อมูลการใช้ประโยชน์จากพืชซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ได้อีกหลายแง่ต่อไป ทั้งในทางอุตสาหกรรมหรือการพัฒนายาใหม่ การใช้ประโยชน์จากข้อมูลพฤกษศาสตร์พื้นบ้านที่มีประสิทธิภาพนั้นต้องนำมาใช้ควบคู่กับการศึกษาความหลากชนิดของพืชจึงจะเกิดประโยชน์สูงสุด เนื่องจากหมอยาพื้นบ้านหรือปราชญ์ชาวบ้านที่ให้ข้อมูลการใช้ประโยชน์พืชนั้นมักบอกชื่อพืชเป็นชื่อท้องถิ่นในขณะที่ชื่อท้องถิ่นของพืชแต่ละชนิดในแต่ละพื้นที่เรียกไม่เหมือนกันหรือชื่อท้องถิ่นเดียวกันแต่ต่างพื้นที่กันอาจหมายถึงพืชต่างชนิด ดังนั้นการสำรวจและระบุชนิดพืชทั้งชื่อวิทยาศาสตร์ และชื่อท้องถิ่นจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญอย่างยิ่ง นอกจากนี้แล้วการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอประจำชนิดพืชเพื่อใช้ประโยน์ในการระบุชนิดในคราวต่อไปในกรณีที่ได้ตัวอย่างเป็นชิ้นส่วนของพืชหรือพืชที่ถูกแปรรูปแล้วก็สำคัญอย่างยิ่งสำหรับพืชกลุ่มที่นำมาใช้เป็นยาสมุนไพร

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดสำหรับพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย
2) เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู ได้แก่ *Piper betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum*, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve*, *P. tricolor* และ *P. yinkiangense* เทียบกับพลู *P. betle*
3) เพื่อประเมินน้ำมันหอมระเหย (essential oils) จากพืชเหล่านี้
4) เพื่อหาแหล่งวัตถุดิบสำหรับสารเคมีที่สำคัญ เช่น chavicol, eugenol, myristicin, piperine และ safrole ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าหรือเทียบเท่ากับพลู

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 อนุกรมวิธานของพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย

มีรายงานการศึกษาความหลากชนิดและซิสเทแมทิคส์ (Systematics) ของพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยมากว่า 10 ปี Chaveerach et al. (2002) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและรูปแบบดีเอ็นเอด้วยวิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ 14 แบบ เพื่อเปรียบเทียบหรือบอกความแตกต่างระหว่าง *P. chaba* ของประเทศไทย กับ *P. retrofractum* ของประเทศญี่ปุ่น พบว่าดัชนีความเหมือน (Similarity index) ระหว่าง *P. chaba* กับ *P. retrofractum*, *P. chaba* กับ *P. kadsura*, *P. retrofractum* กับ *P. kadsura* จากข้อมูลสัณฐานวิทยา คือ 71.4%, 38.5%, 46.0% ตามลำดับ จากข้อมูลความหลากหลายของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ 9.4%, 9.3%, 22% ตามลำดับ แสดงว่า *P. retrofractum* และ *P. kadsura* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า *P. chaba* และ *P. retrofractum* ซึ่งมีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่า *P. chaba* ของประเทศไทยเป็นคนละชนิดกับ *P. retrofractum* ของประเทศญี่ปุ่น

Chaveerach et al. (2006b) รายงานชนิดใหม่ของโลก 3 ชนิด คือ *P. dominantinervium* Chaveer. & Mokkamul, *P. pilobracteatum* Chaveer. & Sudmoon และ *P. phuwuaense* Chaveer. & Tanee และในปีเดียวกันได้รายงานการใช้ประโยชน์ของพืชสมุนไพรสกุลพริกไทยไว้ทั้งหมด 8 ชนิด ทั้งในแง่ของการเป็นอาหาร เครื่องเทศ สมุนไพร ใช้ในพิธีกรรมต่างๆ และใช้เป็นพืชประดับ (Chaveerach et al., 2006a) ปีต่อมา Chaveerach et al. (2007) พบชนิดใหม่ของโลก 1 ชนิด คือ *P. betloides* Chaveer. & Tanomtong และ 2 สายพันธุ์ คือ *P. thomsonii* C.DC. var. *trichostigma* Chaveer. & Sudmoon และ *P. pedicellatum* C.DC. var. *eglandulatum* Chaveer. & Mokkamul ต่อมาจึงได้รายงานความหลากชนิดของพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย โดยได้รวบรวมทั้งพืชสกุลพริกไทยชนิดใหม่ของโลกที่พบครั้งแรก 3 ชนิด พบครั้งที่สองอีก 1 ชนิด และ 2 สายพันธุ์

และยังมีการรายงานชนิดใหม่ของโลกเพิ่มขึ้นอีก 2 ชนิด ด้วย คือ *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon และ *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mokkamul (Chaveerach et al., 2008, 2010) ล่าสุด Sudmoon et al. (2011) ได้รายงาน *P. protrusum* Chaveer. & Tanee เป็นพืชชนิดใหม่เพิ่มเติม พืชชนิดนี้พบที่ภาคใต้ของไทย ในการสำรวจพบเพียงต้นเพศผู้จึงได้เก็บตัวอย่างพืชชนิดอื่นๆ ในสกุลเดียวกันอีก 6 ชนิด ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้ชิดกันมากที่สุดมาศึกษาข้อมูลระดับโมเลกุลร่วมกันโดยใช้วิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) ข้อมูลระดับโมเลกุลสนับสนุนข้อมูลทางสัณฐานวิทยาว่าพืชดังกล่าวเป็นพืชชนิดใหม่ โดยรวมแล้วปัจจุบันนี้จึงพบพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยทั้งสิ้น 43 ชนิด

1.2.2 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcoding)

การวิเคราะห์จีโนมของสิ่งมีชีวิตนอกจากเพื่อหาความสัมพันธ์และอธิบายวิวัฒนาการแล้วยังมีจุดประสงค์สำคัญอีกประการหนึ่งคือเพื่อสร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้น ในที่นี้จะกล่าวถึงเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดพืชในกรณีที่พืชนั้นถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นสมุนไพร เนื่องจากพืชจะต้องถูกนำมาใช้เพียงบางส่วนหรือถูกแปรรูปเช่นบดเป็นผงจึงไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วยวิธีการดั้งเดิมคือการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่เหมาะสมที่สุดในกรณีนี้คือเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

นักวิทยาศาสตร์ได้นำแนวคิดการทำบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตจากการใช้รหัสแท่ง หรือบาร์โค้ด (bar code) ของสินค้าต่างๆ ซึ่งช่วยในการระบุประเภท ชื่อ และราคาสินค้าได้อย่างแม่นยำ ระบบนี้ช่วยลดความผิดพลาดและเพิ่มความรวดเร็วในการบันทึกข้อมูล จึงต้องการนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุสิ่งมีชีวิต เพื่อลดความผิดพลาดและเพิ่มความรวดเร็ว อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ บาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตต้องเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ซึ่งแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น ง่ายต่อการใช้และมีความชัดเจน ดีเอ็นเอซึ่งเป็นสารพันธุกรรมแสดงลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิต นักวิทยาศาสตร์เลือกบริเวณดีเอ็นเอสั้นๆ ที่สะดวกกับการใช้งานและเหมาะสม จากส่วนของโครโมโซมที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูง แต่มีความต่างระหว่างชนิดเดียวกันต่ำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในการระบุสิ่งมีชีวิต (อรุณรัตน์ ฉวีราช, 2552)

ในปี ค.ศ. 2003 ได้มีการจัดตั้ง Consortium for the Barcoding of Life (CBOL) ขึ้นเพื่อจัดทำมาตรฐานและคู่มือในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด รวบรวมและจัดทำฐานข้อมูลกลางของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่แสดงความสัมพันธ์ของลำดับดีเอ็นเอในบาร์โค้ดกับชนิดต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต มาตรฐานที่จัดทำขึ้นใช้ส่วนของยีน cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรียเป็นบาร์โค้ดสำหรับสัตว์ ส่วนในพืชพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดน้อยมาก เนื่องจากจีโนมพืชในไมโทคอนเดรียมีวิวัฒนาการช้า และมีอัตราการแทนที่ของเบสต่ำกว่ายีนในคลอโรพลาสต์มาก จึงเสนอให้พิจารณาใช้ส่วนของดีเอ็นเอจากนิวเคลียสที่เรียกว่า internal transcribed

sequence (ITS) หรือส่วนของดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ที่อยู่ระหว่างยีน *psb*A และยีน *trn*H ซึ่งแสดงความแตกต่างชนิดสูง สามารถใช้ในการจำแนกชนิดต่างๆ ของพืชได้ (Hebert et al., 2003) ดังนั้นในพืชจึงอยู่ในระยะการหาบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นบาร์โค้ด ซึ่งพืชต่างกลุ่มกันอาจต้องใช้ต่างบริเวณ ดังที่ Chase et al. (2007) เสนอให้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จาก 3 บริเวณต่อพืช 1 ชนิด โดยมี 2 ทางเลือก คือ *rpo*C1, *mat*K และ *psb*A-*trn*H spacer หรือ *rpo*C1, *rpo*B และ *mat*K ต่อมา CBOL Plant Working Group (2009) ได้เสนอ 2 บริเวณ คือ *rbc*L และ *mat*K เป็นบริเวณบาร์โค้ดมาตรฐานสากล (core barcode) สำหรับพืชหลายกลุ่ม ล่าสุด Hollingsworth et al. (2011) ได้เสนอบริเวณ *psb*A-*trn*H spacer เป็นบริเวณมาตรฐานเพิ่มเติม

1.2.3 สารสำคัญที่พบและประโยชน์ของพืชสกุลพริกไทย

Rocha and Ming (1999) พบว่าในใบของ *P. hispidinervium* มีปริมาณของสารซาฟรอลสูงถึง 83-93% ของน้ำมันหอมระเหย สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งทดแทนจากอดีตจนถึงปัจจุบันที่ได้จากพืชใกล้สูญพันธุ์ *Ocotea pretiosa* Benth, *Cinnamomum petrophilum*, *C. mollissimum* และ *Sassa albidum* Nutt. สารซาฟรอลเป็นวัตถุดิบที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารอนุพันธ์ 2 ชนิด โดยโรงงานอุตสาหกรรมคือสารเฮลิโอโทรพินและสารไพเพอโรนอลบิวท็อกไซด์ โดยสารเฮลิโอโทรพินนั้นใช้เป็นสารแต่งกลิ่นและรสในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น น้ำยาขัดพื้น น้ำยาขัดเงา แชมพู สบู่ โลชัน ผงซักฟอก รวมทั้งน้ำยาทำความสะอาดทั้งหลาย สารชนิดนี้ถ้าได้จากธรรมชาติมีราคาแพงเกินไปสามารถใช้สารสังเคราะห์ได้ ส่วนสารไพเพอโรนอลบิวท็อกไซด์นั้นใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของยาฆ่าแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีราคาแพงเมื่อสกัดจากธรรมชาติแต่ยังไม่สามารถใช้สารสังเคราะห์มาทดแทนได้

Huang et al. (2001) ศึกษาพบว่าสารสกัดจาก *P. kadsura* ประกอบด้วยสาร 7 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มี 3 ชนิด คือ futoquinol, galbelgin และ meso-galgravin มีผลยับยั้งทั้ง hepatitis B virus และการสร้าง e antigen ส่วน piperenone สามารถยับยั้งเฉพาะ hepatitis B virus ในขณะที่ piperlactam S มีพิษต่อเซลล์

Amusan and Okorie (2002) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันที่สกัดจากผลของ *P. guineense* ในการรักษาปลาแห้ง (*Charias* spp.) ไม่ให้แมลง *Desmestes maculates* (Degeer) ทำลาย ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้สารนี้ 5-6 ไมโครลิตรต่อกรัมน้ำหนักปลา สามารถควบคุมการเจริญของแมลงได้ทั้งในระยะที่เป็นตัวอ่อนและตัวเต็มวัยอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงได้เสนอว่าน้ำมันจากพืชชนิดนี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ป้องกันปลาแห้งไม่ให้แมลงรบกวน

Luger et al. (2002) ได้ศึกษาโครงสร้างผลึกของสาร 3-(4′-methoxyphenyl) propanol pyrrole ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่สกัดได้จากไรโซมของ *P. lolot* ในประเทศเวียดนาม สารนี้มีฤทธิ์

ต้านแบคทีเรีย โมเลกุลของสารประกอบด้วย propanoyl pyrrole อยู่ในแนวระนาบและส่วนของ methoxyphenyl อยู่ในแนวขวางระนาบ มีมุมกาง 93.8(3)° และมีขนาดใหญ่กว่าที่เคยรายงานไว้จากอนุพันธ์ของ dimethoxy ในพืชสกุลเดียวกันถึง 30°

Samuel et al. (2002) สกัดสารจากใบพริกไทย (*P. nigrum*) และพืชป่า 7 ชนิด ได้แก่ *P. argyrophyllum*, *P. attenuatum*, *P. chuvya*, *P. thwaitessii*, *P. trinueron*, *P. zeylanicum* และชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศศรีลังกาคือ *P. longum* รวมทั้งชนิดที่เป็นพืชปลูกคือ *P. nigrum* และ *P. chaba* ด้วยเมทิลแอลกอฮอล์และวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) ผลโครมาโตแกรมที่ได้พบฟีโนลิก (phenolic) จำนวน 20 จุด โดยมี 1 จุด ที่พบในพืชทุกชนิดซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบและจำแนกที่มีประโยชน์สำหรับพืชสกุลนี้ และยังพบว่าพริกไทยที่เจริญในท้องถิ่นมีแนวโน้มมีร้อยละของน้ำมัน โอลีโอเรซิน (oleoresin) และพิเพอรีน (piperine) สูงกว่าพริกไทยที่นำมาจากแหล่งอื่นและชนิดอื่นๆ ที่ศึกษา

Scott et al. (2002, 2004) ศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดจากพืชสกุลพริกไทย 3 ชนิด คือ พริกไทย *P. guineense* และ *P. tuberculatum* ต่อการกำจัดแมลง พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด มีสารพิเพอรีนซึ่งเป็นสารในกลุ่ม isobutyl amides มีฤทธิ์เป็น neurotoxins ต่อแมลง โดยสารสกัดจากพริกไทยที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ สามารถฆ่าแมลงในสวนและในบ้านเรือนได้ ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพเริ่มตั้งแต่ 0.01% สามารถกำจัดหนอนผีเสื้อและแมลงในตระกูล Tenthredinidea ถึง 0.1% สามารถกำจัดแมลงปีกแข็งศัตรูของลิลลี่และมันฝรั่ง พบว่ามีผลทำให้แมลงศัตรูพืชจากแคนาดาและอเมริกาเหนือตายได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสูตรสารสกัดจากพืชสกุลนี้มีผลไล่แมลงได้ด้วย จึงป้องกันใบพืชจากการกัดกิน และป้องกันแมลงพวกที่เจาะลำต้น สารสกัดจากพริกไทยให้ผลในระดับเหมาะสมในการควบคุมแมลงกลุ่มผีเสื้อและตัวอ่อนของ sawfly และยังยับยั้งการกัดกินได้ในระยะสั้นด้วย นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์อื่นๆ ที่เกิดขึ้นจากการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันกับสารอื่นในสารสกัดนั้น ข้อดีที่สำคัญของสารสกัดนี้คือช่วงครึ่งชีวิตในธรรมชาติสั้น จึงไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และปลอดภัยสำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเพราะพืชสกุลนี้ได้ใช้เป็นเครื่องเทศและยามาหลายร้อยปีแล้ว งานวิจัยนี้แนะนำให้ใช้สารสกัดจากพืชเหล่านี้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่เล็กๆ ในสวนครัว ปีต่อมา Scott et al. (2005) ได้ศึกษาการใช้ยาฆ่าแมลงที่สกัดได้จากผลพริกไทยในการควบคุมแมลงที่ทำลายหญ้า European chafer (*Rhizotrogus majalis*) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดที่มีความเข้มข้น 2.5% สามารถทำลายตัวอ่อนในระยะที่ 3 ของแมลงได้ ในภาคสนาม ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 2% สามารถกำจัดหนอนระยะที่ 3 และ 4 ได้ และที่ 4% สามารถกำจัดหนอนระยะที่ 3 ตอนปลายได้ และยังสามารถกำจัดประชากรไส้เดือนได้ เมื่อศึกษาถึงระยะเวลาครึ่งชีวิตพบว่าเป็น 1-2.6 วัน สรุปได้ว่าสารสกัดนี้ตกค้างอยู่ในสภาพธรรมชาติน้อยกว่ายาฆ่าแมลงที่ใช้อยู่คือ diazonon ดังนั้นถ้ามีความหนาแน่นประชากรแมลงรบกวนอยู่เป็นบริเวณควรใช้สารสกัดนี้จะให้ผลดีกว่าบริเวณที่มีประชากรแมลงรบกวนอยู่ในพื้นที่เป็นบริเวณกว้าง ซึ่งจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายและไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น

Luz et al. (2003) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากใบและกิ่งอ่อนของ *P. reticulatum* และ *P. crassinervium* จากภาคเหนือของประเทศบราซิล โดยการกลั่นด้วยไอน้ำแล้ววิเคราะห์ส่วนประกอบด้วยวิธี GC/MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยของ *P. reticulatum* มี β-elemene ถึง 24.6% และ β-caryophyllene มี 16.7% ส่วน *P. crassinervium* มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ β-caryophyllene 17.7%, γ-elemene และ β-elemene 10.9%

Anuradha et al. (2004) สกัดสารจากผลแห้งของ *P. longum* ด้วยเฮกเซน พบสารที่มีคุณสมบัติห้ามการทำงานของเอนไซม์ glucosidase โดยสารนี้ประกอบด้วย pipataline 2, sesamin, oellitorine, guineensine, brachystamide β, 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-propanoic acid-Me-ester, piperlomguminine และพิเพอรีน นอกเหนือจากสารประกอบเหล่านี้แล้วยังพบสารชนิดใหม่จากพืชชนิดนี้คือ isodihydropiperlonguminine ส่วนสารที่มีคุณสมบัติห้ามการทำงานของเอนไซม์ glucosidase คือ pipataline, sesamin, pellitorine, guineensine และ brachystamide β ซึ่งสารประกอบกลุ่มนี้น่าจะมีคุณสมบัติต้านไวรัส เบาหวาน และโรคหลอดลมอักเสบ

Dyer et al. (2004) ศึกษาการสกัด การสังเคราะห์ และนิเวศวิทยาวิวัฒนาการของสารเอไมด์ในพืชสกุลพริกไทย จำนวน 1,000 ชนิด ที่ทั่วโลกรู้จัก พบว่าพืช 112 ชนิด มีสารประกอบที่แตกต่างกัน 667 ชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์/เอไมด์ 190 ชนิด ลิกแนน 49 ชนิด นีโอลิกแนน 70 ชนิด เทอร์พีน (terpene) 97 ชนิด โพรเพนิลฟีนอล (propenylphenol) 39 ชนิด สเตียรอยด์ 15 ชนิด คาวาไพโรน (kavapyrone) 18 ชนิด ชาลโคน/ไดไฮโดรชาลโคน (chalcone/dihydrochalcone) 17 ชนิด ฟลาโวน (flavone) 16 ชนิด ฟลาวาโนน (flavanone) 6 ชนิด ไพเพอโรไลด์ (piperolide) 4 ชนิด และสารประกอบอื่นอีก 146 ชนิดที่ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มใดๆ เลย โดยพบสารประกอบเหล่านี้จากทุกส่วนของพืชได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และดอก ตัวอย่างสารประกอบโพรเพนิลฟีนอลที่เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ ยูจีนอล ซาฟรอล และ มายริสทิซิน สารที่สำคัญที่สุดในกลุ่มเอไมด์ คือ พิเพอรีน ซึ่งสกัดได้จากพืช 20 ชนิด สารในกลุ่มเอไมด์อื่นๆ ที่พบ เช่น pipericide, piplartine, 4′-desmethyl pipartine และ cenocladamide, 4′-desmethyl pipartine และ cenocladamide และพบว่ามีเอไมด์หลายชนิดที่ออกฤทธิ์ร่วมกันกลายเป็นยาฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงตรงกับการรายงานของ Scott et al. (2002)

นอกจากนี้ยังมีการรายงานคุณสมบัติการต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา ของ *P. colubrinum* และมีการพยายามโคลนจีนดังกล่าวซึ่งมีลำดับเบสคล้ายออสโมทิน (osmotin) ได้ (Dicto and Munjula, 2005) ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้มีการนำ *P. colubrinum* มาใช้เป็นต้นตอในการปลูกพริกไทย

ในประเทศไทย ผศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัฒนธร หัวหน้าภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และ รศ.ดร.อรุณศรี ปรีเปรม อาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้นำเสนอผลงานการวิจัยเรื่อง “การผลิตสารสกัดพริกไทยหยอดจมูก สำหรับป้องกันภาวะความจำบกพร่องและกรรมวิธีในการผลิต” (ผ่านรายการเวทีชุมชน ทางสถานีวิทยุโทรทัศน์ NBT ขอนแก่น เมื่อวันที่ 24 เมษายน 2551) โดยอาจารย์ทั้งสองท่านร่วมนำเสนอสาระสำคัญของงานวิจัยว่า เนื่องจากทีมวิจัยได้ค้นพบ “สารพิเพอริน” ในพริกไทยดำ ซึ่งมีสรรพคุณในการป้องกันภาวะความจำบกพร่อง

โดยปัจจุบันวงการแพทย์ได้ตระหนักถึงความสำคัญในการชะลอการเสื่อมของระบบประสาท และพยายามที่จะป้องกันเซลล์ประสาทในสมองเพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคสมองเสื่อม มีรายงานทางการศึกษาพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันโรคอัลไซเมอร์ได้ สารพิเพอรีนเป็นสารสำคัญที่สกัดจากพริกไทยดำ มีคุณสมบัติในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ จากจุดนี้เองจึงทำให้ทีมนักวิจัยซึ่งประกอบด้วย รศ.ดร.อรุณศรี ปรีเปรม สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ รศ.ดร.สมเดช กนกเมธากุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และ ผศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัฒนธร หัวหน้าภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สนใจศึกษาวิธีการนำสารพิเพอรินบรรจุในอนุภาคนาโนแล้วพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสเปรย์หยอดจมูกเพื่อป้องกันโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งพบมากในกลุ่มผู้สูงอายุและคนวัยทำงานที่มีภาวะความเครียดสูง สารพิเพอรีนเป็นสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากพริกไทยดำซึ่งเป็นสารที่มีรสเผ็ด แสบร้อน และทำให้จามเมื่อสัมผัสกับเยื่อบุอ่อนต่างๆ ซึ่งจะระคายเคืองอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากสูดลมหายใจเอาผงพริกไทย หรือผงสมุนไพรที่มีสารพิเพอรินเป็นส่วนประกอบ ร่างกายจะเกิดปฏิกิริยาต่อต้านเพื่อป้องกันตนเองด้วยการจาม ดังนั้นนักวิจัยจึงได้มีการปรับโครงสร้างทางกายภาพของสารพิเพอรีนให้เป็นอนุภาคไลโปโซมที่มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตรเพื่อลดการระคายเคืองต่อเยื่อบุ และมีการตรวจสอบปริมาณการเพิ่มของเซลล์สมองต่อการออกฤทธิ์ของสารพิเพอรีนจากพริกไทยดำด้วยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์เพื่อยืนยันผลที่แน่นอนและน่าเชื่อถือ การศึกษาวิจัยนี้นอกจากจะส่งผลดีต่อกลุ่มผู้สูงอายุและกลุ่มคนวัยทำงานที่มีภาวะความจำบกพร่องแล้ว ยังนับเป็นความสำเร็จของแวดวงวิชาการไทยที่สามารถค้นพบสรรพคุณของพริกไทยดำทำให้สามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยได้อย่างสูงสุด ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาวิจัยที่มีผลต่อการพัฒนาประเทศในระยะยาว

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พร้อมระบุชนิดด้วยข้อมูลสัณฐานวิทยาตามเอกสารอ้างอิงใน Chaveerach et al. (2008) และ อรุณรัตน์ ฉวีราช และคณะ (2552) การระบุกลิ่นเหมือนพลูใช้ความคิดเห็นส่วนบุคคล โดยให้ 10 คน ทดลองดมกลิ่นจากใบพืช บันทึกชนิดที่คิดว่ามีกลิ่นเหมือนพลู แล้วเลือกชนิดที่ผู้ทดลองทุกคนลงความเห็นว่ามีกลิ่นเหมือนพลูตรงกันทุกคน นำตัวอย่างพืชทุกชนิดมาสกัดดีเอ็นเอ สร้างและวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด ส่วนพืชเฉพาะชนิดที่มีกลิ่นเหมือนพลูนำมาสกัดสาร หาองค์ประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืช

2.2 การสกัดและตรวจสอบดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชตามวิธีการที่รายงานไว้โดย Porebski et al. (1997) ซึ่งมีสารเคมีและขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) ดูด extraction buffer (100 mM Tris pH 8.0, 1.4 M sodium chloride (NaCl), 20 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2% Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)) ซึ่งอุ่นแล้วที่ 65°C ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในโกร่ง เติม polyvinylpyrrolidone (PVP) ปริมาณ 0.03 กรัม และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 ไมโครลิตร

2) ใส่เนื้อเยื่อพืชที่เตรียมไว้บดจนละเอียดแล้วย้ายใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3) เติม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 65°C 30 นาที กลับหลอดไปมาทุก 5 นาที

4) เติม Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารในข้อ 3 (ประมาณ 600 ไมโครลิตร) กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน

5) Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนไปใส่หลอดใหม่

6) เติม 2-propanol (-20°C) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารที่ได้ กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน แล้วแช่ไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

7) Centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้งแล้วเติมเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

8) Centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง แล้วรอให้ตะกอนแห้ง

9) เติม (65°C) 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วแช่ที่ 4°C ข้ามคืน ก่อนนำไปเก็บที่ -20°C

10) วัดปริมาณและตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซีส (agarose gel electrophoresis)

11) เตรียมแผ่นเจลอะกาโรส (agarose gel) โดยตวง 0.5X TAE buffer (20 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 0.06% glacial acetic acid) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

12) ชั่งผงอะกาโรส ปริมาณ 0.24 กรัม (= 0.8% agarose) หรือ 0.36 กรัม (= 1.2% agarose) ตามที่ต้องการใส่ลงในข้อ 1 แล้วแกว่ง flask ให้ผงวุ้นเข้ากับ buffer

13) นำไปละลายด้วย microwave สลับกับการแกว่ง flask จนกระทั่งผงวุ้นละลายหมด ตั้งไว้ให้อุ่นที่ประมาณ 60°C คือให้มือจับได้

14) ใส่กระบะเจลลงในบล็อกและใส่โคมลงไปให้ลงล็อก ค่อยๆ เทสารในข้อ 3 ลงในกระบะเจล ทิ้งไว้ 20 นาที ก่อนนำเจลไปใช้

15) ใส่เจลที่เตรียมไว้ลงในกระบะเจลอิเล็กโทรฟอเรซีส เติม 0.5X TAE buffer ให้ท่วมผิวเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 30 นาที

16) ย้อมเจลใน 0.001% ethidium bromide 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 3 รอบ แล้วนำไปถ่ายรูปเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA Barcoding)

2.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 1 โดยได้ข้อมูลจาก http://www.kew.org/barcoding/update.html ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสในปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ ดังนี้

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1) sterile H_2O	11.4
2) 2X GoTaq master mix (Promega)	15.0
3) primer F (50 ไมโครโมลาร์)	0.3
4) primer R (50 ไมโครโมลาร์)	0.3
5) DNA (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	3.0

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีแล้วนำไปเข้าเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR machine) โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) Predenaturation 3 นาที ที่ 94°C

2) ทำปฏิกิริยา 35 รอบ ดังนี้

2.1) Denaturation	30 วินาที	ที่ 94°C
2.2) Annealing	30 วินาที	ที่ 55°C
2.3) Extension	2 นาที	ที่ 72°C
3) Final extension	5 นาที	ที่ 72°C

4) เก็บที่ 4°C จนกว่าจะตรวจผล

ตรวจผลผลิตด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซีสดังรายละเอียดข้างต้น โดยใช้อะกาโรส ความเข้มข้น 1.2% เมื่อได้ผลผลิตที่ต้องการแล้วส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หรือโรงพยาบาลรามาธิบดี ซึ่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยหลักการ Dye Terminator โดยใช้ Mega BACE1000 Sequencing Sytems คู่กับ ALFexpress Analysis System

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	บริเวณเป้าหมาย
MK-F1	TAATTTACGATCAATTCATTC	*mat*K gene
MK-R2	CTTCCTCTGTAAAGAATTC	
RL-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	*rbc*L gene
RL-R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	
TP-F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	*psb*A-*trn*H spacer
TP-R	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	

2.3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) วิเคราะห์ความถูกต้องด้วยโปรแกรม FinchTV (http://www.geospiza.com/finchtv/index.htm) และ BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)

2) ใช้เครื่องมือ Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เปรียบเทียบความเหมือน (alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากสิ่งมีชีวิตอื่นซึ่งมีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) วิเคราะห์ทิศทาง (annotation) และตำแหน่งเริ่มการแปลรหัส (reading frame)

3) แปลรหัส (translate) ด้วย ExPASy (http://www.expasy.org/tools/dna.html)

4) บันทึก (submit) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้วิเคราะห์แล้วไว้ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit.html) เพื่อใช้อ้างอิงและนักวิจัยจากทั่วโลกสามารถเข้าถึงได้

2.4 การสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลาย

เตรียมสารสกัดจากพืชโดยนำใบมาล้างและผึ่งลม ชั่งมา 25 กรัม บดให้เป็นผงละเอียด เติมตัวทำละลายคือเฮกเซน (analytical grade) ปริมาตร 120 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบและทดสอบฤทธิ์ต่อไป

2.5 การกลั่นและแยกน้ำมันหอมระเหยจากใบพลู

เก็บใบสดที่เจริญเติบโตเต็มที่ ชั่งมา 1 กิโลกรัม นำใบพืชไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไอน้ำ (WiseTherm Heating Mantles) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จะได้น้ำมันหอมระเหยที่แยกจากน้ำให้เก็บส่วนนี้ไว้และส่วนของน้ำที่มีน้ำมันหอมระเหยรวมอยู่ด้วย จากนั้นใช้กรวยแยกแยกน้ำมันหอมระเหยออกจากน้ำ โดยเติมสาร dichloromethane (CH_2Cl_2) : น้ำมันหอมระเหยที่รวมอยู่กับน้ำ ในอัตราส่วน 25:500 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ซึ่งน้ำมันหอมระเหยกับ dichloromethane จะแยกชั้นออกมาอยู่ด้านล่างของกรวยแยก เก็บส่วนนี้ไว้ จากนั้นนำไประเหยสาร dichloromethane ออก ด้วยเครื่อง (Rotary Evaporator model) จะได้น้ำมันหอมระเหยเข้มข้น เก็บไว้ที่ -20°C ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบและทดสอบฤทธิ์ต่อไป

2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากพืชและน้ำมันหอมระเหย

วิเคราะห์สารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลายและน้ำมันหอมระเหย ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ด้วยเครื่อง Agilent Technologies GC 6890 N/5973 inert MS ที่เชื่อมกับคอลัมน์แบบคาปิลลารี ขนาด 30.0 m x 250 μm x 0.25 μm ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารสกัดปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตั้งค่าอุณหภูมิ mass-transferred line เป็น 280°C กำหนดค่าอุณหภูมิตู้อบให้เพิ่มจาก 70°C ถึง 120°C ด้วยอัตรา 3°C ต่อนาที และให้คงอยู่ที่ 120°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นให้เพิ่มขึ้นจนถึง 270°C ด้วยอัตรา 5°C ต่อนาที ร้อยละของปริมาณสารองค์ประกอบเมื่อเทียบกับองค์ประกอบทั้งหมด (relative content) คำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟ ระบุชนิดสารโดยเปรียบเทียบแมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของสารองค์ประกอบที่ได้กับข้อมูลในฐานข้อมูล Wiley 7N.1 library

2.7 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืช

2.7.1 การเตรียมสารสกัด

แบ่งสารที่สกัดได้มา 15 มิลลิลิตร นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator (Buchi, Switzerland) จนระเหยหมด แล้วละลายสารสกัดด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางแบบ two-fold serial dilutions ด้วย DMSO ดังนั้นความเข้มข้นที่จะใช้ทดสอบคือ 0 (ไม่เจือจาง) เจือจาง 2 4 และ 8 เท่า

2.7.2 การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อการทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* TISTR 126, *Escherichia coli* TISTR 780, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 78 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041 และ *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 ซึ่งซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Luria-Bertani (LB) agar (1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 1.5% Bactoagar, pH 7.0; Sambrook and Russell, 2001) ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเจือจางเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^1 CFU ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบ ส่วนราเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose (PDA) agar (The National Plant Diagnostic Network Diagnostics, http://wiki.bugwood.org/Potato_dextrose_agar) ที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน แล้วเขี่ยปลายของเส้นใยไปเลี้ยงบนจานอาหารใหม่ ที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน เพื่อใช้ทดสอบ

2.7.3 การเตรียมจานอาหารและสารควบคุม

ทดสอบด้วยวิธี well plate diffusion โดยในจานอาหารแต่ละจานมีอาหาร 20 มิลลิลิตร เป็น LB agar สำหรับแบคทีเรียและ PDA สำหรับรา แต่ละจานเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จำนวน 7 หลุม สารควบคุมลบ (negative control) คือ DMSO และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ สารควบคุมบวก (positive control) ใช้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ ampicillin สำหรับแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และ clindamycin สำหรับ *Staphylococcus aureus* สำหรับราใช้ itraconazole สารทดสอบที่เติมลงในแต่ละหลุมใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

2.7.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

กระจายเซลล์ความเข้มข้น $1x10^1$ CFU ต่อมิลลิลิตร บนจานอาหาร LB agar เจาะหลุม เติมสารแต่ละอย่างลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญ (clear zone) ทั้งหมด ลบด้วยขนาดของหลุม จะได้เป็นขนาดที่นำไปบอกฤทธิ์ของสาร โดยผลการทดสอบฤทธิ์แบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1 ไม่มีบริเวณยับยั้ง ได้ผลเป็น 0 มิลลิเมตร นั่นคือ ไม่มีฤทธิ์ทางสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ระดับ 2 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง คือ ได้ผลเป็น <5 มิลลิเมตร นั่นคือมีบริเวณยับยั้งแต่น้อยมาก ถือว่าไม่มีฤทธิ์ทางสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ระดับ 3 มีการยับยั้ง แบ่งเป็นระดับย่อย คือ

- ได้ผลเป็น 5-10 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อน (mild inhibitory)
- ได้ผลเป็น >10-15 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง (moderate inhibitory)
- ได้ผลเป็น >15 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งอย่างแรง (strong inhibitory)

วิธีการทดลองและหลักการแปลผลนี้ดัดแปลงมาจาก Suppakul et al. (2006)

2.7.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านรา

เขี่ยปลายเส้นใยรามาเลี้ยงบนจานอาหารที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน นำจานเพาะเลี้ยงเจาะมาหลุมห่างจากเส้นใย 1 เซนติเมตร เติมสารแต่ละอย่างลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 28°C อีก 7 วัน แล้ววัดขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญ แจกแจงระดับการยับยั้งเช่นเดียวกับการยับยั้งแบคทีเรีย

2.7.6 ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ได้คำนวณค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibition concentration: MIC) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดที่ผสมลงในอาหารแล้วจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2000)

2.7.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดสอบแต่ละอย่างทำ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณความเชื่อมั่นทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ด้วย IBM program SPSS Statistics 19

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 การใช้ประโยชน์จากพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย

จากการศึกษาและสำรวจการใช้พืชสกุลพริกไทยในภูมิภาคต่างๆ ทั้งในแง่เป็นอาหาร ยารักษาโรค ปลูกประดับและใช้ในประเพณีหรือพิธีกรรม พบว่าพลูสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พลูเหลืองหรือพลูนวล และพลูเขียว ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจ สังเกต และสอบถาม ทำให้ทราบว่าได้มีการนำพืชสกุลพริกไทยหลายชนิดมาใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันของประชาชนทั่วทุกภูมิภาค หลายชนิดเป็นพืชเศรษฐกิจ หลายชนิดมีคุณสมบัติทางยาสุมนไพร ชนิดที่เป็นที่รู้จักทั่วไปในทุกภูมิภาค (รูปที่ 1) มีการนำมาใช้ประโยชน์มากและการใช้ประโยชน์ดังรายละเอียดต่อไปนี้

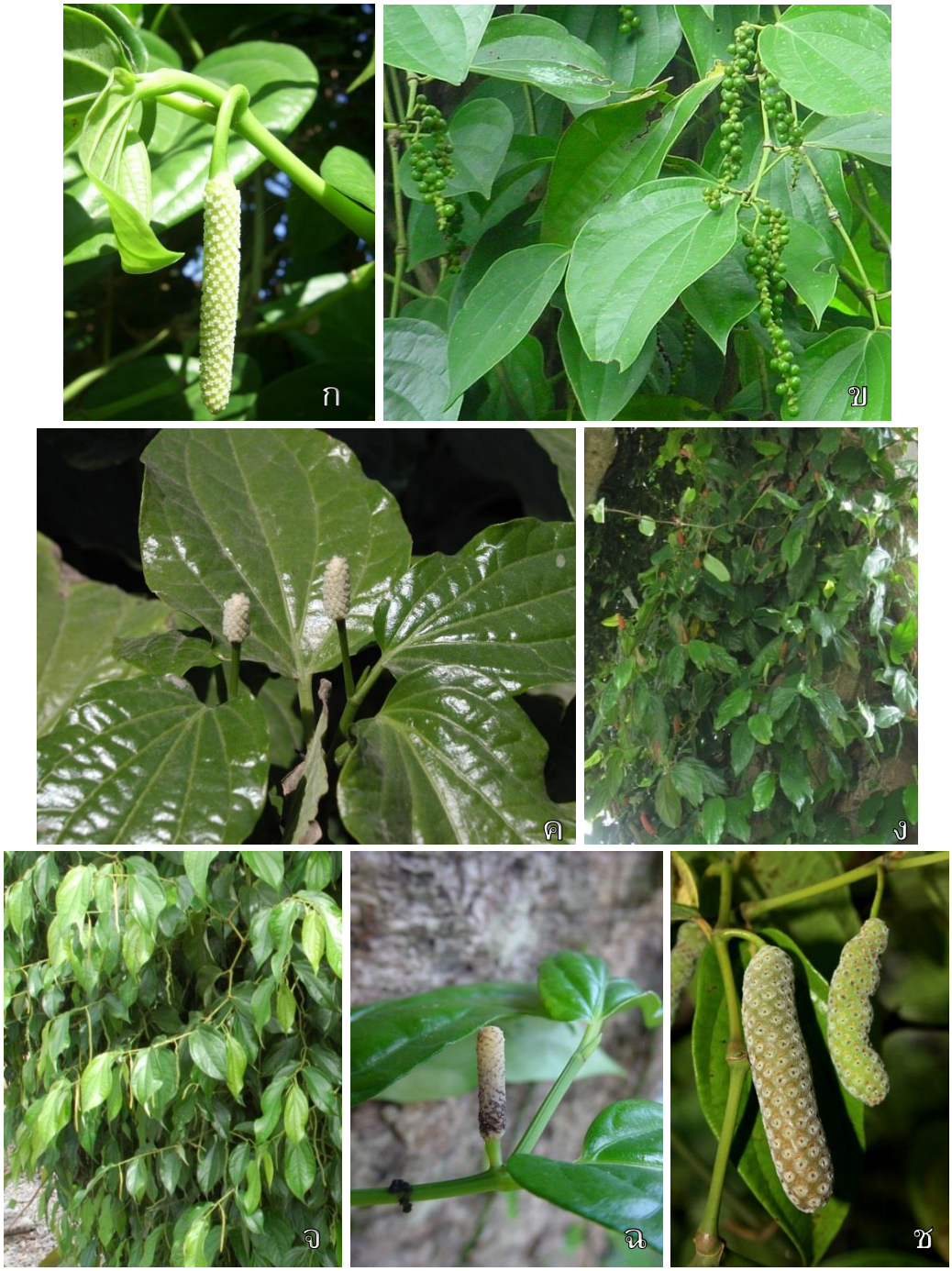
พลู *P. betle* L. คนไทยมีความผูกพันกับพลูมาแต่โบราณกาล มีการนำมาใช้ประโยชน์หลายประการ เช่น การกินหมาก และการประกอบพิธีกรรมต่างๆ แก้อาการขาบวมเนื่องจากไปลุยน้ำมาแล้วติดเชื้อ ใช้ใบพลูเขียวแก่ 7 ใบ เสกคาถากวาดให้หาย ถูไปตามขาหลายๆ รอบ เปลี่ยนใบใหม่ มีคุณสมบัติทางยาคือ แก้ปวดฟัน แก้รำมะนาด ลดกลิ่นปาก รักษากลาก น้ำกัดเท้า แก้ลมพิษ แก้อาการอักเสบของเยื่อจมูก แก้เล็บขบ รักษาแผล แก้คัน แก้ท้องอืดเฟ้อ แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย ขับลม

พริกไทย *P. nigrum* L. เป็นพืชเศรษฐกิจ ใช้ผลเป็นเครื่องเทศ และยาสมุนไพร มีคุณสมบัติทางยาคือ บำรุงธาตุ ช่วยเจริญอาหาร ลดอาการท้องอืดเฟ้อ แน่นจุกเสียด ขับลม ขับเหงื่อ ขับปัสสาวะ แก้ตาแดง ใช้ประกอบในตำรับเบญจกูลรักษาธาตุ

ชะพลู *P. sarmentosum* Roxb. ใช้รับประทานเป็นผัก และประกอบอาหารประเภทแกง มีคุณสมบัติทางยา คือ บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ บำรุงโลหิต ช่วยเจริญอาหาร ลดระดับน้ำตาลในเลือด แก้ปัสสาวะรดที่นอน แก้ปวดท้อง ขับเสมหะ ใช้ประกอบในตำรับเบญจกูลรักษาธาตุ

ดีปลี *P. retrofractum* Vahl ใช้เป็นยาสมุนไพรและเครื่องเทศ ปัจจุบันนิยมนำมาปลูกประดับ เนื่องจากลักษณะการแตกกิ่งและสีของผลสุกที่สวยงาม มีคุณสมบัติทางยาคือ ใช้แก้พิษอัมพฤกษ์ อัมพาต แก้ตัวร้อน แก้ท้องร่วง แก้พิษงู แก้ปวดฟัน แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย แก้ท้องอืด แก้ท้องเฟ้อ ขับลม ขับเสมหะ รักษาโรคหืด ใช้ประกอบในตำรับเบญจกูลรักษาธาตุ

สะค้านเนื้อ *P. pendulispicum* C.DC. ต้นเพศเมียซึ่งติดผลมีชื่อเรียกว่าสะค้าน สะค้านเนื้อ หรือจะค่านจิ้น ใช้ลำต้นมาประกอบอาหาร ส่วนต้นเพศผู้มีชื่อเรียกว่าสะค้านแดง ใช้ลำต้นที่มีเนื้อไม้สีแดงเรื่อเป็นยาสมุนไพรบำรุงกำลัง



รูปที่ 1 พลู *Piper betle* (ก) พริกไทย *P. nigrum* (ข) ชะพลู *P. sarmentosum* (ค) ดีปลี *P. retrofractum* (ง) สะค้านเนื้อ *P. pendulispicum* (จ) พริกหาง *P. longum* (ฉ) พลูป่า *P. rubroglandulosum* (ช)

พริกหาง *P. longum* L. ใช้เครือหรือลำต้น ต้มแล้วดื่มน้ำ เป็นยาสมุนไพร รักษาภูมิแพ้ ริดสีดวงทวาร ริดสีดวงจมูก แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ลดไขมันอุดตันเส้นเลือดในสมอง ลดความดัน รักษาเบาหวาน แก้ปวดศีรษะ ลดไข้

พลูป่า *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mokkamul ชาวบ้านอาจนำมากินกับหมากถ้าไม่สามารถหาพลูได้ แต่ไม่ค่อยนิยมเพราะรสเผ็ดมากกว่าพลู หมอยาพื้นบ้านนำมารักษาโรคโดยเคี้ยวแล้วเป่า รักษาโรคเริม รักษาโรคงูสวัด

3.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทยที่พบในประเทศไทย

เก็บตัวอย่างพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยได้ทั้งสิ้น 36 ชนิด (รูปที่ 2-7) โดยมี 3 ชนิดที่มีตัวอย่างต้นเพศผู้และเพศเมียด้วย บางชนิดเก็บได้หลายซ้ำ สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดจากบริเวณ *mat*K gene, *psb*A-*trn*H spacer region และ *rbc*L gene ได้สำเร็จในเกือบทุกตัวอย่าง มีเพียงสองชนิดคือ *P. montium* และ *P. rubroglandulosum* (♀) ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณ *mat*K gene ได้ บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเหล่านี้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Piper+Thailand) ทั้งสิ้น 190 accessions (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมจากแต่ละบริเวณดังนี้

ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิด

บริเวณ *mat*K gene ให้ค่า 0.000 ใน *P. dominantinervium*, *P. hongkongense*, *P. kraense* และ *P. longum* ถึง 0.386 ใน *P. betle*

บริเวณ *rbc*L gene ให้ค่า 0.000 ใน *P. dominantinervium*, *P. hongkongense*, *P. longum*, *P. pedicellatum*, *P. pilobracteatum*, *P. polysyphonum*, *P. sarmentosum*, *P. sylvestre* และ *P. wallichii* ถึง 0.166 ใน *P. betle*

