รายงานโครงการวิจัย

# การประเมินคุณค่าและการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมพืช
# Evaluation and Utilization of Plant Germplasm

หัวหน้าโครงการวิจัย
สุพินญา บุญมานพ
Suphinya Bunmanop

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2565

รายงานโครงการวิจัย

# การประเมินคุณค่าและการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมพืช
# Evaluation and Utilization of Plant Germplasm

หัวหน้าโครงการวิจัย
สุพินญา บุญมานพ
Suphinya Bunmanop

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2565

## คำปรารภ

ภายใต้สภาวการณ์ปัจจุบันกระแสการรักสุขภาพมาเป็นอันดับหนึ่ง รวมถึงการเกิดวิกฤตโรคอุบัติใหม่ในการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ทำให้พืชสมุนไพรได้รับความสนใจ ซึ่งการศึกษาสารสำคัญในพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ทราบว่าสารสำคัญนี้มีผลอย่างไรต่อสุขภาพ ทั้งในด้านการเสริมภูมิ การป้องกัน ในโครงการวิจัยนี้ดำเนินการศึกษาสารสำคัญเพื่อเป็นข้อมูลของถั่วเหลือง ถั่วสกุล phaseolus ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร รวมทั้งกวาวเครือขาว หนอนตายหยาก และเท้ายายม่อม ทั้งนี้ได้วิจัยการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อใช้ประกอบและต่อยอดการวิจัยเพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ทางการเภสัชกรรม และการแพทย์ รวมถึงการเสริมสร้างความมั่นคงทางอาหารในประเทศต่อไปในอนาคต

กรมวิชาการเกษตร

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | 9 |
| ผู้วิจัย | 10 |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ | 12 |
| บทนำ | 13 |
| บทคัดย่อ | 15 |
| 1. การทดลองที่ 1 การประเมินพิวรารินในหัวกวาวเครือขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช | 17 |
| 2. การทดลองที่ 2 การใช้เทคนิค NIR ในการทำนายปริมาณไอโซฟลาโวนในเมล็ด เพื่อประเมินคุณค่าเชื้อพันธุ์ถั่วเหลืองในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช | 28 |
| 3. การทดลองที่ 3 การประเมินลักษณะประจำพันธุ์และพฤกษเคมี (Phaseolamin) ในถั่วสกุล Phaseolus ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช | 44 |
| 4. การทดลองที่ 4 การศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิจากรากหนอนตายหยากที่ได้จากการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช | 61 |
| 5. การทดลองที่ 5 วิเคราะห์ปริมาณแป้ง และโปรตีนในหัวเท้ายายม่อมเพื่อการอนุรักษ์ | |
| 6. การทดลองที่ 6 การเพิ่มปริมาณสาระสำคัญในกลุ่ม terpenoid จากต้นจิงจูฉ่ายโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | 83 |
| 7. การทดลองที่ 7 การเพิ่มปริมาณสารสำคัญเคอร์ซิตรินและรูตินจากต้นพลูคาวโดยใช้สารกระตุ้น | 112 |
| บทสรุปและข้อเสนอแนะ | 126 |
| เอกสารอ้างอิง | 129 |
| ภาคผนวก | |
| ก. การทดลองที่ 3 แบบบันทึกข้อมูลของถั่วพื้นเมืองแบบบันทึกของ IPGRI | 140 |
| ข. การทดลองที่ 4 | 144 |


กรมวิชาการเกษตร

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1.1 | ดอกฝัก เมล็ด และหัวกวาวเครือขาว (ถ่ายภาพจาก ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี | 19 |
| 2.1.2 | สารประกอบไอโซฟลาโวนส์ (isoflavones) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างจากกวาวเครือขาว | 22 |
| 2.1.3 | แปลงกวาวเครือขาว ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี ที่อายุ 3 เดือนหลังปลูก (ธันวาคม 2562) | 23 |
| 2.1.4 | แปลงกวาวเครือขาว ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี ที่อายุ 6 เดือนหลังปลูก (มีนาคม 2563) | 24 |
| 2.1.5 | แปลงกวาวเครือขาว ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี ที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก (มิถุนายน 2563) | 24 |
| 2.1.6 | หัวกวาวเครือขาวที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก (มิถุนายน 2563) | 25 |
| 2.1.7 | หัวกวาวเครือขาวที่อายุ 12 เดือนหลังปลูก (กันยายน 2563) | 25 |
| 2.1.8 | ขั้นตอนอบแห้งกวาวเครือขาวและบดละเอียดก่อนส่งวิเคราะห์ | 26 |
| 2.2.1 | The original NIR spectra of soybean seed of 800-2500 nm. | 31 |
| 2.2.2 | Regression coefficient plots to evaluate Daidzin (a), Daidzein (b), Glycitin (c), Glycitein (d), Genistin (e), Genistein (f), and Total isoflavone (g) in soybean grains. | 35 |
| 2.2.3 | Scatter plots of actual Daidzin (a), Daidzein (b), Glycitin (c), Glycitein (d), Genistin (e), Genistein (f), and Total isoflavone (g) value in soybean seed (ppm) vs. NIR predicted isoflavone values | 36 |
| 2.3.1 | การทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส | 58 |
| 2.3.2 | การทำงานของเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4 | 58 |
| 2.4.1 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 70 |
| 2.4.2 | *Stemona collinsiae* Craib. | 70 |
| 2.4.3 | *Stemona tuberosa* Lour. | 70 |
| 2.4.4 | *Stemona rupestris* Inthachub. | 70 |
| 2.4.5 | *Stemona pierrei* Gagnap. | 71 |
| 2.4.6 | *Stemonai* sp. (unknown) | 71 |
| 2.4.7 | ตัวอย่างพรรณไม้แห้งผ่านกระบวนการรักษาสภาพและจัดทำเป็นพรรณไม้อ้างอิง (plant specimen) จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ | 71 |
| 2.4.8 | รากหนอนตายหยากอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (ตัวอย่างที่ 1) และรากหนอนตายหยากจาก อ.วังน้ำเขียว จ. นครราชสีมา (ตัวอย่างที่ 2) | 73 |
| 2.4.9 | โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ stemocurtisine และ stemofoline | 73 |
| 2.4.10 | หนอนตายหยากเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ | 77 |
| 2.5.1 | ต้น เมล็ด และหัวเท้ายายม่อม | 84 |
| 2.5.2 | รวมรวบเท้ายายม่อมแหล่งพันธุ์ต่างสถานที่ (ธันวาคม 2562) | 87 |
| 2.5.3 | เท้ายายม่อมจากแหล่งพันธุ์ต่างสถานที่ (มีนาคม 2563) | 88 |
| 2.5.4 | เท้ายายม่อมที่อายุ 4 เดือนหลังปลูก (กันยายน 2563) | 89 |
| 2.5.5 | หัวเท้ายายม่อมเก็บเกี่ยวที่อายุ 8 เดือนหลังปลูก (มกราคม 2564) | 90 |
| 2.5.6 | แป้งเท้ายายม่อม จาก 6 จังหวัด (จันทบุรี ฉะเชิงเทรา กาฬสินธุ์ อุบลราชธานี พังงา และตรัง) | 90 |
| 2.6.1 | ลักษณะข้อ (A (1 – 4)) ยอด (B (5 - 8)) จิงจูฉ่ายที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ อายุ 2 สัปดาห์ และ ลักษณะต้นจิงจูฉ่าย (C) ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ อายุ 8 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส | 102 |
| 2.6.2 | การเกิดยอดใหม่จากข้อ (A) และ ยอด (B) จิงจูฉ่ายที่เพาะลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 4 6 และ 12 mg/l ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ | 104 |


กรมวิชาการเกษตร

| | | |
|---|---|---|
| 2.6.3 | ยอดใหม่ที่ได้จากการชักนำโดยใช้ BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 mg/l นำไปเพาะลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม BA ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ | 104 |
| 2.6.4 | ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นจิงจูฉ่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อทำการย้ายปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา 1 เดือน (A) และ 6 เดือน (B) | 105 |
| 2.6.5 | ลักษณะต้นจิงจูฉ่ายอายุ 12 สัปดาห์ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับสารกระตุ้น salicylic acid ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 3 และ 5 mM ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส | 106 |
| 2.6.6 | ปริมาณสาร total terpenoids ที่ตรวจวัดได้ในวันที่ 1, 3 และ 5 หลังกระตุ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 0 (control 2), 0.1 (T1), 0.5 (T2), 1 (T3), 3 (T4) และ 5 (T5) มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ (control 1) | 108 |
| 2.6.7 | ปริมาณสาร ascorbic acid ที่ตรวจวัดได้ในวันที่ 1, 3 และ 5 หลังกระตุ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 0 (control 2), 0.1 (T1), 0.5 (T2), 1 (T3), 3 (T4) และ 5 (T5) มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ (control 1) | 109 |
| 2.7.1 | ลักษณะพลูคาวก้านม่วงที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ (ก.) อายุ 4 สัปดาห์ และ (ข.) อายุ 8 สัปดาห์ | 118 |
| 2.7.2 | ลักษณะพลูคาวใบเขียวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ (ก.) อายุ 4 สัปดาห์ และ (ข.) อายุ 8 สัปดาห์ | 119 |
| 2.7.3 | ลักษณะยอดพลูคาวก้านม่วงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA (ก) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร | 120 |
| 2.7.4 | ลักษณะยอดพลูคาวใบเขียวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA (ก) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร | 121 |
| 2.7.5 | ลักษณะรากพลูคาวที่ถูกชักนำให้เกิดยอดด้วย BA ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อตัดชิ้นส่วนยอดไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร MS พบว่าพืชไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ รากมีลักษณะสั้นเป็นปุ่มปม | 121 |
| 2.7.6 | ขั้นตอนการดำเนินงานเพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารเคอร์ซิตรินและรูตินในต้นพลูคาวในสภาพปลอดเชื้อ | 122 |
| 2.7.7 | แผนผังการสังเคราะห์กรดซาลิไซลิกและฟลาโวนอยด์ในพืช (Gondor *et al*., 2016) | 123 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1.1 | ระบบตัวทำละลายสำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของตัวอย่างจากกวาวเครือขาว | 22 |
| 2.1.2 | ข้อมูลการเจริญเติบโตกวาวเครือขาว : เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นที่อายุ 3, 6 และ 9 เดือนหลังปลูก | 23 |
| 2.1.3 | ปริมาณของสารประกอบหลักในอาหารของตัวอย่างจากกวาวเครือขาวต่อปริมาณสารตัวอย่าง 100 กรัม | 26 |
| 2.1.4 | ชนิดและปริมาณของสารสำคัญ puerarin (1), daidzein (2) และ genistein (3) ในตัวอย่างจากกวาวเครือขาว | 27 |
| 2.2.1 | Partial Least Square calibration result for isoflavones values of 200 samples soybean seed. | 34 |
| 2.2.2 | The characteristics of samples used in model for isoflavones values of 200 samples soybean seed. | 34 |
| 2.2.3 | Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Daidzin value in soybean seed. | 37 |
| 2.2.4 | Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Daidzein value in soybean seed. | 38 |
| 2.2.5 | Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Glycitin value in soybean seed. | 39 |
| 2.2.6 | Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Glycitein value in soybean seed. | 40 |
| 2.2.7 | Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Genistin value in soybean seed. | 41 |
| 2.2.8 | Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Genistein value in soybean seed. | 42 |
| 2.2.9 | Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Total isoflavone value in soybean seed. | 43 |
| 2.3.1 | ข้อมูลการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ถั่วสกุล phaseolus และพันธุ์ตรวจสอบ | 48 |
| 2.3.2 | ลักษณะประจำพันธุ์ถั่วสกุล phaseolus และพันธุ์ตรวจสอบ | 51 |
| 2.3.3 | ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวเนื่องกับโรคอ้วน (เอนไซม์ไลเปส) และเบาหวาน (เอนไซม์แอลฟ่า-อะไมเลส เอนไซม์แอลฟ่า-กลูโคซิเดส และเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4) | 59 |
| 2.4.1 | HPLC gradient flow condition system1 : สำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของตัวอย่างจากราก หนอนตายหยาก | 68 |
| 2.4.2 | HPLC gradient flow condition system2 : สำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของตัวอย่างจากราก หนอนตายหยาก | 68 |
| 2.4.3 | ตัวอย่างพรรณไม้แห้งเพื่อลงทะเบียนเป็นตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ | 72 |
| 2.4.4 | ผลการทดลองในการทดสอบหาสารแอลคาลอยด (alkaloids) ในตัวอย่าง | 73 |
| 2.4.5 | ค่า Chemical shift $^{1}$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $d_H$ 7.26) ของสาร stemocurtisine | 74 |
| 2.4.6 | ค่า Chemical shift $^{1}$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $\delta_H$ 7.26) ของสาร stemofoline | 75 |
| 2.4.7 | ปริมาณสารทุติยภูมิในตัวอย่างรากหนอนตายหยากแต่ละชนิด (species) จากแหล่งที่มาต่างๆกัน | 77 |
| 2.4.8 | ผลการชักนำให้เกิดยอดหนอนตายหยากของ *S. tuberosa* Lour. และ *S. collinsiae* Craib. บนอาหารทดลอง 13 สูตร ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 60 วัน | 78 |
| 2.4.9 | ผลการชักนำให้เกิดรากหนอนตายหยากของ *S. tuberosa* Lour. และ *S. collinsiae* Craib. บนอาหารทดลอง 12 สูตร ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 60 วัน | 79 |
| 2.5.1 | การเจริญเติบโตของเท้ายายม่อมที่อายุ 5 เดือนหลังปลูก | 88 |
| 2.5.2 | น้ำหนักหัวเท้ายายม่อมที่อายุ 8 เดือนหลังปลูก | 90 |


กรมวิชาการเกษตร

2.5.3 ปริมาณของสารประกอบหลักในอาหารของตัวอย่างจากเท้ายายม่อมต่อปริมาณสารตัวอย่าง 100 กรัม 91
2.6.1 จำนวนการเกิดยอดใหม่ที่ชักนำจากชิ้นส่วนข้อ และยอดจิงจูฉ่าย เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0 1 2 4 6 และ 12 mg/l ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 103
2.7.1 เปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อของวิธีการฟอกในพลูคาวและจำนวนใบที่พัฒนาจากต้นปลอดเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ 119
2.7.2 อิทธิพลของ BA ที่มีต่อการเกิดยอดใหม่ของพลูคาวที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 45 วัน 120
2.7.3 อิทธิพลของสารกระตุ้นที่มีต่อการผลิตสารเคอร์ซิตรินและรูตินของพลูคาวก้านม่วงที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง 123
2.7.4 อิทธิพลของสารกระตุ้นที่มีต่อการผลิตสารเคอร์ซิตรินและรูตินของพลูคาวใบเขียวที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง 123

## สารบัญภาคผนวกตาราง

**ตารางที่ ภาคผนวก ข หน้า**

2.4.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยอดเฉลี่ยหนอนตายหยาก *Stemona tuberosa* Lour. จากการทดลองชักนำให้เกิดยอดในสภาพปลอดเชื้อ 144
2.4.2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยอดเฉลี่ยหนอนตายหยาก *Stemona collinsiae* Craib. จากการทดลองชักนำให้เกิดยอดในสภาพปลอดเชื้อ 144

กรมวิชาการเกษตร

## กิตติกรรมประกาศ

การประเมินคุณค่าและการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมพืช ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559-2561 และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562-2564 ภายใต้แผน อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืช และจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าและนวัตกรรม ด้วยเล็งเห็นความสำคัญของการศึกษาสารสำคัญ (ทุติยภูมิ) ในพืชที่เป็นองค์ประกอบในการเลือกบริโภคเป็นอาหารสุขภาพและทางด้านแพทย์ และแพทย์แผนไทย ตลอดถึงการนำไปต่อยอดในการวิจัยด้านผลิตภัณฑ์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ที่จัดสรรงบประมาณเพื่อสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่าน ที่ได้เสียสละเวลาในการให้ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์และแนวทางในการปรับปรุงแก้ไข จนสามารถดำเนินงานได้ตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ กรมวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความร่วมมือและการสนับสนุนงานวิจัย ทั้งครุภัณฑ์ทางด้านวิทยาศาสตร์ และสาธารณูปโภค ตลอดในการดำเนินการวิจัยจนลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ หัวหน้าการทดลองภายใต้โครงการวิจัยนี้ นายพิทยา วงษ์ช้าง นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล นางประกาย อ่อนวิมล และนางสาววรารัตน์ ศรีประพัฒน์ ที่ได้ดำเนินงานวิจัย และจัดทำรายงานโครงการวิจัยฉบับนี้

หวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาต่อยอดในด้านการเกษตรกรรม ผลิตอาหารสุขภาพ สมุนไพรที่มีคุณภาพ กรมวิชาการเกษตร และประเทศไทยตามสมควร

สุพินญา บุญมานพ และคณะ

กุมภาพันธ์ 2565

**ผู้วิจัย**

**(คณะผู้วิจัย)**

| | |
|---|---|
| **หัวหน้าการทดลองที่ 1 นางสาวสุพินญา บุญมานพ** | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| ผู้ร่วมงาน นางสาวปาริฉัตร สังข์สะอาด | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| นางสาวอัสนี ส่งเสริม | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |


กรมวิชาการเกษตร

| | |
|---|---|
| นายบุญร่วม คิดค้า | สังกัด มหาวิทยาลัยพะเยา |
| **หัวหน้าการทดลองที่ 2 นายพิทยา วงษ์ช้าง** | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| ผู้ร่วมงาน นางสาวปาริฉัตร สังข์สะอาด | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| นางอ้อยทิน ผลพานิช | สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ |
| นายอนุวัฒน์ รัตนชัย | สังกัด กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผล |
| นางสาววชิรญา อิ่มสบาย | สังกัด ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน |
| นางสาวสิรินาฏ น้อยพิทักษ์ | สังกัด ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน |
| นางสาวสมนึก พรมแดง | สังกัด ศูนย์วิจัยและปฏิบัติการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน |
| **หัวหน้าการทดลองที่ 3 นายพิทยา วงษ์ช้าง** | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| ผู้ร่วมงาน นางสาวปาริฉัตร สังข์สะอาด | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| นางสาวอภิญญา วงศ์เปี้ย | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| นางอ้อยทิน ผลพานิช | สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ |
| นางสาวอุทัยวรรณ สุทธิศันสนีย์ | สังกัด สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| นางสาวยุราพร สหัสกุล | สังกัด สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| นางสาวอมรรัตน์ เอื้อสลุง | สังกัด สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| **หัวหน้าการทดลองที่ 4 นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล** | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| ผู้ร่วมงาน นางสาวสุพินญา บุญมานพ | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| นางสาวพัชร ปิริยวินิตร | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| นายธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์ | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| **หัวหน้าการทดลองที่ 5 นางสาวสุพินญา บุญมานพ** | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| ผู้ร่วมงาน นางสาว ปาริฉัตร สังข์สะอาด | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| **หัวหน้าการทดลองที่ 6 นางประกาย อ่อนวิมล** | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| ผู้ร่วมงาน นางสาวกฤตยา เพชรผึ้ง | สังกัด สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| นายไพฑูรย์ บุปผาดา | สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรอำนาจเจริญ |
| **หัวหน้าการทดลองที่ 7 นางสาววรารัตน์ ศรีประพัฒน์** | สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| ผู้ร่วมงาน นางสาวมณทิรา ภูติวรนาถ | สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ |

กรมวิชาการเกษตร

นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

กรมวิชาการเกษตร

**คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ**

| | |
|---|---|
| BA | 6-Benzylaminopurine |
| MS | Murashige and Skoog |
| HPLC | High Liquid Chromatograph |
| UHPLC | Ultra High Liquid Chromatograph |

กรมวิชาการเกษตร

## บทนำ

**ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัยที่** 2 การประเมินคุณค่าและการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมพืช

สถานการณ์สมุนไพร และผลิตภัณฑ์สมุนไพร ในปัจจุบันเป็นที่ต้องการทั่วโลก แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ยาแผนโบราณ อาหารเสริม น้ำมันหอมระเหยและเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลรักษาผิวพรรณ การนำสมุนไพรมาใช้เป็นยาต้องอาศัยความร่วมมือของนักวิจัยหลายสาขา เพื่อให้ได้ยาจากสมุนไพรที่มีคุณภาพทัดเทียมกับยาแผนปัจจุบัน ขั้นตอนการพัฒนายาจากสมุนไพรเริ่มจาก การคัดเลือกสมุนไพรที่มีศักยภาพในการที่จะนำไปพัฒนาผลิตเป็นยา และหากเป็นการพัฒนายาในขั้นอุตสาหกรรมต้องคำนึงถึงแหล่งวัตถุดิบ คุณภาพวัตถุดิบ ความยากง่ายในการหาวัตถุดิบ และความแปรปรวนของสารสำคัญตามฤดูกาล ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีผลถึงราคาวัตถุดิบและประสิทธิภาพในการรักษาโรคของยาจากสมุนไพรนั้น ๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการวิจัยปรับปรุง และการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาเป็นแนวทางหนึ่งที่จะสามารถแก้ไขปัญหาในบางจุดที่สำคัญโดยเฉพาะเรื่องวิธีการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรให้มีสารสำคัญอย่างสม่ำเสมอและมีปริมาณมากเพียงพอ ที่จะนำมาผลิตในระดับในอุตสาหกรรมยาได้ต่อไปในอนาคต และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญควบคู่ไปกับการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช เป็นแหล่งข้อมูลสำคัญและประโยชน์ทางด้านวิชาการ โดยเฉพาะเพื่อแสดงถึงความมั่นคงทางด้านความหลากหลายของพืชที่มีอยู่ในประเทศไทย พร้อมทั้งมีข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านพืชอาหารของชุมชน และในเชิงพาณิชย์

การวิจัยในปัจจุบันมุ่งเน้นศึกษาสารสำคัญต่างๆในพืช ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย การนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการกำจัดแมลง และการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในทางการแพทย์เพิ่มมากขึ้น ประเทศไทย มีความหลากหลาย

ทางด้านพืช ในการวิเคราะห์หาสารสำคัญในพืชนั้นมีการวิจัยอย่างกว้างขวางในหลายๆ หน่วยงาน ซึ่งกรมวิชาการเกษตร ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชได้เล็งเห็นความสำคัญต่อพืชที่ได้มีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช ที่ยังขาดข้อมูลเหล่านี้เพื่อประโยชน์ใช้ในการจัดทำฐานข้อมูล ทั้งในด้านการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์พืช และการค้า ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยประเมินสารสำคัญ และการใช้สารชักนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืช เช่น **กวาวเครือขาว ถั่วเหลือง ถั่วสกุล Phaseolus หนอนตายหยาก เท้ายายม่อม จิงจูฉ่าย และพลูคาว** ปัจจุบันความต้องการใช้วัตถุดิบจากหัวกวาวเครือขาว หนอนตายหยาก เท้ายายม่อม และจิงจูฉ่าย เป็นที่ต้องการของตลาด ส่วนใหญ่ได้จากการเก็บจากธรรมชาติ ทำให้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในอนาคต ข้อมูลน้อยที่บ่งชี้ถึงความมีอยู่ของพืชในประเทศไทย ข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ ปริมาณสาระสำคัญ การวิเคราะห์หาปริมาณฟาซิโอลามินของถั่วสกุล Phaseolus ที่จัดเก็บในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร เพื่อทราบข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์และปริมาณ พฤกษเคมีนี้แล้ว จะทำให้เกิดความสะดวกในการใช้ประโยชน์จากเมล็ดพันธุ์พืชที่อนุรักษ์ไว้ มีผลต่อการส่งเสริมการปลูกเมล็ดถั่วเพื่อนำมาสกัดให้ได้พฤกษเคมีเป็นการเพิ่มมูลค่าในตัวผลิตผลทางการเกษตรสร้างรายได้แก่เกษตรกรหลังการทำนา ศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิ หรือสาระสำคัญที่มีในพืชสมุนไพร และพืชอาหาร แต่ละชนิดที่ทำการเก็บรวบรวมไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช เพื่อเป็นฐานข้อมูลของนักปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกพันธุ์ที่จะนำไปใช้ในทางการค้าได้ในอนาคต ในโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 2 ประการ คือ

1. ศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิ/สาระสำคัญ (ปริมาณพฤกษเคมี) : พิวรารินในหัวกวาวเครือขาว (เพื่อเป็นแหล่งข้อมูลทางการผลิตเพื่อการค้า สำหรับนักวิจัยและผู้ที่มีความสนใจพืชสมุนไพร) ฟาซิโอลามินของถั่วในสกุล Phaseolus (ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช) สาระสำคัญ/สารอัลคาลอยด์ จากรากต้นหนอนตายหยาก (ที่ได้จากการเก็บรวบรวมเพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช) ปริมาณแป้งต้านทานการย่อย โปรตีนจากหัวเท้ายายม่อม และสารในกลุ่ม terpeniod ของสมุนไพรจิงจูฉ่าย ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นฐานข้อมูลของธนาคารเชื้อพันธุพืชสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต
2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม terpeniod ของสมุนไพรจิงจูฉ่าย และการใช้สาร methyl jasmonate และ salicylic acid เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณสาร quercitrin และ rutin ในพลูคาว 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ก้านม่วงและพันธุ์ใบเขียวในสภาพปลอดเชื้อในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเป็นแหล่งข้อมูล ทางการผลิตเพื่อการค้าและใช้ประโยชน์ในด้านการวิจัย รวมทั้งผู้ที่มีความสนใจผลิตสมุนไพรชนิดนี้ในด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคต

ภายใต้โครงการวิจัยที่ 2 การประเมินคุณค่าและการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมพืช ประกอบด้วย 7 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1. การประเมินพิวรารินในหัวกวาวเครือขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (ปีเริ่มต้นปีงบประมาณ 2562 – สิ้นสุดปีงบประมาณ 2564)

การทดลองที่ 2. การใช้เทคนิค NIR ในการทำนายปริมาณไอโซฟลาโวนในเมล็ด เพื่อประเมินคุณค่าเชื้อพันธุ์ถั่วเหลืองในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (ปีเริ่มต้นปีงบประมาณ 2559 – สิ้นสุดปีงบประมาณ 2561)

การทดลองที่ 3. การประเมินลักษณะประจำพันธุ์และพฤกษเคมี (Phaseolamin) ในถั่วสกุล Phaseolus ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (ปีเริ่มต้นปีงบประมาณ 2562 – สิ้นสุดปีงบประมาณ 2564)

การทดลองที่ 4. การศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิจากรากหนอนตายหยากที่ได้จากการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช (ปีเริ่มต้นปีงบประมาณ 2562 – สิ้นสุดปีงบประมาณ 2564)

การทดลองที่ 5. วิเคราะห์ปริมาณแป้ง และโปรตีนในหัวเท้ายายม่อมเพื่อการอนุรักษ์ (ปีเริ่มต้นปีงบประมาณ 2563 – สิ้นสุดปีงบประมาณ 2564)

การทดลองที่ 6. การเพิ่มปริมาณสาระสำคัญในกลุ่ม terpenoid จากต้นจิงจูฉ่ายโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ปีเริ่มต้นปีงบประมาณ 2563 – สิ้นสุดปีงบประมาณ 2564)

ส่วนวิชาการ

การทดลองที่ 7. การเพิ่มปริมาณสารสำคัญเคอร์ซิตรินและรูตินจากต้นพลูคาวโดยใช้สารกระตุ้น
(ปีเริ่มต้นปีงบประมาณ 2564 – สิ้นสุดปีงบประมาณ 2564)

## บทคัดย่อ

ภายใต้โครงการวิจัยการประเมินคุณค่าและการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมพืช มีการทดลองหาสารสำคัญในพืช ที่ดำเนินการในปี พ.ศ. 2559 – 2564 รวมทั้งสิ้น 7 การทดลอง โดยศึกษาพืชในพืช 7 ชนิด ดังนี้ กวาวเครือขาว ถั่วเหลือง ถั่วสกุล Phaseolus หนอนตายหยาก เท้ายายม่อม สมุนไพรจิงจูฉ่าย และพลูคาว พบว่ากวาวเครือขาวเก็บเกี่ยวที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก มีปริมาณของ puerain daidzein และgenistein สูง คือ 80.66, 24.15 และ 0.26 มก./ ตัวอย่าง 100 กรัมตามลำดับ ทั้งนี้ระยะเวลา และช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวมีผลต่อปริมาณสารสำคัญในกวาวเครือขาว การใช้เทคนิค NIR สามารถทำนายปริมาณสารไอโซฟลาโวนในเมล็ดถั่วเหลืองที่จัดเก็บในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรรมวิชาการเกษตรได้ จากการวิเคราะห์สารสกัดถั่วสกุล Phaseolus ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่า–อะไมเลสได้ร้อยละ 13-31 ที่ความเข้มข้น 12.5 มก./มล. โดยถั่ว TML 92 (2) และถั่วนิ้วนางแดงสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงที่สุด สารสกัดถั่วทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่า–กลูโคซิเดส ได้ร้อยละ 6-60 ที่ความเข้มข้น 12.5 มก./มล. โดยถั่วเหลือง สจ.5 และ ชม.60 สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงกว่าถั่วชนิดอื่นๆ และสารสกัดถั่วทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4 ได้ร้อยละ 12-52 ที่ความเข้มข้น 12.5 มก./มล. โดยถั่วเขียวชัยนาท 4 ชัยนาท 84-1 และถั่วบอย สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงกว่าถั่วชนิดอื่นๆ จากการทดลองจำแนกชนิดหนอนตายหยาก (species) ได้ 5 ชนิด ได้แก่ *Stemona curtisii* Hook. f., *S. collinsiae* Craib., *S. tuberosa* Lour., *S. rupestris* Inthachub., และ *S. pierrei* Gagnep และยังไม่สามารถจำแนกได้ 1 ชนิด ทั้งนี้รากหนอนตายหยาก *S. rupestris* Inthachub. จาก อ.เขาวง จ. กาฬสินธุ์ ให้ปริมาณสาร stemocurtisine สูงที่สุด (1.68% w/w) ในขณะที่รากหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. จาก จ. กาญจนบุรี ให้ปริมาณสาร stemofoline สูงที่สุด (1.65% w/w) เท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัด ให้ผลผลิตน้ำหนักหัวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เท้ายายม่อมจากจ.จันทบุรี มีน้ำหนักหัวสูงสุด (416.88 ก.) แต่ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมที่แปรรูปไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ [พันธุ์จากจ.อุบลราชธานีสูงสุด (220.37 ก./นน.สด 1 กก.] และปริมาณคาร์โบไฮเดรตและ โปรตีน จากแป้งเท้ายายม่อมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ การเพิ่มปริมาณสารสำคัญต้นจิงจูฉ่ายในสภาพปลอดเชื้อได้ โดยใช้ salicylic acid 0.1 mM เป็นเวลานาน 1 วัน มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสาร total terpenoid มากที่สุด (23.05 มก./100ก. คิดเป็น 2 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ) และ การกระตุ้นด้วย salicylic acid 0.5 mM เป็นเวลานาน 3 วัน มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสาร ascorbic acid มากที่สุด (6.6 มก./100ก. คิดเป็น 2.2 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ) การเพิ่มปริมาณสารเคอร์ซิตรินและรูตินในต้นพลูคาวก้านม่วงในสภาพปลอดเชื้อคือสูตรอาหาร MS + กรดซาลิไซลิก 0.50 mM (6.46±1.08 และ 0.59±0.08 มก./ก. ตามลำดับ)

กรมวิชาการเกษตร

# Abstracts

Evaluation and Utilization of Plant Germplasm Research Project, have been experiments to find important substances in plants. There were conducted in the years 2016 – 2021. It had 7 experiments, conducted on 7 plant species as follows: *Pueraria candollei* var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham (White Kawo Krua), soybean, bean (Phaseolus spp.), *Stemona* sp., *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze. (arrowroot) , *Artemisia lactiflora* (white mugwort) and *Houttuynia cordata* Thunb (Plu Kao).

The showed that White Kawo Krua was harvested at 9 months after planting with high content of puerain, daidzein and genistein, 80.66, 24.15 and 0.26 mg/100 g sample, respectively. In the harvest affects the amount of important substances. Using the NIR technique, it was possible to predict isoflavone content in soybean seeds stored in Gene Bank of DOA. All of the bean (Phaseolus spp.) from the genebank extracts can inhibit alpha-amylase by 13-31% at concentrations of 12.5 mg/ml, with TML 92 (2) and red-fingered bean being the highest inhibition. In addition, it was found that all of the bean extracts were inhibit the alpha-glucosidase enzyme by 6-60% at the concentration of 12.5 mg/ml, with SJ5 and SJ60 of soybean being inhibit enzymes higher than other types of beans. From the experimental results was shown that all bean extracts were inhibited dipeptidyl-peptidase-4 enzyme by 12-52% at the concentration of 12.5 mg/ml by Chainat 4 mung beans, Chainat 84-1 black gram and boy bean have inhibited the enzyme higher than other beans. Five species of *Stemona* sp. were identified, namely *S. curtisii* Hook. f., *S. collinsiae* Craib., *S. tuberosa* Lour., *S. rupestris* Inthachub, *S. pierrei* Gagnap., and 1 unknown (*Stemona* sp.). *Stemona* alkaloids, stemocurtisine and stemofoline, were extracted and detected. Root extract from *S. rupestris* Inthachub from Khao Wong District, Kalasin Province yielded the highest amount of stemocurtisine (1.68% w/w), while *S. collinsiae* Craib. from Kanchanaburi Province yielded the highest amount of stemofoline (1.65% w/w). Arrowroot from all six provinces had significantly different weight yields of tubers. Arrowroot from Chanthaburi Province had the highest head weight (416.88 g.). But the quantity of arrowroot processed was not statistically different. The starch of arrowroot from Ubon Ratchathani variety was highest (220.37 g./fresh 1 kg. weight). Carbohydrate and protein of starch by arrowroot from all 6 provinces were not statistically different. Salicylic acid has efficiency to stimulant on white mugwort under sterile conditions for enhancement of terpenoid content and ascorbic acid. The use of 0.1 mM salicylic acid as an elicitor for one day resulted in a total terpenoid content of 23.05 mg/100g, was 2 times higher than that of field-grown plants. The use of 0.5 mM salicylic acid as an elicitor for three day resulted in a ascorbic acid of 6.6 mg/100g, was 2.2 times higher than that of field-grown plants. A suitable formula for increasing the quercitrin and rutin content in sterile purple stalk plums was MS + 0.50 mM of salicylic acid (6.46±1.08 and 0.59±0.08 mg/g. respectively).


**การทดลองที่ 1**

**การประเมินพิวรารินในหัวกวาวเครือขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช**

กรมวิชาการเกษตร

# Evaluation of Puerarin Found in Tuber Root of White Kawo Krua from Tissue Culture Collection of Gene Bank

**สุพินญา บุญมานพ ปาริฉัตร สังข์สะอาด อัสนี ส่งเสริม และบุญร่วม คิดค้า**
Suphinya Bunmanop, Parichat Sangkasa-ad, Assanee Sogserm and Bunruam Khika

**คำสำคัญ:** กวาวเครือขาว, พิวรารินี
**Key words:** White Kawo Krua, puerarin

## บทคัดย่อ

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham] เป็นพืชสมุนไพรที่ไทยที่ใช้ประโยชน์กันทั้งในรูปแบบของยา อาหารเสริม และเครื่องสำอาง การวิจัยนี้ดำเนินการ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี ในเดือน มิถุนายน 2561 โดยวางแผนการทดลองแบบบลอกสุ่มสมบูรณ์ (RCB) จำนวน 4 ซ้ำ (blocks) มี 4 กรรมวิธี คือ เก็บเกี่ยวกวาวเครือขาวเมื่ออายุ 12, 15, 18 และ21 เดือนหลังปลูกลงแปลง พบว่า การเก็บเกี่ยวกวาวเครือขาว ที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก มีปริมาณของ puerain daidzein และ genistein สูง คือ 80.66, 24.15 และ 0.26 มก./ ตัวอย่าง 100 กรัมตามลำดับ การวิจัยนี้เป็นไปได้ว่า ระยะเวลาและช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวมีผลต่อปริมาณสารสำคัญ

## Abstracts

White Kawo Krua [*Pueraria candollei* var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham] is a Thai medicinal plant that is used in the form of medicine, dietary supplement and cosmetic. This research was carried out at the Agricultural Research and Development Center, Kanchanaburi in June 2018. A complete randomized (RCB) experiment was planned with 4 replications (blocks) with 4 treatments: white Kwao Kruea was harvested at the age of 12, 15, 18 and 21 months after planted in the field. White Pueraria was harvested at 9 months after planting with high content of puerain, daidzein and genistein, 80.66, 24.15 and 0.26 mg/100 g sample, respectively. In the harvest affects the amount of important substances.

กรมวิชาการเกษตร

## บทนำ

กวาวเครือขาว เดิมชื่อวิทยาศาสตร์ *Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Ariy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham ปัจจุบันถูกจัดชื่อใหม่โดย The International Legume Database and Information Service (ILDIS) เปลี่ยนเป็น [*Pueraria candollei* var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham] (ITDIS, 2010) มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Pueraria candollei* Grah. หรือที่เรียกว่า เครือเขาปู่ หรือตาลานเครือ ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae อนุวงศ์ Papilionoideae (ภาพที่ 2.1.1) ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ.2518 ได้กำหนดให้กวาวเครือขาวเป็นพืชสงวน พืชชนิดนี้มีชื่อท้องถิ่นแตกต่างกันเช่น กาวเครือ จาน

เครือ กวาวเครือขาว ทองเครือ ตานจอมทอง กวาวหัว ตาลานเครือ จอมทอง เป็นต้น (วุฒิ, 2540) สารสำคัญที่พบในหัวกวาวเครือขาวได้แก่ สารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชทั่วไป มีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง เช่น เป็นรงควัตถุ เป็น signaling molecule เป็นสารป้องกัน หรือต่อต้านความเครียดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต และเป็นสารดึงดูดแมลงเพื่อช่วยผสมเกสรของพืช (Wade et al., 2003)

สารสำคัญในหัวกวาวเครือขาวแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม (รุจน์, 2547; Ingham et al., 1994) คือ

กลุ่ม 1 Isoflavones ได้แก่ daidzein, genistein, kawakhurin และ kawakhurin hydrate ทำหน้าที่คล้าย hormone estrogen ซึ่งสารธรรมชาติที่ได้จากพืชเรียกว่า phytoestrogens มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เอสโทรเจนิกช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่ผิวชั้นบนสุดของหนังกำพร้า และเพิ่มความหนาแน่นของเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibers) ช่วยลดอาการในสตรีวัยทอง ช่วยให้กระดูกแข็งแรง ป้องกันโรคกระดูกพรุน เป็นต้น (รุจน์, 2547)

กลุ่ม 2 Isoflavone glycosides ได้แก่ daidzin, genistin, puerarin, mirificin และ puerarin-6-monoacetate เป็นอนุพันธุ์ของ isoflavone ที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีหน้าที่ป้องกันโรคกระดูกพรุน กระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ป้องกันโรคหลอดเลือดแข็งตัว ใช้รักษาอาการติดสุราเรื้อรัง รักษาโรคเบาหวาน เป็นต้น (รุจน์, 2547)

กลุ่ม 3 Coumestans ได้แก่ coumestrol, mirificoumestan, mirificoumesta glycol และ mirificoumestan-hydrate เป็นสารธรรมชาติในกลุ่ม phytoestrogen หน้าที่ป้องกันโรคมะเร็ง เป็นต้น (รุจน์, 2547, Stadbauer and Kappe, 1993)

กลุ่ม 4 Chromene ได้แก่ miroestrol และ deoxymiroestrol ซึ่ง miroestrol เป็นสารที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน พบเป็นปริมาณ 0.002-0.003% ของน้ำหนักหัวแห้ง miroestrol เป็นสารออกฤทธิ์ชนิดแรกที่สกัดได้จากรากสะสมอาหารกวาวเครือขาว และออกฤทธิ์แรงที่สุด ทำหน้าที่ป้องกันโรคมะเร็ง ทำให้ช่องคลอดของสัตว์เพศเมียวัยก่อนเจริญพันธุ์มีขนาดขยายใหญ่ เป็นต้น (รุจน์, 2547, Jones and Pope, 1960)

กลุ่ม 5 Steroids ได้แก่ β-sitosterol และ stigmasterol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ 2 ชนิด คือ MCF-7 และ MDA-MB-231 เป็นต้น (รุจน์, 2547, Awad et al., 2007)

กลุ่ม 6 สารอื่น ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสไขมันโปรตีน ใยอาหาร แอลกอฮอร์ แคลเซี่ยม และฟอสฟอรัส

กรมวิชาการเกษตร

**ภาพที่ 2.1.1** ดอกฝัก เมล็ด และหัวกวาวเครือขาว (ถ่ายภาพจาก ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี)

จากปริมาณความต้องการใช้วัตถุดิบจากหัวกวาวเครือขาว ทั้งทางด้านงานวิจัย และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ ส่วนใหญ่ได้จากการเก็บจากธรรมชาติ จึงได้มีประกาศพระราชบัญญัติ ทั้งพ.ร.บ. คุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 ของกรมวิชาการเกษตร ให้กวาวเครือขาวเป็นพืชสงวน และพ.ร.บ. คุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย พ.ศ. 2542 ของสถาบันการแพทย์แผนไทย ให้กวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรควบคุม ซึ่งในสภาพธรรมชาติมีการกระจายพันธุ์ด้วยเมล็ด แต่ประสบปัญหาของการถูกทำลายด้วยศัตรูธรรมชาติ ปัญหาการเกิดไฟป่า การถูกบุกรุกจากการขยายตัวของสังคมเมือง และลักลอบขุดขายของชาวบ้านทำให้ไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ได้ อีกทั้งสรีรวิทยาของกวาวเครือขาวออกดอกและติดฝัก เมื่ออายุ 8-18 เดือน (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ทั้งนี้กวาวเครือขาวสามารถติดเมล็ดปีละครั้ง จึงทำให้กวาวเครือขาวเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ได้

ซึ่งการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในหัวกวาวเครือขาว และการนำต้นกวาวเครือขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกมีข้อมูลรายงานน้อย ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยโดยใช้สารชักนำเพื่อเพิ่มปริมาณพิวรารินในหัว

กวาวเครือขาว ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ และจะเป็นพื้นฐานความรู้ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางเศรษฐกิจต่อไปในอนาคต

**การทบทวนวรรณกรรม**

การวิเคราะห์สารสำคัญใน**กวาวเครือขาว** ประสาร (2546) พบว่าการฉีดพ่นสารละลายทองแดงให้กับกวาวเครือขาว ทำให้ปริมาณ daidzein และ genistein ในรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวมีปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ความเข้มข้น 300 ppm มีการสะสม daidzein และ genistein ในรากสะสมอาหารกวาวเครือขาวมากที่สุด สารประกอบทองแดงในรูปของ $CuCl_2$, $CuSO_4$ และ Cu-EDTA ทำให้การสะสม daidzein และ genistein ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และพรทิพย์ (2547) พบว่าการฉีดพ่นกวาวเครือขาวด้วย $CuCl_2$ 1,000 ppm, $MnCl_2$ 1,000 ppm และ $FeCl_2$ 1,000 ppm สามารถชักนำการสะสมสาร comestrol ในกวาวเครือขาวเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะการฉีดพ่นด้วย $CuCl_2$ 1,000 ppm ให้ปริมาณ comestrol สูงสุด ในปี 2550 วิโรจน์ พบว่าการฉีดพ่นด้วย Zn ที่ความเข้มข้น 0 (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น), 50, 100, 200 และ 300 mg/L (0, 50, 100, 200 และ 300 ppm ตามลำดับ) ให้ปริมาณ puerarin เท่ากับ 87.7, 113.0, 129.0, 194.3 และ 146.3 µg/gDW ตามลำดับ และการฉีดพ่นด้วย Zn ที่ความเข้มข้น 200 mg/L (200 ppm) ทำให้กวาวเครือขาวมีการสะสม puerarin มากที่สุด ในขณะที่บุญร่วม (2551) พบว่าการใช้ chitosan ที่ความเข้มข้น 1,000 mg/L (1,000 ppm) ร่วมกับ $CuCl_2$ ที่ความเข้มข้น 200 mg/L (200 ppm) ทำให้ปริมาณของ puerarin และgenistein ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนมีปริมาณสูงที่สุดและแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมี puerarin เท่ากับ 423 และ 386 µg/gDW และมี genistein เท่ากับ 22.6 และ 22.4 µg/gDW และสุพินญา (2553) พบว่าการใช้ yeast extract ที่ความเข้มข้น 2,000 ppm สามารถชักนำให้ปริมาณของ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวสูงสุด คือ 169.32 µg/gDW ในสภาพแปลงปลูก ในปี 2550 รายงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตร ศึกษาผลของสภาพแวดล้อมต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต และสารสำคัญในหัวกวาวเครือขาวเมื่อปลูกในสถานที่ 3 แห่ง (จังหวัดกาญจนบุรี ลำปาง และลพบุรี) พบว่า ปริมาณสาร genistin ในหัวกวาวเครือขาวพบสูงสุดที่จ. ลำปาง รองลงมาคือที่ จ.ลพบุรี และจ.กาญจนบุรี (22.50, 16.90 และ 12.16 mg/100g. dry wt. ตามลำดับ) ที่อายุเก็บเกี่ยว 1.5 และ 3 ปี ให้สาร genistin สูงสุด 23.86 และ 26.52 mg/100g. dry wt. และปริมาณสาร coumestrol ในหัวกวาวเครือขาว พบสูงสุดที่ จ.ลพบุรี รองลงมาคือ จ.ลำปาง และจ.กาญจนบุรี เท่ากับ 5.88, 5.60 และ3.27 mg/100g. dry wt. ตามลำดับ ที่อายุเก็บเกี่ยว 1.5 และ 3 ปี .ให้สาร coumestrol สูงสุด 17.29 mg/100g. dry wt.