บริเวณ *psb*A-*trn*H spacer ให้ค่า 0.000 ใน *P. dominantinervium*, *P. khasianum*, *P. kraense*, *P. longum*, *P. montium*, *P. mutabile*, *P. nigrum*, *P. pilobracteatum*, *P. polysyphonum* และ *P. sarmentosum* ถึง 0.117 ใน *P. boehmeriifolium*

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด

บริเวณ *mat*K gene ให้ค่า 0.000 ใน 8 คู่ ได้แก่ *P. kraense* กับ *P. dominantinervium*, *P. magnibaccum* กับ *P. kraense*, *P. phuwuaense* กับ *P. dominantinervium*, *P. phuwuaense* กับ *P. kraense*, *P. pilobracteatum* กับ *P. dominantinervium*, *P. pilobracteatum* กับ *P. kraense*, *P. pilobracteatum* กับ *P. phuwuaense*, *P. sylvestre* กับ *P. polysyphonum* ถึง 0.486 ในคู่ *P. ribesioides* กับ *P. pilobracteatum*

รูปที่ 2 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper argyritis* (ก) *P. betle* (ข) *P. betloides* (ค) *P. boehmeriifolium* (ง) *P. caninum* (จ) และ *P. colubrinum* (ฉ)

รูปที่ 3 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper crocatum* (ก) *P. dominantinervium* (ข) *P. hongkongense* (ค) *P. khasianum* (ง) *P. kraense* (จ) และ *P. longum* (ฉ)

รูปที่ 4 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper maculaphyllum* (ก) *P. magnibaccum* (ข) *P. montium* (ค) *P. mutabile* (ง) *P. nigrum* (จ) และ *P. pedicellatum* (ฉ)

รูปที่ 5 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper pendulispicum* (ก) *P. phuwuaense* (ข) *P. pilobracteatum* (ค) *P. polysyphonum* (ง) *P. protrusum* (จ) และ *P. retrofractum* (ฉ)

รูปที่ 6 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper ribesioides* (ก) *P. rubroglandulosum* (ข) *P. sarmentosum* (ค) *P. semiimmersum* (ง) *P. submultinerve* (จ) และ *P. sylvaticum* (ฉ)

รูปที่ 7 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper sylvestre* (ก) *P. thomsonii* (ข) *P. tricolor* (ค) *P. umbellatum* (ง) *Piper wallichii* (จ) และ *P. yinkiangense* (ฉ)

ตารางที่ 2 GenBank accession number เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทย

Scientific name	GenBank accession number		
	*mat*K	*psb*A-*trn*H spacer	*rbc*L
Piper argyritis	KM073990	JX442927, KM055176	JX291978, KM055126
P. betle (♀)	GU372747, KM098143	GQ891996, JQ248053	JQ248074
P. betle (♂)	KM098144	JQ248050	JQ248071
P. betloides	KM098135	JQ248051	JQ248072
P. boehmeriifolium	KM073991, KM073992	KM055177, KM055178	KM055127, KM055128
P. caninum	KM073993, KM073994	KM055179, KM055180	KM055129, KM055130
P. colubrinum	GU372751, KM073995	GQ892000	KM055131
P. crocatum	KM098136	JQ248047	JQ248068
P. dominantinervium	KM073996, KM073997	KM055181, KM055182	KM055132, KM055133
P. hongkongense	KM073998, KM073999	KM055183, KM055184	KM055134, KM055135
P. khasianum	KM074000, KM074001	KM055185, KM055186	KM055136, KM055137
P. kraense	KM074002, KM074003	KM055187, KM055188	KM055138, KM055139
P. longum	KM074004, KM074005	KM055189, KM055190	KM055140, KM055141
P. maculaphyllum	KM074006, KM098137	JQ248046, KM055191	JQ248067, KM055142
P. magnibaccum	KM074007, KM074008	KM055192, KM055193	KM055143, KM055144

ตารางที่ 2 GenBank accession number เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทย (ต่อ)

Scientific name	GenBank accession number		
	*mat*K	*psb*A-*trn*H spacer	*rbc*L
P. montium	n/a	KM055194, KM055195	KM055145, KM055146
P. mutabile	KM074035	KM055196, KM055197	KM055147, KM055148
P. nigrum	KM074009, KM074010	GQ891994, KM055198, KM055199	KM055149, KM055150
P. pedicellatum var. *eglandulatum*	KM074011, KM074012	KM055200, KM055201	KM055151, KM055152
P. pendulispicum (♀)	KM074013, GU372748	KM055202, GQ891997	KM055153, JX291979
P. phuwuaense	KM074014, KM074015	KM055203, KM055204	KM055154, KM055155
P. pilobracteatum	KM074016, KM074017, KM074018, KM074019	KM055205, KM055206, KM055207, KM055208	KM055156, KM055157, KM055158, KM055159
P. polysyphonum	KM074020, KM074021	KM055209, KM055210	KM055160, KM055161
P. protrusum	KM074032, KM074033	GU980900, KM055223	KM055172, KM055173
P. retrofractum	GU372749, KM074034	GQ891998, KM055224	KM055175
P. ribesioides	GU372750, KM074022	GQ891999, KM055211	KM055162

หมายเหตุ n/a คือไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ตารางที่ 2 GenBank accession number เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทย (ต่อ)

Scientific name	GenBank accession number		
	*mat*K	*psb*A-*trn*H spacer	*rbc*L
P. rubroglandulosum (♀)	n/a	JX442926	JX291977
P. rubroglandulosum (♂)	KM098138	JX442925	JX291976
P. sarmentosum	GU372746, KM074023, KM074024	KM055212, KM055213	KM055163, KM055164
P. semiimmersum	KM098139	JQ248045	JQ248066
P. submultinerve	KM098140	JQ248048	JQ248069
P. sylvaticum	KM074025, KM074026	KM055214, KM055215	KM055174
P. sylvestre	KM074027, KM074028	KM055216, KM055217	KM055165, KM055166
P. thomsonii var. *trichostigma*	KM074029	KM055218	KM055167
P. tricolor	KM098141	JQ248049	JQ248070
P. umbellatum	EU669471*, GQ429067*	KM055219, KM055220	KM055168, KM055169
P. wallichii	KM074030, KM074031	KM055221, KM055222	KM055170, KM055171
P. yinkiangense	KM098142	JQ248052	JQ248073

หมายเหตุ * คือ accessions จากงานวิจัยอื่นซึ่งนำมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรม, n/a คือไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

บริเวณ *rbc*L gene ให้ค่า 0.000 ใน 49 คู่ ได้แก่ *P. dominantinervium* กับ *P. caninum*, *P. kraense* กับ *P. boehmeriifolium*, *P. maculaphyllum* กับ *P. khasianum*, *P. magnibaccum* กับ *P. khasianum*, *P. magnibaccum* กับ *P. caninum*, *P. magnibaccum* กับ *P. dominantinervium*, *P. montium* กับ *P. khasianum*, *P. montium* กับ *P. magnibaccum*, *P. mutabile* กับ *P. caninum*, *P. mutabile* กับ *P. dominantinervium*, *P. mutabile* กับ *P. magnibaccum*, *P. nigrum* กับ *P. caninum*, *P. nigrum* กับ *dominantinervium*, *P. nigrum* กับ *P. magnibaccum*, *P. nigrum* กับ *P.*

mutabile, P. pedicellatum กับ *P. khasianum*, *P. pedicellatum* กับ *P. magnibaccum*, *P. pedicellatum* กับ *P. montium*, *P. pedicellatum* กับ *P. pendulispicum*, *P. pendulispicum* กับ *P. caninum*, *P. pendulispicum* กับ *P. dominantinervium*, *P. pendulispicum* กับ *P. magnibaccum*, *P. pendulispicum* กับ *P. mutabile*, *P. pendulispicum* กับ *P. nigrum*, *P. phuwuaense* กับ *P. caninum*, *P. phuwuaense* กับ *P. dominantinervium*, *P. phuwuaense* กับ *P. magnibaccum, P. phuwuaense* กับ *P. mutabile*, *P. phuwuaense* กับ *P. nigrum*, *P. phuwuaense* กับ *P. pedicellatum, P. pilobracteatum* กับ *P. caninum*, *P. pilobracteatum* กับ *P. mutabile*, *P. polysyphonum* กับ *P. khasianum*, *P. polysyphonum* กับ *P. magnibaccum*, *P. polysyphonum* กับ *P. montium, P. sarmentosum* กับ *P. longum*, *P. sylvestre* กับ *P. khasianum*, *P. sylvestre* กับ *P. magnibaccum*, *P. sylvestre* กับ *P. montium*, *P. thomsonii* กับ *P. nigrum*, *P. pilobracteatum* กับ *P. phuwuaense*, *P. polysyphonum* กับ *P. pendulispicum*, *P. polysyphonum* กับ *P. pedicellatum*, *P. sylvestre* กับ *P. pendulispicum*, *P. sylvestre* กับ *P. pedicellatum*, *P. sylvestre* กับ *P. polysyphonum*, *P. wallichii* กับ *P. umbellatum*, *P. protrusum* กับ *P. phuwuaense*, *P. protrusum* กับ *P. pilobracteatum* ถึง 0.213 ในคู่ *P. betle* กับ *P. argyritis*

บริเวณ *psb*A-*trn*H spacer ให้ค่า 0.000 ใน 16 คู่ ได้แก่ *P. montium* กับ *P. magnibaccum*, *P. pilobracteatum* กับ *P. caninum*, *P. polysyphonum* กับ *P. pedicellatum*, *P. ribesioides* กับ *P. pedicellatum*, *P. sarmentosum* กับ *P. longum*, *P. sylvestre* กับ *P. pedicellatum*, *P. wallichii* กับ *P. khasianum*, *P. wallichii* กับ *P. pedicellatum*, *P. protrusum* กับ *P. magnibaccum*, *P. sylvestre* กับ *P. polysyphonum*, *P. sylvestre* กับ *P. ribesioides*, *P. wallichii* กับ *P. polysyphonum*, *P. wallichii* กับ *ribesioides*, *P. wallichii* กับ *P. sylvestre*, *P. yinkiangense* กับ *P. betle* ถึง 0.228 ในคู่ *P. semiimmersum* กับ *P. umbellatum*

พบว่าบริเวณ *mat*K gene ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำในชนิดเดียวกันและให้ค่าสูงในระหว่างชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นจึงเป็นบริเวณที่มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดพืชสกุลพริกไทย

ตารางที่ 3 Genetic distance values of the *mat*K region efficient for *Piper* identification

	P. argyritis	*P. betle*	*P. betle*	*P. betle*	*P. betloides*	*P. boehmeriifolium*	*P. boehmeriifolium*	*P. caninum*	*P. caninum*	*P. colubrinum*	*P. colubrinum*	*P. crocatum*	*P. dominantinervium*	*P. dominantinervium*	*P. hongkongense*	*P. hongkongense*	*P. khasianum*	*P. khasianum*	*P. kraense*	*P. kraense*	*P. longum*	*P. longum*	*P. maculaphyllum*	*P. maculaphyllum*	*P. magnibaccum*	*P. magnibaccum*	*P. nigrum*	*P. nigrum*	*P. pedicellatum*	*P. pedicellatum*	*P. pendulispicum*
P. argyritis	0.000																														
P. betle	0.323	0.000																													
P. betle	0.076	0.362	0.000																												
P. betle	0.126	0.386	0.106	0.000																											
P. betloides	0.249	0.423	0.262	0.260	0.000																										
P. boehmeriifolium	0.004	0.323	0.074	0.124	0.252	0.000																									
P. boehmeriifolium	0.011	0.325	0.074	0.126	0.258	0.009	0.000																								
P. caninum	0.013	0.328	0.080	0.132	0.249	0.009	0.017	0.000																							
P. caninum	0.013	0.328	0.080	0.132	0.249	0.009	0.017	0.000	0.000																						
P. colubrinum	0.020	0.332	0.087	0.134	0.267	0.017	0.022	0.026	0.026	0.000																					
P. colubrinum	0.089	0.375	0.143	0.195	0.310	0.085	0.093	0.093	0.093	0.072	0.000																				
P. crocatum	0.054	0.358	0.106	0.145	0.267	0.052	0.056	0.061	0.061	0.065	0.130	0.000																			
P. dominantinervium	0.004	0.323	0.072	0.121	0.252	0.002	0.007	0.011	0.011	0.015	0.087	0.050	0.000																		
P. dominantinervium	0.004	0.323	0.072	0.121	0.252	0.002	0.007	0.011	0.011	0.015	0.087	0.050	0.000	0.000																	
P. hongkongense	0.013	0.321	0.080	0.130	0.260	0.011	0.011	0.020	0.020	0.024	0.095	0.059	0.009	0.009	0.000																
P. hongkongense	0.013	0.321	0.080	0.130	0.260	0.011	0.011	0.020	0.020	0.024	0.095	0.059	0.009	0.009	0.000	0.000															
P. khasianum	0.007	0.325	0.076	0.126	0.249	0.002	0.011	0.011	0.011	0.020	0.087	0.054	0.004	0.004	0.013	0.013	0.000														
P. khasianum	0.007	0.325	0.074	0.124	0.249	0.004	0.009	0.013	0.013	0.017	0.089	0.052	0.002	0.002	0.011	0.011	0.002	0.000													
P. kraense	0.004	0.323	0.072	0.121	0.252	0.002	0.007	0.011	0.011	0.015	0.087	0.050	0.000	0.000	0.009	0.009	0.004	0.002	0.000												
P. kraense	0.004	0.323	0.072	0.121	0.252	0.002	0.007	0.011	0.011	0.015	0.087	0.050	0.000	0.000	0.009	0.009	0.004	0.002	0.000	0.000											
P. longum	0.013	0.325	0.080	0.130	0.258	0.011	0.015	0.020	0.020	0.024	0.091	0.054	0.009	0.009	0.017	0.017	0.013	0.011	0.009	0.009	0.000										
P. longum	0.013	0.325	0.080	0.130	0.258	0.011	0.015	0.020	0.020	0.024	0.091	0.054	0.009	0.009	0.017	0.017	0.013	0.011	0.009	0.009	0.000	0.000									
P. maculaphyllum	0.065	0.369	0.130	0.171	0.282	0.065	0.072	0.074	0.074	0.080	0.141	0.111	0.065	0.065	0.074	0.074	0.063	0.063	0.065	0.065	0.072	0.072	0.000								
P. maculaphyllum	0.054	0.341	0.072	0.113	0.249	0.052	0.054	0.061	0.061	0.065	0.130	0.085	0.050	0.050	0.059	0.059	0.054	0.052	0.050	0.050	0.054	0.054	0.111	0.000							
P. magnibaccum	0.007	0.325	0.074	0.124	0.249	0.004	0.009	0.013	0.013	0.017	0.089	0.052	0.002	0.002	0.011	0.011	0.002	0.000	0.002	0.002	0.011	0.011	0.063	0.052	0.000						
P. magnibaccum	0.009	0.323	0.076	0.124	0.256	0.007	0.011	0.015	0.015	0.015	0.087	0.054	0.004	0.004	0.013	0.013	0.009	0.007	0.004	0.004	0.013	0.013	0.069	0.054	0.007	0.000					
P. nigrum	0.015	0.334	0.087	0.130	0.262	0.017	0.022	0.026	0.026	0.030	0.102	0.061	0.015	0.015	0.024	0.024	0.020	0.017	0.015	0.015	0.022	0.022	0.072	0.063	0.017	0.020	0.000				
P. nigrum	0.009	0.325	0.080	0.121	0.249	0.011	0.015	0.020	0.020	0.024	0.095	0.059	0.009	0.009	0.017	0.017	0.013	0.011	0.009	0.009	0.017	0.017	0.072	0.054	0.011	0.013	0.020	0.000			
P. pedicellatum	0.011	0.328	0.080	0.126	0.252	0.007	0.015	0.015	0.015	0.024	0.091	0.054	0.009	0.009	0.017	0.017	0.009	0.011	0.009	0.009	0.013	0.013	0.067	0.046	0.011	0.013	0.022	0.013	0.000		
P. pedicellatum	0.011	0.325	0.074	0.124	0.258	0.009	0.004	0.017	0.017	0.022	0.093	0.056	0.007	0.007	0.011	0.011	0.011	0.009	0.007	0.007	0.015	0.015	0.072	0.054	0.009	0.007	0.022	0.015	0.015	0.000	
P. pendulispicum	0.004	0.325	0.076	0.126	0.252	0.007	0.011	0.015	0.015	0.020	0.091	0.050	0.004	0.004	0.013	0.013	0.009	0.007	0.004	0.004	0.009	0.009	0.067	0.050	0.007	0.009	0.013	0.009	0.009	0.011	0.000

3.3 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากพืช

เนื่องจากพลูเป็นพืชชสกุลพริกไทยชนิดที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดและมีสารสำคัญต่างๆ ที่นำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ก็ยังมีปัญหาในการปลูกทำให้วัตถุดิบที่ป้อนเข้าสู่โรงงานอุตสาหกรรมมีปริมาณไม่เพียงพอส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูง หากมีพืชอื่นที่มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกันหรือมากกว่าพลูจะเป็นทางเลือกใหม่ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น จึงได้เก็บตัวอย่างพลู (รูปที่ 8) และชนิดที่มีกลิ่นเหมือนพลูอีก 8 ชนิด ได้แก่ พลูดอยสุเทพ *P. betloides* (รูปที่ 9) พลูลงยา *P. crocatum* (รูปที่ 10) พลูลงยา *P. maculaphyllum* (รูปที่ 11) พลูป่า *P. rubroglandulosum* (รูปที่ 12) พลูขน *P. semiimmersum* (รูปที่ 13) พลูชมพู *P. submultinerve* (รูปที่ 14) พลูสามสี *P. tricolor* (รูปที่ 15) และพลูจีน *P. yinkiangense* (รูปที่ 16) มาจากสถานที่ต่างๆ ดังตารางที่ 4 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ในสารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 17-25 ระบุสารที่พบในพืชแต่ละชนิดได้ดังตารางที่ 5-13 โดยพบสารที่สำคัญ ได้แก่ eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, germacrene A, germacrene D และ sesquiterpenes

รูปที่ 8 พลู *Piper betle*

รูปที่ 9 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูดอย *Piper betloides*

รูปที่ 10 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูลงยา *Piper crocatum*

รูปที่ 11 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูลงยา *Piper maculaphyllum*

รูปที่ 12 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูป่า *Piper rubroglandulosum*

รูปที่ 13 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูขน *Piper semiimmersum*

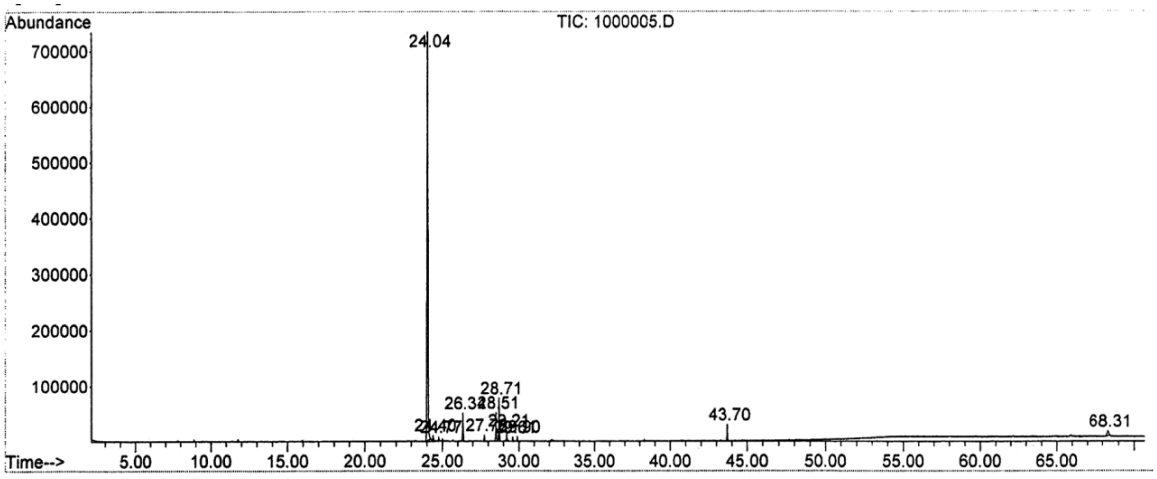
รูปที่ 14 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูชมพู *Piper submultinerve*

รูปที่ 15 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูสามสี *Piper tricolor*

รูปที่ 16 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูจีน *Piper yinkiangense*

ตารางที่ 4 ตัวอย่างศึกษาและสถานที่เก็บตัวอย่างพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

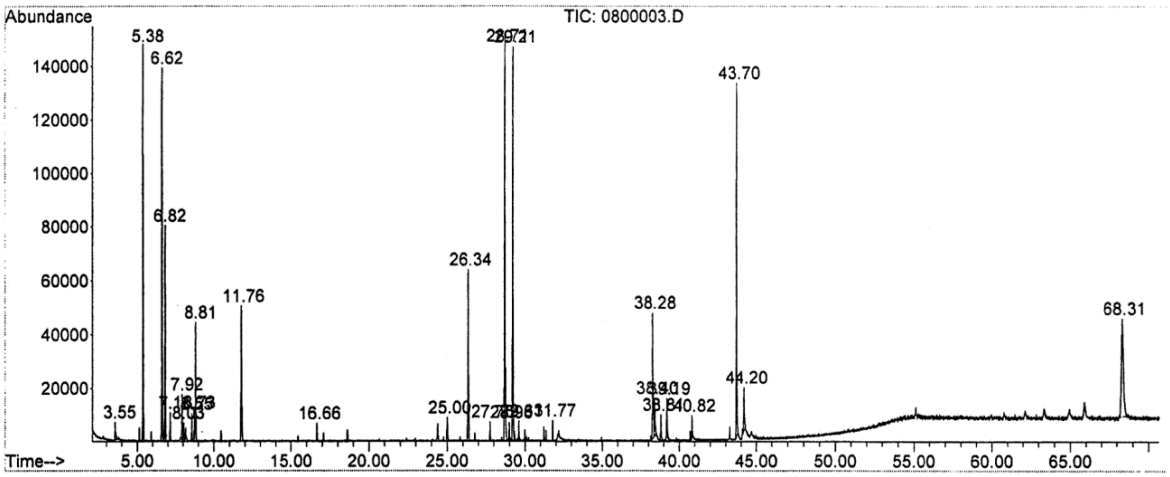
ลำดับที่	ตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1.	พลู	*Piper betle*	อ. เมือง จ. ขอนแก่น
2.	พลูดอยสุเทพ	*P. betloides*	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จ. เชียงใหม่
3.	พลูลงยา	*P. crocatum*	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ. เชียงใหม่
4.	พลูลงยา	*P. maculaphyllum*	เขตห้ามล่าสัตว์ป่าเขาพระแทว จ. ภูเก็ต
5.	พลูป่า	*P. rubroglandulosum*	ศูนย์พัฒนาและส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าเขาพระแทว จ. ภูเก็ต
6.	พลูขน	*P. semiimmersum*	อุทยานแห่งชาติศรีพังงา จ. พังงา
7.	พลูชมพู	*P. submultinerve*	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ. เชียงใหม่
8.	พลูสามสี	*P. tricolor*	อุทยานแห่งชาติศรีพังงา จ. พังงา
9.	พลูจีน	*P. yinkiangense*	อุทยานแห่งชาติเขาสก จ. สุราษฎร์ธานี



รูปที่ 17 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper betle*

ตารางที่ 5 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper betle*

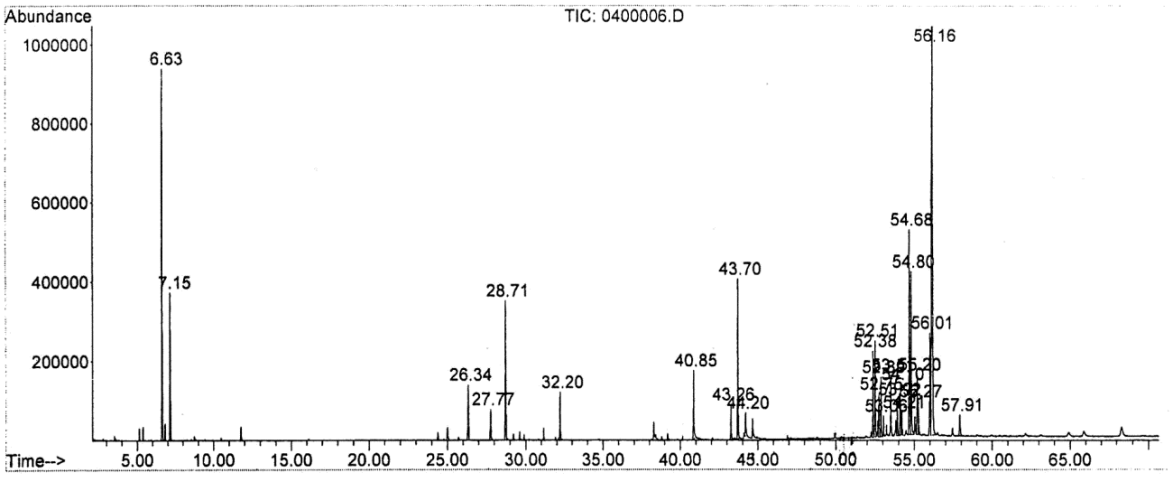
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
24.042	Eugenol หรือ Isoeugenol หรือ 4-cyclopropyl-2-methoxyphenol หรือ Chavibetol	$C_{10}H_{12}O_2$	164	80.524
28.707	Germacrene-D	$C_{15}H_{24}$	204	5.210
26.339	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	3.833
28.513	α-amorphene	$C_{15}H_{24}$	204	3.319
43.702	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	296	1.669
29.213	Bicyclogermacrene	$C_{15}H_{24}$	204	1.241
	Unknown			4.204



รูปที่ 18 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper betloides*

ตารางที่ 6 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper betloides*

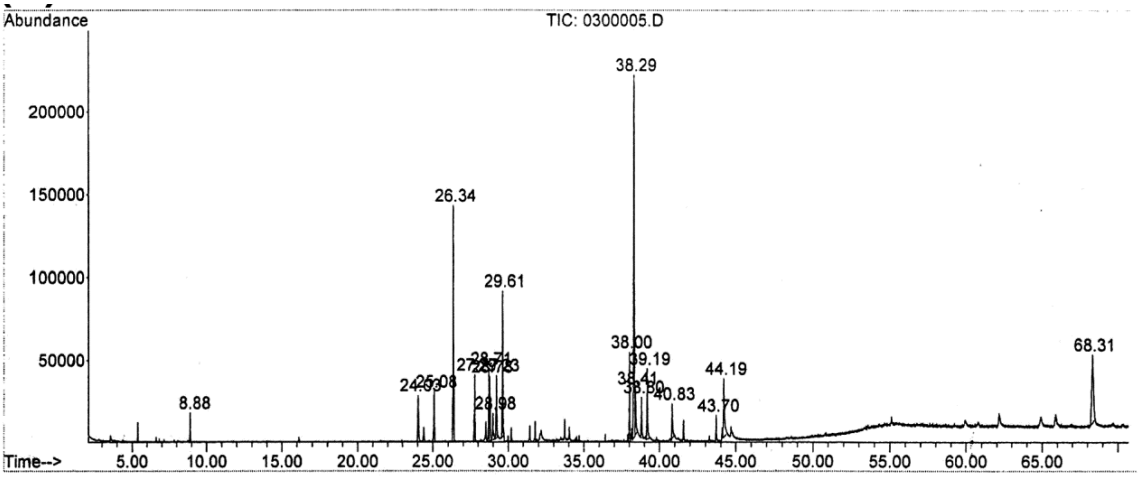
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
28.713	Germacrene-D หรือ β-cubebene หรือ Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro	$C_{15}H_{24}$	204	13.286
29.212	Bicyclogermacrene	$C_{15}H_{24}$	204	12.552
5.381	α-pinene หรือ Tricyclene หรือ γ-terpinene หรือ 4-carene	$C_{10}H_{16}$	136	9.424
6.621	Sabinene หรือ β-phellandrene หรือ β-terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	9.352
68.309	1,3-dimethyl-4-azaphenanthrene 4'methy-2 phenylindole	$C_{15}H_{13}N$	207	9.160
43.702	Phytol isomer	$C_{20}H_{40}O$	296	8.930
26.339	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	5.885
6.821	β-pinene หรือ Sabinene หรือ Cyclohexane,4-methylene-1-(1-methylethyl)	$C_{10}H_{16}$	136	5.527
11.768	L-linalool	$C_{10}H_{18}O$	154	4.377
11.756	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	4.130
38.278	β-phellandrene หรือ β-thujene หรือ Sabinene	$C_{10}H_{16}$	136	3.548
	Unknown			13.829



รูปที่ 19 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper crocatum*

ตารางที่ 7 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper crocatum*

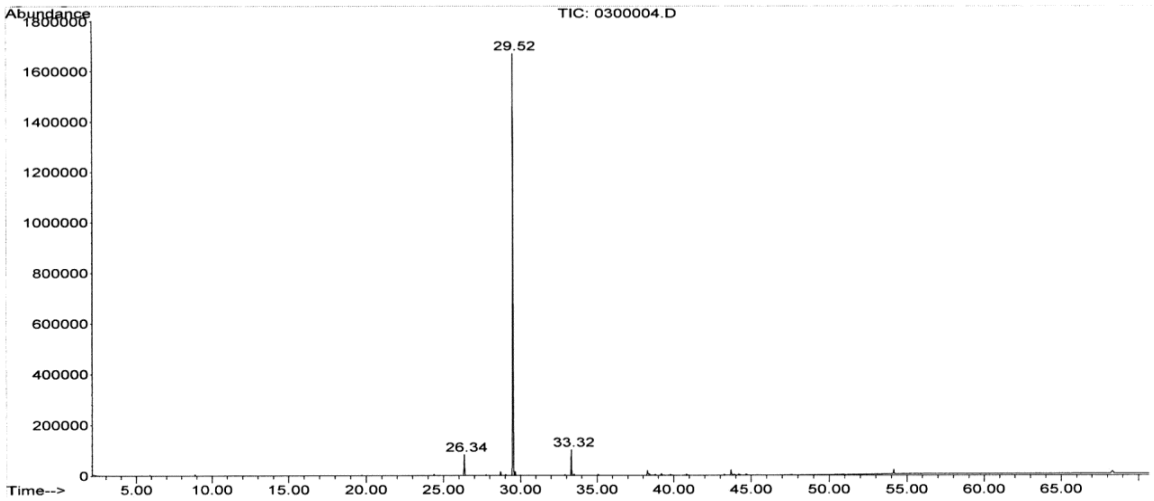
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
6.627	Sabinene หรือ β-phellandrene หรือ β-terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	10.166
54.683	4-allyloxy-6-methoxy-N,N-dimethyl-1,3,5-	$C_9H_{14}N_4O_2$	210	6.543
28.713	Germacrene-D หรือ β-cubebene หรือ Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro หรือ Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene,2-isopropyl-5-m	$C_{15}H_{24}$	204	4.585
43.702	Phytol isomer	$C_{20}H_{40}O$	296	4.368
7.150	β-myrcene	$C_{10}H_{16}$	136	4.006
56.005	Methyl (25R)-5-oxo-A-nor-3,5-secospirost	$C_{27}H_{42}O_5$	446	3.651
40.846	Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	256	2.259
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	2.058
27.773	α-humulene	$C_{15}H_{24}$	204	1.121
56.158	Unknown			61.243



รูปที่ 20 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper maculaphyllum*

ตารางที่ 8 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper maculaphyllum*

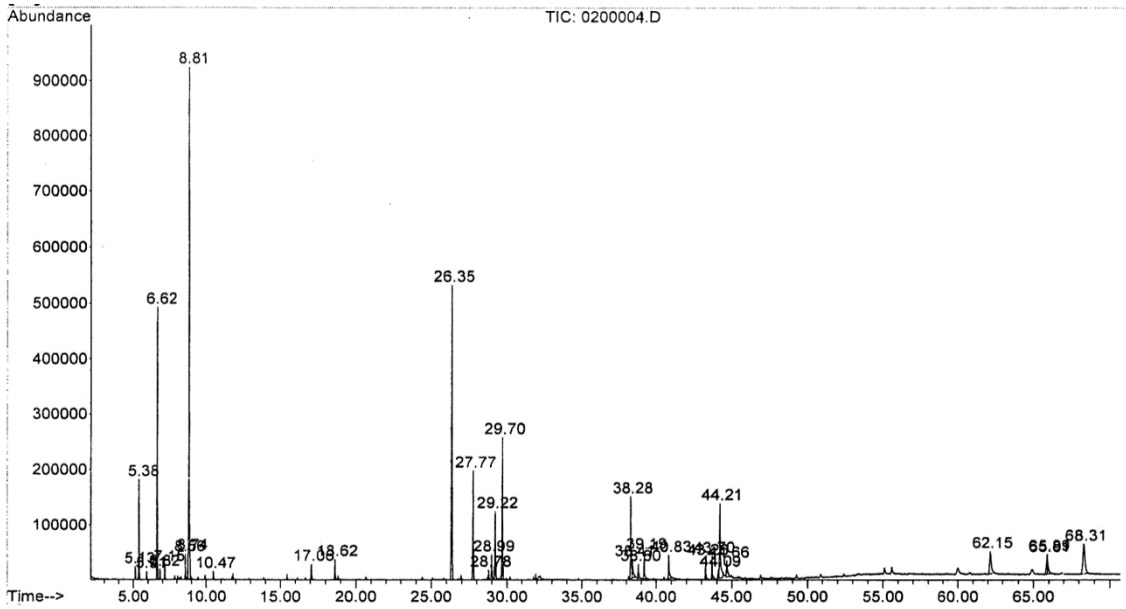
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
38.296	Germacrene-A	$C_{15}H_{24}$	204	24.256
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	13.442
68.315	24(Z)-methyl-25-homocholesterol หรือ 1,5-dimethyl-6-(1,5-dimethylhexyl)-15,16	$C_{29}H_{50}O$	414	9.660
29.612	1H-cycloprop[e]azulene หรือ Bicyclogermacrene	$C_{15}H_{24}$	204	7.112
29.224	Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro หรือ Bicyclogermacrene	$C_{15}H_{24}$	204	3.867
28.707	Germacrene-D หรือ β-cubebene	$C_{15}H_{24}$	204	3.777
27.767	α-humulene หรือ β-selinene	$C_{15}H_{24}$	204	3.611
28.778	1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methylbenzene	$C_{15}H_{22}$	202	3.389
24.025	Isoeugenol หรือ Chavibetol	$C_{10}H_{12}O_2$	164	3.236
25.082	β-elemene	$C_{15}H_{24}$	204	3.014
8.877	1,8-cineole	$C_{10}H_{18}O$	154	1.393
	Unknown			23.243



รูปที่ 21 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper rubroglandulosum*

ตารางที่ 9 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper rubroglandulosum*

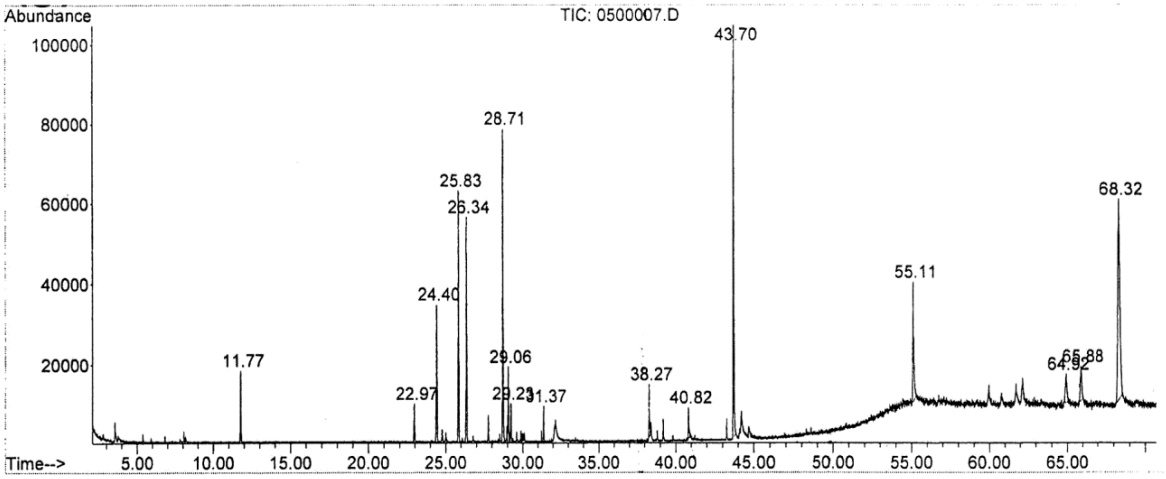
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
29.518	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (butylated hydroxytoluene)	$C_{15}H_{24}O$	220	89.828
26.339	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	5.330
	Unknown			4.842



รูปที่ 22 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper semiimmersum*

ตารางที่ 10 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper semiimmersum*

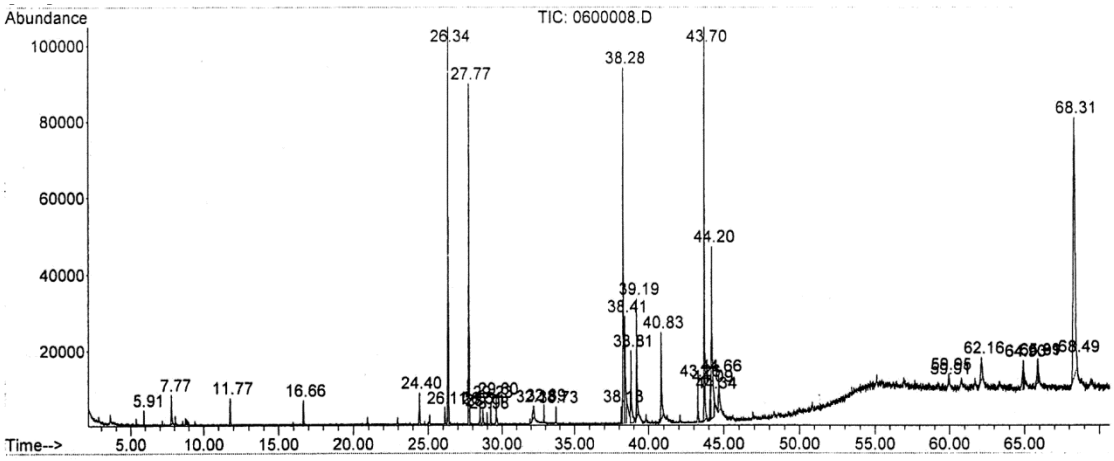
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
8.812	Sabinene หรือ β-phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136	22.788
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	15.304
6.627	Sabinene หรือ β-phellandrene หรือ Cyclohexane หรือ 4-methylene-1-(1-methylethyl) หรือ β-terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	10.121
29.694	β-bisabo	$C_{15}H_{24}$	204	5.977
44.207	9-octadecenoic acid Heptadecene-(8)-carbonic acid-(1) หรือ 9,12,15-octadecatrien-1-ol,(z,z,z)-	$C_{18}H_{34}O_2$	282	5.000
27.767	cis,cis,cis-1,1,4,8-tetramethyl-4,7,10-cycloundecatriene หรือ β-selinene หรือ α-humulene หรือ α-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	5.211
38.278	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	4.064
5.381	α-pinene หรือ Tricycle[2.2.1.02,6] heptane,1,7,7-trimethyl หรือ γ-terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	3.399
62.151	Vitamin e	$C_{29}H_{50}O_2$	430	2.660
	Unknown			25.476



รูปที่ 23 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper submultinerve*

ตารางที่ 11 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper submultinerve*

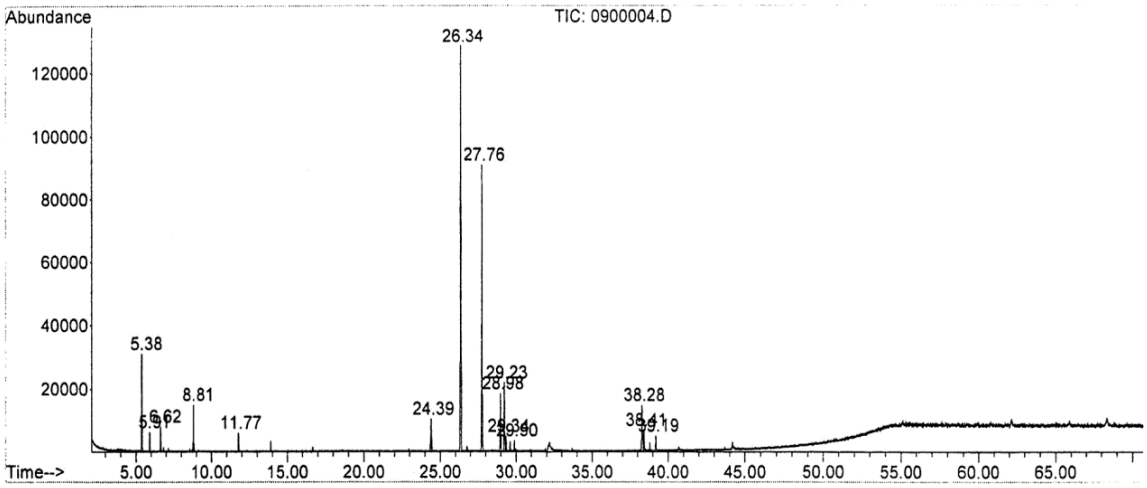
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
43.702	Phytol isomer	$C_{20}H_{40}O$	296	24.754
68.314	24(z)-methyl-25-homocholesterol หรือ 1,5-dimethyl-6-(1,5-dimethylhexyl)-15,16	$C_{29}H_{50}O$	414	19.150
28.713	Germacrene-D	$C_{15}H_{24}$	204	10.676
25.828	α-gurjunene	$C_{15}H_{24}$	204	9.199
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	8.555
24.400	α-copaene หรือ α-cubebene	$C_{15}H_{24}$	204	5.517
11.768	L-linalool	$C_{10}H_{18}O$	154	2.381
22.967	α-cubebene หรือ α-ylangene	$C_{15}H_{24}$	204	1.453
55.106	Unknown			18.315



รูปที่ 24 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper tricolor*

ตารางที่ 12 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper tricolor*

RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
68.315	(23s)ethylcholest-5-en-3.β-ol	$C_{29}H_{50}O$	414	18.663
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	14.593
38.279	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	10.581
27.767	α-humulene	$C_{15}H_{24}$	204	9.427
44.195	9,12,15-octadecatrien-1-ol,(z,z,z)- หรือ 7,10,13-hexadecatrienoic acid	$C_{18}H_{32}O$	264	7.025
39.189	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	3.270
40.829	Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	256	2.711
	Unknown			33.730



รูปที่ 25 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper yinkiangense*

ตารางที่ 13 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper yinkiangense*

RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	39.444
27.767	α-humulene หรือ α-caryophyllene หรือ β-selinene	$C_{15}H_{24}$	204	25.152
5.381	α-pinene หรือ (1R,1S)-2,6,6-trimethyl bicyclo[3.1.1]hept-2-ene หรือ Tricyclene tricycle หรือ [2.2.1.02,6]heptane,1,3,3-trimethyl หรือ 3-care	$C_{10}H_{16}$	136	6.025
29.230	α-selinene	$C_{15}H_{24}$	204	5.271
28.983	β-selinene	$C_{15}H_{24}$	204	4.606
8.813	Sabinene หรือ β-phellandrene หรือ β-terpin	$C_{10}H_{16}$	136	3.647
24.389	α-copaene	$C_{15}H_{24}$	204	3.185
38.408	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene	$C_{20}H_{40}$	280	1.520
	Unknown			11.150

3.4 ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชทั้ง 9 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (รูปที่ 26) ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* ได้ผลขนาดของบริเวณยับยั้ง (ตารางที่ 14) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

สารสกัดพืชที่ไม่ได้เจือจาง

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

สารสกัดจากพืช 8 ชนิด คือ *P. betle* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. submultinerve*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. semiimmersum* และ *P. yinkiangense* ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญแต่ไม่เกิดฤทธิ์ยับยั้ง

แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

สารสกัดจากพืช 7 ชนิด คือ *P. betle* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. semiimmersum* และ *P. yinkiangense* ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ แต่มีเพียง 2 ชนิด คือ *P. rubroglandulosum* เพศเมีย และ *P. yinkiangense* ที่มีฤทธิ์การยับยั้งอย่างอ่อน คือ เกิดบริเวณยับยั้ง 5.17±0.29 และ 5.17± 0.29 มิลลิเมตร

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

สารสกัดจาก *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* มีฤทธิ์การยับยั้งอย่างอ่อน คือ เกิดบริเวณยับยั้ง 5.83±0.76 และ 6.00±1.00 มิลลิเมตร

สำหรับแบคทีเรีย *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* สารสกัดจากพืชทั้ง 9 ชนิด ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ

สารสกัดพืชที่เจือจาง

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่เจือจาง 2 4 และ 8 เท่า ได้ผลดังนี้

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

สารสกัดจากพืช 8 ชนิด คือ *P. betle* เพศผู้, *P. betloides*, *P. crocatum, P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. semiimersum*, *P. submultinerve* และ *P. yinkiangense* ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญแต่ไม่เกิดฤทธิ์ยับยั้ง

แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

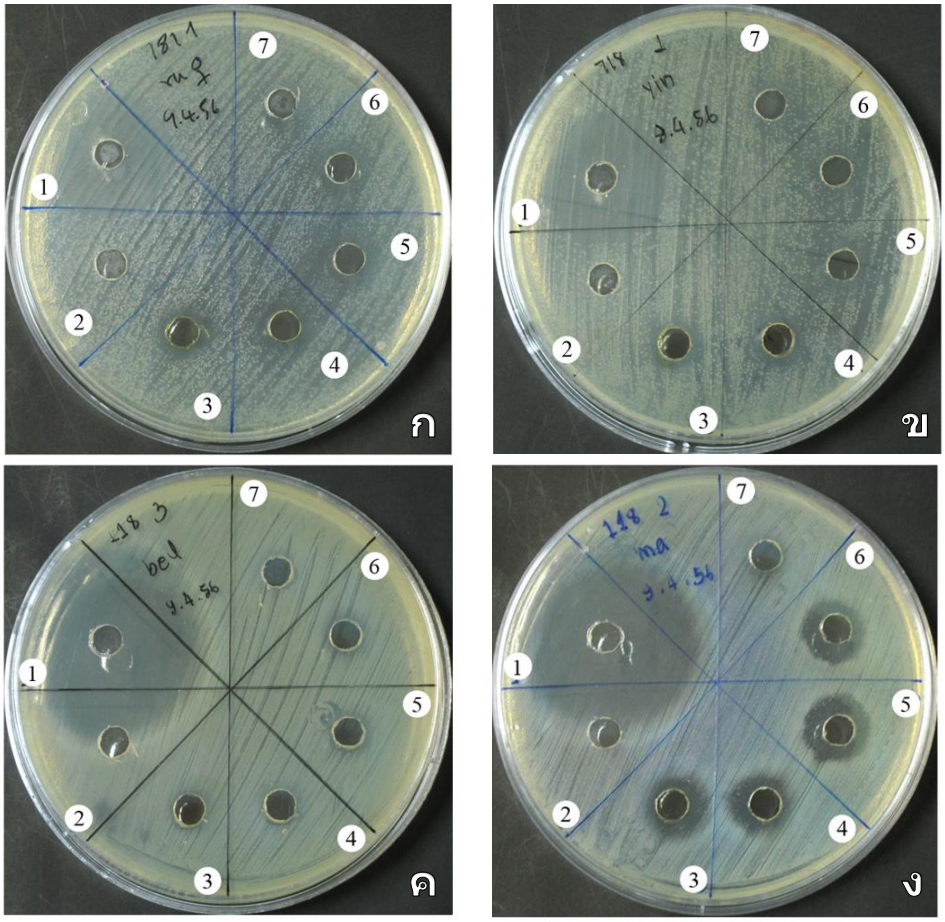
สารสกัดจากพืชที่ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญแต่ไม่เกิดฤทธิ์ยับยั้ง ได้แก่ *P. rubroglandulosum* เพศผู้ ทุกระดับการเจือจาง *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. rubroglandulosum* เพศเมีย, *P. semiimmersum* และ *P. yinkiangense* ที่ระดับการเจือจาง 2 และ 4 เท่า และ *P. betle* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย และ *P. maculaphyllum* ที่ระดับการเจือจาง 2 เท่า

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

สารสกัดจาก *P. betloides* ทุกระดับการเจือจางทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญแต่ไม่เกิดฤทธิ์ยับยั้ง สารสกัดจาก *P. maculaphyllum* เกิดฤทธิ์ยับยั้ง โดยมีบริเวณยับยั้งขนาด 5.67±0.58, 6.33±1.15 และ 5.67±0.58 มิลลิเมตร สำหรับการเจือจาง 2 4 และ 8 เท่า ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งของแต่ละระดับการเจือจางไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$).

สำหรับแบคทีเรีย *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* สารสกัดจากพืชทั้ง 9 ชนิด ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ

แบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ที่นำมาทดสอบนี้ เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้มากในประเทศเขตร้อน จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยพืชต่างๆ เพื่อจะนำมาใช้เพิ่มเติมจากพลู พบว่าชนิดที่เป็นไปได้ ได้แก่ *P. rubroglandulosum* เพศผู้, *P. yinkiangense*, *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* โดยสารสกัดที่ไม่เจือจางจาก *P. rubroglandulosum* และ *P. yinkiangense* มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัดที่ไม่เจือจางจาก *P. betloides* และสารสกัดที่ทุกระดับการเจือจางจาก *P. maculaphyllum* มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* พืชที่น่าสนใจที่สุดคือ *P. maculaphyllum* เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์หลายโรค ประชาชนจึงสามารถใช้ประโยชน์จากพืชนี้ได้ทั้งการบริโภคในระดับท้องถิ่นหรือการปลูกเป็นจำนวนมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปแทนการใช้ใบพลูเพียงอย่างเดียว ในกรณีที่พลูเกิดโรคหรือขาดแคลนในบางฤดู ผลการทดสอบยังพบว่าสารสกัดจาก *P. yinkiangense*, *P. betloides* and *P. maculaphyllum* มีฤทธิ์การยับยั้ง *P. aeruginosa* และ *S. aureus* สูงกว่าสารสกัดจากพลู



รูปที่ 26 ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่ระดับการเจือจางต่างๆ ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* (สารสกัดจาก ♀ *Piper rubroglandulosum* (ก) *P. yinkiangense* (ข)) และ *Staphylococcus aureus* (สารสกัดจาก *P. betloides* (ค) *P. maculaphyllum* (ง)) สารที่เติมลงไปในแต่ละหลุมได้แก่ (1) antibiotic (2) น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (3) สารสกัดที่ไม่ได้เจือจาง (4) สารสกัดที่เจือจาง 2 เท่า (5) สารสกัดที่เจือจาง 4 เท่า (6) สารสกัดที่เจือจาง 8 เท่า และ (7) DMSO

ตารางที่ 14 ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่ระดับการเจือจางต่างๆ ต่อการเจริญของแบคทีเรีย

พืชและระดับการเจือจางของสารสกัด	ขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มม.±SE) ของแบคทีเรีย[a]		
	B. thuringiensis	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
♀ *Piper betle*			
ไม่เจือจาง	2.00 ± 0.00 [A]	2.67 ± 0.58 [A]	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.17 ± 0.29	2.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	0.00	0.00	0.00
♂ *P. betle*			
ไม่เจือจาง	2.50 ± 0.50 [A]	3.67 ± 0.58 [ABD]	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.33 ± 0.29	3.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.00 ±0.00	0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ±0.00	0.00	0.00
P. betloides			
ไม่เจือจาง	2.67 ± 0.58 [AB]	4.33 ± 0.58 [BCDE]	5.83 ± 0.76 [A]
เจือจาง 2 เท่า	2.17 ± 0.29	3.33 ± 0.29	3.83 ± 0.76
เจือจาง 4 เท่า	2.17 ± 0.29	2.50 ± 0.87	3.67 ± 1.53
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	2.67 ± 1.15
P. crocatum			
ไม่เจือจาง	3.75 ± 0.35 [BC]	4.50 ± 0.87 [BCE]	0.00
เจือจาง 2 เท่า	3.33 ± 0.58	3.17 ± 1.04	0.00
เจือจาง 4 เท่า	3.33 ± 0.29	2.67 ± 0.58	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.83 ± 0.76	0.00	0.00
P. maculaphyllum			
ไม่เจือจาง	2.33 ± 0.29 [A]	3.33 ± 1.15 [AB]	6.00 ± 1.00 [A]
เจือจาง 2 เท่า	2.50 ± 0.00	3.00 ± 0.00	5.67 ± 0.58
เจือจาง 4 เท่า	2.50 ± 0.50	0.00	6.33 ± 1.15
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	5.67 ± 0.58

[a]หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกัน มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 14 ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่ระดับการเจือจางต่างๆ ต่อการเจริญของแบคทีเรีย (ต่อ)

พืชและระดับการเจือจางของสารสกัด	ขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มม.±SE) ของแบคทีเรีย[a]		
	B. thuringiensis	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
♀ *P. rubroglandulosum*			
ไม่เจือจาง	3.50 ± 0.87 [BCD]	5.17 ± 0.29 [C]	0.00
เจือจาง 2 เท่า	3.17 ± 0.58	4.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	3.17 ± 0.76	3.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.67 ± 1.15	0.00	0.00
♂ *P. rubroglandulosum*			
ไม่เจือจาง	2.67 ± 0.58 [ACD]	5.00 ± 0.00 [CD]	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.33 ± 0.58	4.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.83 ± 1.04	3.17 ± 0.29	0.00
เจือจาง 8 เท่า	3.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	0.00
P. semiimersum			
ไม่เจือจาง	2.17 ± 0.29 [A]	3.67 ± 1.53 [ABD]	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.33 ± 0.58	4.33 ± 2.31	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
P. submultinerve			
ไม่เจือจาง	2.00 ± 0.00 [A]	0.00	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.33 ± 0.58	0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.33 ±0.58	0.00	0.00
P. yinkiangense			
ไม่เจือจาง	3.67 ± 0.76 [C]	5.17 ± 0.29 [CE]	0.00
เจือจาง 2 เท่า	3.00 ± 0.50	4.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.33 ± 0.58	2.67 ± 0.58	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00

[a]หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกัน มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.5 ปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

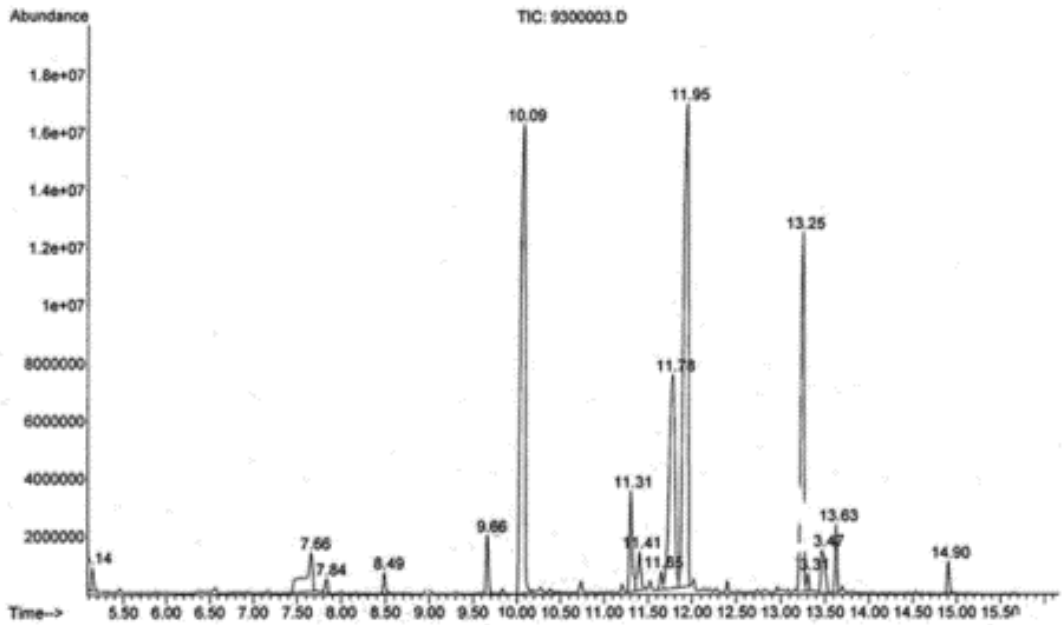
ได้กลั่นน้ำมันหอมจากพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลูโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ ได้สัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยเทียบกับน้ำหนักใบสดจากพืชแต่ละชนิดดังตารางที่ 15 พบว่าพลูให้น้ำมันหอมมากที่สุด คือ 2.73 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ชนิดที่ให้น้ำมันหอมน้อยที่สุดคือพลูลลงยา *P. crocatum* ซึ่งได้เพียง 0.03 มิลลิลิตร/กิโลกรัม โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของพืชแต่ละชนิดดังรูปที่ 27-35 เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างพืชแต่ละชนิดดังตารางที่ 16 ปริมาณสารองค์ประกอบที่พบในสัดส่วนมากกว่า 10% ได้แก่ พบ L-linalool 13.629-26.590% ใน *P. betloides* และ *P. crocatum* พบ β-terpineol, α-terpineol, 4-terpineol, และ isomers ของ terpineol 10.111-46.560% ใน *P. betloides*, *P. crocatum* และ *P. tricolor* พบ eugenol/isoeugenol 49.942-53.559% ใน *P. tricolor* และ *P. betle* พบ eugenol acetate/isoeugenol acetate 29.739% ใน *P. betle* พบ β-elemene 14.384% ใน *P. submultinerve* พบ isomers ของ caryophyllene 11.505-39.422% ใน *P. maculaphyllum*, *P. submultinerve* และ *P. yinkiangense* พบ β-selinene และ α-selinene 10.319-36.62% ใน *P. betloides*, *P. yinkiangense*, และ *P. submultinerve* พบ germacrene D 12.528-36.317% ใน *P. maculaphyllum* และ *P. submultinerve* พบ bicyclogermacrene 14.482% ใน *P. tricolor* พบ butylated hydroxytoluene 13.521-29.474% ใน *P. crocatum*, *P. betloides*, *P. maculaphyllum* และ *P. semiimersum* พบ 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene 13.559-60.089% ใน *P. betle*, *P. yinkiangense*, *P. submultinerve*, *P. tricolor*, *P. rubroglandulosum* และ *P. semiimersum*

เมื่อทราบว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระแหยมีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และต้านการอักเสบจึงได้ทดลองนำน้ำมันหอมระเหยมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ 3 อย่าง ได้แก่ สบู่ก้อน สบู่เหลว และสเปรย์ระงับกลิ่น (รูปที่ 36) และนำผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไปทดสอบในอาสาสมัครจำนวน 60 คน พบว่าสบู่ก้อนและสบู่เหลวช่วยลดอาการอักเสบของผิวหนังโดยเฉพาะสิวที่ใบหน้าและช่วยลดอาการคันได้อย่างมีนัยสำคัญ สเปรย์ระงับกลิ่นมีคุณสมบัติในการลดหรือกำจัดกลิ่นเท้าได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน

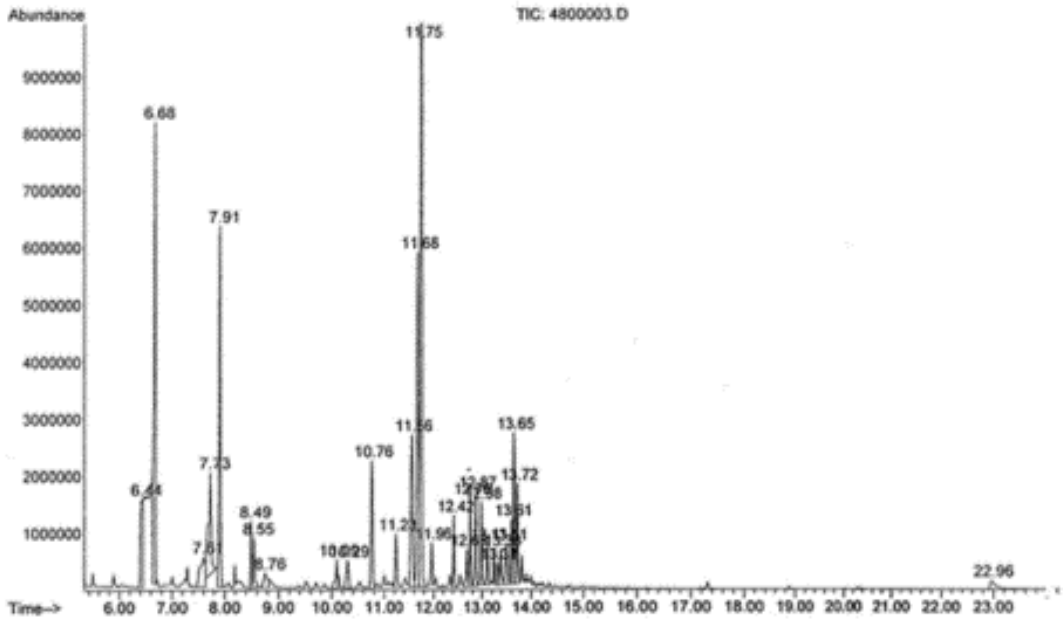
ตารางที่ 15 สัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยเทียบกับน้ำหนักใบสดจากพืชแต่ละชนิด

พืชที่ใช้กลั่น	เดือน/ปี/ฤดูกาล* ที่กลั่น	น้ำหนักสด (กิโลกรัม)	ปริมาณน้ำมันหอม (มิลลิลิตร)	สัดส่วนน้ำมันหอม (มิลลิลิตร/กิโลกรัม)
Piper betle 1	11/2012/D	1.00	1.840	1.84
	7/2013/R	0.92	0.770	0.84
	7/2013/R	1.00	0.790	0.79
	7/2013/R	0.94	1.050	1.12
	8/2013/R	1.00	2.150	2.15
	8/2013/R	1.00	2.730	2.73
P. betle 2	11/2012/D	1.00	0.950	0.95
P. betloides	2/2014/D	0.82	0.078	0.10
P. crocatum	2/2014/D	0.66	0.020	0.03
P. maculaphyllum	5/8/2013/R	0.50	0.025	0.05
P. rubroglandulosum 1	4/2014/D	0.47	0.220	0.47
P. rubroglandulosum 2	1/4/2014	0.33	0.240	0.72
P. semiimersum	8/2013/R	0.60	0.080	0.13
P. submultinerve 1	2/2014/D	1.00	0.115	0.12
P. submultinerve 2	2/2014/D	0.76	0.302	0.40
P. submultinerve 3	2/2014/D	0.36	0.010	0.03
P. submultinerve 4	2/2014/D	0.94	0.032	0.03
P. tricolor 1	11/2013/D	0.78	0.590	0.76
P. tricolor 2	2/2014/D	0.98	0.030	0.03
P. yinkiangense	4/2014/D	0.65	0.40	0.62

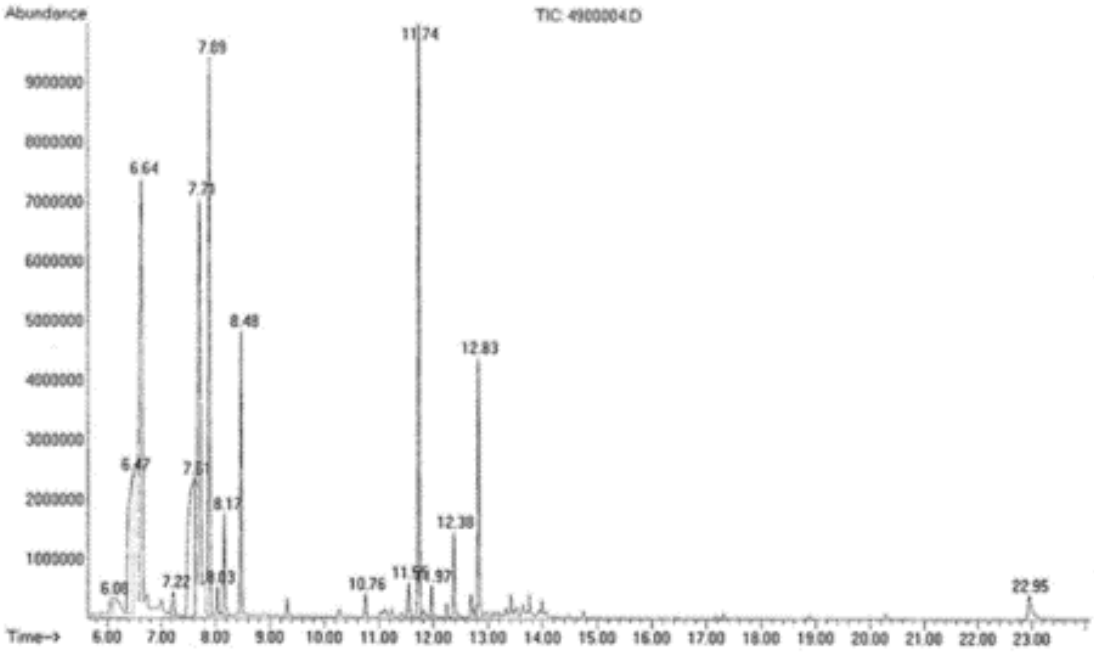
***D = ฤดูแล้ง, R = ฤดูฝน**



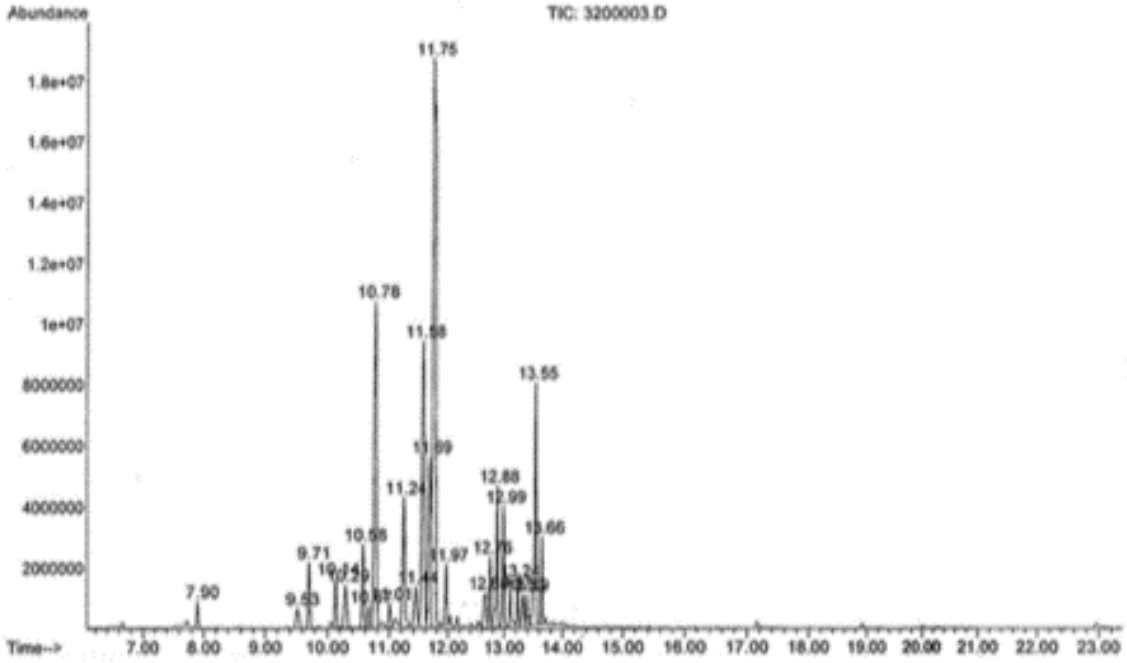
รูปที่ 27 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper betle*



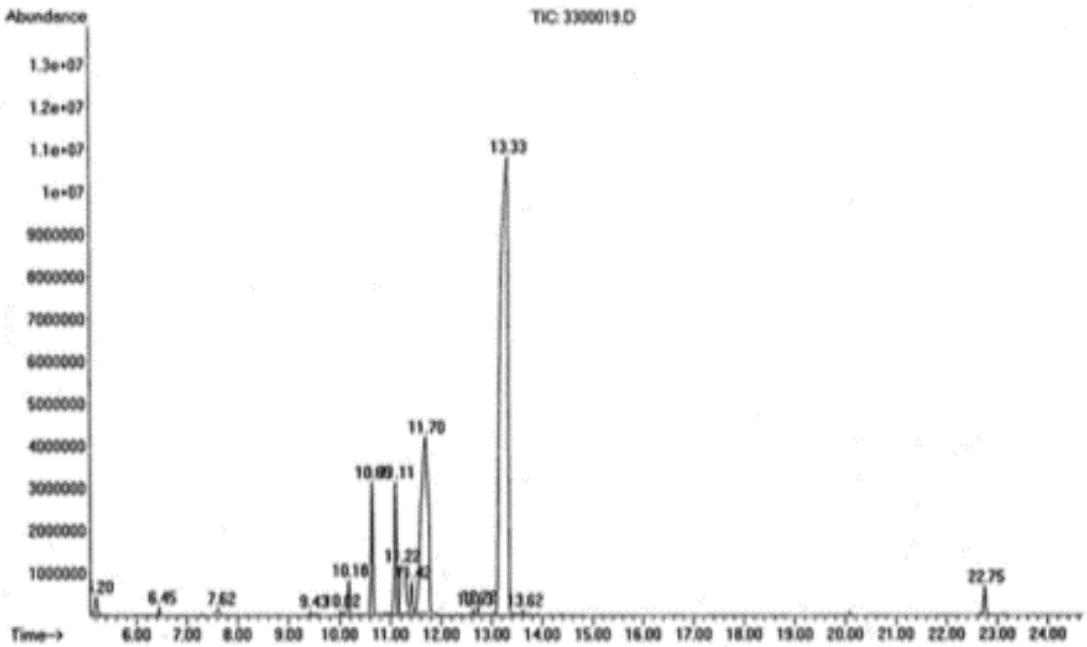
รูปที่ 28 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper betloides*



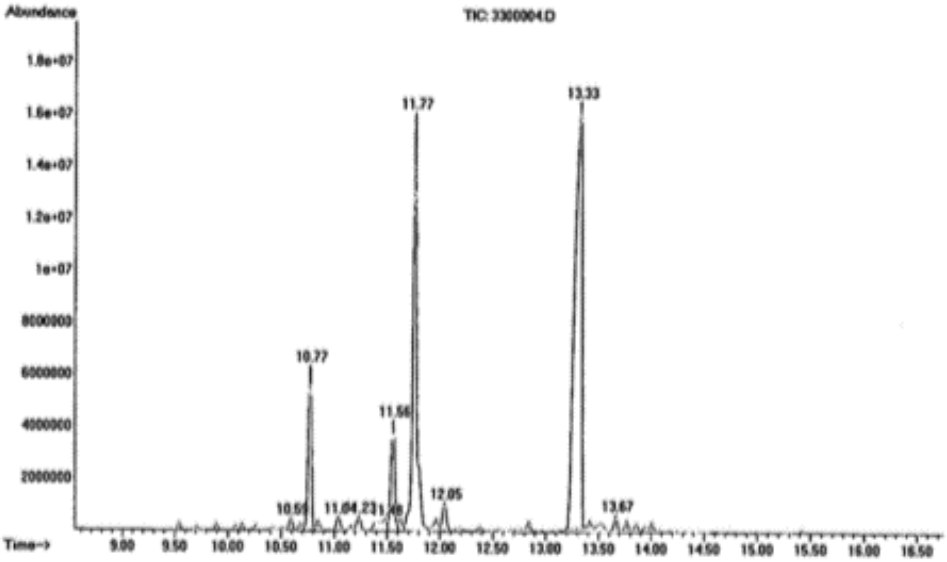
รูปที่ 29 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper crocatum*



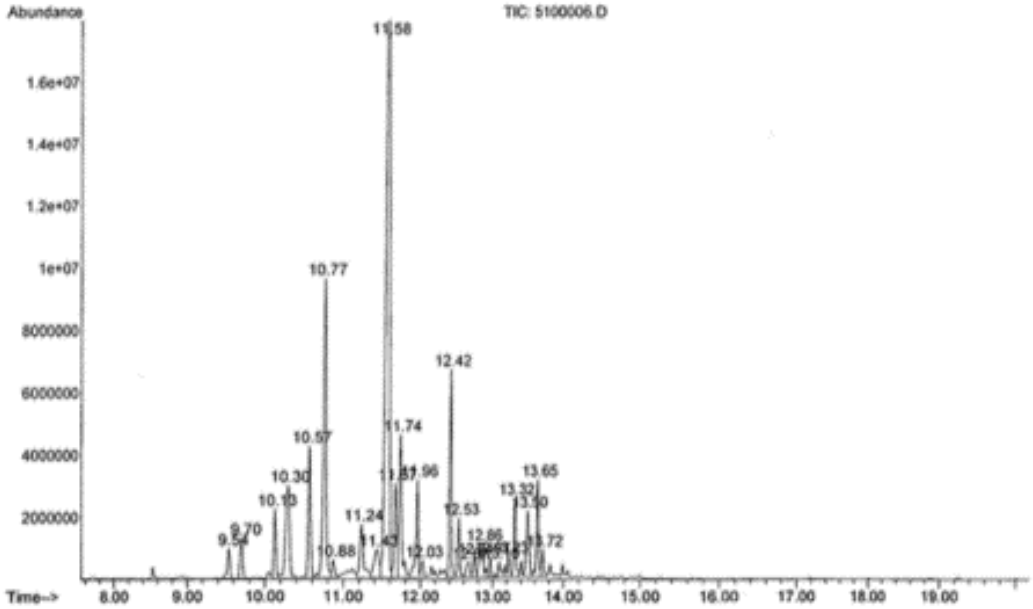
รูปที่ 30 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper maculaphyllum*



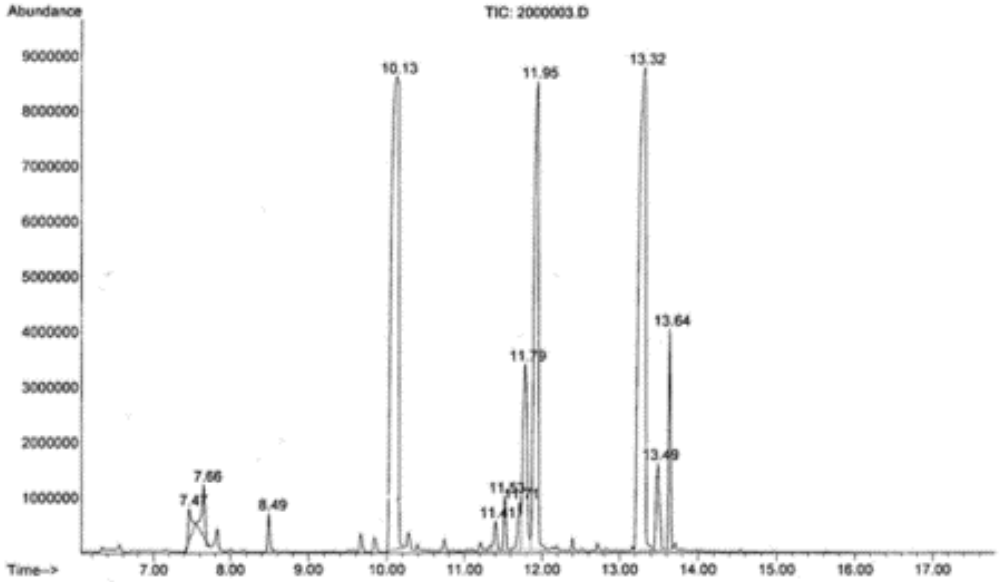
รูปที่ 31 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper rubroglandulosum*



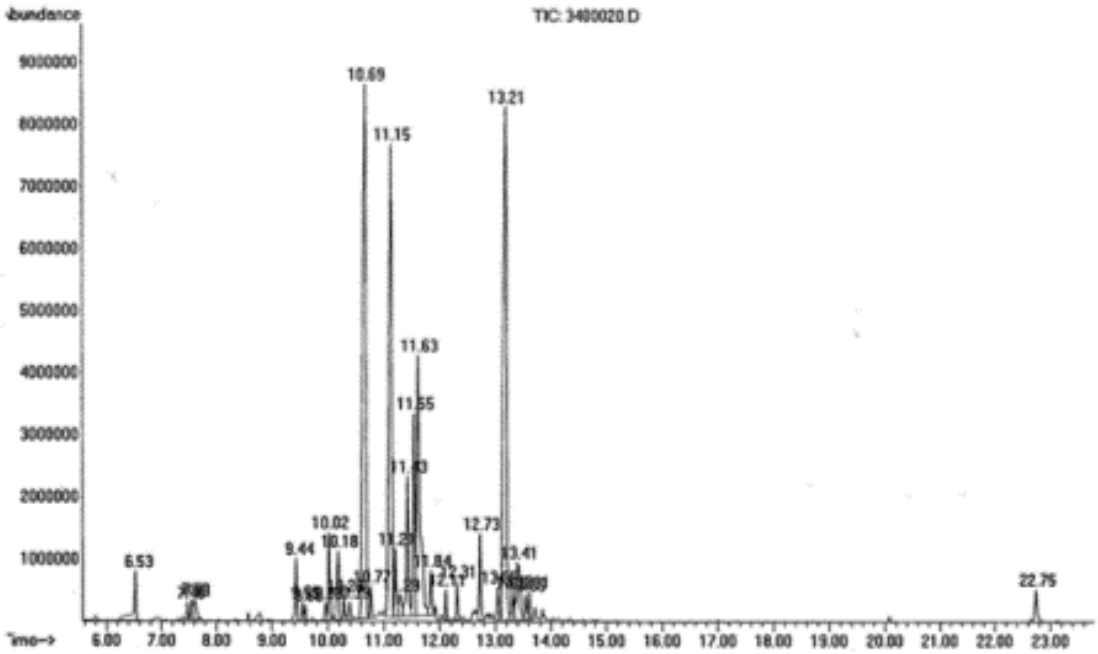
รูปที่ 32 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper semiimmersum*



รูปที่ 33 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper submultinerve*



รูปที่ 34 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper tricolor*



รูปที่ 35 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper yinkiangense*

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

Compound	Retention time	Formula	Molecular weight	Relative content (%)														
				Piper betle 1	*P. betle* 2	*P. betloides*	*P. crocatum*	*P. maculaphyllum*	*P. rubroglandulosum* 1	*P. rubroglandulosum* 2	*P. semiimmersum*	*P. submultinerve* 1	*P. submultinerve* 2	*P. submultinerve* 3	*P. submultinerve* 4	*P. tricolor* 1	*P. tricolor* 2	*P. yinkiangense*
Eucalyptol	5.143	$C_{10}H_{18}O$	154	-	0.654	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-β-Ocimene; δ-3-Carene; α-Ocimene; cis-Ocimene; cis-β-Ocimene; γ-Terpinene; Tricyclene; α-Pinene	5.195-5.477	$C_{10}H_{16}$	136	-	-	-	-	-	0.597	0.750	-	-	-	-	-	-	0.688	-
trans-Sabinene hydrate	6.072	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	-	0.717	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Terpineol	7.243-7.710	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	-	25.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.701	-
L-Linalool	6.406-6.683	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	13.629	26.590	-	0.160	-	-	-	-	5.434	-	-	7.112	1.594
α-Terpineol	7.462-7.912	$C_{10}H_{18}O$	154	-	0.494	10.111	14.218	0.636	-	-	-	-	-	-	-	2.276	2.243	-
Linalyl propionate		$C_{13}H_{22}O_2$	210															
Borneol	7.479	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.240
4-Terpineol	7.554-7.733	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	4.705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46.560	0.381
n-Decanal	7.612	$C_{10}H_{20}O$	156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.208
2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-	7.658	$C_{10}H_{18}O$	154	-	3.762	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-Piperitol	8.056	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.508	-
Geraniol	8.166-8.950	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	1.204	7.777	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chavicol	8.489-8.546	$C_9H_{10}O$	134	0.716	0.617	1.110	-	-	-	-	-	-	-	4.035	-	0.729	-	-
δ-Elemene; α-Terpinene; δ-2-Carene; δ-4-Carene	9.429-9.539	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	0.149	-	-	1.135	-	-	-	-	-	1.337
Chavicol acetate	9.550-9.677	$C_{11}H_{12}O_2$	176	6.843	1.637	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.293

ตารางที่ 16 องค์ประกออบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

Compound	Retention time	Formula	Molecular weight	Relative content (%)														
				Piper betle 1	*P. betle* 2	*P. betloides*	*P. crocatum*	*P. maculaphyllum*	*P. rubroglandulosum* 1	*P. rubroglandulosum* 2	*P. semiimmersum*	*P. submultinerve* 1	*P. submultinerve* 2	*P. submultinerve* 3	*P. submultinerve* 4	*P. tricolor* 1	*P. tricolor* 2	*P. yinkiangense*
α-Cubebene	9.596-9.706	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	1.755	-	-	-	1.379	-	-	-	-	-	0.295
Cadina-1,4-diene																		
Eugenol; Isoeugenol; Chavibetol; Isochavibetol	9.873-11.950	$C_{10}H_{12}O_2$	164	7.847	53.559	-	-	-	-	-	-	-	-	4.797	2.730	49.942	-	-
Cyclosativene	9.960	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.367
α-Copaene	10.017-13.548	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	8.522	0.136	0.213	-	2.135	-	-	0.704	-	0.651	1.648
Geranyl acetate	10.093	$C_{12}H_{20}O_2$	196	-	-	0.910	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Elemene	10.179-11.477	$C_{15}H_{24}$	204	1.118	-	1.012	-	1.820	1.269	1.110	-	5.195	6.424	3.337	14.384	-	1.234	2.030
O-Methyl eugenol	10.289	$C_{11}H_{14}O_2$	178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.397
α-Grujunene	10.571-11.685	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	9.439	-	-	-	4.097	-	-	-	-	-	-
trans-Caryophyllene; trans-β-Caryophyllene	10.646-10.802	$C_{15}H_{24}$	204	2.473	-	3.617	0.651	11.505	4.083	4.870	9.318	11.656	39.422	7.175	26.283	-	1.831	21.142
Germacrene D; β-Cubebene; (-)-Sinularene	10.871-11.887	$C_{15}H_{24}$	204	6.714	-	5.312	0.869	12.528	1.115	2.168	7.362	36.317	1.145	-	3.953	1.174	4.769	8.592
trans-β-Farnesene	10.917	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	0.208	-	-	-	-	-	-	-	-
Aromadendrene	11.010	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	0.842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Caryophyllene	11.114-11.240	$C_{15}H_{24}$	204	0.775	-	1.679	-	4.987	4.282	3.062	-	2.849	-	6.490	25.063	-	0.760	16.136
Calarene; Valencene	11.287	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.838

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

				Relative content (%)														
Compound	**Retention time**	**Formula**	**Molecular weight**	*Piper betle* 1	*P. betle* 2	*P. betloides*	*P. crocatum*	*P. maculaphyllum*	*P. rubroglandulosum* 1	*P. rubroglandulosum* 2	*P. semiimmersum*	*P. submultinerve* 1	*P. submultinerve* 2	*P. submultinerve* 3	*P. submultinerve* 4	*P. tricolor* 1	*P. tricolor* 2	*P. yinkiangense*
γ-Cadinene; α-Cadinene; α-Morphine; α-Amorphene; 4,5-Dimethyl-11-Methylenetricyclo[7.2.1.0(4.9)]dodecane	11.408-11.422	$C_{15}H_{24}$	204	2.652	1.633	-	-	1.858	-	-	-	-	-	-	5.822	0.761	-	-
α-Selinene	11.414-11.627	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.180	-	-	-	0.820	10.749
β-Selinene	11.269-11.673	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	10.319	-	-	-	-	-	-	36.62	2.429	7.540	-	-	-
(+)-Ledene	11.677	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	3.281	-	-	-	-	-	-
Butylated hydroxytoluene	11.713-11.765	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	23.912	13.521	27.542	-	-	29.474	-	9.743	7.849	7.060	1.169	-	-
Bicyclogermacrene	11.714-11.737	$C_{15}H_{24}$	204	2.748	-	-	-	-	-	-	-	5.742	-	-	-	-	14.482	-
1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene		$C_{10}H_{16}$	136															
δ-Cadinene	11.840-13.323	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	1.078	-	1.043	-	-	-	3.456	1.145	0.975	-	-	-	1.133
δ-Amorphene	11.956	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.918	-
Isoeugenol acetate; Eugenol acetate	11.973	$C_{12}H_{14}O_3$	206	29.739	-	-	-	1.833	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calamenene	12.031	$C_{15}H_{22}$	202	-	-	-	-	-	-	-	-	0.608	-	-	-	-	-	-
α-Ionene		$C_{13}H_{18}$	174															

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

Compound	Retention time	Formula	Molecular weight	Relative content (%)														
				Piper betle 1	*P. betle* 2	*P. betloides*	*P. crocatum*	*P. maculaphyllum*	*P. rubroglandulosum* 1	*P. rubroglandulosum* 2	*P. semiimmersum*	*P. submultinerve* 1	*P. submultinerve* 2	*P. submultinerve* 3	*P. submultinerve* 4	*P. tricolor* 1	*P. tricolor* 2	*P. yinkiangense*
(-)-α-Panasinsen	12.037	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.114	-
trans-γ-Bisabolene	12.048	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	1.911	-	-	-	-	-	-	-
Elemicin; Isoelemicine; cis-Asarone	12.112	$C_{12}H_{16}O_3$	208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.477
Nerolidol; Farnesol	12.308-12.417	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	1.368	-	-	-	-	-	5.462	2.105	2.591	1.694	-	2.488	0.651
Hedycaryol; Elemol	12.348	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sesquisabinene hydrate	12.377	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	-	1.797	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacrene B; γ-Elemene	12.533	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	1.803	-	-	-	-	-	-
Spathulenol	12.637	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	-	-	-	0.248	0.409	-	-	-	-	-	-	-	-
Caryophyllene oxide	12.723-12.844	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	-	-	-	0.272	0.540	-	-	1.038	-	0.924	-	-	1.804
β-Spathulenol	12.746-13.386	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	1.756	-	2.487	-	-	-	0.708	-	-	-	-	0.699	-
β-Bisabolene	12.827	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	5.077	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Globulol	12.837-12.879	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	2.286	-	3.717	-	-	-	2.154	-	-	-	-	2.204	-
Viridiflorol	12.971-13.825	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	1.655	-	2.786	-	-	-	0.576	-	1.081	-	-	2.144	-
Ledol		$C_{15}H_{26}O$	222															
(-)-Allospathulenol	13.127	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

Compound	Retention time	Formula	Molecular weight	Relative content (%)														
				Piper betle 1	*P. betle* 2	*P. betloides*	*P. crocatum*	*P. maculaphyllum*	*P. rubroglandulosum* 1	*P. rubroglandulosum* 2	*P. semiimmersum*	*P. submultinerve* 1	*P. submultinerve* 2	*P. submultinerve* 3	*P. submultinerve* 4	*P. tricolor* 1	*P. tricolor* 2	*P. yinkiangense*
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	13.213-13.329	$C_{13}H_{14}O_4$	234	30.163	13.559	-	-	1.036	60.018	60.089	51.935	0.930	-	31.115	-	30.066	-	21.262
Isospathulenol	13.381	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	1.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Cadinol	13.401-13.669	$C_{15}H_{26}O$	222	-	1.657	5.431	-	1.836	-	-	-	5.697	-	2.675	-	6.712	2.105	3.028
Copaene	13.438	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	0.212	-	-	-	-	-	-	-	-
Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	13.473	$C_{15}H_{24}$	204	-	2.149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+)-δ-Cadinene		$C_{15}H_{24}$	204															
5-epi-neointermedeol	13.611-13.744	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	1.997	-	-	-	-	-	-	-	9.176	-	-	-	0.461
(+)-Epi-bicyclo sesquiphellandrene	13.704-13.71	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.696	-	1.633	-	-	-
Benzoic acid, phenylmethyl ester	14.904	$C_{14}H_{12}O_2$	212	-	0.855	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oleamide	22.740-22.970	$C_{18}H_{35}NO$	281	-	-	0.905	1.815	-	1.079	0.801	-	-	-	1.491	-	-	-	0.899
Unknown				8.212	19.425	5.000	1.943	3.829	26.593	25.568	-	4.821	0.482	9.351	2.211	7.171	4.969	3.039
Total				100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

รูปที่ 36 ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนผสม ได้แก่ สบู่ก้อน (ก) และสบู่เหลว (ข) ลดอาการคันและการอักของผิวหนัง และสเปร์ย์ (ค) ระงับกลิ่นเท้า

บทที่ 4
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

พืชสกุลพริกไทยมีรายงานพบในประเทศไทยถึง 43 ชนิด แม้ส่วนใหญ่จะเป็นพืชป่า แต่ได้มีการนำหลายชนิดมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ เช่น เป็นเครื่องเทศ เป็นยาสมุนไพร และใช้ผสมในยาฆ่าแมลง (Chaveerach et al., 2006a, 2008; Scott et al., 2008; Fan et al., 2011) พลู *Piper betle* เป็นชนิดที่นิยมปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ คาวิคอล ซินีออล และยูจีนอล (Chaveerach et al., 2006a; Yusoff et al., 2005; Misra et al., 2009)

4.1 การใช้ประโยชน์พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย

พืชสกุลพริกไทยที่รู้จักกันดีทั่วทุกภูมิภาคและมีการนำมาใช้ประโยชน์ ได้แก่ พลู พริกไทย *P. nigrum* ชะพลู *P. sarmentosum* ดีปลี *P. retrofractum* พริกหาง *P. longum* และพลูป่า *P. rubroglandulosum* โดยมีสรรพคุณทางสมุนไพรหลายประการ เช่น แก้ปวดฟัน แก้ปวดท้อง แก้ลมพิษ ขับลม ขับเสมหะ บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ และบำรุงโลหิต พลูเป็นชนิดที่ปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจมากที่สุด แต่มีปัญหาในการปลูกเช่น โรคใบเน่าและโรคใบจุด ดังนั้นการหาพืชทดแทนหรือชนิดที่สามารถนำมาปลูกเสริมได้จะเป็นการวางแผนการจัดการทรัพยากรที่ยั่งยืน ดังนั้นจึงเริ่มจากประเมินชนิดที่มีกลิ่นเหมือนพลูซึ่งมีแนวโน้มว่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน

4.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA Barcoding)

เนื่องจากมีการนำพืชมาใช้ประโยชน์ทั้งโดยการใช้ชิ้นส่วนพืชหรือนำมาแปรรูปโดยบดเป็นผง ดังนั้นจึงควรมีการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดไว้เพื่อใช้ระบุชนิดพืช

ในประเทศไทยได้มีการสร้างเครื่องดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดพืชดอกหลายกลุ่ม ได้แก่ บริเวณ *trn*H-*psb*A spacer ใช้ได้ผลดีในพืชสกุล *Senna* (Monkheang et al., 2011) *Cissus* และ *Smilax* (Kritpetcharat et al., 2011) บริเวณ *rbc*L gene ใช้ในพืชกาฝาก ได้แก่ สกุล *Scurrula*, *Dendrophthoe*, *Helixanthera*, *Macrosolen* และ *Viscum* (Kwanda et al., 2013) ส่วน *mat*K ใช้ได้ในพืชสกุล *Piper* บางชนิด (Sudmoon et al., 2012) งานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยทั้งสิ้น 36 ชนิด สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดจากบริเวณ *mat*K gene, *psb*A-*trn*H spacer และ *rbc*L gene บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเหล่านี้ไว้ในฐานข้อมูล

GenBank ทั้งสิ้น 190 accessions พบว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ *mat*K gene ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเหมาะสมต่อการนำมาใช้ระบุชนิด คือมีค่าเป็นไปตามหลักการของ Prof. Dr. Paul D.N. Hebert (Hebert et al., 2003) ว่า ค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดจะค่อนข้างสูงแต่ภายในชนิดเดียวกันจะมีความผันแปรต่ำ แต่ในพลูซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดสูงที่สุด ถึง 0.386 สอดคล้องกับความหลากหลายทางสายพันธุ์ที่มีในชนิดนี้ ซึ่งอาจเป็นผลจากการกระทำของมนุษย์คือนำมาปลูกในสภาวะที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงที่สุด ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมจากบริเวณ *mat*K gene นี้ใช้ระบุชนิดได้เกือบทุกชนิด มีเพียง 8 คู่ เท่านั้นที่ให้ค่าเป็น 0 จึงไม่สามารถระบุชนิดได้โดยการใช้ข้อมูลบริเวณนี้ โดยทั้ง 8 คู่นี้สามารถใช้อีกสองบริเวณระบุชนิดได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Newmaster et al. (2007) ที่เสนอให้ใช้สองบริเวณคือ *mat*K gene และ *trn*H-*psb*A spacer ในการระบุชนิด

4.3 องค์ประกอบทางเคมีของพลูและพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลู

จากการประเมินด้วยการดมพบว่าพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลูมี 8 ชนิด ได้แก่ พลูดอยสุเทพ *P. betloides* พลูลงยา *P. crocatum* พลูลงยา *P. maculaphyllum* พลูป่า *P. rubroglandulosum* พลูขน *P. semiimmersum* พลูชมพู *P. submultinerve* พลูสามสี *P. tricolor* และพลูจีน *P. yinkiangense* จึงได้เก็บใบพลูและพืชเหล่านี้รวม 9 ชนิด มาสกัดสารเคมีโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เฮกเซน (hexane) และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารที่สำคัญในพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลู ได้แก่ eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, β-phellandrene, β-cubebene, germacrene A, germacrene D และ sesquiterpenes ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้พบในพลูด้วยแต่ในสัดส่วนที่แตกต่างกันไป

ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชทั้ง 9 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* โดย แบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ที่นำมาทดสอบนี้ เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้มาก ในประเทศเขตร้อน พบว่าชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญ ได้แก่ *P. rubroglandulosum* เพศผู้ *P. yinkiangense*, *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* โดยสารสกัดที่ไม่เจือจางจาก *P. rubroglandulosum* และ *P. yinkiangense* มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัดที่ไม่เจือจางจาก *P. betloides* และสารสกัดที่ทุกระดับการเจือจางจาก *P. maculaphyllum* มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ด้วยข้อมูลเหล่านี้พืชชนิดที่น่าสนใจว่าจะมีศักยภาพในการนำมาใช้ได้เช่นเดียวกับพลู ได้แก่ *P. rubroglandulosum* (♂), *P. yinkiangense*, *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* โดยงานวิจัยนี้พบว่าพืชทั้งสี่ชนิดนี้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าพลู โดยชนิดที่น่าสนใจมากที่สุดคือ *P. maculaphyllum* เนื่องจากแม้

ความเข้มข้นต่ำๆก็มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของหลายโรคในมนุษย์

เมื่อกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 9 ชนิด โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ เพื่อเทียบสัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยเทียบกับน้ำหนักใบสดจากพืชแต่ละชนิด พบว่าพลูให้น้ำมันหอมมากที่สุด คือ 2.73 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ชนิดที่ให้น้ำมันหอมน้อยที่สุดคือพลูลลงยา *P. crocatum* ซึ่งได้เพียง 0.03 มิลลิลิตร/กิโลกรัม องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของพืชเหล่านี้ที่พบสูงกว่า 10% ได้แก่ L-linalool, β-terpineol, α-terpineol, 4-terpineol, eugenol/isoeugenol, eugenol acetate/isoeugenol acetate, β-elemene, caryophyllene, β-selinene, α-selinene, germacrene D, bicyclogermacrene, butylated hydroxytoluene, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene สารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในครัวเรือน เช่น linalool ใช้แต่งกลิ่นน้ำหอม และผสมในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขอนามัยและผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ได้แก่ โลชั่น สบู่ แชมพู สารซักฟอก terpineol มีกลิ่นหอมที่ทำให้รู้สึกผ่อนคลายคล้ายกับกลิ่นไลแลค จึงมักนำมาใช้ผสมในน้ำหอม เครื่องสำอางค์ และสารปรุงรสแต่งกลิ่นอาหาร (Kumar et al., 2010; Sanubol et al., 2014) น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ในปริมาณแตกต่างกันอาจเป็นผลจากสองปัจจัย คือ ประเภทของพืชเป็นพืชป่าหรือพืชปลูก และฤดูกาลฤดูฝนหรือฤดูแล้ง นั่นคือ พืชปลูกที่ปลูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมมีการบำรุงเป็นอย่างดีให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่า และในฤดูฝนได้ปริมาณสูงกว่าฤดูแล้ง

แม้ว่าในพืชป่าทุกชนิดจะให้น้ำมันหอมระเหยในปริมาณต่ำกว่าพืชปลูกอย่างพลู แต่พบว่ามีอัตราส่วนขององค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญสูงกว่า หากพืชป่าเหล่านี้ได้รับการปลูกและบำรุงเป็นอย่างดีเช่นเดียวกับพลู อาจทำให้ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงเทียบเท่ากับพลู ซึ่งเป็นความน่าสนใจที่จะนำมาทดลองปลูกและหาสภาวะที่เหมาะสมหรือปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงขึ้นเพราะพืชป่ามีข้อได้เปรียบคือต้านทานต่อโรค เจริญเติบโตเร็ว แตกกิ่งและใบได้มาก อีกทั้งการมีพืชทางเลือกเป็นปัจจัยสำคัญในการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืน ในเบื้องต้นประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากพืชนี้ได้ทั้งการบริโภคในระดับท้องถิ่นหรือการปลูกเป็นจำนวนมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปแทนการใช้ใบพลูเพียงอย่างเดียวในกรณีที่พลูเกิดโรคหรือขาดแคลนในบางฤดู

เอกสารอ้างอิง

อรุณรัตน์ ฉวีราช. 2552. อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของพืช. โครงการผลิตตำราคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, 172 หน้า.