**วัตถุประสงค์**

**เพื่อศึกษาสารพิวรารินในกวาวเครือขาวที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อายุการเก็บเกี่ยวต่างกัน**

## ระเบียบวิธีการวิจัย

**สถานที่ทำการวิจัย** : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี

**ระยะเวลาที่ดำเนินการ** : ปีที่เริ่มต้น 2559 ปีที่สิ้นสุด 2564

**วิธีการดำเนินการ**

-วิธีปฏิบัติการทดลอง

**1.1 การขยายพันธุ์กวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ**

สนับวิชาการเกษตร

นำเมล็ดกวาวเครือขาว มาล้างทำความสะอาดโดยผ่านน้ำไหล และล้างด้วยน้ำยาทำความสะอาดหรือผงซักฟอก 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดจนหมดคราบผงซักฟอก วางผึ่งไว้ให้หมาด เริ่มฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 70 % ประมาณ 10 วินาที แล้วนำไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 % ที่เติม tween 20 จำนวน 2 หยดเขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว นำเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS + IAA 0.1 mg/l + BA 2 mg/l นำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นในอาหารสูตร MS + IAA 0.5 mg/l + BA 1.5 mg/l และ MS + IAA 1 mg/l + BA 3 mg/l จากนั้นเพิ่มจำนวนและชักนำให้เกิดรากโดยสารเร่งการเจริญเติบโต และปริมาณน้ำตาล NAA 1 mg/l น้ำตาลร้อยละ 2 ในอาหารสูตร WPM ที่มีอาหารสูตร MS SH และ WPM

**1.2 กวาวเครือขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ลงปลูกในแปลง**

ต้นกวาวเครือขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขั้นตอนที่1 ออกปลูกในโรงเรือนทดลอง เพื่อเตรียมความพร้อมก่อนนำลงปลูกในแปลงทดลอง ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี ในเดือนสิงหาคม 2562 โดยวางแผนการทดลองแบบ บลอกสุ่มสมบูรณ์ (RCB) จำนวน 4 ซ้ำ (blocks) มี 4 กรรมวิธี คือ เก็บเกี่ยวกวาวเครือขาวเมื่ออายุ 9, 12, 15 และ18 เดือนหลังปลูกในแปลง

ปรับสภาพพื้นที่โดยใช้ปุ๋ยคอกอัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ ใช้ต้นกวาวเครือขาว ซึ่งได้จากการเพาะเนื้อเยื่อเพื่อการอนุรักษ์ ลงปลูกในแปลงทดลอง ระยะปลูก 2 เมตร x 2 เมตร ใส่ปุ๋ยทุกๆ 6 เดือน เมื่ออายุครบ 6, 12, 18 และ 24 เดือนหลังปลูกในแปลง เก็บตัวอย่างของหัวกวาวเครือขาว ในแต่ละทรีตเมนต์ ล้างน้ำให้สะอาด ปอกเปลือกหัวกวาวเครือขาว เอาเฉพาะเนื้อสีขาวข้างใน หั่นหัวกวาวเครือขาวเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบลมร้อน ที่ 50°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด

กรรมวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบบลอกสุ่มสมบูรณ์ (RCB) จำนวน 5 ซ้ำ (blocks) มี 4 กรรมวิธี คือ เก็บเกี่ยวกวาวเครือขาวเมื่ออายุ 9, 12, 15 และ 18 เดือนหลังปลูกในแปลง

**1.3 การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการในกวาวเครือขาว (2562-2564)**

การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของกวาวเครือขาวสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบหลักในอาหาร ซึ่งได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ความชื้น เถ้า และใยอาหารทั้งหมด การทดสอบใช้วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหารของ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International 2019

**1.4 การตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญในกวาวเครือขาว (2562-2564)**

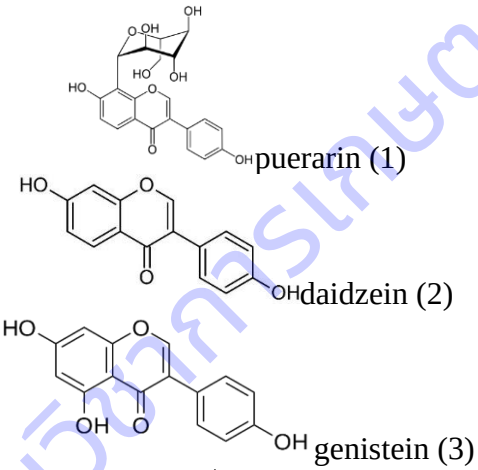
การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของตัวอย่างจากกวาวเครือขาว เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในกวาวเครือขาว โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์สำหรับเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ยี่ห้อ Waters รุ่น Delta 600 ตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจวัด Waters 2996 Photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ด้วยคอลัมน์ชนิด HPLC C18 column (C18; 25 cm x 4.6 mm, 10 mm) และใช้ปริมาณตัวอย่างในการฉีดวิเคราะห์ 10 มิลลิลิตร โดยเลือกใช้ระบบตัวทำละลายในการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1.1

**ตารางที่ 2.1.1** ระบบตัวทำละลายสำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของตัวอย่างจากกวาวเครือขาว

กรมวิชาการเกษตร

| เวลา (นาที) | ร้อยละโดยปริมาตรของตัวทำละลาย (v/v) | | อัตราการไหล (มล./นาที) |
|---|---|---|---|
| | 0.01 โมล/ล. กรดอะซิติกใน อะซิโตไนไตรล์ | 0.01 โมล/ล.กรดอะซิติกในน้ำ (Milli-Q water) | |
| 5 | 25 | 75 | 1.0 |
| 10 | 30 | 70 | 1.0 |
| 20 | 50 | 50 | 1.0 |
| 30 | 85 | 15 | 1.0 |
| 40 | 100 | 0 | 1.0 |

การตรวจสอบชนิดและปริมาณสารสำคัญประเภทสารประกอบไอโซฟลาโวนส์ (isoflavones) ที่พบในกวาวเครือขาว ซึ่งได้แก่ puerarin (1) daidzein (2) และ genistein (3) โดยสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดมีโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 2.1.2 และการวิเคราะห์เชิงปริมาณนั้นทำได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (1) – (3) คิดเป็นปริมาณของสารสำคัญ (มิลลิกรัม) ต่อสารตัวอย่างจากกวาวเครือขาว 100 กรัม




**ภาพที่ 2.1.2** สารประกอบไอโซฟลาโวนส์ (isoflavones) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างจากกวาวเครือขาว

กรมวิชาการเกษตร

## ผลการวิจัย (Results)

กวาวเครือขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในแปลงทดลอง ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี มีการเจริญเติบโตที่อายุ 3, 6, และ9 เดือนหลังปลูกมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 0.98, 1.51, และ 2.22 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 2.1.2) และภาพแสดงกวาวเครือขาวในแปลงปลูกที่อายุ 3, 6 และ 9 เดือนหลังปลูก ดังภาพที่ 2.1.3-2.1.5 ตามลำดับ

**ตารางที่ 2.1.2** ข้อมูลการเจริญเติบโตกวาวเครือขาว : เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นที่อายุ 3, 6 และ 9 เดือนหลังปลูก

| กรรมวิธีที่ | เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นกวาวเครือขาว (ซม.) | | |
|---|---|---|---|
| | อายุ 3 เดือน | อายุ 6 เดือน | อายุ 9 เดือน |
| **1.เก็บเกี่ยวหัวกวาวเครือขาวที่อายุ 9 เดือน** | 1.18 | 1.49 | 2.20 |
| **2.เก็บเกี่ยวหัวกวาวเครือขาวที่อายุ 12 เดือน** | 0.88 | 1.64 | 2.54 |
| **3.เก็บเกี่ยวหัวกวาวเครือขาวที่อายุ 15 เดือน** | 0.72 | 1.50 | 1.84 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **4.เก็บเกี่ยวหัวกวาวเครือขาวที่อายุ 18 เดือน** | 1.15 | 1.41 | 2.31 |
| **ค่าเฉลี่ย** | **0.98** | **1.51** | **2.22** |

**ภาพที่ 2.1.3** แปลงกวาวเครือขาว ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี ที่อายุ 3 เดือนหลังปลูก (ธันวาคม 2562)

**ภาพที่ 2.1.4** แปลงกวาวเครือขาว ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี ที่อายุ 6 เดือนหลังปลูก (มีนาคม 2563)

**ภาพที่ 2.1.5** แปลงกวาวเครือขาว ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี ที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก (มิถุนายน 2563)

ดำเนินการเก็บเกี่ยวกวาวเครือขาวที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก (มิถุนายน 2563) และ 12 เดือนหลังปลูก (กันยายน 2563) ดังแสดงในภาพที่ 2.1.6 และ 2.17 หลังจากนั้นแปรรูปตาก อบ บด และการแปรรูปกวาวเครือขาวอบแห้ง (ภาพที่ 2.1.8) ก่อนบดละเอียดเพื่อนำส่งวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ

**ภาพที่ 2.1.6** หัวกวาวเครือขาวที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก (มิถุนายน 2563)

**ภาพที่ 2.1.7** หัวกวาวเครือขาวที่อายุ 12 เดือนหลังปลูก (กันยายน 2563)

**ภาพที่ 2.1.8** ขั้นตอนอบแห้งกวาวเครือขาวและบดละเอียดก่อนส่งวิเคราะห์

**การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของกวาวเครือขาว** ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ความชื้น เถ้า และใยอาหารทั้งหมด โดยวิธีการการทดสอบตามมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหารของ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International 2019 โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบหลักในอาหารแสดงได้ดังตารางที่ 2.1.3

**ตารางที่ 2.1.3** ปริมาณของสารประกอบหลักในอาหารของตัวอย่างจากกวาวเครือขาวต่อปริมาณสารตัวอย่าง 100 กรัม

| กรรมวิธี | ปริมาณของสารประกอบ (กรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | คาร์โบไฮเดรต | ไขมัน | โปรตีน | ความชื้น | เถ้า | ใยอาหารทั้งหมด |
| **1. อายุ 9 เดือนหลังปลูก** | 61.22 | 0.93 | 9.67 | 14.91 | 13.06 | 18.72 |
| **2. อายุ 12 เดือนหลังปลูก** | 71.82 | 1.21 | 5.84 | 10.81 | 11.25 | 9.08 |

**การตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญในกวาวเครือขาว** ประเภทสารประกอบไอโซฟลาโวนส์ (isoflavones) ที่พบในกวาวเครือขาว ซึ่งได้แก่ puerarin, daidzein และ genistein พบว่า ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณพิวรารินและปริมาณ daidzein ในหัวกวาวเครือขาว ที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก มีค่าปริมาณ puerarin daidzein และ genistein สูงสุด (80.66, 24.15 และ 0.26 มิลลิกรัม/กวาวเครือขาวแห้ง100กรัม ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 2.1.4

**ตารางที่ 2.1.4** ชนิดและปริมาณของสารสำคัญ puerarin (1), daidzein (2) และ genistein (3) ในตัวอย่างจากกวาวเครือขาว

| กรรมวิธี | ปริมาณสารสำคัญ (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม) | | |
|---|---|---|---|
| | puerarin (1) | daidzein (2) | genistein (3) |
| **1. อายุ 9 เดือนหลังปลูก** | 80.66 | 24.15 | 0.26 |
| **2. อายุ 12 เดือนหลังปลูก** | 55.42 | 14.74 | 0.16 |

กรมวิชาการเกษตร

## อภิปรายผล (Discussion)

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของสมุนไพร คือปริมาณสารสำคัญ หรือสารที่ออกฤทธิ์ทางยาของสมุนไพร ซึ่งโดยทั่วไปมีผลมาจากกรรมพันธุ์ ระยะเวลาการเจริญเติบโต สภาพแวดล้อม (สภาพของดิน ปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ ความสูงจากระดับน้ำทะเล ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว และการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว จากข้อมูลการวิจัยอายุการเก็บเกี่ยวน่าจะมีผลต่อปริมาณสารสำคัญของกวาวเครือขาว แต่เนื่องจากอายุที่น้อยเกินไปจึงทำให้ไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน แต่ผลการวิจัยนี้พบว่า ปริมาณของ puerain และ daidzein ที่อายุ 9 เดือนหลังปลูกนั้น มีปริมาณ 80.66 และ 24.15 มก./ ตัวอย่าง 100 กรัมตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าปริมาณจากตัวอย่างกวาวเครือขาวจากแหล่งต่างๆ ในจ.เชียงรายด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสุรพจน์ วงศ์ใหญ่ ในรายงานการวิจัยของปราโมทย์ และคณะ (2548) แต่ปริมาณ genistein มีปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งความแตกต่างของพื้นที่ทำให้ปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน แต่ในการศึกษาในระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่ต่างกันนั้นยังมีข้อมูลการศึกษาที่น้อย ปราโมทย์ และคณะ (2548) ศึกษากวาวเครือขาวจาก อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ และจ.ลำปาง พบว่า ทุกตัวอย่างมีสารในกลุ่ม isoflavanoids ได้แก่ daidzein, genistein, coumestrol และ daizin เป็นองค์ประกอบโดยสรุปว่าปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของกวาวเครือขาว ได้แก่ แหล่งที่มาของวัตถุดิบ อายุ และขนาด ในการวิจัยนี้จึงเป็นไปได้ว่า ระยะเวลา และช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวมีผลต่อปริมาณสารสำคัญ ซึ่งจากข้อมูลนี้จะสามารถสนับสนุนการเลือกใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพสำหรับการสกัดเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ได้ในอนาคต

**สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)**

การเก็บเกี่ยวกวาวเครือขาว ที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก มีปริมาณของ puerain daidzein และgenistein สูง คือ 80.66, 24.15 และ 0.26 มก./ ตัวอย่าง 100 กรัมตามลำดับ และมีโอกาสเป็นไปได้ว่า ระยะเวลา และช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวมีผลต่อปริมาณสารสำคัญ ควรมีการซึ่งศึกษาในต่อเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนการปลูกเพื่อในเชิงการค้า ทั้งนี้หากระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่สั้น และมีปริมาณสารสำคัญที่สูงกว่าระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ยาว ทำให้มีผลต่อผลผลิต รายได้ และใช้ประกอบการพิจารณาในการลงทุนผลิตกวาวเครือขาวในเชิงธุรกิจต่อไปในอนาคต

**การทดลองที่ 2**

# การใช้เทคนิค NIR ในการทำนายปริมาณไอโซฟลาโวนในเมล็ด เพื่อประเมินคุณค่าเชื้อพันธุ์ถั่วเหลืองในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

# Predictation of Isoflavone Content in Seeds by NIR Technique for Evaluate Soybean Germplasm in Genebank)

**พิทยา วงษ์ช้าง ปาริฉัตร สังข์สะอาด อนุวัฒน์ รัตนชัย อ้อยทิน ผลพานิช วชิรญา อิ่มสบาย สมนึก พรมแดง และ สิรินาฏ น้อยพิทักษ์**

Pitthaya Wongchang, Parichat Sangkasa-ad, Anuwat Rattanachai, Auytin Polpanit, Wachiraya Imsabai, Somnuk Promdang and Sirinad Noypitak

**คำสำคัญ:** ถั่วเหลือง, พฤกษเคมี, ไฟโตเอสโทรเจน, ไอโซฟลาโวน, เอนไออาร์

**Key words:** soybean, phytochemical, phytoestrogen, isoflavone, NIR)

**บทคัดย่อ**

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีโปรตีนและน้ำมันสูงมีการใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น เป็นอาหารของมนุษย์ ทั้งในรูปของการบริโภคโดยตรง ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และในถั่วเหลืองยังมีสารสำคัญที่มีประโยชน์ต่อร่างกายโดยเฉพาะสารไอโซฟลาโวน (isoflavones) ซึ่งเป็น พฤกษเคมี (phytochemical) ที่มีความโดดเด่น โดยมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ aglycones และ glucoside โดยไอโซฟลาโซนในรูป glucoside อยู่ในรูปอนุพันธ์ 2 ชนิดคือ malonyl และ acetyl ไอโซฟลาโวนเป็นสารโภชนเภสัชมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเป็นไฟโตเอสโทรเจนลดปัญหาที่เกี่ยวเนื่องกับอาการหลังการหมดประจำเดือน ป้องกันการเกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก โรคหัวใจและหลอดเลือด อีกทั้งช่วยรักษาความชุ่มชื้น ยืดหยุ่น และลดความเหี่ยวย่นของผิวหนัง

ปัจจุบันธนาคารเชื้อพันธุ์พืชไม่มีข้อมูลสารไอโซฟลาโวนของถั่วเหลืองในแต่ละตัวอย่างพันธุ์ และเชื่อว่าในแต่ละตัวอย่างพันธุ์มีปริมาณของสารไอโซฟลาโวนที่แตกต่างกัน ซึ่งถือว่าเป็นฐานข้อมูลเชื้อพันธุกรรมที่มีความหลากหลาย หากมีฐานข้อมูลในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชแล้วจะทำให้มีความสะดวกในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และเป็นประโยชน์ในทางการค้า ในการทดลองหาปริมาณสารไอโซฟลาโวนใช้วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และใช้เทคนิค NIR ซึ่งเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่ไม่ทำลายตัวอย่างโดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยตัวอย่าง เป็นวิธีการที่ให้ผลที่ดีและรวดเร็ว หลักการคือการสร้างสมการจากค่าสหสัมพันธ์ ระหว่าง

กรมวิชาการเกษตร

ค่าการดูดกลืนแสงที่ส่องผ่านวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์และค่าที่วิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ เมื่อได้สมการที่มีค่าความสัมพันธ์สูง ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมินต่ำก็สามารถนำสมการนี้ใช้ทำนายค่าของตัวอย่างแทนการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ในการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในถั่วเหลือง จำนวน 200 ตัวอย่าง โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR ได้สเปกตรัมของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง และได้ค่าปริมาณสารไอโซฟลาโวนจากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างสมการและปรับสมการสำหรับประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวนได้สมการ 7 สมการ และเมื่อทำการทวนสอบสมการ โดยนำตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง จำนวน 10 ตัวอย่าง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR ทำนายค่าปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด เปรียบเทียบกับค่าการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ พบว่าสมการสำหรับการประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด กับค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% จึงสรุปได้ว่าสามารถใช้เทคนิค NIR ทำนายปริมาณสารไอโซฟลาโวนในเมล็ดถั่วเหลืองได้

## Abstract

Soybean has a high protein and oil contents in the seed which has a use for human foods and foods industry. The important ingredient in soybean that was an isoflavone which was called as a phytochemical, it has two forms they were aglycones and glucoside, glucoside consist of two derivative malonyl and acetyl. Isoflavone was nutrition that were medicinal effects as antioxidants and phytoestrogen to decrease menopausal symptoms, prevent the cause of the disease such as breast cancer, prostate cancer, cardiovascular disease and also maintain moisture, elasticity and reduce skin wrinkles.

In present Genebank was lack of isoflavone content data in soybean and believe that isoflavone content in each variety was different that were important data to serve for plant breeder and commercial use in the future. The methods to use in the experiment to found isoflavone content in soybean seed were analysis from the laboratory and NIR technique, which was an undestructive seed by using light absorption that was a rapid method. The experiment uses the correlation of measure between laboratory analysis and NIR technique to create an equation, which was a select high correlation (R2) and low standard error of prediction (SEP) and uses an equation for predicted isoflavone content instead analysis from the laboratory. In the experiment, 200 accessions of soybean were extracted to found isoflavone content which was Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein and total isoflavone by using two methods to compare the isoflavones content and get the measures to form 7 equations. Validate the measures by using 10 accessions unknown of soybean to compare the measures from methods, the result showed that can be using NIR technique to predicted isoflavones content in soybean.

กรมวิชาการเกษตร

## บทนำ

ถั่วเหลืองจัดเป็นพืชที่สำคัญและเป็นพืชอาหารเก่าแก่พืชหนึ่งของโลก ชาวจีนรู้จักใช้ประโยชน์พืชนี้มานานกว่า 4,700 ปีมาแล้ว ประโยชน์ของถั่วเหลืองมีมากมายหลายประการ เช่น ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ ทั้งในรูปของการบริโภคโดยตรง ใช้ปรุงแต่งอาหารในรูปแบบต่างๆ หรือใช้ในอุตสาหกรรม นอกนั้นยังใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ทั้งนี้เพราะถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีโปรตีนและน้ำมันสูงมาก คือเมล็ดมีโปรตีนตั้งแต่ 35 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำมัน 15 ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ (กรมพัฒนาที่ดิน, มปป) ถั่วเหลืองมีสารสำคัญต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากมาย โดยเฉพาะ isoflavones นั้นเป็นสารที่พบมากในถั่วเหลือง และเป็นสารตัวหนึ่งที่โดดเด่นและน่าสนใจคือ สารไอโซฟลาโวน ในถั่วเหลืองจะอยู่ในธรรมชาติเป็น 2 รูปแบบ คือ aglycones และ glucoside โดยไอโซฟลาโซนในรูป glucoside สามารถอยู่ในรูปอนุพันธ์ 2 ชนิดคือ malonyl และ acetyl สารดังกล่าวข้างต้นจะพบในถั่วเหลืองในปริมาณที่แตกต่างกัน (วันดีและคณะ, มปป) สารไอโซฟลาโวนเป็นพฤกษเคมี (phytochemical) ที่มีสรรพคุณต่อสุขภาพ เป็นสารโภชนเภสัช มีฤทธิ์ต้านอนุมูล (antioxidant) และเป็นไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) ซึ่งทำงานคล้ายกับฮอร์โมนเพศหญิง (Estrogen, 17b-estradiol E2 Isoflavones) เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ทำให้ไดแอดเซอินสามารถจับกับโปรตีนตัวรับของเอสโตรเจน (estrogen receptor) ในร่างกายได้ สามารถใช้สารนี้ลดปัญหาที่เกี่ยวเนื่องกับอาการหลังการหมดประจำเดือน (menopausal symptoms) หรืออาจมีผลป้องกันหรือปรับเปลี่ยนภาวะความผิดปกติของร่างกายหรือการเกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็งบางชนิด โรคหัวใจและหลอดเลือด (Shimoni, 2003) อีกทั้งยังช่วยรักษาความชุ่มชื้น ยืดหยุ่น และลดความเหี่ยวย่นของผิวหนัง มีการวิจัยพบอีกด้วยว่า ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองช่วยลดและป้องกันโรคมะเร็งเต้านม และส่วนในเพศชายช่วยป้องกันและยับยั้งโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก แม้ว่ากลไกในการทำงานยังไม่ทราบแน่ชัดแต่นักวิจัยพบว่าผู้ชายที่รับประทานผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองยิ่งมากเท่าไร การเป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมากยิ่งพบน้อยลง (Good health, 2006)

ปัจจุบันในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชยังไม่มีข้อมูลของสารไอโซฟลาโวนในแต่ละตัวอย่างพันธุ์เพื่อเก็บไว้เป็นฐานข้อมูลของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช และเชื่อว่าปริมาณของสารไอโซฟลาโวนในแต่ละสายพันธุ์นั้นมีปริมาณที่ไม่เท่ากันซึ่งถือว่าเป็นฐานข้อมูลเชื้อพันธุกรรมที่มีความหลากหลาย หากมีฐานข้อมูลเหล่านี้ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชแล้วจะส่งผลทำให้เกิดความสะดวกในการใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ของนักปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงการคัดเลือกพันธุ์ที่จะนำไปใช้ในทางการค้าได้ในอนาคต ในการหาปริมาณสารดังกล่าวจะใช้วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และใช้เทคนิค NIR (Near Infrared) ซึ่งเป็นการใช้เครื่องมือวิเคราะห์โมเลกุลที่ไม่ทำลายตัวอย่างโดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างเป็นวิธีการที่ให้ผลที่ดีและรวดเร็ว หลักการของ NIR Spectroscopy คือ (หน่วยบริการทางห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, มปป) การสร้างสมการจากค่าสหสัมพันธ์ (R, R2) ระหว่างค่าการดูดซับแสง Near Infrared ที่ส่องผ่านวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนหนึ่งและค่าที่วิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ เมื่อได้สมการที่มีค่าความสัมพันธ์สูง ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard Error of Prediction, SEP) ต่ำ ก็นำสมการนี้ใช้ทำนายค่าของตัวอย่างแทนการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการต่อไป (อนุวัฒน์และคณะ, มปป)

### วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินค่าไอโซฟลาโวนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชโดยเทคนิค NIR สำหรับใช้เป็นฐานข้อมูลของธนาคารเชื้อพันธุ์พืชเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

## ระเบียบวิธีการวิจัย

**สถานที่ทำการวิจัย** : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
หน่วยวิเคราะห์วิจัยพฤกษเคมี ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

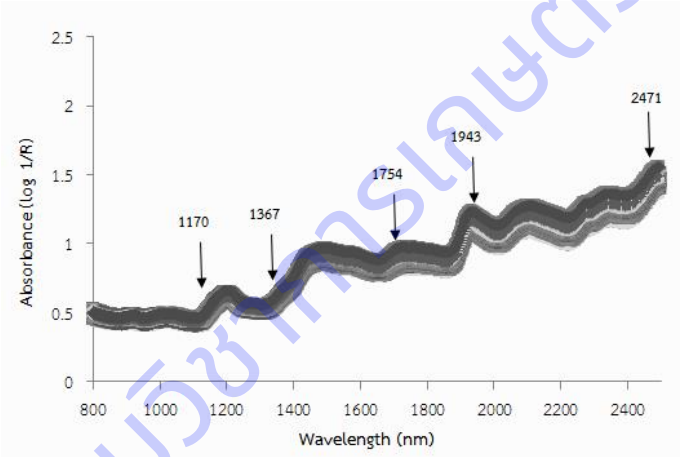
**ระยะเวลาที่ดำเนินการ** : ปีที่เริ่มต้น 2559 ปีที่สิ้นสุด 2561

**วิธีการดำเนินการ**

1. นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆที่ได้รับการปลูกฟื้นฟูจากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ บรรจุเซลล์บรรจุตัวอย่างสำหรับเมล็ดธัญพืช นำไปสแกนด้วยเครื่อง Near Infrared Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 800-2,500 nm (ภาพที่ 2.2.1) เพื่อหาปริมาณไอโซฟลาโวนในเมล็ดถั่วเหลือง ทำ 3 ซ้ำ

2. นำเมล็ดถั่วเหลืองจากข้อที่ 1 ไปวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนของถั่วเหลืองในห้อง ปฏิบัติการทำ 3 ซ้ำ

3. สร้างสมการถดถอยเชิงสมการเส้นด้วยเทคนิค partial least square regression (PLSR) โดยใช้โปรแกรม the Unscrambler ข้อมูลถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ calibration set เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นระหว่างข้อมูลปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีมาตรฐานกับข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 800-2,500 nm กลุ่มที่ 2 คือ validation set เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบสมการถดถอยเชิงเส้นในการทำนายโปรตีนของตัวอย่าง




**ภาพที่ 2.2.1** The original NIR spectra of soybean seed of 800-2500 nm.

กรมวิชาการเกษตร

## ผลการวิจัย (Results)

จากการทดลองจะได้สมการสำหรับการประเมินคาไอโซฟลาโวนทั้ง 6 ชนิด ซึ่งได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และสามารถนำเอาสมการดังกล่าวไปประเมินหาคาไอโซฟลาโวนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บอนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชได้ โดยที่ไม่ทำลายตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ซึ่งมีปริมาณจำกัด

## อภิปรายผล (Discussion)

จากการสร้างสมการและปรับสมการจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 200 ตัวอย่าง ทำ calibration ด้วยวิธี PLS regression โดยการใช้ spectra เริ่มต้น (original) แบบ Full cross validation กับค่าปริมาณสาร

ไอโซฟลาโวนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ที่ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร พบว่าสมการจาก original spectra ของสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone มีดังนี้

1. Daidzin มีค่าสหสัมพันธ์ (R) ระหว่างการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการกับค่าการทำนาย เท่ากับ 0.91 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนาย Standard Error of Prediction (SEP) เท่ากับ 9.75 ppm ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่ม Standard Error of Calibration (SEC) เท่ากับ 7.33 ppm มีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง (F) = 8 ปัจจัย ค่าความคลาดเคลื่อน (Standard Deviation, SD) จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่ากับ 23.89 ppm และสมการประเมินปริมาณ Daidzin ในเมล็ดถั่วเหลือง ตั้งแต่ 17.92– 103.43 ppm มีค่าเฉลี่ย 55.54 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในการประเมินปริมาณ Daidzin ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1520 1980 2000 2100 2242 2294 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับสารไอโซฟลาโวน ที่ 1980 nm เป็นค่าของโปรตีน ที่ 2000 และ 2100 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2242 และ 2294 nm เป็นค่าของกรดอะมิโน

2. Daidzein ค่าสหสัมพันธ์ (R) = 0.90, SEP = 0.79 ppm, SEC = 0.45 ppm, F = 10 ปัจจัย, SD = 1.89 ppm และสมการประเมินปริมาณ Daidzein ในเมล็ดถั่วเหลือง ตั้งแต่ 2.77–9.75 ppm มีค่าเฉลี่ย 5.33 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Daidzein ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1520 1580 1900 1980 2000 2100 2242 2294 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1980 nm เป็นค่าของโปรตีน ที่ 1580 1900 2000 และ 2100 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2242 และ 2294 nm เป็นค่าของกรดอะมิโน

3. Glycitin ค่าสหสัมพันธ์ (R) =0.92, SEP = 5.81 ppm, SEC = 3.52 ppm, F = 9 ปัจจัย, SD = 15.27 ppm และสมการประเมินปริมาณ Glycitin ในเมล็ดถั่วเหลือง ตั้งแต่ 18.36–75.56 ppm มีค่าเฉลี่ย 40.22 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Glycitin ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1440 1520 1900 1940 2000 2100 2242 2276 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1940 nm เป็นค่าของน้ำ ที่ 1440 1900 2000 2100 และ 2276 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2242 nm เป็นค่าของกรดอะมิโน

4. Glycitein ค่าสหสัมพันธ์ (R) =0.91, SEP = 0.25 ppm, SEC = 0.17 ppm, F = 9 ปัจจัย, SD = 0.64 ppm และสมการประเมินปริมาณ Glycitein ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ตั้งแต่ 1.03–3.62 ppm มีค่าเฉลี่ย 2.38 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Glycitein ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1440 1520 1580 1900 2000 2180 2276 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1440 1580 1900 2000 และ 2276 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2180 nm เป็นค่าของโปรตีน

5. Genistin ค่าสหสัมพันธ์ (R) =0.92, SEP = 12.90 ppm, SEC = 7.65 ppm, F = 10 ปัจจัย, SD = 33.11 ppm และสมการประเมินปริมาณ Genistin ในเมล็ดถั่วเหลือง ตั้งแต่ 17.64–139.57 ppm มีค่าเฉลี่ย 65.27 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Genistin ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1510 1520 1900 2000 2080 2180 2276 2380 และ 2461 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 2080 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1900 2000 2276 และ 2461 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 1510 และ 2180 nm เป็นค่าของโปรตีน

กรมวิชาการเกษตร

6. Genistein ค่าสหสัมพันธ์ (R) = 0.89, SEP = 0.33 ppm, SEC = 0.17 ppm, F = 10 ปัจจัย, SD = 0.76 ppm และสมการประเมินปริมาณ Genistein ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ตั้งแต่ 2.20–4.96 ppm มีค่าเฉลี่ย 3.49 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Genistein ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1450 1520 1580 1900 2000 2080 2180 2252 และ 2461 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 และ 2080 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1450 1580 1900 2000 2252 และ 2461 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2180 nm เป็นค่าของโปรตีน

7. Total isoflavone ค่าสหสัมพันธ์ (R) = 0.92, SEP = 27.86 ppm, SEC = 21.62 ppm, F = 8 ปัจจัย , SD = 72.35 ppm และสมการประเมินปริมาณ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ตั้งแต่ 58.87–326.56 ppm มีค่าเฉลี่ย 161.82 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Total isoflavone ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 970 1410 1520 1980 2100 2242 2294 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 970 1410 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 2100 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 1980 nm เป็นค่าของโปรตีน ที่ 2242 และ 2294 nm เป็นค่าของกรดอะมิโน (ตารางที่ 2.2.1 และ 2.2.2) และ (ภาพที่ 2.2.2)

จากการหาความสัมพันธ์จากการทำนายค่าสารไอโซฟลาโวน Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วย NIR และค่าที่วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R2) มีค่า 0.90 0.82 0.86 0.84 0.86 0.80 และ 0.85 ตามลำดับ (ภาพที่ 2.3) จากการสร้างสมการจากจำนวนตัวอย่าง 200 ตัวอย่าง ถึงแม้ว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจจะสูงขึ้น หากมีการทดลองต่อไปควรเพิ่มตัวอย่างที่มีค่าสารไอโซฟลาโวนที่หลากหลายมากขึ้น เช่น Daidzin 75-85 ppm Daidzein 8-10 ppm Glycitin 50-60 ppm Glycitein 1-2 ppm Genistin 75-150 ppm Genistein 4.5-5 ppm และ Total isoflavone 200-300 ppm

**ตารางที่ 2.2.1** Partial Least Square calibration result for isoflavones values of 200 samples soybean seed.

| Isoflavones | Sample | Math methods | Wavelength region (nm) | F | R | SEC | SEP | SD | Bias | N |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Daidzin | seed | Original | 800-2500 | 8 | 0.91 | 7.33 | 9.75 | 23.89 | -0.0316 | 82 |
| Daidzein | seed | Original | 800-2500 | 10 | 0.90 | 0.45 | 0.79 | 1.89 | -0.0186 | 72 |
| Glycitin | seed | Original | 800-2500 | 9 | 0.92 | 3.52 | 5.81 | 15.27 | -0.0760 | 76 |
| Glycitein | seed | Original | 800-2500 | 9 | 0.91 | 0.17 | 0.25 | 0.64 | 0.0019 | 92 |
| Genistin | seed | Original | 800-2500 | 10 | 0.92 | 7.65 | 12.90 | 33.11 | -0.0118 | 78 |
| Genistein | seed | Original | 800-2500 | 10 | 0.89 | 0.17 | 0.33 | 0.76 | 0.0010 | 66 |
| Total isoflavone | seed | Original | 800-2500 | 8 | 0.92 | 21.62 | 27.86 | 72.35 | 0.091 | 88 |

R: Multiple correlation coefficients

F: The number of factors used in the calibration equation

SEC: Standard error of calibration, SEP: Standard error of prediction

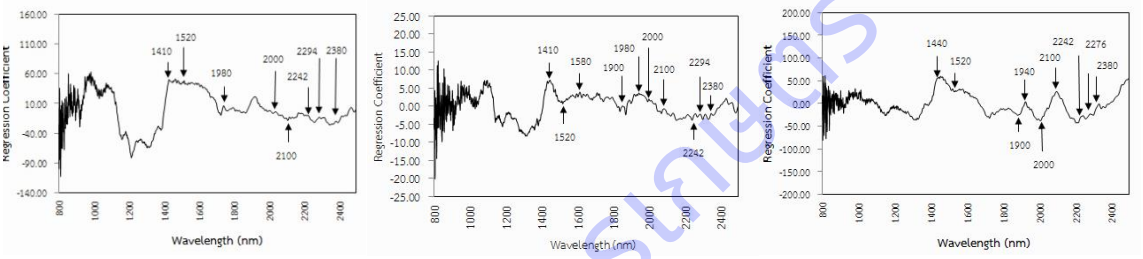
SD: Standard Deviation of actual value

Bias: The average of difference between actual value and NIR value, N: Number of samples

**ตารางที่ 2.2.2** The characteristics of samples used in model for isoflavones values of 200 samples soybean seed.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

| Isoflavones | Sample | Min-Max | Mean | SD | Unit |
|---|---|---|---|---|---|
| Daidzin | seed | 17.92-103.43 | 55.54 | 23.89 | ppm |
| Daidzein | seed | 2.77-9.75 | 5.33 | 1.89 | ppm |
| Glycitin | seed | 18.36-75.56 | 40.22 | 15.27 | ppm |
| Glycitein | seed | 1.03-3.62 | 2.38 | 0.64 | ppm |
| Genistin | seed | 17.64-139.57 | 65.27 | 33.11 | ppm |
| Genistein | seed | 2.20-4.96 | 3.49 | 0.76 | ppm |
| Total isoflavone | seed | 58.87-326.56 | 161.82 | 72.35 | ppm |



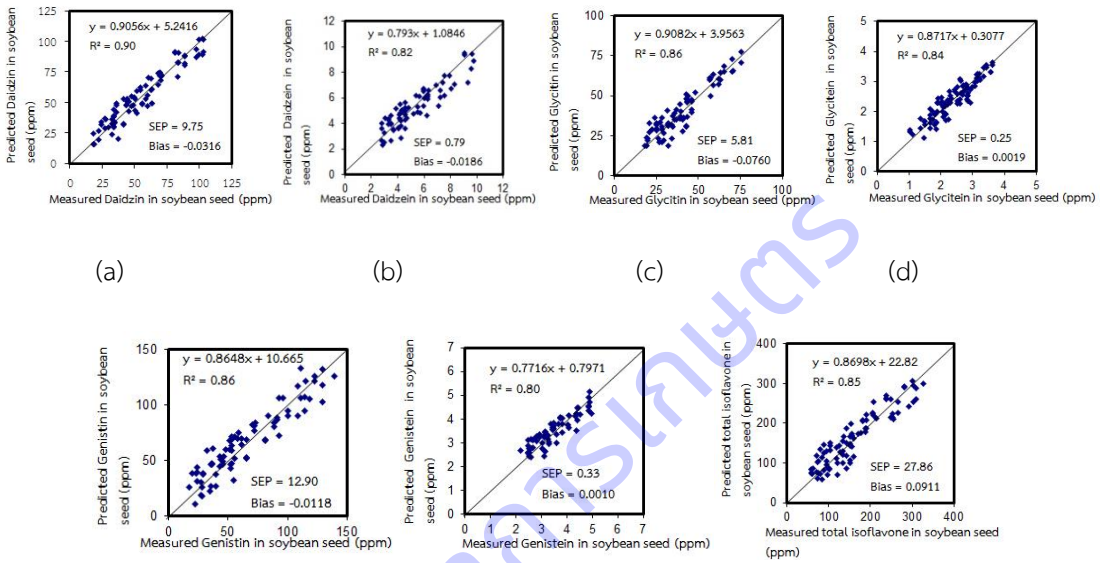

(a) (b) (c)

(d) (e) (f)

(g)

**ภาพที่ 2.2.2** Regression coefficient plots to evaluate Daidzin (a), Daidzein (b), Glycitin (c), Glycitein (d), Genistin (e), Genistein (f), and Total isoflavone (g) in soybean grains.

ศูนย์วิทยทรัพยากร




**ภาพที่ 2.2.3** Scatter plots of actual Daidzin (a), Daidzein (b), Glycitin (c), Glycitein (d), Genistin (e), Genistein (f), and Total isoflavone (g) value in soybean seed (ppm) vs. NIR predicted isoflavone values

ขั้นตอนการทำ validation หลังจากได้สมการ calibration แล้ว ทำการทวนสอบว่าสมการที่สร้างขึ้นมาสามารถนำมาทำนายข้อมูลชุดอื่นได้ ซึ่งการทดสอบสมการประเมินค่าปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง โดยนำตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง จำนวน 10 ตัวอย่าง ไปสแกนด้วยเครื่อง Near Infrared Spectrophotometer และทำนาย (predicted) ค่าปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการมีความถูกต้องมากน้อยแค่ไหน (Standard Error of Prediction ; SEP) ค่าเฉลี่ยของการทำนายกับค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการมีความแตกต่างกันหรือไม่ (bias) ค่าสถิติที่ใช้ในการตรวจสอบว่าสมการ calibration ที่สร้างขึ้นมามีความถูกต้องสามารถนำไปใช้งานได้คือ ค่า SEP และ bias ควรมีค่าน้อยๆ ถึงจะแสดงว่าสมการ calibration มีความเหมาะสมที่จะนำเครื่อง NIR มาใช้ในการทำนายคุณลักษณะที่ต้องการหา รวมทั้งค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R2) ควรมีค่าเข้าใกล้ 1

การคำนวณค่า SEP และค่า bias ของปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ที่ทำนายได้กับค่าวิเคราะห์ใน

กรมวิชาการเกษตร

ห้องปฏิบัติการไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งมีค่า SEP = 1.74 0.35 1.12 0.19 1.75 0.14 และ 4.13 ppm ตามลำดับ ค่า bias = 0.67 -0.01 -0.08 -0.06 -1.10 -0.01 และ 0.68 ppm ตามลำดับ ค่า bias มีค่าเป็นลบแสดงว่า ค่าที่ทำนายได้มีค่ามากกว่าค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 2.2.3-2.2.9) และนำสถิติ t-test ใช้ทดสอบความแตกต่างหรือเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของวิธีการ 2 วิธี พบว่า สมการสำหรับการประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง กับค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ดังนั้นจึงสามารถนำสมการไปใช้ประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้

**สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion).**

สามารถใช้สมการที่ได้ในการประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวนทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ ซึ่งสามารถนำเอาวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้กับการประเมินปริมาณสารในเมล็ดพันธุ์ชนิดอื่นๆได้ อีกทั้งเป็นข้อมูลในฐานข้อมูลไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับการใช้ประโยชน์ของนักปรับปรุงพันธุ์พืช

**ตารางที่ 2.2.3** Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Daidzin value in soybean seed.

| Samples | Method to determine Daidzin | | d | $d^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | (x-y) | $(x-y)^2$ |
| | X | Y | | |
| 1 | 103.43 | 101.57 | 1.86 | 3.47 |
| 2 | 83.95 | 82.51 | 1.44 | 2.06 |
| 3 | 50.20 | 52.74 | -2.54 | 6.45 |
| 4 | 34.82 | 33.03 | 1.78 | 3.18 |
| 5 | 88.53 | 87.93 | 0.60 | 0.37 |
| 6 | 49.31 | 47.94 | 1.37 | 1.87 |
| 7 | 26.86 | 28.70 | -1.83 | 3.36 |
| 8 | 62.86 | 60.24 | 2.62 | 6.89 |
| 9 | 102.10 | 102.35 | -0.25 | 0.06 |
| 10 | 71.52 | 69.87 | 1.65 | 2.73 |
| Total | 673.59 | 666.88 | 6.71 | 30.43 |
| Average | 67.36 | 66.69 | 0.67 | 3.04 |

กรมวิชาการเกษตร

**ตารางที่ 2.2.4** Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Daidzein value in soybean seed.

| Samples | Method to determine Daidzein | | d (x-y) | $d^2$ $(x-y)^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | | |
| | X | Y | | |
| 1 | 6.25 | 6.14 | 0.11 | 0.01 |
| 2 | 2.79 | 2.43 | 0.36 | 0.13 |
| 3 | 4.14 | 4.73 | -0.60 | 0.36 |
| 4 | 8.31 | 8.00 | 0.31 | 0.10 |
| 5 | 9.75 | 9.45 | 0.30 | 0.09 |
| 6 | 7.54 | 7.86 | -0.32 | 0.10 |
| 7 | 6.90 | 6.42 | 0.48 | 0.23 |
| 8 | 4.30 | 4.58 | -0.28 | 0.08 |
| 9 | 4.30 | 4.59 | -0.29 | 0.08 |
| 10 | 6.36 | 6.60 | -0.24 | 0.06 |
| **Total** | 60.65 | 60.80 | -0.14 | 1.24 |
| **Average** | 6.07 | 6.08 | -0.01 | 0.12 |

กรมวิชาการเกษตร

**ตารางที่ 2.2.5** Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Glycitin value in soybean seed.

| Samples | Method to determine Glycitin | | d | $d^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | (x-y) | $(x-y)^2$ |
| | X | Y | | |
| 1 | 62.05 | 62.82 | -0.77 | 0.59 |
| 2 | 75.56 | 76.40 | -0.84 | 0.70 |
| 3 | 43.28 | 44.91 | -1.63 | 2.66 |
| 4 | 46.00 | 45.06 | 0.95 | 0.90 |
| 5 | 18.36 | 18.23 | 0.14 | 0.02 |
| 6 | 32.16 | 32.55 | -0.39 | 0.15 |
| 7 | 43.30 | 42.09 | 1.22 | 1.48 |
| 8 | 39.06 | 38.46 | 0.60 | 0.36 |
| 9 | 39.06 | 40.76 | -1.70 | 2.88 |
| 10 | 71.52 | 69.87 | 1.65 | 2.73 |
| **Total** | 470.37 | 471.14 | -0.77 | 12.46 |
| **Average** | 47.04 | 47.11 | -0.08 | 1.25 |

กรมวิชาการเกษตร

**ตารางที่ 2.2.6** Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Glycitein value in soybean seed.

| Samples | Method to determine Glycitein | | d | $d^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | (x-y) | $(x-y)^2$ |
| | X | Y | | |
| 1 | 1.03 | 1.20 | -0.17 | 0.03 |
| 2 | 1.85 | 1.53 | 0.32 | 0.10 |
| 3 | 2.93 | 2.82 | 0.11 | 0.01 |

| Samples | Method to determine Glycitein | | d (x-y) | $d^2$ $(x-y)^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | | |
| | X | Y | | |
| 4 | 2.02 | 2.22 | -0.19 | 0.04 |
| 5 | 2.98 | 2.84 | 0.14 | 0.02 |
| 6 | 1.50 | 1.65 | -0.15 | 0.02 |
| 7 | 2.32 | 2.41 | -0.08 | 0.01 |
| 8 | 2.45 | 2.63 | -0.18 | 0.03 |
| 9 | 1.68 | 1.75 | -0.07 | 0.01 |
| 10 | 2.62 | 2.91 | -0.29 | 0.08 |
| Total | 21.39 | 21.96 | -0.57 | 0.35 |
| Average | 2.14 | 2.20 | -0.06 | 0.03 |

กรมวิชาการเกษตร

**ตารางที่ 2.2.7** Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Genistin value in soybean seed.

| Samples | Method to determine Genistin | | d (x-y) | $d^2$ $(x-y)^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | | |
| | X | Y | | |
| 1 | 42.84 | 43.90 | -1.06 | 1.13 |
| 2 | 58.70 | 60.65 | -1.95 | 3.80 |
| 3 | 51.13 | 52.68 | -1.55 | 2.39 |
| 4 | 88.60 | 87.68 | 0.92 | 0.85 |
| 5 | 28.15 | 27.05 | 1.10 | 1.21 |
| 6 | 95.80 | 97.61 | -1.81 | 3.27 |

| Samples | Method to determine Genistin | | d | $d^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | (x-y) | $(x-y)^2$ |
| | X | Y | | |
| 7 | 53.03 | 55.27 | -2.24 | 5.01 |
| 8 | 115.28 | 118.49 | -3.21 | 10.30 |
| 9 | 46.82 | 48.39 | -1.57 | 2.45 |
| 10 | 28.86 | 28.47 | 0.38 | 0.15 |
| Total | 609.21 | 620.19 | -10.98 | 30.56 |
| Average | 60.92 | 62.02 | -1.10 | 3.06 |

กรมวิชาการเกษตร

**ตารางที่ 2.2.8** Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Genistein value in soybean seed.

| Samples | Method to determine Genistein | | d | $d^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | (x-y) | $(x-y)^2$ |
| | X | Y | | |
| 1 | 3.83 | 3.66 | 0.17 | 0.03 |
| 2 | 4.47 | 4.54 | -0.07 | 0.01 |
| 3 | 4.86 | 4.99 | -0.13 | 0.02 |
| 4 | 3.28 | 3.40 | -0.13 | 0.02 |
| 5 | 3.60 | 3.51 | 0.08 | 0.01 |
| 6 | 2.20 | 2.34 | -0.14 | 0.02 |
| 7 | 3.30 | 3.05 | 0.25 | 0.06 |
| 8 | 4.40 | 4.50 | -0.10 | 0.01 |
| 9 | 4.40 | 4.31 | 0.09 | 0.01 |

| Samples | Method to determine Genistein | | d (x-y) | $d^2$ $(x-y)^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | | |
| | X | Y | | |
| 10 | 3.49 | 3.66 | -0.17 | 0.03 |
| **Total** | 37.83 | 37.97 | -0.14 | 0.21 |
| **Average** | 3.78 | 3.80 | -0.01 | 0.02 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร

**ตารางที่ 2.2.9** Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Total isoflavone value in soybean seed.

| Samples | Method to determine Total isoflavone | | d (x-y) | $d^2$ $(x-y)^2$ |
|---|---|---|---|---|
| | Reference Method | NIR Prediction | | |
| | X | Y | | |
| 1 | 96.17 | 93.76 | 2.41 | 5.83 |
| 2 | 152.01 | 148.97 | 3.04 | 9.26 |
| 3 | 303.16 | 299.21 | 3.94 | 15.55 |
| 4 | 75.46 | 73.56 | 1.90 | 3.61 |
| 5 | 280.27 | 288.36 | -8.09 | 65.46 |
| 6 | 74.15 | 70.61 | 3.54 | 12.55 |
| 7 | 214.26 | 209.74 | 4.52 | 20.44 |
| 8 | 143.60 | 146.36 | -2.76 | 7.59 |
| 9 | 134.90 | 131.97 | 2.93 | 8.59 |
| 10 | 152.01 | 156.64 | -4.63 | 21.43 |
| **Total** | 1625.97 | 1619.15 | 6.82 | 170.31 |
| **Average** | 162.60 | 161.92 | 0.68 | 17.03 |

**การทดลองที่ 3**

# การประเมินลักษณะประจำพันธุ์และพฤกษเคมี (Phaseolamin) ในถั่วสกุล Phaseolus ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

# Characterization and phytochemical (phaseolamin) of *Phaseolus* spp. in Genebank

**พิทยา วงษ์ช้าง ปาริฉัตร สังข์สะอาด อภิญญา วงศ์เปี้ย อ้อยทิน ผลพานิช อุทัยวรรณ สุทธิศันสนีย์ ยุราพร สหัสกุล และ อมรรัตน์ เอื้อสลุง**

Pitthaya Wongchang, Parichat Sangkasa-ad, Aphinya Wongpia, Auytin Polpanit, Uthawan suttisansanee, Yuraporn Sahasakul and Amornrat Aursalung

กรมวิชาการเกษตร

**คำสำคัญ:** ถั่วในสกุล Phaseolus, สารพฤกษเคมี, ฟาซิโอลามิน

**Key words:** Phaseolus spp., Phytochemical, Phaseolamin

## บทคัดย่อ

อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตเป็นอาหารหลักที่นิยมบริโภค หากไม่ระวังอาจทำให้เกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังโดยไม่รู้ตัว เช่น โรคอ้วน โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความดัน โรคเบาหวาน โรคไต เป็นต้น ในปัจจุบันคนหันมาใส่ใจสุขภาพกันมากขึ้นเริ่มหันมาสนใจวิธีลดการบริโภคคาร์โบไฮเดรตซึ่งเชื่อกันว่าสามารถลดน้ำหนักได้ดีกว่าการลดอาหารประเภทอื่นๆ หากหลีกเลี่ยงไม่ได้ยังมีทางเลือกอื่น เช่น การบริโภคสารสกัดฟาซิโอลามิน (phaseolamin) ที่ได้จากถั่วในสกุล Phaseolus ซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลาย เอนไซม์แอลฟ่า–กลูโคซิเดส และเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4 ทำให้ไม่เกิดกระบวนการย่อยเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลที่โมเลกุลเล็กลงได้ และไม่ถูกดูดซึมเกิดการสะสมในร่างกาย ทำให้เกิดการเผาผลาญไขมันที่สะสมในร่างกายอย่างต่อเนื่องเป็นการลด

ความเสี่ยงของการเกิดโรค และถือว่าเป็นคุณสมบัติที่ดีในการช่วยคุมน้ำหนัก ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่ได้รับจากการบริโภคสารสกัดฟาซิโอลามิน

คัดเลือกสายพันธุ์ถั่วสกุล Phaseolus ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ประเมินลักษณะประจำพันธุ์และหาปริมาณพฤกษเคมี (ฟาซิโอลามิน) ใช้เป็นฐานข้อมูลของธนาคารเชื้อพันธุ์พืชเพื่อการใช้ประโยชน์ในอนาคต ทำการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ของถั่วสกุล Phaseolus จำนวนทั้งหมด 17 สายพันธุ์ และวิเคราะห์หาสารสำคัญรวมถึงปริมาณฟาซิโอลามินในถั่วสกุล Phaseolus จำนวนทั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยปริมาณฟาซิโอลามินสามารถประเมินจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟ่า-อะไมเลส เอนไซม์แอลฟ่า-กลูโคซิเดส และเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4 ซึ่งเอนไซม์ 2 ชนิดแรกทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ดังนั้นถ้ามีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ จะสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดถั่วทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่า–อะไมเลส ได้ร้อยละ 13-31 ที่ความเข้มข้น 12.5 มก./มล. โดยถั่ว TML 92 (2) และถั่วนิ้วนางแดงสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดถั่วทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่า–กลูโคซิเดส ได้ร้อยละ 6-60 ที่ความเข้มข้น 12.5 มก./มล. โดยถั่วเหลือง สจ.5 และ ชม.60 สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงกว่าถั่วชนิดอื่นๆ ส่วนเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4 เป็นเอนไซม์ยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนกลูคากอนจากตับอ่อนและกระตุ้นตับอ่อนหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ทำให้สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดถั่วทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4 ได้ร้อยละ 12-52 ที่ความเข้มข้น 12.5 มก./มล. โดยถั่วเขียวชัยนาท 4 ชัยนาท 84-1 และถั่วบอย สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงกว่าถั่วชนิดอื่นๆ จากการทดลองทำให้ทราบข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์และปริมาณพฤกษเคมีที่สำคัญต่อการลดความเสี่ยงการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เช่น โรคอ้วนและเบาหวาน รวมถึงการใช้ประโยชน์จากฐานพันธุกรรมพืชที่อนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ใช้เป็นฐานข้อมูลของนักปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกพันธุ์นำไปใช้ในทางการค้าได้ในอนาคต เป็นการเพิ่มมูลค่าในตัวผลิตผลทางการเกษตรที่ตรงจุดสามารถสร้างรายเสริมให้กับเกษตรกร


## Abstract

Carbohydrate foods are commonly consumed. If not careful use can lead to chronic non-communicable diseases such as obesity, coronary heart disease, high blood pressure, diabetes, kidney disease, etc. At present, more people are turning to health-conscious and reducing carbohydrate intake. It is better than reducing other types of food. If unavoidable, there are alternatives, such as consuming phaseolamin extract obtained from beans in Phaseolus spp. which is responsible for inhibiting the activity of amylase in saliva, alpha-glucosidase, and dipeptidyl-peptidase-4 enzyme causing the digestion process to be converted into smaller sugar molecules and is not absorbed and accumulates in the body, It causes the burning of fat accumulated in the body continuously, thereby reducing the risk of disease. And is considered a good feature to help control weight. Reduce the risk of disease caused by the consumption of phaseolamin extract.