อรุณรัตน์ ฉวีราช, รุ่งลาวัลย์ สุดมูล, ธวัดชัย ธานี และ ปิยะ โมคมุล. 2552. พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่นการพิมพ์, ขอนแก่น, 165 หน้า.

Amusan, A.A.S. and Okorie, T.G. 2002. The use of *Piper guineense* fruit oil (PFO) as protectant of dried fish against *Dermestes maculatas* (Degeer) infestation. Global Journal of Pure and Applied Sciences 8(2): 197–201.

Anuradha, V., Sreelatha, T., Srinivas, P.V., Tivari, A.K. and Rao, J.M. 2004. Isolation and synthesis of new bioactive molecules from *Piper longum*. Natural Product Research 18(3): 247–251.

Banka, R.A. and Teo, S.P. 2000. *Piper betle*. In: van der Vossen, H.A.M., Wessel, M. (eds.) PROSEA 16 stimulant plants. Backhuys, Leiden, pp. 135-140.

CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America 106(31): 12794–12797.

Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Van Den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgsensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L. and Wilkinson, M. 2007. A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. Taxon 56(2): 295–299.

Chaveerach, A., Kunitake, H., Nuchadomrong, S., Sattayasai, N. and Komatsu, H. 2002. RAPD patterns as a useful tool to differentiate Thai *Piper* from morphologically alike Japanese *Piper*. Science Asia 28(3): 197–201.

Chaveerach, A., Mokkamul, P., Sudmoon, R. and Tanee, T. 2006a. Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand. Ethnobotany Research and Applications 4: 223–231.

Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T. and Mokkamul, P. 2006b. Three new species of Piperaceae from Thailand. Acta Phytotaxonomica Sinica 44(4): 447–453.

Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T. and Mokkamul, P. 2008. The species diversity of the genus *Piper* from Thailand. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 59(2): 105–163.

Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T. and Mokkamul, P. 2010. Notes on *Piper rubroglandulosum* (Piperaceae) in Thailand. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 60(3): 175–177.

Chaveerach, A., Tanomtong, A., Sudmoon, R., Tanee, T. and Mokkamul, P. 2007. A new species and two new varieties of *Piper* (Piperaceae) from Thailand. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 58(1): 33–38.

Dicto, J. and Manjula, S. 2005. Identification of elicitor-induced PR5 gene homologue in *Piper* colubrinum Link by suppression subtractive hybridization. Current Sciences 88(25): 624–627.

Dyer, L.A., Richards, J. and Dodson, C.D. 2004. Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of *Piper* amides. In: Dyer, L.A. and Palmer, A.N. (eds.). *Piper*: A Model Genus for Studies of Evolution, Chemical Ecology, and Trophic Interactions. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 117–139.

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clinical Microbiology and Infection 6: 509–515.

Fan, L.S., Muhamad, R., Omar, D. and Rahmani, M. 2011. Insecticidal properties of *Piper nigrum* fruit extracts and essential oils against *Spodoptera litura*. International Journal of Agriculture and Biology 13: 517–522.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and De Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Series B 270(1512): 313–321.

Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. and Little, D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS ONE 6(5): e19254.

Huang, R.L., Chen, C.F., Feng, H.Y. and Lin, L.C. 2001. Anti–hepatitis B virus of seven compounds isolated from *Piper kadsura* (Choisy) Ohwi. Journal of Chinese Medicine 12(3): 179–190.

Kritpetcharat, O., Kritpetcharat, P., Daduang, J., Daduang, S., Suwanrungruang, K., Khemtonglang, N., Bletter, N., Sudmoon, R. and Chaveerach, A. 2011. Using DNA markers and barcoding to solve the common problem of identifying dried medicinal plants with the examples of *Smilax* and *Cissus* in Thailand. Journal of Medicinal Plants Research 5(15): 3480–3487.

Kumar, N., Mirsa, P., Dube, A., Bhattacharya, S., Dikshit, M. and Ranade, S. 2010. *Piper betle* Linn. a maligned pan-Asiatic plant with an array of pharmacological activities and prospects for drug discovery. Current Sciences 99: 923–932.

Kwanda, N., Noikotr, K., Sudmoon, R., Tanee, T. and Chaveerach, A. 2013. Medicinal parasitic plants on diverse hosts with their usages and barcodes. Journal of Natural Medicines 67(3): 438–445.

Luger, P., Weber, M., Dung, N.X., Luu, V.T., Rang, D.D., Tuong, D.T. and Ngoc, P.H. 2002. The crystal structure of 3-(4′-methoxyphenyl) propanonoyl pyrrole of *Piper lolot* C.DC. from Vietnam. Crystal Research Technology 37(6): 627–633.

Luz, A.I.R., Zoghbi, M.G.B. and Maia, J.G.S. 2003. The essential oils of *Piper reticulatum* L. and *P. crassinervium* H.B.K. Acta Amazonica 33(2): 341–344.

Misra, P., Kumar, A., Khare, P., Gupta, S., Kumar, N. and Dube, A. 2009. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. Journal of Medical Microbiology 58: 1058–1066.

Monkheang, P., Sudmoon, R., Tanee, T., Noikotr, K., Bletter, N. and Chaveerach, A. 2011. Species diversity, usages, molecular markers and barcode of medicinal *Senna* species (Fabaceae, Caesalpinioideae) in Thailand. Journal of Medicinal Plants Research 5(26): 6173–6181.

Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, R.A.D. and Janovec, J. 2007. Testing candidates plant barcode regions in the Myristicaceae. Molecular Ecology Resources 8: 480–490.

Porebski, S., Bailey, L.G. and Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter 15: 8–15.

Rocha, S.F.R. and Ming, L. 1999. *Piper hispidinervium*: a sustainable source of safrole. In: Janick, J. (ed.). Perspective on New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, pp. 479–481.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York.

Samuel, M.R.A., Gurusinghe, P.A., Alles, W.S. and Kronole, S.T.W. 2002. Genetic diversity and crop improvement in pepper (*Piper nigrum*). Acta Horticulturae (ISHS) 188: 117–124.

Sanubol, A., Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T., Noikotr, K. and Chuachan, C. 2014. Betel-like-scented *Piper* plants as diverse sources of industrial and medicinal aromatic chemicals. Chiang Mai Journal of Science 41(5.1): 1171–1181.

Scott, I.M., Arnason, J.T. and Philogne, B.J.R. 2002. The efficacy of *Piper nigrum* (Piperaceae) extracts: botanical alternatives for urban pest insect control. Do688. The 2002 ESA Annual Meeting and Exhibition, Fort Lauderdale, Florida, 14-20 November 2002.

Scott, I.M., Gagnon, N., Lesage, L., Philogene, B.J.R. and Arnason, J.T. 2005. Efficacy of botanical insecticides from *Piper* species (Piperaceae) extracts for control of European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Economic Entomology 98(3): 845–855.

Scott, I.M., Jensen, H., Nicol, R., Lesage, L., Bradbury, R., Sánchez-Vindas, P., Poveda, L., Arnason, J.T. and Philogène, B., Jr. 2004. Efficacy of *Piper* (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests. Journal of Economic Entomology 97(4): 1390–1403.

Scott, I.M., Jensen, H.R., Philogène, B.J.R. and Arnason, J.T. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. Phytochemistry Reviews 7: 65–75.

Silayoi, I., Krengpiem, P. and Disthabanchong, A. 1985. Effectiveness of systemic fungicides for control of *Phytophthora parasitica* NK1 in foot rot of *Piper betle*. Thai Agricultural Research Journal 3: 104–107.

Srivastava, S., Gupta, M.M., Prajapati, V., Tripathi, A.K. and Kumer, S. 2001. Insecticidal activity of myristicin from *Piper mullesua*. Pharmaceutical Biology 39(3): 226–229.

Sudmoon, R., Tanee, T. and Chaveerach, A. 2011. *Piper protrusum* (Piperaceae), a new species from southern Thailand based on morphological and molecular evidence. Journal of Systematics and Evolution 49(5): 468–475.

Sudmoon, R., Tanee, T., Wongpanich, V., Bletter, N. and Chaveerach, A. 2012. Ethnobotany and species specific molecular markers of some medicinal *sakhan* (*Piper*, Piperaceae). Journal of Medicinal Plants Research 6(7): 1168–1175.

Suppakul, P., Sanla-ead, N. and Phoopuritham, P. 2006. Antimicrobial and antioxidant activities of betel oil. Kasetsart Journal (Natural Science) 40: 91–100.

Yusoff, Z., Mahmud, Z., Saleh, S.H. and Mohd, E.Y. 2005. Study on the chemical constituents of *Piper betle* L. in relation to their possible insect attractant property. Malaysian Journal of Science 24: 143–147.

ภาคผนวก
ผลงานจากโครงการวิจัย

Article 1: Published

Sanubol, S., Chaveerach, A.*, Sudmoon, R., Tanee, T., Noikotr, K. and Chuachan, C. 2014. Betel-like-scented *Piper* plants as diverse sources of industrial and medicinal aromatic chemicals. Chiang Mai Journal of Science 41(5.1): 1171–1181. (ISI impact factor 0.516).

Chiang Mai J. Sci. 2014; 41(5.1) : 1171-1181
http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/
Contributed Paper

Betel-like-scented *Piper* Plants as Diverse Sources of Industrial and Medicinal Aromatic Chemicals

Arisa Sanubol [a], Arunrat Chaveerach*[a], Runglawan Sudmoon [a], Tawatchai Tanee [b], Kowit Noikotr [c] and Chattong Chuachan [d]

[a] Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.
[b] Faculty of Environment and Resource Studies, Mahasarakham University, Mahasarakham 44000, Thailand.
[c] Department of Biology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand.
[d] Garden and Development Department, Queen Sirikit Botanic Garden, The Botanical Garden Organization, Chiang Mai 50180, Thailand.
*Author for correspondence; e-mail: raccha@kku.ac.th

Received: 21 May 2013
Accepted: 10 August 2013

ABSTRACT

Piper betle (Piperaceae) or betel leaf, known locally as "*Phlu*" has been used by people in Thailand for chewing for a long time. Additionally, the leaves are used for traditional remedies and folk customs, such as for weddings and housewarming ceremonies. More recently, the aromatic oil industry has used the leaves for oil distillation. Moreover, the oils are used in several household products. Over the past 12 years of our research on *Piper* species, we found that among the more than 43 species recorded, there are some plants other than *P. betle* that possess a betel-like scent, viz. *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum*, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve*, *P. tricolor*, and *P. yinkiangense*. As it was expected that these plants would contain similar useful chemicals, their extracts were screened for the chemical contents by GC-MS. The extracts contain some important chemical substances that are similar to the betel extract, namely, eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, germacrene A and germacrene D, and sesquiterpenes. The results indicate that the eight plant species would have as high a potential as *P. betle* for industrial purposes. Moreover, as the plants are wild species they have a greater vigor, thus growing well and with more branching than betel. The diverse *Piper* species studied and documented are important for sustainable uses and can enable conservation management for posterity.

Keywords: betel plant, betel-like-scented plants, GC-MS, *Piper* species, Thailand

1. INTRODUCTION

The plants in the genus *Piper* are of great interest because they are useful in many functional aspects, for instance, as spices, medicines, and insecticides [1-3]. The betel plant, *P. betle*, is a well-known and important species that contains important chemical

substances, including essential oils and substances, such as chavicol, cineol, and eugenol which can be used for medicinal and insecticidal purposes [4,5]. Indeed, it has been reported that eugenol has anti-oxidant and anti-inflammatory properties [4]. It is also known to be stimulating, anesthetic, and psychoactive [6,7]. Even though the betel plant is of great economic importance, there are inherent problems with its cultivation, with one common cause being that the roots and leaves often rot because of infection by Phytophthora parasitica Dast [8,9]. Banka and Teo [9] have reported that leaf spots caused by bacteria are another problem.

Two *Piper* species from Cameroon, *P. nigrum* and *P. guineenense*, were studied [10] to identify the aromatic target components responsible for the characteristic odor of these valuable spices and food-flavoring products. The main compounds detected were as follows: *P. nigrum* contains germacrene D (11.01%), limonene (10.26%), β-pinene (10.02%), α-phellandrene (8.56%), β-caryophyllene (7.29%), α-pinene (6.40%) and cis-beta-ocimene (3.19%); *P. guineense* (black) contains β-caryophyllene (57.59%), β-elemene (5.10%), bicyclogermacrene (5.05%) and α-humulene (4.86%); and *P. guineense* (white) contains β-caryophyllene (51.75%), cis-β-ocimene (6.61%), limonene (5.88%), β-pinene (4.56%), linalool (3.97%) and α-humulene (3.29%).

Investigations of the genus *Piper* in Thailand [11,12] reveals that of the 43 known *Piper* species, there are numerous species that possess a betel-like scent. All of these species are blossoming, wild species that produce abundant branches and leaves. Furthermore, these species are hardy and resistant to diseases, and some of them have a stronger scent than the betel plants. Therefore, these species are predicted to have an economic potential greater than that of the betel plants.

Betel oil contains several substances, such as chavicol, terpene, and sesquiterpene [13], hydroxychavicol, hydroxychavicol acetate, allylpyrocatechol, chavibetol, piperbetol, methylpiperbetol, piperol A, and piperol B [14], chavibetol, chavibetol acetate and caryophyllene [15], allopyrocatecholdiacetate, safrole and B-phellandrene [16], and eugenol and hydroxychavicol [17]. Both the crude extracts of *P. betle* leaves and the purified compounds have been found to possess important antiseptic (e.g., oral hygiene), anti-diabetic, cardiovascular, anti-inflammatory/ immunemodulatory, antiulcer, hepato protective, and anti-infective properties [14] and are also active against many species of bacteria and fungi [16,18]. The chemical composition of natural products was successfully accessed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis as reported by Phutdhawong et al. [19], Quang et al. [20], and Norkaew et al. [21]. The properties of the major compounds are as follows. Isoeugenol, an isomer of eugenol, is a phenylpropene that is synthesized from eugenol and is a constituent of the essential oils of plants. Chavibetol, another isomer of eugenol, is an aromatic compound with a spicy odor [22]. Caryophyllene is a spicy, clove-like aroma [23]. Phellandrenes are used in fragrances because of their pleasant aromas; the odor of β-phellandrene has been described as peppery-minty and slightly citrusy [24]. Sabinene is a natural bicyclic monoterpene, which is one of the chemical compounds that contributes to the spiciness of black pepper (*P. nigrum*) [25]. Sesquiterpenes, a class of volatile compounds, are typically produced for their antimicrobial and insecticidal properties [26,27].

In Thailand, betel oil has been used in modern medicine as an antiseptic component in gels, balms, and cosmetics for hands, feet, and body, as an anti-inflammatory, and as a

treatment for many diseases. Examples of applications of betel oil are as follows: "Plumix", a product by Information Service Center, Institute of Science and Technology Research, Thailand for inhibition of gastrointestinal pathogens in chickens [28]; "betel oil", by Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Kasetsart University, Thailand, claimed to have an anti-microorganism effect [29]; "Plugenol gel", a product by Thai Herbal Products Co., Ltd, for treatment of microbial infection and inflammatory [30]. The research in this study aims to investigate various betel-like-scented species for a preliminary chemical information analysis using hexane extracts.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Materials

The 43 *Piper* species in Thailand were explored in the areas as described by Chaveerach et al. [11,12] and screened for their betel scent. Species identifications were done following the literature and compared with the specimens kept at Khon Kaen University. Leaf samples from several individuals of the betel-like-scented species were collected for chemical extraction. Voucher specimens were kept at the Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University. No specific permits were required for the described field studies because the locations are not privately owned nor are they protected in any way. Moreover the field studies did not involve endangered or protected species.

2.2 Preparation of Chemical Extracts

The extracts were prepared, and the chemical contents were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The leaf samples were rinsed with water and air-dried to get rid of water. The 25 g of leaf samples were ground into a powder, mixed with a 120 mL hexane solvent (analytical grade), and filtered at room temperature. A 90 mL filtrate was obtained and stored at -20°C until used for the GC-MS analysis.

2.3 GC-MS Analysis and Identification of Components

The GC-MS analysis of the crude extracts was performed using an Agilent Technologies GC 6890 N/5973 inert MS fused with a capillary column (30.0 m × 250 mm × 0.25 mm). Helium gas was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min. The injection and mass-transferred line temperature were set at 280°C. The oven temperature was programmed for 70°C to 120°C at 3°C/min, then held isothermally for 2 min, and finally raised to 270°C at 5°C/min. A 1 μL aliquot of the crude extract was injected in the split mode. The relative percentage of the crude constituents was expressed as the percentage using peak area normalization. Identification of the components of the crude extracts was assigned by comparison of the mass spectra obtained with those of the reference compounds stored in the Wiley 7N.1 library.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 The Betel-Like-Scented Piper Species

There were nine species found to be aromatic betel-like plants, viz. *P. betle* L., *P. betloides* Chaveer. & Tanomtong, *P. crocatum* Ruiz et Pavon, *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon, *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mokkamul, *P. semiimmersum* C.DC., *P. submultinerve* C.DC., *P. tricolor* Y.C.Tseng, and *P. yinkiangense* Y.C.Tseng. The voucher specimen numbers and sites of specimen collection are shown in Table 1. *Piper betle* is found as a cultivated plant in all regions of Thailand. Except for *P. betle*, most of the species are wild, however *P. maculaphyllum*

and *P. crocatum* are often collected from the wild and grown as decorative plants. The images of all of the betel-like-scented *Piper* species are shown in Figure 1.

Table 1. Details of specimen collection.

Species	Voucher specimen number	Site of specimen collection
P. betle L.	A. Chaveerach 16	Cultivated, Muang District, Khon Kaen Province, Northeastern Thailand
P. betloides Chaveer. & Tanomtong	A. Chaveerach 171	Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai Province, Northern Thailand
P. crocatum Ruiz et Pavon	A. Chaveerach 12	Garden and Development Department, Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai Province, Northern Thailand
P. maculaphyllum Chaveer. & Sudmoon	A. Chaveerach 126	Punyaban Waterfall, Lum Nam Kraburi National Park, Ranong Province, Southern Thailand
P. rubroglandulosum Chaveer. & Mokkamul	A. Chaveerach 319	Khao Phra Thaeo Wildlife Conservation Development and Extension Center, Phuket Province, Southern Thailand
P. semiimmersum C.DC.	A. Chaveerach 115	Sri Pungnga National Park, Pungnga Province, Southern Thailand
P. submultinerve C.DC.	A. Chaveerach 223	Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai Province, Northern Thailand
P. tricolor Y.C.Tseng	A. Chaveerach 64	Sri Pungnga National Park, Pungnga Province, Southern Thailand
P. yinkiangense Y.C.Tseng	A. Chaveerach 133	Khao Sok National Park, Surat Thani Province, Southern Thailand

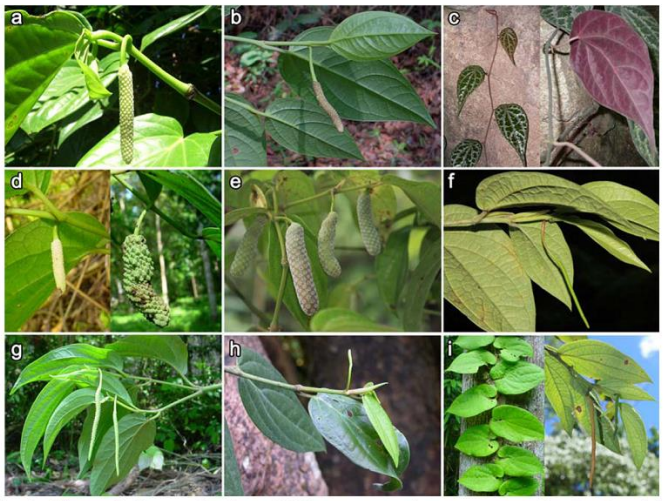


Figure 1. *Piper betle* (a) and the eight betel-like-scented species: *P. betloides* (b), *P. crocatum* (c), *P. maculaphyllum* (d), *P. rubroglandulosum* (e), *P. semiimmersum* (f), *P. submultinerve* (g), *P. tricolor* (h), and *P. yinkiangense* (i).

3.2 Chemical Identification of the Betel-Like-Scented Species Using GC-MS

The preliminary phytochemical screening of the hexane crude extract of nine *Piper* species shows the presence of different aromatic compounds. The total ionic chromatographs (TIC), showing the peak identities of the compounds from the nine individual species are given in Figure 2. The identified chemical compounds and their relative contents in each species are provided in Table 2.

Piper betle contains major chemicals, such as 80.52% eugenol (or isoeugenol, 4-cyclopropyl-2-methoxyphenol or chavibetol), which are identical to the constituents in earlier studies [15-17]. It also contains caryophyllene and some other minor chemicals, as shown in Table 2.

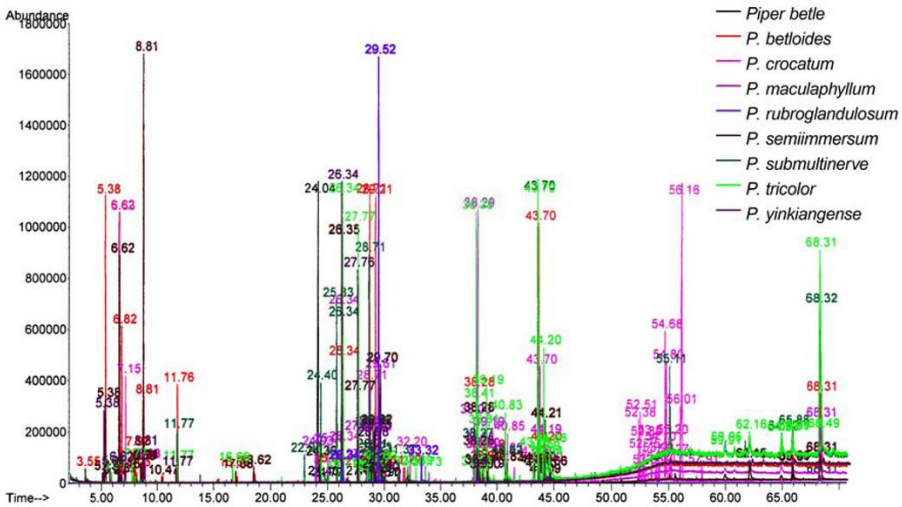


Figure 2. GC-MS chromatograms of hexane crude extracts from the leaves of the nine examined *Piper* species.

Table 2. Preliminary phytochemicals identified in the hexane crude extracts from the leaves of the nine examined *Piper* species.

Compound	Formula	Relative content**								
		P. betle	*P. betloides*	*P. crocatum*	*P. maculaphyllum*	*P. rubroglandulosum*	*P. semiimmersum*	*P. submultinerve*	*P. tricolor*	*P. yinkiangense*
Eugenol or Isoeugenol or Chavibetol or 4-cyclopropyl-2-methoxyphenol	$C_{10}H_{12}O_2$	80.52	-	-	3.24	-	-	-	-	-
Germacrene-D or β-cubebene or α-cubebene or α-ylangene or Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6, 8a-octahydro or Bicyclo [4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-m	$C_{15}H_{24}$	5.21	13.29	4.59	3.78	-	-	12.13	-	-
Germacrene-A	$C_{15}H_{24}$	-	-	-	24.26	-	-	-	-	-
Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	3.83	5.89	2.06	13.44	5.33	15.30	8.56	14.59	39.44
α-amorphene	$C_{15}H_{24}$	3.32	-	-	-	-	-	-	-	-
α-humulene or α-caryophyllene or cis,cis,cis-1,1,4,8-tetramethyl-4, 7, 10-cycloundecatriene	$C_{15}H_{24}$	-	-	1.12	3.61	-	5.21	-	9.43	35.03
Phytol or Phytol isomer	$C_{20}H_{40}O$	1.67	8.93	4.37	-	-	-	24.75	-	-
Bicyclogermacrene or 1H-cycloprop[e]azulene or Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6, 8a-octahydro	$C_{15}H_{24}$	1.24	12.55	-	10.98	-	-	-	-	-
α-pinene or Tricyclene or γ-terpinene or 4-carene or Tricycle[2.2.1.02,6] heptane,1,7,7-trimethyl-3-carene	$C_{10}H_{16}$	-	9.42	-	-	-	3.40	-	-	6.03
Sabinene or β-phellandrene or β-terpinene or β-thujene or β-pinene or Cyclohexane or 4-methylene-1-(1-methylethyl)	$C_{10}H_{16}$	-	18.43	10.17	-	-	32.91	-	-	3.65
1,3-dimethyl-4-azaphenanthrene or 4'methy-2 phenylindole	$C_{15}H_{13}N$	-	9.16	-	-	-	-	-	-	-
L-linalool	$C_{10}H_{18}O$	-	4.38	-	-	-	-	2.38	-	-
1,8-cineole	$C_{10}H_{18}O$	-	-	-	1.39	-	-	-	-	-
4-allyloxy-6-methoxy-N, N-dimethyl-1,3,5-	$C_{9}H_{14}N_4O_2$	-	-	6.54	-	-	-	-	-	-
β-myrcene	$C_{10}H_{16}$	-	-	4.01	-	-	-	-	-	-
β-elemene	$C_{15}H_{24}$	-	-	-	3.01	-	-	-	-	-
β-bisabo	$C_{15}H_{24}$	-	-	-	-	-	5.98	-	-	-
Methyl (25R)-5-oxo-A-nor-3, 5-secospirost	$C_{27}H_{42}O_5$	-	-	3.65	-	-	-	-	-	-
Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	-	-	2.26	-	-	-	-	2.71	-
24(Z)-methyl-25-homocholesterol or 1,5-dimethyl-6-(1,5-dimethylhexyl) -15,16	$C_{29}H_{50}O$	-	-	-	9.66	-	-	19.15	-	-
1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl) -4-methylbenzene	$C_{15}H_{22}$	-	-	-	3.39	-	-	-	-	-
2,6-bis(1,1-dimethylethyl) -4-methylphenol (butylated hydroxytoluene)	$C_{15}H_{24}O$	-	-	-	-	89.83	-	-	-	-
9-octadecenoic acid or Heptadecene-(8)-carbonic acid-(1)	$C_{18}H_{34}O_2$	-	-	-	-	-	5.00	-	-	-
or 9,12,15-octadecatrien-1-ol,(z,z,z)- Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	-	4.13	-	-	-	4.06	-	13.85	-

Table 2. Continued.

Compound	Formula	Relative content**								
		P. betle	*P. betloides*	*P. crocatum*	*P. maculaphyllum*	*P. rubroglandulosum*	*P. semiimmersum*	*P. submultinerve*	*P. tricolor*	*P. yinkiangense*
Vitamin e	$C_{29}H_{50}O_2$	-	-	-	-	-	2.66	-	-	-
α-gurjunene	$C_{15}H_{24}$	-	-	-	-	-	-	9.20	-	-
α-copaene	$C_{15}H_{24}$	-	-	-	-	-	-	5.52	-	3.19
(23s)ethylcholest-5-en-3. β-ol	$C_{29}H_{50}O$	-	-	-	-	-	-	-	18.66	-
9,12,15-octadecatrien-1-ol,(z,z,z)- or 7,10,13-hexadecatrienoic acid	$C_{18}H_{32}O$	-	-	-	-	-	-	-	7.03	-
3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene	$C_{20}H_{40}$	-	-	-	-	-	-	-	-	1.52
4-allyl-1, 2-diacetoxy benzene	$C_{13}H_{14}O_4$	-	-	-	-	4.84	-	-	-	-
unknown*		4.20	13.83	61.24	23.24	-	25.48	18.32	33.73	11.15

*Unknown from each species is not the only one compound and may not be the same compound through all species.

** - means not detected

Isoeugenol and chavibetol, isomers of eugenol, compounds of the phenylpropanoid group are some of the primary constituents in the extract of *P. betle*. *Piper maculaphyllum* also contains isougenol or chavibetol (3.24%), though in smaller amounts.

Caryophyllene is an important constituent that was found in all nine of the studied species, though in different quantities: *P. yinkiangense* (39.44%); *P. semiimmersum* contains trans-caryophyllene (15.30%) and α-caryophyllene (5.21%); *P. tricolor* (14.59%); *P. maculaphyllum* (13.44%); *P. submultinerve* (8.56%); *P. betloides* (5.89%); *P. rubroglandulosum* (5.33%); *P. betle* (3.83%) and *P. crocatum* (2.06%).

Sabinene and phellandrene are monoterpene constituents of essential oils and were found in relatively high percentage in all four of the studied species, viz. *P. semiimmersum*, (32.91%); *P. crocatum* (10.17%); *P. betloides* (18.43%); and *P. yinkiangense* (3.65%). Phellandrene is a constituent of the essential oil of Eucalyptus dives [24]. Phellandrenes are used in fragrances because of their pleasant aromas; the odor of β-phellandrene has been described as peppery-minty and slightly citrusy. Sabinene is a natural bicyclic monoterpene, isolated from the essential oils of a variety of plants, including holm oak (*Quercus ilex*) and Norway spruce (*Picea abies*), which are not grown in Thailand. In addition, sabinene is one of the chemical compounds that contributes to the spiciness of black pepper (*Piper nigrum*) and is a major constituent of carrot seed oil. It also occurs in tea tree oil at a low concentration and is present in the essential oil obtained from nutmeg [25].

Germacrene A and germacrene D, sesquiterpenes, are significant components of *P. maculaphyllum* containing 24.26% and 3.78% respectively. The sesquiterpenes are also present in *P. betloides* (13.29%), *P. submultinerve* (12.13%), *P. betle* (5.21%), and *P. crocatum* (4.59%).

The minor common volatile aromatic compounds are found in *P. betloides* (9.42% α-pinene and 4.38% L-linalool), *P. semiimmersum* (3.40% α-pinene), *P. submultinerve* (2.38% L-linalool), and *P. yinkiangense* (6.03% α-pinene). These compounds are components in both branded and imitation perfumes [31]. *Piper rubroglandulosum* contains significantly

high amounts of butylated hydroxytoluene (89.83%) also known as butylhydroxytoluene (BHT) or 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol. BHT is a lipophilic (fat-soluble) organic compound, a derivative of phenol that is useful against viruses in the herpes family, for its antioxidant properties, as a food additive, and as a prevention for apoptosis in etiolated seedlings. BHT induces large structural changes in the organization of all cellular organelles and the formation of new unusual membrane structures in the cytoplasm [32,33]. This is very interesting, because people are very close to the species. The people in Southern Thailand have been using *P. rubroglandulosum* for chewing (instead of *P. betle*) and for medicinal purposes for long time. This high content compound may be a key active ingredient which should be further examined.

The preliminary study on the chemical constituents of betel-like-scented *Piper* species (screened down to nine species) uses the non-polar solvent hexane for the extraction process, thus isolating the major monoterpenes (sabinene and phellandrene), sesquiterpenes (germacrene A, germacrene D, and caryophyllene), and phenylpropenes (eugenol, isoeugenol, and chavibetol). Even though hexane was used to extract chemical substances for the GC-MS analysis rather than the essential oils, the chemical constituents found tended to be similar, for instance among *P. betle*, *P. nigrum*, and *P. guineense.* A study of *P. nigrum* and *P. guineense* essential oils also provided evidence of the similarity among the chemical constituents [10].

3.3. Uses of Piper Species

Many research studies have been conducted on various *Piper* species, such as *P. nigrum*, *P. guineense* and *P. chaba* to investigate their potential uses. *Piper betle* has been studied for many years, particularly for its compounds and usefulness in treating diseases [10,34,35]. The plants are still of interest among researchers for their pharmacological activities, antimicrobial, and insecticidal properties, however, more information about the other Piper species with a similar aroma could be obtained. The study, therefore, examines whether the eight species identified as aromatic betel-like plants have any important identical chemical substances. The research findings would contribute to the data on aromatic plants and provide the basis for further research investigations.

In addition to eugenol (or isoeugenol, 4-cyclopropyl-2-methoxyphenol or chavibetol) reported in P. betle [15,16,17], caryophyllene is another compound found from this study.

The main compounds, which include β-caryophyllene, germacrene D, limonene, β-pinene, α-phellandrene and α-humulene, are identical to the compounds found in the Piper species from Cameroon [10]. The minor constituents, including δ-carene, β-phellandrene, isoborneol, α-guaiene, sarisan, elemicin, calamenene, caryophyllene alcohol, isoelemicin, T-muurolol, cubenol, and bulnesol, are of great importance for the characteristic pepper odor of these *Piper* species. Additionally, minor common volatile aroma compounds, including α-pinene and L-linalool found in *P. betloides*, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve*, and *P. yinkiangense* are components found in both branded and imitation perfumes [31].

4. Conclusion

The GC-MS analysis of the hexane crude extracts of different *Piper* species shows the presence of a composition of volatile chemicals from the phenylpropene, monoterpene, and sesquiterpene groups. The identification of economically beneficial chemicals existing in many other plant species is important for industry and is also

beneficial in providing a growing population with supplements from natural sources.

Many plant species in the wild are not exploited or used because they are not known or well characterised. The hardiness, good growth, and abundance of branches of the wild species should be studied for uses in native forms, modified forms, and purified chemicals. The diversity of betel-like-scented species and the chemical components could be useful for industries to produce flavors, fragrances, cosmetics, drugs, perfumes, and food preservatives.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful for the financial support provided by the Thailand Research Fund and Khon Kaen University through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0027/2553) to Arisa Sanubol and Arunrat Chaveerach and the Research Career Development Grant (Grant No. RSA5580054). We wish to acknowledge the support of the Khon Kaen University Publication Clinic, Research and Technology Transfer Affairs, Khon Kaen University for their assistance.

REFERENCES

[1] Chaveerach A., Mokkamul P., Sudmoon R. and Tanee T., Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand, *Ethnobotany Research and Applications*, 2006; **4**: 223-231.

[2] Scott I.M., Jensen H.R., Philogéne B.J.R. and Arnason J.T., A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action, *Phytochem. Rev.*, 2008; **7**: 65-75.

[3] Fan L.S., Muhamad R., Omar D. and Rahmani M., Insecticidal properties of *Piper nigrum* fruit extracts and essential oils against *Spodoptera litura*, *Int. J. Agric. Biol.*, 2011; **13**: 517-522.

[4] Yusoff Z., Mahmud Z., Saleh S.H. and Mohd E.Y., Study on the chemical constituents of *Piper betle* L. in relation to their possible insect attractant property, *Malaysian J. Sci.*, 2005; **24**: 143-147.

[5] Misra P., Kumar A., Khare P., Gupta S., Kumar N. and Dube A., Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol, *J. Med. Microbiol.*, 2009; **58**: 1058-1066.

[6] Sensch O., Vierling W., Brandt W. and Reiter M., Calcium-channel blocking effect of constituents of clove oil, *Planta Med.*, 1993; **59(suppl.)**: A687.

[7] Toda S., Ohnishi M., Kimura M. and Toda T., Inhibitory effects of eugenol and related compounds on lipid peroxidation induced by reactive oxygen, *Planta Med.*, 1994; **60**: 282.

[8] Silayoi I., Krengpiem P. and Disthabanchong A., Effectiveness of systemic fungicides for control of *Phytophthora parasitica* NK1 in foot rot of *Piper betle*, *Thai Agric. Res. J.*, 1985; **3**: 104-107.

[9] Banka R.A. and Teo S.P., *Piper betle*; in van der Vossen H.A.M. and Wessel M., eds., *PROSEA 16 Stimulant Plants*, Backhuys, Leiden, 2000; 135-140.

[10] Jirovetz L., Buchbauer G., Ngassoum M.B. and Geissler M., Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction-gas chromatography, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry, *J. Chromatogr. A*, 2002; **976**: 265-275.

[11] Chaveerach A., Sudmoon R., Tanee T. and Mokkamul P., The species diversity of the genus *Piper* from Thailand, *Acta Phytotax. Geobot.*, 2008; **59**: 105-163.

[12] Chaveerach A., Sudmoon R., Tanee T. and Mokkamul P., *The Genus Piper in Thailand*, Khon Kaen Kanpim Printing, Khon Kaen, 2009.

[13] Manigauha A., Ali H. and Maheshwari M.U., Antioxidant activity of ethanolic of *Piper betle* leaves, *J. Pharm. Res.*, 2009; **2**: 491-494.

[14] Kumar N., Mirsa P., Dube A., Bhattacharya S., Dikshit M. and Ranade S., *Piper betle* Linn. a maligned pan-Asiatic plant with an array of pharmacological activities and prospects for drug discovery, *Curr. Sci.*, 2010; **99**: 923-932.

[15] Suppakul K., Sanla-Ead N. and Phoopuritham P., Antimicrobial and antioxidant activities of betel oil, *Kasetsart J.*, 2006; **40**: 91-100.

[16] Arambewela L., Kumaratunga K.G.A. and Dias K., Studies on *Piper betle* of Sri Lanka, *J. Nat. Sci. Foundation Sri Lanka*, 2005; **33**: 133-139.

[17] Amonkar A.J., Nagabhushan M., Souza A.V.D. and Bhide S.V., Hydroxychavicol: A new phenolic antimutagen from betel leaf, *Food Chem. Toxicol.*, 1986; **24**: 1321-1324.

[18] Charoenwattana P., Antifungal efficiency of *Piper betle* L. on *Aspergillus flavus*, *Agric. Sci. J.*, 2007; **38**: 50-53.

[19] Phutdhawong W., Kaewkong, S. and Buddhasukh D., GC-MS analysis of fatty acids in Thai durian aril, *Chiang Mai J. Sci.*, 2005; **32**: 155-158.

[20] Quang D.N., Spiteller P., Porzel A., Schmidt J., Geissler T., Arnold N. and Wessjohann L., Alkaloids from the mushroom *Pseudobaeospora pyrifera*, Pyriferines A-C, *J. Nat. Prod.* 2008; **71**: 1620-1622.

[21] Norkaew O., Pitija K., Pripdeevech P., Sookwong P. and Wongpornchai S., Supercritical fluid extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of terpenoids in fresh kaffir lime leaf oil, *Chiang Mai J. Sci.*, 2013; **40**: 240-247.

[22] Nigam S.S. and Purohit R.M., Chemical examination of the essential oil of the leaves of *Piper betle*, *Reichstoffe Aromen*, 1962; **12**: 185-190.

[23] Ghelardini C., Galeotti N., Di C.M.L., Mazzanti G. and Bartolini A., Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene, *Farmaco*, 2001; **56**: 387-389.

[24] Boland D.J., Brophy J.J. and House A.P.N., *Eucalyptus Leaf Oils, Use, Chemistry, Distillation and Marketing*, Inkata Press, Melbourne, 1991.

[25] Shulgin A.T., Sargent T. and Naranjo C., The chemistry and psychopharmacology of nutmeg and of several related phenylisopropylamines, *Psychopharmacol. Bull.*, 1967; **4**: 13.

[26] Feger W., Brandauer H. and Ziegler H., Germacrenes in *Citrus* peel oils, *J. Essent. Oil Res.*, 2001; **13**: 274-277.

[27] Noge K. and Becerra J.X., Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraceae), *Molecules*, 2009; **14**: 5289-5297.

[28] Information Service Center, Institute of Scientific and Technological Research, Thailand, Available at: http://www.tistr.or.th/callcenter/index.php?option=com_content&task= view&id=97, Accessed 8 June 2013.

[29] Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Kasetsart University, Thailand, Available at: http://www.ku.ac.th/e-magazine/september45/agri/piper.html, Accessed 8 June 2013.