Phaseolus spp. 17 accessions were selected from the genebank, characterization, and evaluation that used as a genebank database for future use. And analyzes for phytochemical, phaseolamin content in 10 accessions of Phaseolus spp. Alpha-glucosidase enzyme and dipeptidyl-peptidase-4 enzyme, which the first two enzymes that digest carbohydrates into single molecules of sugar. It can reduce blood sugar levels. From the experimental, the results were


กรมวิชาการเกษตร

found that all of the bean (Phaseolus spp.) extracts can inhibit alpha-amylase by 13-31% at concentrations of 12.5 mg/ml, with TML 92 (2) and red-fingered bean being the highest inhibition. In addition, it was found that all of the bean extracts were inhibit the alpha-glucosidase enzyme by 6-60% at the concentration of 12.5 mg/ml, with SJ5 and SJ60 of soybean being inhibit enzymes higher than other types of beans. The enzyme dipeptidil-peptidase-4, it's an enzyme that inhibits the secretion of glucagon from the pancreas and stimulates the pancreas to secrete insulin to control blood sugar levels. From the experimental results was shown that all bean extracts were inhibited dipeptidyl-peptidase-4 enzyme by 12-52% at the concentration of 12.5 mg/ml by Chainat 4 mung beans, Chainat 84-1 black gram and boy bean have inhibited the enzyme higher than other beans. From the experiment, the information about the characteristics of Phaseolus spp. and phytochemicals that are important to reduce the risk of chronic non-communicable diseases such as obesity and diabetes are known. The genebank database of conserved plant genetic base can be used for breeders in the selection plant for use in trade in the future and adding value to agricultural products that can generate additional income for farmers.

**บทนำ**

การบริโภคอาหารของคนโดยส่วนใหญ่นิยมบริโภคอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตซึ่งจัดเป็นกลุ่มอาหารหลักของคนทุกเชื้อชาติทั่วโลก ตัวอย่างอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เรารู้จักกันดี คือ ข้าว แป้ง น้ำตาล ซึ่งหากไม่ระวังการบริโภคอาหารประเภทดังกล่าวแล้วอาจจะทำให้เกิดโรคตามมาโดยไม่รู้ตัว เช่น โรคอ้วน โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความดัน โรคเบาหวาน โรคไต และโรคอื่นๆ อีกมากมาย ในปัจจุบันคนหันมาใส่ใจสุขภาพกันมากขึ้นโดยเฉพาะเรื่องรูปร่างและการควบคุมน้ำหนักหากกล่าวเฉพาะการลดการบริโภคอาหารเพียงอย่างเดียวแล้วส่วนใหญ่คนจะเริ่มหันมาสนใจวิธีลดการรับประทานคาร์โบไฮเดรตซึ่งเชื่อกันว่าส่งผลให้ลดน้ำหนักได้ดีกว่าการลดการรับประทานอาหารประเภทอื่นๆ หรือหากหลีกเลี่ยงการบริโภคคาร์โบไฮเดรตไม่ได้แล้วในปัจจุบันยังมีทางเลือกอื่นเพื่อลดน้ำหนักได้อีก เช่น การบริโภคสารสกัดฟาซิโอลามิน (phaseolamin) ที่ได้จากถั่วในสกุล Phaseolus เพื่อยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนรูปของคาร์โบไฮเดรตไปเป็นน้ำตาล ซึ่งสารสกัดฟาซิโอลามีนจากถั่วมีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลายทำให้ไม่สามารถเกิดกระบวนการย่อยของคาร์โบไฮเดรตที่กินเข้าไปให้เปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลที่โมเลกุลเล็กลงได้ ทำให้ไม่เกิดการสะสมพลังงานตามส่วนต่างๆของร่างกายจนแปรเปลี่ยนเป็นไขมันในภายหลัง และเมื่อไม่มีพลังงานและไขมันส่วนเกินแล้วร่างกายจะดึงพลังงานสำรองหรือไขมันที่สะสมมาใช้ทดแทนทำให้เกิดการเผาผลาญไขมันภายในร่างกายอย่างต่อเนื่องเป็นการลดความเสี่ยงของการเกิดโรค และถือว่าเป็นคุณสมบัติอันยอดเยี่ยมในการช่วยคุมน้ำหนัก รักษารูปร่างที่เราได้รับจากการบริโภคสารสกัดฟาซิโอลามินจากถั่ว

ปัจจุบันธนาคารเชื้อพันธุ์พืชยังขาดข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์และปริมาณฟาซิโอลามินซึ่งเป็นพฤกษเคมีที่พบอยู่ในถั่วโดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วในสกุล Phaseolus ที่เก็บอนุรักษ์ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช หากทราบข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์และปริมาณพฤกษเคมีนี้แล้วจะทำให้เกิดความสะดวกในการใช้ประโยชน์จากเมล็ดพันธุ์พืชที่อนุรักษ์ไว้ มีผลต่อการส่งเสริมการปลูกเมล็ดถั่วเพื่อนำมาสกัดให้ได้พฤกษเคมีเป็นการเพิ่มมูลค่าในตัวผลิตผลทางการเกษตร สร้างรายได้แก่เกษตรกรหลังการทำนา และเพื่อเป็นฐานข้อมูลของนักปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกพันธุ์ที่จะนำไปใช้ในทางการค้าได้ในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร

**วัตถุประสงค์**

1. เพื่อประเมินลักษณะประจำพันธุ์ และหาปริมาณพฤกษเคมี (ฟาซิโอลามิน) ของถั่วในสกุล Phaseolus ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช
2. เพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลของธนาคารเชื้อพันธุ์พืชสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

**ระเบียบวิธีการวิจัย**

**สถานที่ทำการวิจัย** : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, สถาบันโภชนาการมหาวิทยาลัยมหิดล

**ระยะเวลาที่ดำเนินการ** : ปีที่เริ่มต้น 2562 ปีที่สิ้นสุด 2564

**วิธีการดำเนินการ**

1. คัดเลือกสายพันธุ์ถั่วในสกุล Phaseolus ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช จำนวน 17 สายพันธุ์ รวมถึงพันธุ์ตรวจสอบ ได้แก่ ถั่วเหลือง และถั่วเขียว ที่เป็นพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตร (ปี 2562)
2. ปลูกเพื่อเพิ่มปริมาณเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้เพียงพอต่อการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ ทำการปลูกเพิ่มปริมาณเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (ปี 2562)
3. ปลูกประเมินลักษณะประจำพันธุ์ถั่วในสกุล Phaseolus โดยใช้หลักเกณฑ์ของ IPGRI พร้อมทั้งการปลูกเพิ่มปริมาณเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้เพียงพอต่อการวิเคราะห์หาปริมาณพฤกษเคมีในห้องปฏิบัติการ โดยทำการปลูกประเมินลักษณะประจำพันธุ์และเพิ่มปริมาณเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (ปี 2563)
4. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณพฤกษเคมีในห้องปฏิบัติการ ทำการวิเคราะห์ที่สถาบันโภชนาการมหาวิทยาลัยมหิดล (ปี 2563-2564) ประกอบด้วย การเตรียมตัวอย่าง การสกัดสารสำคัญ การสกัดโปรตีน การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ การวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ และกรดฟีนอลิก การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ฤทธิ์เชิงสุขภาพ
5. เปรียบเทียบปริมาณพฤกษเคมีในเมล็ดของถั่วสายพันธุ์ต่างๆ ในสกุล Phaseolus ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (ปี 2564)

**ผลการทดลองและอภิปราย (Results and Discussion)**

**ลักษณะประจำพันธุ์**

- ได้ข้อมูลการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ถั่วสกุล phaseolus และพันธุ์ตรวจสอบ จำนวนทั้งหมด 17 ตัวอย่างพันธุ์ (ตารางที่ 2.3.1และ 2.3.2) เพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลของธนาคารเชื้อพันธุ์พืชสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต และใช้เป็นฐานข้อมูลของนักปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกพันธุ์นำไปใช้ในทางการค้าเป็นการเพิ่มมูลค่าในตัวผลิตผลทางการเกษตรสามารถสร้างรายเสริมให้กับเกษตรกร ได้แก่ สีโคน สีดอก สีกลีบเลี้ยง ลักษณะการเจริญ รูปแบบการเจริญ ความยาวก้านใบ ความยาวก้านใบย่อย ขนใบที่ใบ การแตกกิ่ง ความหนาแน่นทรงพุ่ม ลักษณะการแตกกิ่ง การเรียงตัวของกิ่ง เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

**ตารางที่ 2.3.1** ข้อมูลการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ถั่วสกุล phaseolus และพันธุ์ตรวจสอบ

| GS.No. | ชื่อพันธุ์ | สีโคน | สีดอก | สีกลีบเลี้ยง | ลักษณะการเจริญ | รูปแบบการเจริญ | ความยาวก้านใบ | ความยาวก้านใบย่อย | ขนใบที่ใบ | การแตกกิ่ง | ความหนาแน่นทรงพุ่ม |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DOALG00009 | ถั่วแขก (ฝักเขียวเมล็ดขาว) | เขียว | ขาว | เขียว | เลื้อยพันค้าง | เลื้อยไปตามพื้น | <12 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | ประปราย |
| DOALG00038 | TML 92 (2) | เขียว | เหลืองอ่อน | เขียว | เลื้อยพันค้าง | เลื้อยไปตามพื้น | 12-18 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่นน้อย |
| DOALG00045 | TML 92 | เขียว | ขาว | เขียว | เลื้อยพันค้าง | เลื้อยไปตามพื้น | <12 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่นปานกลาง |
| DOALG00046 | ถั่วแขก (ดำ) | ม่วง | ม่วง | เขียว | เลื้อยพันค้าง | เลื้อยไปตามพื้น | <12 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | ประปราย |
| DOALG00047 | TML 8 ถั่วขาว | เขียว | เหลืองอ่อน | เขียว | เลื้อยพันค้าง | เลื้อยไปตามพื้น | <12 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่นน้อย |
| DOALG00059 | ถั่วบอย | เขียว | เหลืองอ่อน | เขียว | เลื้อยพันค้าง | เลื้อยไปตามพื้น | <12 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | ประปราย |
| DOALG00072 | TML 76 ฝักสีน้ำตาลอ่อน | เขียว | ม่วงอ่อน | เขียว | ไม่มีเถา | ขึ้นตรง | <12 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่นน้อย |
| DOALG00077 | TML 92 | เขียว | เหลืองอ่อน | เขียว | เลื้อยพันค้าง | เลื้อยไปตามพื้น | <12 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่นน้อย |
| DOALG00088 | ถั่วนิ้วนางแดง | เขียว | เหลืองเข้ม | เขียว | เลื้อยพันค้าง | เลื้อยไปตามพื้น | >18 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่นปานกลาง |
| DOALG00107 | ถั่วนิ้วนางแดง | เขียว | เหลืองเข้ม | ม่วงอมเขียว | เลื้อยพันค้าง | เลื้อยไปตามพื้น | >18 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่นปานกลาง |
| DOALG00108 | ถั่วอะซูกิ | เขียว | เหลืองเข้ม | เขียว | ไม่มีเถา | ขึ้นตรง | 12-18 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | ค่อนข้างหนาแน่น |
| DOALG00111 | ถั่วแดงหลวง | เขียว | ม่วงอ่อน | เขียว | ไม่มีเถา | ขึ้นตรง | 2 | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่นน้อย |
| DOALG00112 | ถั่วแดงหลวง | เขียว | ม่วงอ่อน | เขียว | ไม่มีเถา | ขึ้นตรง | <12 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่นน้อย |
| DOASB 1339 | สจ. 5 | เขียว | ม่วงอ่อน | ม่วงเข้ม | ไม่มีเถา | ขึ้นตรง | 12-18 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 2-5 กิ่ง | หนาแน่น |
| DOASB 1340 | ชม. 60 | เขียว | ขาว | ขาว | ไม่มีเถา | ขึ้นตรง | 12-18 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 0-1 กิ่ง | หนาแน่นน้อย |
| - | ถั่วเขียว ชัยนาท 4 | ม่วง | เหลืองเข้ม | เขียว | ไม่มีเถา | ขึ้นตรง | >18 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่น |
| - | ถั่วเขียว ชัยนาท 84-1 | เขียว | เหลืองอ่อน | เขียว | ไม่มีเถา | ขึ้นตรง | 12-18 ซม. | <10 ซม. | ใบมีขน | 3-5 กิ่ง | หนาแน่น |

กรมวิชาการเกษตร

**ตารางที่ 2.3.1** ข้อมูลการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ถั่วสกุล phaseolus และพันธุ์ตรวจสอบ (ต่อ)

| GS.No. | ชื่อพันธุ์ | ลักษณะการแตกกิ่ง | การเรียงตัวของกิ่ง | ประเภทของพืช | การทนทานต่อการล้ม | สีใบ | สีก้านใบ | การมีขน | ตำแหน่งช่อดอก | ความยาวก้านดอก | สีฝักสด |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DOALG00009 | ถั่วแขก (ฝักเขียวเมล็ดขาว) | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ล้มง่ายมาก | เขียวอ่อน | เขียว | น้อย | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียว |
| DOALG00038 | TML 92 (2) | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ข้ามฤดู | ล้มง่ายมาก | เขียวอ่อน | เขียว | น้อย | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวเข้ม |
| DOALG00045 | TML 92 | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ข้ามฤดู | ล้มง่ายมาก | เขียวอ่อน | เขียว | น้อย | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียว |
| DOALG00046 | ถั่วแขก (ดำ) | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ล้มง่ายมาก | เขียวอ่อน | ม่วงเข้ม | น้อย | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียว |
| DOALG00047 | TML 8 ถั่วขาว | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ข้ามฤดู | ล้มง่ายมาก | เขียวอ่อน | เขียว | น้อย | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวเข้ม |
| DOALG00059 | ถั่วบอย | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ข้ามฤดู | ล้มง่ายมาก | เขียวอ่อน | เขียว | น้อย | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวเข้ม |
| DOALG00072 | TML 76 ฝักสีน้ำตาลอ่อน | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ต้านทานการล้ม | เขียวอ่อน | เขียว | ปานกลาง | ใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวอ่อน |
| DOALG00077 | TML 92 | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ข้ามฤดู | ล้มง่ายมาก | เขียวอ่อน | เขียว | น้อย | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวเข้ม |
| DOALG00088 | ถั่วนิ้วนางแดง | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ข้ามฤดู | ล้มง่ายมาก | เขียวอ่อน | ม่วงอมเขียว | ปานกลาง | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวเข้ม |
| DOALG00107 | ถั่วนิ้วนางแดง | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ข้ามฤดู | ล้มง่ายมาก | เขียวอ่อน | ม่วงอมเขียว | ปานกลาง | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวเข้ม |
| DOALG00108 | ถั่วอะซูกิ | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ต้านทานการล้ม | เขียวอ่อน | เขียว | ค่อนข้างมาก | ใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวเข้ม |
| DOALG00111 | ถั่วแดงหลวง | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ต้านทานการล้ม | เขียวอ่อน | เขียว | ปานกลาง | ใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวอ่อน |
| DOALG00112 | ถั่วแดงหลวง | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ต้านทานการล้ม | เขียวอ่อน | เขียว | ปานกลาง | ใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวอ่อน |
| DOASB 1339 | สจ. 5 | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ต้านทานการล้ม | เขียว | เขียว | ค่อนข้างมาก | ใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียว |
| DOASB 1340 | ชม. 60 | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ต้านทานการล้ม | เขียวเข้ม | เขียว | น้อย | ใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียว |
| - | ถั่วเขียว ชัยนาท 4 | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ต้านทานการล้ม | เขียวเข้ม | ม่วงอมเขียว | ปานกลาง | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียวเข้ม |
| - | ถั่วเขียว ชัยนาท 84-1 | ไม่แตกกิ่ง | สลับ | ฤดูเดียว | ต้านทานการล้ม | เขียวเข้ม | เขียว | ปานกลาง | เหนือและใต้ทรงพุ่ม | <14 ซม. | เขียว |

กรมวิชาการเกษตร

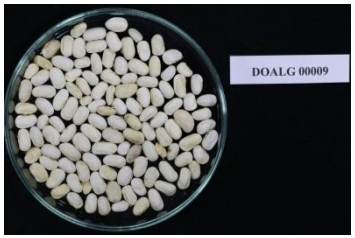
**ตารางที่ 2.3.1** ข้อมูลการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ถั่วสกุล phaseolus และพันธุ์ตรวจสอบ (ต่อ)

| GS.No. | ชื่อพันธุ์ | รูปร่างตัดขวางของฝัก | ระยะระหว่างเมล็ด | รูปร่างของเมล็ด | ความสม่ำเสมอของฝัก | จำนวนดอกต่อช่อ | จำนวนฝักต่อช่อ | ความยาวฝักสด | ความกว้างฝักสด | ความยาวฝักแห้ง | ความกว้างฝักแห้ง |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DOALG00009 | ถั่วแขก (ฝักเขียวเมล็ดขาว) | กลม | ติดกัน | กลม | สม่ำเสมอดี | 4 | 2 | 9 | 0.6- | 8.5 | 0.58 |
| DOALG00038 | TML 92 (2) | แบน | ติดกัน | แบน | สม่ำเสมอดี | 8 | 4 | 7.18 | 1.80 | 7.00 | 1.68 |
| DOALG00045 | TML 92 | แบน | ติดกัน | แบน | สม่ำเสมอน้อย | 5 | 4 | 7.40 | 1.64 | 7.12 | 1.64 |
| DOALG00046 | ถั่วแขก (ดำ) | กลม | ติดกัน | กลม | ไม่สม่ำเสมอ | 2 | 2 | 9.12 | 1.02 | 9.46 | 0.78 |
| DOALG00047 | TML 8 ถั่วขาว | แบน | ติดกัน | แบน | สม่ำเสมอดี | 10 | 4 | 6.08 | 1.76 | 6.68 | 1.68 |
| DOALG00059 | ถั่วบอย | แบน | ติดกัน | แบน | สม่ำเสมอดี | 7 | 4 | 6.64 | 1.82 | 6.18 | 1.7 |
| DOALG00072 | TML 76 ฝักสีน้ำตาลอ่อน | ค่อนข้างกลม | ติดกัน | รี | สม่ำเสมอน้อย | 4 | 2 | 11.22 | 1.12 | 9.96 | 1.04 |
| DOALG00077 | TML 92 | แบน | ติดกัน | แบน | ป่านกลาง | 9 | 6.6 | 7.16 | 1.84 | 7.30 | 1.72 |
| DOALG00088 | ถั่วนิ้วนางแดง | กลม | ติดกัน | กลม | สม่ำเสมอดี | 3 | 5 | 9.50 | 0.58 | 9.08 | 0.62 |
| DOALG00107 | ถั่วนิ้วนางแดง | กลม | ติดกัน | กลม | สม่ำเสมอดี | 4 | 6 | 9.36 | 0.60 | 9.14 | 0.64 |
| DOALG00108 | ถั่วอะซูกิ | กลม | ติดกัน | กลม | สม่ำเสมอน้อย | 3 |  | 7.64 | 0.40 | 8.32 | 0.44 |
| DOALG00111 | ถั่วแดงหลวง | ค่อนข้างกลม | ค่อนข้างติดกัน | รี | สม่ำเสมอน้อย | 4 | 2 | 9.94 | 1.26 | 7.22 | 1.24 |
| DOALG00112 | ถั่วแดงหลวง | ค่อนข้างกลม | ค่อนข้างติดกัน | รี | สม่ำเสมอน้อย | 4 | 2 | 10.44 | 1.48 | 9.60 | 1.3 |
| DOASB 1339 | สจ. 5 | แบน | ติดกัน | กลม | สม่ำเสมอดี | 3 | 2 | 5 | 1 | 4.5 | 0.9 |
| DOASB 1340 | ชม. 60 | แบน | ติดกัน | กลม | สม่ำเสมอดี | 3 | 2 | 5.1 | 1 | 4.6 | 0.91 |
| - | ถั่วเขียว ชัยนาท 4 | กลม | ติดกัน | กลม | สม่ำเสมอดี | 4 | 6 | 4.98 | 0.58 | 5.66 | 0.54 |
| - | ถั่วเขียว ชัยนาท 84-1 | กลม | ติดกัน | กลม | สม่ำเสมอดี | 5 | 6 | 11.28 | 0.72 | 10.34 | 0.6 |

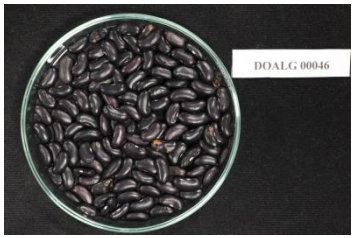
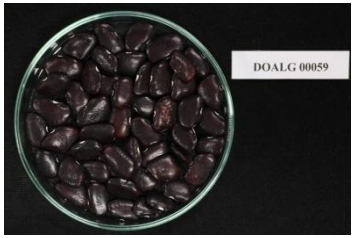
**ตารางที่ 2.3.2** ลักษณะประจำพันธุ์ถั่วสกุล phaseolus และพันธุ์ตรวจสอบ

| GS.No. | ชื่อพันธุ์ | ใบ/ดอก/ฝัก | รูปเมล็ด |
|---|---|---|---|

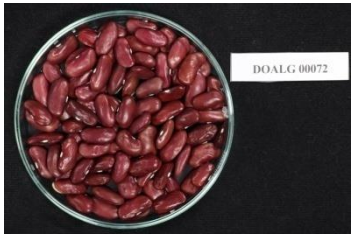
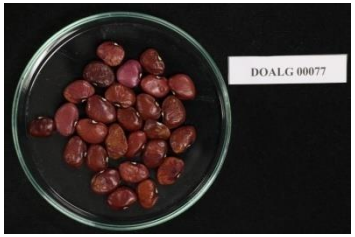
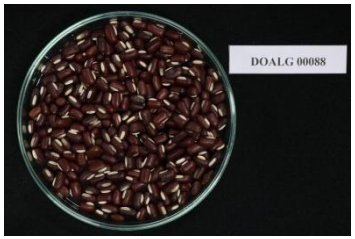
กรมวิชาการเกษตร

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| DOALG00009 | ถั่วแขก<br>(ฝักเขียวเมล็ดขาว) | | | |  |
| DOALG00038 | TML 92 (2) | | | | |
| DOALG00045 | TML 92 | | | | |

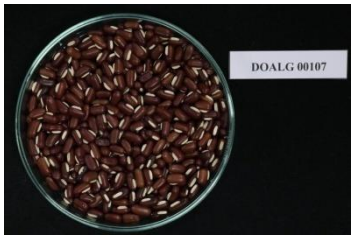
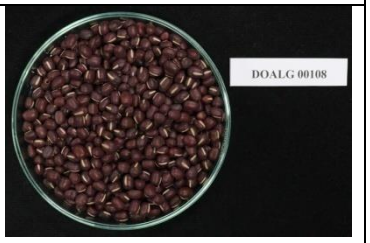
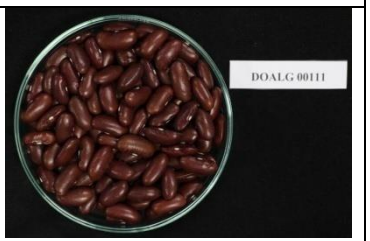
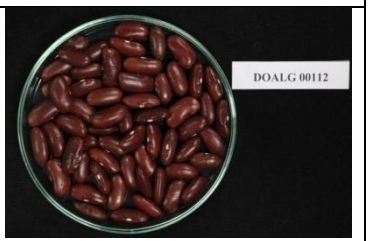
กรมวิชาการเกษตร

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| DOALG00046 | ถั่วแขก (ดำ) | | | |  |
| DOALG00047 | TML 8 ถั่วขาว | | | | |
| DOALG00059 | ถั่วบอย | | | |  |

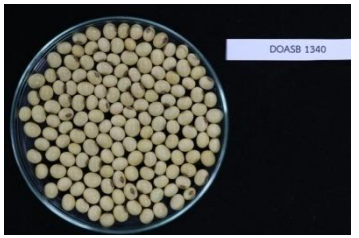
กรมวิชาการเกษตร

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| DOALG00072 | TML 76 ฝักสี<br>น้ำตาลอ่อน | | | |  |
| DOALG00077 | TML 92 | | | |  |
| DOALG00088 | ถั่วนิ้วนางแดง | | | |  |

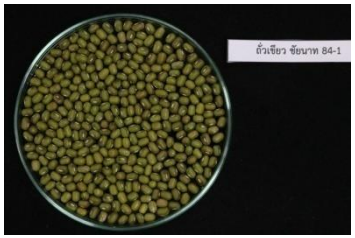
ศูนย์วิชาการเกษตร

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| DOALG00107 | ถั่วนิ้วนางแดง | | | |  |
| DOALG00108 | ถั่วอะซูกิ | | | |  |
| DOALG00111 | ถั่วแดงหลวง | | | |  |
| DOALG00112 | ถั่วแดงหลวง | | | |  |

กรมวิชาการเกษตร

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| DOASB 1339 | สจ. 5 | | | | |
| DOASB 1340 | ชม. 60 | | | |  |
| - | ถั่วเขียว ชัยนาท 4 | | | | |

ศูนย์วิทยทรัพยากร

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| - | ถั่วเขียว ชัยนาท 84-1 | | | |  |

กรมวิชาการเกษตร

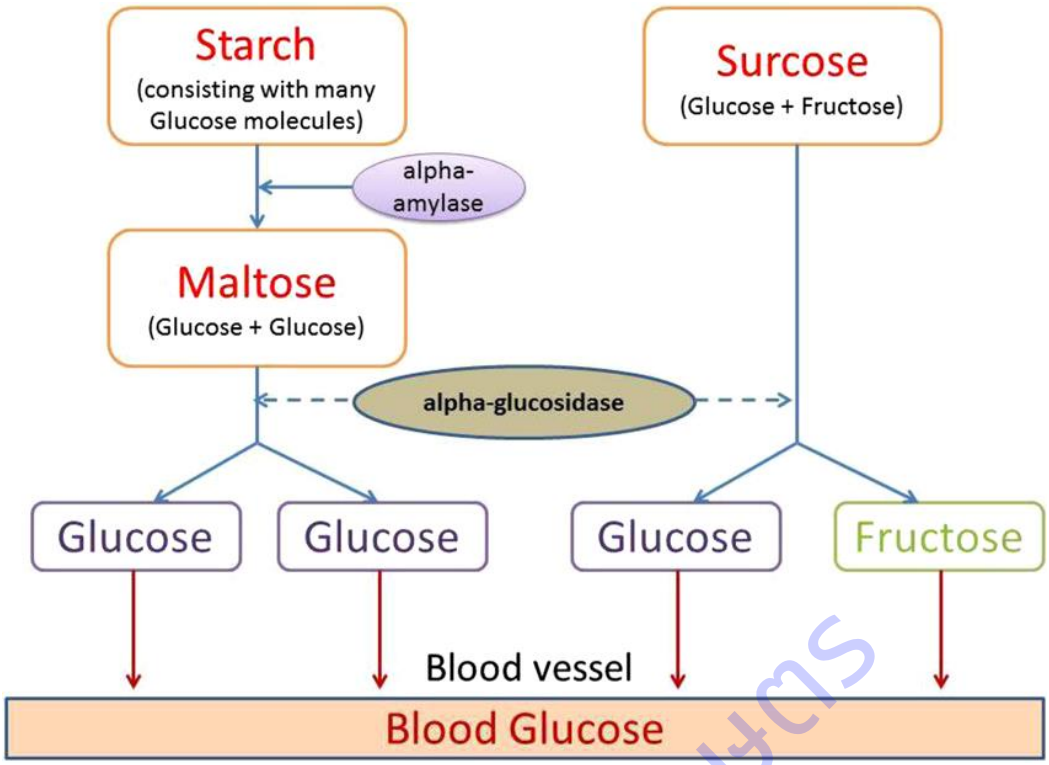
**การวิเคราะห์หาปริมาณพฤกษเคมี**

ทำการศึกษาสมบัติเชิงสุขภาพผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังบางชนิด ได้แก่ **โรคอ้วน** ผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส และ**โรคเบาหวาน** ผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟ่า-อะไมเลส เอนไซม์แอลฟ่า-กลูโคซิเดส และเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4 จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารที่สามารถทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ควบคุมโรคไม่ติดต่อเรื้อรังดังกล่าวข้างต้น เป็นสารสังเคราะห์ซึ่งมีข้อจำกัดเกี่ยวกับราคาการผลิต การนำเข้าจากต่างประเทศ และผลข้างเคียงจากการใช้ยา ซึ่งการใช้พืชอาหารที่มีฤทธิ์ทางยาอาจเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการป้องกันโรคเหล่านี้

โรคอ้วนเกิดจากการสะสมไขมันที่ผิดปกติหรือมากเกินไป ซึ่งพบว่ามีความเสี่ยงต่อสุขภาพ โดยเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์สำคัญในการย่อยไขมันให้กลายเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ดังนั้นถ้ามีสารยับยั้ง (inhibitor) ที่สามารถต้านการย่อยสลายไขมันเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันและจำกัดการดูดซึมของกรดไขมันในลำไส้เล็กแล้ว สารชนิดนี้จะสามารถนำมาใช้เป็นยาที่มีประโยชน์สำหรับการรักษาภาวะไขมันในเลือดสูง และป้องกันโรคอ้วนได้ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดถั่วเกือบทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 10-21 ที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. ยกเว้นถั่วเขียวทั้ง 2 พันธุ์ ที่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสเลยที่ความเข้มข้นของสารสกัดเดียวกันนี้ โดยถั่วที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด ได้แก่ ถั่วอะซูกิ และถั่วแดงหลวง โดยถั่วอะซูกิยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดอีกด้วย อย่างไรก็ตาม สำหรับถั่วแดงหลวง ถึงแม้จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสสูง แต่กลับมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมปานกลาง จึงเป็นไปได้ว่านอกจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมแล้ว ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ด้วย

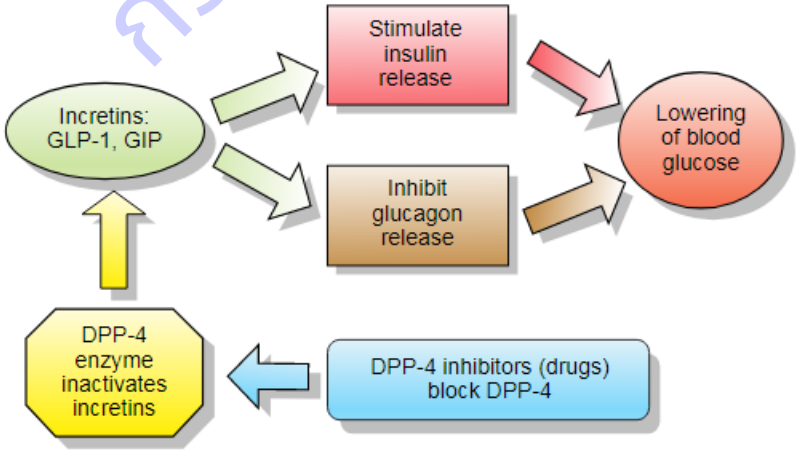
ส่วนโรคเบาหวานถือเป็นความผิดปกติของร่างกายที่ผลิตฮอร์โมนอินซูลินไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย หรือเกิดจากภาวะดื้ออินซูลินส่งผลให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูงกว่าปกติที่ควรจะเป็น ดังนั้นเป้าหมายหลักในการรักษาโรคเบาหวาน คือ การลดระดับน้ำตาลให้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับระดับปกติด้วยการใช้ยารับประทานและการฉีดอินซูลิน ควบคู่ไปกับการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย นอกจากนี้ยังมีทางเลือกของการรักษาโรคเบาหวาน ได้แก่ การใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวเนื่องกับการผลิตน้ำตาลกลูโคส เช่น เอนไซม์แอลฟ่า–กลูโคซิเดส และเอนไซม์แอลฟ่า–อะไมเลส ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (ภาพที่ 2.3.1) ซึ่งก็คือน้ำตาลกลูโคสที่สามารถเข้าสู่กระแสเลือด และไปเลี้ยงเซลล์ทั่วร่างกาย ดังนั้นถ้ามีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ จะสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดถั่วทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่า–อะไมเลส ได้ร้อยละ 13-31 ที่ความเข้มข้น 12.5 มก./มล. โดยถั่ว TML 92(2) และถั่วนิ้วนางแดงสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงที่สุดซึ่งถั่วชนิดนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมค่อนข้างสูง และอาจทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดถั่วทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่า–กลูโคซิเดส ได้ร้อยละ 6-60 ที่ความเข้มข้น 12.5 มก./มล.โดยถั่วเหลืองทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงกว่าถั่วชนิดอื่นๆ โดยถั่วเหลืองมีชนิด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง ซึ่งสารเหล่านี้อาจทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ที่ดีได้

กรมวิทยาศาสตร์บริการ




**ภาพที่ 2.3.1** การทำงานของเอนไซม์แอลฟ่า-อะไมเลส และเอนไซม์แอลฟ่า-กลูโคซิเดส

อีกองค์ประกอบหนึ่งของการควบคุมโรคเบาหวาน คือ การควบคุมปริมาณการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4 (ภาพที่ 2.3.2) ซึ่งจะส่งผลให้ยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนกลูคากอนจากตับอ่อนและกระตุ้นตับอ่อนหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ทำให้สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดถั่วทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4 ได้ร้อยละ 12-52 ที่ความเข้มข้น 125 มก./มล. โดยถั่วเขียวทั้ง 2 ชนิด และถั่วบอย สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงกว่าถั่วชนิดอื่นๆ โดยถั่วทั้ง 3 ชนิดนี้ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมค่อนข้างสูงซึ่งอาจสามารถทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งที่ดีได้ (ตารางที่ 2.3.3)




**ภาพที่ 2.3.2** การทำงานของเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4

กรมวิทยาศาสตร์

**ตารางที่ 2.3.3** ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวเนื่องกับโรคอ้วน (เอนไซม์ไลเปส) และเบาหวาน (เอนไซม์แอลฟ่า-อะไมเลส เอนไซม์แอลฟ่า-กลูโคซิเดส และเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4)

| GS.No. | พันธุ์ | ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | เอนไซม์ไลเปส* | เอนไซม์แอลฟ่า-อะไมเลส# | เอนไซม์แอลฟ่า-กลูโคซิเดส# | เอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4# |
| DOALG00038 | TML 92 (2) | 17.09 ± 1.46$^{c}$ | **31.06 ± 1.24$^{a}$** | 21.39 ± 1.51$^{f}$ | 38.32 ± 2.55$^{d}$ |
| DOALG00047 | ถั่วขาว | 12.06 ± 1.01$^{d}$ | 25.79 ± 1.47$^{b}$ | 12.32 ± 0.83$^{g}$ | 35.63 ± 3.39$^{d}$ |
| DOALG00059 | ถั่วบอย | 15.99 ± 1.45$^{c}$ | 25.04 ± 1.69$^{b}$ | 41.36 ± 2.73$^{c}$ | 47.33 ± 1.61$^{b}$ |
| DOALG00107 | ถั่วนิ้วนางแดง | 6.89 ± 0.48$^{f}$ | 30.08 ± 1.33$^{a}$ | 48.59 ± 2.94$^{bc}$ | 37.02 ± 3.37$^{d}$ |
| DOALG00108 | ถั่วอะซูกิ | **20.87 ± 2.05$^{a}$** | 12.53 ± 0.80$^{d}$ | 26.91 ± 2.17$^{e}$ | 11.95 ± 0.83$^{e}$ |
| DOALG00112 | ถั่วแดงหลวง | 19.31 ± 1.89$^{b}$ | 14.15 ± 0.38$^{d}$ | 6.43 ± 0.59$^{h}$ | 13.02 ± 1.11$^{e}$ |
| DOASB 1339 | ถั่วเหลือง สจ. 5 | 9.57 ± 0.57$^{e}$ | 24.77 ± 2.41$^{b}$ | **59.83 ± 3.96$^{a}$** | 42.44 ± 4.12$^{c}$ |
| DOASB 1340 | ถั่วเหลือง ชม. 60 | 9.57 ± 0.90$^{e}$ | 26.33 ± 2.03$^{b}$ | 52.18 ± 4.93$^{b}$ | 45.62 ± 2.35$^{b}$ |
| - | ถั่วเขียวผิวดำ | ND | 12.91 ± 0.87$^{d}$ | 49.32 ± 3.18$^{c}$ | **51.62 ± 3.37$^{a}$** |
| - | ถั่วเขียวผิวมัน | ND | 17.26 ± 1.32$^{c}$ | 37.98 ± 3.59$^{d}$ | 47.97 ± 4.27$^{b}$ |

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (*n=3*) และแสดงผลด้วย ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD); ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่น $p<0.05$ ด้วยการทดสอบ One-way ANOVA และ Duncan's multiple comparison test; *ความเข้มข้นของสารสกัด = 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร; #ความเข้มข้นของสารสกัด = 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

## สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

### สรุปผลการวิจัย

ได้ข้อมูลการจากการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ถั่วสกุล phaseolus และพันธุ์ตรวจสอบ จำนวนทั้งหมด 17 ตัวอย่างพันธุ์ เพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลของธนาคารเชื้อพันธุ์พืชสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต และสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลของนักปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกพันธุ์นำไปใช้ในเชิงการค้าเป็นการเพิ่มมูลค่าในตัวผลิตผลทางการเกษตร สร้างรายเสริมให้กับเกษตรกรผู้ปลูก ซึ่งลักษณะประจำพันธุ์ได้แก่ สีโคน สีดอก สีกลีบเลี้ยง ลักษณะการเจริญ รูปแบบการเจริญ ความยาวก้านใบ ความยาวก้านใบย่อย ขนใบที่ใบ การแตกกิ่ง ความหนาแน่นทรงพุ่ม ลักษณะการแตกกิ่ง การเรียงตัวของกิ่ง เป็นต้น

การวิเคราะห์หาปริมาณพฤกษเคมี จากการทดลองพบว่า สารสกัดที่ได้จากถั่วสกุล Phaseolus สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วน (เอนไซม์ไลเปส) และเบาหวาน (เอนไซม์แอลฟ่า-อะไมเลส เอนไซม์แอลฟ่า-กลูโคซิเดส และเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4) หากสามารถนำสารสกัดที่ได้จากถั่วสกุล phaseolus มาใช้บริโภคแทนสารที่ได้จากการสังเคราะห์เพื่อป้องกันการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง ซึ่งน่าจะเป็นทางเลือกที่ดี มีความปลอดภัย ไม่มีผลข้างเคียง อีกทั้งยังช่วยให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นจากการปลูกพืชเป็นการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร

### ข้อเสนอแนะ

ต้องค้นหาเชื้อพันธุกรรมพืชที่มีศักยภาพที่เก็บอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชมาเพื่อใช้ประโยชน์จากพื้นฐานความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงการค้าให้เพิ่มมากขึ้น

สงวนลิขสิทธิ์

กรมวิชาการเกษตร

**การทดลองที่ 4**

# การศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิจากรากหนอนตายหยากที่ได้จากการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช
# Study of secondary metabolite conservation of *Stemona* sp.

**สุกัลยา ศิริฟองนุกูล สุพินญา บุญมานพ พัชร ปิริยวินิตร และ ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์**
Sukunlaya Sirifungnukul, Suphinya Bunmanop, Phatchara Piriyavinit
and Teerapat Luangsuphabool

**คำสำคัญ :** หนอนตายหยาก สารทุติยภูมิ การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช
**Key words:** Non-Tai-Yak, *Stemona* sp., Secondary metabolite, Plant conservation

**บทคัดย่อ**

ศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิ (สารแอลคาลอยด์) ต้นหนอนตายหยากแต่ละชนิด (species) ที่รวบรวมมาจากแหล่งต่างๆ ปลูกเลี้ยงเพื่อการอนุรักษ์ไว้ในโรงเรือนทดลองของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร โดยต้นหนอนตายหยากที่สำรวจและรวบรวมมาได้จากแหล่งที่อยู่อาศัย 11 แห่ง สามารถจำแนกชนิด (species) ได้ 5 ชนิด ได้แก่ *Stemona curtisii* Hook. f., *S. collinsiae* Craib., *S. tuberosa* Lour., *S. rupestris* Inthachub., และ *S. pierrei* Gagnep และยังไม่สามารถจำแนกได้ 1 ชนิด เมื่อนำรากไปสกัดและตรวจสอบหาสารทุติยภูมิ stemocurtisine และ stemofoline พบว่า รากต้นหนอนตายหยากแต่ละชนิดมีสารทุติยภูมิหรือสารสารแอลคาลอยด์เป็นส่วนประกอบ โดยรากหนอนตายหยาก *S. rupestris* Inthachub. จาก อ.เขาวง จ. กาฬสินธุ์ ให้ปริมาณสาร stemocurtisine สูงที่สุด (1.68% w/w) ในขณะที่รากหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. จาก จ. กาญจนบุรี ให้ปริมาณสาร stemofoline สูงที่สุด (1.65% w/w)

การอนุรักษ์ต้นหนอนตายหยากโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น พบว่า *S. tuberosa* Lour. สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยได้ดีบนอาหารสูตร MS+6mg/l BA และ MS+8mg/l BA โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้น แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้ ในขณะที่ *S. collinsiae* Craib. สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS+2mg/l TDZ โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้น และสามารถเกิดรากได้บนอาหารสูตร MS+3%sucrose+1mg/l NAA+1mg/l thiamine คิดเป็นร้อยละ 71.23

## Abstracts

Study of secondary metabolites (Alkaloids) each *Stemona* spp. collected from various sources, 11 places. They can be identified into 5 species; *Stemona curtisii* Hook. f., *S. collinsiae* Craib., *S. tuberosa* Lour., *S. rupestris* Inthachub, *S. pierrei* Gagnap., and 1 unknown (*Stemona* sp.). *Stemona* alkaloids, stemocurtisine and stemofoline, were extracted and detected. Root extract from *S. rupestris* Inthachub from Khao Wong District, Kalasin Province yielded the highest amount of stemocurtisine (1.68% w/w), while *S. collinsiae* Craib. from Kanchanaburi Province yielded the highest amount of stemofoline (1.65% w/w)

*In vitro* Conservation of *S. tuberosa* Lour. and *S. collinsiae* Craib. were tested. The optimum medium inducing shoots from *S. tuberosa* Lour. was MS medium supplemented with 6-8 mg/l BA (average 3 shoots per pieces) and for *S. collinsiae* Craib. was MS medium supplemented with 2 mg/l TDZ (average 3 shoots per pieces). The optimum medium inducing roots for *S. collinsiae* Craib. plantlet was MS medium supplemented with 3% sucrose, 1 mg/l NAA and 1mg/l thiamine (accounted for 71.23%).