[30] Thai Herbal Products Co., Ltd., Available at: http://thaiherbinfo.com/en/products.php#, Accessed 8 June 2013.

[31] Sudin N.F., *Comparison of GC-MS Profiles of Volatile Organic Compounds in Branded and Imitation Perfumes of Same Name Brand*, Bachelor of Science Project, University Teknologi, MARA, 2009.

[32] Bouftira I., Abdelly C. and Sfar S., Identification of a naturally occurring 2, 6-bis (1, 1-dimethylethyl)-4-methylphenol from purple leaves of the halophyte plant *Mesembryanthemum crystallinum*, *Afr. J. Biotechnol.*, 2007; **6**: 1136-1139.

[33] Rujiralai T. and Cheewasedtham W. An effective extraction method for estimation of total antioxidant and mercaptobenzothiazole residues in baby nipples, *Eur. J. Sci. Res.*, 2011; **64**: 277-284.

[34] Ahuja S.C. and Ahuja U., Betel leaf and betel nut in India: History and uses, *Asian Agrihist*, 2011; **15**: 13-35.

[35] Chowdhury I., Amin R. and Binzaid S., Optimal control on environment for improving the *Piper betle* (Pann) growth, *Life Sci. Leafl.*, 2011; **17**: 605-615.

Article 2: In Press

Sanubol, A., Chaveerach, A.*, Sudmoon, R., Tanee, T., and Liehr, T. Verification of selected *Piper* species (Piperaceae) using morphological characters, molecular data, and chemical constituents. Malayan Nature Journal (SNIP 0.146).

Khon Kaen University Mail - Colour printing.

Khon Kaen University

Arunrat Chaveerach <raccha@kku.ac.th>

Colour printing.

editor@mns.org.my <editor@mns.org.my> Thu, Apr 23, 2015 at 9:09 AM
To: raccha@kku.ac.th

Good morning Arunarat,

Your manuscript titled *Verification of Selected Piper Species (Piperaceae) Using Morphological Characters, Molecular Data, and Chemical Constituents* is in its final stage before sent for printing. In your manuscript, you have added a few pictures of the Pipers for referencing. But they are in colour. According to our guideline, if an author submits a manuscript and wants to print it in colour, the author has to bare the cost. If you want it in colour, you would have to pay for all 300 copies, but if in black and white, it would be free of charge.

Please think about it and get back to me as soon as possible so I can make the necessary arrangements.

Thank you and hope to hear from you soon.

"In every walk with nature one receives far more than he seeks."-John Muir

Best regards,
Jayshini Naidu
Editorial Executive (Publications)
Malaysian Nature Society
JKR 641, Jalan Kelantan, Bukit Persekutuan, 50480 Kuala Lumpur
Tel: 603-22879422 Fax: 603-22878773 Web: www.mns.my
Malaysian Nature Society **MNSMalaysia**

Please print this email only if you need to

Since 1940
Saving today for tomorrow

Title: Verification of selected *Piper* species (Piperaceae) using morphological characters, molecular data, and chemical constituents

Authors: Arisa SANUBOL[1], Arunrat CHAVEERACH[1*], Runglawan SUDMOON[1], Tawatchai TANEE[2] and Thomas LIEHR[3]

Affiliations:

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 – THAILAND

[2]Faculty of Environment and Resource Studies, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150 – THAILAND

[3]Universitätsklinikum Jena, Institute of Human Genetics, 07743 Jena, Thuringia – GERMANY

*Corresponding author: raccha@kku.ac.th

Running head: Verification of *Piper* species based on molecular and chemical data

Verification of selected *Piper* species (Piperaceae) using morphological characters, molecular data, and chemical constituents

Arisa SANUBOL[1], Arunrat CHAVEERACH[1], Runglawan SUDMOON[1], Tawatchai TANEE[2] and Thomas LIEHR[3]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 – THAILAND

[2]Faculty of Environment and Resource Studies, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150 – THAILAND

[3]Universitätsklinikum Jena, Institute of Human Genetics, Jena – GERMANY

*E-mail: raccha@kku.ac.th

Abstract

Piper argyritis Ridl. ex C.DC., *P. betle* L., *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon, *P. pendulispicum* C.DC., and *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mokkamul are very important species for biodiversity, food, and medicine. Accordingly, proper identification should be verified using available data, especially since some controversy exists concerning the distinctiveness of certain species pairs (e.g., *P. argyritis/ P. maculaphyllum*, *P. betle/ P. rubroglandulosum*, and *P. pendulispicum/ Piper* sp.) based solely on morphology. In this study, a dendrogram constructed from 1,015 random amplified polymorphic DNA (RAPD) banding patterns revealed this method to be a powerful and efficient tool to distinguish among *Piper* species. Individuals of *P. betle* and *P. rubroglandulosum* are grouped in each species clade, with genetic similarity (S) levels of 0.84-0.91 and 0.87, respectively, and all studied species are recognized as separate species, with S values of 0.57 to 0.82. The S levels of males and females of *P.*

betle and *P. rubroglandulosum* are 0.84-0.91, within the level considered as identical species. Moreover, an analysis of chemical constituents provided additional species distinctions, as *P. rubroglandulosum* contains 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol, trans-caryophyllene, and 4-allyl-1,2-diacetoxy benzene, while *P. betle* contains eugenol, isoeugenol, and chavibetol.

Key words: chemical constituents, genetic similarity, *Piper*, RAPD

1. Introduction

The genus *Piper* in Thailand has been studied with regard to species diversity, usage, new species, and molecular markers (Chaveerach et al., 2002, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008a, 2010; Suwanphakdee & Chantaranothai, 2008, 2011; Sudmoon et al., 2011, 2012; Suwanphakdee & Simpson, 2012). Because pipers are of great interest for use as spices, medicines, and insecticides (Chaveerach et al., 2006; Scott et al., 2008; Fan et al., 2011), correct species identification is important. This is commonly based on morphological characteristics alone, but for some pipers, such as dioecious species, molecular data should be considered because morphology among and within species can be rather similar (Chaveerach et al., 2008a). Taxonomists who specifically concentrate on the specimen type might encounter identification biases in species overlap and might not consider such data as molecular evidence. For example, based on morphological characteristics, *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon has been reduced to synonymy under *P. argyritis* Ridl. ex C.DC., and *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mokkamul has been synonymized under *P. betle* L. (Suwanphakdee & Chantaranothai, 2011). Therefore, to overcome potential identification problems associated with a uniform, worldwide species type and to enable the use of these species in domestic and industrial applications, other characteristics, such as chemical composition and molecular data, must be used. DNA fingerprinting, which is based on the polymerase chain reaction (PCR), is an efficient and reliable technology used to classify plant groups, including apples (Koller et al., 1993), chestnuts (Galderisi et al., 1998), *Curcuma* species (Chaveerach et al., 2008b), and *P. protrusum* Chaveer. & Tanee (Sudmoon et al., 2011).

Several substances have been found in *P. betle*, depended on the studies, namely eugenol and hydroxychavicol (Amonkar et al., 1986), allopyrocatecholdiacetate, safrole,

and B-phellandrene (Arambewela et al., 2005), chavibetol, chavibetol acetate, and caryophyllene (Suppakul et al., 2006), chavicol, terpene, and sesquiterpene (Manigauha et al., 2009), and hydroxychavicol, hydroxychavicol acetate, allylpyrocatechol, chavibetol, piperbetol, methylpiperbetol, piperol A, and piperol B (Kumar et al., 2010). These compounds possess important anti-septic, anti-diabetic, cardiovascular protective, anti-inflammatory, anti-immunomodulatory, anti-ulcer, hepato-protective, and anti-infective properties (Kumar et al., 2010). The chemical composition of natural products has been successfully elucidated by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis, as reported by Andersen & Taglialatela-Scafati (2005), Quang et al. (2008), Schierling et al. (2011), and Demiray et al. (2013).

The aim of this study was to verify the identification of pairs of presumably different species, *P. argyritis* (De Candolle, 1912) and *P. maculaphyllum* (Chaveerach et al., 2008a), and *P. betle* and *P. rubroglandulosum* (Chaveerach et al., 2008a), using a combination of morphological characteristics, genome analyses with random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker, and their chemical constituents. The RAPD marker has been proved to be a powerful tool for taxon identification (Chalageri & Babu, 2012; Muthiah et al., 2013). The species pair female *P. pendulispicum* and *Piper* sp., firstly identified as male *P. pendulispicum* by Chaveerach et al. (2008a), was also compared.

2. Materials and methods

2.1. Plant collection

Plants were sampled at the different sites and provinces shown in Table 1. Figure 1 shows a map of Thailand and highlights the different provinces where specimens were collected. *Piper betle* and *P. rubroglandulosum* were transferred from southern

Thailand and planted in Khon Kaen province under same environmental conditions for a period of two years before collecting of leaves for chemical extraction to eliminate the climate factors that are related to the production of aromatic compounds.

2.2. Morphological comparisons

The morphological characteristics of each pair of species, *P. betle* and *P. rubroglandulosum* published by Chaveerach et al. (2008a), and *P. argyritis* published by De Candolle (1912) and *P. maculaphyllum* published by Chaveerach et al. (2008a), were compared.

2.3. Molecular analyses

The molecular characteristics were assessed following DNA extraction, DNA fingerprinting with RAPD, and dendrogram construction.

2.3.1. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from all collected samples using the Plant Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience). The extracted DNA was analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The quality and quantity of DNA were determined using a gel documentation instrument. The DNA samples were diluted to a final concentration of 20 ng/μL in Tris-EDTA buffer (TE; consists of 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), and these dilutions were used as the DNA template in PCR reactions.

2.3.2. DNA fingerprinting using RAPD marker and dendrogram construction

Amplifications were performed for all species in 25-μL reactions consisting of GoTaq Green Master Mix (Promega), 0.5 μM primer, and 5 ng DNA template. Thirty-six RAPD primers were screened, and the 22 primers successfully amplified were as follows (5′ to 3′): GGTGGTCAAG, TGCCGAGCTG, AATCGGGCTG,

GGGTAACGCC, CAATCGCCGT, GTTGCGATCC, CAAACGTCGG, CACAGGCGGA, TGAGCGGACA, GTACGCCCGA, CTCCTGCCAA, TGGGCGTCAA, CAGGCCCTTC, GTTTCGCTCC, GGACTGGAGT, GGTGACGCAG, GTCCACACGG, CTGCTGGGAC, GTAGACCCGT, TCCGCTCTGG, GGAGGGTGTT, and AGGGAACGAG. Each reaction mixture was incubated at 94 °C for 3 min, and the amplification was performed with the following thermal cycles using a Swift Maxi Thermal Cycler (Esco Micro Pte., Ltd): 35 cycles of denaturation for 1 min at 94 °C, 2 min annealing at 40 °C, 2 min extension at 72 °C, and a 7-min final extension at 72 °C. The amplification products were detected by 1.2% agarose gel electrophoresis in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) and visualized using ethidium bromide staining. The RAPD bands resulting from successfully amplified primers and discerned by agarose gel electrophoresis were documented as diallelic characters (present = 1, absent = 0). These bands were used to construct a dendrogram with the NTSYS-pc 2.1 program (Rohlf, 1998).

2.4. Comparison of the chemical constituents by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Samples of *P. betle* ♂, *P. betle* ♀, *P. rubroglandulosum* ♂, and *P. rubroglandulosum* ♀ were prepared for chemical extraction, and the chemical constituents were analyzed by GC-MS.

2.4.1. Preparation of chemical extracts

The air-dried leaves (25 g) were ground, added to 120 mL hexane solvent (analytical grade), and filtered at room temperature. Ninety mL of filtrate was obtained and stored at -20 °C until the GC-MS analysis.

2.4.2. GC-MS analysis

The GC-MS analysis of the crude extracts was performed using an Agilent Technologies GC 6890 N/ 5973 inert Mass Selective Detector fused with a capillary column (30.0 m × 250 µm × 0.25 µm). Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 ml/min. The injection and mass-transfer line temperatures were set to 280 °C. The oven temperature was programmed from 70 to 120 °C at 3 °C/min, held isothermally for 2 min, and then raised to 270 °C at 5 °C/min. A 1-µL aliquot of crude extract was injected in the split mode. The relative percentage of crude constituents was expressed as a percentage by peak area normalization. The identity of the components of the crude extract was assigned by a comparison of their GC-MS spectra to the Wiley 7N.1 library.

3. Results

The morphological characteristics of *P. argyritis* and *P. maculaphyllum*, including plant sexuality (monoecious vs. dioecious), leaf shape and type, flowering spike, and fruiting spike, are shown in Table 2, confirming that these plants are, indeed, different species. The significant morphological characteristics of *P. maculaphyllum* that differed from those of *P. argyritis* are shown in Figure 2 (A-C). The main differences involved leaf shape, leaf dappling, and spikes of both male and female flowers in *P. maculaphyllum*, a monoecious plant, and the male plant of *P. argyritis* (a dioecious plant). In addition to different distributions, morphological data revealed different characteristics for *P. rubroglandulosum* and *P. betle*, including the node and internode, leaf apex, arrangement of flowers along the rachis, and bearing fruiting spike, as shown in Table 3

and Figure 2 (D-I). Morphological characters of *P. pendulispicum* and *Piper* sp. are shown in Figure 2 (J-L).

A total of 1,015 RAPD bands, comprising 383 characters (Figure 3), was produced from the 22 successful primers. The resulting dendrogram (Figure 4) separated the outgroup *Peperomia pellucida* and appropriately grouped each studied species in distinct lineages.

The genetic similarity (S) levels of the six different species are shown in Table 4, ranging from 0.57 between *Piper* sp. and *P. betle* ♀ 3 to 0.82 between *P. argyritis* and *P. pendulispicum* ♀. Individuals of the same species showed S levels ranging from 0.84 to 0.97 for *P. betle* and 0.87 for *P. rubroglandulosum*. The S levels of the males and females were 0.84 for *P. betle* and 0.87 for *P. rubroglandulosum*, indicating an identical species, whereas those of *P. betle* and *P. rubroglandulosum*, 0.64-0.75, indicated different species. An S value for *P. argyritis* and *P. maculaphyllum* of 0.67 confirmed their different species designation. An S value for *Piper* sp. and *P. pendulispicum* of 0.81 is in the range of different species.

The preliminary phytochemical screening of the crude hexane extract of male and female plants of *P. betle* and *P. rubroglandulosum* demonstrated the presence of different chemical compounds. The chemical compounds, their retention times, and relative contents for each species are provided in Table 5. The total ion chromatographs (TICs), showing the peak identities of the compounds identified, are provided in Figure 5. The major chemicals of both male and female *P. betle* were eugenol, isoeugenol, and chavibetol, whereas 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol, trans-caryophyllene, and 4-allyl-1,2-diacetoxy benzene were abundant in both male and female *P. rubroglandulosum*. The other compounds from *P. betle* are unknown.

4. Discussion

Piper argyritis and *P. maculaphyllum* are unquestionably distinct species, with different important morphological characteristics, as shown in Table 2. These differences were, in particular, with regard to the male flowers of dioecious *P. argyritis*; *P. maculaphyllum* is monoecious. In summary, the morphological data of *P. argyritis* published by De Candolle in 1912 support the differences between *P. maculaphyllum* and *P. argyritis*, which were identified as distinct species in the present study.

It is clear that only the important morphological characteristics (Table 3) of the pair of species compared, *P. betle* and *P rubroglandulosum*, can be used to distinguish these two species. We assume that *P. betle* and *P. rubroglandulosum* were once the same species, as indicated by the similar female flowers and other characters, but that geographical barriers led to morphological changes for long period, particularly with regard to fruiting spikes. *Piper rubroglandulosum* is specifically distributed in southern Thailand, whereas *P. betle* is distributed throughout all Thailand regions and shows no fruiting spikes, even in the southern Thailand in the same growing area as *P. rubroglandulosum*.

Therefore, we propose that morphological characterization should be the first tool used for plant identification, because of it is the easiest aspect for distinguishing species. In some cases, incomplete investigation or incomplete plant characteristics might influence the interpretation of the various morphological traits in plants, as demonstrated by Suwanphakdee & Chantaranothai (2011), who mistakenly concluded that *P. maculaphyllum* and *P. argyritis*, and *P. betle* and *P. rubroglandulosum*, were identical species.

Thus, identification of morphologically similar pipers should be corroborated using additional characterization tools because certain species pairs have several variable features and are widely distributed with overlapping geographical locations, often resulting in species confusion. To overcome these problems and accurately identify plants for domestic and industrial applications, we suggest that characterization of the genus *Piper* should be investigated based on genetic information. The present research used molecular data obtained by RAPD fingerprinting, which indicated different species with S values of 0.57-0.82 and identical species with S values of 0.84-0.97.

The S values of 0.67 between *P. argyritis* and *P. maculaphyllum* and 0.64-0.75 between *P. betle* and *P. rubroglandulosum* indicate different species and support the morphological data used to identify distinct species. Further support for this designation arises from the dendrogram (Figure 4), which clearly indicates that each taxon formed a monophyletic group. In addition, based on the dendrogram, *P. argyritis* appears to be more similar genetically to *P. pendulispicum* than *P. maculaphyllum* this emphasizes that they are distinct taxa.

The S value of 0.81 between *Piper* sp. and *P. pendulispicum* indicated that they are different species, as also suggested by many morphological characters. Formerly *Piper* sp. was identified by Chaveerach et al. (2008a) as *P. pendulispicum* ♂ based on several features, particularly leaf shape; after revisiting the distribution areas years later, some differences, such as leaf color, usage, distribution area, and sex, confirmed the conclusion of the present study. *Piper* sp., locally called 'sakhan daeng', has leaves that are darker green, a male spike, and red wood. The root and stem of *Piper* sp. are soaked in bottles of Thai white whisky until the color of the whisky becomes red, and the local men often drink a small glass of this whisky a day to improve blood circulation and

virility. The distribution areas of *Piper* sp. include high elevations on mountains and in evergreen forests in northeastern and northern Thailand. *Piper pendulispicum* ♀ presents female spikes becoming fruiting spikes, even when there are no male plants nearby, and cream-colored wood. Its soft stem is often used in a soup called 'kaeng khae' both in northern and northeastern Thailand. It is popularly cultivated by local people in home gardens in northern Thailand, whereas, in Loei province of northeastern Thailand, it always grows in forests and is not cultivated. Although chemicals were not extracted from these two species, based on morphological and genetic differences it is likely that the chemical composition is also different. We propose that *Piper* sp. is not *P. pendulispicum* ♂, and upon further analysis it may be determined that this is a new *Piper* species.

Although they were grown in the same environment, different chemicals were found between *P. betle* and *P. rubroglandulosum* whereas similar compounds were found between the males and females of each species. The major chemicals of both male and female *P. betle* were eugenol/isoeugenol/chavibetol, whereas 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol, trans-caryophyllene, and 4-allyl-1,2-diacetoxy benzene were found in male and female *P. rubroglandulosum*. The major chemicals contained in *P. betle* are identical to the constituents reported in several previous studies (Amonkar et al., 1986; Arambewela et al., 2005; Suppakul et al., 2006). *Piper betle* also contains caryophyllene and some other minor chemicals.

Currently, all the data indicate that *P. rubroglandulosum* and *P. betle*, and *P. argyritis* and *P. maculaphyllum*, represent distinct species. This finding is in contrast to the conclusions of Suwanphakdee & Chantaranothai (2011) that *P. maculaphyllum* is a synonym of *P. argyritis* and *P. rubroglandulosum* is a synonym of *P. betle*.

Additionally, the data for *P. pendulispicum* ♀ and *Piper* sp., including morphological characters, usages, and RAPD banding, suggest that these are distinct species, in contrast to Chaveerach et al. (2008a) who first identified *Piper* sp. as *P. pendulispicum* ♂. The different sex *Piper* species plants should be carefully observed before determining the same or different species.

The present study used a small number of individuals for the genetic similarity analysis. However, we employed several methods, including morphological characteristics, chemicals, usages, and molecular data, and the results are all congruent. The molecular study, a subset of a genomic study, used 1-2 individual species; indeed, such studies are usually much smaller than morphological studies, often as small as a single individual (Hillis, 1987). Analyses using a large sample size are often limited by the availability of specimens, the expense of the analysis, and the time-consuming nature.

Many species of the genus *Piper* are dioecious (e.g., *P. argyritis*, *P. caninum*, *P. colubrinum*, *P. montium*, *P. pendulispicum*, *P. semiimmersum*, and *P. tricolor* (Chaveerach et al., 2008a)), which complicates identification based on morphological characteristics. Using molecular and chemical techniques similar to those of the present study, we hope to verify the identification of all dioecious *Piper* species in Thailand.

Acknowledgements

The authors are thankful for the financial support provided by the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0027/2553) and Khon Kaen University to Arisa Sanubol and Arunrat Chaveerach. Part of the

research is also supported by the Research Career Development Grant (Grant No. RSA5580054).

References

Amonkar AJ, Nagabhushan M, Souza AVD & Bhide SV (1986). Hydroxychavicol: a new phenolic antimutagen from betel leaf. *Food and Chemical Toxicology* 24: 1321–1324.

Andersen RJ & Taglialatela-Scafati O (2005). Avrainvilloside, a 6-deoxy-6-aminoglucoglycerolipid from the green alga *Avrainvillea nigricans*. *Journal of Natural Products* 68: 1428–1430.

Arambewela L, Kumaratunga KGA & Dias K (2005). Studies on *Piper betle* of Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 33: 133–139.

Chalageri G & Babu UV (2012). In vitro plant regeneration via petiole callus of *Viola patrinii* and genetic fidelity assessment using RAPD markers. *Turkish Journal of Botany* 36: 358–368.

Chaveerach A, Mokkamul P, Sudmoon R & Tanee T (2006a). Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand. *Ethnobotany Research and Applications* 4: 223–231.

Chaveerach A, Sudmoon R, Tanee T & Mokkamul P (2006b). Three new species of Piperaceae from Thailand. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 44: 447–453.

Chaveerach A, Sudmoon R, Tanee T & Mokkamul P (2007a). Two new species of *Piper* (Piperaceae) from Malay Peninsula. *Taiwania* 52: 210–215.

Chaveerach A, Sudmoon R, Tanee T & Mokkamul P (2008a). The species diversity of the genus *Piper* from Thailand. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 59: 105–163.

Chaveerach A, Sudmoon R, Tanee T & Mokkamul P (2010). Notes on *Piper rubroglandulosum* (Piperaceae) in Thailand. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 60: 175–177.

Chaveerach A, Sudmoon R, Tanee T, Mokkamul P, Sattayasai N & Sattayasai J (2008b). Two new species of *Curcuma* (Zingiberaceae) used as cobra-bite antidotes. *Journal of Systematics and Evolution* 46: 80–88.

Chaveerach A, Tanomtong A, Sudmoon R, Tanee T & Mokkamul P (2007b). A new species and two new varieties of *Piper* (Piperaceae) from Thailand. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 58: 33–38.

Chaveerach R, Kunitake H, Nuchadomrong S, Sattayasai N & Komatsu H (2002). RAPD patterns as a useful tool to differentiate Thai *Piper* from morphologically alike Japanese *Piper*. *Science Asia* 28: 221–225.

De Candolle C (1912). *Records of the Botanical Survey of India volume 6 – no. 1 Piperaceae Novae E Peninsula Malayana*. Calcutta, Superintendent Government Printing, India.

Demiray H, Eşiz Dereboylu A, Yazici ZI & Karabey F (2013). Identification of benzoin obtained from calli of *Styrax officinalis* by HPLC. *Turkish Journal of Botany* 37: 956–963.

Fan LS, Muhamad R, Omar D & Rahmani M (2011). Insecticidal properties of *Piper nigrum* fruit extracts and essential oils against *Spodoptera litura*. *International Journal of Agriculture & Biology* 13: 517–522.

Galderisi U, Cipollaro M, Di Bernado G, De Masi L, Galano G & Casin A (1998). Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73: 259–263.

Hillis DM (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 23–42.

Koller B, Lehmann A, McDermott JM & Gesseler C (1993). Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 901–904.

Kumar N, Mirsa P, Dube A, Bhattacharya S, Dikshit M & Ranade S (2010). *Piper betle* Linn. a maligned pan–Asiatic plant with an array of pharmacological activities and prospects for drug discovery. *Current Science* 99: 923–932.

Manigauha A, Ali H & Maheshwari MU (2009). Antioxidant activity of ethanolic extract of *Piper betle* leaves. *Journal of Pharmacy Research* 2: 491–494.

Muthiah JVL, Shunmugiah KP & Manikandan R (2013). Genetic fidelity assessment of encapsulated in vitro tissues of *Bacopa monnieri* after 6 months of storage by using ISSR and RAPD markers. *Turkish Journal of Botany* 37: 1008–1017.

Quang DN, Spiteller P, Porzel A, Schmidt J, Geissler T, Arnold N & Wessjohann L (2008). Alkaloids from the mushroom *Pseudobaeospora pyrifera*, pyriferines A-C. *Journal of Natural Products* 71: 1620–1622.

Rohlf FJ (1998). *NTSYS_pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1*. Applied Biostatistics Inc., New York, 38 pp.

Schierling A, Schott M, Dettner K & Seifert K (2011). Biosynthesis of the defensive alkaloid (Z)-3-(2-methyl-1-butenyl) pyridine in *Stenus similis* beetles. *Journal of Natural Products* 74: 2231–2234.

Scott IM, Jensen HR, Philogène BJR & Arnason JT (2008). A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7: 65–75.

Sudmoon R, Tanee T & Chaveerach A (2011). *Piper protrusum* (Piperaceae), a new species from southern Thailand based on morphological and molecular evidence. *Journal of Systematics and Evolution* 49: 468–475.

Sudmoon R, Tanee T, Wongpanich V, Bletter N & Chaveerach A (2012). Ethnobotany and species specific molecular markers of some medicinal *sakhan* (*Piper*, Piperaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* 6: 1168–1175.

Suppakul K, Sanla-Ead N & Phoopuritham P (2006). Antimicrobial and antioxidant activities of betel oil. *Kasetsart Journal* 40: 91–100.

Suwanphakdee C & Chantaranothai P (2008). Short note: a further note on the genus *Piper* L. (Piperaceae) from Thailand. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University* 8: 205–209.

Suwanphakdee C & Chantaranothai P (2011). A new species and three taxonomic changes in *Piper* (Piperaceae) from Thailand. *Blumea* 56: 235–239.

Suwanphakdee C & Simpson D (2012). *Piper chantaranothaii* (Piperaceae), a new species from Thailand. *Kew Bulletin* 67: 707–711.

Table 1. *Piper* species collected from various provinces and regions of Thailand. All voucher specimens were kept at Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University.

Plant sample	Voucher number	Province of specimen collection	Region of Thailand
P. argyritis	AC11	Chiang Mai	Northern Thailand
*P. argyritis**	-	-	-
P. betle ♂	AC341	Si Sa Ket	Northeastern Thailand
P. betle 1 ♀	AC16.1	Khon Kaen	Northeastern Thailand
P. betle 2 ♀	AC16.2	Khon Kaen	Northeastern Thailand
P. betle 3 ♀	AC16.3	Sa Kaeo	Central Thailand
P. betle 4 ♀	AC16.4	Loei	Northeastern Thailand
P. maculaphyllum	AC127	Ranong	Southern Thailand
P. pendulispicum ♀	AC82	Chiang Mai	Northern Thailand
P. rubroglandulosum ♂	AC316	Phuket	Southern Thailand
P. rubroglandulosum ♀	AC340	Phuket	Southern Thailand
Piper sp.	AC868	Chiang Mai	Northern Thailand

*Latinized description published by De Candolle (1912)

Table 2. Comparison of principal morphological characteristics of *Piper argyritis*, firstly described by De Candolle (1912), and *P. maculaphyllum*, firstly described by Chaveerach et al. (2008a).

Character	***P. argyritis***	***P. maculaphyllum***
Plant nature	dioecious	monoecious
Stem	branchlet glabrous	with white short hairs
Leaves	**One type**: oblong-ovate, base with slight equilateral rounded, apex sharply acuminate, 18 cm. long and 6 cm. wide.	**Two types**: Leaves on epiphytic branches - leaf blade thick, leathery, adaxially light green to dark pink dapple, abaxially green, ovate to broadly lanceolate, 7–15 cm wide, 20–22 cm long; apex acuminate; base cordate. Leaves on free branches - leaf blade thick, leathery, with scattered pellucid and brownish-red glands, shape and size same as on epiphytic branches; apex acuminate; base sub-rounded or subcordate with rounded and unequal lobes, basal lobes sometimes overlapping, both sides glabrous.
Spike	**Male**: 8 cm long, 3 cm thick, rachis hirsute; bracts glabrous, rhachis adnate and free margin, up to 1-5 mm. long; stamens 2, anthers reniform, 4-valvate, filament equilateral.	**Male:** pendulous, approx. 2 cm long, 0.2 cm in diameter; peduncle approx. 1 cm long; bract elliptic, peltate, stalk short and hairy, margin ciliate; stamens 2, with flat and unequal filament long. **Female:** similar to male spike, 2–8 cm long; stigmas 4. **Fruiting**: 2–10 cm long, 0.4–1 cm in diameter; peduncle 1.2–2.2 cm long; drupe hairy.

Table 3. Comparison of principal morphological characteristics of *P. betle* and *P. rubroglandulosum*, firstly described by Chaveerach et al. (2008a).

Character	***P. betle*** ♂	***P. betle*** ♀	***P. rubroglandulosum*** ♂	***P. rubroglandulosum*** ♀
Distribution area in Thailand	All Thailand regions	All Thailand regions	Southern Thailand	Southern Thailand
Stem	Stout with pinkish-stripe, straight node-internode branching on free branch, length of node on free branch 3.4-9.2 cm long.	Stout with pinkish-stripe, straight node-internode branching on free branch, length of node on free branch 2.5-10.5 cm long.	Slender to stout, stiff, often pinkish-green stripes, zigzag node-internode branching on free branch, length of node on free branch 2-7.7 cm long.	Slender to stout, stiff, often pinkish-green stripes, zigzag node-internode branching on free branch, length of node on free branch 1.5-2.8 cm long.
Leaves	petiole 1.7-3.4 cm long shape broadly ovate, 7.3-10.3 cm wide, 13-16 cm long, lacking reddish glands; base oblique cordate, apex acuminate	petiole 1.5-3.5 cm long shape broadly ovate, 7.7-11.3 cm wide, 12.7-14.3 cm long, lacking reddish glands; base cordate to oblique cordate; apex acuminate	petiole 0.7-1 cm long; shape ovate or elliptic, 4-5 cm wide, 7.5-11 cm long, densely reddish glandular base shallowly cordate, often oblique apex acute or cuspidate	petiole 0.5-1 cm long; shape ovate or elliptic, 4-5 cm wide, 7.5-11 cm long, densely reddish glandular base shallowly cordate, often oblique apex acute or cuspidate

	veins 7-8, two pairs basal, apical pair arising 2.4-3.3 cm above base.	veins 9, three pairs basal, apical pair arising 1.2-2.2 cm above base.	veins 7, two pairs basal, apical pair arising 0.3-0.9 cm above base.	veins 7, two pairs basal, apical pair arising 0.2-0.5 cm above base.
Spike	Cylindric, slender, pendulous, 0.2 cm wide, 6-6.5 cm long	Cylindric, slender, pendulous, 0.4-0.5 cm wide 3.1-3.7 cm long	Cylindric, slender, pendulous, 0.2 cm wide, 5.5-10 cm long	Cylindric, stout, pendulous, 0.3-0.5 cm wide 1.7-3.2 cm long
	Peduncle 2-3 cm long, glabrous	Peduncle 2-3 cm long, glabrous	Peduncle 1-2 cm long, rachis hairy	Peduncle 1-1.2 cm long, glabrous
	stamen 2	-	stamen 2	-
	stigma -	stigma 4-6, pubescent, female flowers spirally arranged on rachis	-	stigma 3-5, pubescent, female flowers not spirally arranged on rachis
	bract orbicular, peltate	bract orbicular, peltate	bract subrounded, margin free, stalk short and pubescent	bract subrounded, margin free, stalk short and pubescent
Fruiting spike	-	not fruiting, flower wilted and dried	-	pendulous, 3-7 cm long, drupe embedded in rachis, pubescent

1 Table 4. Similarity coefficients of six *Piper* species based on RAPD fingerprint data

2 using 22 primers and the NTSYS-pc 2.1 program.

	P. betle ♂	*P. betle*1♀	*P. betle* 2 ♀	*P. betle* 3 ♀	*P. betle* 4 ♀	*P. rubroglandulosum* ♂	*P. rubroglandulosum* ♀	*Piper* sp.	*P. pendulispicum* ♀	*P. argyritis*	*P. maculaphyllum*	*Peperomia pellucida*
P. betle ♂	1.00											
*P. betle*1♀	0.91	1.00										
P. betle 2 ♀	0.88	0.92	1.00									
P. betle 3 ♀	0.88	0.92	0.97	1.00								
P. betle 4 ♀	0.84	0.87	0.89	0.91	1.00							
P. rubroglandulosum ♂	0.70	0.69	0.69	0.69	0.75	1.00						
P. rubroglandulosum ♀	0.68	0.67	0.65	0.64	0.72	0.87	1.00					
Piper sp.	0.60	0.58	0.58	0.57	0.60	0.62	0.63	1.00				
P. pendulispicum ♀	0.61	0.61	0.60	0.58	0.62	0.64	0.66	0.81	1.00			
P. argyritis	0.65	0.64	0.64	0.62	0.64	0.66	0.67	0.78	0.82	1.00		
P. maculaphyllum	0.66	0.64	0.65	0.64	0.65	0.65	0.67	0.63	0.64	0.67	1.00	
Peperomia pellucida	0.61	0.61	0.59	0.58	0.61	0.58	0.62	0.56	0.58	0.64	0.61	1.00

3

Table 5. Preliminary phytochemicals identified in crude hexane extracts of the leaves of *Piper betle* and *P. rubroglandulosum*.

Plant	**RT (min)**	**Compound**	**Formula**	**Mw**	**Relative content (%)**
P. betle ♂	24.030	Eugenol or chavibetol	$C_{10}H_{12}O_2$	164	39.273
	68.308	(23s)-ethylcholest-5-en-3.β.-ol	$C_{29}H_{50}O$	414	8.042
	31.780	1-hydroxy-1,7-dimethyl-4-Isopropyl-2,7-cyclodecadiene	$C_{15}H_{26}O$	222	7.443
	43.702	Phytol isomer	$C_{20}H_{40}O$	296	7.229
	6.627	Sabinene or β-phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136	5.125
	28.513	Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro or α-amorphene or bicyclo[4.4.0]dec-1-ene,2-isopropyl-5-m or α-copaene	$C_{15}H_{24}$	204	4.027
	38.278	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	4.020
		Unknown	-	-	24.841

P. betle ♀	24.042	Eugenol or isoeugenol or chavibetol	$C_{10}H_{12}O_2$	164	80.524
	28.707	Germacrene-D	$C_{15}H_{24}$	204	5.210
	26.339	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	3.833
	28.513	α-amorphene	$C_{15}H_{24}$	204	3.319
	43.702	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	296	1.669
	29.213	Bicyclogermacrene	$C_{15}H_{24}$	204	1.241
		Unknown	-	-	4.024
P. rubroglandulosum ♂	29.518	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol	$C_{15}H_{24}O$	220	89.828
	26.339	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	5.330
	33.319	4-allyl-1,2-diacetoxy benzene	$C_{13}H_{14}O_4$	234	4.842
P. rubroglandulosum ♀	29.518	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol	$C_{15}H_{24}O$	220	87.694
	26.340	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	6.167
	33.326	4-allyl-1,2-diacetoxy benzene	$C_{13}H_{14}O_4$	234	6.139

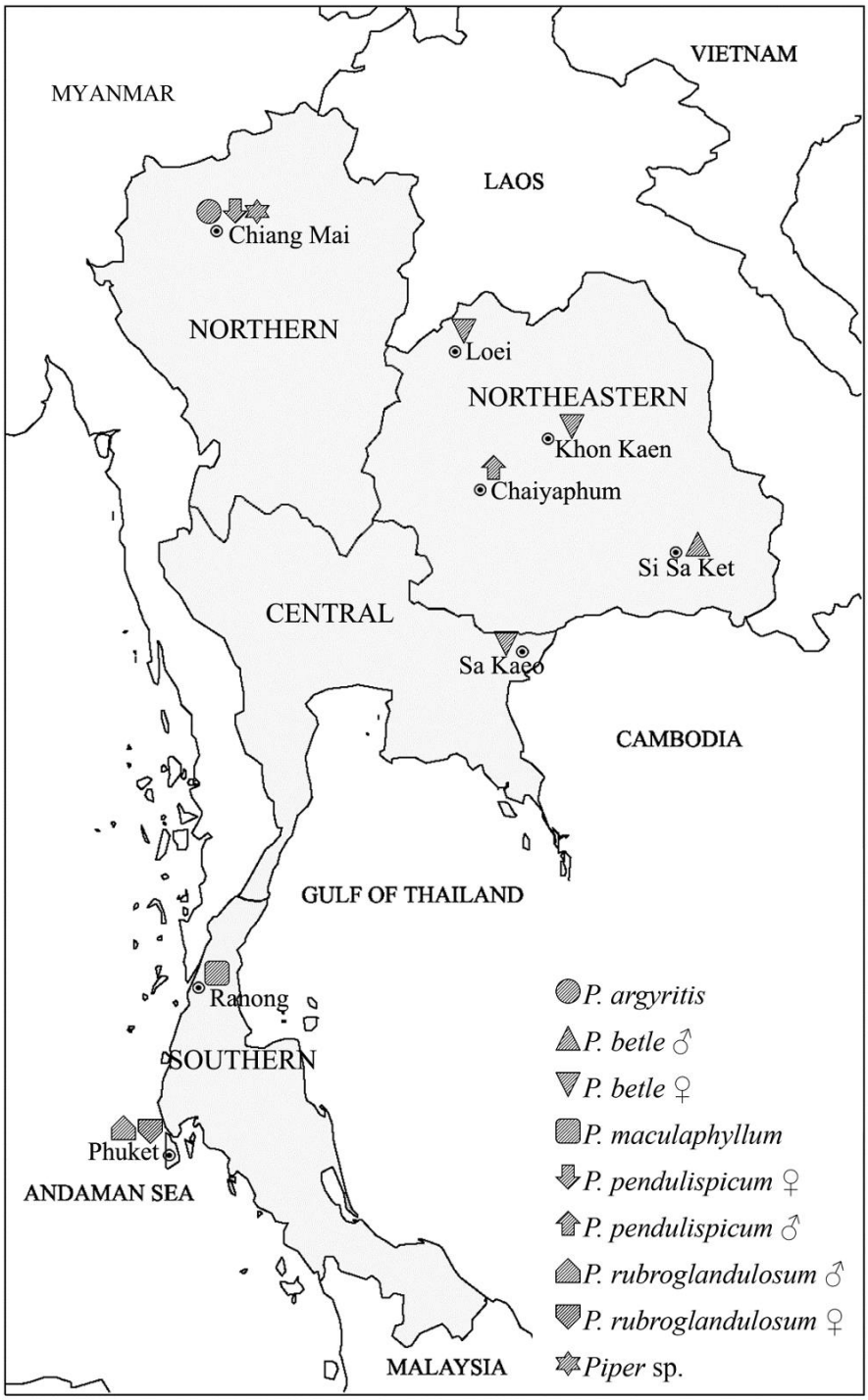


Figure 1. Map of Thailand showing the different provinces where the *Piper* species were collected.

Figure 2. Photographs to illustrate important morphological characteristics of *Piper argyritis* (A. habit showing leaves on free branch and male spike), *P. maculaphyllum* (B. dappled leaves, C. fruiting spikes), *P. betle* ♀ (D. habit showing free branch, E. female spike, F. wilted female spike), *P. rubroglandulosum* ♀ (G. habit showing free branch, H. female spike, I. fruiting spike), *P. pendulispicum* (J. habit showing leaves on epiphytic branch, K. fruiting spike), and *Piper* sp. (L. leaves with male spike).

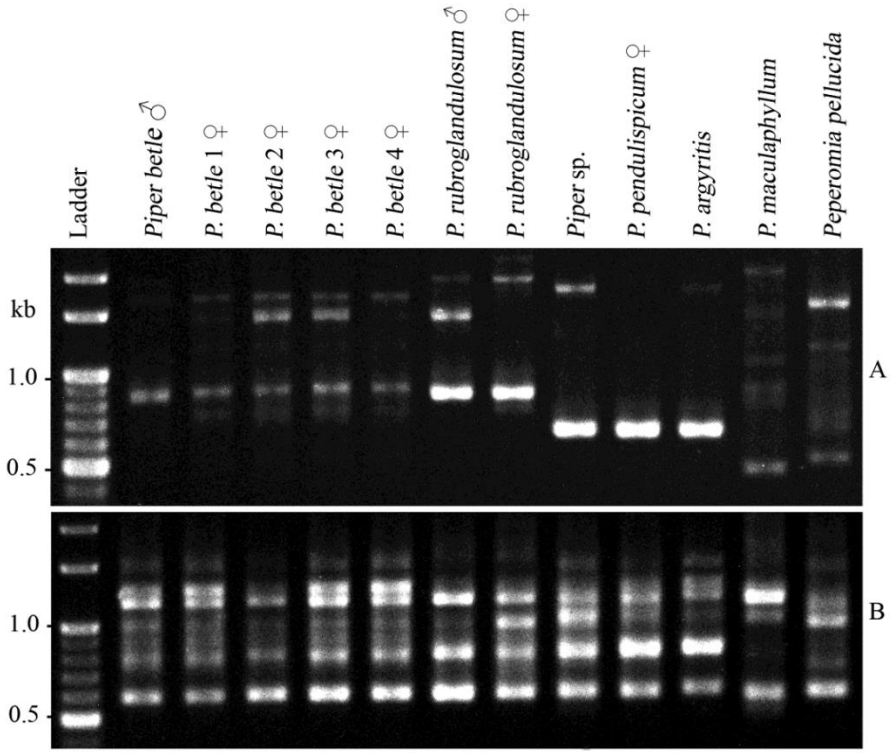


Figure 3. Two examples of the RAPD banding patterns of the *Piper* species obtained using the primer sequences GTCCACACGG (A) and CAATCGCCGT (B).

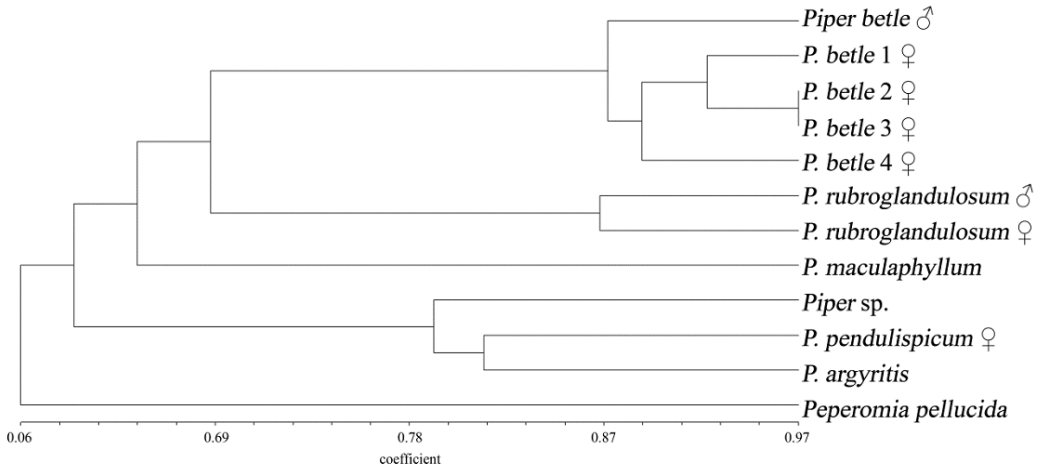


Figure 4. Dendrogram constructed from the RAPD analysis obtained from six *Piper* species and *Peperomia pellucida* as an outgroup using 22 primers and the NTSYS-pc 2.1 program.

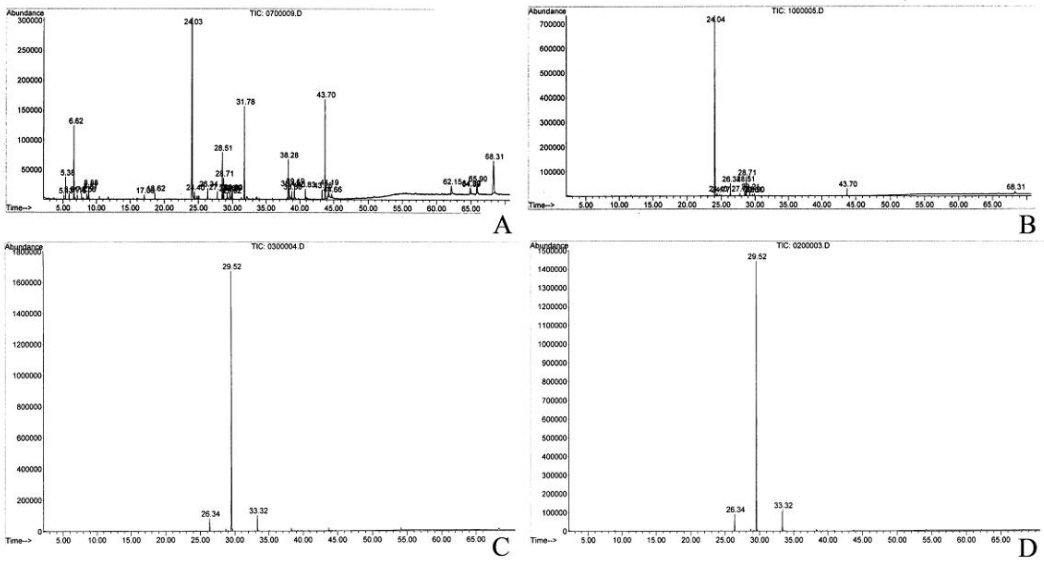


Figure 5. Chromatograms of crude hexane extracts of the leaves of the four examined *Piper* samples; *P. betle* ♂ (A), *P. betle* ♀ (B), *P. rubroglandulosum* ♂ (C), and *P. rubroglandulosum* ♀ (D).