## บทนำ (Introduction)

พืชสมุนไพรหนอนตายหยากเป็นพืชที่เคยพบการกระจายพันธุ์ทั่วไปในทุกภูมิภาคของประเทศไทย แต่ปัจจุบันพบได้น้อย และไม่ค่อยเป็นที่รู้จักเหมือนในอดีต พืชสมุนไพรในสกุลหนอนตายหยากมีหลายชนิด (species) มีลักษณะทางกายภาพที่คล้ายคลึงกัน เป็นพืชสมุนไพรที่ชาวบ้านพื้นถิ่นรู้จักนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น การใช้ฆ่าเห็บเหาในสัตว์ประเภทโคกระบือ (วีระพล, 2536) บางชนิดใช้ฆ่าหนอนหรือใส่ในไหปลาร้าเพื่อป้องกันหนอนแมลงวัน (พนมกร, 2550) เป็นต้น จากตำราการแพทย์แผนไทย พบมีรายชื่อยาแผนโบราณหลายตำรับ ใช้รากหนอนตายหยากเป็นส่วนผสมในการปรุงเป็นยารับประทาน รักษาอาการไอ ขับเสมหะ ฆ่าพยาธิ มี

กรมวิชาการเกษตร

การนำมาพอกรักษาโรคผิวหนัง (วุฒิ, 2552) ระบบรากหนอนตายหยากนั้นเป็นรากสะสมอาหาร ออกเป็นกระจุกจำนวนมาก (ปาจารีย์, 2551) มีสารทุติยภูมิหรือสารสำคัญสะสมอยู่ในส่วนของราก เป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่มอัลคาลอยด์เรียกว่า Stemona alkaloids ตัวอย่างสารที่สำคัญ เช่น stemonine, stemocurtisine และ stemocurtisinol เป็นต้น โดยสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช (เช่น หนอน หนอนกระทู้ผัก เพลี้ยส้ม ด้วงถั่วเขียว) และจุลินทรีย์สาเหตุของโรคพืชได้หลายชนิด (Pilli and Ferreira de Oliveira, 2000; สุภาณี และคณะ, 2546) สามารถนำมาทดแทนการใช้สารเคมีในภาคเกษตรกรรมได้ และถ้าใช้ในปริมาณที่เหมาะสมเพียงเพื่อการป้องกันควบคุมหรือกำจัดแมลงศัตรูพืช หรือเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชก็ไม่มีสารตกค้างและ/หรือเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม (ไพบูลย์, 2551; อภิฤทธิ์, 2551; วีระพล และคณะ, 2536) นอกจากนี้ มีรายงานว่าสาร 1',2' –didehydrostemofoline และ stemofoline ที่สกัดได้จากรากพืชสมุนไพรหนอนตายหยากมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์ จึงถือว่ามีศักยภาพในการป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้อีกทางหนึ่ง (Baird *et al*., 2009) ด้วยคุณประโยชน์หลากหลายทำให้ปัจจุบันมีความต้องการใช้รากพืชสมุนไพรหนอนตายหยากเพิ่มมากขึ้น การขยายพันธุ์ธรรมชาติต้องใช้เวลาประมาณหลายปี จึงจะได้ต้นหนอนตายหยากที่มีรากขนาดที่เหมาะในการนำมาใช้ประโยชน์ได้ ส่งผลให้มีการขุดต้นหนอนตายหยากออกจากป่ามาขายเป็นจำนวนมาก ประกอบกับมีการถากถางพื้นที่เพื่อสร้างเป็นแปลงเพาะปลูกทางเกษตรเพิ่มขึ้น ด้วยสาเหตุนี้ ปัจจุบันการค้นหาต้นหนอนตายหยากต้องบุกลึกเข้าไปในเขตพื้นที่ป่ามากขึ้น ทำให้พืชสกุลหนอนตายหยากในหลายท้องถิ่นลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว บางพื้นที่ก็ไม่พบพืชสกุลนี้ในบริเวณนั้นอีกเลย จึงเริ่มมีการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ไว้เพื่อไม่ให้สูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติในประเทศไทย อย่างไรก็ตามพืชสมุนไพรสกุลหนอนตายหยากมีหลายชนิด ซึ่งมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก แต่ปริมาณสาระสำคัญที่มีอยู่ในรากสะสมอาหารนั้น นอกจากมีปริมาณสารชนิดเดียวกันที่อาจมีไม่เท่ากันหรือมีไม่เหมือนกันแล้ว คุณภาพของสารก็อาจมีไม่เท่ากันด้วยเช่นกัน ดังนั้น การเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุ์จึงควรมีการศึกษาข้อมูลปริมาณสาระสำคัญควบคู่กันไปด้วย เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในการนำเชื้อพันธุ์พืชไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสม ยั่งยืน

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณสารทุติยภูมิหรือสารสำคัญที่มีในรากสะสมอาหารของพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก (*Stemona* Lour.) แต่ละชนิดที่ทำการเก็บรวบรวมไว้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญควบคู่ไปกับการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก

ขอบเขตการวิจัย เริ่มจากการสำรวจ รวบรวม และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เปรียบเทียบกับรายงานที่มีอยู่แล้ว เพื่อระบุชนิดพืชสมุนไพรหนอนตายหยากที่ถูกต้อง จัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย และศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิหรือสารสำคัญที่มีอยู่ในรากพืชสมุนไพรสกุลหนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) ที่รวบรวมมาได้อย่างน้อย 3 ชนิด (species) เปรียบเทียบแต่ละชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานควบคู่กับการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชและการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## การทบทวนวรรณกรรม

### ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์พืชสมุนไพรหนอนตายหยาก

หนอนตายหยากเป็นพืชสกุล *Stemona* วงศ์ STEMONACEAE สามารถพบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย แต่จะพบมากบริเวณป่าเชิงเขาไม่สูงมากนักในแถบภาคกลางและภาคเหนือ เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอายุหลายปี มีลักษณะเป็นทั้งแบบไม้เลื้อยคลุม เลื้อยพัน ทอดนอน หรือตั้งตรง ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าสั้นๆ มีระบบรากเป็นรากสะสมอาหาร ออกเป็นกระจุกจำนวนมาก ใบเป็นใบเดี่ยว มีทั้งแบบเรียงสลับ แบบระนาบเดียว เรียงตรงข้าม หรือเรียงเป็นวง แผ่นใบเรียบรูปร่างแผ่นใบรี ไข่แกมรี หรือไข่กว้าง ฐานใบรูปหัวใจ หรือสอบเรียว เส้นใบขนาดตามยาว

กรมวิชาการเกษตร

มีหลายเส้นเห็นได้ชัดขนานกับขอบใบ เจริญออกจากจุดเดียวกัน ระหว่างเส้นใบตามยาวจะมีเส้นใบย่อยกั้นกลางออกมาประสานกันจนดูเป็นตาสี่เหลี่ยม โคนก้านใบป่อง ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือช่อดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลีบรวม 4 กลีบ เกสรเพศผู้ 4 อัน เกสรเพศเมีย 1 อัน 2 คาร์เพล 1 ช่อง รังไข่อยู่เหนือวงกลีบรวม ก้านเกสรเพสเมีย 1 อัน บางชนิดผลแห้งแตก 2 ข้าง เมล็ดมีรูปทรงรีกว้าง มีสันนูนยาวตามความยาวของเมล็ดชัดเจนหรือเลือนราง ก้านเมล็ดยาว เมล็ดสร้างปุยหุ้มเมล็ดชนิดพิเศษเรียกว่า elaiosome มีลักษณะฉ่ำน้ำและเป็นที่สะสมไขมัน (ปาจารีย์, 2551) จากรายงาน ศูนย์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (มณฑา และคณะ, 2551) ได้จำแนกชนิดของหนอนตายหยากโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ร่วมกับการจำแนกด้วยอนุกรมวิธาน โดยพิจารณาจากใบและดอก สามารถจำแนกได้ 9 ชนิด คือ *Stemona kerii, S. tuberosa* Lour., *S. tuberosa* cf. *phyllantha*, *S. burkillii, S. curtisii, S. collinsae* Craib., *S. cochichinensis* Unknown group-1 และ Unknown group-2 และรายงานจาก Flora of Thailand (2011) ระบุว่า มีพืชสกุล *Stemona* ในประเทศไทยทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Stemona aphylla, S. burkillii, S. cochinchinensis, S. collinsiae, S. curtisii, S. involuta, S. kerrii, S. phyllantha, S. pierrei, S. rupestris* และ *S. tuberosa*

การขยายพันธุ์ต้นหนอนตายหยากตามธรรมชาติ แบ่งออกเป็น 2 วิธี (เมธี, 2544) คือ

1) การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการเพาะเมล็ดให้เจริญเป็นต้นใหม่ แต่เนื่องจากหนอนตายหยากมีการพักตัวในฤดูหนาว จึงต้องใช้เวลาในการเจริญเติบโตมากกว่า 3 ปี จึงจะสามารถนำรากมาใช้ประโยชน์ได้

2) การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการใช้กระจุกรากที่มีส่วนของเหง้าและตาติดอยู่ นำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำและความชื้นสูง ซึ่งจะช่วยกระตุ้นให้ตาเจริญขึ้นจากเหง้าหรือลำต้นที่หดสั้นเหนือกระจุกรากนั้น จากนั้นจึงตัดแบ่งรากตามจำนวนตาที่แตกยอดใหม่เหนือกระจุกราก แยกปลูกเป็นต้นกล้าใหม่ได้

**ประโยชน์ของพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก**

พืชสมุนไพรหนอนตายหยากเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในหลายๆประเทศตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ชาวบ้านรู้จักนำมาใช้ประโยชน์ในการฆ่าเห็บเหาในสัตว์ประเภทโคกระบือและมีรายงานพบว่าสารสกัดรากหนอนตายหยากที่ความเข้มข้น ร้อยละ 50 สามารถฆ่าเห็บในระยะตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัยได้สูงสุดที่ร้อยละ 100 และ 93.33 ตามลำดับ โดยไม่พบผลข้างเคียงเนื่องจากการแพ้สารสกัดดังกล่าว (วีระพลและคณะ, 2536) บางชนิดใช้ฆ่าหนอน หรือใส่ในไหปลาร้าเพื่อกำจัดหนอนแมลงวันและแมลงศัตรูพืช (พนมกร, 2550) ในร้านขายยาแผนโบราณประเทศจีนหนอนตายหยากจะถูกเรียกชื่อว่า “Pai-pu” มีสรรพคุณใช้เป็นยาแก้ไอ ยาขับลม ยาถ่ายพยาธิลำไส้ ส่วนประเทศแถบอินโดจีนมีการนำรากของต้นหนอนตายหยากมาใช้เป็นยารักษาโรคเจ็บหน้าอก แก้โรคผิวหนัง (Stuart, 1911) ในส่วนของการทำการเกษตรกรรมนั้น ได้มีการนำรากของหนอนตายหยากมาบดละเอียดแล้วนำไปละลายน้ำ และนำน้ำที่กรองได้มาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ เช่น การใช้สารสกัดจากรากต้นหนอนตายหยากทำลายหนอนกระทู้ผักและแมลงวันทอง (อำนวยและอรรณพ, 2535) การควบคุมปริมาณหนอนในแปลงปลูกพืชตระกูลกระหล่ำ (กฤตชญา, 2547) เป็นต้น และจากรายงานของ Jiyavorranant (2001) พบว่า สารสกัดจากรากหนอนตายหยาก สามารถทำให้หนอนใยผักตายได้ร้อยละ 62.5 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และพบการตกค้างของสารสกัดหยาบจากหนอนตายหยากในปริมาณเล็กน้อยในช่วง 24 ชั่วโมง แต่เมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง ไม่พบการตกค้างของสารสกัด

**สารออกฤทธิ์ในรากของพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก**

กรมวิชาการเกษตร

จากรายงานของ Pilli *et al.* (2005) พืชสกุลหนอนตายหยากมีรากสะสมอาหารที่มีสารทุติยภูมิที่ในกลุ่มอัลคาลอยด์เรียกว่า Stemona alkaloids พบว่ามีมากกว่า 80 ชนิด จัดแบ่งเป็น 8 กลุ่มตามโครงสร้างหลัก คือ 1. กลุ่ม stenine 2. กลุ่ม stemoamide 3. กลุ่ม tuberostemospironine 4. กลุ่ม stemonamine 5. กลุ่ม pavistemoline 6. กลุ่ม stemofoline 7. กลุ่ม stemocurtisin 8. กลุ่มอื่นๆ หรือเรียกว่า miscellaneous group โดยต้นหนอนตายหยากแต่ละชนิดมีสาร *Stemona* alkaloids สะสมอยู่ในรากแตกต่างกันไป เช่น *Stemona tuberosa* มีสารอัลคาลอยด์ที่สามารถระบุชนิดได้แล้ว 14 ชนิด เช่น stenine, stemoamide, tuberostemonine, didehydrohuberostemonine, stemotinine, tuberostemospironine เป็นต้น มีรายงานพบสาร oxyprotostemonine, stemocurtisine และ stemocurtisinol ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งสกัดได้จากรากของพืชสมุนไพรหนอนตายหยากทั้งในชนิด *S. curtisii* Hook.f. และ *S. Kerrii* (Chotikadachanarong *et al*., 2011; เจษฎาภรณ์, 2554)

**การศึกษาสารทุติยภูมิ/สารสำคัญในพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก**

พืชสมุนไพรหนอนตายหยากแต่ละชนิดมีสารอัลคาลอยด์สะสมอยู่ในรากแตกต่างกันไป การศึกษาผลของการใช้รากสมุนไพรหนอนตายหยากในด้านต่างๆ มีเป็นจำนวนมาก ได้แก่

การศึกษาทางการแพทย์แผนโบราญมีรายงานการใช้ประโยชน์จากรากหนอนตายหยากในหลายประเทศ เช่น การใช้รากแช่เหล้าเป็นยาแก้ไอ และขับเสมหะ ในประเทศจีน (Qin and Xu, 1996) นอกจากนี้ มีรายงานว่าสาร 1',2' –didehydrostemofoline และ stemofoline ที่สกัดได้จากรากพืชสมุนไพรหนอนตายหยากมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์ จึงถือว่ามีศักยภาพในการป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้อีกทางหนึ่ง (Baird *et al*., 2009)

การศึกษาผลของสารสกัดจากรากสมุนไพรหนอนตายหยากกับการปศุสัตว์ เช่น การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดรากสมุนไพรหนอนตายหยาก (*S. collinsae*) ต่อเห็บโค (Boophilus microplus) ในระยะตัวอ่อน และระยะตัวเต็มวัย โดยมีการศึกษาทั้งในรูปแบบห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง พบว่า สารสกัดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถฆ่าเห็บในระยะตัวอ่อนได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และระยะตัวเต็มวัย 93.33 เปอร์เซ็นต์ โดยในส่วนของสัตว์ทดลองนั้น ไม่พบผลข้างเคียง หรืออาการผิดปกติเนื่องจากการแพ้ของสารสกัดดังกล่าว (วีระพล และคณะ, 2536) เมื่อนำรากพืชสมุนไพรหนอนตายหยากสดและแห้ง บดละเอียด แล้วนำไปผสมในอาหารและมูลไก่ พบว่า สามารถยับยั้งพัฒนาการของหนอนแมลงวันในมูลไก่ได้สูงกว่าในอาหาร อย่างไรก็ตาม ไม่พบผลกระทบต่อสุขภาพไก่ที่เลี้ยงทั้งทางด้านสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพของซากไก่ (ธวัชชัย และคณะ, 2545)

การควบคุมแมลงพาหะนำโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข พบว่า สารสกัดชีวภาพจากรากพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก (*Stemona* Lour.) ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10 – 50 มิลลิลิตร สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ที่เลี้ยงในน้ำกลั่น และน้ำจากคลองแสนแสบ ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ชุลีพร, 2550)

การใช้ประโยชน์ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช พบว่า มีรายงานการใช้สารสกัดจากรากสมุนไพรหนอนตายหยาก (*S. collinsae*) มีผลยับยั้งการทำลายของหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* Hubner. ได้ (รัตติยา และพิทยา, 2543) ในขณะที่ การนำรากสมุนไพรหนอนตายหยาก (Stemona spp.) มาสกัดสารด้วย methanol พบว่า มีความเป็นพิษสูงต่อด้วงงวงข้าวโพด (Sitophilus zeamais Motsch.) (วาสนา, 2545) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากสมุนไพรหนอนตายหยาก ชนิด Stemona tuberosa Lour. ที่ได้จากแหล่งต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นำมาสกัดด้วย methanol มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมหนอนใยผักและหนอนกระทู้ผัก (สุภาณี และคณะ, 2546)

กรมวิชาการเกษตร

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิจากรากพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก โดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งเป็นการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชได้อีกทางหนึ่ง เข้าช่วยโดยอาจมีการเติมสารประกอบที่มีแหล่งที่มาจากจุลชีพลงในอาหารเพาะเลี้ยง สามารถกระตุ้นให้พืชตอบสนองได้เหมือนกลไกการป้องกันตัวเองตามธรรมชาติ หรืออาจเป็นการใช้สารกระตุ้นเพื่อให้พืชสร้างสารทุติยภูมิในปริมาณที่มากขึ้น ซึ่งทำให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ตลอดทั้งปีโดยไม่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ ทั้งจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย อวัยวะพืชในรูปแบบรากเพาะเลี้ยง รากลอย การเพาะเลี้ยงแคลลัส หรือการเพาะเลี้ยงพืชทั้งต้น (วราภรณ์, 2551) การผลิตสารทุติยภูมิในพืชชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีการศึกษาวิจัยในพืชหลายชนิด เช่น การผลิตสาร plumbagin จากเซลล์แขวนลอย แคลลัส และราก hairy root ของต้นเจตมูลเพลิงแดง (Chuntaratin, 2006; สุภาภรณ์, 2547; สุกัลยา, 2549) การผลิตสาร shikonin จากเซลล์แขวนลอยของ *Lithospermum erythrorhizon* (Ramachandra and Ravishanker, 2002) นอกจากนี้ ยังทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิถึงในระดับอุตสาหกรรมในถังเพาะเลี้ยง (bioreactor) เพื่อทดแทนการปลูกพืชจากธรรมชาติ (วราภรณ์, 2551) ช่วยลดความเสี่ยงของปริมาณวัตถุดิบที่อาจไม่เพียงพออันเนื่องมาจากความไม่คงตัวของเซลล์พืช ปริมาณผลผลิตต่ำ การเจริญเติบโตช้า

## ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

**ประเด็นวิจัย**

รวบรวมเชื้อพันธุ์หนอนตายหยากจากแหล่งต่างๆ มาปลูกเก็บไว้ในโรงเรือน บันทึกข้อมูลเปรียบเทียบเพื่อระบุชนิด (species) ให้ถูกต้อง ศึกษาสารทุติยภูมิ/สารสำคัญที่สกัดได้จากรากสมุนไพรหนอนตายหยาก และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหนอนตายหยากเพื่อการอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อ

**สถานที่ทำการวิจัย**

โรงเรือนและห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ (บางเขน) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

**ระยะเวลาดำเนินงาน**

การทดลองนี้เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2561 สิ้นสุด เดือน กันยายน 2564

**วิธีการดำเนินการ**

1) การสำรวจและรวบรวมพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก

ค้นคว้าข้อมูล สำรวจ และรวบรวม ตัวอย่างสมุนไพรหนอนตายหยากจากสถานที่ต่างๆในพื้นที่ที่มีรายงานการกระจายพันธุ์ นำมาปลูกเก็บไว้ในเรือนเพาะชำ กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ (บางเขน) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อใช้เป็นวัสดุวิจัย จากนั้นบันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับรายงานของ Flora of Thailand (2011) และรายงานของ Pajaree (2008) เพื่อระบุชื่อวิทยาศาตร์ที่ถูกต้อง และจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimen) ตามวิธีการจัดทำพรรณไม้แห้งและส่งเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ/พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร

2) การศึกษาสารทุติยภูมิ/สารสำคัญ ที่สกัดได้จากรากพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก

2.1) การสกัดสารทุติยภูมิจากรากของต้นหนอนตายหยาก

นำตัวอย่างที่ที่รวบรวมมาได้จากข้อ 1 เข้าสู่กระบวนการสกัดสารทุติยภูมิจากราก ดัดแปลงตามขั้นตอนของ Chotikadachanarong (2011) โดยมีรายละเอียดดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

(1) ตัดแยกส่วนรากออกจากส่วนต้นของต้นหนอนตายหยาก นำมาล้างให้สะอาดและชั่งน้ำหนักสด ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท แล้วชั่งน้ำหนักแห้งของราก

(2) บดตัวอย่างให้ละเอียด นำไปสกัดด้วย ethanol 20 มล. ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 0.2 ก. เป็นเวลา 24 ชม. แล้วกรองสารละลายออกมา

(3) สกัดส่วนของกากซ้ำตามขั้นตอนที่ 1-2 อีก 2 รอบ

(4) นำสารละลายที่ได้มารวมกัน แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท ได้สารสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ

(5) นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปหาปริมาณสารทุติยภูมิด้วยเทคนิค HPLC

2.2) การหาปริมาณสารทุติยภูมิด้วย HPLC (High Perfomance Liquid Chromatography)

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.1 มาสกัดอีกครั้งเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ ดัดแปลงตามขั้นตอนของเจษฎาภรณ์ (2556) โดยมีรายละเอียดดังนี้

(1) นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 2.1 มาละลายใน methanol 1 มล. จากนั้นเติมน้ำ 1 มล. และตามด้วย dichloromethane (DCM) 2 มล. เมื่อสารละลายแยก ดูดส่วนของสารชั้นล่างซึ่งเป็นส่วนผสมของ DCM กับสารทุติยภูมิออกใส่ใน vial ให้ได้ปริมาตร 10 มล. นำไประเหยแห้งในตู้อบลมร้อน 40 องศาเซลเซียส จะได้ crude DCM extract ชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วจึงนำไปละลายด้วย methanol อัตราส่วน 1:1 (crude:methanol) กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่สารละลายกรองแล้วใน vial ขนาด 2 มล. สำหรับวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป

(2) การวิเคราะห์ตัวอย่างจากรากของหนอนตายหยาก โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์สำหรับเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ยี่ห้อ Waters รุ่น Delta 600 ตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจวัด Waters 2996 Photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ด้วยคอลัมน์ชนิด HPLC C18 column (C18; 25 cm x 4.6 mm, 10 mm) และใช้ปริมาณตัวอย่างในการฉีดวิเคราะห์ 10 มิลลิลิตร โดยเลือกใช้ stemocurtisine และ stemofoline บริสุทธิ์ เป็นสารมาตรฐาน ใช้สภาวะระบบตัวทำละลายในการวิเคราะห์จากโครมาโตแกรมสภาพขั้วและการละลายตามความเหมาะสมในแต่ละตัวอย่าง 2 ระบบ ดังแสดงในตารางที่ 2.4.1 และ 2.4.2 จากนั้นนำปริมาณสารที่ได้มาคำนวณหาปริมาณของสาร stemocurtisine และ stemofoline ที่มีในน้ำหนักแห้งของราก 1 ก.

(3) บันทึกผล วิเคราะห์ผลการทดลอง สรุปผล

**ตารางที่ 2.4.1** HPLC gradient flow condition system1 : สำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของตัวอย่างจากรากหนอนตายหยาก

| **เวลา (นาที)** | **ร้อยละโดยปริมาตรของตัวทำละลาย (v/v)** | | **อัตราการไหล (มล./นาที)** |
|---|---|---|---|
| | **เมทานอล** | **0.01 โมล/ล. แอมโมเนียมอะซิเตตในน้ำ (Milli-Q water)** | |
| 5 | 90 | 10 | 1.0 |
| 10 | 85 | 15 | 1.0 |

| เวลา (นาที) | ร้อยละโดยปริมาตรของตัวทำละลาย (v/v) | | อัตราการไหล (มล./นาที) |
|---|---|---|---|
| | เมทานอล | 0.01 โมล/ล. แอมโมเนียมอะซิเตตในน้ำ (Milli-Q water) | |
| 15 | 80 | 20 | 1.0 |
| 20 | 70 | 30 | 1.0 |
| 30 | 90 | 10 | 1.0 |

**ตารางที่ 2.4.2** HPLC gradient flow condition system2 : สำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของตัวอย่างจากรากหนอนตายหยาก

| เวลา (นาที) | ร้อยละโดยปริมาตรของตัวทำละลาย (v/v) | | อัตราการไหล (มล./นาที) |
|---|---|---|---|
| | เมทานอล | 0.01 โมล/ล. แอมโมเนียมอะซิเตตในน้ำ (Milli-Q water) | |
| 5 | 30 | 70 | 1.0 |
| 10 | 55 | 45 | 1.0 |
| 15 | 70 | 30 | 1.0 |
| 20 | 85 | 15 | 1.0 |
| 30 | 100 | 0 | 1.0 |

3) การเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพรหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์

(1) การเพาะเลี้ยงต้นหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ โดยตัดส่วนยอดใหม่ที่แตกออกมาจากเหง้า (rhizome) ของหนอนตายหยากที่ได้จากการสำรวจรวบรวม (อย่างน้อยจาก 3 แหล่งตัวอย่างหรือชนิดตัวอย่าง) ซึ่งมียอดอ่อนยาวอย่างน้อย 3-4 ข้อปล้อง มาล้างดินออกโดยล้างผ่านน้ำไหล จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำยาทำความสะอาดหรือผงซักฟอก แล้วจึงล้างด้วยน้ำสะอาดจนหมดคราบผงซักฟอก วางผึ่งไว้ให้หมาด เริ่มฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 5-10 % เติม tween20 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 10-15 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ย้ายปลายยอดและข้อไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เพื่อเตรียมเป็น stock culture ในการทดลองต่อไป

(2) การทดลองสูตรอาหารชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ

นำชิ้นส่วนหนอนตายหยากขนาดประมาณ 1 ซม. ที่มีตาติดอยู่ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลองสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน 3 ชนิด ได้แก่ 6-benzyladenin (BA) Kinetin (KN) และ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 2 4 และ 8 มก./ล. รวมทั้งหมด 12 สูตร และมีสูตรควบคุม (control) คือสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. และปรับค่า pH ที่ 5.75-5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงเป็นเวลา 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด เป็นเวลา 60 วัน บันทึกผลการเกิดยอด จำนวนยอดต่อชิ้น ความยาวยอด จำนวนใบ และร้อยละการเกิดราก

(3) การทดลองสูตรอาหารชักนำให้เกิดราก/รากสะสมอาหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

นำชิ้นส่วนหนอนตายหยากขนาดประมาณ 1 ซม. ที่มีตาติดอยู่ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลองสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 ก./ล. และเติม thiamine ความเข้มข้น 0 และ 1 มก./ล. ร่วมกับการไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน หรือการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน 2 ชนิด คือ Indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1 มก./ล. โดยมีสูตรควบคุม (Cr=control) คือสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. อาหารทุกสูตรปรับค่า pH ที่ 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงเป็นเวลา 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ วางแผนการทดลองแบบ CRD ปัจจัยที่สนใจศึกษา คือ การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชในการเกิดรากต่ออาหารทั้ง 12 สูตร สูตรละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด เป็นเวลา 60 วัน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การเกิดราก ลักษณะรากที่เกิดขึ้น ความยาวราก จำนวนราก

(4) ทดสอบการย้ายออกปลูก โดยนำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและเกิดเป็นต้นสมบูรณ์ ย้ายออกปลูกในโรงเรือน บันทึกผลร้อยละการรอดชีวิต และการเจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์ หลังย้ายปลูกนาน 2 เดือน

4) สรุปผลการทดลองทั้งหมด และรายงานผล

## ผลการวิจัย (Results)

1) การสำรวจและรวบรวมพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก

รวบรวมตัวอย่างเชื้อพันธุกรรมหนอนตายหยากปลูกลงกระถางเก็บอนุรักษ์ไว้ในโรงเรือน ได้จำนวนทั้งสิ้น 92 ตัวอย่าง จาก 11 แหล่ง ได้แก่

1) เชื้อพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการอนุรักษ์ไว้ในโรงเรือนของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช
2) ตลาดนัดสมุนไพร บริเวณวัดพระศรีรัตนมหาธาตุ (วัดพระพุทธชินราช) จ. พิษณุโลก
3) พื้นที่การเกษตร ต. กุดสินคุ้มใหม่ อ.เขาวง จ.กาฬสินธุ์
4) หาดทุ่งวัวแล่น ต.สะพลี อ.ประทิว จ.ชุมพร
5) พื้นที่สวนยางพาราา ต.แหลมสัก อ.อ่าวลึก จ.กระบี่
6) พื้นที่ป่าชุมชน อ.เมืองปาน จ.ลำปาง
7) พื้นที่ใน ต. ท่าเสา อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี
8) พื้นที่ใน ต. หนองทะเล อ.เมืองกระบี่ จ.กระบี่
9) พื้นที่การเกษตร ต.ปากน้ำ อ.บางน้ำจืด จ.ชุมพร
10) พื้นที่ป่าชุมชน อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
11) ตลาดขายสินค้าและต้นไม้บริเวณ ด่านช่องจอม บ้านด่านพัฒนา ต.ด่าน อ.กาบเชิง จ.สุรินทร์

สามารถจัดจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์โดยเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาจาก Flora of Thailand ได้ 5 ชนิด (species) (ภาพที่ 2.4.1-2.4.5) ไม่สามารถจำแนกได้ 1 ชนิด (ภาพที่ 2.4.6) ได้แก่

1. *Stemona curtisii* Craib.
2. *S. collinsiae* Craib.
3. *S. tuberosa* Lour.
4. *S. rupestris* Inthachub.
5. *S. pierrei* Gagnep
6. *Stemona* sp. (Unknown)

สำนักวิทยบริการฯ

**ภาพที่ 2.4.1** *Stemona curtisii* Hook. f.

**ภาพที่ 2.4.2** *Stemona collinsiae* Craib.

**ภาพที่ 2.4.3** *Stemona tuberosa* Lour.

**ภาพที่ 2.4.4** *Stemona rupestris* Inthachub.

**ภาพที่ 2.4.5** *Stemona. pierrei* Gagnep

**ภาพที่ 2.4.6** *Stemona* sp. (unknown)

ได้จัดทำตัวอย่างพรรณไม้เพื่อจัดเก็บเป็นตัวอย่างอ้างอิง และลงทะเบียนเป็นพรรณไม้อ้างอิงใน พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ จำนวน 26 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2.4.3, ภาพที่ 2.4.7)

กรมวิชาการเกษตร

**ภาพที่ 2.4.7** ตัวอย่างพรรณไม้แห้งผ่านกระบวนการรักษาสภาพและจัดทำเป็นพรรณไม้อ้างอิง (plant specimen) จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ

2) การศึกษาสารทุติยภูมิ/สารสำคัญ ที่สกัดได้จากรากพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก

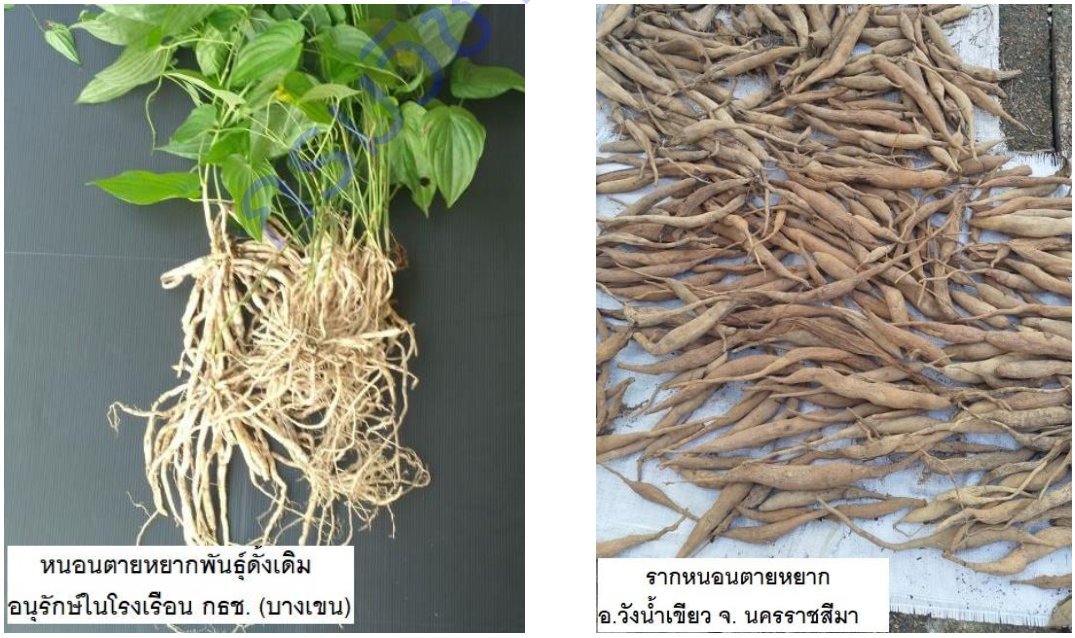
การสกัดและทดสอบสารมาตรฐาน stemocurtisine และ stemofoline คัดเลือกรากหนอนตายหยากพันธุ์ดั้งเดิมที่อนุรักษ์ไว้ในโรงเรือนอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช กธช. (บางเขน) เป็นตัวอย่างที่ 1 และรากหนอนตายหยากจาก อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา (เฉพาะรากที่หลุดจากต้นที่ขุดได้จากป่าชุมชน) เป็นตัวอย่างที่ 2 (ภาพที่ 2.4.8) นำไปสกัดและทดสอบเพื่อหาสารมาตรฐานในเบื้องต้น พบว่า ทั้งสองตัวอย่างให้ผลการทดสอบหาสารแอลคาลอยด์เป็นบวก (positive) (ตารางที่ 2.4.4) และเมื่อทำการแยกสารบริสุทธิ์จากทั้งสองตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างที่ 1 มีสารแอลคาลอยด์ stemocurtisine และ stemofoline เป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 2.4.9) ส่วนตัวอย่างที่ 2 ถึงแม้จะมีสารแอลคาลอยด์แต่ไม่ใช่สาร stemocurtisine และ stemofoline (ตารางที่ 2.4.5 และ 2.4.6)

**ตารางที่ 2.4.3** ตัวอย่างพรรณไม้แห้งเพื่อลงทะเบียนเป็นตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ

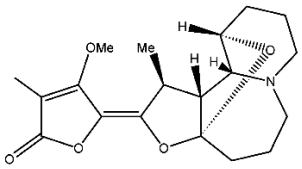
| ที่ | ผู้เก็บ/หมายเลข (Collector-Number) | ชื่อวิทยาศาสตร์ (Botanical Name) | หมายเลขลงทะเบียนเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (Bk number) |
|---|---|---|---|
| 1 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS1.1 | *Stemona tuberosa* Lour. | 070617 |
| 2 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS2.2 | *Stemona collinsiae* Craib | 070618 |
| 3 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS3.1 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070619 |
| 4 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS3.2 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070620 |
| 5 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS3.3 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070621 |
| 6 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS4.1 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070622 |
| 7 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS4.2 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070623 |
| 8 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS4.4 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070624 |
| 9 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS6.1 | *Stemona collinsiae* Craib | 070626 |
| 10 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS6.2 | *Stemona collinsiae* Craib | 070627 |
| 11 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS6.3 | *Stemona collinsiae* Craib | 070628 |
| 12 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS6.5 | *Stemona collinsiae* Craib | 070629 |

กรมวิชาการเกษตร

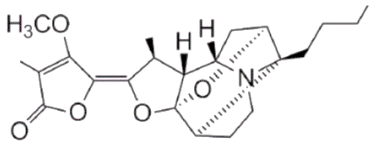
| ที่ | ผู้เก็บ/หมายเลข (Collector-Number) | ชื่อวิทยาศาสตร์ (Botanical Name) | หมายเลขลงทะเบียนเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (Bk number) |
|---|---|---|---|
| 13 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS7.1 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070630 |
| 14 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS7.2 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070631 |
| 15 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS7.4 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070632 |
| 16 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS7.5 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070633 |
| 17 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS7.6 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070634 |
| 18 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS7.7 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070635 |
| 19 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS8.1 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070636 |
| 20 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS8.4 | *Stemona curtisii* Hook. f. | 070637 |
| 21 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS10.1 | *Stemona rupestris* Inthachub | 070638 |
| 22 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS10.2 | *Stemona rupestris* Inthachub | 070639 |
| 23 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS10.3 | *Stemona rupestris* Inthachub | 070640 |
| 24 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS10.5 | *Stemona rupestris* Inthachub | 070641 |
| 25 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS10.8 | *Stemona rupestris* Inthachub | 070642 |
| 26 | S. Sirifongnukul & K. Pruesapan SS10.15 | *Stemona rupestris* Inthachub | 070643 |




**ภาพที่ 2.4.8** รากหนอนตายหยากอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (ตัวอย่างที่ 1) และรากหนอนตายหยากจาก อ.วังน้ำเขียว จ. นครราชสีมา (ตัวอย่างที่ 2)




stemoncurtisine




stemofoline

**ภาพที่ 2.4.9** โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ stemocurtisine และ stemofoline

**ตารางที่ 2.4.4** ผลการทดลองในการทดสอบหาสารแอลคาลอยด (alkaloids) ในตัวอย่าง

| ตัวอย่าง | ทดสอบด้วย Mayer's reagent | ทดสอบด้วย Dragendorff's reagent | การแปลผลการทดลอง |
|---|---|---|---|
| 1 | ตะกอนสีขาว | ตะกอนสีแดงสม | positive (มีสารแอลคาลอยด์) |
| 2 | ตะกอนสีขาว | ตะกอนสีแดงสม | positive (มีสารแอลคาลอยด์) |

**ตารางที่ 2.4.5** ค่า Chemical shift $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $d_H$ 7.26) ของสาร stemocurtisine

| $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $d_H$ 7.26) สารมาตรฐาน stemocurtisine | $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $d_H$ 7.26) สาร (3) |
|---|---|
| 4.15 (s, 3H) | 4.10 (s, 3H) |
| 4.01 (s, 1H) | 3.95 (s, 1H) |
| 3.44 (s, 1H) | 3.40 (s, 1H) |
| 3.38 (t, *J* = 13 Hz, 1H) | 3.30 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H) |
| 3.07 (quin, *J* = 6.5 Hz, 1H) | 3.05 (m, 1H) |
| 3.02 (m, 1H) | 3.00 (m, 1H) |
| 2.96 (m, 1H) | 2.95 (m, 1H) |
| 2.87 (m, 1H) | 2.80 (m, 1H) |
| 2.65 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H) | 2.60 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H) |
| 2.36 (dd, *J* = 4.5, 13.5 Hz, 1H) | 2.35 (dd, *J* = 4.5, 12.5 Hz, 1H) |
| 2.21 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H) | 2.18 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H) |
| 2.08 (s, 3H) | 1.95 (s, 3H) |
| 2.03 (m, 1H) | 2.10 (m, 1H) |
| 1.82 (m, 1H) | 1.80 (m, 1H) |
| 1.75 (m, 1H) | 1.79 (m, 1H) |
| 1.66 (m, 1H) | 1.69 (m, 1H) |
| 1.62 (m, 1H) | 1.60 (m, 1H) |
| 1.37 (d, *J* = 7 Hz, 3H) | 1.35 (d, *J* = 7 Hz, 3H) |

กรมวิชาการเกษตร

| $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $d_H$ 7.26) สารมาตรฐาน stemocurtisine | $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $d_H$ 7.26) สาร (3) |
|---|---|
| 1.21 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H) | 1.19 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H) |

**ตารางที่ 2.4.6** ค่า Chemical shift $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $d_H$ 7.26) ของสาร stemofoline

| $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $d_H$ 7.26) สารมาตรฐาน stemofoline | $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$ with $d_H$ 7.26) สาร (5) |
|---|---|
| 4.28 (br s, 1H) | 4.32 (br s, 1H) |
| 4.15 (s, 3H) | 4.27 (s, 3H) |
| 3.53 (br s, 1H) | 3.65 (br s, 1H) |
| 3.18 (ddd, 2H) | 3.22 (m, 2H) |
| 3.10 (dd, *J* = 9.9, 6.6 Hz, 1H) | 3.21 (dd, *J* = 10.0, 6.5 Hz, 1H) |
| 3.04 (ddd, 1H) | 3.17 (m, 1H) |
| 2.72 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H) | 2.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H) |
| 2.07 (s, 1H) | 2.11 (s, 1H) |
| 1.98 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H) | 2.12 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H) |
| 1.89 (m, 2H) | 1.95 (m, 2H) |
| 1.83 (dd, *J* = 10.0, 3.6 Hz, 1H) | 1.91 (dd, *J* = 10.0, 3.0 Hz, 1H) |
| 1.75 (m, 1H) | 1.83 (m, 1H) |
| 1.59 (m, 2H) | 1.67 (m, 2H) |
| 1.44 (m, 1H) | 1.50 (m, 1H) |
| 1.38 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H) | 1.47 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H) |
| 1.34 (m, 2H) | 1.40 (m, 2H) |
| 1.25 (m, 1H) | 1.20 (m, 1H) |
| 0.93 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H) | 1.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H) |

กรมวิชาการเกษตร

ทั้งนี้สารสำคัญที่พบข้างต้นจะถูกนำมาใช้เป็นสารมาตรฐาน (authentic standards) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิในตัวอย่างของรากหนอนตายหยากแต่ละชนิด (species) จากแหล่งที่มาต่างๆกันด้วยเทคนิค HPLC (High Perfomance Liquid Chromatography) โดยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Waters รุ่น Delta 600

จากวิเคราะห์สารสกัดที่ได้จากตัวอย่างรากหนอนตายหยากแต่ละชนิด (species) พบว่า สาร stemoncurtisine พบในรากหนอนตายหยาก 2 ชนิด (species) คือ

- *S. curtisii* Hook. f. ที่ได้ตัวอย่างพันธุ์จากแหล่งที่มา 6 แหล่ง ได้แก่

1) ตัวอย่างพันธุ์ดั้งเดิมที่อนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช
2) ตัวอย่างพันธุ์จาก อ.ประทิว จ.ชุมพร
3) ตัวอย่างพันธุ์จาก อ.อ่าวลึก จ.กระบี่
4) ตัวอย่างพันธุ์จาก อ.เมือง จ.กระบี่
5) ตัวอย่างพันธุ์จาก อ. บางน้ำจืด จ.ชุมพร
6) ตัวอย่างพันธุ์จาก อ. บางน้ำจืด จ.ชุมพร

- *S. rupestris* Inthachub. ที่ได้จาก อ.เขาวง จ.กาฬสินธุ์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิจากรากหนอนตายหยาก *S. rupestris* Inthachub. และ *S. curtisii* Hook. f. พบว่า มีสาร stemocurtisine เป็นสารประกอบหลักในตัวอย่าง โดยรากหนอนตายหยาก *S. rupestris* Inthachub. จาก อ.เขาวง จ. กาฬสินธุ์ ให้ปริมาณสาร stemocurtisine สูงที่สุด (1.68% w/w) รองลงมาคือรากหนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. จาก อ.ประทิว จ. ชุมพร (1.15% w/w) (ตารางที่ 2.4.7)

สาร stemofoline พบในรากหนอนตายหยาก 2 ชนิด (species) ได้แก่

- *S. curtisii* Hook. f. จากแหล่งที่มา 4 แห่ง คือ

1) ตัวอย่างพันธุ์ดั้งเดิมที่อนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช
2) ตัวอย่างพันธุ์ที่ได้จาก อ.ประทิว จ.ชุมพร
3) ตัวอย่างพันธุ์ที่ได้จาก อ.บางน้ำจืด จ.ชุมพร
4) ตัวอย่างพันธุ์ที่ได้จาก อ. บางน้ำจืด จ.ชุมพร

- *S. collinsiae* Craib. จากแหล่งที่มา 2 แห่ง คือ

1) ตัวอย่างพันธุ์จาก อ.ไทรโยค จ. กาญจนบุรี
2) ตัวอย่างพันธุ์จาก อ.เมือง จ.พิษณุโลก

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิจากรากหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. พบว่า มีสาร stemofoline เป็นสารประกอบหลักในตัวอย่าง โดยรากหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. ที่ได้จาก อ.ไทรโยค จ. กาญจนบุรี ให้ปริมาณสาร stemofoline สูงที่สุด (1.65% w/w) รองลงมาคือรากหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. จาก อ. เมือง จ. พิษณุโลก (1.03% w/w) (ตารางที่ 2.4.7)

สำหรับหนอนตายหยากชนิดอื่นๆ ได้แก่ *S. tuberosa* Lour. *S. rupestris* Inthachub. *S. pierrei* Gagnep. และ *Stemona* sp. (unknown) รวมถึง *S. curtisii* Hook. f. จาก อ.เมือง จ.กระบี่ ไม่พบสาร stemocurtisinol และ stemofoline จากสารสกัดรากดังกล่าว (ตารางที่ 2.4.7)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

**ตารางที่ 2.4.7** ปริมาณสารทุติยภูมิในตัวอย่างรากหนอนตายหยากแต่ละชนิด (species) จากแหล่งที่มาต่างๆกัน

| ลำดับ | ชนิด (species) | แหล่งที่มา | ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนัก (% w/w) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | stemocurtisine | stemofoline |
| 1 | *Stemona curtisii* Craib. | อนุรักษ์ดั้งเดิม | **1.12 ± 0.28*** | 0.16 ± 0.08 |
| 2 | *Stemona tuberosa* Lour. | เมืองปาน ลำปาง | - | - |
| 3 | *Stemona collinsiae* Craib. | ไทรโยค กาญจนบุรี | - | **1.65 ± 0.31*** |
| 4 | *Stemona curtisii* Hook. f. | ประทิว ชุมพร | **1.15 ± 0.25*** | 0.17 ± 0.05 |
| 5 | *Stemona curtisii* Hook. f. | อ่าวลึก กระบี่ | **0.94 ± 0.10*** | - |
| 6 | *Stemona collinsiae* Craib. | เมือง พิษณุโลก | - | **1.03 ± 0.42*** |
| 7 | *Stemona curtisii* Hook. f. | เมือง กระบี่ | **0.71 ± 0.20*** | - |
| 8 | *Stemona curtisii* Hook. f. | บางน้ำจืด ชุมพร | **1.03 ± 0.18*** | 0.11 ± 0.02 |
| 9 | *Stemona rupestris* Inthachub. | เขาวง กาฬสินธุ์ | **1.68 ± 0.39*** | - |
| 10 | *Stemona curtisii* Hook. f. | ทุ่งหว้า สตูล | 0.76 ± 0.21 | 0.09 ± 0.02 |
| 11 | *Stemona pierrei* Gagnep. | กาบเชิง สุรินทร์ | - | - |
| 12 | *Stemona tuberosa* Lour. | เมืองปาน ลำปาง | - | - |
| 13 | *Stemona* sp. | วังน้ำเขียว นครราชสีมา | - | - |

* สารประกอบหลักในตัวอย่าง

3) การเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพรหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์

(1) ฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อได้สำเร็จ จำนวน 2 ชนิด คือ *Stemona tuberosa* Lour. และ *S. collinsiae* Craib. (ภาพที่ 2.4.10) ทำการเพิ่มจำนวนต้นหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อด้วยการตัดข้อและเปลี่ยนย้ายอาหารสูตรเดิมทุกๆ 30-45 วัน เพื่อเตรียม stock culture สำหรับการทดลองชักนำเพิ่มจำนวนยอดอย่างรวดเร็ว และการชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ ต่อไป

**ภาพที่ 2.4.10** หนอนตายหยากเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

(2) ดำเนินการทดลองการชักนำให้เกิดยอดในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อหนอนตายหยากทั้งสองชนิด (*S. tuberosa* Lour. และ *S. collinsiae* Craib.) บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

เจริญเติบโต BA (6-benzyladinine) KN (Kinetin) และ TDZ (Thidiazuron) ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 2 4 6 และ 8 มก./ล. โดยสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสูตรควบคุม (control) (รวมเป็นอาหารทดลอง 13 สูตร) เลี้ยงในสภาพที่ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ช.ม./วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน พบว่า หนอนตายหยากทั้งสองชนิด (species) สามารถเจริญเติบโตขึ้นเป็นยอดใหม่ได้จากทุกสูตรอาหาร โดยหนอนตายหยาก *S. tuberosa* Lour. สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 6 มก./ล. (S3) และสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 8 มก./ล. (S4) โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้น ในขณะที่หนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 มก./ล. (S9) โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้น (ตารางที่ 2.4.8) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 2.4.1 และ 2.4.2)

**ตารางที่ 2.4.8** ผลการชักนำให้เกิดยอดหนอนตายหยากของ *S. tuberosa* Lour. และ *S. collinsiae* Craib. บนอาหารทดลอง 13 สูตร ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 60 วัน

| | code | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | สูตรอาหาร | BA2 | BA4 | BA6 | BA8 | KN2 | KN4 | KN6 | KN8 | TDZ2 | TDZ4 | TDZ6 | TDZ8 | control (MS) |
| *S. tuberosa* Lour. | จำนวนยอด | $2^{bc}$ | $2.25^{ab}$ | **$3^{a}$** | **$3^{a}$** | $1^{d}$ | $1.2^{c}$ | $1^{d}$ | $1^{d}$ | $1.25^{c}$ | $1.6^{bc}$ | $2^{bc}$ | $1.4^{bc}$ | $1.2^{c}$ |
| | ความสูง (ซม.) | 4.4 | 3.15 | 2.75 | 2.12 | 4.06 | 4.2 | 3.24 | 3.96 | 4.57 | 4 | 4.4 | **4.6** | 3.54 |
| *S. collinsiae* Craib. | จำนวนยอด | $2.8^{ab}$ | $2^{a-d}$ | $1.74^{cd}$ | $2.2^{a-d}$ | $2^{a-d}$ | $1.6^{cd}$ | $1^{d}$ | $1.6^{cd}$ | **$3^{a}$** | $2.4^{a-c}$ | $1.8^{b-d}$ | $2.6^{a-c}$ | $1.2^{d}$ |
| | ความสูง (ซม.) | **3.38** | 1.62 | 1.82 | 1.5 | 2.86 | 2.26 | 2.52 | 2.54 | 2.06 | 2.5 | 1.84 | 2.48 | 3.12 |