Article 3: Submitted

Sanubol, A., Chaveerach, A.*, Sudmoon, R., Tanee, T., and Liehr, T. Chemical activities of nine betel-like-scented *Piper* species against pathogenic microorganisms. Submitted to Acta Biochimica Polonica (ISI impact factor 1.395).

Chemical Activities of Nine Betel-like scented *Piper* Species Against Pathogenic Microorganisms

Arisa Sanubol[1], Arunrat Chaveerach[1,4]*, Runglawan Sudmoon[1,4], Tawatchai Tanee[2] and Thomas Liehr[3]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002,

[2]Faculty of Environment and Resource Studies, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

[3]University Clinic Jena, Institute of Human Genetics, 07743 Jena, Germany

[4]Genetics and Environmental Toxicology (GET) Research Group, Khon Kaen University

*Corresponding author: raccha@kku.ac.th

For Peer Review

ABSTRACT

Nine betel-like scented *Piper* species were tested for their activity against pathogenic bacteria and fungi. The crude extracts of *P. betle*, *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum*, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve*, *P. tricolor* and *P. yinkiangense* were tested on *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Trichoderma harzianum* and *Aspergillus flavus*. The crude extracts of the nine *Piper* species were extracted with hexane and filtrated. The filtrates were evaporated to remove the solvent and then dissolved with dimethyl sulfoxide (DMSO). The extracts were tested on bacteria and fungi at 0 (undiluted), 2×, 4× and 8× dilutions, with DMSO alone as a control. Effectiveness against *P. aeruginosa* was found with undiluted *P. rubroglandulosum* and *P. yinkiangense* extracts, and effectiveness against *S. aureus* was observed with undiluted *P. betloides* extract and all concentrations of *P. maculaphyllum* extract. Therefore, the most interesting species is *P. maculaphyllum*, as it was effective against *S. aureus*, which causes many human diseases. Therefore, the human population can benefit from both local and industrial medicines produced from these studied plants, which to date have only been produced from betel leaves.

Keywords: crude extract; fungi; hexane; *Piper* species; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCTION

Medicinal and aromatic plants have been used by humans for purposes such as food, treating disease, beauty and cultural activities since pre-history. Plant-derived chemicals are the basis of many compounds used in healthcare in both industrialized and developing countries, in both processed and traditional forms. Plant-derived chemicals are produced by secondary metabolic activities involved in environmental interactions. They have been used in medicines such as analgesics (morphine), antitussives (codeine), antihypertensives (reserpine), cardiotonics (digoxin), antineoplastics (vinblastine and paclitaxel), and antimalarial compounds (artemisinin). These chemicals represent some of the many irreplaceable medicinal products derived from plants. Over 25% of new drugs approved over the last 30 years are based on molecules of plant origin, and approximately 50% of the top-selling chemicals are derived from knowledge on plant secondary metabolism (Terryn *et al*., 2006; Gomez-Galera *et al*., 2007). Additionally, seven plant-derived compounds with anticancer activity have received FDA approval for clinical use: taxol/paclitaxel from *Taxus brevifolia*, vinblastine and vincristine from *Catharanthus roseus*, topotecan and irinotecan from *Camptotheca acuminata*, and etoposide and teniposide from *Podophyllum peltatum* (Gomez-Galera *et al*., 2007). Additionally, the US National Cancer Institute has screened over 40,000 plant samples since 1986 and found five chemicals with significant anti-AIDS activity (http://www.cancer.gov; Gomez-Galera *et al*., 2007).

Plants in the genus *Piper* have been used since prehistoric times for a variety of human activities. They are used as spices, in traditional and processed forms of medicines, in cosmetic compounds, in cultural activities and as insecticides (Chaveerach *et al*., 2006; Scott *et al*., 2008; Fan *et al*., 2011). *Piper betle*, the betel plant, is one of the most important and well-known species of the genus. It contains important chemical substances, such as chavicol, cineol and eugenol, used in essential oils, medicines and insecticides (Yusoff *et al*., 2005; Misra *et al*., 2009). Eugenol has been reported as having anti-oxidant and anti-inflammatory properties (Misra *et al*., 2009). Although the betel plant is of great economic importance, it is challenging to cultivate. The main problem is foot and leaf rot, which caused by the fungus *Phytophthora parasitica* Dast

For Peer Review

(Silvayoi *et al*., 1985; Banka and Teo, 2000). In addition, the plant is subject to leaf spot, caused by bacteria (Banka and Teo, 2000). Investigations of the genus *Piper* in Thailand (Chaveerach *et al*., 2008, 2009) have found that among the 43 *Pip*er species, some produce a betel-like scent. Of these, all are wild species and hardy, producing numerous branches and leaves. They are tolerant and resistant to disease. Some produce a stronger scent than betel. Therefore, these species might be equally or more economically beneficial than the betel plant.

Crude hexane *Piper* extracts were tested on several types of bacteria and fungi that are common pathogens of humans: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Trichoderma harzianum* and *Aspergillus flavus*. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen of humans. It causes urinary tract, soft tissue, bone, joint, gastrointestinal and respiratory system infections; systemic infections; bacteremia; and dermatitis. Patients with severe burns, and cancer and AIDS patients who are immunosuppressed, are particularly affected, and serious infections arise in patients hospitalized with cancer, cystic fibrosis and burns. The case fatality rate in these patients is close to 50% (Todar, 2009). *Bacillus thuringiensis* which produces insecticidal toxins is used as an alternative insecticide. Most *E. coli* strains are harmless in healthy humans, but some serotypes can cause serious food poisoning and are occasionally responsible for product recalls due to food contamination. Some strains have been reported to be colonic pathological strains borne from surgical excisions and autopsies of acutely infected patients (Kelly, 1990). Others are opportunistic pathogens for infection in patients with hemorrhagic colitis (Attar, 1998). *Staphylococcus aureus* is a major cause of nosocomial infections, pyoarthritis, endocarditis and other disorders (Siriwong *et al*., 2009). It is considered a transient pathogenic organism of the skin. It can express a variety of virulence factors and can secrete exotoxins and enzymes that cause cutaneous and systemic infections, such as impetigo, subcutaneous abscesses, furuncles, staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) and toxic shock syndrome (TSS) (Brewer *et al*., 2008). *Trichoderma harzianum*, a filamentous fungus, is an effective biological control agent. It is used to control a variety of soil borne plant pathogens, such as *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., and *Sclerotium rolfsii* (Harman *et al*., 2004). *Trichoderma harzianum* has been shown to induce defense responses and systemic resistance as well as control

For Peer Review

plant pathogens (Alfano *et al*., 2007). *Aspergillus flavus* is a major problem in the storage of food and feedstuffs. There are reports of severe cases of mycotoxicoses in humans and livestock due to the consumption of commodities contaminated with *A. flavus*. Aflatoxins produced by toxigenic strains of *A. flavus* have received much attention throughout the world because of their hepatocarcinogenic, teratogenic, mutagenic and immunosuppressive properties (Aoudou *et al*., 2010). Approximately five billion people have been exposed to aflatoxins in developing countries, and aflatoxicosis is ranked 6th among the ten most important human health risks identified by WHO (Prakash *et al*., 2010).

Given that these pathogens affect human health, that plants act as sources of chemicals for medicinal drugs, and that Thailand has many *Piper* betel-like scented species, the present study aims to test the activities of crude hexane extracts of nine *Piper*, betel-like-scented species against microorganisms that cause disease. Our results will help guide their potential use, in combination with, or instead of, the betel plant.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials. Leaves of nine *Piper* species were collected, including those from both sexes of *P. betle* and *P. rubroglandulosum* (Figure 1). These included *P. betle* from Khon Kaen province, northeastern Thailand; *P. betloides*, *P. crocatum* and *P. submultinerve* from Chiang Mai province, northern Thailand; *P. maculaphyllum* from Ranong province, southern Thailand; *P. rubroglandulosum* from Phuket province, southern Thailand; *P. semiimmersum* and *P. tricolor* from Phang Nga province, southern Thailand; and *P. yinkiangense* from Surat Thani province, southern Thailand. These were used for the anti-microorganism test using the agar-well diffusion method, as explained below.

Crude extract preparation. Leaves from 11 individuals of the nine sampled species were air-dried. Twenty-five grams of each were then ground, added to 120 ml hexane (analytical grade) solvent, and filtered at room temperature. Ninety milliliters of filtrate was collected and maintained at -20 °C. Fifteen milliliters of the solution was then divided among new tubes, and the hexane was evaporated following centrifuging with a vacuum concentrator (ScanVac LaboGene, Denmark) at 20 °C and 200 rpm for 2 h. A dark green, thick, viscous crude extract was obtained. Fifteen milliliters of

For Peer Review

dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each crude extract tube, and the tubes were maintained at -20 °C until antimicrobial activity testing. Upon testing, the crude extracts were variously diluted to yield undiluted, 2×, 4× and 8× dilutions.

Microorganism and inoculum preparation for testing. The microorganisms used for crude extract testing were *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 78, *Bacillus thuringiensis* TISTR 126, *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 and *Aspergillus flavus* TISTR 3041. They were obtained from the culture collection at the Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). The bacterial and fungal cultures were cultivated at 37 °C for 24 h on LB (Luria-Bertani) agar (Sambrook and Russell, 2001) and at 28 °C for 5 days in Potato dextrose agar (PDA), respectively. Bacteria were then isolated from a single colony and cultivated at 37 °C for 24 h on LB agar. Cell densities of approximately 1×10^1 CFU mL^{-1} were prepared from the cultures by dilution with distilled water. The fungi were cultivated at 28 °C for 5 days.

Testing activities. The antimicrobial activities of the crude extracts of the nine *Piper* species were investigated using well plate diffusion. Petri dishes, each containing 20 mL of LB agar, were used to cultivate the bacteria and fungi. Seven 5-mm-diameter wells were bored into each agar plate. Two-fold serial dilutions of the crude extracts were made with DMSO: 0, 2×, 4× and 8×. The negative controls were DMSO and distilled water. The positive controls consisted of 50 µg/mL of antibiotics, including itraconazole for the fungi *Aspergillus flavus* and *Trichoderma harzianum*, ampicillin for the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*, and clindamycin for *Staphylococcus aureus*.

1.1 Anti-bacterial test

Twenty microliters each of crude extract, negative controls and positive controls were added to each well in the petri dishes of LB agar, containing bacteria growing at a density $1x10^1$ CFU mL^{-1}. Each experiment was performed in triplicate, and the plates were incubated at 37 °C for 24 hours. The clear zone within the sample wells, caused by the activity of phytochemicals against the microorganisms, was measured as the diameter of the clear zone minus the diameter of the well, a method modified from Suppakul *et al*. (2006). The results were categorized into three levels: no inhibition zone (or no clear zone), no inhibition and inhibition. Each level was defined or sub classified

For Peer Review

as follows: no inhibition zone (0 mm; i.e., no phytochemical activities against the microorganisms); no inhibition or clear zones without inhibition (<5 mm); and inhibition, classified as mild inhibition (5-10 mm), moderate inhibition (>10-15 mm) and strong inhibition (>15 mm).

1.2 Anti-fungal test

The fungi in each 5-mm-diameter well of the active plate was transferred and placed in the middle of experimental plate. The plates were incubated at 28 °C to cultivate fungi for 5 days. Next, 20 µl of crude extract, negative controls and positive controls were added to each well. Each experiment was performed in triplicate, and the plates were then further incubated at 28 °C for 7 days. The classifications are as in section 4.1.

Determination of minimum inhibitory concentration. The agar dilution method of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2000) was adopted to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Here, the minimum inhibitory concentration at which no visible growth observed was defined as the MIC of the *Piper* species crude extracts that resulted in a zone of inhibition.

Statistical analysis. Data points were indicated by the means of the measured values and subjected to analysis of variance (ANOVA) using the IBM program SPSS Statistics 19.

RESULTS

Undiluted extracts

Phytochemical activities on *Bacillus thuringiensis*

Eight *Piper* species; namely *P. betle* (male and female), *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. submultinerve*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum* (male and female), *P. semiimmersum* and *P. yinkiangense* produced clear zones with *B. thuringiensis* but were not inhibitory.

The effects of the different dilutions of crude hexane extracts from the leaves of *Piper* species on the selected microorganisms are shown in Figure 2, and the width of the inhibition zones produced by each *Piper* species on their respective bacteria and fungi are shown in Table 1.

For Peer Review

Phytochemical activities on *Pseudomonas aeruginosa*

Seven *Piper* species, including *P. betle* (both ♂ and ♀), *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum* (both male and female), *P. semiimmersum* and *P. yinkiangense* showed clear zones with *P. aeruginosa*. Additionally, two species; namely, *P. rubroglandulosum* (♀) and *P. yinkiangense*, had mild inhibitory effects, producing inhibition zones of 5.17 ± 0.29 and 5.17 ± 0.29 mm, respectively; there was no significance difference between the two species ($p > 0.05$).

Phytochemical activities on *Staphylococcus aureus*

The crude hexane extracts of *P. betloides* and *P. maculaphyllum* had mild inhibitory effects on *S. aureus*, with no significance difference between the two species ($p > 0.05$). The zones of inhibition were 5.83 ± 0.76 and 6.00 ± 1.00 mm, respectively.

All nine *Piper* species had no activity, with no clear zone, on *E. coli*, *T. harzianum* and *A. flavus*.

Diluted extracts (2×, 4×, and 8×):

The crude hexane extracts of nine *Piper* species prepared as 2×, 4×, and 8× dilutions were tested on the selected microorganisms. The results are shown below (Table 1).

Phytochemical activities on *Bacillus thuringiensis*

The 2×, 4×, and 8× dilution crude hexane extracts of *P. betle* (male), *P. betloides*, *P. crocatum, P. maculaphyllum*, ♀ and ♂ *P. rubroglandulosum*, *P. semiimersum*, *P. submultinerve* and *P. yinkiangense* showed clear zones in *B. thuringiensis* treatment, as did the 2× and 4× extracts of ♀ *P. betle*; however, these were not inhibitory.

Phytochemical activities on *Pseudomonas aeruginosa*

The 2×, 4×, and 8× dilution crude hexane extracts of ♂ *P. rubroglandulosum*; the 2× and 4× diluted extracts of *P. betloides*, *P. crocatum*, ♀ *P. rubroglandulosum*, *P. semiimmersum* and *P. yinkiangense*; and the 2× diluted extracts of ♀ and ♂ *P. betle* and *P. maculaphyllum* all showed clear zones with *P. aeruginosa*, but without inhibition. In contrast, the 2×, 4×, and 8× diluted crude hexane extracts of *P. submultinerve* and *P. tricolor* did not produce clear zones with *P. aeruginosa*.

Phytochemical activities on *Staphylococcus aureus*

For Peer Review

The 2×, 4×, and 8× dilution crude hexane extracts of *P. betloides* and *P. maculaphyllum* produced clear zones; however, those of *P. betloides* were not inhibitory. For *P. maculaphyllum*, inhibition zones of 5.67 ± 0.58, 6.33 ± 1.15 and 5.67 ± 0.58, for the 2×, 4×, and 8× dilutions, respectively. These values were not significantly different ($p > 0.05$).

No clear zones were produced from the 2×, 4×, and 8× diluted crude hexane extracts of ♀ and ♂ *Piper betle*, *P. crocatum*, ♀ and ♂ *P. rubroglandulosum*, *P. semiimersum*, *P. submultinerve*, *P. tricolor* or *P. yinkiangense.*

In addition, no phytochemical activity and no clear zones were observed in any of the *Piper* extracts against *E. coli*, *T. harzianum* or *A. flavus*.

DISCUSSION

This study identified *Piper* species from a high biodiversity country that, in addition to *P. betle*, may provide medical benefits. The most promising species are *P. rubroglandulosum* (♂), *P. yinkiangense*, *P. betloides* and *P. maculaphyllum*. Undiluted extracts of *P. rubroglandulosum* and *P. yinkiangense* were effective against *P. aeruginosa*. Undiluted extracts of *P. betloides* and all concentrations of *P. maculaphyllum* were effective against *S. aureus*. The most interesting species is *P. maculaphyllum*, as it was effective against *S. aureus*, which causes many human diseases. Therefore, the human population can benefit from local and commercial medicines made from these plants, which formerly were made only from betel leaves.

The two bacteria species *P. aeruginosa* and *S. aureus* are common pathogens in houses and hospitals in tropical countries. They are also opportunistic pathogens of humans and cause many topical and internal diseases, particularly when the human immune system is compromised, as mentioned in the introduction.

Traditional and pharmaceutical use of *P. betle* is widespread in many countries due to several important substances, including xydroxychavicol, chavicol, eugenol, terpene, sesquiterpene, safrole, and allypyrocatechol diacetate. Several different extracts and solvents have been studied, and several compounds with high biological activity have been identified The phenolic compounds eugenol and hydroxychavicol are not mutagenic in various strains of *Salmonella typhimurium* (Amonkar, 1986). Betel leaves are reported to possess antioxidant activity against tobacco carcinogens (Chang *et al.*,

For Peer Review

2002). Ethanol extracts have antibacterial activity against both *Staphylococcus aureus*, which causes skin disease (Sukatta *et al*., 2004). Aqueous extracts have been shown to have antioxidant activity (Dasgupta, 2004). Antidiabetic activities of aqueous and ethanolic extracts have been observed in rats (Arambewela *et al*., 2005). Betel leaves have antiseptic activities on skin when ground with 40% ethyl alcohol solvent (Chaveerach *et al*., 2006). Methanolic extracts of *P. betle* have broad spectrum activities, including antifungal, antibacterial, antitumour, hypotensive, respiratory depressant, anthelminthic, carditonic and antifertility; their antioxidant activity scavenges free radicals and reduces free-radical induced cell injury (Manigauha *et al*., 2009). The leaf extracts, fractions and purified compounds play a role in oral hygiene and have positive cardiovascular effects. They also have anti-diabetic, anti-inflammatory/immunomodulatory, anti-ulcer, hepato-protective, anti-infective, and high antioxidant activities. Important compounds include hydroxychavicol, hydroxychavicol acetate, allypyro-catechol, chavibetol, piperbetol, methylpiperbetol, and piperols A and B (Kumar *et al*., 2010). Other works discuss the optimum environmental conditions for growth in *P. betle* and review its medicinal and nutritional benefits (2011).

Sanubol *et al*. (2014) described some of the major chemicals within the nine *Piper* betel-like scented species; specifically, sabinene, β-phellandrene, 4-allyloxy-6-methoxy-N, N-dimethyl-1,3,5-germacrene-D, β-cubebene and others. A high amount, 34.835% of an unknown compound was also identified. These compounds seem to be different from those of *P. betle* (Sanubol *et al*., 2014) that are active against many species of bacteria and fungi (Arambewela *et al*., 2005; Charoenwattana, 2007).

In Thailand, traditional and pharmaceutical use of *P. betle* has occurred from ancient times into the present. Traditional Thai forms include fresh leaves and capsules. It has antiseptic and anti-inflammatory activities on skin diseases, presumably from *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The prepared form is made by grinding as many leaves as needed with 40% ethyl alcohol to produce a concentrated extract. The extract is then applied to the skin.

However, our results show clear zones of *P. betle* on *P. aeruginosa*, but without inhibitory effects; we also observed no inhibitory activity on *S. aureus*. Possible reasons include our use of different solvent extracts or concentrations. In addition, *P. rubroglandulosum*, *P. yinkiangense*, *P. betloides* and *P. maculaphyllum* had greater

For Peer Review

inhibitory activities on *P. aeruginosa* and *S. aureus* than did *P. betle*, a finding consistent with its hotter and spicier attributes when chewed. Therefore, the human population can benefit from both local and industrial medicines from these plants, originally derived only from betel leaves.

Acknowledgments

The authors are thankful for the financial support provided by the Thailand Research Fund and Khon Kaen University through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0027/2553) to Arisa Sanubol and Arunrat Chaveerach and the Research Career Development Grant (Grant No. RSA5580054). This research was also supported by the Genetics and Environmental Toxicology (GET) Research Group, Khon Kaen University.

Conflict of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

Alfano G, Lewis IML, Cakir C, Bos JIB, Miller SA, Madden LV, Kamoun S, Hoitink HAJ. 2007. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma ham*atum 382. *Phytopathology* **97**: 429-437.

Amonkar AJ, Nagabhushan D'Souza AV, Bhide SV. 1986. Hydroxychavicol: A new phenolic antimutagen from betle leaf. *Food Chem Toxicol* **24**: 1321-1324.

Aoudou Y, Léopold TN, Michel JDP, Xavier EF, Moses MC. Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *J Yeast Fungal Res* **1**: 001-008.

Arambewela L, Kumaratunga KGA, Dias K. 2005. Studies on *Piper betle* of Sri Lanka. *J Natl Sci Found* **33**: 133-139.

Attar A, Becheur H, Gilbert T, Bloch F, Petite, JP. 1998. Hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157:H7. *Ann Med Interne (Paris)* **149**: 288-90.

For Peer Review

Banka RA, Teo SP. 2000. *Piper betle*. In *PROSEA 16 stimulant plants*, van der Vossen HAM, Wessel M (eds). Backhuys: Leiden; 135-140.

Brewer JD, Hundley MD, Meves A, Hargreaves J, McEvoy MT, Pittelkow MR. 2008. Staphylococcal scalded skin syndrome and toxic shock syndrome after tooth extraction. *J Am Acad Dermatol* **59**: 342-6. doi: 10.1016/j.jaad.2008.02.032. Epub 2008 May 15.

Chang MC, Uang BJ, Wu HL, Lee JJ, Hahn LJ, Jeng JH. 2002. Inducing the cell cycle arrest and apoptosis of oral KB carcinoma cells by hydroxychavicol: roles of glutathione and reactive oxygen species. *Br J Pharmacol* **135**: 619-630.

Charoenwattana P. 2007. Antifungal efficiency of *Piper betle* L. on *Aspergillus flavus*. *Agricultural Sci J* **38:** 50-53.

Chaveerach A, Mokkamul P, Sudmoon R, Tanee T. 2006. Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand. *Ethnobotany Res Appl* **4**: 223-231.

Chaveerach A, Sudmoon R, Tanee T, Mokkamul, P. 2008. The species diversity of the genus *Piper* from Thailand. *Acta Phytotax Geobot* **59**: 105–163.

Chowdhury I, Amin R, Binzaid, S. 2011. Optimal control on environments for improving the *Piper betle* (pann) growth. *Life Sciences Leaflets* **17**: 605-615.

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect* **6**: 509-515.

Fan LS, Muhamad R, Omar D, Rahmani M. 2011. Insecticidal properties of *Piper nigrum* fruit extracts and essential oils against *Spodoptera litura*. *Int J Agric Biol* **13**: 517–522.

Gomez-Galera S, Pelacho AM., Gene A, Capell T, Christon P. 2007. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Report* **26**: 1689-1715.

Harman GE, Howell CR, Viterbo, A, Chet I, Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* **2**: 43-56.

Kelly J, Oryshak A, Wenetsek M, Grabiec J, Handy S. 1990. The colonic pathology of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Am J Surg Pathol* **14**: 87-92.

Kumar N, Misra P, Dube A, Bhattacharya S, Dikshit M, Rabnade S. 2010. *Piper betle* Linn. a maligned Pan-Asiatic plant with an array of pharmacological activities and prospects for drug discovery. *Curr Sci* **99**: 2010.

For Rev.

Manigauha A, Ali H, Uma maheshwari M. 2009. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Piper* betel leaves. *J Pharm Res* **2**: 491-494.

Misra, P., Kumar, A., Khare, P., Gupta, S., Kumar, N. and Dube, A. 2009. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. *J Med Microbiol* **58**: 1058-1066.

Prakash B, Shukla R, Singh P, Kumar A, Mishra, P.K. and Dubey, N.K. 2010. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *Int J Food Microbiol* **142**: 114-119.

Sanubol A, Chaveerach A, Sudmoon R, Tanee T, Noikotr K, and Chuachan, C. 2014. Betel-like-scented *Piper* plants as diverse sources of industrial and medicinal aromatic chemicals. *Chiang Mai J Sci*, impress.

Scott IM, Jensen HR, Philogène BJR, Arnason JT. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochem Rev* **7**: 65-75.

Silayoi I, Krengpiem P. Disthabanchong A. 1985. Effectiveness of systemic fungicides for control of *Phytophthora parasitica* NK1 in foot rot of *Piper betle*. *Thai Agric Res J* **3**: 104-107.

Siriwong N Chukeatirote E. 2009. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and controlling. *Songklanagarind Med J* **27**: 347-358.

Sukatta U, Dilokkunanant U, Charoenkul N, Rugthaworn P, Siriwan S. 2004. Antimicrobial activity of betel crude extract and betel oil on some microbes causing skin disease. Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Science, *Nat Resour Environ Econ*: 299-303.

Suppakul P, SanlaEad N, Phoopuritham, P. 2006. Antimicrobial and antioxidant activities of betel oil. *Kasetsart J* **40**: 91-100.

Terryn N, Montagu VM, Inze D, Goosens A. 2006. Functional genomic approaches to study and engineer secondary metabolites in plant cell cultures. In *Medicinal and aromatic plants*, Bogers LJ, Craker LE, Jange D (eds). The Netherlands; 291-300.

Todar K. 2009. Opportunistic infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Available Source: http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Pseudomonas.html.

Yusoff Z, Mahmud Z, Saleh SH, Mohd EY. 2005. Study on the chemical constituents of *Piper betle* L. in relation to their possible insect attractant property. *Malay J Sci* **24**: 143-147.

For Peer Review

Table 1. Antimicrobial activity of different dilution levels of crude hexane extracts from the leaves of *Piper* species using an agar well diffusion assay.

Plants and level diluted crude hexane extracts	Zone of inhibition[a] / mm		
	Bt	*Pa*	*Sa*
♀ *Piper betle*			
Un-dilution	2.00 ± 0.00 [A]	2.67 ± 0.58 [A]	0.00
2×-dilution	2.17 ± 0.29	2.00 ± 0.00	0.00
4×-dilution	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
8×-dilution	0.00	0.00	0.00
♂ *P. betle*			
Un-dilution	2.50 ± 0.50 [A]	3.67 ± 0.58 [ABD]	0.00
2×-dilution	2.33 ± 0.29	3.00 ± 0.00	0.00
4×-dilution	2.00 ±0.00	0.00	0.00
8×-dilution	2.00 ±0.00	0.00	0.00
P. betloides			
Un-dilution	2.67 ± 0.58 [AB]	4.33 ± 0.58 [BCDE]	5.83 ± 0.76 [A]
2×-dilution	2.17 ± 0.29	3.33 ± 0.29	3.83 ± 0.76
4×-dilution	2.17 ± 0.29	2.50 ± 0.87	3.67 ± 1.53
8×-dilution	2.00 ± 0.00	0.00	2.67 ± 1.15
P. crocatum			
Un-dilution	3.75 ± 0.35 [BC]	4.50 ± 0.87 [BCE]	0.00
2×-dilution	3.33 ± 0.58	3.17 ± 1.04	0.00
4×-dilution	3.33 ± 0.29	2.67 ± 0.58	0.00
8×-dilution	2.83 ± 0.76	0.00	0.00
P. maculaphyllum			
Un-dilution	2.33 ± 0.29 [A]	3.33 ± 1.15 [AB]	6.00 ± 1.00 [A]
2×-dilution	2.50 ± 0.00	3.00 ± 0.00	5.67 ± 0.58
4×-dilution	2.50 ± 0.50	0.00	6.33 ± 1.15
8×-dilution	2.00 ± 0.00	0.00	5.67 ± 0.58
♀ *P. rubroglandulosum*			

For Peer Review

Un-dilution	3.50 ± 0.87 [BCD]	5.17 ± 0.29 [C]	0.00
2×-dilution	3.17 ± 0.58	4.00 ± 0.00	0.00
4×-dilution	3.17 ± 0.76	3.00 ± 0.00	0.00
8×-dilution	2.67 ± 1.15	0.00	0.00
♂ *P. rubroglandulosum*			
Un-dilution	2.67 ± 0.58 [ACD]	5.00 ± 0.00 [CD]	0.00
2×-dilution	2.33 ± 0.58	4.00 ± 0.00	0.00
4×-dilution	2.83 ± 1.04	3.17 ± 0.29	0.00
8×-dilution	3.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	0.00
P. semiimersum			
Un-dilution	2.17 ± 0.29 [A]	3.67 ± 1.53 [ABD]	0.00
2×-dilution	2.33 ± 0.58	4.33 ± 2.31	0.00
4×-dilution	2.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	0.00
8×-dilution	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
P. submultinerve			
Un-dilution	2.00 ± 0.00 [A]	0.00	0.00
2×-dilution	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
4×-dilution	2.33 ± 0.58	0.00	0.00
8×-dilution	2.33 ±0.58	0.00	0.00
P. yinkiangense			
Un-dilution	3.67 ± 0.76 [C]	5.17 ± 0.29 [CE]	0.00
2×-dilution	3.00 ± 0.50	4.00 ± 0.00	0.00
4×-dilution	2.33 ± 0.58	2.67 ± 0.58	0.00
8×-dilution	2.00 ± 0.00	0.00	0.00

For Peer Review

Figure legend

Figure 1. The nine *Piper* species investigated: ♀ *Piper betle* (A), ♂ *P. betle* (B), *P. betloides* (C), *P. crocatum* (D), *P. maculaphyllum* (E), ♀ *P. rubroglandulosum* (F), ♂ *P. rubroglandulosum* (G), *P. semiimmersum* (H), *P. submultinerve* (I), *P. tricolor* (J-K) and *P. yinkiangense* (L).

Figure 2. Examples of different dilution levels and clear zones of crude hexane extracts from the leaves of *Piper* species against *Pseudomonas aeruginosa* (♀ *Piper rubroglandulosum* (A) and *P. yinkiangense* (B)) and *Staphylococcus aureus* (*Piper betloides* (C) and *P. maculaphyllum* (D)). Treatments: antibiotic (1), sterile distilled water (2), undiluted extractions (3), 2×-diluted extractions (4), 4×-diluted extractions (5), 8×-diluted extractions (6) and DMSO (7).

For Peer Review

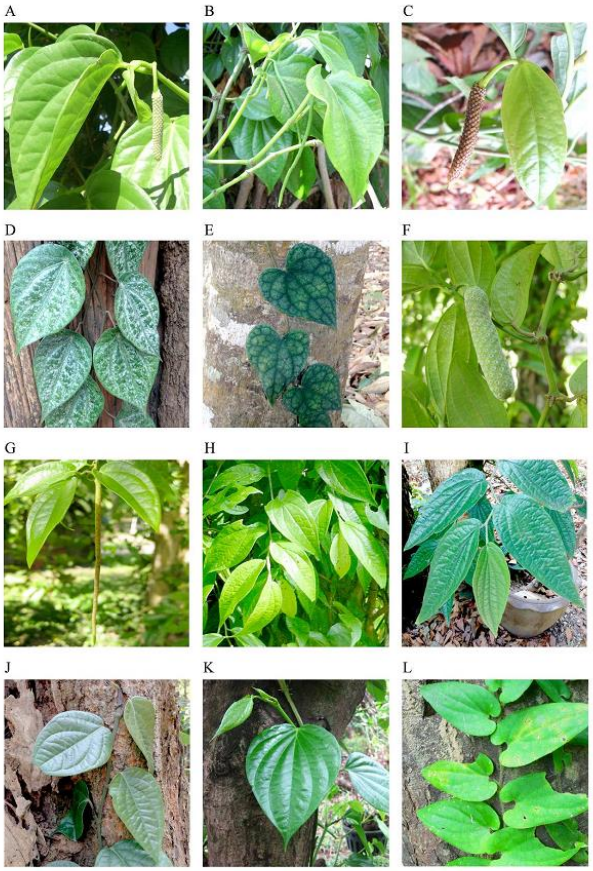


Figure 1. The nine Piper species investigated: ♀ Piper betle (A), ♂ P. betle (B), P. betloides (C), P. crocatum (D), P. maculaphyllum (E), ♀ P. rubroglandulosum (F), ♂ P. rubroglandulosum (G), P. semiimmersum (H), P. submultinerve (I), P. tricolor (J-K) and P. yinkiangense (L).
284x414mm (300 x 300 DPI)

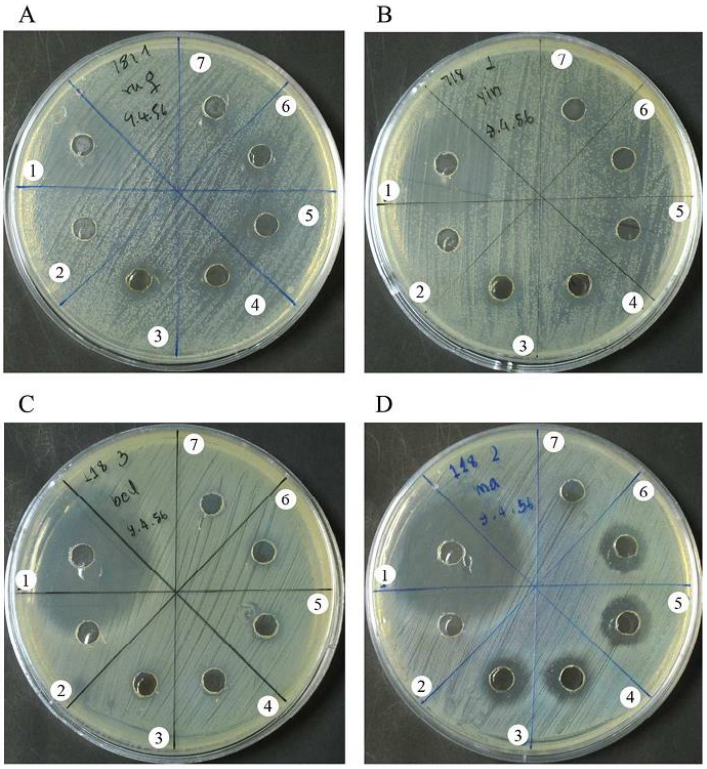


Figure 2. Examples of different dilution levels and clear zones of crude hexane extracts from the leaves of Piper species against Pseudomonas aeruginosa (♀ Piper rubroglandulosum (A) and P. yinkiangense (B)) and Staphylococcus aureus (Piper betloides (C) and P. maculaphyllum (D)). Treatments: antibiotic (1), sterile distilled water (2), undiluted extractions (3), 2×-diluted extractions (4), 4×-diluted extractions (5), 8×-diluted extractions (6) and DMSO (7).
164x180mm (300 x 300 DPI)

Article 4: Submitted

Sanubol, A., Sudmoon, R., Tanee, T., and Liehr, T. and Chaveerach, A.* Quantity and chemical components of the volatile oils of nine betel-like-scented *Piper* plants. Submitted to Journal of Chromatography (ISI impact factor 4.258).

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Chromatography A
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Quantity and components of the volatile oils of nine betel-like scented Piper plants and the mixture of these oils with commercial products

Article Type: Full Length Article

Keywords: betel-like-scented Piper species; GC-MS; phytochemicals; stream distillation; volatile oils

Corresponding Author: Prof. Arunrat Chaveerach, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Khon Kaen University

First Author: Arisa Sanubol, Ph.D. candidate

Order of Authors: Arisa Sanubol, Ph.D. candidate; Runglawan Sudmoon, Ph.D. ; Tawatchai Tanee, Ph.D. ; Thomas Liehr, Ph.D. ; Arunrat Chaveerach, Ph.D.

Suggested Reviewers: Nyree Zerega Ph.D.
Director of Graduate Program in Plant Biology and Conservation, Plant Biology and Conservation, Northwestern University and The Chicago Botanic Garden
n-zerega@northwestern.edu
Scientific expertise in Plant systematics, Evolution and Biogeography

Will McClatchey Ph.D.
Vice President & Director of Research, Botanical Research Institute of Texas
will.mcclatchey@gmail.com
Scientific expertise in Evolutionary Biology and Ethnobotany

Brijmohan Singh Bhau Ph.D.
Principal Scientist, Medicinal, Aromatic and Economic Plants Division CSIR- North East Institute of Science and Technology Jorhat 785 006, Assam, India
bsbhau@gmail.com; bhaubs@rrljorhat.res.in
Scientific expertise in Plant systematics

Quantity and components of the volatile oils of nine betel-like scented *Piper* plants and the mixture of these oils with commercial products

Arisa Sanubol [a], Runglawan Sudmoon [a,d], Tawatchai Tanee [b,d], Thomas Liehr [c] and Arunrat Chaveerach *[a,d]

[a] *Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*

[b] *Faculty of Environment and Resource Studies, Mahasarakham University, Mahasarakham 44000, Thailand*

[c] *University clinic Jena, Institute of Human Genetics, 07743 Jena, Germany*

[d] *Genetics and Environmental Toxicology Research Group, Khon Kaen University*

* Corresponding author: Tel.: +668 2309 5690.

E-mail address: raccha@kku.ac.th.

ABSTRACT

Volatile oil quantity and chemical components were detected in the leaves of a cultivated betel species including *Piper betle* and eight wild betel-like-scented species by GC-MS. The oil quantity is higher in the commercially cultivated species at 2.15-2.73 mL/kg, while wild species had a lower amount, 0.03-0.76 mL/kg. However, when some wild species are grown in sunlight-exposed areas around households and office buildings, they produce higher oil amounts e.g., the species *P. rubroglandulosum*, *P. tricolor* and *P. yinkiangense*. The reason for the increased production is attacks by pathogens and insects, which is a route for secondary metabolite synthesis in plants. Interestingly, species with high oil amounts synthesize several chemicals with a low percentage for each chemical, while species with lower oil amounts synthesize less diverse chemicals but at a higher percentage. Substances found in a satisfactory amount in each species include the following: eugenol/isoeugenol and 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene in *P. betle*, L-linalool, α-terpineol, β-selinene and butylated hydroxytoluene in *P. betloides*, L-linalool, β-terpineol, α-terpineol and butylated hydroxytoluene in *P. crocatum*, trans-caryophyllene, germacrene D and butylated hydroxytoluene in *P. maculaphyllum*, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene in *P. rubroglandulosum*, butylated hydroxytoluene in *P. semiimersum*, β-elemene, trans-caryophyllene, β-selinene, 4-

allyl-1,2-diacetoxybenzene and germacrene D in *P. submultinerve*, 4-terpineol, eugenol/isoeugenol, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene and bicyclogermacrene in *P. tricolor*, and α-caryophyllene, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene and α-selinene in *P. yinkiangense*. The oils were added to anti-inflammatory and anti-itching soap and foot deodorant spray products.

Keywords: betel-like-scented *Piper* species, GC-MS, phytochemicals, stream distillation, volatile oils

1. Introduction

Essential oils or volatile oils are aroma oils physically extracted by various methods from aromatic plants popularly obtained by stream distillation. Medicinal and aromatic plants have always been related to current human health systems including traditional usage in households and industry. Plant-derived medicines and aromatic oils constitute substantial components that are products of plant secondary metabolism and involved in many other aspects of a plant's interaction with its immediate environment [1,2]. The oils are used for fragrances in-house products, such as green pesticides and soaps, flavorings in perfume, cosmetics and seasoning in food at the household and industry levels, and more recently, in aromatherapy and as herbal medicines. Plant essential oils are commercially produced from several botanical sources, and many are members of the mint family (Lamiaceae). The oils are generally composed of complex mixtures of monoterpenes, biogenetically related phenols, and sesquiterpenes. Examples include 1,8-cineole, a major constituent of oils from rosemary and eucalyptus, eugenol, which is from clove oil, thymol, which is from garden thyme, menthol, which is from various mint species, asarones, which is from calamus, and carvacrol and linalool, which come from many plant species [3]. The oils comprise various substances depending on the plant species and are used for diverse options. Two classes of compounds, terpenoids and phenyl propenes, make up the bulk of plant volatile oils and define the particular properties of many species and herbs, e.g., terpenoid menthol, a major component of peppermint, provides this herb with its cool, peppery aroma and flavor. In contrast, the major constituent of cloves is phenylpropene eugenol, which provides this spice with its pungent, distinctive aroma. Eugenol makes up 70 to 90% of essential oils and 15% of the dry weight of clove buds (Myrtaceae). Eugenol is also found in significant amounts in cinnamon and cinnamon leaves and at a lesser amount in nutmeg and pepper [4]. β-

Caryophyllene, which is found in *Helichrysum italicum* and *Achille millefolium*, has anti-inflamatory activity [1].

Members of the *Piper* species also include medicinal and aromatic plants. Many species, particularly cultivated species such as *P. betle*, *P. nigrum*, *P. chaba*, and *P. sarmentosum*, have long been used both in households and industry worldwide, including in Asia, due to their high species diversity. Additionally, these plants contain some chemicals with benefit to humans for the numerous usages mentioned above for instances citronella, eugenol, cineole and many others found in many plants species, such as *Piper betle*, *P. betloides*, *P. crocatum*, are used for insect and mosquito repellant [3,5]. Moreover, isoeugenol, chavibetol, caryophyllene, sabinene, phyllandrene and germacrene A and D are major components found in hexane crude extracts by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of the nine betel-like-scented *Piper* species. A number of these compounds have long been used for several treatments including isoeugenol, an isomer of eugenol that is a phenylpropene synthesized from eugenol and a constituent of essential oils in plants; chavibetol, another eugenol isomer that is an aromatic compound with a spicy odor [6]; caryophyllene, which has a spicy and clove-like aroma [7]; sabinene, a natural bicyclic monoterpene that is one of the chemical compounds that contributes to the spiciness of *P. nigrum* black peppers [8]; phyllandrene, which is used in fragrances for its pleasant aroma; β-phyllandrene, which has been described to be a peppery-mint and slightly citrus [9]; and germacrenes, which are sesquiterpenes, a class of volatile organic hydrocarbons that are typically produced for their antimicrobial and insecticidal properties [10,11].

GC-MS is a method that has been accepted for phytochemical identification and has been used in conjunction with the analysis of the essential oils of *Piper* species. For example, this method identified chemicals contained in the essential oils of *P. nigrum* and *P. guineense* [12], *P. nigrum* and *P. longum* [13], *P. capense*, *P. guineense*, *P. nigrum*, and *P. umbellatum* [14], and *P. betle* [15].

Because of the many uses for volatile oils, including the various chemicals contained in *Piper* crude extract species, we aimed to study volatile oil quantity concentrated from wild species. Additionally, the chemical components in the oils were elucidated by GC-MS. Soap, liquid soap and foot deodorant spray were produced with a mixture of the oils obtained via stream distillation in the laboratory.

2. Experimental

2.1 Plant samples and collection

The leaves of the nine species studied including eight wild aromatic betel-like plants, viz. *P. betloides* Chaveer. & Tanomtong, *P. crocatum* Ruiz et Pavon, *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon, *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mokkamul, *P. semiimmersum* C.DC., *P. submultinerve* C.DC., *P. tricolor* Y.C.Tseng, *P. yinkiangense* Y.C.Tseng, and one from the more cultivated *P. betle* L. species were collected from the various native growing areas described in the Table 1. The morphological characteristics of these species are shown in Fig. 1. Species identification was performed according to Chaveerach et al. [16,17] and compared with the specimens maintained kept at Khon Kaen University. The research study collection took place between 2012 and 2014. Some species, such as *P. betle*, *P. rubroglandulosum*, *P. submultinerve* and *P. tricolor*, were easier/possible to collect, and more than one was for amount clarification and to sort chemicals in various times and areas collected.

2.2 Stream distillation and oil quantity comparison for each of the studied species

Freshly matured leaves (1 kg) of each of the nine studied samples were subjected to stream distillation with 3.8 L water using WHM12017 Heating Mantles (Daihan Scientific Co. Ltd., Korea) for 3 hours at 25 °C. After distillation, the oils were collected in two parts: the first was floated on top of water in a flask, and the second was mixed with water in a flask. The oils on top of water were transferred to a new bottle by an auto pipette that was maintained at -20 °C. The oil and water mixture was divided in a separation funnel by adding dichloromethane (CH_2Cl_2) to the mixture in a 25:500 mL proportion. Then, the funnel was checked to determine whether it was a homogeneous mixture, and it was left for 1 h at room temperature. Dichloromethane and the volatile oil remained at the bottom of the funnel. The dichloromethane was evaporated using a Rotary Evaporator (Buchi Rotavapor R-210, Switzerland); thus, the remainder was the oil only, which was transferred it to the supplement in the bottom of the first part and maintained at -20 °C until further use of the products and chemicals for identification by GC-MS.

2.3 Chemical identification of the oils of the betel-like scented species using GC-MS

GC-MS analysis of the oils was performed using an Agilent Technologies GC 6890 N/5973 inert MS fused with a capillary column (30.0 m × 250 mm × 0.25 mm). Helium gas was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min. The injection and mass-transferred line temperature were set at 280 °C. The oven temperature was programmed at 70

°C to 120 °C at 3 °C/min. The temperature was then held for 2 min and finally raised to 270 °C at 5 °C/min. A 1-µL aliquot of oil was injected in the split mode. The relative percentage of the oil constituents was expressed as the percentage using peak area normalization. The identification of the oil components was determined by comparison of the mass spectra obtained with those of the reference compounds stored in the Wiley 7N.1 library.

2.4 Products with a mixture of volatile oils

The volatile oils from the nine species sampled were obtained via stream distillation in the laboratory and the oil of a species was used in mixtures for soap, liquid soap and foot deodorant spray. Medicinal properties were tested by 60 volunteers.

3. Results

The oil quantity of the nine *Piper* species, including eight wild and one cultivated, was determined by stream distillation (Table 2).

The cultivated plant *P. betle* produced oil in the highest amount (2.73 mL/kg) compared with the wild species. However, there was a difference between the commercial individual/cultivars *P. betle* 1* and *P. betle* 2**. These cultivars were purchased from a market, and *P. betle* 1* which is commercially cultivated individuals gave high oil amounts ranging from 0.79 to 2.73 mL/kg. For these plants, the two individuals collected on 9/7/2013 had low oil amounts in the range of 0.79 -0.84. For *P. betle* 2**, growth under natural conditions for one plant produced a low amount of oil 0.95 mL/kg.

For the eight wild species, low oil amounts were obtained, starting with 0.03 mL/kg for *P. crocatum*, which was from the forest of the Garden and Development Department, Queen Sirikit Botanic Garden, to 0.76 mL/kg for *P. tricolor* 1***. Additionally, the eight wild species were divided into two groups.

The first group included three individual species viz. species that were transferred from the forest for growth in houses under natural conditions: *P. tricolor* 1***, which provided oil that was 0.76 mL/kg higher than the native wild individual; *P. tricolor* 2, which grows in forests; the individual species *P. rubroglandulosum* 2#, which grows around office areas under natural conditions, providing an oil content higher to 0.72 mL/kg than the native wild individual; *P. rubroglandulosum* 1, which grows in forests; and *P. yinkiangense*#, which grows around office areas under natural conditions and provides a high oil content (0.62 mL/kg).

The second group comprised individual *P. tricolor* 2 and *P. rubroglandulosum* 1 species, and the other five species with several individuals included *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. semiimersum*, *P. submultinerve* 1, *P. submultinerve* 2, *P. submultinerve* 3, and *P. submultinerve* 4. These plants had oil contents, starting at 0.03 mL/kg for *P. crocatum*, *submultinerve* 3, and *P. submultinerve* 4, to 0.47 mL/kg for *P. rubroglandulosum* 1.

The GC-MS results of each species volatile oil are listed in Table 3, which shows the different aromatic compounds. Total ionic chromatographs (TICs) showing the peak identities of compounds from nine individual *Piper* species are shown in Fig. 2. The summary of the types and content of compounds compared with the rate of essential oil (mL/kg) are shown in Table 4. The compound contents are listed beginning with a 10% increase (13.629%) e.g., L-linalool, which was found in *P. betloides* at the highest amount and 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene, which was found in *P. rubroglandulosum* 2 at 60.089%. By comparing the chemical content and volatile amounts of the group of individual species that produce low volatile amounts, we observed a release of high amounts of important chemicals.

Three products with mixtures of volatile oils of a species studied were shown in Fig. 3. When tested on 60 volunteers, the soaps and liquid soaps showed significant anti-inflammatory activity on the skin e.g., anti-inflammatory and anti-itching activity, and the foot deodorant spray decreased/removed bad smells with $p<0.05$.

4. Discussion and conclusions

Individual plant samples were collected in unequal numbers because of two reasons. The first is oil quantity, as it was required that the plants be of the same species, and the analysis would be better when many individuals of commercially cultivated species were studied e.g., *P. betle* 1. The second reason is that wild species collections are difficult to obtain from distant forests. Thus, the authors attempted to collect as many as possible. Some species are easier e.g., *P. submultinerve*, and some species are harder to obtain, such as *P. maculaphyllum* and *P. yinkiangense*. However, the species with the most numbers showed the best results reaching for the record summary and study in the species with small numbers.

The yields of volatile oils varied according to many factors, such as type of species, cultivated and wild individual species, and growth conditions, including cultivars and optimum growth conditions for leaf production in relation to the season and temperature in

addition to suitable factors such as water, light, fertilizer and pathogenic and insect protection.

The volatile oil quantity of one of the commercially cultivated *P. betle* species and eight wild species showed that *P. betle* 1 grown under the cultivated condition produces a high volatile oil amount ranging from 2.15-2.73 mL/kg, and with the exception of a *P. betle* 1 individual purchased on 9/7/2013, it produces low volatile oils amount in the range of 0.79-0.84 mL/kg, which may be due to its growth in the raining season with increased water and other suitable factors; thus, the individual species synthesizes a less volatile oil amount but increases primary substances for growth. In contrast, *P. betle* 2 was grown in the absence of commercially cultivated conditions, under natural conditions without factors such as fertilizer and water; thus, the individual produced a less volatile oil amount.

The volatile oil amount may depend on species cultivars, optimum growing conditions, season, and temperature with fertilizer and water supplementation. Although *P. betle* can be grown in a wide temperature range, there is actually a different degree of rain and dry seasons, but the effects on volatile oil production in the case of plants depend on secondary metabolite synthesis, which is induced by insect and pathogen attacks. For example, *P. betle* 1 was collected during the dry season, which has an average temperature of 37-40 °C, on 5/8/2013, and the volatile amount collected increased to 2.15-2.73 mL/kg. This result means that there is a small amount of water in leaves including those with optimum growing conditions under commercially cultivated conditions. During the same dry season, with the exception of the *P. betle* 1 collected on 29/11/2012, the lower temperature averaged 25-30 °C under optimum commercially cultivated conditions, producing volatile oil at 1.84 mL/kg. The *P. betle* individual collected on 9/7/2013 provided a low volatile oil amount (0.79-0.84 mL/kg), and it was taken from a different cultivated source farm, which had suboptimal growth conditions.

P. betle 2 grows under natural conditions, and it produces a lower volatile oil amount than *P. betle* 1 compared with the eight wild species because their growth depends on natural conditions. Presumably, volatile oil synthesis in wild species should also depend on human management. Additionally, the eight wild species have more advantages than cultivated the *P. betle* species such as growing well, strength, abundant branching, and disease and insect resistance. Accordingly, the three wild individuals species, including *P. rubroglandulosum* 2#, grow around office areas under natural conditions and release a higher volatile amount (0.72 mL/kg) than the collected wild individual *P. rubroglandulosum* 1, which releases a volatile amount of only 0.47 mL/kg. Similarly, *P. tricolor* 1***, which was collected from a

227 forest and grown in a house area under natural conditions, produces a volatile oil amount of
228 0.76 mL/kg, which is greater than that of the collected wild individual *P. tricolor* 2, which
229 produced only 0.03 mL/kg volatile oil. Another species, *P. yinkiangense* #, which was grown
230 in an office area under natural conditions, produced a volatile oil amount of 0.62 mL/kg.
231 Chaveerach et al. [16] reported that wild *Piper* can grow in a wide range of conditions,
232 including tropical rainforests and dry evergreen forests, where there is less light due to trees
233 and moisture. Thus, the author suggested that when the wild *Piper* species is moved for
234 growth in sunlight, it has the ability to synthesize oil similar to the three species *P.*
235 *rubroglandulosum* 2#, *P. tricolor* 1*** and *P. yinkiangense* #. The reason for this
236 phenomenon is pathogens and insects.

237 Although wild individual species produce a smaller volatile oil amount than individual
238 cultivated species, the results from GC-MS show several highly important chemical
239 components (Table 3). Starting with 10% quantitation, *P. betle* 2 produces a volatile oil
240 amount of 0.95 mL/kg, but eugenol synthesis is increased to 53.559%, while *P. betle* 1
241 produces a volatile oil amount of 2.15-2.73 mL/kg but synthesizes eugenol/isoeugenol at only
242 29.739% (7.847). This result is similar to *P. rubroglandulosum* 1, 2, which produces a
243 volatile oil amount of 0.47-0.72 mL/kg but it produces a yields an allyl-1, 2-
244 diacetoxybenzene amount of 60.089% (Table 4). In summary, cultivated and wild species can
245 be used for processes depending on chemical requirement and volatile oil quantity for
246 sufficient wild individual species support. Thus, our research revealed that the eight wild
247 species can serve the same purpose as *P. betle* for various human purposes including those
248 for household products and industry e.g., drug development, the food industry, and the aroma
249 industry. The results of this study are invaluable as it demonstrated more of an advantage in
250 the choice of using more *P. betle* species; additionally, volatile oils from *P. betle* species are
251 very expensive.

252 As shown in Table 4, substances found in a satisfactory amount for each species include
253 the following: eugenol/Isoeugenol and 4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene in the commercially
254 cultivated *P. betle*, L-linalool, β-terpineol, α-terpineol and butylated hydroxytoluene in *P.*
255 *crocatum*, L-linalool, α-terpineol, β-selinene and butylated hydroxytoluene in *P. betloides*, 4-
256 terpineol, eugenol/isoeugenol, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene and bicyclogermacrene in *P.*
257 *tricolor*, β-elemene, trans-caryophyllene, β-selinene, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene and
258 germacrene D in *P. submultinerve*, trans-caryophyllene, germacrene D and butylated
259 hydroxytoluene in *P. maculaphyllum*, α-caryophyllene, 4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene and α-

selinene in *P. yinkiangense*, and 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene in *P. rubrograndulosum* and butylated hydroxytoluene in *P. semiimersum*.

Industries require certain chemicals in volatile oils and use them in different quantities. Moreover, plants can serve as sources for homemade products produced in the laboratory. The products have several activities including those that inhibit inflammation, acne, itching, and bacteria. For example, some oils have activity against *Staphylococcus aureus*, which causes skin disease [18]. Others have antiseptic activities for skin for conditions caused by *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [19], whereas others have antifungal, antitumor, hypotensive, and respiratory depressant effects [20]. The important compounds related to these treatments include hydroxychavicol, hydroxychavicol acetate, allpyro-catechol, chavibetol, piperbetol, methylpiperbetol, and piperols A and B [21]. Additionally, there are more chemicals within the hexane crude extracts of the nine betel-like scented species, including sabinene, β-phellandrene, 4-allyloxy-6-methoxy-N, N-dimethy-1,3,5-germacrene-D, and β-cubebene. These are not found in *P. betle* but in other species [5] and have activity against many bacteria and fungi species [22,23].

Thus, the substances contained in the volatile oils from these nine sample species, as well as their bioactivities, are important to determine their benefits when used in soap, liquid soap and foot deodorant. However, we have concentrated only on the quantity mixture for efficiency.

Acknowledgments

The authors are thankful for the financial support provided by the Thailand Research Fund and Khon Kaen University through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0027/2553) to Arisa Sanubol and Arunrat Chaveerach and the Research Career Development Grant (Grant No. RSA5580054). This research was also supported by the Genetics and Environmental Toxicology (GET) Research Group, Khon Kaen University.

References

[1] J. Bensouilah, P. Buck, Essential oil sciences in contex: aromadermatology, aromatherapy in the treatment and care of common skin conditions, Radcliffe Publishing Ltd., Oxford, 2006.

[2] S. Gomez-Galera, A.M. Pelacho, A. Gene, T. Capell, P. Christou, The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants, Aust. J. Crop. Sci. 26 (2007) 1689-1715.

[3] O. Koul, S. Walia, G.S. Dhaliwal, Essential oils as green pesticides: potential and constraints, Biopestic. Int. 4(1) (2008) 63-84.

[4] D.R. Gang, J. Wang, N. Dudareva, K.H. Nam, J.E. Simon, An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in Sweet Basil, Plant. Physiol. 125 (2001) 539-555.

[5] A. Sanubol, A. Chaveerach, R. Sudmoon, T. Tanee, K. Noikotr, C. Chuachan, Betel-like-scented *Piper* plants as diverse sources of industrial and medicinal aromatic chemicals, Chiang Mai J. Sci., 41(5) (2014): In press

[6] S.S. Nigam, R.M. Purohit, Chemical examination of the essential oil of the leaves of *Piper betle*, Reichstoffe Aromen. 12 (1962) 185-190.

[7] C. Ghelardini, N. Galeotti, C.M.L. Di, G. Mazzanti, A. Bartolini, Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene, Farmaco. 56 (2001) 387-389.

[8] A.T. Shulgin, T. Sargent, C. Naranjo, The chemistry and psychopharmacologyof nutmeg and of several related phenylisopropylamines. Psychopharmacol Bull. 4(3) (1967) 13.

[9] D.J. Boland, J.J, Brophy, A.P.N. House, Eucalyptus Leaf Oils, Use, Chemistry, Distillation and Marketing, Inkata Press, Melbourne, 1991.

[10] W. Feger , H. Brandauer, H. Ziegler, Germacrenes in Citruspeel oils. J. Essent. Oil. Res. 13 (2001) 274-277.

[11] K. Noge, J.X. Becerra, Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraceae). Molecules. 14 (2009) 5289-5297.

[12] L. Jirovetz, G. Buchbauer, M.B. Ngassoum, M. Geissler, Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction gas chromatography, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry, J. Chromatogr A. 976 (2002) 265-275.

[13] L. Liu, G. Song, Y. Hu, GC-MS analysis of the essential oils of *Piper nigrum* L. and *Piper longum* L, Chromatographia. 66(9-10) (2007) 785-790.

[14] T. Francois, J.D.P. Michel, S.M. Lambert, F. Ndifor, W.N.A. Vyry, A.Z.P. Henri, M. Chantal, Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of *Piper capense* L. and *Piper umbellatum* L. grown in Cameroon, Afr. J. Biotechno. 8(3) (2009) 424-431.

[15] A.B. Caburian, M.O. Osi,. Characterization and evaluation of antimicrobial activity of essential oil from the leaves of *Piper betle* L, E-Int. Scientific Res. J. 2(1) (2010) 2-13.

[16] A. Chaveerach, R. Sudmoon, T. Tanee, P. Mokkamul, The species diversity of the genus *Piper* from Thailand, APG. 59 (2008) 105-163.

[17] A. Chaveerach, R. Sudmoon, T. Tanee, P. Mokkamul. The genus *Piper* in Thailand, Khon Kaen Kanpim Printing, Khon Kaen, 2009.

[18] U. Sukatta, U. Dilokkunanant, N. Charoenkul, P. Rugthaworn, S. Siriwan, Antimicrobial activity of betel crude extract and betel oil on some microbes causing skin disease, Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Science, Nat. Resour. Environ. Econ. (2004) 99-303.

[19] A. Chaveerach P. Mokkamul, R. Sudmoon ,T. Tanee, Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand. Ethnobotany Res. Appl. 4 (2006) 223–231.

[20] A. Manigauha, S., Patel, J. Monga, H. Ali, Evaluation of anticonvulsant activity of *Pongamia pinnata* Linn in experimental animals, Int. J. PharmTech. Res. 2(4) (2009) 1119-1121.

[21] N. Kumar, P. Misra, A. Dube, S. Bhattacharya, M. Dikshit, S. Rabnade, *Piper betle* Linn. a maligned Pan-Asiatic plant with an array of pharmacological activities and prospects for drug discovery. Curr. Sci. 99(7) (2010)

[22] L. Arambewela, K.G.A. Kumaratunga, K. Dias, Studies on *Piper betle* of Sri Lanka. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka. 33(2) (2005) 133-139.

[23] P. Charoenwattana, Antifungal efficiency of *Piper betle* L. on *Aspergillus flavus*. Agric. Sci. J. 38 (2007) 50–53.

Table legends

Table 1 The nine investigated samples of *Piper* species with leaves collections and growing areas which are collected sites.

Foot note

* Purchased from a market, indicating that it grows in cultivated conditions

** Grows under natural conditions

*** Transferred from forest to grow in house area under natural conditions

Grows around office areas under natural conditions

Table 2 The amount of essential oils from the leaves of the examined *Piper* species

Table 3 Preliminary phytochemicals identified in essential oil from the leaves of the examined *Piper* species

Table 4 The summary of substances, both in type and quantity, compared to the amounts of volatile oils

Figure legends

Fig. 1. The nine *Piper* species investigated: A. *Piper betle* 1; B. *P. betle* 2; C. *P. betloides*; D. *P. crocatum*; E. *P. maculaphyllum*; F. *P. rubroglandulosum* 1; G. *P. rubroglandulosum* 2; H. *P. semiimmersum*; I. *P. submultinerve* 1; J. *P. submultinerve* 2; K. *P. submultinerve* 3; L. *P. submultinerve* 4; M. *P. tricolor* 1; N. *P. tricolor* 2; O-P. *P. yinkiangense*

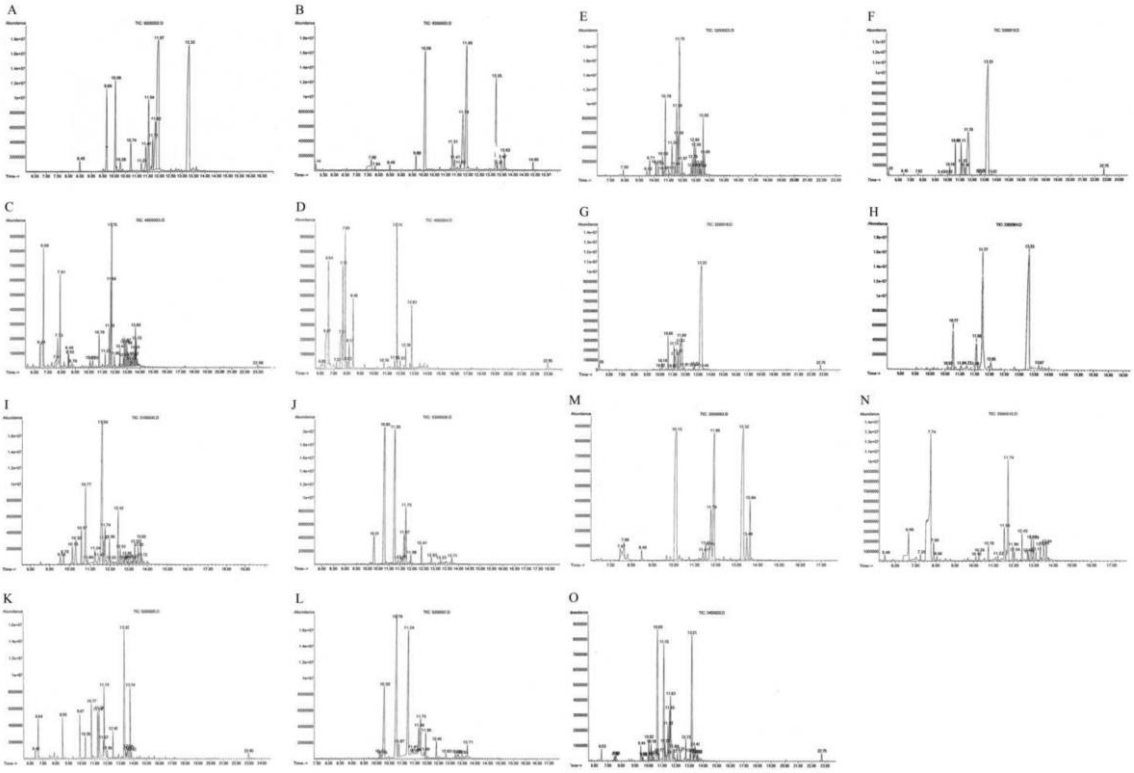
Fig. 2. GC-MS chromatograms of volatile oils of the nine *Piper* species here are *P. betle* 1-2 (A-B); *P. betloides* (C); *P. crocatum* (D); *P. maculaphyllum* (E); *P. rubroglandulosum* 1 (F).

Fig. 2 cont. GC-MS chromatograms of volatile oils of the nine *Piper* species: shown here are the chromatograms for *P. rubroglandulosum* 2 (G); *P. semiimmersum* (H); *P. submultinerve* 1-4 (I-L).

Fig. 2 cont. GC-MS chromatograms of volatile oils of the nine *Piper* species: shown here are the chromatograms for *P. tricolor* (M-N); *P. yinkiangense* (O)

Fig. 3. The three products with the mixture of volatile oils, namely, soap (A), liquid soap (B) and foot deodorant spray (C)

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P


A
B
E
F
C
D
G
H
I
J
M
N
K
L
O

A

สบู่สมุนไพร
น้ำมันหอมพลู
ขจัดสิวและผดผื่น 150.-
เหมาะสำหรับผิวธรรมดา-ผิวมัน

B

เจลอาบน้ำสมุนไพร

C

สเปรย์สมุนไพร

Table 1 The nine investigated samples of *Piper* species with leaves collections and growing areas which are collected sites.

Plants	Collected sites
Piper betle 1*	Muang Khon Kaen District, Khon Kaen Province in northeastern Thailand
P. betle 2**	Muang Khon Kaen District, Khon Kaen Province in northeastern Thailand
P. betloides	Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai Province in northern Thailand
P. crocatum	Garden and Development Department, Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai Province in northern Thailand
P. maculaphyllum	Punyaban Waterfall, Lum Nam Kraburi National Park, Ranong Province in southern Thailand
P. rubroglandulosum 1	Khao Phanom Bencha National Park, Krabi Province in southern Thailand
P. rubroglandulosum 2#	Khao Phanom Bencha National Park, Krabi Province in southern Thailand
P. semiimmersum	Sri Pungnga National Park, Pungnga Province in southern Thailand
P. submultinerve 1	Garden and Development Department, Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai Province in northern Thailand
P. submultinerve 2	Beside 105 road, Mae Salid Sub-District, Ban Tak District, Tak Province in northern Thailand
P. submultinerve 3	Garden and Development Department, Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai Province in northern Thailand
P. submultinerve 4	Beside 105 road, Mae Salid Sub-District, Ban Tak District, Tak Province in northern Thailand
P. tricolor 1***	Muang Khon Kaen District, Khon Kaen Province in northeastern Thailand
P. tricolor 2	Garden and Development Department, Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai Province in northern Thailand
P. yinkiangense #	Khao Sok National Park, Surat Thani Province in southern Thailand

* Purchased from a market, indicating that it grows in cultivated conditions

** Grows under natural conditions

*** Transferred from forest to grow in house area under natural conditions

Grows around office areas under natural conditions

7 **Table 2** The amount of essential oils from the leaves of the examined *Piper* species

***Piper* species**	**Date**	**Weight/kg**	**Essential oil value (mL)**	**Essential oil ratio (mL/kg)**
Piper betle 1*	29/11/2012	1.00	1.840	1.84
	9/7/2013	0.92	0.770	0.84
	9/7/2013	1.00	0.790	0.79
	26/7/2013	0.94	1.050	1.12
	5/8/2013	1.00	2.150	2.15
	5/8/2013	1.00	2.730	2.73
P. betle 2**	29/11/2012	1.00	0.950	0.95
P. betloides	4/2/57	0.82	0.078	0.10
P. crocatum	5/2/2014	0.66	0.020	0.03
P. maculaphyllum	5/8/2013	0.50	0.025	0.05
P. rubroglandulosum 1	1/4/2014	0.47	0.220	0.47
P. rubroglandulosum 2#	1/4/2014	0.33	0.240	0.72
P. semiimersum	5/8/2013	0.60	0.080	0.13
P. submultinerve 1	7/2/2014	1.00	0.115	0.12
P. submultinerve 2	7/2/2014	0.76	0.302	0.40
P. submultinerve 3	7/2/2014	0.36	0.010	0.03
P. submultinerve 4	7/2/2014	0.94	0.032	0.03
P. tricolor 1***	12/11/2013	0.78	0.590	0.76
P. tricolor 2	4/2/2014	0.98	0.030	0.03
P. yinkiangense#	1/4/2014	0.65	0.40	0.62

Table 3 Preliminary phytochemicals identified in essential oil from the leaves of the examined *Piper* species

				Relative content														
Compound	**Retention time**	**Formula**	**Molecular weight**	*Piper betle* 1	*P. betle* 2	*P. betloides*	*P. crocatum*	*P. maculaphyllum*	*P. rubroglandulosum* 1	*P. rubroglandulosum* 2	*P. semiimmersum*	*P. submultinerve* 1	*P. submultinerve* 2	*P. submultinerve* 3	*P. submultinerve* 4	*P. tricolor* 1	*P. tricolor* 2	*P. yinkiangense*
Eucalyptol	5.143	$C_{10}H_{18}O$	154	-	0.654	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-β-Ocimene	5.195-5.477	$C_{10}H_{16}$	136	-	-	-	-	-	0.597	0.750	-	-	-	-	-	-	0.688	-
δ-3-Carene																		
α-Ocimene																		
cis-Ocimene																		
cis-β-Ocimene																		
γ-Terpinene																		
Tricyclene																		
α-Pinene																		
trans-Sabinene hydrate	6.072	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	-	0.717	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Terpineol	7.243-7.710	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	-	25.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.701	-
L-Linalool	6.406-6.683	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	13.629	26.590	-	0.160	-	-	-	-	5.434	-	-	7.112	1.594
α-Terpineol	7.462-7.912	$C_{10}H_{18}O$	154	-	0.494	10.111	14.218	0.636	-	-	-	-	-	-	-	2.276	2.243	-
Linalyl propionate		$C_{13}H_{22}O_2$	210															
Borneol	7.479	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.240
4-Terpineol	7.554-7.733	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	4.705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46.560	0.381
n-Decanal	7.612	$C_{10}H_{20}O$	156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.208
2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-	7.658	$C_{10}H_{18}O$	154	-	3.762	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-Piperitol	8.056	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.508	-
Geraniol	8.166-8.950	$C_{10}H_{18}O$	154	-	-	1.204	7.777	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chavicol	8.489-8.546	$C_9H_{10}O$	134	0.716	0.617	1.110	-	-	-	-	-	-	-	4.035	-	0.729	-	-
δ-Elemene	9.429-9.539	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	0.149	-	-	1.135	-	-	-	-	-	1.337
α-Terpinene																		
δ-2-Carene																		
δ-4-Carene																		
Chavicol acetate	9.550-9.677	$C_{11}H_{12}O_2$	176	6.843	1.637	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.293
α-Cubebene	9.596-9.706	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	1.755	-	-	-	1.379	-	-	-	-	-	0.295
Cadina-1,4-diene																		
Eugenol	9.873-11.950	$C_{10}H_{12}O_2$	164	7.847	53.559	-	-	-	-	-	-	-	-	4.797	2.730	49.942	-	-
Chavibetol																		
3-Allylguaiacol																		
Isoeugenol																		
2-Methoxy-6-(2-pro penyl)phenol																		
Isochavibetol																		
2-methoxy-5-[(E)-prop-1-enyl]phenol																		
Phenol,2-methoxy-3-(2-propen-1-yl)2-Methoxy-6-(2-pro penyl)phenol																		
3-Allyl-6-methoxy phenyl acetate																		
Cyclosativene	9.960	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.367
α-Copaene	10.017-13.548	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	8.522	0.136	0.213	-	2.135	-	-	0.704	-	0.651	1.648
Geranyl acetate	10.093	$C_{12}H_{20}O_2$	196	-	-	0.910	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Elemene	10.179-11.477	$C_{15}H_{24}$	204	1.118	-	1.012	-	1.820	1.269	1.110	-	5.195	6.424	3.337	14.384	-	1.234	2.030
8-Isopropenyl-1, 5-dimethyl-1, 5-cyclo decadiene																		
O-Methyl eugenol	10.289	$C_{11}H_{14}O_2$	178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.397
α-Grujunene	10.571-11.685	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	9.439	-	-	-	4.097	-	-	-	-	-	-
trans-Caryophyllene	10.646-10.802	$C_{15}H_{24}$	204	2.473	-	3.617	0.651	11.505	4.083	4.870	9.318	11.656	39.422	7.175	26.283	-	1.831	21.142
trans-β-Caryophyllene																		
γ-caryophyllene																		
Bicyclo[5.2.0]nonane,																		

4-ethenyl-4,8,8-tri methyl-2-methylene-																		
Germacrene D	10.871-11.887	$C_{15}H_{24}$	204	6.714	-	5.312	0.869	12.528	1.115	2.168	7.362	36.317	1.145	-	3.953	1.174	4.769	8.592
β-Cubebene																		
(-)-Sinularene																		
trans-β-Farnesene	10.917	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	0.208	-	-	-	-	-	-	-	-
Aromadendrene	11.010	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	0.842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Caryophyllene	11.114-11.240	$C_{15}H_{24}$	204	0.775	-	1.679	-	4.987	4.282	3.062	-	2.849	-	6.490	25.063	-	0.760	16.136
cis, cis, cis-1,1,4,8-Tetra methyl-4,7,10-cycloun decatriene																		
Calarene	11.287	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.838
Valencene																		
γ-Cadinene	11.408-11.422	$C_{15}H_{24}$	204	2.652	1.633	-	-	1.858	-	-	-	-	-	-	5.822	0.761	-	-
α-Morphine																		
α-Cadinene																		
α-Amorphene																		
4,5-Dimethyl-11-Methylenetricyclo[7.2.1.0 (4.9)]dodecane																		
α-Selinene	11.414-11.627	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.180	-	-	-	0.820	10.749
β-Selinene	11.269-11.673	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	10.319	-	-	-	-	-	-	36.62	2.429	7.540	-	-	-
(+)-Ledene	11.677	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	3.281	-	-	-	-	-	-
Butylated hydroxytoluene	11.713-11.765	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	23.912	13.521	27.542	-	-	29.474	-	9.743	7.849	7.060	1.169	-	-
Bicyclogermacrene	11.714-11.737	$C_{15}H_{24}$	204	2.748	-	-	-	-	-	-	-	5.742	-	-	-	-	14.482	-
1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene		$C_{10}H_{16}$	136															
δ-Cadinene	11.840-13.323	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	1.078	-	1.043	-	-	-	3.456	1.145	0.975	-	-	-	1.133
δ-Amorphene	11.956	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.918	-
Isoeugenol acetate	11.973	$C_{12}H_{14}O_3$	206	29.739	-	-	-	1.833	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol acetate																		
Calamenene	12.031	$C_{15}H_{22}$	202	-	-	-	-	-	-	-	-	0.608	-	-	-	-	-	-
α-Ionene		$C_{13}H_{18}$	174															
(-)-α-Panasinsen	12.037	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.114	-
trans-γ-Bisabolene	12.048	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	1.911	-	-	-	-	-	-	-
Elemicin	12.112	$C_{12}H_{16}O_3$	208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.477
Isoelemicine																		
cis-Asarone																		
Nerolidol	12.308-12.417	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	1.368	-	-	-	-	-	5.462	2.105	2.591	1.694	-	2.488	0.651
Farnesol																		
Hedycaryol	12.348	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elemol																		
Sesquisabinene hydrate	12.377	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	-	1.797	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacrene B	12.533	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	1.803	-	-	-	-	-	-
γ-Elemene																		
Spathulenol	12.637	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	-	-	-	0.248	0.409	-	-	-	-	-	-	-	-
Caryophyllene oxide	12.723-12.844	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	-	-	-	0.272	0.540	-	-	1.038	-	0.924	-	-	1.804
β-Spathulenol	12.746-13.386	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	1.756	-	2.487	-	-	-	0.708	-	-	-	-	0.699	-
β-Bisabolene	12.827	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	5.077	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Globulol	12.837-12.879	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	2.286	-	3.717	-	-	-	2.154	-	-	-	-	2.204	-
Viridiflorol	12.971-13.825	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	1.655	-	2.786	-	-	-	0.576	-	1.081	-	-	2.144	-
Ledol		$C_{15}H_{26}O$	222															
(-)-Allospathulenol	13.127	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	13.213-13.329	$C_{13}H_{14}O_4$	234	30.163	13.559	-	-	1.036	60.018	60.089	51.935	0.930	-	31.115	-	30.066	-	21.262
Isospathulenol	13.381	$C_{15}H_{24}O$	220	-	-	1.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Cadinol	13.401-13.669	$C_{15}H_{26}O$	222	-	1.657	5.431	-	1.836	-	-	-	5.697	-	2.675	-	6.712	2.105	3.028
Copaene	13.438	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	0.212	-	-	-	-	-	-	-	-
Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	13.473	$C_{15}H_{24}$	204	-	2.149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+)-δ-Cadinene		$C_{15}H_{24}$	204															
5-epi-neointermedeol	13.611-13.744	$C_{15}H_{26}O$	222	-	-	1.997	-	-	-	-	-	-	-	9.176	-	-	-	0.461
(+)-Epi-bicyclo sesquiphellandrene	13.704-13.71	$C_{15}H_{24}$	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.696	-	1.633	-	-	-
Benzoic acid, phenylmethyl ester	14.904	$C_{14}H_{12}O_2$	212	-	0.855	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oleamide	22.740-22.970	$C_{18}H_{35}NO$	281	-	-	0.905	1.815	-	1.079	0.801	-	-	-	1.491	-	-	-	0.899
Unknown				8.212	19.425	5.000	1.943	3.829	26.593	25.568	-	4.821	0.482	9.351	2.211	7.171	4.969	3.039
Total				100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Table 4 The summary of substances, both in type and quantity, compared to the amounts of volatile oils

Compounds	Contents (%)	Species	Amount of essential oil (mL/kg)
L-Linalool	26.590	*P. crocatum*	0.03
L-Linalool	13.629	*P. betloides*	0.10
β-Terpineol	25.025	*P. crocatum*	0.03
4-Terpineol	46.560	*P. tricolor* 2	0.03
α-Terpineol	10.111	*P. betloides*	0.10
α-Terpineol	14.218	*P. crocatum*	0.03
Eugenol/Isoeugenol	49.942	*P. tricolor* 1	0.76
Eugenol/Isoeugenol	53.559	*P. betle* 2	0.95
β-Elemene	14.384	*P. submultinerve* 4	0.03
trans-Caryophyllene	21.142	*P. yinkiangense*	0.62
trans-Caryophyllene	11.656	*P. submultinerve* 1	0.12
trans-Caryophyllene	11.505	*P. maculaphyllum*	0.05
trans-Caryophyllene	26.283	*P. submultinerve* 4	0.03
Caryophyllene	39.422	*P. submultinerve* 2	0.40
α-Caryophyllene	16.136	*P. yinkiangense*	0.62
α-Caryophyllene	25.063	*P. submultinerve* 4	0.03
β-Selinene	10.319	*P. betloides*	0.10
β-Selinene	36.62	*P. submultinerve* 2	0.40
Germacrene D	12.528	*P. maculaphyllum*	0.05
Germacrene D	36.317	*P. submultinerve* 1	0.12
α-Selinene	10.749	*P. yinkiangense*	0.62
Bicyclogermacrene	14.482	*P. tricolor* 2	0.03

Butylated hydroxytoluene	13.521	*P. crocatum*	0.03
Butylated hydroxytoluene	23.912	*P. betloides*	0.10
Butylated hydroxytoluene	27.542	*P. maculaphyllum*	0.05
Butylated hydroxytoluene	29.474	*P. semiimersum*	0.13
Eugenol acetate/Isoeugenol acetate	29.739	*P. betle* 1	2.15-2.73
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	21.262	*P. yinkiangense*	0.62
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	13.559	*P. betle* 2	0.95
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	31.115	*P. submultinerve* 3	0.03
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	30.163	*P. betle* 1	2.15-2.73
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	30.066	*P. tricolor* 1	0.76
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	60.018	*P. rubroglandulosum* 1	0.47
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	60.089	*P. rubroglandulosum* 2	0.72
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	51.935	*P. semiimersum*	0.13

Article 5: Submitted

Chaveerach, A., Sanubol, A., Tanee, T., and Liehr, T. and Sudmoon, R.* Efficient DNA barcode regions for classifying *Piper* species (Piperaceae). Submitted to Journal of Systematics and Evolution. (ISI impact factor 1.488).

Efficient DNA barcode regions for classifying *Piper* species (Piperaceae)

Arunrat Chaveerach[1,2], Arisa Sanubol[1], Pansa Monkheang[1], Neeranuch Yimpongsawat[1], Tawatchai Tanee[2,3] and Runglawan Sudmoon[1,2*]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

[2]Genetics and Environmental Toxicology (GET) Research Group, Khon Kaen University, Thailand

[3]Faculty of Environment and Resource Studies, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

*Corresponding author: rsudmoon@yahoo.com

For Review Only

Abstract

As of the *Piper* species are used for spices, in traditional and processed forms of medicines, in cosmetic compounds, in cultural activities and insecticides, barcode construction using *mat*K, *rbc*L and *psb*A-*trn*H spacer regions have been done for serving plant parts, young plants and modified forms identification. Thirty-seven *Piper* species were collected, the three barcode regions were amplified, sequenced, aligned for genetic distance receiving. At intraspecific levels, the genetic distances are most effective for a *Piper* species identification starting from same sequence or no difference in each species to very low distance values. Only one economic and planted species, *P. betle* posted the highest values at 0.386 of *mat*K region, this may be caused from it is an economic and planted species, so is supported growth factors from human affected on its genetic distance. The genetic distances at interspecific level are also most effective for different species identification by *mat*K region ranged from 0.002 between 27 pair species to the highest of 0.486 excepted for eight pair species as *P. kraense* and *P. dominantinervium*, *P. magnibaccum* and *P. kraense*, *P. phuwuaense* and *P. dominantinervium*, *P. phuwuaense* and *P. kraense*, *P. pilobracteatum* and *P. dominantinervium*, *P. pilobracteatum* and *P. kraense*, *P. pilobracteatum* and *P. phuwuaense*, and *P. sylvestre* and *P. polysyphonum* posted genetic distance at 0.000 which were identified by each of the other two regions without of combination.

Keywords: barcode, *Piper* species, *mat*K gene, *rbc*L gene, *psb*A-*trn*H spacer.

Introduction

Plants in the genus *Piper* have been used since prehistoric times for a variety of human activities. They are used as spices, in traditional and processed forms of medicines, in cosmetic compounds, in cultural activities and as insecticides (Chaveerach *et al*., 2006; Scott *et al*., 2008; Fan *et al*., 2011). *Piper betle*, the betel plant, is one of the most important and well-known species of the genus. It contains important chemical substances, such as chavicol, cineol and eugenol, used in essential oils, medicines and insecticides (Yusoff *et al*., 2005; Misra *et al*., 2009). Eugenol has been reported as having anti-oxidant and anti-inflammatory properties (Misra *et al*., 2009). Although the betel plant is of great economic importance, it is challenging to cultivate. The main problem is foot and leaf rot, which caused by the fungus *Phytophthora parasitica* Dast (Silayoi *et al*., 1985; Banka and Teo, 2000). In addition, the plant is subject to leaf spot, caused by bacteria (Banka and Teo, 2000). Investigations of the genus *Piper* in Thailand (Chaveerach *et al*., 2008, 2009) have found that among the 43 *Pip*er species, some produce a betel-like scent. Of these, all are wild species and hardy, producing numerous branches and leaves. They are tolerant and resistant to disease. Some produce a stronger scent than betel. Therefore, these species might be equally or more economically beneficial than the betel plant. The assured advantage is that there are more choices of plants for the use (Sanubol et al., 2014). Medicinal plants have been used in natural and modified forms. The modified forms such as dried sliced plant part, powder and capsules, are hard to be recognized by physical features. Therefore, the reliable identification methods for these plant forms should be provided. DNA barcoding is the most reliable and applicable method for this aspect. It is developed since 2003 (Hebert et al., 2003). It principal uses short DNA sequences from appropriate genome regions for identification of organisms. The regions such as COI, and 16s rDNA regions have been successfully used for most animals for examples, Hebert et al. (2004) used the mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I (MT-CO1) to discriminate between bird species. Zhang and Hanner (2012) used sequences of MT-CO1, 16S RNA, MT-CYB, and RNA 18S in 242 species of fish in 11 *Epinephelus* species.
For plants, however, it is more challenge. Currently, several researchers groups had seeking for suitable regions. There are researches suggested some successful regions for some plant groups, such as *mat*K gene (Siripiyasing et al., 2012; Tanee et al., 2012), *rbc*L gene (Tanee et al., 2012; Kwanda et al., 2013), *psb*A-*trn*H spacer region (Chaveerach et al., 2011).

Up to date the standard barcode of choice for most investigated plants are three plastid including *mat*K, *rbc*L genes, and *psb*A-*trn*H spacer, and one nuclear (ITS) regions proved by many researches of CBOL Plant Working Group, 2009; Chaveerach et al., 2011;

For Review Only

Hollingsworth et al., 2011; Monkheang et al., 2011. With the important of *Piper* species usages mentioned becoming economic plants worldwide using parts of plant from trunk, leaves, fruits or young plants, modified forms such as powder, slices etc. of many species. Therefore, these usage forms should have specific marker to prove a species for put the right plant for the right aims that is barcode construction for each species.

The research aims to barcode construction for *Piper* species in Thailand using *mat*K, *rbc*L and *psb*A-*trn*H spacer region as if they are important medicinal plants, have been fully explored and identified (Chaveerach et al., 2008); therefore their references barcode should be available for serving plant parts, young plants and modified forms.

Materials and Methods

1. Plant materials

Species of *Piper* recently reported in Thailand (Chaveerach et al., 2006, 2007, 2008; Sudmoon et al., 2011) have been collected and identified. Leaf samples were kept on ice and transferred to the laboratory then stored at -20°C.

2. DNA extraction

Whole genomic DNA was extracted by using Plant Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience) following the kit protocols.

3. Amplification of barcode fragments

Polymerase chain reactions were performed with primer pairs (5'-3') ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC and GTTCTAGCACAAGAAAGTCG for *mat*K gene, GTCACCACAAACAGAGACTAAAGC and GTAAAATCAAGTCCACCRCG for *rbc*L gene, and TTATGCATGAACGTAATGCTC and CGCGCATGGTGGATTCACAATCC for *psb*A-*trn*H spacer region (http://www.kew.org/barcoding/update.html). The reaction mixture (30 µl) consists of 1×GoTaq Green Master Mix (Promega), 0.5 µM primers, and 30 ng DNA template. The amplification profile includes pre-denaturation at 94°C for 1 min; 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 52°C (for *mat*K) or 55°C (for *rbc*L gene and *psb*A-*trn*H spacer region) for 30 s, and extension at 72°C for 1 min; final extension at 72°C for 5 min. The amplification products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis.

4. DNA sequencing and sequences analyses

The amplified specific fragments were sent for sequencing at the DNA Sequencing Unit, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Bangkok, Thailand. The sequences were then analyzed for accuracy by Blast tools (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). All completed accurate sequences were aligned in each region for determining genetic diversity

For Review Only

values meaning nucleotide variations by MEGA6 (Tamura et al., 2013). The sequences were submitted to the GenBank database and the corresponding accession numbers are taken.

Results

Thirty-seven *Piper* species were collected for barcoding construction. Since to most of them are wild species, so, there were difficult to collect in sufficient sampled individuals to study reaching to different amount individuals of each barcoding region constructions. There are four satisfied individuals species only, *P. nigrum*, *P. betle*, *P. sarmentosum*, and *P. retrofractum* which are economic plants and easy to collect.

The amplification of barcode banding was not successfully amplified in two species including *P. montium* and *P. rubroglandulosum* (♀) with *mat*K region. When all sequences of all species studied with *mat*K, *rbc*L and *psb*A-*trn*H spacer were submitted to GenBank, the corresponding accession numbers, 119 sequence accessions were provided in the Table 1.

From three barcoding regions, *mat*K, *rbc*L and *psb*A-*trn*H spacer, genetic distances in intraspecific levels of each region are following: the lowest value, 0.000 in *P. dominantinervium*, *P. hongkongense*, *P. kraense* and *P. longum* to the highest 0.386 in *P. betle* of the *mat*K region; *P. dominantinervium*, *P. hongkongense*, *P. longum*, *P. pedicellatum*, *P. pilobracteatum*, *P. polysyphonum*, *P. sarmentosum*, *P. sylvestre* and *P. wallichii* to the highest value 0.166 in *P. betle* of the *rbc*L region; 0.000 in *P. dominantinervium*, *P. khasianum*, *P. kraense*, *P. longum*, *P. montium*, *P. mutabile*, *P. nigrum*, *P. pilobracteatum*, *P. polysyphonum* and *P. sarmentosum* to the highest value 0.117 in *P. boehmeriifolium* of the *psb*A-*trn*H spacer region.

The genetic distances in interspecific levels of each region are following: the lowest values, 0.000 in the pairs species *P. kraense* and *P. dominantinervium*, *P. magnibaccum* and *P. kraense*, *P. phuwuaense* and *P. dominantinervium* , *P. phuwuaense* and *P. kraense*, *P. pilobracteatum* and *P. dominantinervium*, *P. pilobracteatum* and *P. kraense*, *P. pilobracteatum* and *P. phuwuaense* and *P. sylvestr* and *P. polysyphonum* to the highest value 0.486 between *P. ribesioides* and *P. pilobracteatum* of the *mat*K region; 0.000 in pairs between *P. dominantinervium* and *P. caninum*, *P. kraense* and *P. boehmeriifolium*, *P. maculaphyllum* and *P. khasianum*, *P. magnibaccum* and *P. khasianum*, *P. magnibaccum* and *P. caninum*, *P. magnibaccum* and *P. dominantinervium*, *P. montium* and *P. khasianum*, *P. montium* and *P. magnibaccum*, *P. mutabile* and *P. caninum*, *P. mutabile* and *P. dominantinervium*, *P. mutabile* and *P. magnibaccum*, *P. nigrum* and *P. caninum*, *P. nigrum* and *dominantinervium*, *P. nigrum* and *P. magnibaccum*, *P. nigrum* and *P. mutabile, P.*

For Review Only

pedicellatum and *P. khasianum*, *P. pedicellatum* and *P. magnibaccum*, *P. pedicellatum* and *P. montium*, *P. pedicellatum* and *P. pendulispicum*, *P. pendulispicum* and *P. caninum*, *P. pendulispicum* and *P. dominantinervium*, *P. pendulispicum* and *P. magnibaccum*, *P. pendulispicum* and *P. mutabile*, *P. pendulispicum* and *P. nigrum*, *P. phuwuaense* and *P. caninum*, *P. phuwuaense* and *P. dominantinervium*, *P. phuwuaense* and *P. magnibaccum, P. phuwuaense* and *P. mutabile*, *P. phuwuaense* and *P. nigrum*, *P. phuwuaense* and *P. pedicellatum, P. pilobracteatum* and *P. caninum*, *P. pilobracteatum* and *P. mutabile*, *P. polysyphonum* and *P. khasianum*, *P. polysyphonum* and *P. magnibaccum*, *P. polysyphonum* and *P. montium, P. sarmentosum* and *P. longum*, *P. sylvestre* and *P. khasianum*, *P. sylvestre* and *P. magnibaccum*, *P. sylvestre* and *P. montium*, *P. thomsonii* and *P. nigrum*, *P. pilobracteatum* and *P. phuwuaense*, *P. polysyphonum* and *P. pendulispicum*, *P. polysyphonum* and *P. pedicellatum*, *P. sylvestre* and *P. pendulispicum*, *P. sylvestre* and *P. pedicellatum*, *P. sylvestre* and *P. polysyphonum*, *P. wallichii* and *P. umbellatum*, *P. protrusum* and *P. phuwuaense*, and *P. protrusum* and *P. pilobracteatum* to the highest value 0.213 in the pair *P. betle* and *P. argyritis* of the *rbc*L region; 0.000 in the pairs of *P. montium* and *P. magnibaccum*, *P. pilobracteatum* and *P. caninum*, *P. polysyphonum* and *P. pedicellatum*, *P. ribesioides* and *P. pedicellatum*, *P. sarmentosum* and *P. longum*, *P. sylvestre* and *P. pedicellatum*, *P. wallichii* and *P. khasianum*, *P. wallichii* and *P. pedicellatum*, *P. protrusum* and *P. magnibaccum*, *P. sylvestre* and *P. polysyphonum*, *P. sylvestre* and *P. ribesioides*, *P. wallichii* and *P. polysyphonum*, *P. wallichii* and *ribesioides*, *P. wallichii* and *P. sylvestre*, and *P. yinkiangense* and *P. betle* to the highest value 0.228 between *P. semiimmersum* and *P. umbellatum* of the *trn*H spacer region.