(3) ดำเนินการทดลองการชักนำให้รากยอดในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อหนอนตายหยากบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 ก./ล. และเติม thiamine ความเข้มข้น 0 และ 1 มก./ล. ร่วมกับการไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน หรือการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน 2 ชนิด คือ Indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1 มก./ล. โดยมีสูตรควบคุม (Cr=control) คือสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. อาหารทุกสูตรปรับค่า pH ที่ 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงเป็นเวลา 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ (รวมเป็น 12 สูตร) เป็นเวลา 60 วัน พบว่า สามารถชักนำให้ *S. collinsiae* Craib. เกิดรากได้ดีที่สุดคิดเป็นร้อยละ 71.23 บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sucrose 3% ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. และเพิ่มวิตามิน thiamine ความเข้มข้น 1 มก./ล. (R11) แต่สูตรอาหารทดลองชุดนี้ ไม่สามารถชักนำให้หนอนตายหยาก *S. tuberosa* Lour. เกิดรากบนอาหารทดลองได้ (ตารางที่ 2.4.9)

4) ทดสอบการย้ายออกปลูก โดยนำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเกิดเป็นต้นสมบูรณ์พร้อมออกราก ย้ายออกปลูกในโรงเรือน พบว่า ต้นหนอนตายหยากดังกล่าวไม่สามารถรอดชีวิตได้ จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนต้นกล้าสมบูรณ์ในสภาพหลอดทดลองแล้วทดสอบหาวิธีการที่เหมาะสมที่จะนำต้นกล้าออกปลูกในโรงเรือนและสามารถรอดชีวิตได้ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

**ตารางที่ 2.4.9** ผลการชักนำให้เกิดรากหนอนตายหยากของ *S. tuberosa* Lour. และ *S. collinsiae* Craib. บนอาหารทดลอง 12 สูตร ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 60 วัน

| | code | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | R8 | R9 | R10 | R11 | R12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | สูตรอาหาร | Thiamine free | | | | | | 1 mg/l thiamine | | | | | |
| | | 3%su (control) | 6%su | 3%su 1mg/l IBA | 6%su 1mg/l IBA | 3%su 1mg/l NAA | 6%su 1mg/l NAA | 3%su | 6%su | 3%su 1mg/l IBA | 6%su 1mg/l IBA | 3%su 1mg/l NAA | 6%su 1mg/l NAA |
| *S. tuberosa* Lour. | %การเกิดราก | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ความสูง (ซม.) | 5.7 | 4.2 | 5.3 | 4.3 | 3.7 | 4.1 | 4.6 | 4.6 | 4.1 | 3.4 | 3.4 | **3.0** |
| *S. collinsiae* Craib. | %การเกิดราก | 0 | 0 | **0** | 57.14 | 28.57 | 57.14 | 0 | 0 | 14.28 | 42.85 | **71.43** | 42.85 |
| | ความสูง (ซม.) | 3.9 | 3.4 | 3.9 | 3.8 | 4.1 | 3.7 | 3.8 | 3.3 | 4.3 | 3.9 | 4.9 | **4.5** |

## อภิปรายผล (Discussion)

**การศึกษาสารทุติยภูมิ/สารสำคัญ ที่สกัดได้จากรากพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก**

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิจากรากหนอนตายหยากแต่ละชนิด พบว่า หนอนตายหยาก *S. rupestris* Inthachub. และ *S. curtisii* Hook. f. มีสาร stemocurtisine เป็นสารประกอบหลัก โดย *S. rupestris* Inthachub. จาก อ.เขาวง จ. กาฬสินธุ์ ให้ปริมาณสาร stemocurtisine สูงที่สุด (1.68% w/w) รองลงมาคือราก หนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. จาก อ.ประทิว จ. ชุมพร (1.15% w/w) และพบว่า หนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. และ *S. curtisii* Hook. f. มีสาร stemofoline ซึ่งเป็นสารประกอบหลักใน *S. collinsiae* Craib. โดยรากหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. ที่ได้จาก อ.ไทรโยค จ. กาญจนบุรี ให้ปริมาณสาร stemofoline สูงที่สุด (1.65% w/w) รองลงมาคือรากหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. จาก อ. เมือง จ. พิษณุโลก (1.03% w/w) ส่วนใน *S. curtisii* Hook. f. นั้น พบว่ามีสาร stemofoline ในปริมาณที่น้อยและ *S. curtisii* Hook. f. จาก จ. กระบี่ ก็ไม่พบว่ามีสารชนิดนี้อยู่ในสารสกัดจากราก สำหรับหนอนตายหยากชนิดอื่นๆ ได้แก่ *S. tuberosa* Lour. *S. rupestris* Inthachub. *S. pierrei* Gagnep. และ *Stemona* sp. (unknown) ไม่พบสาร stemocurtisinol และ stemofoline ในสารสกัดจากรากดังกล่าว จะเห็นได้ว่าหนอนตายหยากแต่ละชนิด (species) มีสารแอลคาลอยด์ที่อาจเหมือนหรือต่างชนิดกันก็ได้ เช่น หนอนตายหยาก *S. rupestris* Inthachub ที่พบว่ามีสาร stemocurtisine ซึ่งเป็นสารประกอบหลัก และมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างต่างชนิดกัน แต่ไม่พบว่ามีสาร stemofoline จากรากหนอนตายหยาก *S. rupestris* Inthachub ในขณะที่สารสกัดจากรากหนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. สามารถตรวจพบว่ามีสารทุติยภูมิทั้งสองชนิดคือสาร stemocurtisine ซึ่งผลการวิเคราะห์ระบุว่าเป็นสารประกอบหลักจากสารสกัดที่ได้ และมีสาร stemofoline เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัดจากตัวอย่างรากหนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. เช่นกัน สอดคล้องกับรายงานของ Jiraporn (2013) ซึ่งศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิจากหนอนตายหยากโดยการปลูกแบบไม่ใช้ดิน โดยให้สารกระตุ้นเพื่อการผลิตสารแอลคาลอยด์และตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารที่ได้ในสัปดาห์ที่ 4 จากการเพาะเลี้ยง พบว่า

กรมวิชาการเกษตร

สารแอลคาลอยด์มีประมาณเพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดควบคุม โดยสารแอลคาลอยด์ที่วิเคราะห์ได้นั้น มีสาร stemocurtisine และสาร stemofoline ร่วมอยู่ด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้ จะเห็นได้ว่า แม้จะเป็นพืชที่เป็นชนิดเดียวกันแต่หากมีแหล่งที่มาต่างสถานที่กัน ก็อาจมีสารทุติยภูมิแตกต่างกันได้ ดังที่เห็นได้จากหนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. จาก จ. ชุมพร และ จ. สตูล วิเคราะห์สารทุติยภูมิที่สกัดได้จากรากพบว่ามีทั้งสาร stemocurtisine และ stemofoline แต่หนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. จาก จ. กระบี่ นั้นพบว่ามีสาร stemocurtisine เพียงอย่างเดียว

**การเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพรหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์**

สามารถฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อได้สำเร็จ จำนวน 2 ชนิด คือ *Stemona tuberosa* Lour. และ *S. collinsiae* Craib. และได้ทดลองสูตรอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนยอดและชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ

ดำเนินการทดลองการชักนำให้เกิดยอดในสภาพปลอดเชื้อ จากการทดลองหาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนยอดต้นหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนที่เป็นส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดและเพิ่มจำนวนยอดได้เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินเป็นส่วนประกอบ (รังสฤษดิ์, 2540; อารีย์, 2541) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยหลายฉบับที่มีการนำส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่ของต้นหนอนตายหยากมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนิน เช่น BA Kinetin TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน สามารถชักนำให้ส่วนข้อต้นหนอนตายหยากดังกล่าวเกิดยอดขึ้นใหม่ได้ (สุมนา และคณะ, 2548; Montri *et al.*,2006; Singlaw *et al*., 2008; Montri *et al.*,2009; Animesh *et al.*, 2011) โดยผลการทดลองสูตรที่ใช้ BA ความเข้มข้น 6 และ 8 มก./ล. เกิดยอดเฉลี่ย 3.0 ยอดต่อชิ้น ในหนอนตายหยาก *S. tuberosa* Lour. รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. เกิดยอดเฉลี่ย 2.25 ยอดต่อชิ้นนั้น ส่วนหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. ในการทดลองนี้สามารถเกิดยอดใหม่ ได้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุดบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 มก./ล. ได้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้น รองลงมาคืออาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ได้จำนวนยอดเฉลี่ย 2.8 ยอดต่อชิ้น ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Montri *et al*. (2006) ซึ่งเพาะเลี้ยงส่วนข้อของต้นหนอนตายหยาก (*S. curtisii* Hook f.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 20 µM (ประมาณ 5 มก./ล.) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.4 ยอดต่อชิ้น และรายงานของ Singlaw *et al*. (2008) เพาะเลี้ยงหนอนตายหยาก (*S. tuberosa* Lour.) ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 2.62 ยอดต่อชิ้น และการทดลองขยายพันธุ์หนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ กาญจนา และ อริยาภรณ์ (2551) ซึ่งสามารถชักนำให้หนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด 7 ยอดต่อชิ้น บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มก./ล.

อย่างไรก็ตาม สภาพแวดล้อมที่ถูกควบคุมระหว่างการเพาะเลี้ยงต้นหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อนั้นส่งผลต่อการเกิดยอดใหม่ที่แตกต่างกัน ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Animesh (2011) เพาะเลี้ยงส่วนข้อต้นหนอนตายหยาก บนอาหาร MS ที่เติม BAP 3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. ควบคุมการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในสภาพมืดก่อนเป็นเวลา 20 วัน จึงย้ายมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงสลับมืด (16/8 ช.ม./วัน) เป็นเวลา 40 วัน สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้จำนวนยอดเฉลี่ย 12 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ สุมนาและคณะ (2548) รายงานว่าเพาะเลี้ยงส่วนข้อของต้นหนอนตายหยากในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. ในสภาพแสง 24 ช.ม./วัน เป็นเวลา 1 เดือน เกิดยอดเฉลี่ยถึง 19.5 ต้นต่อชิ้นส่วน ดังนั้นการชักนำให้หนอนตายห

ยากเกิดยอดใหม่ได้จำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อจึงจำเป็นต้องศึกษาทั้งในส่วนชนิดและประมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อมที่ควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้ได้จำนวนยอดเกิดใหม่ได้มากที่สุด

การทดลองการชักนำให้รากยอดในสภาพปลอดเชื้อ จากการทดลองหาสูตรอาหารเพื่อชักนำให้หนอนตายหยาก 2 ชนิด (species) เกิดรากบนอาหารทดลองในสภาพปลอดเชื้อได้นั้น หนอนตายหยาก *S. collinsiae* Craib. สามารถเกิดรากได้บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sucrose 3% ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. และเพิ่มวิตามิน thiamine ความเข้มข้น 1 มก./ล. คิดเป็นร้อยละ 71.23 สอดคล้องกับรายงานของ กาญจนาและอริยาภรณ์ (2551) รายงานว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 1-3 มก./ล. สามารถชักนำต้นหนอนตายหยาก (*S. collinsae* Craib.) ให้เกิดรากได้ดีที่สุด แต่สูตรอาหารทดลองกลุ่มนี้ไม่สามารถชักนำให้ยอดหนอนตายหยาก *S. tuberosa* Lour. เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้ ซึ่งขัดแย้งกันกับการรายงานของ Animesh *et al.*(2011) ซึ่งสามารถชักนำยอดหนอนตายหยาก (*S. tuberosa* Lour.) ให้เกิดรากได้เฉลี่ย 4.7 รากต่อยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร half strength MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในขณะที่ Montri *et al.* (2006) รายงานว่าการใช้ IAA ความเข้มข้น 10 µM (1.7 มก./ล.) สามารถชักนำยอดหนอนตายหยาก (*S. curtisii* Hook f.) ให้เกิดรากได้ดีที่สุด และรายงานจาก Montri *et al.* (2009) พบว่า หนอนตายหยาก (*S. tuberosa* Lour.) สามารถเกิดรากได้บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม Auxin โดยใช้เวลาเพาะเลี้ยง 2 เดือน

อย่างไรก็ตาม การชักนำให้ต้นพืชในสภาพปลอดเชื้อเกิดรากขึ้นได้นั้น มีปัจจัยหลากหลายที่มีผลเช่น ชนิด (species) ของพืชที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม Auxin ที่นำมาใช้ สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง และอีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากในสภาพเพาะเลี้ยง (รังสฤษฏ์, 2540) โดยหากใช้ชนิดหรือความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมกับพืชและชิ้นส่วนนั้นๆ หรือมีความเข้มแสงหรืออุณหภูมิที่แตกต่างก็ทำให้ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้เช่นกัน (Geogre, 1993) เช่น รายงานของ อรพิน (2557) พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นผักหวานป่าบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0 0.5 และ 1.0 มก./ล. เป็นเวลา 60 วัน ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้

## สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการศึกษานี้สามารถรวบรวมพืชสมุนไพรหนอนตายหยากจากแหล่งธรรมชาติ 11 แห่ง เข้ามาปลูกอนุรักษ์ไว้ได้ โดยสามารถจำแนกหนอนตายหยากได้ 5 ชนิด (species) และจำแนกไม่ได้ 1 ชนิด ดังนี้ *Stemona curtisii* Craib. *S. collinsiae* Craib. *S. tuberosa* Lour. *S. rupestris* Inthachub. *S. pierrei* Gagnep และ *Stemona* sp. (Unknown)

1) รากของหนอนตายหยากทุกชนิดที่รวบรวมมาได้มีสารทุติยภูมิซึ่งเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นส่วนประกอบ

2) สาร stemocurtisine สามารถตรวจพบได้ในรากของหนอนตายหยาก 2 ชนิด คือ *S. curtisii* Hook. f. และ *S. rupestris* Inthachub โดยพบว่า รากของหนอนตายหยาก *S. rupestris* Inthachub ให้ปริมาณสาร stemocurtisine สูงที่สุด (1.68% w/w)

3) สาร stemofoline สามารถตรวจพบได้ในรากของหนอนตายหยาก 2 ชนิด คือ *S. curtisii* Hook. f. และ *S. collinsiae* Graib. โดยรากหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Graib. ให้ปริมาณสาร stemofoline สูงที่สุด (1.65% w/w)

4) หนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. ที่ได้จาก จ.ชุ มพร และ จ. สตูล ตรวจพบสาร stemocurtisine และ stemofoline ทั้งสองชนิด ในขณะที่หนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. ที่ได้จาก จ. กระบี่ ตรวจพบเพียง

กรมวิชาการเกษตร

สาร stemocurtisine เพียงอย่างเดียว จึงควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อพิสูจน์และเก็บข้อมูลประกอบการพิจารณาการนำรากหนอนตายหยากมาสกัดสารทุติยภูมิเป้าหมายได้เหมาะสมมากยิ่งขึ้น

5) หนอนตายหยาก *S. tuberosa* Lour. *S. pierrei* Gagnap และ *Stemona* sp. ตรวจพบว่ามีสารแอลคาลอยด์ในรากเช่นกัน แต่ไม่ใช่สาร stemocurtisine และ stemofoline จึงควรมีการวิเคราะห์สารแอลคาลอยด์ชนิดอื่นต่อไป

6) *S. tuberosa* Lour. สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยได้ดีบนอาหารสูตร MS+6mg/l BA และ MS+8mg/l BA โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้น แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้

7) *S. collinsiae* Craib. สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS+2mg/l TDZ โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้น และสามารถเกิดรากได้บนอาหารสูตร MS+3%sucrose+1mg/l NAA+1mg/l thiamine คิดเป็นร้อยละ 71.23

## การทดลองที่ 5

## การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง และโปรตีนในหัวเท้ายายม่อมเพื่อการอนุรักษ์

## Starch and Protein Analysis in Arrowroot of *Tacca leontopetaloides* Conservation for Utilization

**สุพินญา บุญมานพ ปาริฉัตร สังข์สะอาด และ สุกัลยา ศิริฟองนุกูล**

Suphinya Bunmanop, Parichat Sangkasa-ad, and Sukanlaya Sirifongnuku

**คำสำคัญ:** เท้ายายม่อม, แป้ง, โปรตีน

**Key words:** *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze., starch, protein

กรมวิชาการเกษตร

### บทคัดย่อ

เท้ายายม่อมเป็นพืชล้มลุกฤดูเดียว ลงหัวให้แป้งชนิดหนึ่ง และเป็นพืชท้องถิ่นของประเทศไทย เพื่อเปรียบเทียบปริมาณแป้งเท้ายายม่อมจากแหล่งต่างสถานที่ โดยวางแผนการทดลองแบบ CBD จำนวน 6 กรรมวิธี มี 4 ซ้ำ ดำเนินการทดลองในเดือน พฤษภาคม 2563 พบว่า เท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัดให้ผลผลิตหัวมีน้ำหนักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เท้ายายม่อมจาก จ.จันทบุรีมีน้ำหนักหัวสูงสุด (416.88 ก.) แต่ไม่แตกต่างกับหัวจาก จ.ฉะเชิงเทรา (411.88 ก.) ซึ่งปริมาณแป้งเท้ายายม่อมที่แปรรูปจากจากทั้ง 6 จังหวัดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมจากพันธุ์จ.อุบลราชธานีสูงสุด (220.37 ก./นน.สด 1 กก.) รองลงมาคือ จ.จันทบุรี (202.37 ก./นน.สด 1 กก.) นอกจากนี้ การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของเท้ายายม่อม พบว่า คาร์โบไฮเดรต และ โปรตีน จากแป้งเท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ปริมาณไขมัน ความชื้น เถ้า และใยอาหารทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

### Abstracts

*Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze. (Arrowroot) is a one-season annual plant, head down to a type of flour and is a local plant of Thailand. The experiment is compare the amount of

arrowroot from different sources by planning a 6-method CBD experiment with four repetitions, the experiment was conducted in May 2020. It was found that arrowroot from all six provinces had significantly different weight yields of tubers. Arrowroot from Chanthaburi Province had the highest head weight (416.88 g.), but it was not different from that of Chachoengsao Province (411.88 g.). The quantity of arrowroot processed from all 6 provinces was not statistically different. The content of arrowroot from Ubon Ratchathani variety was highest (220.37 g./fresh 1 kg. weight), followed by Chanthaburi province (202.37 g./fd. 1 kg.). Carbohydrate and protein of arrowroot from all 6 provinces were not statistically different. But the total fat, moisture, ash and fiber content were statistically significantly different.

## บทนำ

**การทดลองที่ 5** การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง และโปรตีนในหัวเท้ายายม่อมเพื่อการอนุรักษ์

**1. ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย** (เน้นปัญหาที่ต้องแก้ไข ซึ่งต้องทำให้ได้ ผลผลิต (output) ตรงเป้าประสงค์ของโครงการ ตามวัตถุประสงค์)

ปัจจุบันความสนใจในสุขภาพมาเป็นอันดับหนึ่ง ด้วยตระหนักถึงการเลือกบริโภคอาหารที่ถูกหลักและมีประโยชน์ต่อร่างกาย การเสริมสร้างความแข็งแรงของร่างกายซึ่งส่งผลถึงสุขภาพจิตที่ดี ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อบำรุงสุขภาพนำเสนอในรูปแบบต่างๆ และแป้งเป็นหนึ่งในความสนใจของตลาดเพื่อสุขภาพ การมุ่งเน้นศึกษาสารสำคัญต่างๆในพืช ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ประเทศไทยมีความหลากหลายทางด้านพืช ในการวิเคราะห์หาสารสำคัญในพืชนั้นมีการวิจัยอย่างกว้างขวางในหลายๆ หน่วยงาน ซึ่งกรมวิชาการเกษตร ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชได้เล็งเห็นความสำคัญต่อพืชที่ได้มีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช ที่ยังขาดข้อมูลเหล่านี้เพื่อประโยชน์ใช้ในการจัดทำฐานข้อมูล ทั้งในด้านการศึกษา การปรับปรุงพันธุ์พืช และการค้า พืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ พืชสมุนไพร และพืชท้องถิ่น เป็นที่สนใจเนื่องจากมีความสำคัญในการนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการบริโภค และทางด้านการแพทย์ ทั้งนี้พืชท้องถิ่นที่ให้แป้ง เช่น เท้ายายม่อม มีข้อมูลค่อนข้างน้อย ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยประเมินแป้ง ในพืชที่ได้การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช

**เท้ายายม่อม** เท้ายายม่อม เดิมใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tacca leontopetaloides* Ktze.) ปัจจุบันถูกจัดชื่อวงศ์ใหม่โดยWorld Checklist of Selected Plant Families (WCSP) ได้เปลี่ยนเป็น (*Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze.) เป็นพืชล้มลุกลงหัวคล้ายบุก จัดอยู่ในวงศ์ Dioscoreaceae (WCSP, 2012) จัดเป็นพืชแป้งชนิดหนึ่งแต่มีปริมาณแป้งไม่มาก (ภาพที่ 2.5.1) เมื่อเทียบกับพืชให้แป้งตามธรรมชาติอื่น คุณสมบัติของแป้งเท้ายายม่อมคล้ายคลึงกับแป้งกลอย สาคู สาคูเทศ มันเหน็บ และมันพร้าว แต่ลักษณะที่เด่นแตกต่างจากแป้งชนิดอื่น คือ เม็ดแป้งมีลักษณะมันและลื่นกว่า มีความละเอียดของเม็ดแป้งมากกว่า สีของแป้งขาวกว่า และที่สำคัญมีความหนืด (ความคงตัวของแป้ง) เมื่อโดนความร้อนสามารถคงตัวอยู่ได้นานกว่าแป้งชนิดอื่น ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารและทำขนมไทยได้หลายชนิด ทางการแพทย์ใช้เป็นอาหารบำรุงกำลังสำหรับคนฟื้นไข้ โดยละลายแป้งในน้ำกวนจนสุกเดิมด้วยน้ำตาลกรวด สำหรับสารสำคัญที่สกัดจากหัวเท้ายายม่อม คือ สารรสขม มีประมาณ 2.2 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยสารหลายชนิดได้แก่ sitosterol, cerylic alcohol, taccalin, alkaloids, steroidal saponins และสารสกัดจากใบ คือ steroidal saponins มีฤทธิ์ฆ่าหอยได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง มีคุณสมบัติในการรักษาโรคได้หลายชนิด เช่น โรคกระเพาะอาหาร ท้องร่วง และบิด และสามารถหยุดอาการเลือดออกในกระเพาะอาหาร ทั้งนี้ แทนนิน มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย รักษาโรคท้องเสีย ในด้านอุตสาหกรรมใช้แทนนินเป็นตัวลดตะกรันในหม้อไอน้ำ และใช้ฟองหนังคือตกตะกอนโปรตีน

กรมวิชาการเกษตร

**ภาพที่ 2.5.1** ต้น เมล็ด และหัวเท้ายายม่อม

แป้งต้านทานการย่อย (resistant starch) เป็นแป้งที่มีปริมาณน้อยที่ผสมอยู่ในองค์ประกอบของแป้งส่วนใหญ่ แต่พบว่ามีประโยชน์อย่างมากต่อร่างกาย สามารถเป็นแหล่งอาหารจุลินทรีย์สำหรับจุลินทรีย์ ช่วยส่งเสริมสุขภาพร่างกายให้แข็งแรง ส่งผลต่อระบบทางเดินอาหารบริเวณลำไส้ใหญ่ โดยถูกนำมาดัดแปรเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพในหลากหลายรูปแบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารเสริมเพื่อสุขภาพที่มีเส้นใยอาหารสูงออกมาจำหน่ายในรูปแบบแป้งทางการค้า ทำให้สะดวกต่อผู้บริโภคที่สามารถหาแหล่งอาหารที่มีแป้งต้านทานการย่อยเป็นส่วนประกอบมาบริโภคได้มากขึ้น เนื่องจากกระบวนการหมักแป้งต้านทานการย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมันชนิดสายสั้นที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายประการ โดยเฉพาะผลต่อระบบทางเดินอาหาร (ธนาภร, 2560) แป้งต้านทานการย่อยมีสมบัติคลายเส้นใยอาหาร (dietary fiber) นอกจากจะใช้ประโยชน์ในการเป็นส่วนผสมผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อช่วยในการปรับปรุงคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส และกลิ่นรสของอาหารแล้ว แป้งต้านทานการย่อยยังมีประโยชน์ต่อร่างการในการป้องกันการเกิดโรค เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง และลดปริมาณน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน เป็นต้น ปัจจุบันแป้งต้านทานการย่อยได้รับความนิยมสูงในการนำมาใช้เป็นส่วนผสมอาหารเพื่อสุขภาพ และเพิ่มมูลค่าในผลิตภัณฑ์อาหาร (กุหลาบ, 2553) ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Vu (2018) พบว่า เท้ายายม่อมเป็นพืชที่ให้แป้งที่มี ปริมาณของไฟเบอร์สูง (high fiber) สูงกว่าแป้งจากพืชชนิดอื่น และในทางเภสัชกรรม ศึกษาการผลิตแผ่นฟิล์มชนิดรับประทานได้ที่มีสมุนไพรผสมเพื่อใช้การแก้ง่วง จากแป้งชนิดต่างๆ 7 ชนิด ซึ่งฟิล์มที่มีส่วนผสมแป้งเท้ายายม่อม มีคุณลักษณะที่ดี ละลายน้ำเร็ว เรียบไม่กรอบแตกง่าย ไม่เหี่ยวเร็วและมีความคงตัว และเป็นส่วนประกอบในการพัฒนาแผ่นฟิล์มสารสกัดใบชาสำหรับยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ที่เป็นสาเหตุของกลิ่นปาก ในทางอุตสาหกรรมสิ่งทอมีศึกษานำแป้งเท้ายายม่อมทำเป็นฟิล์มเพื่อใช้งานเป็นวัสดุรองปักที่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้ชิ้นผ้ามีลวดลายปักชัดเจน ผ้าในลวดลายปักเรียบ เส้นไหมเรียงตัวสวยงามดีกว่าชิ้นผ้าที่รองปักด้วยฟิล์มละลายน้ำพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol)

ประเทศไทยมีการใช้แป้งเท้ายายม่อมอย่างกว้างขวาง แต่ผลผลิตส่วนใหญ่นำมาจากธรรมชาติ ดังนั้นจึงควรเพิ่มปริมาณการปลูก แต่การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดใช้ระยะเวลาการเจริญเติบโต 3 ปีจึงจะสามารถนำหัวมาใช้ได้ และ1 ต้นจะให้หัวเพียง 1 หัวเท่านั้น ซึ่งเท้ายายม่อมเป็นพืชท้องถิ่นให้แป้ง ถูกทำลายลงเนื่องจากพื้นที่แหล่งอาศัยหรือแหล่งกระจายพันธุ์ที่เกิดอยู่ในพื้นที่ป่าตามธรรมชาติถูกบุกรุกทำลายจากมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยการถูกจำกัดการกระจายพันธุ์จากปัจจัยธรรมชาติเอง ปัจจุบันไม่มีข้อมูลการปริมาณแป้งจากหัวเท้ายายม่อมที่ได้จากการอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งการทดลองนี้จะนำหัวที่ได้จากการเพาะเมล็ดในแหล่งพันธุ์ต่างสถานที่มาทดสอบปลูกเปรียบเทียบในสภาพแปลง โดยศึกษาปริมาณแป้ง และโปรตีนจากหัวเท้ายายม่อม ที่ขนาดหัวต่างๆ เพื่อเป็นประโยชน์ทางด้านวิชาการ พืชอาหารในการบริโภค ด้านเภสัชกรรม และวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ จึงนับเป็นพืชที่มีศักยภาพในเชิงเศรษฐกิจต่อไปในอนาคต

**การทบทวนวรรณกรรม**

กองบรรณสาร

สุภาภรณ์ และคณะ (2546ข) ทำการศึกษาการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของเท้ายายม่อม พบว่า การปลูกเท้ายายม่อมด้วยเมล็ดภายใต้สภาพการพรางแสง 50% มีการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิต (การพัฒนาเป็นดอกและเมล็ด) ได้ในปีที่ 3 แต่ละปีมีการเจริญเติบโตของต้นในช่วงฤดูฝน และพักตัว (ต้นเหี่ยวแห้งตายใบเหลือแต่หัวใต้ดิน) ในช่วงฤดูหนาวในปีที่ 1, 2 และ 3 มีการเจริญเติบโตของต้น คือ ความสูงของก้านใบสูงสุดเฉลี่ย 11.8, 27.43 และ 66.75 เซนติเมตร (ซม.) ตามลำดับ ขนาดหัวเฉลี่ย 7.3, 134.6 และ 291.96 กรัม (ก.) ตามลำดับ ในปีที่ 3 เก็บเกี่ยวผลผลิตหัวเฉลี่ย 4,034 กิโลกรัม/ไร่ และผลผลิตเมล็ดเฉลี่ย 21.35 กิโลกรัม/ไร่ สำหรับการศึกษาของสุพินญา และคณะ (2547ก) ศึกษาอิทธิพลของขนาดหัวเท้ายายม่อมต่อปริมาณแป้งและโปรตีน พบว่า เท้ายายม่อมชนิดต้นสีเขียว ให้เปอร์เซ็นต์แป้ง 78.61, 75.67 และ 75.45 ตามลำดับ (วิเคราะห์ total starch ในแป้งที่แปรรูปจากหัวเท้ายายม่อม) ส่วนเปอร์เซ็นต์โปรตีน เท่ากับ 0.24, 0.27 และ 0.23 ตามลำดับ และชนิดต้นสีม่วง ให้ผลในทำนองเดียวกับต้นสีเขียว คือ หัวขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ ให้เปอร์เซ็นต์แป้ง เท่ากับ 68.09, 74.36 และ 74.47 ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์โปรตีนในหัวขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ เท่ากับ 0.26, 0.26 และ 0.24 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแป้งและโปรตีนทางสถิติในหัวทุกขนาดทั้งชนิดต้นสีเขียว และต้นสีม่วง พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสุพินญา และคณะ (2547ข) ศึกษาอิทธิพลของขนาดหัวเท้ายายม่อมต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตเมื่อปลูกแซมในสวนมะม่วงหิมพานต์ พบว่า เท้ายายม่อมชนิดต้นสีม่วงที่หัวขนาดต่างๆ (เล็ก กลางและใหญ่) ให้น้ำหนักผลผลิต (น้ำหนักสด) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยหัวขนาดเล็ก และกลาง ให้น้ำหนักเพิ่ม 167.17 และ 134.01 % ตามลำดับ ส่วนหัวขนาดใหญ่มีการเพิ่มน้ำหนักเพียง 60.63 % ทั้งนี้ หัวขนาดเล็กมีการเจริญเติบโตและการสะสมอาหารขยายขนาดของหัวได้ดีกว่าหัวขนาดใหญ่ ซึ่งมีการเจริญเติบโตเต็มที่อยู่แล้ว ทั้งนี้สุภาภรณ์ และคณะ (2546ก) ได้ทำการศึกษาส่วนประกอบทางโภชนาการ และลักษณะทางกายภาพบางประการของหัว และแป้งจากหัวเท้ายายม่อมที่แปรรูปมาจากหัว 2 ฤดู และ 3ฤดู พบว่าหัวสดมีความชื้นของหัวเฉลี่ย 66.14 และ 66.99 % ตามลำดับและมีความถ่วงจำเพาะของหัวเฉลี่ย 1.12 และ 1.26 ตามลำดับ สำหรับการแปรรูปเป็นแป้งจากหัวเท้ายายม่อม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักหัวสดเฉลี่ย 20.99 และ 21.87 % ตามลำดับ ส่วนประกอบทางโภชนาการในแป้ง มีคาร์โบไฮเดรท 89.12 และ92.2 ก./100 ก. ตามลำดับ และใยอาหาร 0.59 และ 0.61 ก./ 100 ก. ตามลำดับ Borokini และ Ayodele (2012) วิเคราะห์พฤกษเคมีใน เท้ายายม่อม ใน 4 สถานที่ของประเทศไนจีเรีย พบว่า มีความแตกต่างในระดับของสารทุติยภูมิซึ่งขึ้นกับสถานที่ พบ สารอัลคาลอยด์ ซาโปนิน และแทนนิน ในใบของเท้ายายม่อม ในขณะที่ส่วนหัวจะมีเฉพาะสารอัลคาลอยด์

**2. วัตถุประสงค์**

วิเคราะห์ปริมาณแป้งต้านทานการย่อย (resistant starch) และโปรตีนจากหัวเท้ายายม่อมที่ได้จากการอนุรักษ์เพื่อการใช้ประโยชน์

## **ระเบียบวิธีการวิจัย** (Research Methodology)

**การทดลองที่ 5** การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง และโปรตีนในหัวเท้ายายม่อมเพื่อการอนุรักษ์

**สถานที่ทำการวิจัย**

กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ (บางเขน) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

**ระยะเวลาดำเนินงาน**

การทดลองนี้เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2562 สิ้นสุด เดือน กันยายน 2564

กรมวิชาการเกษตร

**วิธีการดำเนินการ**

**ขั้นตอนที่ 1 การเปรียบเทียบผลผลิต หัวเท้ายายม่อมจากต่างแหล่งพันธุ์ 6 แห่ง (ปี 2563-2564)**

วางแผนการวิจัย นำหัวเท้ายายม่อมที่ได้จากแหล่งพันธุ์ธรรมชาติ 6 แหล่ง มีขนาด 150-200 กรัม มาจัดสิ่งทดลอง ดำเนินการทดลองในเดือน พฤษภาคม 2563 โดยวางแผนการทดลองแบบ CBD จำนวน 6 กรรมวิธี มี 4 ซ้ำ คือ

กรรมวิธีที่ 1 หัวเท้ายายม่อม จาก จ.จันทบุรี
กรรมวิธีที่ 2 หัวเท้ายายม่อม จาก จ.กาฬสินธุ์
กรรมวิธีที่ 3 หัวเท้ายายม่อม จาก จ.ฉะเชิงเทรา
กรรมวิธีที่ 4 หัวเท้ายายม่อม จาก จ.อุบลราชธานี
กรรมวิธีที่ 5 หัวเท้ายายม่อม จาก จ.พังงา
กรรมวิธีที่ 6 หัวเท้ายายม่อม จาก จ.ตรัง

นำหัวเท้ายายม่อมปลูกลงกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 นิ้ว ใช้จำนวนหัว 6 หัวต่อซ้ำในแต่ละกรรมวิธี บันทึกผลการเจริญเติบโตทุกเดือน เก็บเกี่ยวผลผลิตหัวเท้ายายม่อม เมื่อใบแก่มีสีเหลืองและเหี่ยว เก็บข้อมูลผลผลิตน้ำหนักหัวสด วิเคราะห์ปริมาณแป้งต้านทานการย่อยตามวิธีการของ AOAC (2002) และโปรตีน

## **ผลการวิจัย** (Results)

รวมรวบหัวเท้ายายม่อมแหล่งพันธุ์ต่างสถานที่ จาก 6 จังหวัด คือ จ.จันทบุรี จ.กาฬสินธุ์ จ.ฉะเชิงเทรา จ.อุบลราชธานี จ.พังงา และ จ.ตรัง (ภาพที่ 2.5.2) และจัดสิ่งทดลองตามกรรมวิธีที่วางแผนการทดลอง (ภาพที่ 2.5.3) และประสานงานการเลือกพื้นที่ปลูกใน ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน-สวพ.6 จันทบุรี

**ภาพที่ 2.5.2** รวมรวบเท้ายายม่อมแหล่งพันธุ์ต่างสถานที่ (ธันวาคม 2562)

**ภาพที่ 2.5.3** เท้ายายม่อมจากแหล่งพันธุ์ต่างสถานที่ (มีนาคม 2563)

การเจริญเติบโตของเท้ายายม่อมที่อายุ 5 เดือนหลังปลูก (กันยายน 2563) ดังแสดงในภาพที่ 2.5.4 โดยทั้ง 6 กรรมวิธี มีจำนวนก้านใบ อยู่ระหว่าง 1-6 ก้านต่อหัว มีความยาวก้านใบอยู่ระหว่าง 11-86 เซนติเมตร (ซม.) จำนวนก้านช่อดอก 1 ก้านต่อหัวโดยมีความยาวก้านช่อดอกอยู่ระหว่าง 94-167 ซม. ดังแสดงในตารางที่ 2.5.1

**ตารางที่ 2.5.1** การเจริญเติบโตของเท้ายายม่อมที่อายุ 5 เดือนหลังปลูก

| กรรมวิธี | ก้านใบ | | ก้านช่อดอก | |
|---|---|---|---|---|
| | จำนวน | ความยาว (ซม.) | จำนวน | ความยาว (ซม.) |
| 1.เท้ายายม่อมจากจันทบุรี | 2-4 | 25-83 | 1 | 122 |
| 2.เท้ายายม่อมจากกาฬสินธุ์ | 2-4 | 11-67 | 1 | 94 |
| 3.เท้ายายม่อมจากฉะเชิงเทรา | 1-3 | 18-57 | 1 | 88 |
| 4.เท้ายายม่อมจากอุบลราชธานี | 3-6 | 12-71 | 1 | 111 |
| 5.เท้ายายม่อมจากพังงา | 2-4 | 12-60 | 1 | 167 |
| 6.เท้ายายม่อมจากตรัง | 2-4 | 12-86 | 1 | 150 |

กรมวิชาการเกษตร

**ภาพที่ 2.5.4** เท้ายายม่อมที่อายุ 4 เดือนหลังปลูก (กันยายน 2563)

การเก็บเกี่ยวหัวเท้ายายม่อม เมื่อใบแก่มีสีเหลืองและเหี่ยว ผลการทดลองพบว่า เท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัดให้ผลผลิตหัวมีน้ำหนักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เท้ายายม่อมจาก จ.จันทบุรีมีน้ำหนักหัวสูงสุด (416.88 กรัม) แต่ไม่แตกต่างกับหัวจาก จ.ฉะเชิงเทรา (411.88 กรัม) ดังแสดงในตารางที่ 2.5.2 และภาพที่ 2.5.5 และการแปรรูปแป้งเท้ายายม่อมพบว่า ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมที่แปรรูปจากจากทั้ง 6 จังหวัดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมจากพันธุ์จ.อุบลราชธานีสูงสุด (220.37 ก./นน.สด 1 กก.) รองลงมาคือ จ. จันทบุรี (202.37 ก./นน.สด 1 กก.) ดังแสดงในตารางที่ 2.5.2 และภาพที่ 2.5.6

**ตารางที่ 2.5.2** น้ำหนักหัวเท้ายายม่อมที่อายุ 8 เดือนหลังปลูก

| กรรมวิธี | น้ำหนักหัว (กรัม) | แป้ง (กรัม)/หัวสด 1กก. |
|---|---|---|
| 1.เท้ายายม่อมจากจันทบุรี | 416.88 a | 202.37 |
| 2.เท้ายายม่อมจากกาฬสินธุ์ | 246.88 bc | 189.36 |
| 3.เท้ายายม่อมจากฉะเชิงเทรา | 411.88 a | 183.11 |
| 4.เท้ายายม่อมจากอุบลราชธานี | 261.88 b | 220.37 |
| 5.เท้ายายม่อมจากพังงา | 191.88 c | 178.81 |
| 6.เท้ายายม่อมจากตรัง | 291.25 b | 188.38 |
| F-test | ** | ns |
| CV (%) | 18 | 13 |

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละทรีตเม้นต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**ภาพที่ 2.5.5** หัวเท้ายายม่อมเก็บเกี่ยวที่อายุ 8 เดือนหลังปลูก (มกราคม 2564)

**ภาพที่ 2.5.6** แป้งเท้ายายม่อม จาก 6 จังหวัด (จันทบุรี ฉะเชิงเทรา กาฬสินธุ์ อุบลราชธานี พังงา และตรัง)

กรมวิชาการเกษตร

**การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการในเท้ายายม่อม**

การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของเท้ายายม่อมสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบหลักในอาหาร ซึ่งได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ความชื้น เถ้า และใยอาหารทั้งหมด จากแป้ง

เท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัด การทดสอบใช้วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหารของ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International 2019 โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบหลักในอาหาร พบว่า คาร์โบไฮเดรต และ โปรตีน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตอยู่ระหว่าง 87.48 - 88.67 กรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม และโปรตีนมีปริมาณ น้อยกว่า 0.1 กรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม สำหรับปริมาณไขมัน ความชื้น เถ้า และใยอาหารทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ปริมาณไขมันของแป้งเท้ายายม่อม จาก จ.จันทบุรี มีปริมาณไขมันสูงสุด (0.68 กรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม) ปริมาณเถ้าของแป้งเท้ายายม่อมจาก จ. ฉะเชิงเทรา มีปริมาณสูงสุด (0.11 กรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม) ปริมาณใยอาหารทั้งหมดของแป้งเท้ายายม่อมจาก จ. อุบลราชธานี มีปริมาณสูงสุด (1.60 กรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม) ดังแสดงในตารางที่ 2.5.3

**ตารางที่ 2.5.3** ปริมาณของสารประกอบหลักในอาหารของตัวอย่างจากเท้ายายม่อมต่อปริมาณสารตัวอย่าง 100 กรัม

| กรรมวิธี | ปริมาณของสารประกอบ (กรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | คาร์โบไฮเดรต | ไขมัน | โปรตีน | ความชื้น | เถ้า | ใยอาหารทั้งหมด |
| 1.เท้ายายม่อมจากจันทบุรี | 87.48 | 0.68a | <0.10 | 11.47b | 0.088bc | 1.09ab |
| 2.เท้ายายม่อมจากกาฬสินธุ์ | 87.48 | 0.61ab | <0.10 | 11.47b | 0.107a | 0.25c |
| 3.เท้ายายม่อมจากฉะเชิงเทรา | 87.52 | 0.25b | <0.10 | 13.26a | 0.110a | 0.64bc |
| 4.เท้ายายม่อมจากอุบลราชธานี | 88.46 | 0.43b | <0.10 | 11.18b | 0.073c | 1.60a |
| 5.เท้ายายม่อมจากพังงา | 88.23 | 0.43b | <0.10 | 11.57b | 0.085c | 0.30c |
| 6.เท้ายายม่อมจากตรัง | 88.67 | 0.01c | <0.10 | 11.42b | 0.103ab | 0.36c |
| F-test | ns | ** | ns | ** | ** | ** |
| CV (%) | 1 | 17 | 0 | 7 | 0 | 63 |

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละทรีตเม้นต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร

**อภิปรายผล** (Discussion)

จากผลการทดลองลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัดมีลักษณะที่แตกต่างกันในด้านสีและความยาวของก้านใบ ซึ่งเท้ายายม่อมจาก จ.จันทบุรี จ.อุบลราชธานี จ.ตรัง และจ.พังงา มีความยาวกว่าเท้ายายม่อมจาก จ. กาฬสินธุ์ และจ.ฉะเชิงเทรา โดยผลผลิตหัวมีน้ำหนักแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญยิ่ง เท้ายายม่อมจาก จ.จันทบุรีมีน้ำหนักหัวสูงสุด (416.88 ก.) แต่ไม่แตกต่างกับหัวจาก จ.ฉะเชิงเทรา (411.88 ก.) ซึ่งมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่แตกต่างกัน ใบของเท้ายายม่อมจาก จ.จันทบุรีจะมีความยาวกว่า จ.ฉะเชิงเทรา การแปรรูปแป้งเท้ายายม่อมพบว่า ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมที่แปรรูปจากจากทั้ง 6 จังหวัดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมจากพันธุ์จ.อุบลราชธานีสูงสุด (220.37 ก./นน.สด 1 กก.) รองลงมาคือ จ. จันทบุรี (202.37 ก./นน.สด 1 กก.) มีอัตราการแปรรูปเท่ากับ20.23 - 22.03 % ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในการสะสมอาหารของเท้ายายม่อมไม่จะเกี่ยวข้องกับความยาวของก้านใบ แต่จะขึ้นอยู่กับปริมาณธาตุอาหารที่เพียงพอในดินหรือวัสดุปลูก การทดลองนี้มีความยาว (ความสูงของใบ) และน้ำหนักหัว ของเท้ายายม่อมในบางจังหวัด สูงกว่าการวิจัยของ สุภาภรณ์ และคณะ (2546ข) ซึ่งทำการศึกษาการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของเท้ายายม่อม พบว่า การปลูกเท้ายายม่อมด้วยเมล็ดภายใต้สภาพการพรางแสง 50% มีการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิต (การพัฒนาเป็นดอกและเมล็ด) ได้ในปีที่ 3 แต่ละปีมีการเจริญเติบโตของต้นในช่วงฤดูฝน และพักตัว (ต้นเหี่ยวแห้งตายใบเหลือแต่หัวใต้ดิน) ในช่วงฤดูหนาวในปีที่ 1, 2 และ 3 มีการเจริญเติบโตของต้น คือ ความสูงของก้านใบสูงสุด

เฉลี่ย 11.8, 27.43 และ 66.75 เซนติเมตร (ซม.) ตามลำดับ ขนาดหัวเฉลี่ย 7.3, 134.6 และ 291.96 กรัม (ก.) ตามลำดับ แต่ผลการวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของเท้ายายม่อมจาก 6 จังหวัด พบว่า มีค่าปริมาณคาร์โบไฮเดรต และใยอาหารสอดคล้องกับสุภาภรณ์ และคณะ (2546ก) ซึ่งพบว่า ประกอบทางโภชนาการในแป้งมีคาร์โบไฮเดรท 89.12 ก./100 ก. และใยอาหาร 0.59 ก./ 100 ก. ทั้งนี้โดยธรรมชาติเท้ายายม่อมจะแทงช่อดอกที่อายุ 3 ปี การนำหัวมาแปรรูปแป้งหากไม่มีการวางแผนในการขยายพันธุ์ จะค่อนข้างเสี่ยงเพราะหากไม่เก็บเมล็ดขยายพันธุ์ต่อจะไม่มีพันธุ์มาเพาะปลูกต่อไปได้ แต่การแทงช่อดอกอาจมีผลต่อการสะสมอาหารในหัวใต้ดินของเท้ายายม่อมซึ่งเป็นการแย่งอาหารกันระหว่างการสะสมอาหารในหัวใต้ดิน และช่อดอกที่จะสร้างเมล็ดสืบพันธุ์ จึงควรจะมีการศึกษาในด้านการสะสมอาหารในหัวใต้ดินในการผลิตหัวทำแป้ง และการผลิตเมล็ด เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนและความมั่นคงทางอาหารต่อไปในอนาคต

**สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (**Conclusion and Suggestion)

1. เท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัดให้ผลผลิตหัวมีน้ำหนักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เท้ายายม่อมจาก จ.จันทบุรีมีน้ำหนักหัวสูงสุด (416.88 ก.) แต่ไม่แตกต่างกับหัวจาก จ.ฉะเชิงเทรา (411.88 ก.)

2. ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมที่แปรรูปจากจากทั้ง 6 จังหวัดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมจากพันธุ์จ.อุบลราชธานีสูงสุด (220.37 ก./นน.สด 1 กก.) รองลงมาคือ จ.จันทบุรี (202.37 ก./นน.สด 1 กก.)

3. การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของเท้ายายม่อมสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบหลักในอาหาร พบว่า คาร์โบไฮเดรต และ โปรตีน จากแป้งเท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ปริมาณไขมัน ความชื้น เถ้า และใยอาหารทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

กรมวิชาการเกษตร

**การทดลองที่ 6**

## การเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม terpenoid จากต้นจิงจูฉ่ายโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
## Enhancement of terpenoid content in *Artemisia lactiflora* using tissue culture technique

**ประกาย อ่อนวิมล, กฤตยา เพชรผึ้ง, ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ และไพฑูรย์ บุปผาดา**
Prakay Onwimol, Krittaya Petchpoung, Phummarin Wanichananan and Phaitun Bupphada

**คำสำคัญ:** จิงจูฉ่าย, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, สารเทอร์พีนอยด์รวม, 6-*เบนซิลอะมิโนพิวรีน,* ซาลิไซลิก แอซิด
**Key words:** *Artemisia lactiflora*, Tissue culture, Total terpenoid, 6-Benzylaminopurine, Salicylic acid

## บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์และการเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถผลิตพืชสมุนไพรปลอดสารเคมีที่มีสารสำคัญอย่างสม่ำเสมอและปริมาณมากเพียงพอสำหรับรองรับการผลิต ในระดับอุตสาหกรรมยาในอนาคตได้ งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงต้นจิงจูฉ่ายและเพิ่มศักยภาพการผลิตสารสำคัญในกลุ่ม total terpenoids และสาร ascorbic acid โดยใช้สิ่งกระตุ้นในสภาพปลอดเชื้อ รวมทั้งการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ข้อและยอดจิงจูฉ่ายเกิดยอดจำนวนมากโดยนำเนื้อเยื่อส่วนข้อและยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 12. 2 ยอด ต่อ 1 ข้อ ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันกับยอด ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 11.6 ยอดต่อ 1 ยอด การย้ายต้นจิงจูฉ่ายที่มีลักษณะต้นและรากสมบูรณ์ โดยนำมาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องก่อนย้ายออกปลูกเป็นเวลาที่แตกต่างกัน คือ 3, 5, 7 และ 10 วัน พบว่า ต้นจิงจูฉ่ายอายุ 1 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% ในทุกระยะเวลาการปรับสภาพ หลังจากนั้นเมื่อนำต้นจิงจูฉ่ายที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 3 เดือนซึ่งมีต้นและรากสมบูรณ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสิ่งกระตุ้นคือ กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ที่มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 mM (ปัจจัยหลัก) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 วัน (ปัจจัยรอง) จึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารเทอร์พีนอยด์รวม ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และวิเคราะห์ปริมาณสาร ascorbic acid ด้วยเครื่อง Ultra High Liquid Chromatography พบว่า salicylic acid มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตสารสำคัญทั้ง 2 ชนิด โดยพบว่าการกระตุ้นด้วย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 0.1 mM เป็นเวลานาน 1 วัน มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสาร total terpenoid มากที่สุด (23.05 mg/100g คิดเป็น 2 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ) และการกระตุ้นด้วย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 0.5 mM เป็นเวลานาน 3 วัน มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสาร ascorbic acid มากที่สุด (6.6 mg/100g คิดเป็น 2.2 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ)



## Abstracts

Plant propagation and medicinal enrichment using tissue culture is the production approach of chemical-free herbs with consistent and large quantities of essential substances for the future pharmaceutical industry. This research aimed to determine the optimal medium for multiplication and enhancing total terpenoid content and ascorbic acid in white mugwort using the elicitors under aseptic conditions. The appropriate medium for shoots multiplication from nodal segments and shoots tips were also optimized. Tissues of nodal segments and shoot tips were cultured on solid MS medium supplemented with 0, 1, 2, 4, 6 and 12 mg/l of BA for 4 weeks. The results showed that nodal segments cultured on solid MS medium without BA produced an average of 12.2 shoots per nodal segment. Shoot tips had a similar result with an average of 11.6 shoots per shoot tip. For acclimatization, white mugwort with healthy roots and stems were transferred to room temperature for 3, 5, 7 and 10 days. One month after transplantation, the survival rate was 100% in every condition. Then, the 3-month-old plantlets


กรมวิทยาศาสตร์

with healthy stems and roots from tissue culture were cultured in a liquid MS medium supplemented with 0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 mM of salicylic acid (the major factor) for 1, 3 and 5 days (the minor factor). The total terpenoid content was analyzed by using a spectrophotometer and the ascorbic acid was analyzed by using a Ultra High Liquid Chromatography. The result shown that, salicylic acid has efficiency for enhancement of terpenoid content and ascorbic acid. The use of 0.1 mM salicylic acid as an elicitor for one day resulted in a total terpenoid content of 23.05 mg/100g, was 2 times higher than that of field-grown plants. The use of 0.5 mM salicylic acid as an elicitor for three day resulted in a ascorbic acid of 6.6 mg/100g, was 2.2 times higher than that of field-grown plants.

กรมวิชาการเกษตร

# บทนำ (Introduction)

## 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จิงจูฉ่าย (white mugwort) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artemisia lactiflora* มีถิ่นกำเนิดมาจากภาคตะวันออกเฉียงใต้ของจีน คือ มณฑลกุ้ยโจว สำหรับประเทศไทยนิยมปลูกในจังหวัดทางภาคเหนือ เช่น เชียงราย เชียงใหม่ จิงจูฉ่าย มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบหลายชนิด เช่น (E)-13- farnesene, nerolidol, และ zingiberene โดยพบกลุ่ม terpenoid มากที่สุด (Jing *et al*., 2011) พืชชนิดนี้มีสรรพคุณช่วยปรับสมดุลความดันเลือดในร่างกายและช่วยขับลมในกระเพาะอาหารได้ดี ลำต้นสดมีปริมาณโซเดียมต่ำ ผู้เป็นโรคไตจึงรับประทานได้ (Bown, 1995) อีกทั้งมีวิตามินและเกลือแร่ ต่าง ๆ อาทิธาตุเหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส และมีวิตามินซีสูง จากรายงานพบว่าปริมาณวิตามินซีในจิงจูฉ่ายมากกว่าในมะนาวถึง 58 เท่า นอกจากนี้ยังมีวิตามินเอ วิตามินอี เป็นต้น ซึ่งการรับประทานใบสดจะได้ผลดีกว่าการนำไปปรุงอาหารโดยผ่านกระบวนการให้ความร้อน (Worarakkulwong and Wongsawadwech, 2012) สำหรับประเทศไทย นิยมนำมารับประทานสดโดยใส่ในต้มเลือดหมู และนำไปทำผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น ชาหรือผงยาแคบซูล ทำให้ในปัจจุบันเริ่มมีการปลูกจิงจูฉ่ายเป็นการค้ามากยิ่งขึ้น เนื่องจากเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพและมีสรรพคุณทางยาที่สำคัญ อย่างไรก็ตามเกษตรกรมักปลูกสมุนไพรชนิดนี้โดยใช้สารเคมีเพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณมาก ทำให้เกิดการตกค้างหรือมีสารเคมีปนเปื้อนในธรรมชาติ นอกจากนี้การปลูกในสภาพธรรมชาติยังไม่สามารถควบคุมปริมาณสารสำคัญให้ได้ตามเกณฑ์มาตรฐานขององค์การอุตสาหกรรมยา ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีการวิจัยและปรับปรุงวิธีการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรที่ปลอดสารเคมีที่มีสารสำคัญอย่างสม่ำเสมอและมีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาผลิตในระดับในอุตสาหกรรมยาได้ และการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกลุ่มเทอร์พีนอยด์รวมของสมุนไพรจิงจูฉ่ายในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นแหล่งข้อมูลทางการผลิตเพื่อการค้าและใช้ประโยชน์ในด้านการวิจัย รวมทั้งผู้ที่มีความสนใจผลิตสมุนไพรชนิดนี้ในด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคต

## 2. การทบทวนวรรณกรรม

ในปัจจุบันพืชสมุนไพรของไทยกลับมาเป็นที่นิยมในการใช้ทำเป็นยาเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีคุณสมบัติช่วยในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง (Saetung *et al*., 2005; Kummalue *et al*., 2014; Senawonga *et al*., 2014) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติช่วยในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Panyaphu *et al*., 2012; Palasuwan and Soogarun, 2014; Klinthong *et al*., 2015 Nugboon and Intarapichet, 2015) ทำให้ร่างกายแข็งแรงไม่เจ็บไข้ได้ป่วยง่าย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้พืชสมุนไพรมีการนำกลับมาใช้ในทางการแพทย์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจิงจูฉ่ายเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมยาสนใจที่จะนำมาใช้ในปัจจุบัน

จิงจูฉ่าย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Artemisia lactiflora* อยู่ในวงศ์ Asteraceae มีถิ่นกำเนิดมาจากภาคตะวันออกเฉียงใต้ของจีน คือ มณฑลกุ้ยโจว จิงจูฉ่ายเป็นพืชล้มลุกไม้พุ่มขนาดเล็ก สูงประมาณ 0.5 – 1 ฟุต ใบเป็นรูปรีขอบเป็นแฉกๆ 5 แฉกสีเขียว เนื้อใบหนา คล้ายต้นขึ้นฉ่าย รากหรือเหง้าใหญ่จะกระจายเป็นวงกว้าง แตกกิ่งก้านหนาแน่นเป็นกอคล้ายๆ ใบบัวบก จะมีกลิ่นหอม รสชาติขมเล็กน้อย สามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดได้ เจริญงอกงามได้ดีในที่แสงแดดรำไร ปลูกได้ดีในอากาศเย็นมากกว่าอากาศร้อน (Bown, 1995) ดังนั้นจึงพบว่ามีการปลูกจิงจูฉ่ายในจังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย เช่น เชียงราย เชียงใหม่ เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

จิงจูฉ่าย มีกลิ่นน้ำมันหอมระเหยในใบและลำต้น น้ำมันหอมระเหยที่พบนั้นมีหลายชนิด เช่น (E)-13-farnesene, nerolidol, spathulenol, caryophyllene oxide และ zingiberene โดยพบ กลุ่ม terpenoid มากที่สุด (Jing *et al*., 2011) ซึ่งช่วยปรับสมดุลความดันเลือดในร่างกาย และช่วยขับลมในกระเพาะอาหารได้ดี อีกทั้งลำต้นสดและเมล็ดนั้นมีปริมาณโซเดียมต่ำผู้เป็นโรคไตจึงรับประทานได้ นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณในการล้างพิษ ควบคุมการมีประจำเดือน รวมทั้งนำมาใช้รักษาโรคไวรัสตับอักเสบ ไตอักเสบได้อีกด้วย (Bown, 1995) ปัจจุบันมีรายงานว่าพบปริมาณวิตามินซีในจิงจูฉ่ายมากกว่าในมะนาวถึง 58 เท่า และให้สรรพคุณทางยาสูง อีกทั้งมีวิตามินและเกลือแร่ต่าง ๆ อาทิ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต กากใยอาหาร เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส วิตามินซีสูง วิตามินเอ วิตามินอี และวิตามินบี 6 เป็นต้น รวมทั้งผ่านการพิสูจน์แล้วว่าสามารถรักษาไข้มาลาเรียซึ่งคล้ายๆ กับเซลล์ของมะเร็ง คือจะมีประมาณธาตุเหล็กสูงกว่าเซลล์ปกติประมาณ 5 – 1,000 เท่า ซึ่งการทานใบสดจะได้ผลดีกว่าผ่านกระบวนความร้อน (Worarakkulwong and Wongsawadwech, 2012)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มเมื่อประมาณปี ค.ศ. 1902 โดยนักพฤกษศาสตร์ชาวเยอร์มัน ชื่อ Gottieb Haberlandt และได้มีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเรื่อยมา จนในปีค.ศ. 1938 สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะและแคลลัสของพืชได้หลายชนิด ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็ได้มีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง Murashige (1974) ได้กล่าวถึงประโยชน์ ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่ามี 4 สาขาหลัก ๆ คือ

1. การผลิตยาและสารสกัดจากธรรมชาติอื่น ๆ โดยการเลี้ยงเซลล์หรืออวัยวะที่สามารถผลิตสารได้ โดยการผลิตสารบางชนิดในสภาพปลอดเชื้ออาจสร้างสารได้มากกว่าในสภาพธรรมชาติ

2. การปรับปรุงพันธุ์พืช เช่นการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ การผลิตพืช haploid การรวมโปรโตพลาส การสร้าง somatic hybrid และการถ่ายยีนในพืชชั้นสูง

3. การผลิตพืชปลอดโรค และการเก็บรักษาพันธุ์พืช

4. การขยายพันธุ์พืชที่มีลักษณะให้ได้พืชจำนวนมากในเวลาอันสั้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมินั้นสิ่งที่มีความสำคัญมากที่สุดคือสิ่งกระตุ้น (elicitor) คือสารหรือวิธีการที่สามารถชักนำให้พืชสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ภายในเวลาอันสั้น ซึ่งเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสารทุติยภูมิลง โดยพืชที่ได้รับสิ่งกระตุ้นจะเกิดการตอบสนองทั้งทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา (Zhao *et al*., 2005) สิ่งกระตุ้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ สิ่งกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitor) เช่น chitin, chitosan และ yeast extract เป็นต้น และสิ่งกระตุ้นทางกายภาพ (abiotic elicitor) เช่น $H_2O_2$, ethanol, methyl jasmonate, โลหะหนัก, การตัด และแสงอัลตราไวโอเลต เป็นต้น (Mehmetoglu and Curtis, 1997)

การเลือกใช้สิ่งกระตุ้นให้เหมาะสมกับชนิดของพืชและเนื้อเยื่อเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นแตกต่างกัน โดย Krolicka *et al*. (2008) รายงานถึงการใช้เซลล์ *A. rhizogenes* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมากระตุ้นการผลิตสาร quercetin ในต้น *Dionaea muscipula* และ *Drosera capensis* พบว่าการผลิตสาร quercetin ใน *D. muscipula* เพิ่มขึ้น แต่การผลิตสาร quercetin ใน *Drosera capensis* ลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานความเข้มข้นของสิ่งกระตุ้นเช่นกัน โดย Ziaratnia *et al*. (2008) พบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่ยอดและรากของ *Drosera capensis* สัมผัสกับ salicylic acid มีผลต่อการผลิตสาร 7-methljuglone โดยในส่วนยอดมีการผลิตสาร 7- methljuglone มากที่สุดภายหลังจากให้ salicylic acid เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนรากนั้นมีการผลิตสาร 7- methljuglone มากที่สุดภายหลังจากให้ salicylic acid เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และงานวิจัยของ Chansuthep (2010) ที่ใช้ salicylic acid กระตุ้นให้ hairy root เจตมูลเพลิงแดงผลิตสาร plumbagin และปลดปล่อยสู่อาหารเพาะเลี้ยง

กรมวิชาการเกษตร

โดยพบการผลิตสาร plumbagin จาก hairy root ที่กระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ ภายหลังทำการกระตุ้น 1 วัน (93.6 มิลลิกรัมต่อลิตร 4.4 เท่าของชุดควบคุม) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Juengwatanatrakul (2011) ที่ใช้ salicylic acid โดยความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้ต้นเจตมูลเพลิงแดงสามารถผลิตสาร plumbagin ได้ ภายหลังทำการกระตุ้น 3 วัน ในปริมาณ 1.31±0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือประมาณ 2.7 เท่าของชุดควบคุมเป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการเพิ่มปริมาณสารในกลุ่ม terpenoid ในพืชสมุนไพรจิงจูฉ่ายโดยใช้สิ่งกระตุ้นคือ salicylic acid ในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากมีแนวโน้มความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มปริมาณสารในกลุ่ม terpenoid ให้เกิดผลสำเร็จในสมุนไพรจิงจูฉ่าย นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุมคุณภาพในการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรชนิดนี้ให้มีสารสำคัญสม่ำเสมอและปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

**3. วัตถุประสงค์**

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในกลุ่ม total terpenoid ของสมุนไพรจิงจูฉ่ายในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นแหล่งข้อมูล ทางการผลิตเพื่อการค้าและใช้ประโยชน์ในด้านการวิจัย รวมทั้งผู้ที่มีความสนใจผลิตสมุนไพรชนิดนี้ในด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคต

กรมวิชาการเกษตร

## ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

**1. ประเด็นวิจัย**

การวิจัยครั้งนี้ ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพรจิงจูฉ่ายในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ส่วนต่าง ๆ เช่น ปลายยอด และข้อ รวมทั้งทำการศึกษาหาวิธีการเพิ่มปริมาณสาร สำคัญ total terpenoid และวิตามินซี ในต้นจิงจูฉ่ายโดยใช้สิ่งกระตุ้น คือ salicylic acid ในสภาพปลอดเชื้อ นอกจากนี้จะทำการสกัดสารสำคัญที่ผลิตได้จากต้นจิงจูฉ่ายที่เพาะเลี้ยงโดยผ่านการใช้สิ่งกระตุ้น และไม่ผ่านการใช้สิ่งกระตุ้นในสภาพปลอดเชื้อ รวมทั้งสกัดสารสำคัญจากต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกตามธรรมชาติ แล้วนำไปวิเคราะห์ สารสำคัญ total terpenoid และวิตามินซี ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และเครื่อง Ultra High Liquid Chromatograph (UHPLC) จากนั้นนำข้อมูลทีได้มาเปรียบเทียบกัน จึงสรุปผลการวิจัยในครั้งนี้

**2. สถานที่ทำการวิจัย:** ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ปทุมธานี

**3. ระยะเวลาดำเนินงาน:** 1 ตุลาคม 2562 – 30 กันยายน 2564

**4. วิธีการดำเนินงาน**

**4.1 ฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวของข้อและยอดจิงจูฉ่าย และเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อ**

นำต้นจิงจูฉ่ายอายุ 6 เดือน ตัดยอดออกมาจากกระถางเพาะเลี้ยง ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ตัดใบส่วนเกินออกและนำไปล้างทำความสะอาดเอาเศษดินที่ติดมาออกด้วยน้ำยาล้างจาน 1 ครั้ง ผึ่งให้สะเด็ดน้ำแล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ Clorox ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 และ 20 นาที พอครบตามเวลานำไปล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ครบตามเวลานำไปซับด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับน้ำส่วนเกินออก จากนั้นนำไปลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 สัปดาห์

บันทึกผลการทดลองโดย นับจำนวนข้อและยอดที่มีชีวิต และปราศจากเชื้อ

**4.2 ศึกษาผลของ 6-Benzylaminopurine (BA) ที่ชักนำให้เกิดยอด**

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เริ่มจากนำข้อและยอดจิงจูฉ่ายจากต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

- สูตรอาหาร **MS + BA 0 mg/l**
- สูตรอาหาร **MS + BA 1 mg/l**
- สูตรอาหาร **MS + BA 2 mg/l**
- สูตรอาหาร **MS + BA 4 mg/l**
- สูตรอาหาร **MS + BA 6 mg/l**
- สูตรอาหาร **MS + BA 12 mg/l**

เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายลงอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ในช่วงเวลาดังกล่าวมีการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์

บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน (โดยนับยอดที่มีความยาวตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรขึ้นไป) วัดความยาวยอด และบันทึกภาพ การทดลองนี้ใช้ 15 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำคือ 1 ขวดเพาะเลี้ยง

กรมวิชาการเกษตร

**4.3 การนำต้นจิงจูฉ่ายออกปลูกในโรงเรือน**

นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นจิงจูฉ่ายที่มีระบบรากสมบูรณ์มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับคลายฝาขวดไว้ ศึกษาระยะเวลาในการปรับสภาพที่แตกต่างกันคือ 3, 5, 7 และ 10 วัน นำต้นออกจากขวดล้างทำความสะอาดวุ้นที่ติดกับรากออกให้หมด และพักไว้ หลังจากนั้นย้ายปลูกลงกระถางโดยใช้ดินผสมสำเร็จรูปพร้อมปลูก (ราชาดินปลูก) เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนต้นจิงจูฉ่ายที่รอดชีวิตและมีลักษณะต้นแข็งแรงสมบูรณ์

**4.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับ salicylic acid ต่อการเพิ่มปริมาณสาร total terpenoids และ สาร ascorbic acid ในต้นจิงจูฉ่าย**

**ปัจจัยที่ 1** คือความเข้มข้นของสิ่งกระตุ้น (Salicylic acid ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 3 และ 5 mM)

**ปัจจัยที่ 2** คือ ระยะเวลาที่จิงจูฉ่ายสัมผัสสิ่งกระตุ้น (ระยะเวลา 1, 3 และ 5 วัน) รวม 18 ชุดทดลอง (treatment combination) ชุดทดลองละ 4 ซ้ำ นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

นำยอดจิงจูฉ่ายที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในการทดลองที่ 1 ปีงบประมาณ 2563 มาเพาะเลี้ยงจนมีอายุ 12 สัปดาห์ หลังจากนั้นเติมสิ่งกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิคือ salicylic acid ซึ่งกรองผ่านแผ่นกรองชนิด PTFE ขนาดช่อง 0.20 ไมโครเมตรให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

- สูตรอาหาร MS + ชุดควบคุมใช้ absolute ethanol และน้ำ deionized
- สูตรอาหาร MS + Salicylic acid 0.1 mM
- สูตรอาหาร MS + Salicylic acid 0.5 mM
- สูตรอาหาร MS + Salicylic acid 1 mM
- สูตรอาหาร MS + Salicylic acid 3 mM
- สูตรอาหาร MS + Salicylic acid 5 mM

บันทึกผลการทดลองและนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร total terpenoids ด้วยเครื่อง spectrophotometer วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง Ultra-High Performance Liquid chromatography (HPLC) ภายหลังจากทำการกระตุ้น 1, 3 และ 5 วัน

**วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม total terpenoid และ ปริมาณวิตามินซี (ascorbic acid)**

ตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ทั้ง 2 ชนิดตามวิธีการดังนี้

**การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม total terpenoid**

ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยเปรียบเทียบกับต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ ตามวิธีการของ Chang และคณะ (2012)

<u>การเตรียมตัวอย่าง</u>

นำตัวอย่างต้นจิงจูฉ่าย (ผ่านการกระตุ้น ไม่ผ่านการกระตุ้น และปลูกในสภาพธรรมชาติ) มาอบที่ 50°C เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง บดให้ละเอียด เก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและสะอาด

<u>การสกัด</u>

กรมวิชาการเกษตร

สกัดตัวอย่าง 2 g ด้วย methanol 10 ml โดยใช้วิธี ultrasonic extraction เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลาย แล้วสกัดซ้ำด้วย methanol 10 ml อีก 2 ครั้ง นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ละลายกลับด้วย methanol 15 ml ก่อนนำไปวิเคราะห์

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายมาตรฐาน ursolic acid ด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml

การวิเคราะห์ปริมาณ total terpenoid

การวิเคราะห์ปริมาณ total terpenoid ในสารสกัดจิงจูฉ่าย โดยนำสารสกัดตัวอย่าง 100 µL ทำปฏิกิริยากับ vanillin-glacial acetic acid solution (150 µL, 5% w/v) และ perchloric acid solution (500 µL) บ่มตัวอย่างที่ 60oC เป็นเวลา 45 นาที แล้วเติม glacial acetic acid (2.25mL) แล้วนำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 548 nm (UV1800; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) ผลการวิเคราะห์แสดงในรูป milligram ursolic acid equivalents (mg ursolic acid/g ตัวอย่าง (น้ำหนักแห้ง)

**การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี**

ด้วยเครื่อง Ultra High Liquid Chromatograph (UHPLC) ตามวิธีการของ M. Stan *et al*., (2014)

การสกัด

บดตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายสด (ผ่านการกระตุ้น ไม่ผ่านการกระตุ้น และปลูกในสภาพธรรมชาติ) ปริมาณ 10 g ใน 1% acetic acid (4 °C) ปริมาตร 100 ml ด้วยเครื่องบด เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนสารละลายส่วนใสกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 µm ก่อน นำไปฉีด UHPLC

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายมาตรฐานวิตามินซี (L-ascorbic) ด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 mg/ml

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

การวิเคราะห์วิตามินซี ในสารจิงจูฉ่ายด้วยเครื่อง Ultra High Liquid Chromatograph (UHPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Shimadzu รุ่น Nexera-2 LD-30AD เครื่องตรวจวัดชนิด Photo diode array รุ่น SPD-M20A ระบบฉีดสารอัตโนมัติรุ่น SIL-30AC (สภาวะเครื่อง UHPLC: ใช้คอลัมน์: Supelco Titan C18 (100mm × 2.1mm × 1.9 µm) ที่อุณหภูมิคอลัมน์: 30°C อัตราการไหล: 0.5 ml/min ตัวพา: Isocratic: 15 mM phosphate buffer pH 2.7 (ตัวพา A) และ methanol (ตัวพา B) เครื่องตรวจวัด: PDA 245 nm ปริมาตรการฉีด: 1 µl เวลาที่ใช้: 6 นาที)

## ผลการวิจัย (Results)

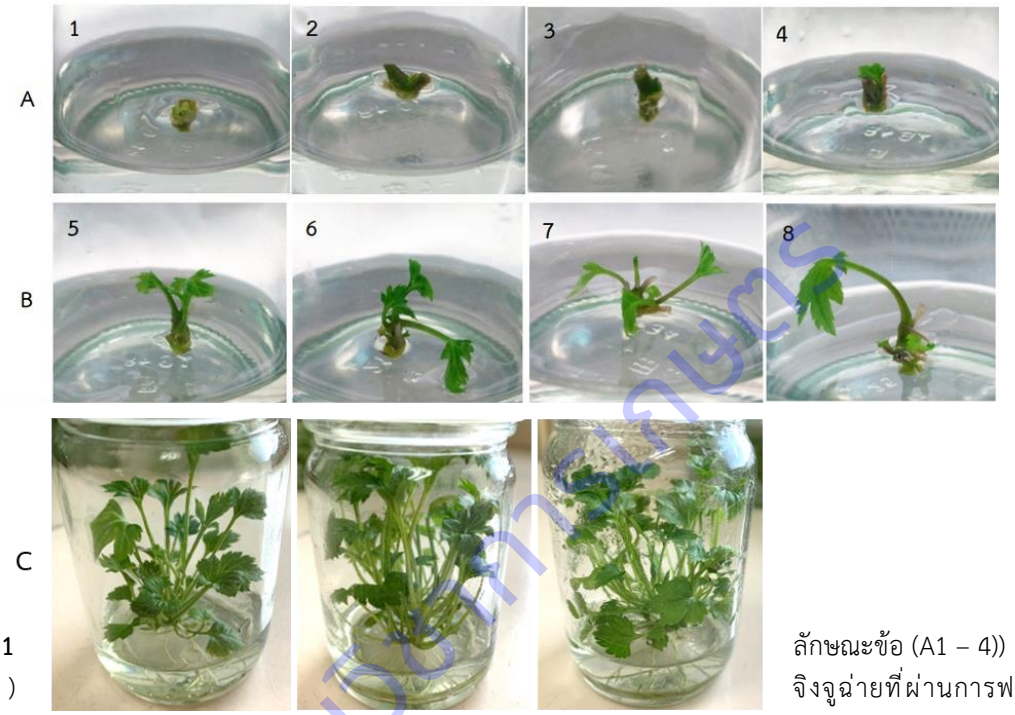
**1. ฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวของข้อและยอดจิงจูฉ่าย และเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อ**

จากการทดลองฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนข้อจิงจูฉ่ายโดยใช้ Clorox ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 และ 20 นาที พบว่าหลังจากผ่านไป 2 สัปดาห์ชิ้นส่วนข้อจิงจูฉ่ายที่รอดชีวิตโดยปราศจากเชื้อจำนวน 15 และ 6 ชิ้น ตามลำดับ จากชิ้นส่วนข้อเริ่มต้นจำนวนอย่างละ 50 ชิ้น คิดเป็น 7.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลักษณะข้อที่รอดชีวิตมีลักษณะเป็นสีเขียว บางข้อเริ่มมียอดอ่อนเกิดขึ้น (ภาพที่ 2.6.1A (1 – 4)) สำหรับชิ้นส่วนยอดจิงจูฉ่ายที่รอดชีวิตโดยปราศจากเชื้อจำนวน 10 และ 3 ชิ้น ตามลำดับ จากชิ้นส่วนยอดเริ่มต้นจำนวนอย่างละ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

50 ชิ้น คิดเป็น 5 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลักษณะยอดที่รอดชีวิตมีลักษณะที่สมบูรณ์สีเขียว และเริ่มมีใบอ่อนเกิดขึ้นจำนวน 2-3 ใบ (ภาพที่ 2.6.1B (5 – 8))

หลังจากนั้นนำข้อและยอดที่รอดชีวิตนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนจนอายุครบ 8 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์มีสีเขียวและเริ่มมีรากเกิดขึ้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงได้เพียง 4 สัปดาห์ และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงจนอายุครบ 8 สัปดาห์ มีการแตกยอดใหม่เกิดขึ้นรวมทั้งมีปริมาณรากเพิ่มขึ้นจำนวนมาก (ภาพที่ 2.6.1C) จึงนำไปตัดแยกยอดแล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน สำหรับเพิ่มปริมาณต้นจิงจูฉ่ายให้เพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป




**ภาพที่ 2.6.1** ลักษณะข้อ (A1 – 4)) ยอด (B5 - 8 ) จิงจูฉ่ายที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้ออายุ 2 สัปดาห์ และ ลักษณะต้นจิงจูฉ่าย (C) ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ อายุ 8 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

**2. ศึกษาผลของ 6-Benzylaminopurine (BA) ที่ชักนำให้เกิดยอด**

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณยอดให้ได้จำนวนมาก โดยการชักนำให้เกิดยอดกลุ่ม (Multiple shoots) โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อ และ ยอดจิงจูฉ่าย เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้นต่าง 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าหลังจากได้ทำการยืนยันประสิทธิภาพของสูตรอาหารที่ได้ในการเพาะเลี้ยงทั้งสองครั้ง ให้ผลไปในทางเดียวกัน โดยชิ้นส่วนยอดและข้อเริ่มเกิดยอดใหม่ขนาดเล็กเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ และยอดพัฒนาจนเห็นได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 4 โดยชิ้นส่วนของข้อจิงจูฉ่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ย 12. 2 ยอด ต่อ 1 ข้อ และสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 12 mg/l จำนวนการเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 0.3 ยอด สำหรับยอดจิงจูฉ่ายให้ผลไปในทางเดียวกันคือ ยอดจิงจูฉ่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ย 11.6 ยอด ต่อ 1 ยอด และสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่จากยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 12 mg/l จำนวนการเกิดยอดใหม่เฉลี่ย 0 ยอด หรือมีการตายหลังจากที่นำชิ้นส่วนยอดไปเลี้ยงเป็นเวลา 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สัปดาห์ จึงทำให้ไม่มียอดใหม่เกิดขึ้น (ตารางที่ 2.6.1 ภาพที่ 2.6.2A และ B) สำหรับยอดเกิดใหม่ที่ได้จากการชักนำโดยใช้ BA ความเข้มข้น 1, 2 ละ 4 mg/l จะมีลักษณะยอดสั้นและจำนวนยอดน้อย แต่หลังจากตัดยอดแล้วย้ายลงอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BA พบว่ามีการเจริญเติบโตและออกรากได้ปกติ ไม่ต่างกับยอดที่ได้จากการชักนำโดยใช้ BA ความเข้มข้น 0 mg/l (ภาพที่ 2.6.3)

**ตารางที่ 2.6.1** จำนวนการเกิดยอดใหม่ที่ชักนำจากชิ้นส่วนข้อ และยอดจิงจูฉ่าย เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 0 1 2 4 6 และ 12 mg/l ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

| **ความเข้มข้นของ BA (mg/l)** | **จำนวนยอดเกิดใหม่ที่ได้จาก** | |
|---|---|---|
| | **ชิ้นส่วนข้อ** | **ชิ้นส่วนยอด** |
| 0 | 12.2[a] | 11.6[a] |
| 1 | 5.3[b] | 4.5[b] |
| 2 | 2.8[c] | 2.0[c] |
| 4 | 2.7[cd] | 1.5[cd] |
| 6 | 1.7[d] | 1.0[d] |
| 12 | 0.3[e] | 0[e] |
| C.V. (%) | 32.26 | 33.79 |
| *Pr > F* | <.0001 | <.0001 |

[1]/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าด้วยวิธี DMRT

กรมวิชาการเกษตร

BA 0 มก/ล BA 1 มก/ล BA 2 มก/ล BA 4 มก/ล BA 6 มก/ล BA 12 มก/ล

A

BA 0 มก/ล BA 1 มก/ล BA 2 มก/ล BA 4 มก/ล BA 6 มก/ล BA 12 มก/ล

B

**ภาพที่ 2.6.** มข้น 0 1 ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

BA 0 มก/ล BA 1 มก/ล BA 2 มก/ล BA 4 มก/ล

A

B

**ภาพที่** **2.6.3** ยอดใหม่ที่ได้จากการชักนำโดยใช้ BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 ละ 4 mg/l นำไปเพาะลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม BA ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

กรมวิชาการเกษตร

**3. การนำต้นจิงจูฉ่ายออกปลูกในโรงเรือน**

การย้ายต้นจิงจูฉ่ายที่มีลักษณะต้นและรากสมบูรณ์ โดยนำต้นจิงจูฉ่ายมาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาที่แตกต่างกัน คือ 3, 5, 7 และ 10 วัน จึงนำออกปลูกในโรงเรือน พบว่า ต้นจิงจูฉ่ายมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% หลังออกปลูกนาน 1 เดือนในทุกระยะเวลาการปรับสภาพ แต่ในช่วง 1-2 เดือนแรกต้นจิงจูฉ่ายมีอาการชะงักการเจริญเติบโตเนื่องจากยังปรับตัวกับสภาพอากาศได้ไม่ดีเท่าที่ควร (ภาพที่ 2.6.4A) หลังจากมีอายุครบ 6 เดือน มีการแตกกอเพิ่มมากขึ้น สามารถตั้งตัวได้ดีใบมีขนาดใหญ่ ต้นแข็งแรงและสมบูรณ์ ตามภาพที่ 6.4B

**ภาพที่ 2.6.4** ลักษ 1 เดือน

**4. ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับ salicylic acid ต่อการเพิ่มปริมาณสาร total terpenoids และ สาร ascorbic acid ในต้นจิงจูฉ่าย**

ได้นำต้นจิงจูฉ่ายที่มีอายุครบ 24 สัปดาห์ มาตัดแยกยอดแล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอต่อการนำไปศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ ในต้นจิงจูฉ่าย หลังจากนั้นเมื่อต้นจิงจูฉ่ายมีอายุครบ 12 สัปดาห์ ซึ่งมีลักษณะต้นและระบบรากสมบูรณ์แข็งแรง มาเลี้ยงในอาหารที่เติมสิ่งกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิคือ salicylic acid ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0, 0.1, 0.5, 1, 3 และ 5 mM (ปัจจัยหลัก) หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน (ปัจจัยรอง) (ภาพที่ 2.6.5) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร total terpenoids โดยใช้สารมาตรฐาน ursolic acid ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และวิเคราะห์ปริมาณสาร ascorbic acid ด้วยเครื่อง Ultra High Liquid Chromatograph (UHPLC) โดยใช้สารมาตรฐานวิตามินซี (L-ascorbic) โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ

**ภาพที่ 2.6.5** ลักษณะต้นจิงจูฉ่ายอายุ 12 สัปดาห์ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับสารกระตุ้น salicylic acid ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 3 และ 5 mM ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

หลังจากนำตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายไปวิเคราะห์ปริมาณสาร total terpenoids โดยใช้สารมาตรฐาน ursolic acid ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และวิเคราะห์ปริมาณสาร ascorbic acid โดยใช้สารมาตรฐานวิตามินซี (L-ascorbic) ด้วยเครื่อง Ultra-High Liquid Chromatograph (UHPLC) พบว่าความเข้มข้นของ salicylic acid (ปัจจัยหลัก) และระยะเวลาที่ต้นจิงจูฉ่ายสัมผัส salicylic acid (ปัจจัยรอง) ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณสาร total terpenoids และ ascorbic acid ซึ่งเป็นผลรวมของปริมาณสาร total terpenoids และ ascorbic acid ที่วิเคราะห์ได้ในต้นจิงจูฉ่าย แต่อิทธิพลหลักจากทั้ง 2 ปัจจัยต่างมีผลต่อปริมาณสาร total terpenoids และ ascorbic acid รวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1, 0.5 และ 1 mM สามารถกระตุ้นให้ต้นจิงจูฉ่ายผลิตสาร total terpenoids และสาร ascorbic acid เพิ่มสูงขึ้นกว่าต้นจิงจูฉ่ายที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ส่วนความเข้มข้นสุดท้าย 3 และ 5 mM กระตุ้นให้ต้นจิงจูฉ่ายผลิตสาร total terpenoids ต่ำกว่าต้นจิงจูฉ่ายที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และกระตุ้นให้ต้นจิงจูฉ่ายผลิตสาร ascorbic acid ใกล้เคียงต้นจิงจูฉ่ายที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แต่ salicylic acid ทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นให้ต้นจิงจูฉ่ายผลิตสารทั้งสองชนิดสูงกว่าต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ

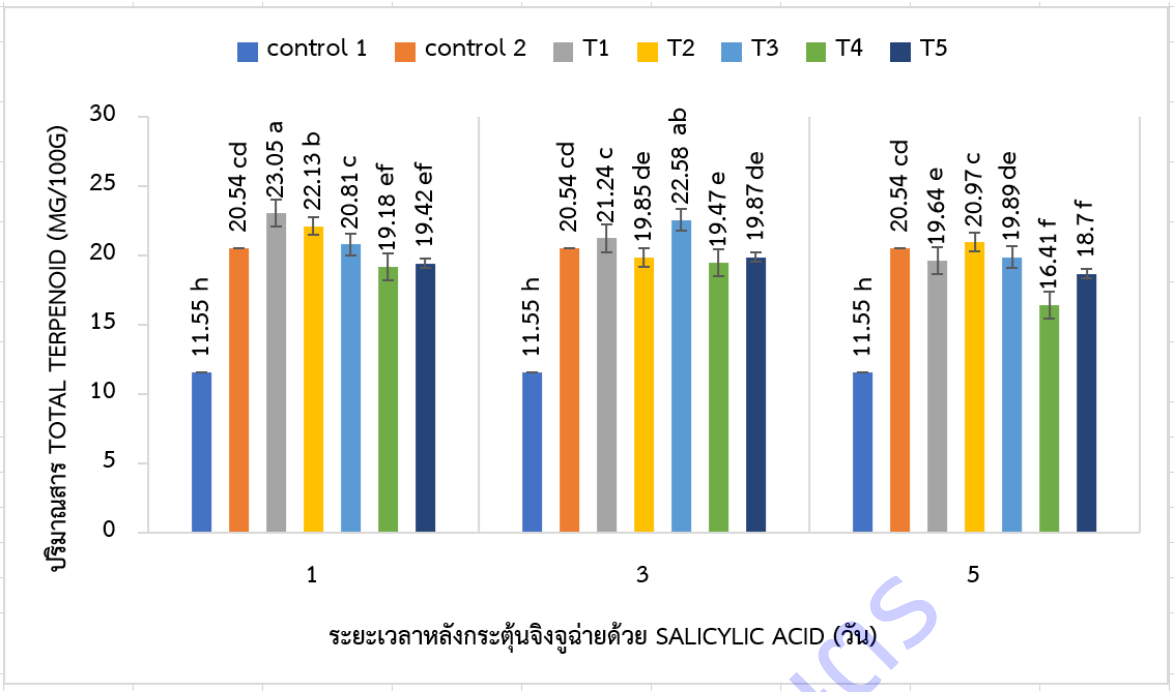
โดยการกระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 และ 0.5 mM ทำให้ต้นจิงจูฉ่ายมีการผลิตสาร total terpenoids ในปริมาณ 23.05 และ 22.13 mg/100g หลังจากกระตุ้น 1 วัน และสูงกว่าต้นจิงจูฉ่ายที่ไม่ได้รับการกระตุ้น คือ 20.54 mg/100g แต่หลังจากนั้นการผลิตสาร total terpenoids จะเริ่มลดลง ส่วนการกระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 1, 3 และ 5 mM นั้น ทำให้ต้นจิงจูฉ่ายมีการผลิตสาร total terpenoids ในปริมาณที่ต่ำลงหลังจากกระตุ้น 1 วัน และมีปริมาณเพิ่มขึ้น คือ 22.58, 19.47 และ 19.87 mg/100g หลังจากกระตุ้น 3 วัน หลังจากนั้นการผลิตสาร total terpenoids กลับลดต่ำลงมา (ภาพที่ 2.6.6) สำหรับตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ สามารถผลิตสาร total terpenoids ได้ปริมาณต่ำที่สุดคือ 11.55 mg/100g หลังจากดูในภาพรวมการกระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5, 1, 3 และ 5 mM สามารถผลิตสาร total terpenoids ได้น้อยกว่าการกระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 mM (23.05 mg/100g คิดเป็น 2 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ) แต่สามารถผลิตสาร total terpenoids ได้สูงกว่าตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติในทุกความเข้มข้น

การกระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 และ 0.5 mM ทำให้ต้นจิงจูฉ่ายมีการผลิตสาร ascorbic acid ในปริมาณ 6.0 และ 6.6 mg/100g หลังจากกระตุ้น 3 วัน และใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลา 5 วัน

กรมวิชาการเกษตร

และสูงกว่าต้นจิงจูฉ่ายที่ไม่ได้รับการกระตุ้น คือ 4.7 mg/100g ส่วนการกระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 1, 3 และ 5 mM นั้น ทำให้ต้นจิงจูฉ่ายมีการผลิตสาร ascorbic acid ในปริมาณที่ต่ำลงหลังจากกระตุ้น 1 วัน และมีปริมาณเพิ่มขึ้น คือ 5.6, 5.2 และ 5.4 mg/100g หลังจากกระตุ้น 3 วัน หลังจากนั้นการผลิตสาร ascorbic acid กลับลดต่ำลงมา ยกเว้นการกระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 3 mM มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากกระตุ้น 5 วัน (ภาพที่ 2.6.7) สำหรับตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ สามารถผลิตสาร ascorbic acid ได้ปริมาณต่ำที่สุดคือ 4.7 mg/100g หลังจากดูในภาพรวมการกระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1, 1, 3 และ 5 mM สามารถผลิตสาร ascorbic acid ได้น้อยกว่าการกระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 mM (6.6 mg/100g คิดเป็น 2.2 เท่าของจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ) แต่สามารถผลิตสาร ascorbic acid ได้สูงกว่าตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติในทุกความเข้มข้น

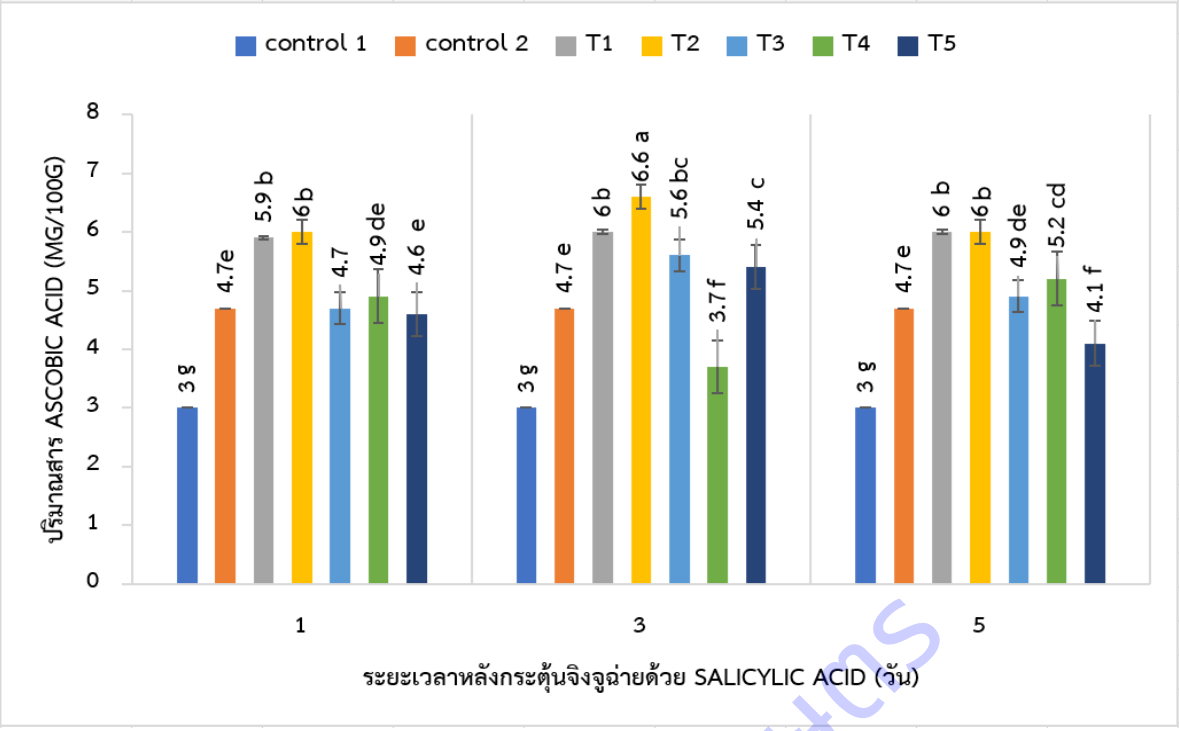
กรมวิชาการเกษตร




**ภาพที่ 2.6.6** ปริมาณสาร total terpenoids ที่ตรวจวัดได้ในวันที่ 1, 3 และ 5 หลังกระตุ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 0 (control 2), 0.1 (T1), 0.5 (T2), 1 (T3), 3 (T4) และ 5 (T5) มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ (control 1)

**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยในกราฟที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย a – f คือ ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย เนื่องจากอิทธิพลร่วมของความเข้มข้นของ Salicylic acid (ปัจจัยหลัก) และระยะเวลาที่จิงจูฉ่ายสัมผัส Salicylic acid (ปัจจัยรอง)

กรมวิทยาศาสตร์




**ภาพที่ 2.6.7** ปริมาณสาร ascorbic acid ที่ตรวจวัดได้ในวันที่ 1, 3 และ 5 หลังกระตุ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ Salicylic acid ความเข้มข้น 0 (control 2), 0.1 (T1), 0.5 (T2), 1 (T3), 3 (T4) และ 5 (T5) มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในธรรมชาติ (control 1)

**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยในกราฟที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย a – f คือ ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย เนื่องจากอิทธิพลร่วมของความเข้มข้นของ Salicylic acid (ปัจจัยหลัก) และระยะเวลาที่จิงจูฉ่ายสัมผัส Salicylic acid (ปัจจัยรอง)

## อภิปรายผล (Discussion)

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยใช้ BA นั้นได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ยงศักดิ์และอัญชลี (2557) ที่พบว่าอาหาร ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนการเกิดยอดของต้นพรมมิเฉลี่ย 8.0 ยอด แต่จำนวนการเกิดยอดเฉลี่ยลดลงเหลือ 1.5 ยอด เมื่อเติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร จากรายงานที่กล่าวมานี้ พบแนวโน้มเดียวกันคือ BA ความเข้มข้นต่ำชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าการใช้ความเข้มข้นสูงในพืชทั้งสองชนิด เนื่องจากการใช้ BA ความเข้มข้นสูงเกินไปส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อพืช สำหรับต้นจิงจูฉ่ายการนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารเจริญเติบโตก็เพียงพอต่อการเกิดยอดกลุ่มเพราะอาหารสูตร MS มีวิตามินและแร่ธาตุครบถ้วน ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพิ่ม

ส่วนการใช้ salicylic acid เป็นสิ่งกระตุ้นนั้นมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการผลิตสารสำคัญของพืชหลายชนิดและมีแนวโน้มว่า salicylic acid ความเข้มข้นต่ำมีประสิทธิภาพให้การกระตุ้นสารทุติยภูมิได้มากกว่า salicylic acid ความเข้มข้นสูง เช่น Jeong *et al*. (2005) ได้กระตุ้นการสร้างสาร saponin ใน hairy root ของโสม (*Panax ginseng*) โดยใช้ salicylic acid ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 mM พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ salicylic acid จาก 0.1 ถึง 0.5 สามารถกระตุ้นให้ hairy root สร้างสาร saponin เพิ่มมากขึ้น แต่ประสิทธิภาพการสร้างสาร saponin ลดลงเมื่อใช้ salicylic acid ความเข้มข้น 1.0 mM และในการกระตุ้นสาร plumbagin

กรมวิทยาศาสตร์

ในเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้ salicylic acid ความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40 mM ซึ่งรายงานโดย ศศิวิมล และคณะ (2553) ก็ให้ผลสอดคล้องกัน คือพบว่าความเข้มข้นของ salicylic acid 10 และ 20 mM สามารถกระตุ้นให้ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงสร้างสาร plumbagin ได้เพิ่มมากขึ้น แต่ประสิทธิภาพการสร้างสาร plumbagin ลดลงเมื่อใช้ salicylic acid ความเข้มข้น 30 และ 40 mM จากรายงานที่กล่าวมานี้ แม้จะพบแนวโน้มเดียวกันคือความเข้มข้นต่ำกระตุ้นได้ดีและความเข้มข้นสูงให้ผลตรงข้าม แต่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมก็ต่างกันออกไปตามชนิดพืชและชนิดสิ่งกระตุ้น ซึ่งจากการทดลองในการสร้างสาร total terpenoid จากต้นจิงจูฉ่ายนี้ salicylic acid ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่างจากในเจตมูลเพลิงแดงเช่นกัน