The genetic distance of the *mat*K region in the Table 2 is the representative sample.

For Review Only

Table 1 GenBank accession numbers of DNA barcoding from three regions of *Piper* species.

Scientific name	GenBank accession number		
	*mat*K	*psb*A-*trn*H spacer	*rbc*L
Piper argyritis	KM073990	JX442927, KM055176	JX291978, KM055126
P. betle (♀)	GU372747, KM098143	GQ891996, JQ248053	JQ248074
P. betle (♂)	KM098144	JQ248050	JQ248071
P. betloides	KM098135	JQ248051	JQ248072
P. boehmeriifolium	KM073991, KM073992	KM055177, KM055178	KM055127, KM055128
P. caninum	KM073993, KM073994	KM055179, KM055180	KM055129, KM055130
P. colubrinum	GU372751, KM073995	GQ892000	KM055131
P. crocatum	KM098136	JQ248047	JQ248068
P. dominantinervium	KM073996, KM073997	KM055181, KM055182	KM055132, KM055133
P. hongkongense	KM073998, KM073999	KM055183, KM055184	KM055134, KM055135
P. khasianum	KM074000, KM074001	KM055185, KM055186	KM055136, KM055137
P. kraense	KM074002, KM074003	KM055187, KM055188	KM055138, KM055139
P. longum	KM074004, KM074005	KM055189, KM055190	KM055140, KM055141
P. maculaphyllum	KM074006, KM098137	JQ248046, KM055191	JQ248067, KM055142
P. magnibaccum	KM074007, KM074008	KM055192, KM055193	KM055143, KM055144
P. montium	n/a	KM055194, KM055195	KM055145, KM055146
P. mutabile	KM074035	KM055196, KM055197	KM055147, KM055148
P. nigrum	KM074009, KM074010	GQ891994, KM055198, KM055199	KM055149, KM055150
P. pedicellatum var. *eglandulatum*	KM074011, KM074012	KM055200, KM055201	KM055151, KM055152
P. pendulispicum (♀)	KM074013, GU372748	KM055202, GQ891997	KM055153, JX291979
P. phuwuaense	KM074014, KM074015	KM055203, KM055204	KM055154, KM055155
P. pilobracteatum	KM074016, KM074017, KM074018, KM074019	KM055205, KM055206, KM055207, KM055208	KM055156, KM055157, KM055158, KM055159
P. polysyphonum	KM074020, KM074021	KM055209, KM055210	KM055160, KM055161
P. protrusum	KM074032, KM074033	GU980900, KM055223	KM055172, KM055173
P. retrofractum	GU372749, KM074034	GQ891998, KM055224	KM055175
P. ribesioides	GU372750, KM074022	GQ891999, KM055211	KM055162
P. rubroglandulosum (♀)	n/a	JX442926	JX291977
P. rubroglandulosum (♂)	KM098138	JX442925	JX291976
P. sarmentosum	GU372746, KM074023, KM074024	KM055212, KM055213	KM055163, KM055164
P. semiimmersum	KM098139	JQ248045	JQ248066
P. submultinerve	KM098140	JQ248048	JQ248069
P. sylvaticum	KM074025, KM074026	KM055214, KM055215	KM055174
P. sylvestre	KM074027, KM074028	KM055216, KM055217	KM055165, KM055166
P. thomsonii var. *trichostigma*	KM074029	KM055218	KM055167
P. tricolor	KM098141	JQ248049	JQ248070
P. umbellatum	EU669471*, GQ429067*	KM055219, KM055220	KM055168, KM055169
P. wallichii	KM074030, KM074031	KM055221, KM055222	KM055170, KM055171
P. yinkiangense	KM098142	JQ248052	JQ248073

Note: n/a was not amplified, * is the accessions from other publications

For Review Only

Table 2 Genetic distance values of the *mat*K region efficient for Piper identification by the lowest, but one in 0.002 and the highest values

	P. argyritis	*P. betle*	*P. betle*	*P. betle*	*P. betloides*	*P. boehmeriifolium*	*P. boehmeriifolium*	*P. caninum*	*P. caninum*	*P. colubrinum*	*P. colubrinum*	*P. crocatum*	*P. dominantinervium*	*P. dominantinervium*	*P. hongkongense*	*P. hongkongense*	*P. khasianum*	*P. khasianum*	*P. kraense*	*P. kraense*	*P. longum*	*P. longum*	*P. maculaphyllum*	*P. maculaphyllum*	*P. magnibaccum*	*P. magnibaccum*	*P. nigrum*	*P. nigrum*	*P. pedicellatum*	*P. pedicellatum*	*P. pendulispicum*
P. argyritis	0.000																														
P. betle	0.323	0.000																													
P. betle	0.076	0.362	0.000																												
P. betle	0.126	0.386	0.106	0.000																											
P. betloides	0.249	0.423	0.262	0.260	0.000																										
P. boehmeriifolium	0.004	0.323	0.074	0.124	0.252	0.000																									
P. boehmeriifolium	0.011	0.325	0.074	0.126	0.258	0.009	0.000																								
P. caninum	0.013	0.328	0.080	0.132	0.249	0.009	0.017	0.000																							
P. caninum	0.013	0.328	0.080	0.132	0.249	0.009	0.017	0.000	0.000																						
P. colubrinum	0.020	0.332	0.087	0.134	0.267	0.017	0.022	0.026	0.026	0.000																					
P. colubrinum	0.089	0.375	0.143	0.195	0.310	0.085	0.093	0.093	0.093	0.072	0.000																				
P. crocatum	0.054	0.358	0.106	0.145	0.267	0.052	0.056	0.061	0.061	0.065	0.130	0.000																			
P. dominantinervium	0.004	0.323	0.072	0.121	0.252	0.002	0.007	0.011	0.011	0.015	0.087	0.050	0.000																		
P. dominantinervium	0.004	0.323	0.072	0.121	0.252	0.002	0.007	0.011	0.011	0.015	0.087	0.050	0.000	0.000																	
P. hongkongense	0.013	0.321	0.080	0.130	0.260	0.011	0.011	0.020	0.020	0.024	0.095	0.059	0.009	0.009	0.000																
P. hongkongense	0.013	0.321	0.080	0.130	0.260	0.011	0.011	0.020	0.020	0.024	0.095	0.059	0.009	0.009	0.000	0.000															
P. khasianum	0.007	0.325	0.076	0.126	0.249	0.002	0.011	0.011	0.011	0.020	0.087	0.054	0.004	0.004	0.013	0.013	0.000														
P. khasianum	0.007	0.325	0.074	0.124	0.249	0.004	0.009	0.013	0.013	0.017	0.089	0.052	0.002	0.002	0.011	0.011	0.002	0.000													
P. kraense	0.004	0.323	0.072	0.121	0.252	0.002	0.007	0.011	0.011	0.015	0.087	0.050	0.000	0.000	0.009	0.009	0.004	0.002	0.000												
P. kraense	0.004	0.323	0.072	0.121	0.252	0.002	0.007	0.011	0.011	0.015	0.087	0.050	0.000	0.000	0.009	0.009	0.004	0.002	0.000	0.000											
P. longum	0.013	0.325	0.080	0.130	0.258	0.011	0.015	0.020	0.020	0.024	0.091	0.054	0.009	0.009	0.017	0.017	0.013	0.011	0.009	0.009	0.000										
P. longum	0.013	0.325	0.080	0.130	0.258	0.011	0.015	0.020	0.020	0.024	0.091	0.054	0.009	0.009	0.017	0.017	0.013	0.011	0.009	0.009	0.000	0.000									
P. maculaphyllum	0.065	0.369	0.130	0.171	0.282	0.065	0.072	0.074	0.074	0.080	0.141	0.111	0.065	0.065	0.074	0.074	0.063	0.063	0.065	0.065	0.072	0.072	0.000								
P. maculaphyllum	0.054	0.341	0.072	0.113	0.249	0.052	0.054	0.061	0.061	0.065	0.130	0.085	0.050	0.050	0.059	0.059	0.054	0.052	0.050	0.050	0.054	0.054	0.111	0.000							
P. magnibaccum	0.007	0.325	0.074	0.124	0.249	0.004	0.009	0.013	0.013	0.017	0.089	0.052	0.002	0.002	0.011	0.011	0.002	0.000	0.002	0.002	0.011	0.011	0.063	0.052	0.000						
P. magnibaccum	0.009	0.323	0.076	0.124	0.256	0.007	0.011	0.015	0.015	0.015	0.087	0.054	0.004	0.004	0.013	0.013	0.009	0.007	0.004	0.004	0.013	0.013	0.069	0.054	0.007	0.000					
P. nigrum	0.015	0.334	0.087	0.130	0.262	0.017	0.022	0.026	0.026	0.030	0.102	0.061	0.015	0.015	0.024	0.024	0.020	0.017	0.015	0.015	0.022	0.022	0.072	0.063	0.017	0.020	0.000				
P. nigrum	0.009	0.325	0.080	0.121	0.249	0.011	0.015	0.020	0.020	0.024	0.095	0.059	0.009	0.009	0.017	0.017	0.013	0.011	0.009	0.009	0.017	0.017	0.072	0.054	0.011	0.013	0.020	0.000			
P. pedicellatum	0.011	0.328	0.080	0.126	0.252	0.007	0.015	0.015	0.015	0.024	0.091	0.054	0.009	0.009	0.017	0.017	0.009	0.011	0.009	0.009	0.013	0.013	0.067	0.046	0.011	0.013	0.022	0.013	0.000		
P. pedicellatum	0.011	0.325	0.074	0.124	0.258	0.009	0.004	0.017	0.017	0.022	0.093	0.056	0.007	0.007	0.011	0.011	0.011	0.009	0.007	0.007	0.015	0.015	0.072	0.054	0.009	0.007	0.022	0.015	0.015	0.000	
P. pendulispicum	0.004	0.325	0.076	0.126	0.252	0.007	0.011	0.015	0.015	0.020	0.091	0.050	0.004	0.004	0.013	0.013	0.009	0.007	0.004	0.004	0.009	0.009	0.067	0.050	0.007	0.009	0.013	0.009	0.009	0.011	0.000

For Review Only

Discussion

Even though, the most *Piper* species are wild species, 43 species in Thailand, but they are most popularly used in many functional aspects, for instance, as spices, medicines, and insecticides (Chaveerach et al., 2008; Chaveerach et al., 2006; Scott et al., 2008; Fan et al., 2011). Only four species as *P. betle*, *P. retrofractum*, *P. nigrum* and *P. sarmentosum* are economic and planted species, all of them are also used in several aspects mentioned. The one economic species as betel plant, *P. betle*, is a well-known and important species that contains important chemical substances, including essential oils and substances, such as chavicol, cineol, and eugenol which can be used for medicinal and insecticidal purposes (Chaveerach et al., 2006; Yusoff et al., 2005; Misra et al., 2009). Based on their usages, several forms as traditional in part of plants, and prepared forms as powder, capsule and others, their DNA marker as barcode should be constructed for using right species in the right aims for human well-being for example in industrial of medicinal, cosmetics and house-hold products. With these form usages reaching to unidentified species using morphological characters, DNA barcode have been served and overcome the problems. In the case of flowering plants in Thailand, *trn*H-*psb*A spacer region was suggested to be efficient DNA barcode marker in *Senna* species (Monkheang et al., 2011), *Smilax* and *Cissus* species (Kritpetcharat et al., 2011), additional with other regions as *rbc*L in parasitic plants including *Scurrula*, *Dendrophthoe*, *Helixanthera*, *Macrosolen*, *Viscum* species (Kwanda et al., 2013), *mat*k studied on somes medicinal sakhan, *Piper*, Piperaceae (Sudmoon et al., 2012).

Here for the barcode of thirty-seven *Piper* species with the three regions, the genetic distance values follow the hypothesis of the barcode, in principle by Dr. Paul D.N. Hebert, a population geneticist at the University of Guelph in Ontario (Hebert et al., 2003) that results in significant variance in sequences between species and a comparatively small variance within species. At intraspecific levels, the genetic distances of all three regions are most effective for a *Piper* species identification starting from same sequence or no difference in each species to very low distance values. Only one economic and planted species, *P. betle* posted the highest values at 0.386 of *mat*K region, this may be caused from it is an economic and planted species, so is supported growth factors from human affected on its genetic distance. The genetic distances at interspecific level are also most effective for different species identification by *mat*K region showing by 27 pair species starting from 0.002 to the highest 0.486 as shown in the Table 2 small amount, eight unidentified pair species as showing genetic distance of 0.000 (Table 3). Therefore, the eight pair species can be identified by the other two regions as shown in the Table 2. That is following to the guidance

For Review Only

of Newmaster et al. (2007) proposed to use *mat*K and *trn*H-*psb*A spacer to identify plants in Myristicaceae and Sudmoon et al. (2012) without of regions combination following of Hollingsworth et al. (2009) recommended *rbc*L+*mat*K as the core DNA barcode regions for land plants.

Table 3 Genetic distance values in interspecific level for identification of some *Piper* species based *mat*K, rbcL and trnH-psbA spacer sequences.

Pairs of species	*mat*K region	*rbc*L region	*trn*H-*psb*A spacer region
P. kraense and *P. dominantinervium*	0.000	0.005-0.008	0.111-0.117
P. magnibaccum and *P. kraense*	0.000	0.008	0.1110-0.123
P. phuwuaense and *P. dominantinervium*	0.000	0.000-0.003	0.021-0.026
P. phuwuaense and *P. kraense*	0.000	0.005-0.008	0.021-0.129
P. pilobracteatum and *P. dominantinervium*	0.000	0.003	0.021
P. pilobracteatum and *P. kraense*	0.000	0.003	0.010-0.123
P. pilobracteatum and *P. phuwuaense*	0.000	0.003	0.016-0.021
P. sylvestre and *P. polysyphonum*	0.000	0.000	0.000-0.010

For Review Only

Acknowledgments

The authors are thankful for the financial support provided by the Thailand Research Fund through the Research Career Development Grant (Grant No. RSA5580054).

References

Banka, R.A., Teo, S.P. 2000. *Piper betle*. In: van der Vossen HAM, Wessel M (eds) PROSEA 16 stimulant plants. Backhuys, Leiden, pp 135-140.

CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America [Proc. Natl. Acad. Sci. USA] 106(31): 12794–12797. doi: 10.1073/pnas.0905845106.

Chaveerach, A., Mokkamul, P., Sudmoon, R., and Tanee, T. 2006. Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand. Ethnobotany Research and Applications 4: 223-231.

Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T. and Mokkamul, P. 2009. The genus *Piper* in Thailand, 2nd edition. Khon Kaen Kanpim Printing, Khon Kaen. 165 pp. (ISBN 978-616-549-005-4).

Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T., and Mokkamul, P. 2006. Three new species of Piperaceae from Thailand. Acta Phytotaxonomica Sinica 44(4): 447-453.

Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T., and Mokkamul, P. 2008. The species diversity of the genus *Piper* from Thailand. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 59(2): 105-163.

Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T., and Mokkamul, P. 2008. The species diversity

Chaveerach, A., Tanee, T. and Sudmoon, R. 2011. Molecular identification and barcodes for the genus *Nymphaea*. Acta Biologica Hungarica 62(3): 328–340. DOI 10.1556/ABiol.62.2011.3.11.

Chaveerach, A., Tanomtong, A., Sudmoon, R., Tanee, T., and Mokkamul, P. 2007. A new species and two new varieties of *Piper* (Piperaceae) from Thailand. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 58(1): 33-38.

Fan, L.S., Muhamad, R., Omar, D. and Rahmani, M. 2011. Insecticidal properties of *Piper nigrum* fruit extracts and essential oils against *Spodoptera litura*. International Journal of Agriculture and Biology. 13: 517–522.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003). Biological

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS and Francis CM (2004). Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biol. 2: 1657-1663.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and De Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Series B [Proc R Soc Lond B Biol Sci] 270(1512): 313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.

Hollingsworth, P.M., Forrest, .LL., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M.W., Cowan, R.S., Erickson, D.L., Fazekas, A.J., Graham. S.W., James, K.E., Kim, K.J., Kress, W.J., Schneider, H., van Alphen, Stahl, J., Barrett, S.C, van den Berg, C., Bogarin, D., Burgess, K.S., Cameron, K.M., Carine, M., Chacón, J., Clark, A., Clarkson, J.J., Conrad, F., Devey, D.S., Ford, C.S., Hedderson T.A., Hollingsworth, M.L., Husband, B.C., Kelly, L.J., Kesanakurti, P.R., Kim, J.S., Kim, Y.D., Lahaye, R., Lee, H.L., Long, D.G., Madriñán, S., Maurin, O., Meusnier, I., Newmaster, S.G., Park, C.W., Percy, D.M., Petersen, G., Richardson, J.E., Salazar, G.A., Savolainen, V., Seberg, O., Wilkinson, M.J., Yi, D.K., Little, D.P. 2009. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:12794-12797.

For Review Only

Hollingsworth, P.M., Graham, S.W., Little, D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS ONE 6(5): e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254.

Kritpetcharat, O., Kritpetcharat, P., Daduang, J., Daduang, S., Suwanrungruang, K., Khemtonglang, N., Bletter, N., Sudmoon, R., and Chaveerach, A. 2011. Using DNA markers and barcoding to solve the common problem of identifying dried medicinal plants with the examples of *Smilax* and *Cissus* in Thailand. Journal of Medicinal Plants Research 5(15): 3480-3487.

Kwanda, N., Noikotr, K., Sudmoon, R., Tanee, T., and Chaveerach, A. 2013. Medicinal parasitic plants on diverse hosts with their usages and barcodes. Journal of Natural Medicines 67(3): 438-445. DOI: 10.1007/s11418-012-0695-2

Misra, P., Kumar, A., Khare, P., Gupta, S., Kumar, N. and Dube, A. 2009. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. Journal of Medical Microbiology 58:1058–1066.

Monkheang, P., Sudmoon, R., Tanee, T., Noikotr, K., Bletter, N., and Chaveerach, A. 2011. Species diversity, usages, molecular markers and barcode of medicinal *Senna* species (Fabaceae, Caesalpinioideae) in Thailand. Journal of Medicinal Plants Research 5(26): 6173-6181.

Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD, Janovec J (2007). Testing candidates plant barcode regions in the Myristicaceae. Molecular Ecology Resources. 8:480-490.

Sanubol, S., Chaveerach, A.*, Sudmoon, R., Tanee, T., Noikotr, K., and Chuachan, C. 2014. Betel-like-scented *Piper* plants as diverse sources of industrial and medicinal aromatic chemicals. Chiang Mai Journal of Science 41(5.1): 1171-1181. (ISI impact factor 0.418).

Scott, I.M., Jensen, H.R., Philogène, B.J.R. and Arnason, J.T. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. Phytochemistry Reviews 7: 65–75.

Silayoi, I., Krengpiem, P. and Disthabanchong, A. 1985. Effectiveness of systemic fungicides for control of *Phytophthora parasitica* NK1 in foot rot of *Piper betle*. Thai Agricultural Research Journal 3: 104–107.

Sudmoon, R., Tanee, T., and Chaveerach, A. 2011. *Piper protrusum* (Piperaceae), a new species from southern Thailand based on morphological and molecular evidence. Journal of Systematics and Evolution 49(5): 468-475.

Sudmoon, R., Tanee, T., Wongpanich, V., Bletter, N., and Chaveerach, A. 2012. Ethnobotany and species specific molecular markers of some medicinal *sakhan* (*Piper*, Piperaceae). Journal of Medicinal Plants Research 6(7): 1168-1175.

For Review Only

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30(12): 2725-2729.

Yusoff, Z., Mahmud, Z., Saleh, S.H. and Mohd, E.Y. 2005. Study on the chemical constituents of *Piper betle* L. in relation to their possible insect attractant property, Malaysian Journal of Science. 24: 143-147.

Zhang JB and Hanner R (2012). Molecular approach to the identification of fish in the South China Sea. PLoS One 7: e30621. Available at [http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0030621].

For Review Only

ลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

Nucleotide ▾ Piper Thailand matK

Display Settings: Summary, 100 per page, Sorted by Accession

Results: 56

1. **Piper** argyrites voucher A. Chaveerach 11 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
   796 bp linear DNA
   Accession: KM073990.1 GI: 691193333

2. **Piper** boehmeriifolium voucher A. Chaveerach 2.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
   796 bp linear DNA
   Accession: KM073991.1 GI: 691193335

3. **Piper** boehmeriifolium voucher A. Chaveerach 2.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
   796 bp linear DNA
   Accession: KM073992.1 GI: 691193337

4. **Piper** caninum voucher A. Chaveerach 79.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
   796 bp linear DNA
   Accession: KM073993.1 GI: 691193339

5. **Piper** caninum voucher A. Chaveerach 79.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
   796 bp linear DNA
   Accession: KM073994.1 GI: 691193341

6. **Piper** colubrinum voucher A. Chaveerach 19 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
   796 bp linear DNA
   Accession: KM073995.1 GI: 691193343

7. **Piper** dominantinervium voucher A. Chaveerach 43.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
   796 bp linear DNA
   Accession: KM073996.1 GI: 691193345

8. **Piper** dominantinervium voucher A. Chaveerach 43.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
   796 bp linear DNA
   Accession: KM073997.1 GI: 691193347

9. **Piper** hongkongense voucher A. Chaveerach 68.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
   796 bp linear DNA
   Accession: KM073998.1 GI: 691193349

10. **Piper** hongkongense voucher A. Chaveerach 68.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
    796 bp linear DNA
    Accession: KM073999.1 GI: 691193351

Piper khasianum voucher A. Chaveerach 149.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast

11. 796 bp linear DNA
Accession: KM074000.1 GI: 691193353

Piper khasianum voucher A. Chaveerach 149.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
12. 796 bp linear DNA
Accession: KM074001.1 GI: 691193355

Piper kraense voucher A. Chaveerach 134.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
13. 796 bp linear DNA
Accession: KM074002.1 GI: 691193357

Piper kraense voucher A. Chaveerach 134.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
14. 796 bp linear DNA
Accession: KM074003.1 GI: 691193359

Piper longum voucher A. Chaveerach 3.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
15. 796 bp linear DNA
Accession: KM074004.1 GI: 691193361

Piper longum voucher A. Chaveerach 3.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
16. 796 bp linear DNA
Accession: KM074005.1 GI: 691193363

Piper argyrites voucher A. Chaveerach 126 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
17. 796 bp linear DNA
Accession: KM074006.1 GI: 691193365

Piper magnibaccum voucher A. Chaveerach 5.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
18. 796 bp linear DNA
Accession: KM074007.1 GI: 691193367

Piper magnibaccum voucher A. Chaveerach 5.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
19. 796 bp linear DNA
Accession: KM074008.1 GI: 691193369

Piper nigrum voucher A. Chaveerach 17.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
20. 796 bp linear DNA
Accession: KM074009.1 GI: 691193371

Piper nigrum voucher A. Chaveerach 17.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
21. 796 bp linear DNA
Accession: KM074010.1 GI: 691193373

Piper pedicellatum var. eglandulatum voucher A. Chaveerach 181.1 maturase K (**matK**) gene, partial
22. cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074011.1 GI: 691193375

Piper pedicellatum var. eglandulatum voucher A. Chaveerach 181.2 maturase K (**matK**) gene, partial
23. cds; chloroplast

796 bp linear DNA
Accession: KM074012.1 GI: 691193377

24. **Piper** pendulispicum voucher A. Chaveerach 82 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074013.1 GI: 691193379

25. **Piper** phuwuaense voucher A. Chaveerach 46.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074014.1 GI: 691193381

26. **Piper** phuwuaense voucher A. Chaveerach 46.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074015.1 GI: 691193383

27. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074016.1 GI: 691193385

28. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074017.1 GI: 691193387

29. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.3 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074018.1 GI: 691193389

30. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.4 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074019.1 GI: 691193391

31. **Piper** polysyphonum voucher A. Chaveerach 94.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074020.1 GI: 691193393

32. **Piper** polysyphonum voucher A. Chaveerach 94.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074021.1 GI: 691193395

33. **Piper** ribesioides voucher A. Chaveerach 1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074022.1 GI: 691193397

34. **Piper** sarmentosum voucher A. Chaveerach 18.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074023.1 GI: 691193399

35. **Piper** sarmentosum voucher A. Chaveerach 18.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074024.1 GI: 691193401

36. **Piper** sylvaticum voucher A. Chaveerach 4.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074025.1 GI: 691193403

37. **Piper** sylvaticum voucher A. Chaveerach 4.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074026.1 GI: 691193405

38. **Piper** sylvestre voucher A. Chaveerach 8.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074027.1 GI: 691193407

39. **Piper** sylvestre voucher A. Chaveerach 8.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074028.1 GI: 691193409

40. **Piper** thomsonii var. trichostigma voucher A. Chaveerach 229 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074029.1 GI: 691193411

41. **Piper** wallichii voucher A. Chaveerach 91.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074030.1 GI: 691193413

42. **Piper** wallichii voucher A. Chaveerach 91.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074031.1 GI: 691193415

43. **Piper** protrusum voucher A. Chaveerach 100.1 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074032.1 GI: 691193417

44. **Piper** protrusum voucher A. Chaveerach 100.2 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074033.1 GI: 691193419

45. **Piper** retrofractum voucher A. Chaveerach 9 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074034.1 GI: 691193421

46. **Piper** mutabile voucher A. Chaveerach 52 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
796 bp linear DNA
Accession: KM074035.1 GI: 691193423

47. **Piper** betloides voucher A. Chaveerach 47 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
723 bp linear DNA
Accession: KM098135.1 GI: 697065591

Piper crocatum voucher A. Chaveerach 12 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast

48. 589 bp linear DNA
Accession: KM098136.1 GI: 697057998

Piper argyrites voucher A. Chaveerach 126 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
49. 566 bp linear DNA
Accession: KM098137.1 GI: 697057999

Piper betle voucher A. Chaveerach 314 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
50. 553 bp linear DNA
Accession: KM098138.1 GI: 697058001

Piper semi-immersum voucher A. Chaveerach 115 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
51. 758 bp linear DNA
Accession: KM098139.1 GI: 697065596

Piper submultinerve voucher A. Chaveerach 223 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
52. 773 bp linear DNA
Accession: KM098140.1 GI: 697065598

Piper tricolor voucher A. Chaveerach 64 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
53. 773 bp linear DNA
Accession: KM098141.1 GI: 697065600

Piper yinkiangense voucher A. Chaveerach 133 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
54. 773 bp linear DNA
Accession: KM098142.1 GI: 697065602

Piper betle voucher A. Chaveerach 16 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
55. 773 bp linear DNA
Accession: KM098143.1 GI: 697065604

Piper betle voucher A. Chaveerach 341 maturase K (**matK**) gene, partial cds; chloroplast
56. 763 bp linear DNA
Accession: KM098144.1 GI: 697065606

Nucleotide ▾ Piper Thailand rbcL

Display Settings: Summary, 100 per page, Sorted by Accession

Results: 63

1. **Piper** semi-immersum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
   517 bp linear DNA
   Accession: JQ248066.1 GI: 383385907

2. UNVERIFIED: **Piper** argyrites ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit-like (**rbcL**) gene, partial sequence; chloroplast
   536 bp linear DNA
   Accession: JQ248067.1 GI: 383385909

3. **Piper** crocatum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
   521 bp linear DNA
   Accession: JQ248068.1 GI: 383385910

4. **Piper** submultinerve ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
   516 bp linear DNA
   Accession: JQ248069.1 GI: 383385912

5. **Piper** tricolor ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
   529 bp linear DNA
   Accession: JQ248070.1 GI: 383385914

6. UNVERIFIED: **Piper** betle ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit-like (**rbcL**) gene, partial sequence; chloroplast
   549 bp linear DNA
   Accession: JQ248071.1 GI: 383385916

7. **Piper** betloides ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
   533 bp linear DNA
   Accession: JQ248072.1 GI: 383385917

8. **Piper** yinkiangense ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
   510 bp linear DNA
   Accession: JQ248073.1 GI: 383385919

9. **Piper** betle ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
   509 bp linear DNA

Accession: JQ248074.1 GI: 383385921

10. **Piper** betle voucher A. Chaveerach 319 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
526 bp linear DNA
Accession: JX291976.1 GI: 404435959

11. **Piper** betle voucher A. Chaveerach 340 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
427 bp linear DNA
Accession: JX291977.1 GI: 404435961

12. **Piper** argyrites voucher A. Chaveerach 11 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
420 bp linear DNA
Accession: JX291978.1 GI: 404435963

13. **Piper** pendulispicum voucher A. Chaveerach 673 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
499 bp linear DNA
Accession: JX291979.1 GI: 404435965

14. **Piper** argyrites voucher A. Chaveerach 11 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055126.1 GI: 685848467

15. **Piper** boehmeriifolium voucher A. Chaveerach 2.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
556 bp linear DNA
Accession: KM055127.1 GI: 685848469

16. **Piper** boehmeriifolium voucher A. Chaveerach 2.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055128.1 GI: 685848471

17. **Piper** caninum voucher A. Chaveerach 79.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
553 bp linear DNA
Accession: KM055129.1 GI: 685848473

18. **Piper** caninum voucher A. Chaveerach 79.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055130.1 GI: 685848475

19. **Piper** colubrinum voucher A. Chaveerach 19 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
553 bp linear DNA
Accession: KM055131.1 GI: 685848477

20. **Piper** dominantinervium voucher A. Chaveerach 43.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055132.1 GI: 685848479

21. **Piper** dominantinervium voucher A. Chaveerach 43.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055133.1 GI: 685848481

22. **Piper** hongkongense voucher A. Chaveerach 68.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055134.1 GI: 685848483

23. **Piper** hongkongense voucher A. Chaveerach 68.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055135.1 GI: 685848485

24. **Piper** khasianum voucher A. Chaveerach 149.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
553 bp linear DNA
Accession: KM055136.1 GI: 685848487

25. **Piper** khasianum voucher A. Chaveerach 149.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055137.1 GI: 685848489

26. **Piper** kraense voucher A. Chaveerach 134.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
553 bp linear DNA
Accession: KM055138.1 GI: 685848491

27. **Piper** kraense voucher A. Chaveerach 134.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055139.1 GI: 685848493

28. **Piper** longum voucher A. Chaveerach 3.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055140.1 GI: 685848495

29. **Piper** longum voucher A. Chaveerach 3.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055141.1 GI: 685848497

30. **Piper** argyrites voucher A. Chaveerach 126 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
546 bp linear DNA
Accession: KM055142.1 GI: 685848499

31. **Piper** magnibaccum voucher A. Chaveerach 5.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055143.1 GI: 685848501

32. **Piper** magnibaccum voucher A. Chaveerach 5.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055144.1 GI: 685848503

33. **Piper** montium voucher A. Chaveerach 7.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055145.1 GI: 685848505

34. **Piper** montium voucher A. Chaveerach 7.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
556 bp linear DNA
Accession: KM055146.1 GI: 685848507

35. **Piper** mutabile voucher A. Chaveerach 52.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
556 bp linear DNA
Accession: KM055147.1 GI: 685848509

36. **Piper** mutabile voucher A. Chaveerach 52.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055148.1 GI: 685848511

37. **Piper** nigrum voucher A. Chaveerach 17.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055149.1 GI: 685848513

38. **Piper** nigrum voucher A. Chaveerach 17.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
542 bp linear DNA
Accession: KM055150.1 GI: 685848515

39. **Piper** pedicellatum var. eglandulatum voucher A. Chaveerach 181.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055151.1 GI: 685848517

40. **Piper** pedicellatum var. eglandulatum voucher A. Chaveerach 181.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055152.1 GI: 685848519

41. **Piper** pendulispicum voucher A. Chaveerach 82 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055153.1 GI: 685848521

42. **Piper** phuwuaense voucher A. Chaveerach 46.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055154.1 GI: 685848523

43. **Piper** phuwuaense voucher A. Chaveerach 46.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
542 bp linear DNA
Accession: KM055155.1 GI: 685848525

44. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055156.1 GI: 685848527

45. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
552 bp linear DNA
Accession: KM055157.1 GI: 685848529

46. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.3 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
525 bp linear DNA
Accession: KM055158.1 GI: 685848531

47. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.4 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
536 bp linear DNA
Accession: KM055159.1 GI: 685848533

48. **Piper** polysyphonum voucher A. Chaveerach 94.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055160.1 GI: 685848535

49. **Piper** polysyphonum voucher A. Chaveerach 94.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
543 bp linear DNA
Accession: KM055161.1 GI: 685848537

50. **Piper** ribesioides voucher A. Chaveerach 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055162.1 GI: 685848539

51. **Piper** sarmentosum voucher A. Chaveerach 18.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
551 bp linear DNA
Accession: KM055163.1 GI: 685848541

52. **Piper** sarmentosum voucher A. Chaveerach 18.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055164.1 GI: 685848543

53. **Piper** sylvestre voucher A. Chaveerach 8.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055165.1 GI: 685848545

54. **Piper** sylvestre voucher A. Chaveerach 8.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
540 bp linear DNA
Accession: KM055166.1 GI: 685848547

55. **Piper** thomsonii var. trichostigma voucher A. Chaveerach 229 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
542 bp linear DNA
Accession: KM055167.1 GI: 685848549

56. **Piper** umbellatum voucher A. Chaveerach 14.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055168.1 GI: 685848551

57. **Piper** umbellatum voucher A. Chaveerach 14.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
553 bp linear DNA
Accession: KM055169.1 GI: 685848553

58. **Piper** wallichii voucher A. Chaveerach 91.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
556 bp linear DNA
Accession: KM055170.1 GI: 685848555

59. **Piper** wallichii voucher A. Chaveerach 91.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
521 bp linear DNA
Accession: KM055171.1 GI: 685848557

60. **Piper** protrusum voucher A. Chaveerach 100.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
554 bp linear DNA
Accession: KM055172.1 GI: 685848559

61. **Piper** protrusum voucher A. Chaveerach 100.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
524 bp linear DNA
Accession: KM055173.1 GI: 685848561

62. **Piper** sylvaticum voucher A. Chaveerach 4 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
524 bp linear DNA
Accession: KM055174.1 GI: 685848563

63. **Piper** retrofractum voucher A. Chaveerach 9 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (**rbcL**) gene, partial cds; chloroplast
550 bp linear DNA
Accession: KM055175.1 GI: 685848565

Nucleotide ▾ Piper Thailand psbA

Display Settings: Summary, 100 per page, Sorted by Accession

Results: 71

1. **Piper** nigrum **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
   285 bp linear DNA
   Accession: GQ891994.1 GI: 261279725

2. **Piper** sarmentosum **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
   280 bp linear DNA
   Accession: GQ891995.1 GI: 261279727

3. **Piper** betle **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
   258 bp linear DNA
   Accession: GQ891996.1 GI: 261279729

4. **Piper** pendulispicum **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
   277 bp linear DNA
   Accession: GQ891997.1 GI: 261279731

5. **Piper** retrofractum **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
   298 bp linear DNA
   Accession: GQ891998.1 GI: 261279733

6. **Piper** ribesioides **PsbA**-like (**psbA**) gene, partial sequence; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
   315 bp linear DNA
   Accession: GQ891999.1 GI: 261279735

7. **Piper** colubrinum **PsbA**-like (**psbA**) gene, partial sequence; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
   264 bp linear DNA
   Accession: GQ892000.1 GI: 261279736

8. **Piper** sp. Pi-B **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
   324 bp linear DNA
   Accession: GQ892001.1 GI: 261279737

9. **Piper** protrusum **PsbA**-like (**psbA**) gene, partial sequence; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
   265 bp linear DNA

Accession: GU980900.1 GI: 300872239

10. **Piper** semi-immersum voucher A. Chaveerach 115 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
265 bp linear DNA
Accession: JQ248045.1 GI: 378756952

11. **Piper** argyrites voucher A. Chaveerach 126 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
253 bp linear DNA
Accession: JQ248046.1 GI: 378756954

12. **Piper** crocatum voucher A. Chaveerach 12 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
277 bp linear DNA
Accession: JQ248047.1 GI: 378756956

13. **Piper** submultinerve voucher A. Chaveerach 223 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
255 bp linear DNA
Accession: JQ248048.1 GI: 378756958

14. **Piper** tricolor voucher A. Chaveerach 64 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
283 bp linear DNA
Accession: JQ248049.1 GI: 378756960

15. **Piper** betle voucher A. Chaveerach 314 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
254 bp linear DNA
Accession: JQ248050.1 GI: 378756962

16. **Piper** betloides voucher A. Chaveerach 171 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
264 bp linear DNA
Accession: JQ248051.1 GI: 378756964

17. **Piper** yinkiangense voucher A. Chaveerach 133 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
264 bp linear DNA
Accession: JQ248052.1 GI: 378756966

18. **Piper** betle voucher A. Chaveerach 16 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
280 bp linear DNA
Accession: JQ248053.1 GI: 378756968

19. **Piper** betle voucher A. Chaveerach 319 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
252 bp linear DNA
Accession: JX442925.1 GI: 407750880

20. **Piper** betle voucher A. Chaveerach 340 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
256 bp linear DNA
Accession: JX442926.1 GI: 407750882

21. **Piper** argyrites voucher A. Chaveerach 11 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
256 bp linear DNA
Accession: JX442927.1 GI: 407750884

22. **Piper** pendulispicum voucher A. Chaveerach 673 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; **psbA**-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast
255 bp linear DNA
Accession: JX442928.1 GI: 407750886

23. **Piper** argyrites voucher A. Chaveerach 11 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
287 bp linear DNA
Accession: KM055176.1 GI: 685848567

24. **Piper** boehmeriifolium voucher A. Chaveerach 2.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
294 bp linear DNA
Accession: KM055177.1 GI: 685848569

25. **Piper** boehmeriifolium voucher A. Chaveerach 2.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
289 bp linear DNA
Accession: KM055178.1 GI: 685848571

26. **Piper** caninum voucher A. Chaveerach 79.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
292 bp linear DNA
Accession: KM055179.1 GI: 685848573

27. **Piper** caninum voucher A. Chaveerach 79.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
291 bp linear DNA
Accession: KM055180.1 GI: 685848575

28. **Piper** dominantinervium voucher A. Chaveerach 43.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
303 bp linear DNA
Accession: KM055181.1 GI: 685848577

29. **Piper** dominantinervium voucher A. Chaveerach 43.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
293 bp linear DNA
Accession: KM055182.1 GI: 685848579

30. **Piper** hongkongense voucher A. Chaveerach 68.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
288 bp linear DNA
Accession: KM055183.1 GI: 685848581

31. **Piper** hongkongense voucher A. Chaveerach 68.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
300 bp linear DNA
Accession: KM055184.1 GI: 685848583

32. **Piper** khasianum voucher A. Chaveerach 149.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
297 bp linear DNA
Accession: KM055185.1 GI: 685848585

33. **Piper** khasianum voucher A. Chaveerach 149.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
297 bp linear DNA
Accession: KM055186.1 GI: 685848587

34. **Piper** kraense voucher A. Chaveerach 134.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
289 bp linear DNA
Accession: KM055187.1 GI: 685848589

35. **Piper** kraense voucher A. Chaveerach 134.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
297 bp linear DNA
Accession: KM055188.1 GI: 685848591

36. **Piper** longum voucher A. Chaveerach 3.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
301 bp linear DNA
Accession: KM055189.1 GI: 685848593

37. **Piper** longum voucher A. Chaveerach 3.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
290 bp linear DNA
Accession: KM055190.1 GI: 685848595

38. **Piper** argyrites voucher A. Chaveerach 126 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
293 bp linear DNA
Accession: KM055191.1 GI: 685848597

39. **Piper** magnibaccum voucher A. Chaveerach 5.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
285 bp linear DNA
Accession: KM055192.1 GI: 685848599

40. **Piper** magnibaccum voucher A. Chaveerach 5.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
293 bp linear DNA
Accession: KM055193.1 GI: 685848601

41. **Piper** montium voucher A. Chaveerach 7.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
285 bp linear DNA
Accession: KM055194.1 GI: 685848603

42. **Piper** montium voucher A. Chaveerach 7.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
281 bp linear DNA
Accession: KM055195.1 GI: 685848605

43. **Piper** mutabile voucher A. Chaveerach 52.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
297 bp linear DNA
Accession: KM055196.1 GI: 685848607

44. **Piper** mutabile voucher A. Chaveerach 52.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
307 bp linear DNA
Accession: KM055197.1 GI: 685848609

45. **Piper** nigrum voucher A. Chaveerach 17.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
282 bp linear DNA
Accession: KM055198.1 GI: 685848611

46. **Piper** nigrum voucher A. Chaveerach 17.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
299 bp linear DNA
Accession: KM055199.1 GI: 685848613

47. **Piper** pedicellatum var. eglandulatum voucher A. Chaveerach 181.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
298 bp linear DNA
Accession: KM055200.1 GI: 685848615

48. **Piper** pedicellatum var. eglandulatum voucher A. Chaveerach 181.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
299 bp linear DNA
Accession: KM055201.1 GI: 685848617

49. **Piper** pendulispicum voucher A. Chaveerach 82 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
283 bp linear DNA
Accession: KM055202.1 GI: 685848619

50. **Piper** phuwuaense voucher A. Chaveerach 46.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
297 bp linear DNA
Accession: KM055203.1 GI: 685848621

51. **Piper** phuwuaense voucher A. Chaveerach 46.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
306 bp linear DNA
Accession: KM055204.1 GI: 685848623

52. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
302 bp linear DNA
Accession: KM055205.1 GI: 685848625

53. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
302 bp linear DNA
Accession: KM055206.1 GI: 685848627

54. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.3 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
299 bp linear DNA
Accession: KM055207.1 GI: 685848629

55. **Piper** pilobracteatum voucher A. Chaveerach 41.4 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
286 bp linear DNA
Accession: KM055208.1 GI: 685848631

56. **Piper** polysyphonum voucher A. Chaveerach 94.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
302 bp linear DNA
Accession: KM055209.1 GI: 685848633

57. **Piper** polysyphonum voucher A. Chaveerach 94.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
297 bp linear DNA
Accession: KM055210.1 GI: 685848635

58. **Piper** ribesioides voucher A. Chaveerach 1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
291 bp linear DNA
Accession: KM055211.1 GI: 685848637

59. **Piper** sarmentosum voucher A. Chaveerach 18.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
301 bp linear DNA
Accession: KM055212.1 GI: 685848639

60. **Piper** sarmentosum voucher A. Chaveerach 18.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
302 bp linear DNA
Accession: KM055213.1 GI: 685848641

61. **Piper** sylvaticum voucher A. Chaveerach 4.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
301 bp linear DNA
Accession: KM055214.1 GI: 685848643

62. **Piper** sylvaticum voucher A. Chaveerach 4.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
297 bp linear DNA
Accession: KM055215.1 GI: 685848645

63. **Piper** sylvestre voucher A. Chaveerach 8.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
297 bp linear DNA
Accession: KM055216.1 GI: 685848647

64. **Piper** sylvestre voucher A. Chaveerach 8.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
309 bp linear DNA
Accession: KM055217.1 GI: 685848649

65. **Piper** thomsonii var. trichostigma voucher A. Chaveerach 299 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
291 bp linear DNA
Accession: KM055218.1 GI: 685848651

66. **Piper** umbellatum voucher A. Chaveerach 14.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
283 bp linear DNA
Accession: KM055219.1 GI: 685848653

67. **Piper** umbellatum voucher A. Chaveerach 14.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
290 bp linear DNA
Accession: KM055220.1 GI: 685848655

68. **Piper** wallichii voucher A. Chaveerach 91.1 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
292 bp linear DNA
Accession: KM055221.1 GI: 685848657

69. **Piper** wallichii voucher A. Chaveerach 91.2 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
300 bp linear DNA
Accession: KM055222.1 GI: 685848659

70. **Piper** protrusum voucher A. Chaveerach 100 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
294 bp linear DNA
Accession: KM055223.1 GI: 685848661

71. **Piper** retrofractum voucher A. Chaveerach 9 **PsbA** (**psbA**) gene, partial cds; and **psbA**-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
293 bp linear DNA
Accession: KM055224.1 GI: 685848663

กิจกรรมการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

ได้นำผลการวิจัยและผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปเผยแพร่ในงานต่างๆ

สัปดาห์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประจำปี 2556-2557

โครงการประกวดการพัฒนาภูมิปัญญาสู่นวัตกรรม จัดโดยกรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ ร่วมกับ สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ และ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ณ โรงแรมเจริญธานี ขอนแก่น

23 ธันวาคม 2557

International Conference on "Research for Social Devotion" In Commemoration of the 50th Anniversary of Khon Kaen University, Thailand

22-23 January 2015