นอกจากความเข้มข้นของ salicylic acid จะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสร้างสารสำคัญในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงแล้ว ระยะเวลาที่เนื้อเยื่อได้สัมผัสกับ salicylic acid ก็ส่งผลต่อการสร้างสารสำคัญเช่นกัน โดย Malarz *et al*. (2007) ได้ศึกษาการกระตุ้นการผลิตสาร crepidiaside B, สาร 8-deoxylactucin และสาร sonchuside A ในเนื้อเยื่อรากของ *Cichorium intybus* โดยใช้ salicylic acid ความเข้มข้น 100 µM และตรวจสอบการผลิตสารทุติยภูมิทั้ง 3 ชนิด ภายหลังจากการกระตุ้น 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าในเนื้อเยื่อรากมีการผลิตสาร crepidiaside B และสาร 8-deoxylactucin เพิ่มขึ้นเป็นลำดับจนถึงชั่วโมงที่ 96 และมีการผลิตสาร 8-deoxylactucin สูงกว่าในเนื้อเยื่อรากที่ไม่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงที่ 120 ส่วนสาร sonchuside A มีการผลิตสูงกว่าเนื้อเยื่อรากที่ไม่ได้รับการกระตุ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 – 72 แต่กลับมีการผลิตต่ำกว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96

จากผลการทดลองในการใช้ salicylic acid กระตุ้นการผลิตสาร total terpenoids และ ascorbic acid รวมทั้งการรายงานของ Malarz *et al*. (2007) เป็นสิ่งยืนยันว่าระยะเวลาที่เนื้อเยื่อได้สัมผัสกับสิ่งกระตุ้นมีผลอย่างมากต่อผลผลิตสารสำคัญที่สกัดได้หลังจากกระตุ้น ดังนั้นในการใช้สิ่งกระตุ้นชนิดต่าง ๆ นอกจากที่จะศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการกระตุ้นแล้ว ควรศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญหลังจากการกระตุ้นด้วย เพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณมากที่สุดและคุ้มค่ากับการลงทุนในแต่ละครั้งที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าแม้ว่าต้นจิงจูฉ่ายจะไม่ได้รับสิ่งกระตุ้นแต่ถ้านำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อก็ยังให้สารสำคัญสูงกว่าที่นำไปปลูกธรรชาติ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี

กรมวิชาการเกษตร

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

## 1. สรุปผลการวิจัย

อาหารที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อและยอดจิงจูฉ่ายคือ สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 12. 2 ยอดต่อ 1 ข้อ และ 11.6 ยอดต่อ 1 ยอด

การย้ายต้นจิงจูฉ่ายที่มีลักษณะต้นและรากสมบูรณ์ที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มาปรับสภาพเป็นเวลา 3 วัน จึงนำออกปลูกในโรงเรือนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% และสามารถตั้งตัวได้ดีมีการแตกกอและเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นภายใน 6 เดือน

กรดซาลิไซลิกมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมจากต้นจิงจูฉ่าย โดยพบการผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมมากที่สุด เท่ากับ 23.05 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 2 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ เมื่อกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลานาน 1 วัน และพบการผลิตสาร ascorbic acid มากที่สุดในต้นจิงจูฉ่ายที่กระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 mM เท่ากับ 6.6 mg/100g คิดเป็น 2.2 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ภายหลังทำการกระตุ้น 3 วัน

## 2. ข้อเสนอแนะ

ผลจากงานวิจัยในครั้งนี้ได้ข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้รวมไปถึงวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม total terpenoid ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจิงจูฉ่ายในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตและควบคุมคุณภาพปริมาณสารสำคัญในต้นจิงจูฉ่ายให้เป็นไปตามมาตรฐานขององค์การอุตสาหกรรมยา เพื่อให้เกษตรกรสามารถผลิตสมุนไพรชนิดนี้ให้ได้คุณภาพในเชิงการค้า นอกจากนี้ยังได้จัดทำแผ่นพับและนำเสนอผลงานวิจัยเรื่องเต็มที่สมบูรณ์ในการประชุมวิชาการระดับชาติประจำปี 2564 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เมื่อวันที่ 8 – 9 ธันวาคม 2564 รวมทั้งนำไปเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ ปีที่ 5 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม – เมษายน 2565 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางในการดำเนินวิจัยต่อยอดในอนาคตต่อไป

กรมวิทยาศาสตร์

**การทดลองที่ 7**

# การเพิ่มปริมาณสารสำคัญเคอร์ซิตรินและรูตินจากต้นพลูคาวโดยใช้สารกระตุ้น
# Increasing of quercitrin and rutin contents from *Houttuynia cordata* Thunb. by using elicitors

**วรารัตน์ ศรีประพัฒน์ มณทิรา ภูติวรนาถ มัลลิกา แก้ววิเศษ และ ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์**
Wararat Sripapat, Montira Putiworanart, Mallika Kaewwises and Phummarin Wanichananan

**คำสำคัญ (TH) :** พลูคาว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เคอร์ซิตริน รูติน
**คำสำคัญ (EN) :** *Houttuynia cordata* Thunb, Plant tissue culture, Plant growth regulator, Quercitrin, Rutin

## บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์สมุนไพรพลูคาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอต่อความต้องการเพื่อรองรับอุตสาหกรรมการผลิตสมุนไพรอย่างมีคุณภาพ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำให้พลูคาวเกิดยอดจำนวนมากและเพิ่มปริมาณสารเคอร์ซิตรินและรูตินในพลูคาว ซึ่งพบว่าวิธีการฟอกฆ่าเชื้อส่วนข้อพลูคาวพันธุ์ก้านม่วงและใบเขียวที่เหมาะสม คือการใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และไฮเตอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จะทำให้ได้ข้อที่ปลอดเชื้อและสามารถพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดถึง 95 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้น 0–4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่าการใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยพลูคาวพันธุ์ก้านม่วงและใบเขียวเพิ่มขึ้นมากที่สุด เท่ากับ 4.15±0.90 ยอดต่อข้อ และ 4.05±0.74 ยอดต่อข้อ ตามลำดับ การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารเคอร์ซิตรินและรูตินในต้นพลูคาวในสภาพปลอดเชื้อพบว่าสูตรอาหารที่เติมกรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้พลูคาวก้านม่วงผลิตสารเคอร์ซิตรินและรูตินสูงที่สุด เท่ากับ 6.46±1.08 และ 0.59±0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่พลูคาวใบเขียวสามารถผลิตสารรูตินสูงที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ โดยจะสามารถผลิตรูตินได้ปริมาณ 2.14±0.30 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง

## Abstract

Plant tissue culture technique for medicinal plant *Houttuynia cordata* Thunb is considered to be the most efficient technology in large scale plant multiplication for improving the production process as in pharmaceutical industry. In this work, the most effective treatment

for sterilization of *H. cordata* was evaluated and the effect of plant growth regulators on shoot multiplication and secondary metabolite production were also studied. Among four sterilizing processes used in this experiment, the results showed that the maximum percentage of clean and alive nodal for *H. cordata*-purple shoot and *H. cordata*-green leaf is around 95% and 85%, respectively. The best surface sterilized method observed when using 95% ethanol for 1 minute, followed by 15% Haiter® Bleach for 15 minutes, and then followed by 5% Haiter® Bleach for 5 minutes. Furthermore, after cultured the sterilized explants on MS medium supplemented with 0–4.0 mg·L$^{-1}$ BA for 45 days. The highest number of shoots regenerated were observed on MS medium supplemented with 1.0 mg·L$^{-1}$ BA with an average number of 4.15±0.90 and 4.05±0.74 shoots per explant for *H. cordata*-purple shoot and *H. cordata*-green leaf, respectively. The *in vitro* enhancement of quercitrin and rutin production in *H. cordata*-purple shoot by elicitors showed that the quercitrin and rutin contents were maximal when elicited with 0.5 mM of salicylic acid. The *H. cordata*-purple shoot could produce quercitrin and rutin around 6.46±1.08 and 0.59±0.08 mg g$^{-1}$ dry weight, respectively. Furthermore, the rutin content of *H. cordata*-green leaf was also maximal when elicited with 0.5 mM of salicylic acid which resulted in rutin production about 2.14±0.30 mg g$^{-1}$ dry weight.

กรมวิชาการเกษตร

## บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันนี้การใช้พืชสมุนไพรเพื่อการดูแลสุขภาพยังคงเป็นกระแสที่เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ทำให้พืชสมุนไพรจำนวนไม่น้อยมีคุณสมบัติเป็นพืชเศรษฐกิจ โดยมีการคาดการณ์ว่ายอดขายสมุนไพรหรือสารสกัดสมุนไพรเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกามีมูลค่าถึง 4 พันล้านดอลลาร์ต่อปี (Chang, 2000) ในประเทศไทยเองก็มีการใช้สมุนไพรเป็นยาแผนโบราณอย่างแพร่หลายเนื่องจากพืชสมุนไพรมีศักยภาพในการรักษาโรคหลายชนิด ซึ่งทำให้ยอดขายสมุนไพรไทยหรือสารสกัดสมุนไพรไทยในช่วงปี พ.ศ. 2554-2559 มีการเติบโตเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 68% (Euromonitor International, 2016) ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการสนับสนุนส่งเสริมให้มีการปลูกพืชสมุนไพรไทยอย่างแพร่หลาย จึงทำให้แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564 ถูกจัดตั้งขึ้นเพื่อมุ่งสู่การเป็นผู้นำในการส่งออกวัตถุดิบสำหรับการผลิตสมุนไพรในภูมิภาคอาเซียนและเพื่อเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบ

และผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย (แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1, 2560) อย่างไรก็ตาม การที่จะส่งเสริมให้พืชสมุนไพรมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นนั้นจะต้องมีข้อมูลทางด้านพฤกษาศาสตร์ สารเคมีหรือสารสำคัญในสมุนไพรที่เพียงพอ เพื่อที่จะวิจัยและพัฒนารวมทั้งควบคุมคุณภาพมาตรฐานในการผลิตสมุนไพรไทยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) จัดเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ในปัจจุบันทางการแพทย์ อุตสาหกรรมยา รวมทั้งอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพให้ความสนใจที่จะนำมาใช้ พลูคาวสามารถแปรรูปเป็นยารักษาโรคต่างๆ ได้ เช่น ยายับยั้งแบคทีเรียและไวรัส ยาขับปัสสาวะ ยาลดอาการบวมน้ำ ยาแก้โรคผิวหนัง และแก้ผื่นคัน เป็นต้น (Chen *et al*., 2011; Kumar *et al*., 2014; Hung *et al*., 2015) นอกจากนี้พืชพลูคาวยังสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพและเครื่องดื่มได้ โดยไวน์สมุนไพรจากพลูคาวนั้นเป็นสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) และได้รับรางวัลให้เป็นสินค้าดีเด่นของภูมิภาค ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าทางการตลาดและเป็นโอกาสในการสร้างอาชีพให้กับเกษตรกร และยังเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับชุมชน (ชนวัตร, 2554) ซึ่งไม่เพียงแต่ตลาดในประเทศไทยเท่านั้น โดยจากการสำรวจตลาดเครื่องดื่มชาเพื่อสุขภาพในประเทศจีนพบว่าชาที่มีส่วนผสมของพลูคาวเป็นที่นิยมมากเป็นอันดับ 4 ในตลาดการขายชาในเขตเฉาซานของประเทศจีน (Li *et al*., 2017)

เคอร์ซิตรินและรูตินเป็นสารพฤกษ์เคมีหรือสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavoniods) ที่พบในพลูคาว ซึ่งสาร 2 ชนิดนี้มักนิยมใช้เพื่อวัตถุประสงค์ทางการแพทย์ โดยเคอร์ซิตริน เป็นพฤกษ์เคมีที่มีฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ (Fu *et al*., 2013; Rogerio *et al*., 2007) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่าเคอร์ซิตรินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อ HIV โดยจะไปยับยั้งฟังก์ชันของโปรตีน Vpr ที่ทำหน้าที่เป็น accessory proteins ของเชื้อ HIV (Shimura *et al*., 1999) ส่วนรูตินนั้นเป็นพฤกษ์เคมีที่มีฤทธิ์ในการป้องกันหลอดเลือดฝอยแตก ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ และยังช่วยให้ร่างกายผลิตคอลลาเจน นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Wangchauy and Chanprasert, 2012) ซึ่งปัจจุบันนี้แบรนด์เครื่องสำอางต่างๆ ทั้งในไทยและต่างประเทศนิยมนำสารรูตินมาใช้เป็นส่วนประกอบ จึงทำให้สารสำคัญชนิดนี้มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าพลูคาวจะสามารถสังเคราะห์เคอร์ซิตรินและรูตินได้เองตามธรรมชาติแต่มีปริมาณไม่สม่ำเสมอ ซึ่งบางครั้งจะได้สารเคอร์ซิตรินและรูตินในปริมาณน้อย โดยการสังเคราะห์เคอร์ซิตรินที่พบตามธรรมชาติจะอยู่ในช่วงประมาณ 0.2-2.6 mg/g (ของน้ำหนักแห้ง) ส่วนการสังเคราะห์รูตินที่พบตามธรรมชาติจะอยู่ในช่วงประมาณ 0.2-1.5 mg/g (ของน้ำหนักพืชแห้ง) (มณทิรา ภูติวรนาถ และคณะ, 2557) ในขณะที่งานวิจัยเพื่อประยุกต์ใช้สารเหล่านี้เพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ชนิด HL-60 ต้องใช้ รูตินที่ปริมาณ 120 mg/kg (ของน้ำหนักตัว) (Lin *et al*., 2012) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าปริมาณสารสำคัญมักแปรผันตามสภาพแวดล้อมของพื้นที่ที่เก็บ ในปัจจุบันจึงได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นแหล่งผลิตสารสำคัญ โดยจะสามารถทดแทนการผลิตสารจากการเพาะปลูกพืชตามธรรมชาติ ซึ่งทำให้การผลิตสารสำคัญสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง (วราภรณ์ ภูตะลุน, 2551) นอกจากนี้ยังพบว่าพลูคาวถูกจัดเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรที่กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงสาธารณสุข และภาคเอกชน ได้วิเคราะห์และคัดเลือกให้เป็นพืชสมุนไพรทางเศรษฐกิจที่มีความต้องการใช้แต่ขาดแคลน (อำพล ไมตรีเวช, 2548; สุรพล นธการกิจกุล, 2556) ดังนั้นงานวิจัยนี้จะพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้พลูคาวที่มีคุณภาพโดย มีสารเคอร์ซิตรินและรูตินในปริมาณสูงขึ้น ปราศจากการปนเปื้อนสารพิษและสิ่งเจือปน ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุมคุณภาพในการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรพลูคาวให้มีสารสำคัญสม่ำเสมอและมีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เพื่อจะเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพืชและเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจให้กับพืชสมุนไพรพลูคาว

กรมวิทยาศาสตร์

**การทดลองที่ 7 การเพิ่มปริมาณสารสำคัญเคอร์ซิตรินและรูตินจากต้นพลูคาวโดยใช้สารกระตุ้น**

**<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพลูคาว**

1. คัดเลือกต้นพลูคาวก้านม่วงสายพันธุ์ไทยที่มีความสมบูรณ์ปราศจากโรคและศัตรูพืชที่มีอายุ 6 เดือน จากนั้นตัดชิ้นส่วนบริเวณปลายยอดและข้อออกมาจากกระถางเพาะเลี้ยง นำชิ้นส่วนพืชที่ตัดได้มาล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ตัดใบส่วนเกินแล้วนำมาล้างทำความสะอาดเอาเศษดินที่ติดมาออกด้วยน้ำยาล้างจาน จำนวน 1 ครั้ง และล้างน้ำไหลผ่าน เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชมาตัดเป็นท่อนสั้นๆ ทำความสะอาดชิ้นส่วนข้อและยอดพลูคาวโดยใช้สารฟอกฆ่าเชื้อและเวลาในการทำความสะอาดแตกต่างกัน ซึ่งทุกทรีตเมนต์เติมสาร Tween20 เพื่อลดแรงตึงผิว โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี 20 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลอง คือ 1 ขวดเพาะเลี้ยง

2. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำชิ้นส่วนไปล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ตายออกแล้วตัดชิ้นส่วนข้อให้ได้ความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนชิ้นที่ปราศจากการปนเปื้อนและสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การทดสอบประสิทธิภาพของ BA ในการชักนำให้เกิดยอด**

1. นำต้นพลูคาวที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS อายุ 2 เดือน มาตัดใบและปลายยอดออกให้หมดแล้วตัดแยกเป็นข้อเดี่ยว ๆ

2. นำข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1.0, 2.0, 3.0, และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 20 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลอง คือ 1 ขวดเพาะเลี้ยง ในทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 2.5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน

3. บันทึกผลโดยนับจำนวนยอดและบันทึกลักษณะยอดที่เกิดขึ้น จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**<u>ขั้นตอนที่ 3</u> ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารเคอร์ซิตรินและรูตินในต้นพลูคาวในสภาพปลอดเชื้อ**

1. นำต้นพลูคาวจากขั้นตอนที่ 1-2 ที่มีลักษณะต้นและระบบรากสมบูรณ์แข็งแรง มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสิ่งกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิคือกรดซาลิไซลิกและเมทิลจัสโมเนตซึ่งกรองผ่านแผ่นกรองชนิด PTFE ขนาดช่อง 0.20 ไมโครเมตร ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันคือ กรดซาลิไซลิก : 0, 0.25 และ 0.5 mM; เมทิลจัสโมเนต : 0, 0.05 และ 0.1 mM หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง

2. วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ เคอร์ซิตรินและรูตินด้วย HPLC ภายหลังจากทำการกระตุ้น โดยการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ HPLC สามารถทำได้โดยเมื่อครบระยะเวลาการกระตุ้นให้นำพืชที่ได้มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างแห้งที่ได้ไปบดให้ละเอียดแล้ว

กรมวิชาการเกษตร

ชั่งให้ได้น้ำหนักแห้งปริมาณ 0.1 กรัม จากนั้นนำไปสกัดด้วยเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องเขย่าสารโดยใช้ความถี่สูงที่ค่าความถี่ 40 กิโลเฮริตซ์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสมากรองต่อด้วยแผ่นกรองไนลอนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (PVDF membrane) ตามวิธีของ Fuse (1994)

3. วิเคราะห์สารเคอร์ซิตรินและรูตินด้วย HPLC โดยใช้เครื่อง Shimadzu HPLC (SLC-10Avp) ต่อกับเครื่อง Degasser (DGU-14A) และเครื่องตรวจวัดชนิด Photo-diode array (SPD-M10Avp) ซึ่งสารละลายจะถูกแยกด้วยคอลัมน์ Luna C18 ขนาด 250 × 4.6 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 ไมโครเมตร โดยใช้เฟสคงที่เป็นแบบฝันกลับได้และเชื่อมต่อกับการ์ดคอลัมน์ ขนาด 4x3 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิห้อง และใช้เฟสเคลื่อนที่ของสารละลายผสม $H_2O$-$CH_3CN$-HCOOH อัตราส่วน 400:100:0.2 โดยปริมาตรการแยกสารภายใต้ระบบนี้จะใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่คงที่ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เป็นเวลา 45 นาที

4. นำผลค่าความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณกับกราฟสารละลายมาตรฐานมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Tukey's HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

- กรรมวิธีการทดลอง

**1. การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพลูคาว**

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี 20 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลอง คือ 1 ขวดเพาะเลี้ยง คือ

กรรมการวิธีที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที

กรรมการวิธีที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที และ 5 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที

กรรมการวิธีที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที และ 5 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที

กรรมการวิธีที่ 4 ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที และ 5 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที

**2. การทดสอบประสิทธิภาพของ BA ในการชักนำให้เกิดยอด**

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 20 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลอง คือ 1 ขวดเพาะเลี้ยง คือ

กรรมการวิธีที่ 1 BA ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมการวิธีที่ 2 BA ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมการวิธีที่ 3 BA ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมการวิธีที่ 4 BA ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมการวิธีที่ 5 BA ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

**3. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสาร quercitrin และ rutin ในต้นพลูคาวในสภาพปลอดเชื้อ**

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 กรรมวิธี 3 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลอง คือ 1 ขวดเพาะเลี้ยง คือ

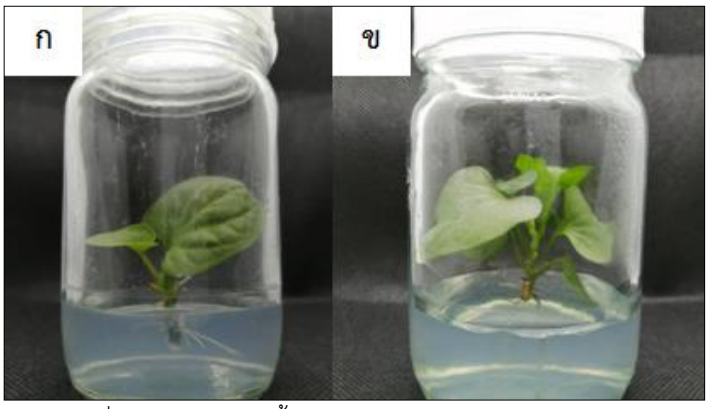
กรรมการวิธีที่ 1 สูตรอาหาร MS

กรมวิชาการเกษตร

| | |
|---|---|
| กรรมการวิธีที่ 2 | สูตรอาหาร MS + เมทิลจัสโมเนต 0.05 mM |
| กรรมการวิธีที่ 3 | สูตรอาหาร MS + เมทิลจัสโมเนต 0.10 mM |
| กรรมการวิธีที่ 4 | สูตรอาหาร MS + กรดซาลิไซลิก 0.25 mM |
| กรรมการวิธีที่ 5 | สูตรอาหาร MS + กรดซาลิไซลิก 0.50 mM |

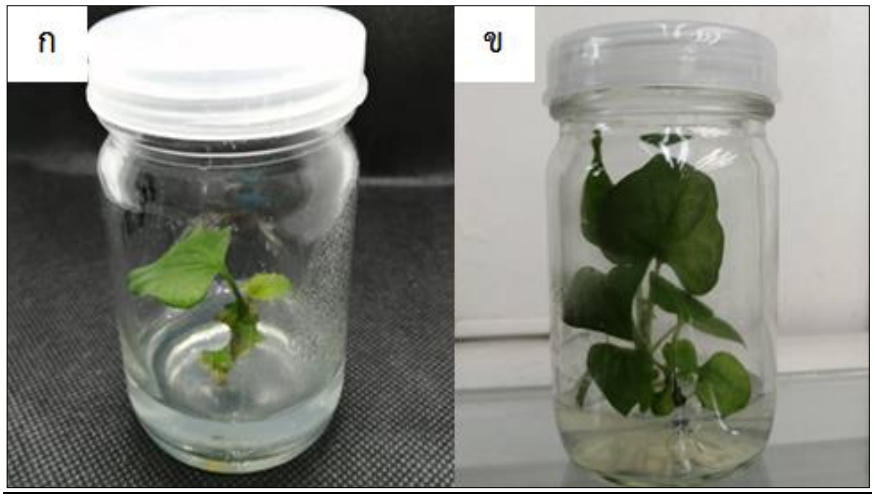
## ผลการวิจัย (Results)

การฟอกฆ่าเชื้อสมุนไพรพลูคาวก้านม่วงและพลูคาวใบเขียวสายพันธุ์ไทยด้วยกรรมวิธีต่างๆ พบว่าแต่ละกรรมวิธีส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อและการพัฒนาที่แตกต่างกัน โดยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อข้อพลูคาวที่เหมาะสมคือการใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และไฮเตอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งจะทำให้ได้ข้อพลูคาวก้านม่วงและพลูคาวใบเขียวที่ปลอดเชื้อและสามารถพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดถึง 95 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พืชจะมีจำนวนใบต่อต้นเท่ากับ 3.80±1.01 และ 3.45±1.54 ใบ ตามลำดับ (ภาพที่ 2.7.1-2.7.2) เทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมัน 95เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.7.1) อย่างไรก็ตามหากใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และไฮเตอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จะมีผลให้ได้ข้อพลูคาวก้านม่วงที่ปลอดเชื้อถึง 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน แต่เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงได้จะมีการพัฒนาที่ต่ำกว่า โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พืชจะมีจำนวนใบต่อต้นเพียง 1.75±1.29 ใบ (ตารางที่ 2.7.1) ดังนั้นประสิทธิภาพของการฟอกฆ่าเชื้อจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารที่ใช้ เนื่องจากใบต้นพลูคาวมีลักษณะซ้อนกันมีซอกใบจำนวนมากทำให้น้ำยาที่ใช้ฟอกเข้าไปไม่ทั่วถึง ถ้าใช้เวลาในการฟอกน้อยเกินไปทำให้มีจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียและเชื้อราหลงเหลืออยู่ ทำให้อัตราการปราศจากเชื้อค่อนข้างต่ำ แต่ถ้าใช้เวลาในการฟอกนานเกินไปทำให้ยอดอ่อนจะเกิดสีน้ำตาลและตายได้จึงส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำหรืออาจส่งผลต่อการพัฒนาของเซลล์และเนื้อเยื่อของพลูคาวได้ นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อพืชเองก็มีอาจมีเชื้อเอนโดไฟต์ที่เป็นแบคทีเรียหรือเชื้อราเจริญเติบโตอยู่ในเนื้อเยื่อพืชซึ่งไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคพืช โดยเชื้อเอนโดไฟต์เหล่านี้มักก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Ulrich *et al*., 2008) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการจัดการที่เหมาะสมเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนพืช




**ภาพที่ 2.7.1** ลักษณะพลูคาวก้านม่วงที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ (ก.) อายุ 4 สัปดาห์ และ (ข.) อายุ 8 สัปดาห์

กรมวิชาการเกษตร




**ภาพที่ 2.7.2** ลักษณะพลูคาวใบเขียวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ (ก.) อายุ 4 สัปดาห์ และ (ข.) อายุ 8 สัปดาห์

**ตารางที่ 2.7.1** เปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อของวิธีการฟอกในพลูคาวและจำนวนใบที่พัฒนาจากต้นปลอดเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

| กรรมวิธีการฟอก | การปลอดเชื้อ (%) | จำนวนใบต่อต้น |
|---|---|---|
| **พลูคาวพันธุ์ก้านม่วง** | | |
| ไฮเตอร์ 15% 15 นาที | 30 | 1.10±1.74$^{c}$ |
| ไฮเตอร์ 15% 15 นาที, 5% 5 นาที | 75 | 2.35±1.42$^{b}$ |
| แอลกอฮอล์ 95 % 1 นาที, ไฮเตอร์ 15% 15 นาที, 5% 5 นาที | 95 | 3.80±1.01$^{a}$ |
| แอลกอฮอล์ 95 % 5 นาที, ไฮเตอร์ 15% 15 นาที, 5% 5 นาที | 95 | 1.75±1.29$^{b}$ |
| **พลูคาวพันธุ์ใบเขียว** | | |
| ไฮเตอร์ 15% 15 นาที | 30 | 0.75±1.55$^{c}$ |
| ไฮเตอร์ 15% 15 นาที, 5% 5 นาที | 75 | 2.05±1.57$^{b}$ |
| แอลกอฮอล์ 95 % 1 นาที, ไฮเตอร์ 15% 15 นาที, 5% 5 นาที | 85 | 3.45±1.54$^{a}$ |
| แอลกอฮอล์ 95 % 5 นาที, ไฮเตอร์ 15% 15 นาที, 5% 5 นาที | 80 | 1.80±1.51$^{bc}$ |

$^{abc}$ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Tukey's test; $p < 0.05$)

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสมุนไพรพลูคาวก้านม่วงและใบเขียวให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ได้ยอดจำนวนมากที่สุด เมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 2.7.2 และภาพที่ 2.7.3-2.7.4) โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 4.15±0.90 และ 4.05±0.74 ยอดต่อข้อ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อชักนำให้เกิดยอดโดยใช้ BA ที่ความเข้มข้น 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าจำนวนยอดจะลดลง และที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะลำต้นจะแคระแกร็นไม่สูงและบางตัวอย่างไม่สามารถเกิดยอดได้อย่างชัดเจน และเมื่อตัดชิ้นส่วนยอดไปเพาะเลี้ยงต่อพบว่าพืชไม่สามารถพัฒนาใบและรากที่สมบูรณ์ได้ และรากมีลักษณะผิดปกติคือสั้นเป็นปุ่มปม (ภาพที่ 2.7.5) ดังนั้นการใช้ BA ที่ความเข้มข้นสูงอาจส่งผลเกิดสารตกค้างภายในเนื้อเยื่อพืชได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารสารควบคุมการ

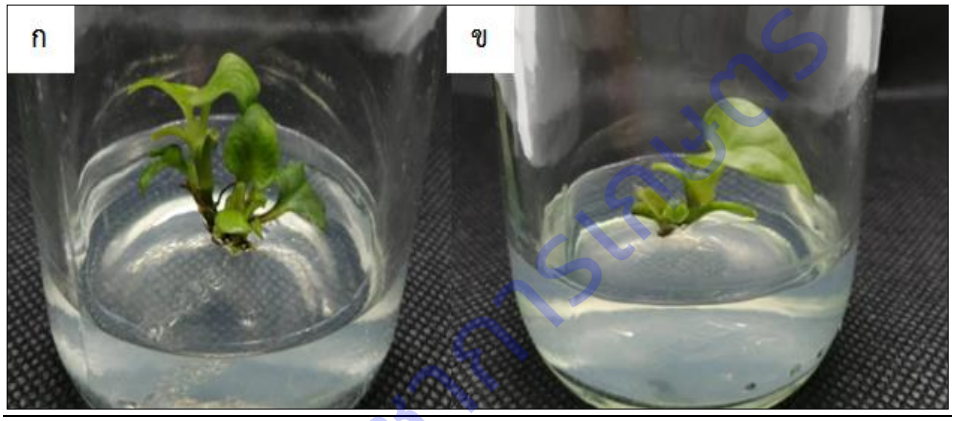
ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

เจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน โดยพบว่าการใช้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินต่ำในช่วงของการชักนำให้เกิดยอดมีผลทำให้ต้นอ่อนเกิดรากได้ดีกว่าการใช้ไซโตไคนินความเข้มข้นสูงในการชักนำยอด (Saunders and Bingham, 1975; นัฏฐา นิตย์วัฒนกุล และคณะ, 2561)

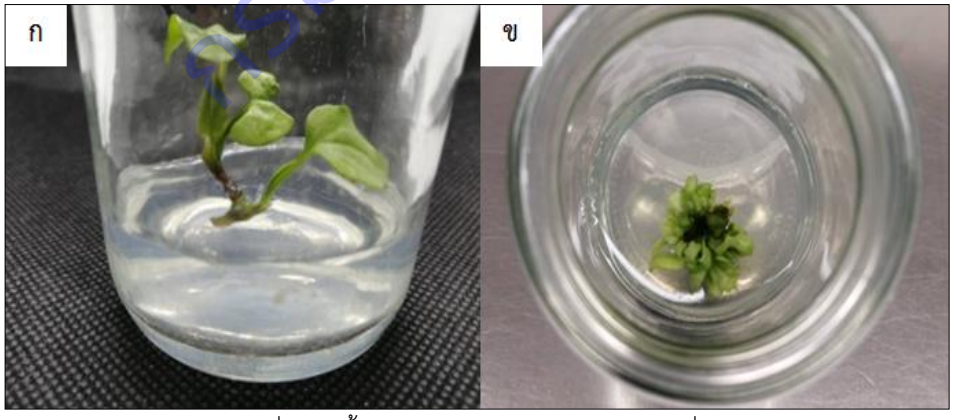
**ตารางที่ 2.7.2** อิทธิพลของ BA ที่มีต่อการเกิดยอดใหม่ของพลูคาวที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 45 วัน

| BA (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| **จำนวนยอดพลูคาวก้านม่วง (ยอด/ต้น)** | 1.10±0.30[b] | 4.15±0.90[a] | 1.25±0.53[b] | 1.15±0.36[b] | 1.40±0.58[b] |
| **จำนวนยอดพลูคาวใบเขียว (ยอด/ต้น)** | 1.15±0.36[b] | 4.05±0.74[a] | 1.20±0.40[b] | 1.25±0.43[b] | 1.25±0.54[b] |

[ab] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละแถวตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Tukey's test; $p < 0.05$)




**ภาพที่ 2.7.3** ลักษณะยอดพลูคาวก้านม่วงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA (ก) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร




**ภาพที่ 2.7.4** ลักษณะยอดพลูคาวใบเขียวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA (ก) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

**ภาพที่ 2.7.5** ลักษณะรากพลูคาวที่ถูกชักนำให้เกิดยอดด้วย BA ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อตัดชิ้นส่วนยอดไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร MS พบว่าพืชไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ รากมีลักษณะสั้นเป็นปุ่มปม

จากนั้นนำต้นพลูคาวที่มีอายุครบ 8 สัปดาห์ มาตัดแยกยอดแล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอต่อการนำไปศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ คือสารเคอร์ซิตรินและรูตินในต้นพลูคาว หลังจากนั้นเมื่อต้นพลูคาวมีอายุครบ 12 สัปดาห์ ซึ่งมีลักษณะต้นและระบบรากสมบูรณ์แข็งแรงมาเลี้ยงในอาหารที่เติมสิ่งกระตุ้นการผลิตสารทุติยภูมิ คือเมทิลจัสโมเนตและกรดซาลิไซลิกที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน คือเมทิลจัสโมเนต : 0, 0.05 และ 0.1 mM และกรดซาลิไซลิก : 0, 0.25 และ 0.5 mM หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ เคอร์ซิตรินและรูตินด้วย HPLC ภายหลังจากทำการกระตุ้น (ภาพที่ 2.7.6)

**ภาพที่ 2.7.6** ขั้นตอนการดำเนินงานเพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารเคอร์ซิตรินและรูตินในต้นพลูคาวในสภาพปลอดเชื้อ

ผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เติมกรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้พลูคาวก้านม่วงผลิตสารเคอร์ซิตรินและรูตินสูงที่สุด โดยสามารถผลิตได้ปริมาณ 6.46±1.08 และ 0.59±0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 2.7.3) ในขณะที่พลูคาวใบเขียวสามารถผลิตสารรูตินสูงที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ โดยจะสามารถผลิตได้ปริมาณ 2.14±0.30 มิลลิกรัมต่อกรัม อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบสารเคอร์ซิตรินในพลูคาวใบเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุ

กรมวิชาการเกษตร

ครบ 12 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค HPLC ได้ (ตารางที่ 2.7.4) นอกจากนี้เมื่อศึกษาวิเคราะห์ปริมาณรูตินที่พบในพลูคาวที่ปลูกในธรรมชาติในโรงเรือนด้วย HPLC พบว่าไม่สามารถตรวจพบสารเคอร์ซิตรินในพลูคาวใบเขียวได้เช่นกัน ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่พลูคาวใบเขียวที่ใช้ในงานวิจัยสามารถผลิตรูตินได้ปริมาณน้อยมาก เนื่องจากปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชจะแปรผันไปตามสายพันธุ์ของพืช (Sytar *et al*., 2014) และการใช้กรดซาลิไซลิกและเมทิลจัสโมเนตเพื่อเป็นสารกระตุ้นอาจจะยังไม่เหมาะสมเพียงพอที่จะทำให้สามารถกระตุ้นให้พลูคาวใบเขียวสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเพิ่มการผลิตสารเคอร์ซิตรินได้ ดังนั้น พลูคาวก้านม่วงจึงเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะเลือกมาใช้เพื่อการผลิตสารสำคัญ คือเคอร์ซิตรินจากต้นพลูคาว ในขณะที่พลูคาวใบเขียวเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะเลือกมาใช้เพื่อการผลิตสาระสำคัญ คือรูตินจากต้นพลูคาว และสูตรอาหาร MS ที่เติมกรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่สามารถกระตุ้นให้พลูคาวผลิตเคอร์ซิตรินและรูตินได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ากรดซาลิไซลิกจัดเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitor) ที่พืชสามารถสังเคราะห์ได้เองตามธรรมชาติแต่มีปริมาณที่น้อยมาก โดยจากงานวิจัยของ Khan และคณะ (2015) พบว่ากรดซาลิไซลิกเป็นสารที่มีบทบาทในหลายๆ กระบวนการของพืช เช่น การควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การพัฒนาและการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งมีชีวิตและสิ่งมีชีวิต โดยจะทำหน้าที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับส่งสัญญาณความเครียด โดยพืชมักจะสามารถตอบสนองต่อสภาวะเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมได้ดีเมื่อมีปริมาณกรดซาลิไซลิกเพิ่มขึ้น (Janda *et al*., 2014) ซึ่งทั้งกรดซาลิไซลิกและฟลาโวนอยด์เป็นอนุพันธ์ของสารฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) และจะถูกสังเคราะห์จากกรดอะมิโนฟีนิลแอลานีน (phenylalanine) (ภาพที่ 2.7.7) ซึ่งจากการศึกษาผลของกรดซาลิไซลิกต่อการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในข้าวสาลีพบว่ากรดซาลิไซลิกมีผลทำให้พืชมีการสะสมเควอซิทิน (quercetin) มากขึ้น นอกจากนี้พืชยังมีการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (Gondor *et al*., 2016) ซึ่งเควอซิทินที่พบในพืชนี้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ คือเคอร์ซิตรินและรูติน ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของเคอร์ซิตรินและรูตินในพลูคาวหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกจึงอาจจะเกี่ยวข้องกับการที่กรดซาลิไซลิกสามารถกระตุ้นให้พืชมีการสะสมสารเควอซิทินในเซลล์เพิ่มมากขึ้น และมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เพิ่มมากขึ้น

**ตารางที่ 2.7.3** อิทธิพลของสารกระตุ้นที่มีต่อการผลิตสารเคอร์ซิตรินและรูตินของพลูคาวก้านม่วงที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง

| กรรมวิธีการกระตุ้น | เคอร์ซิตริน (มิลลิกรัม/กรัม) | รูติน (มิลลิกรัม/กรัม) |
|---|---|---|
| สูตรอาหาร MS | 2.16±0.56$^{c}$ | 0.55±0.05$^{a}$ |
| สูตรอาหาร MS + กรดซาลิไซลิก 0.25 mM | 5.86±0.64$^{ab}$ | 0.55±0.04$^{a}$ |
| สูตรอาหาร MS + กรดซาลิไซลิก 0.50 mM | 6.46±1.08$^{a}$ | 0.59±0.08$^{a}$ |
| สูตรอาหาร MS + เมทิลจัสโมเนต 0.05 mM | 5.61±0.14$^{ab}$ | 0.57±0.04$^{a}$ |
| สูตรอาหาร MS + เมทิลจัสโมเนต 0.10 mM | 4.52±0.45$^{b}$ | 0.41±0.04$^{b}$ |

$^{abc}$ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Tukey's test; $p < 0.05$)

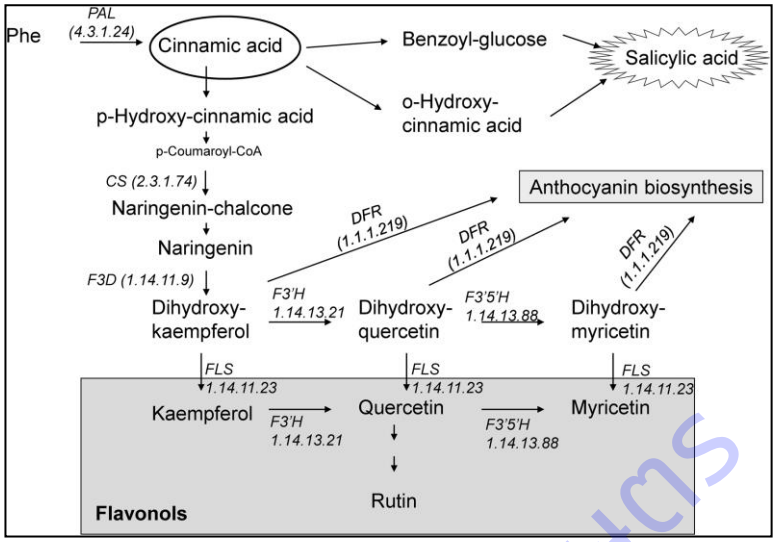
**ตารางที่ 2.7.4** อิทธิพลของสารกระตุ้นที่มีต่อการผลิตสารเคอร์ซิตรินและรูตินของพลูคาวใบเขียวที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง

| กรรมวิธีการกระตุ้น | เคอร์ซิตริน (มิลลิกรัม/กรัม) | รูติน (มิลลิกรัม/กรัม) |
|---|---|---|
| สูตรอาหาร MS | nd* | 1.31±0.12$^{b}$ |
| สูตรอาหาร MS + กรดซาลิไซลิก 0.25 mM | nd | 2.14±0.15$^{a}$ |
| สูตรอาหาร MS + กรดซาลิไซลิก 0.50 mM | nd | 2.14±0.30$^{a}$ |

| | | |
|---|---|---|
| สูตรอาหาร MS + เมทิลจัสโมเนต 0.05 mM | nd | 2.06±0.50[ab] |
| สูตรอาหาร MS + เมทิลจัสโมเนต 0.10 mM | nd | 1.45±0.13[ab] |

[ab] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Tukey's test; $p < 0.05$)

*nd = ไม่สามารถตรวจพบสารได้




**ภาพที่ 2.7.7** แผนผังการสังเคราะห์กรดซาลิไซลิกและฟลาโวนอยด์ในพืช (Gondor *et al*., 2016)

## อภิปรายผล (Discussion)

เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อต้นพลูคาวที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือการใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และตามด้วยไฮเตอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งประสิทธิภาพของการฟอกฆ่าเชื้อจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารที่ใช้ เนื่องจากใบต้นพลูคาวมีลักษณะซ้อนกันมีซอกใบจำนวนมากทำให้น้ำยาที่ใช้ฟอกเข้าไปไม่ทั่วถึง ถ้าใช้เวลาในการฟอกน้อยเกินไปทำให้มีจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียและเชื้อราหลงเหลืออยู่ ทำให้อัตราการปราศจากเชื้อค่อนข้างต่ำ แต่ถ้าใช้เวลาในการฟอกนานเกินไปทำให้ยอดอ่อนจะเกิดสีน้ำตาลและตายได้จึงส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำหรืออาจส่งผลต่อการพัฒนาของเซลล์และเนื้อเยื่อของพลูคาวได้ นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อพืชเองก็มีอาจมีเชื้อเอนโดไฟต์ที่เป็นแบคทีเรียหรือเชื้อราเจริญเติบโตอยู่ในเนื้อเยื่อพืชซึ่งไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคพืช โดยเชื้อเอนโดไฟต์เหล่านี้มักก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการจัดการที่เหมาะสมเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนพืช

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสมุนไพรพลูคาวก้านม่วงและใบเขียวให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ได้ยอดจำนวนมากที่สุด เมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ อย่างไรก็ตามเมื่อชักนำให้เกิดยอดโดยใช้ BA ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นพบว่าจำนวนยอดจะลดลง ลักษณะลำต้นจะแคระแกร็นไม่สูงและบางตัวอย่างไม่สามารถเกิดยอดได้อย่างชัดเจน และเมื่อตัดชิ้นส่วนยอดไปเพาะเลี้ยงต่อพบว่าพืชไม่สามารถพัฒนาใบและรากที่สมบูรณ์ได้ และรากมีลักษณะผิดปกติคือสั้นเป็นปุ่มปม ดังนั้นการใช้ BA ที่ความเข้มข้นสูงอาจส่งผลเกิดสารตกค้างภายในเนื้อเยื่อพืชได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน โดยพบว่าการใช้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินต่ำในช่วงของการชักนำให้เกิดยอดมีผลทำให้ต้นอ่อนเกิดรากได้ดีกว่าการใช้ไซโตไคนินความเข้มข้นสูงในการชักนำยอด

ลิขสิทธิ์การเกษตร

นอกจากนี้พบว่ากรดซาลิไซลิกเป็นสารกระตุ้นที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารเคอร์ซิตรินและรูตินในต้นพลูคาวก้านม่วงในสภาพปลอดเชื้อได้ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของเคอร์ซิตรินและรูตินในพลูคาวหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกนั้นอาจจะเกี่ยวข้องกับการที่กรดซาลิไซลิกสามารถกระตุ้นให้พืชมีการสะสมสารเควอซิทินในเซลล์เพิ่มมากขึ้น และมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น โดยเป็นที่ทราบกันดีว่ากรดซาลิไซลิกจัดเป็นตัวกระตุ้นชีวภาพที่พืชสามารถสังเคราะห์ได้เองตามธรรมชาติแต่มีปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้น การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ จะทำให้สามารถชักนำให้สมุนไพรพลูคาวผลิตสารเคอร์ซิตินและรูตินเพิ่มขึ้น มีผลทำให้สามารถผลิตต้นพลูคาวที่มีสารสำคัญสูงจำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น ส่งผลให้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุมคุณภาพในการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรพลูคาวให้มีสารสำคัญสม่ำเสมอและมีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เพื่อจะเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพืชและเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจให้กับพืชสมุนไพรพลูคาว

## สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อต้นพลูคาวที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือการใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และตามด้วยไฮเตอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้สามารถชักนำให้เกิดยอดพลูคาวก้านม่วงและใบเขียวจำนวนเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด คือเท่ากับ 4.15±0.90 และ 4.05±0.74 ยอดต่อข้อตามลำดับ การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารเคอร์ซิตรินและรูตินในต้นพลูคาวในสภาพปลอดเชื้อพบว่าสูตรอาหารที่เติมกรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้พลูคาวก้านม่วงผลิตสารเคอร์ซิตรินและรูตินสูงที่สุด คือเท่ากับ 6.46±1.08 และ 0.59±0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งตามลำดับ ในขณะที่พลูคาวใบเขียวสามารถผลิตสารรูตินสูงที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ โดยจะสามารถผลิตได้ปริมาณ 2.14±0.30 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบสารเคอร์ซิตรินในพลูคาวใบเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุครบ 12 สัปดาห์ และในต้นพลูคาวที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนด้วยเทคนิค HPLC ได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่พลูคาวใบเขียวที่ใช้ในงานวิจัยสามารถผลิตเคอร์ซิตรินได้ปริมาณน้อยมาก เนื่องจากปริมาณสารฟลาโวเนอยด์ที่พบในพืชจะแปรผันไปตามแหล่งที่เพาะปลูกและสายพันธุ์ของพืช และการใช้สารกระตุ้นอาจจะยังไม่เหมาะสมเพียงพอให้สามารถกระตุ้นให้พลูคาวเขียวสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเพิ่มการผลิตสารรูตินได้ ดังนั้น พลูคาวก้านม่วงจึงเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะเลือกมาใช้เพื่อการผลิตสารสำคัญ คือเคอร์ซิตรินจากต้นพลูคาว ในขณะที่พลูคาวใบเขียวเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะเลือกมาใช้เพื่อการผลิตสารสำคัญ คือรูตินจากต้นพลูคาว และสูตรอาหาร MS ที่เติมกรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่สามารถกระตุ้นให้พลูคาวผลิตเคอร์ซิตรินและรูตินได้ดีที่สุด

ISO 9001:2015

## บทสรุปและข้อเสนอแนะ

### บทสรุป

1. การเก็บเกี่ยวกวาวเครือขาว ที่อายุ 9 เดือนหลังปลูก มีปริมาณของ puerain daidzein และgenistein สูง คือ 80.66, 24.15 และ 0.26 มก./ ตัวอย่าง 100 กรัมตามลำดับ และมีโอกาสเป็นไปได้ว่า ระยะเวลา และช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวมีผลต่อปริมาณสารสำคัญ ควรมีการซึ่งศึกษาในต่อเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนการปลูกเพื่อในเชิงการค้า ทั้งนี้หากระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่สั้น และมีปริมาณสารสำคัญที่สูงกว่าระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ยาว ทำให้มีผลต่อผลผลิต รายได้ และใช้ประกอบการพิจารณาในการลงทุนผลิตกวาวเครือขาวในเชิงธุรกิจต่อไปในอนาคต

2. สามารถใช้สมการที่ได้ในการประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวนทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ ซึ่งสามารถนำเอาวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้กับการประเมินปริมาณสารในเมล็ดพันธุ์ชนิดอื่นๆได้ อีกทั้งเป็นข้อมูลในฐานข้อมูลไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับการใช้ประโยชน์ของนักปรับปรุงพันธุ์พืช

3. ได้ข้อมูลการจากการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ถั่วสกุล phaseolus และพันธุ์ตรวจสอบ จำนวนทั้งหมด 17 ตัวอย่างพันธุ์ เพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลของธนาคารเชื้อพันธุ์พืชสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต และสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลของนักปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกพันธุ์นำไปใช้ในเชิงการค้าเป็นการเพิ่มมูลค่าในตัวผลิตผลทางการเกษตร สร้างรายเสริมให้กับเกษตรกรผู้ปลูก ซึ่งลักษณะประจำพันธุ์ได้แก่ สีโคน สีดอก สีกลีบเลี้ยง ลักษณะการเจริญ รูปแบบการเจริญ ความยาวก้านใบ ความยาวก้านใบย่อย ขนใบที่ใบ การแตกกิ่ง ความนาแน่น ทรงพุ่ม ลักษณะการแตกกิ่ง การเรียงตัวของกิ่ง เป็นต้น

การวิเคราะห์หาปริมาณพฤกษเคมี จากการทดลองพบว่า สารสกัดที่ได้จากถั่วสกุล Phaseolus สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วน (เอนไซม์ไลเปส) และเบาหวาน (เอนไซม์แอลฟ่า-อะไมเลส เอนไซม์แอลฟ่า-กลูโคซิเดส และเอนไซม์ไดเพปทิดิล-เพปทิเดส-4) หากสามารถนำสารสกัดที่ได้จากถั่วสกุล phaseolus มาใช้บริโภคแทนสารที่ได้จากการสังเคราะห์เพื่อป้องกันการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง ซึ่งน่าจะเป็นทางเลือกที่ดี มีความปลอดภัย ไม่มีผลข้างเคียง อีกทั้งยังช่วยให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นจากการปลูกพืชเป็นการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร

4. หนอนตากหยาก มีสารทุติยภูมิที่สำคัญ ซึ่งสามารถนำไปสกัดทำเป็นยารักษาโรค และสารกำจัดแมลงได้ รากของหนอนตายหยาก *S. rupestris* Inthachub ให้ปริมาณสาร stemocurtisine สูงที่สุด (1.68% w/w) สาร stemofoline สามารถตรวจพบได้ในรากของหนอนตายหยาก 2 ชนิด คือ *S. curtisii* Hook. f. และ *S. collinsiae* Graib. โดยรากหนอนตายหยาก *S. collinsiae* Graib. ให้ปริมาณสาร stemofoline สูงที่สุด (1.65% w/w) หนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. ที่ได้จาก จ.ชุมพร และ จ.สตูล ตรวจพบสาร stemocurtisine และ stemofoline ได้ทั้งสองชนิด ในขณะที่หนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook. f. ที่ได้จาก จ. กระบี่ ตรวจพบเพียง

สาร stemocurtisine เพียงอย่างเดียว จึงควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อพิสูจน์และเก็บข้อมูลประกอบการพิจารณาการนำรากหนอนตายหยากมาสกัดสารทุติยภูมิเป้าหมายได้เหมาะสมมากยิ่งขึ้น การเพาะเลี้ยง *S. tuberosa* Lour. ในสภาพปลอดเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยได้ดีบนอาหารสูตร MS+6mg/l BA และ MS+8mg/l BA โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้น แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้ และ *S. collinsiae* Craib. สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS+2mg/l TDZ โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้น และสามารถเกิดรากได้บนอาหารสูตร MS+3%sucrose+1mg/l NAA+1mg/l thiamine คิดเป็นร้อยละ 71.23

5. เท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัดให้ผลผลิตหัวมีน้ำหนักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เท้ายายม่อมจาก จ.จันทบุรีมีน้ำหนักหัวสูงสุด (416.88 ก.) แต่ไม่แตกต่างกับหัวจาก จ.ฉะเชิงเทรา (411.88 ก.) ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมที่แปรรูปจากจากทั้ง 6 จังหวัดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปริมาณแป้งเท้ายายม่อมจากพันธุ์ จ.อุบลราชธานีสูงสุด (220.37 ก./นน.สด 1 กก.) รองลงมาคือ จ.จันทบุรี (202.37 ก./นน.สด 1 กก.) อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของเท้ายายม่อมปริมาณของสารประกอบหลักในอาหาร พบว่าคาร์โบไฮเดรต และ โปรตีน จากแป้งเท้ายายม่อมจากทั้ง 6 จังหวัด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ปริมาณไขมัน ความชื้น เถ้า และใยอาหารทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

6. อาหารที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อและยอดจิ๋งจูฉ่ายคือ สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 12. 2 ยอดต่อ 1 ข้อ และ 11.6 ยอดต่อ 1 ยอด การย้ายต้นจิงจูฉ่ายที่มีลักษณะต้นและรากสมบูรณ์ที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มาปรับสภาพเป็นเวลา 3 วัน จึงนำออกปลูกในโรงเรือนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% และสามารถตั้งตัวได้ดีมีการแตกกอและเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นภายใน 6 เดือน กรดซาลิไซลิกมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมจากต้นจิงจูฉ่าย โดยพบการผลิตสารเทอร์พีนอยด์รวมมากที่สุด เท่ากับ 23.05 มิลลิกรัม/100 กรัม คิดเป็น 2 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ เมื่อกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลานาน 1 วัน และพบการผลิตสาร ascorbic acid มากที่สุดในต้นจิงจูฉ่ายที่กระตุ้นด้วย salicylic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 mM เท่ากับ 6.6 mg/100g คิดเป็น 2.2 เท่าของต้นจิงจูฉ่ายที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ภายหลังทำการกระตุ้น 3 วัน

7. การเพาะเลี้ยงพูลคาวในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สูตรอาหาร MS + BA 1.0 มก./ล. มีผลทำให้สามารถชักนำให้เกิดยอดพลูคาวก้านม่วงและใบเขียวจำนวนเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด คือเท่ากับ 4.15±0.90 และ 4.05±0.74 ยอดต่อข้อ ตามลำดับ ในการเพิ่มปริมาณสารเคอร์ซิตรินและรูตินในต้นพลูคาวในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สูตรอาหาร MS + กรดซาลิไซลิก 0.50 mMr เป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้พลูคาวก้านม่วงผลิตสารเคอร์ซิตรินและรูตินสูงที่สุด คือเท่ากับ 6.46±1.08 และ 0.59±0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่พลูคาวใบเขียวสามารถผลิตสารรูตินสูงที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วยกรดซาลิไซลิก 0.50 mMr โดยจะสามารถผลิตได้ปริมาณ 2.14±0.30 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ดังนั้น พลูคาวก้านม่วงจึงเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะเลือกมาใช้เพื่อการผลิตสารสำคัญ คือเคอร์ซิตรินจากต้นพลูคาว ในขณะที่พลูคาวใบเขียวเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะเลือกมาใช้เพื่อการผลิตสารสำคัญ คือรูตินจากต้นพลูคาว และสูตรอาหาร MS + กรดซาลิไซลิก 0.50 มิลลิโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่สามารถกระตุ้นให้พลูคาวผลิตเคอร์ซิตรินและรูตินได้ดีที่สุด

**ข้อเสนอแนะ**

1. การทราบระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวกวาวเครือขาวเป็นสิ่งที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เหมาะสมกับการผลิตเพื่อการค้าในตลาดวัสดุดิบในการสกัดยาต่อไปในอนาคต เพื่อลดการทำลายพันธุ์ในสภาพธรรมชาติ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. การใช้สมการ NIR เพื่อทำนายสารสำคัญในเมล็ดที่จัดเก็บในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ทำให้เมล็ดไม่ถูกทำลายและสามารถทราบปริมาณสารสำคัญได้ จึงควรศึกษาในเมล็ดชนิดอื่นที่จัดเก็บในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

3. การหาเชื้อพันธุกรรมพืชที่มีศักยภาพที่เก็บอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อการใช้ประโยชน์จากพื้นฐานความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงการค้าให้เพิ่มมากขึ้น

4. หนอนตายหยาก *S. tuberosa* Lour. *S. pierrei* Gagnap และ *Stemona* sp. ตรวจพบว่ามีสารแอลคาลอยด์ในรากเช่นกัน แต่ไม่ใช่สาร stemocurtisine และ stemofoline จึงควรมีการวิเคราะห์สารแอลคาลอยด์ชนิดอื่นต่อไป

5. การส่งเสริมผลิตหัวเท้ายายม่อมควรใช้พันธุ์จาก จ.จันทบุรี และ.จ.อุบลราชธานี เนื่องจาก การให้แป้งมีปริมาณไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณธาตุอาหารในดินและการให้ปุ๋ย แต่ควรมีการศึกษาต่อไปในการวางแผนการผลิตควบคู่ไปกับการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้ในการผลิตหัวเท้ายายม่อมต่อไป

6. ผลจากงานวิจัยในครั้งนี้ได้ข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้รวมไปถึงวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม total terpenoid ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจิงจูฉ่ายในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตและควบคุมคุณภาพปริมาณสารสำคัญในต้นจิงจูฉ่ายให้เป็นไปตามมาตรฐานขององค์การอุตสาหกรรมยา เพื่อให้เกษตรกรสามารถผลิตสมุนไพรชนิดนี้ให้ได้คุณภาพในเชิงการค้า นอกจากนี้ยังได้จัดทำแผ่นพับและนำเสนอผลงานวิจัยเรื่องเต็มที่สมบูรณ์ในการประชุมวิชาการระดับชาติประจำปี 2564 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เมื่อวันที่ 8 – 9 ธันวาคม 2564 รวมทั้งนำไปเผยแพร่ผลงานวิจัย ในวารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ ปีที่ 5 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม – เมษายน 2565 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางในการดำเนินวิจัยต่อยอดในอนาคตต่อไป

7. การขยายพันธุ์พูลคาวและชักนำสารสำคัญในสภาพปลอดเชื้อได้รับความสนใจด้วยได้รับการยืนยันว่าสารสำคัญในพูลคาวสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรน่า 2019 (COVID 19) ได้ มีโอกาสเป็นไปได้ในการศึกษาเพิ่มเติมด้านการผลิตในขนาดที่ใหญ่เพื่อเพิ่มผลผลิตให้ได้ตามความต้องการของตลาด อย่างไรก็ตามในการทดลองไม่สามารถตรวจพบสารเคอร์ซิตรินในพลูคาวใบเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุครบ 12 สัปดาห์ และในต้นพลูคาวที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนด้วยเทคนิค HPLC ได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่พลูคาวใบเขียวที่ใช้ในงานวิจัยสามารถผลิตเคอร์ซิตรินได้ปริมาณน้อยมาก เนื่องจากปริมาณสารฟลาโวเนอยด์ที่พบในพืชจะแปรผันไปตามแหล่งที่เพาะปลูกและสายพันธุ์ของพืช และการใช้สารกระตุ้นอาจจะยังไม่เหมาะสมเพียงพอให้สามารถกระตุ้นให้พลูคาวเขียวสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเพิ่มการผลิตสารรูตินได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นประโยชน์ต่อไปในการขยายผลสู่ภาคการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

## เอกสารอ้างอิง


กรมพัฒนาที่ดิน. มปป. ประวัติและความสำคัญของถั่วเหลือง สืบค้นจาก: www.ldd.go.th/Lddwebsite/web_ord/Technical//P_Technical06028.pdf [2 พฤษภาคม2557]

กรมวิชาการเกษตร. 2548. กวาวเครือขาว-พืชมหัศจรรย์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 41 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2550. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ : โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตกวาวเครือขาว. กองทุนสนับสนุนงานวิจัย กรุงเทพฯ. 166 หน้า.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ และอริยาภรณ์ พงษ์รัตน์. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib.). วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 10(2):1-13.

กุหลาบ สิทธิสวนจิก. 2553. แป้งทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์: แป้งเพื่อสุขภาพ. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์, 10(2):70-77.

ชนวัตร พึ่งนนทสกุล. 2554. คุณค่าของสมุนไพรไทยเพื่อชีวิตที่มีคุณค่า. สืบค้นจาก: http://www.yodsunthonnetwork.com. [22 มี.ค. 2562]

ฐานข้อมูล ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ สำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. สืบค้นจาก https://www.dnp.go.th/botany/ThaiPlantName/Default.aspx

ฐานข้อมูลสำนักงานข้อมูลสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. สืบค้นจาก http://www.medplant.mahidol.ac.th/pharm/search.asp

ธนาภร รติธรรมธร. 2560. แป้งต้านทานการย่อย. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 22(1): หน้า 166-176.

นัฏฐา นิตย์วัฒนกุล นิภาวัลย์ แหมไธสง และอารักษ์ ธีรอาพน. 2561. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้กุหลาบเหลืองโคราช (*Aerides houlletiana* Rchb.f.), ว.วิทย.กษ. 49:1 (พิเศษ):291-293.

บุญร่วม คิดค้า. 2551. ผลของสารชักนำต่อผลผลิตและปริมาณไอโซฟลาโวนอย์ของหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] และฤทธิ์ของสารในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรท (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ประสาร ฉลาดคิด. 2546. อิทธิพลของสภาพแวดล้อม และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การออกดอก การติดฝักและเมล็ด และการสะสมสาร Daidzein และ Genistein ในหัวกวาวเครือขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ปราโมทย์ ทิพย์ดวงตา, สุวรรณา เวชอภิกุล, สุนีย์ จันทร์สกาว และวิสินี จันทร์มหเสถียร. 2548. การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารองค์ประกอบสำคัญจากกวาวเครือขาวในช่วงเวลาต่างๆ. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: เชียงใหม่.

ปาจารีย์ อินทชุบ. 2551. พืชสกุลหนอนตายหยาก (*Stemona* Lour.) บางชนิดในประเทศไทย. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. 22(2): 20-23.

แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564. 2560. สืบค้นจาก: https://www.dtam.moph.go.th/images/download/dl0021/MasterPlanThaiherb.pdf. [22 มี.ค. 2562]

พนมกร ขุนอ่อน. 2550. การใช้น้ำสกัดชีวภาพสมุนไพรหนอนตายหยากควบคุมหนอนแมลงวันบ้าน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. คณะพัฒนาสังคมและสิ่งแวดล้อม, สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์.

พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์. 2551. NIR Spectometer เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์สารอินทรีย์. สืบค้นจาก http://nirapplication.blogspot.com/2008/03/nir-spectrometer [6 พฤษภาคม 2557]

พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์. 2551. NIR Spectometer เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์สารอินทรีย์. สืบค้นจาก http://nirapplication. blogspot.com/2008/03/nir-spectrometer [6 พฤษภาคม 2557]

ศูนย์วิทยทรัพยากร

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์ (มปป) Nir Infrared/ NIR สืบค้นจาก จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0912/near-infrared-nir.html [6 พฤษภาคม 2557]

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. มปป. Nir Infrared/ NIR. สืบค้นจาก http://www.foodnetworksolution.com/ wiki /word/0912/ near-infrared-nir.html [6 พฤษภาคม 2557]

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2546. “ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส.”. สืบค้นจาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1174/ amylase [4 เมษายน 2560]

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2546. “ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส.” สืบค้นจาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1174/amylase [4 เมษายน 2560]

ไพบูลย์ ปะนาเส. 2551. ผลของสารกำจัดแมลงชีวภาพจากหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.) และสารภี (*Mammea siamensis* Miq. T.) ต่อระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและกิจกรรมไลโซไซม์ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ และอัญชลี จาละ. 2557. อิทธิพลของ BA และ NAA ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดต้นพรมมิ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. Thai Journal of Science and Technology. 3 (1):7–14.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

รุจน์ สุทธิศรี. 2547. สารเอสโตรเจนจากพืช (phyoestrogen). ภาควิชาเภสัชวิทยา. คณะเภสัชศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.

วราภรณ์ ภูตะลุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, สำนักพิมพ์ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา, ขอนแก่น, 120 หน้า.

วันดี รังสีวิจิตรประภา, ไชยวัฒน์ ไชยสุต, จินตนา นภาพร, นัททีี พัชราวนิช และจารุวรรณ ธนวิรุฬห์. มปป. การพัฒนาสารสกัดถั่วเหลืองบรรจุแคปซูลและการกำหนดขนาดรับประทาน สืบค้นจาก http://www.arda.or.th/kasetinfo/north/research_soybean/research_soybean 39.pdf [3 พฤษภาคม 2557]

วันดี รังสีวิจิตรประภา, ไชยวัฒน์ ไชยสุต, จินตนา นภาพร, นัททีี พัชราวนิช และจารุวรรณ ธนวิรุฬห์. มปป.. การพัฒนาสารสกัดถั่วเหลืองบรรจุแคปซูลและการกำหนดขนาดรับประทาน. สืบค้นจาก: http://www.arda.or.th/kasetinfo/north/research_soybean/research_soybean 39.pdf [3 พฤษภาคม 2557]

วินระพี นาคสวัสดิ์. 2555. มารู้จัก White kidney beans กันเถอะ. สืบค้นจาก : http://www.jsppharma.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=539320872 [21 เมษายน 2560]

วิราสิณี จันทร์เป็ง และนพพล เล็กสวัสดิ์. 2557. อะไมเลส (Amylase). สาขาวิศวกรรมกระบวนการอาหาร. สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. สืบค้นจาก www.agro.cmu.ac.th/absc/data/57/57-025.pdf [24 เมษายน 2560]

วิโรจน์ เชาว์วิเศษ. 2550. ผลของสังกะสีต่อการสะสม puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] และผลของสารสกัด

กรมวิชาการเกษตร

กวาวเครือขาวต่อการคลายตัวของหลอดเลือดหนูขาว (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วีระพล จันทร์สวรรค์ สถาพร จิตตปาลพงศ์ และนงนุช จันทราช. 2536. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อเห็บโค. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย์.). 27:336-340.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2552. ย่อเภสัชกรรมไทยและสรรพคุณสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 3. ศิลป์สยายบรรจุภัณฑ์และการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 224 น.

ศศิวิมล จันทร์สุเทพ. 2553. การผลิตสาร plumbagin จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* Linn.) ในฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพินญา บุญมานพ, สมสุข ศรีจักรวาล และปราโมทย์ เกิดศิริ. 2547ก. อิทธิพลของขนาดหัวเท้ายายม่อมต่อปริมาณแป้งและโปรตีน. ผลงานฉบับเต็ม : ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร 6 ว. กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. 26 หน้า.

สุพินญา บุญมานพ, สมสุข ศรีจักรวาล และปราโมทย์ เกิดศิริ. 2547ข. อิทธิพลของขนาดหัวเท้ายายม่อมต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตเมื่อปลูกแซมในสวนมะม่วงหิมพานต์. ผลงานฉบับเต็ม : ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร 6ว. กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. 26 หน้า.

สุพินญา บุญมานพ. 2553. พันธุ์ และผลของสารชักนำต่อผลผลิตและปริมาณ puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] และฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการต้านอนุมูลอิสระ. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สุภาณี พิมพ์สมาน, รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา และสังวาล สมบูรณ์. 2546. สารสกัดจากหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช. สืบค้นจาก : http://plantpro.doae.go.th/insectpest_research/A-14-pdf.

สุภาภรณ์ ภัทรสุทธิ, นพรัตน์ หยีดจันทร์ และ ดวงจันทร์ ภูเขียวศักดิ์. 2546ก. การศึกษาส่วนประกอบทางโภชนาการและลักษณะกายภาพบางประการของพืชหัวพื้นเมือง. การประชุมวิชาการ กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2542 เรื่อง ความก้าวหน้าด้านพฤกษศาสตร์สมุนไพร และวัชพืช: 9-10 มีนาคม 2542 : หน้า 17-18.

สุภาภรณ์ ภัทรสุทธิ, นพรัตน์ หยีดจันทร์ และ ดวงจันทร์ ภูเขียวศักดิ์. 2546ข. ศึกษาส่วนประกอบทางโภชนาการและลักษณะทางกายภาพบางประการของหัวและแป้ง จากหัวเท้ายายม่อมที่แปรรูปมาจากหัว 2 ฤดู และ3 ฤดู. การประชุมวิชาการ กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช, กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2546: 7-9 มีนาคม 2546 : หน้า 9-10.

สุภาภรณ์ ภัทรสุทธิ. 2543. เท้ายายม่อม พืชหัวที่น่าสนใจ. ข่าวพฤกษศาสตร์และวัชพืช, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ : หน้า 6-8.

สุมนา นีระ, ปรีชา นีระ และ วชิระ เกตุเพชร. 2548. การขยายพันธุ์สมุนไพรหนอนตายหยากโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *ใน* การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว (ภาคโปสเตอร์) ระหว่างวันที่ 20-22 ตุลาคม 2548, หน้า 289-294.

กรมวิชาการเกษตร

สุรพล นธการกิจกุล. 2556. การพัฒนาห่วงโซ่อุปทานอุตสาหกรรมสมุนไพรไทย เพื่อเตรียมการรวมตัวเป็นประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (ASEAN Economic Community: AEC). วารสารศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 1(2):13-24.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2522. ไม้เทศเมืองไทย : สรรพคุณของยาเทศและยาไทย. โรงพิมพ์กรุงธน, กรุงเทพฯ : หน้า 273-274.

หน่วยบริการทางห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. มปป. เครื่องวิเคราะห์สารด้วยรังสีใกล้คลื่นใต้ สืบค้นจาก http:// cste.sut.ac.th/lsu/index.php?option=com_ content&view=article&id=121:nir&catid=61:2012-05-29-03-31-04 [17 พฤษภาคม 2557]

หน่วยบริการทางห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. มปป. เครื่องวิเคราะห์สารด้วยรังสีใกล้คลื่นใต้ สืบค้นจาก http:// cste.sut.ac.th/lsu/index.php?option=com_content&view=article&id=121:nir&catid=61:2012-05-29-03-31-04 [17 พฤษภาคม 2557]

องค์ความรู้เพื่อการพัฒนาพื้นที่สูงอย่างยั่งยืน. 2559. ถั่วขาว. สืบค้นจาก : http://hkm.hrdi.or.th/knowledge/detail/277 [21 เมษายน 2560]

อนุวัฒน รัตนชัย, จารุวรรณ บางแวก, จารุรัตน พุมประเสริฐ, นฤเทพ เวชภิบาล, ภัควิไล ยอดทอง. มปป.. การประเมินโปรตีนในถั่วเหลืองโดยใชเทคนิค Near Infrared Spectroscopy (Evaluation of Protein Content in Soybean by Using Near Infrared Spectroscopy) สืบค้นจาก www.doa.go.th/pprdo/images/doc/0016.pdf [10 พฤษภาคม 2557]

อภิฤทธิ์ จิตใจงาม. 2551. ผลของสารสกัดจากหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook. F.) ต่อการสืบพันธุ์ของหนูขาวเพศผู้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อรพิน เสละคร. 2557. ผลของ BA และ IBA ต่อการเพิ่มปริมาณหน่อและการออกรากของผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ. ราชภัฏเพชรบูรณ์สาร, 16(1):87-94.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. อติสรรค์, กรุงเทพฯ. 133 น.

อำนวย อิศรางกูร ณ อยุธยา และอรรณพ ตันสกุล. 2535. เกษตรยั่งยืน เกษตรกรรมกับธรรมชาติเครือข่ายเกษตรกรรมทางเลือก. พระโขนง, กรุงเทพฯ.

อำพล ไมตรีเวช. 2548. โครงการวิจัยและพัฒนานโยบายและกลยุทธ์ในการพัฒนา ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในเชิงพาณิชย์. เอกสารประกอบการนำเสนอต่อคณะกรรมการ สภาวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช นำเสนอวันที่ 4 ตุลาคม 2548. สืบค้นจาก: http://www1.nrct.go.th/downloads/041005ampol.pp. [22 มี.ค. 2562]

Agilent Technologies. 2001. Agilent Chemstation (Computer Program). Agilent Technologies, USA. Bourgaud,

Animesh, B., M. A. Bari, M. Roy and S. K. Bhadra. 2011. *In vitro* Propagation of *Stemona tuberosa* Lour. – A Rare Medicinal Plant through High Frequency Shoot Multiplication using Nodal Explants. Plant Tissue Cult. & Biotech. 21(2):151-159.

Anussorn W. and K. Choowongkomon, 2012. Amylase Inhibitors in Plant : Structure, Function and Applications. Functional Plant Science and Biotechnology.Global Science Book.

กรมวิทยาศาสตร์

AOAC Methold. 2002. AACC Report: The definition of dietary fiber: Cereal Food World. 46:112-126.

Baird, M.C., S.G. Pyne, A.T. Ung, W. Lie, T. Sastraruji, A. Jatisatienr, C. Jatisatienr, S. Dheeranupattana, J. Lowlam and S. Boonchalermkit. 2009. Semisynthesis and biological activity of stemofoline alkaloids. Jaurnal of Natural Product. 72:679-684.

Barrett M.L. and J.K. Udani. 2011. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (Phaseolus vulgaris) :A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. Nutrition Journal. 10:24.

Borokini, T.I. and Ayodele, A.E.. 2012. Phytochemical Screening of Tacca leontopetaloides (L.) Kuntze Collected from Four Geographical Locations in Nigeria. International Journal of Modern Botany, 2(4):97-102.

Bown, D. 1995. Encyclopaedia of Herbs and their Uses Dorling Kindersley, London. 424 p.

Chang, C.L., C. S. Lin and G. H. Lai. 2012. Phytochemical Characteristics, Free Radical Scavenging Activities, and Neuroprotection of Five Medicinal Plant Extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2012, Article ID 984295, 8 pages.

Chang, J.. 2000. Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements?. Biochemical Pharmacology. 59:211–219.

Chansuthep, S. 2010. Plumbagin production by hairy root culture of *Plumbago indica* Linn. in Shaked Flasks and in Bioreactor. MS Thesis. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Chen, X., Wang, Z., Yang, Z., Wang, J., Xu, Y., Tan, R.X., et al.. 2011. *Houttuynia cordata* blocks HSV infection through inhibition of NF-kB activation. Antiviral Res. 92:341-345.

Chotikadachanarong, K., S. Dheeranupattana, A. Jatisatienr, S. Wangkarn, P. Mungkornasawakul, S.G. Pyne, T.U. Alison and T. Sastraruji. 2011. Influence of salicylic acid on alkaloid production by root culture of *Stemona curtisii* Hook. F. Journal of Biological Sciences. 3(4): 322-325.

Chung, H. J., Liu, Q., Pauls, K. P., Fan, M. Z. and Yada, R. 2008. In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. Food Res. Int. 41:869–875.

Colon Institute. 2012. “Amylase”. Retrieved April 3, 2017, from http://colon-institute.org/supplements/amylase/

Colon Institute. 2012. รูปโครงสร้างเอนไซม์อะไมเลส. Retrieved April 3, 2017, from http://colon-institute.org/supplements/amylase/

Englyst K.N. and H.N. Englyst. 2005. Carbohydrate bioavailability. Br J Nutr. 94: 1-11

Euromonitor International. 2016. Herbal and traditional products market research. Retrieved March, 2019, from http://www.euromonitor.com/herbal-traditional-products. [.

Flora of Thailand. 2011. Stemonaceae. 11(1):74-99.

Fowler, M.W. 2006. Plants, medicines and man. J. Sci. Food Agric. 86:1797 – 1804.

กรมวิชาการเกษตร

Fu, J., Dai, L., Lin Z. and Lu, H.. 2013. *Houttuynia cordata Thunb.: A review of phytochemistry and pharmacology and quality control*. Chinese Medicine. 4:101-123.

George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology (2nd Edition). Exegetics Ltd., Edington, Wilts., England.

Gondor, O.K., Janda, T., Soós, V., Pál, M., Majláth, I., et al.. 2016. Salicylic Acid Induction of Flavonoid Biosynthesis Pathways in Wheat Varies by Treatment. Front Plant Sci.7:1447.

Good Health (Thailand) Co., Ltd. 2006. คุณประโยชน์ของถั่วเหลือง. Retrieved May 5, 2014, from www.goodhealth.co.th/new_page_28. htm

Gravot, F., A., S. Milesi and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 161:839–851.

Hanhineva R., Torronen I., Bondia P. and et al. 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. International Journal of Molecular Sciences.vol.11 no.4. pp. 1365-1402.

Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A. and Bashir, S. 2014. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54:580–592.

Hung, P.Y., Ho, B.C., Lee, S.Y., Chang, S.Y., Kao, C.L., Lee, S.S., et al.. 2015. *Houttuynia cordata* targets the beginning stage of herpes simplex virus infection. PLoS One., 10: e0115475.

ITDIS. 2010. *Pueraria candollei* var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham. A working list of all plant species, The Plant List. Retrieved , from http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/ild-40424

Janda, T., Gondor, O.K., Yordanova, R., Szalai, G., and Pál, M.. 2014. Salicylicacid and photosynthesis: signaling and effects. Acta Physiol. Plant. 36: 2537–2546.

Jeong, G.T., and D.H. Park. 2005. Comparative evaluation of modified bioreactors for enhancement of growth and secondary metabolite biosynthesis using *Panax ginseng* hairy roots. Biotechnol. Bioproc. Eng. 10:528-534.

Jing, Z. W., Z. S. Ying and Y. Y. Yi. 2011. Analysis of chemical components of volatile oil from *Artemisia lactiflora* Wall in north Guizhou province of China. Medicinal Plant. 2 (6):59 -61.

Jiraporn Palee. 2013. Secondary metabolites production in soilless cultured *Stemona* spp. Doctor of Philosophy in Biology, The graduate school, Chiang Mai University.

Juengwatanatralul, T. 2011. Elicitation effect on production of plumbagin in *in vitro culture* of *Drosera indica* L. Journal of Medicinal Plants Research. 5(19):4949 – 4953.

Khan, M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A., and Khan, N.A.. 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. Front. PlantSci., 6:462.

Klinthong, S., R. Khammanit, S. Phornchirasilp, R. Temsiririrkkul and N. Siriwatanametanon. 2015. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of a Thai traditional formula, Rid-si-duang-ma-ha-kan, for hemorrhoid treatment. Mahidol Univ. J. Pharm. Sci. 42 (3):144-152.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Krauss, B.H. 2000. Native Plants Used As Medicine in Hawaii. Retrieved from http://library.kcc.hawaii.edu/~soma/krauss/pia.html.

Kumar, M., Prasad, S.K., and Hemalatha, S.. 2014. A current update on the phytopharmacological aspects of *Houttuynia cordata* Thunb. Pharmacogn Rev., 8:22-35.

Kummalue, T., Y. U. pratya, U. Lueangamornnara and W. Jiratchariyakul. 2014. A Thai herbal recipe induces apoptosis in T47D human breast cancer cell line. Pharm Sci. Asia. 41 (4):11-17.

Kunchit J., Prapasri P., Nipa R., Anadi N., Piyanut S., and A. Somjai. 2015. Institute of Nutrition, Mahidol University.

Lee, S.J., Jounng Kuk Ahn, Seung Hyun Kim, Jung Tae Kim, Sang Jun Han, Mun Yhung Jung and Ill Min Chung. 2003. Variation in Isoflavone of Soybean Cultivars with Location and Storage Duration. J. Agric. Food Chem., 51(11):3382-3389.

Li, D.L., Zheng, X.L., Duan, L., Deng, S.W., Ye, W., Wang, A.H., Xing, F.W.. 2017. Ethnobotanical survey of herbal tea plants from the traditional markets in Chaoshan, China. J Ethnopharmacol. 205:195-206.

Li, W., K. Koike, Y. Asada, T. Yoshikawa and T. Kikaido. 2005. Rosmarinic acid production by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 80:151 – 155.

Lin, J.P., Yang, J.S., Lin, J.J., Lai, K.C., Lu, H.F., Ma, C.Y., Sai-Chuen Wu, R., Wu, K.C., Chueh, F.S., Gibson Wood, W., Chung, J.G.. 2012. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. Environ. Toxicol. 27(8):480–484.

M. Stam, M. L. Soran, and C. Marutoiu. 2014. Extraction and HPLC Determination of the Ascorbic Acid Content of Three Indigenous Spice Plants. J. Anal. Chem. 69(10):998–1002.

Mala, La'au. 2003. A Garden of Hawaiian Healing Plants. Retrieved from http://hml.org/WWW/garden.html.

Malarz, J., A. Stojakowska and W. Kisiel. 2007. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Chichorium intybus*. Acta Physiol. Plant. 29:127-132.

Mehmetoglu, U. and W. R. Curtis. 1997. Effect of abiotic inducers on sesquiterpene synthesis in hairy root and cell-suspension cultures of *Hyoscyamus muticus*. Appl. Biochem. Biotect. 67:71 – 77.

Montri, N., Ch. Wawrosch, and B Kopp. 2009. In Vitro Propagation of *Stemona tuberosa* Lour., an Antitussive Medicinal Herb. Acta Horticulturae, 812:165-172.

Montri, N., Wawrosch, C. H. and B. Kopp. 2006. Micropropagation of *Stemona curtisii* Hook f., a Thai medicinal plant. Acta Horticulturae, 725:341-345.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

กรมวิทยาศาสตร์

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473 – 479.

Murashige, T. and Skoog, F.. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant. 15:473-497.

Nugboon, K. and K. Intarapichet. 2015. Antioxidant and antibacterial activities of Thai culinary herb and spice extracts, and application in pork meatballs International. Int. Food. Res. J. 22(5):1788-1800.

Pajaree Inthachub. 2008. Taxonomic revision on the family Stemonaceae in Thailand. Master of Science (Botany), Graduate School, Kasetsart University.

Palasuwan, A. and S. Soogarun. 2014. Total antioxidant activity of Thai medicinal plants associated with the treatment of cardiovascular diseases, diabetes and cancers. J. chem. pharm. res. 6(10):27-31.

Panyaphu, K., P. Sirisa-ard, P. N. Ubol, S. Nathakarnkitkul, S. Chansakaow and T. V. On. 2012. Phytochemical antioxidant and antibacterial activities of medicinal plants used in Northern Thailand as postpartum herbal bath recipes by the Mien (Yao) community. Phytopharmacology. 2(1):92-105.

Phetkhong, S., Sumochitraporn, S., and Makkasab, C.. 2010. Surface sterlization study and growth regulators effect in tissue culture of aquatic plant Cryptocoryne albida. In technical paper No.9/2010, Pathumthani: Aquaculture animal genetics Research and Development Institute. (in Thai)

Pilli, R.A. and M.C.F. Ferreira de Oliveira. 2000. Recent progress in the chemistry of the *Stemona* alkaloids. Natural Product Reports. 17:117-127.

Raskin I., D.M. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D.A. Morena, C. Ripoll, N. Yakoby, J. O'Neal, T. Cornwell, I. Pastor and B. Fridlender. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. Trends Biotechnol. 20: 522 – 531.

Rogerio, A.P., Kanashiro, A. and Fontanari, C.. 2007. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma., Inflamm. Res. 56(10):4028.

Saetung, A., A. Itharat, C. Dechsukum, K. Keawpradub, C. Wattanapiromsakul and P. Ratanasuwan. 2005. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 27(Suppl.2):469-478.

Sakthivelu, G., M.K. Akitha Devi, P. Giridhar, T. Rajasekaran, G.A. Ravishankar, M.T. Nikolova, G.B. Angelov, R.M. Todorova and G.P. Kosturkova. 2008. Isoflavone Composition, Phenol Content, and Antioxidant Activity of Soy Bean Seeds from India and Bulgaria. J. Agric. Food Chem. 56(6):2090-2095

Saunders J. W. and E. T. Bingham. 1975. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*, Amer. J. Bot. 62:850-855.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Senawonga, T., S. Khaophaa, S. Misunaa, J. Komaikula, G. Senawonga, P. Wongphakhama and S. Yunchalardd. 2014. Phenolic acid composition and anti cancer activit yagainst human cancer cell lines of the commercially available fermentation products of Houttuynia cordata. ScienceAsia. 40:420-427.

Shimoni, E.. 2003. Stabillity and Shelf Life of Bioactive Compounds during Food Processing and Storage : Soy Isoflavones. Journal of Food Science. 69(6):R160-R166.

Shimura, M., Zhou, Y., Asada, Y., Yoshikawa, T., Hatake, K., Takaku, F., and Ishizaka, Y.. 1999. Inhibition of Vpr-induced cell cycle abnormality by quercetin: a novel strategy for searching compounds targeting Vpr. Biochemical and Biophysical Research Communications. 261(2):308-316.

Simmone A.H., M. Smith, D.B. Weaver, T. Vail, S. Barnes, and C.I. Wei. 2000. Rentention and Changes of Soy Isoflavones and Cartenoids in Immature Soybean Seeds (Edamame) during Processing. J. Agric. Food Chem. 48(12):6061-6069

Singlaw, C., A. Kongbangkerd, K. Promthep and P. Saenpote. 2008. Effect of cytokinins on *In vitro* shoot proliferation of *Stemona tuberose* Lour. NU Science Journal 5(2):221-229.

Sytar, O., Kosyan, A., Taran, N. and Smetanska, I. 2014. Anthocyanin's as marker for selection of buckwheat plants with high rutin content. Gesunde Pflanzen 66:165–169.

Ulrich, K., Stauber, T. and Ewald, D.. 2008. *Paenibacillus*—a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants, Plant Cell Tiss Organ Cult. 93:347–351.

Vu, Q. 2018. Resistant Starch of *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze by Various Treatment Methods. Conference: The 12th SEATUC Symposium-Engineering Education and Research for Sustaninable Development, at Yogyakarta, Indonesia.

Wangchauy, C., and Chanprasert, S.. 2012. Effects of Houttuynia *cordata* Thunb. extract, Isoquercetin and Rutin on cell growth inhibition and apoptotic induction in K562 human leukemic cells. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 4(5):2590-2598.

Worarakkulwong, T. and S. Wongsawadwech. 2012. Antiproliferation and antioxidation activities of *Artemisia vulgaris* var. *indica*. BS Thesis, Mahidol University, Bangkok. (in Thai)

Zhao, J., L.C. Davis and R. Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 23:283 – 333.

Ziaratnia, S.M., K.J. Kunert and N. Lall. 2008. Elicitation of 7-methyljuglone in *Drosera capensis*. S. Arf. J. Bot. 75:97 – 103.

## ภาคผนวก ก
## การทดลองที่ 3

**แบบบันทึกข้อมูลของถั่วพื้นเมืองแบบบันทึกของ IPGRI**

1. สีโคน
   (1) เขียว
   (2) ม่วงอมเขียว
   (3) ม่วง
   (4) อื่น ๆ

2. ลักษณะใบ (วัดเมื่อเจริญเติบโตกิ่งข้อที่ 4)
   (1) Deltoil
   (2) Ovate
   (3) Acute
   (4) Ovate-lanceolate (วัดเมื่อการเจริญเติบโตข้อที่ 4)
   (5) Cuneate
   (6) Cobed
   (7) อื่น ๆ

3. ความยาวก้านใบ (วัดเมื่อการเจริญเติบโตข้อที่ 4)
   (1) สั้น (<12 เซนติเมตร)
   (2) ปานกลาง (<12-18 เซนติเมตร)
   (3) ยาว (>18 เซนติเมตร)

4. ความยาวก้านใบย่อย วัดจากใบกลาง (วัดเมื่อการเจริญเติบโตข้อที่ 4)
   (1) เล็ก (<10 เซนติเมตร)
   (2) กลาง(10-13 เซนติเมตร)
   (3) ใหญ่ (>13 เซนติเมตร)

5. ขนใบที่ใบ (วัดเมื่อการเจริญเติบโตข้อที่ 4)
   (1) ใบเรียบไม่มีขน
   (2) ใบมีขน

6. การแตกกิ่ง
   (1) ไม่แตกกิ่ง
   (2) แตกกิ่งน้อย (1-2 กิ่ง)
   (3) แตกกิ่งปานกลาง (3-5 กิ่ง)
   (4) หนาแน่นน้อย (6-8 กิ่ง)
   (5) ประปราย (>8 กิ่ง)

7. ความหนาแน่นทรงพุ่ม
   (1) หนาแน่น
   (2) ค่อนข้างหนาแน่น
   (3) หนาแน่นปานกลาง
   (4) หนาแน่นน้อย

8. ลักษณะการเจริญเติบโต
   (1) ไม่ทอดยอด
      (1.1) ไม่มีเถา
      (1.2) เถาสั้น
      (1.3) เถายาว

ศรีวิชาการเกษตร

(5) ประปราย

9. รูปแบบการเจริญเติบโต
   (1) ขึ้นตรง
   (2) แผ่กระจายด้านข้าง
   (3) เลื้อยไปตามพื้น

11. ลักษณะการแตกกิ่ง
   (1) ใกล้โคนต้น
   (2) โคนต้นถึงกึ่งกลางต้น
   (3) กลางต้น
   (4) กลางต้นอยู่ข้างบน
   (5) ส่วนใหญ่อยู่ข้างบน

13. การเรียงตัวของกิ่ง
   (1) ตรง
   (2) สลับ

15. สีกลีบดอก
   (1) เหลืองอ่อน
   (2) เหลืองเข้ม
   (3) เขียวอมเหลือง
   (4) อื่น ๆ

17. สีใบ
   (1) เขียวอ่อน
   (2) เขียวเข้ม
   (3) อื่น ๆ

19. ความยาวก้านดอก
   (1) สั้น (<14 เซนติเมตร)
   (2) ปานกลาง (14-18 เซนติเมตร)
   (3) ยาว (>18 เซนติเมตร)

21. ลักษณะฝักแก่
   (1) ค่อนข้างแบน
   (2) กลม

23. สีฝักสด
   (1) เขียว
   (2) เขียวอ่อน

   (2) กึ่งทอดยอด
   (3) เลื้อยพันค้างมีการแตกกิ่งตั้งแต่โคนต้น
   (4) ทอดยอด

10. การทนทานต่อการล้ม
   (1) ล้มง่ายมาก
   (2) ค่อนข้างล้ม
   (3) ล้มปานกลาง
   (4) ไม่ค่อยล้ม
   (5) ต้านทานการล้ม

12. ประเภทของพืช
   (1) ฤดูเดียว
   (2) ข้ามฤดู
   (3) ยืนต้น

14. ตำแหน่งช่อดอก
   (1) เหนือทรงพุ่ม
   (2) เหนือและใต้ทรงพุ่ม
   (3) ใต้ทรงพุ่ม

16. สีกลีบเลี้ยง
   (1) เขียว
   (2) ม่วงอมเขียว
   (3) อื่น ๆ

18. สีก้านใบ
   (1) เขียว
   (2) ม่วงอมเขียว
   (3) ม่วง
   (4) ม่วงเข้ม

20. ขนที่ฝัก (บันทึกเมื่อฝักเริ่มเปลี่ยนสี)
   (1) น้อย
   (2) ปานกลาง
   (3) มาก

22. ความสูงของฝัก
   (1) ใต้ทรงพุ่มทั้งหมด
   (2) ใต้ทรงพุ่มมากกว่าเหนือทรงพุ่ม
   (3) เหนือและใต้ทรงพุ่ม
   (4) เหนือทรงพุ่มมากกว่าใต้ทรงพุ่ม
   (5) เหนือทรงพุ่มทั้งหมด

24. สีฝักแห้ง
   (1) น้ำตาล
   (2) น้ำตาลอ่อน

กรมวิชาการเกษตร

(3) เขียวเข้ม
(4) ม่วง

25. จำนวนฝักต่อช่อ
(1) ความยาวฝักสด
(2) ความยาวฝักแห้ง
(3) ความกว้างฝักสด
(4) ความกว้างฝักแห้ง

27. เนื้อผิวของเปลือกฝัก
(1) หยาบ
(2) ค่อนข้างหยาบ
(3) ปานกลาง
(4) ค่อนข้างเรียบ
(5) เรียบ

29. การเหยียดตรงของฝัก
(1) โค้ง
(2) ค่อนข้างโค้ง
(3) ปานกลาง
(4) ค่อนข้างตรง
(5) เหยียดตรง

31. การมีขน (ดูจากลำต้น ใบ และ ฝัก)
(1) หนาแน่นมาก
(2) ค่อนข้างมาก
(3) ปานกลาง
(4) น้อย
(5) ไม่มีขน

33. ช่วงเวลาการติดฝัก (ดูจากการติดฝักแรกจนถึงติดฝักสุดท้าย)
(1) สั้น
(2) ค่อนข้างสั้น
(3) ปานกลาง
(4) ยาว
(5) ยาวมาก

35. ระยะระหว่างเมล็ด
(1) ห่าง
(2) ค่อนข้างห่าง
(3) ปานกลาง
(4) ค่อนข้างติดกัน
(5) ติดกัน

37. ความสม่ำเสมอของฝัก (ดูจากขนาดรูปร่างและสีฝัก)
(1) ไม่สม่ำเสมอ
(3) น้ำตาลเข้ม
(4) ม่วง
(5) ดำ

26. ความมันของผิวเปลือกฝัก
(1) มันมาก
(2) ค่อนข้างมัน
(3) กึ่งด้านกึ่งมัน
(4) ค่อนข้างด้าน
(5) ด้าน

28. การมีฝักดก
(1) ไม่ดก
(2) ดกน้อย
(3) ดกปานกลาง
(4) ค่อนข้างดก
(5) ดกมาก

30. คุณภาพของฝัก
(1) ไม่ดี
(2) ค่อนข้างไม่ดี
(3) ปานกลาง
(4) ดี
(5) ดีมาก

32. ความหนาของเปลือกฝัก
(1) บาง
(2) ค่อนข้างบาง
(3) ปานกลาง
(4) ค่อนข้างหนา
(5) หนา

34. รูปร่างตัดขวางของฝัก
(1) แบน
(2) ค่อนข้างกลม
(3) กลม
(4) อื่น ๆ

36. การยื่นยาวของปีกฝัก
(1) ยื่นมาก
(2) ยื่นค่อนข้างมาก
(3) ยื่นปานกลาง
(4) ยื่นค่อนข้างน้อย
(5) ยื่นน้อยมาก

38. คะแนนคุณภาพการบริโภค
(1) ไม่ชอบ

กรมวิชาการเกษตร

(2) สม่ำเสมอน้อย
(3) สม่ำเสมอปานกลาง
(4) สม่ำเสมอดี
(5) สม่ำเสมอดีมาก

(2) ชอบน้อย
(3) ชอบปานกลาง
(4) ชอบค่อนข้างมาก
(5) ชอบมาก

39. รูปร่างเมล็ด
(1) กลม
(2) แบน
(3) รูปไข่
(4) รี

กรมวิชาการเกษตร

## ภาคผนวก ข
## การทดลองที่ 4

**ตารางภาคผนวกที่ 2.4.1** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยอดเฉลี่ยหนอนตายหยาก *Stemona tuberosa* Lour. จากการทดลองชักนำให้เกิดยอดในสภาพปลอดเชื้อ

| Sum of Variation | df | SS | MS | F-Value | Pr>F |
|---|---|---|---|---|---|
| ทรีทเม้นต์ | 9 | 21.6800 | 2.40889 | 5.47 | ** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Error | 40 | 17.6000 | 0.44000 | |
| Total | 49 | 39.2800 | | |
| CV = 35.3% | | | | |

** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

หมายเหตุ ทรีทเม้นต์ที่ 5 7 และ 8 ไม่มีความแปรปรวนของผลการทดลอง

**ตารางภาคผนวกที่ 2.4.2** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยอดเฉลี่ยหนอนตายหยาก *Stemona collinsiae* Craib. จากการทดลองชักนำให้เกิดยอดในสภาพปลอดเชื้อ

| Sum of Variation | df | SS | MS | F-Value | Pr>F |
|---|---|---|---|---|---|
| ทรีทเม้นต์ | 11 | 15.9698 | 1.45180 | 2.82 | ** |
| Error | 48 | 24.7520 | 0.51567 | | |
| Total | 59 | 40.7218 | | | |
| CV = 34.6% | | | | | |

** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

หมายเหตุ ทรีทเม้นต์ที่ 7 ไม่มีความแปรปรวนของผลการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร