สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มคุณภาพต้นพันธุ์หนอนตายหยากเพื่อการผลิตสารอัลคาลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : การคัดเลือกโคลนที่ให้ผลผลิตรากสูง และผลของอะไบโอติกอิลิซิเตอร์บางชนิดต่อการสะสมสารอัลคาลอยด์ของรากในสภาพปลอดเชื้อ

(Quality enhancement of *Stemona curtisii* Hook. f. plantlets for alkaloid production through tissue culture : Clonal selection for high yield production of root and effect of some abiotic elicitors on total alkaloids accumulation of root *in vitro*.)

ผู้วิจัย

นางสาวนาตยา มนตรี
นายเฉลิมพล สุวรรณภักดี
นางสาวศศิดารา เจริญศิริ
นางสาวจินดา สุดวัดแก้ว

RCH
ท494
2553
เลขหมู่........................
เลขทะเบียน.......141506
วัน.เดือน.ปี.....16 มี.ค. 2559

.b.......12757019
.i..............................

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณประจำปี 2553

วิทยาเขตชุมพร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการวิจัย การเพิ่มคุณภาพต้นพันธุ์หนอนตายหยากเพื่อการผลิตสารอัลคาลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : การคัดเลือกโคลนที่ให้ผลผลิตรากสูงและผลของอะไบโอติกอิลิซิเตอร์บางชนิดต่อการสะสมสารอัลคาลอยด์ของรากในสภาพปลอดเชื้อ

แหล่งเงิน เงินงบประมาณประจำปี
ประจำปีงบประมาณ 2554 **จำนวนเงินที่ได้รับสนับสนุน** 847,000 บาท
ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี 11 เดือน **ตั้งแต่** 1 ตุลาคม 2553 ถึง 1 สิงหาคม 2555

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย และหน่วยงานสังกัด
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นาตยา มนตรี
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาการเพิ่มคุณภาพต้นพันธุ์หนอนตายหยาก เพื่อการผลิตสารอัลคาลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยคัดเลือกโคลนที่ให้ผลผลิตรากสูง จากการนำโคลนหนอนตายหยากจำนวน 5 โคลน ได้แก่ NM04 NM05 NM09 NM10 และ NM 19 มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 2 เดือน บันทึก จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และการเกิดปฏิกิริยากับสาร dragendorff's reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV spectroscopy ผลการทดลองพบว่า โคลน NM04 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุด คือ 2.67 ราก และที่ความเข้มข้นของ IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากมากที่สุด คือ 0.28 เซนติเมตร รากหนอนตายหยากทุกโคลน มีการสะสมสารอัลคาลอดย์ได้ในสภาพปลอดเชื้อ และโคลน NM19 มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารอัลคาลอยด์มากที่สุดที่ 11.151 เปอร์เซ็นต์

ส่วนการศึกษาผลของอะไบโอติกอิลิซิเตอร์บางชนิด ได้แก่ ethephon methyl jasmonate abscisic acid และแคลเซียมไอออนในรูปของแคลเซี่ยมคลอไรด์ ต่อการเกิดรากและการสะสมสารอัลคาลอยด์ของรากในสภาพปลอดเชื้อ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า การแช่ ethephon ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีจำนวนรากมาที่สุดที่ 5.80 ราก และมีน้ำหนักแห้งมากที่สุด ที่ 0.08 กรัม ส่วนการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีความยาวรากมากที่สุด ที่ 5.00 เซนติเมตร และมีน้ำหนักสดมากที่สุด ที่ 0.67 กรัม ส่วนการแช่ methyl jasmonate และ abscisic acid ที่ความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อจำนวนรากความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง และการแช่แคลเซียมคอลไรด์ จำนวนรากไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลา ความยาวรากมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่ต้นกล้าที่ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้งมากและ ความยาวรากมากที่สุด ที่ 0.129 กรัม และ3.68 เซนติเมตร ตามลำดับ

รากหนอนตายหยากจากที่ได้รับอิลิซิเตอร์ทุกชนิดและทุกทรีทเมนท์มีการสะสมสารอัลคาลอยด์รวม โดยการแช่สาร ethephon ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม

ของสารมากที่สุดที่ 20.045 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม การแช่สาร methyl jasmonate ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 13.815 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม ส่วนการแช่สาร abscissic acid ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 21.008 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม และการแช่สารแคลเซี่ยมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 20.045 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

วิจัยครั้งนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากเงินงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2553 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเม อรัญนารถ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา วัชโรทัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาอันเป็นประโยชน์ต่อการทำการวิจัย และขอบคุณ คุณสุกัญญา แสนภักดี นักวิจัย และคุณสุจินดา สว่างพิทักษ์ นักศึกษาช่วยวิจัย ที่ได้ช่วยในการเก็บข้อมูลงานวิจัย

นางสาวนาตยา มนตรี
นายเฉลิมพล สุวรรณภักดี
นางสาวศศิดารา เจริญศิริ
นางสาวจินดา สุดวัดแก้ว
สิงหาคม 2555

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค
กิตติกรรมประกาศ จ
สารบัญ ช
สารบัญตาราง ฉ
สารบัญภาพ ซ
สารบัญภาคผนวก ฌ

บทที่1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตการวิจัย 3
1.4 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวความคิดในการวิจัย 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 14
บทที่ 4 ผลการวิจัย 18
บทที่ 5 วิจารณ์ผล 33
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย 37
บทที่ 7 เอกสารอ้างอิง 39
ภาคผนวก 42
ประวัตินักวิจัย 53

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ผลของการใช้ elicitors ต่อชนิดของ receptors และการสังเคราะห์ทุติยภูมิในพืชสมุนไพรบางชนิด 12

2 ความสูงต้น จำนวนยอด จำนวนข้อ และจำนวนกิ่งแขนงของโคลนหนอนตายหยาก (NM04 NM05 NM09 NM10 และ NM19) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน 19

3 จำนวนใบที่กางเต็มที่ จำนวนราก และ ความยาวราก ของโคลนหนอนตายหยาก (NM04 NM05 NM09 NM10 และ NM19) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน 20

4 การเกิดปฏิกิริยากับสาร dragendorff's reagent และ ปริมาณ total stemona alkaloids ในโคลนของรากหนอนตายหยาก รหัส NM04 NM05 NM09 NM 10 และ NM 19 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอดเป็นเวลา 2 เดือน 23

5 จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของราก ที่ได้จากการนำต้นกล้าของหนอนตายหยากไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม ethylene ในรูปของ ethephon ความเข้มข้น 0 2 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 2 เดือน 25

6 จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของราก ที่ได้จากการนำต้นกล้าของหนอนตายหยากไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Methyl Jasmonate (MeJA) ความเข้มข้น 0 2 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 2 เดือน 27

7 จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของราก ที่ได้จากการนำต้นกล้าของหนอนตายหยากไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Abscissic acid (ABA) ความเข้มข้น 0 2 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 2 เดือน 3129

8 จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของราก ที่ได้จากการนำต้นกล้าของหนอนตายหยากไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Ca^{2+} ในรูปของ $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0 2 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 2 เดือน 31

9 ปริมาณ Stemona Alkaloids รวมจากสารสกัดอย่างหยาบด้วยเมธานอลจากรากของหนอนตายหยากที่นำต้นกล้าไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม Abscissic acid (ABA) Methyl-Jasmonate (Me-JA) Ethelyne (Ethephon) และ Ca^{2+} ($CaCl_2$) ในความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แล้วย้ายลงไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน 32

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 ราก และดอกของหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.) 5
2 วิถีการสังเคราะห์ อัลคาลอยด์ผ่าน acetyl-CoA, shikimic acid, mevalonic acid และ amino acid 5
3 โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์ที่พบในพืชสกุล *stemona* 6
4 โครงสร้างทางเคมีของสาออกฤทธิ์ใน *S. Curtisii* Hook f. 7
5 การตอบสนองของพืชต่อ elicitors ต่าง ๆ 12
6 การเจริญเติบโตของหนอนตายหยากชุดโคลน รหัส NM01 NM04 NM05 NM09 และ NM19 ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ระดับความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน 21

สารบัญตารางผนวก

ตาราง ผนวกที่		หน้า
1	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากจำนวน 5 โคลน ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	42
2	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน จำนวนรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	42
3	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ความยาวรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	43
4	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักสดรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	43
5	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักแห้งของรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	44
6	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน จำนวนรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	44
7	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ความยาวรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	45
8	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักสดรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	45
9	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักแห้งรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	46
10	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน จำนวนรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	46
11	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ความยาวรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	47

สารบัญตารางผนวก

ตาราง ผนวกที่		หน้า
12	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักสดรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	47
13	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักแห้งรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	48
14	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน จำนวนรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	48
15	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ความยาวรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	49
16	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักสดรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	49
17	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักแห้งรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	50
18	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	50
19	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	51
20	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	51
21	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน	52

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารเคมีการเกษตร ที่ถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นสูง สารฆ่าแมลงยังเป็นที่นิยมใช้ในหมู่เกษตรกร เพราะสามารถใช้แก้ปัญหาการระบาดทำลายของแมลงศัตรูได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ใช้ได้ง่ายและหาซื้อได้ทั่วไป การใช้สารฆ่าแมลงของเกษตรกรจึงเป็นไปในลักษณะที่ไม่มีการคำนึงถึงต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้น ไม่คำนึงถึงผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ใช้และผู้บริโภค ตลอดจนผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นสาเหตุหนึ่งในการทำให้เกิดภาวะโลกร้อน ซึ่งในปัจจุบันการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ได้ให้ความสนใจและมุ่งเน้นที่จะใช้สารที่มีพิษต่ำต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการบริหารจัดการที่ถูกต้องและเหมาะสมกับสถานการณ์ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ปลอดภัยต่อการบริโภคซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาด การใช้สารจากพืชที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดแมลงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาพัฒนาใช้ทดแทนสารเคมีที่มีพิษสูง จากภูมิปัญญาท้องถิ่นมีการนำสมุนไพรหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชได้ดี

หนอนตายหยากเป็นพืชสมุนไพรชนิดในสกุล *Stemona* วงศ์ Stemonaceae (ภาควิชาพฤกษศาสตร์, 2535) มีการนำมาใช้ประโยชน์หลากหลายทั้งทางการแพทย์และการเกษตร เช่น การนำมาใช้เป็นสมุนไพรแก้ไอ ขับเสมหะ ขับลม ฆ่าพยาธิ การกำจัดศัตรูพืช (เลาจนา และประคอง, 2520) กำจัดเห็บ หมัด และไร ในฟาร์มปศุสัตว์ (ทวีศักดิ์, 2542) จากประโยชน์ดังกล่าวทำให้ปัจจุบันนี้มีการนำสารสกัดจากรากหนอนตายหยากมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะด้านการเกษตรซึ่งเป็นทางเลือกของเกษตรกรในการนำมาใช้ควบคุมศัตรูพืชแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลผลิตทางการเกษตรที่มีความปลอดภัยจากสารเคมีตกค้าง ได้คุณภาพมาตรฐานเป็นที่ยอมรับของตลาดทั้งในและต่างประเทศ อย่างไรก็ตามในการใช้ประโยชน์จากพืชสกุล *Stemona* นั้นบางครั้งเกิดความสับสนเนื่องจากพืชในสกุลนี้ทุกชนิดมีชื่อเรียกว่าหนอนตายหยาก แต่ละชนิดมีสารสำคัญแตกต่างกัน สำหรับ *Stemona curtisii* Hook.f. เป็นหนอนตายหยากชนิดที่มีแหล่งกำเนิดที่ ต.ชุมโค อ.ปะทิว จ.ชุมพร พบมากบริเวณป่าชายหาดติดกับทะเลฝั่งอ่าวไทย เจริญได้ดีในดินทราย ปัจจุบันมีปริมาณลดลง เนื่องจากมีการใช้พื้นที่เพื่อการเกษตร ปลูกสร้างที่อยู่อาศัย และการเสียพื้นที่บริเวณชายฝั่งเนื่องจากการถูกกัดเซาะจากน้ำทะเล ประการสำคัญพบว่า มีการขุดรากจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในการทำสารสกัดอย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการปลูกทดแทน เนื่องจากมีรายงานการวิจัยพบสารที่มีฤทธิ์ป้องกันกำจัดแมลงและเชื้อราสาเหตุโรคพืชใน *S. curtisii* ได้แก่ stemofoline, stemocurtisin และ stemocurtisinol (Kaltenegger *et al.*, 2003) ซึ่งทำให้น่าเป็นห่วงว่าหากมีการนำหนอนตายหยากมาใช้ โดยไม่ระมัดระวังและไม่มีมาตรการควบคุมนั้น จะก่อให้เกิดปัญหาการสูญเสียทรัพยากร ธรรมชาติของประเทศได้ในอนาคต

จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัย (Montri, 2006) พบว่ามีความเป็นไปได้ในการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยากมาใช้ในการผลิตต้นพันธุ์เชิงการค้า และเมื่อนำส่วนของรากมาสกัดสารอัลคาลอยด์ พบว่า รากจากต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีการผลิตสารอัลคาลอยด์ได้เช่นเดียวกับต้นหนอนตายหยากที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณชายทะเลฝั่งอ่าวไทยของจังหวัดชุมพร ดังนั้นหากมีการคัดเลือด clone ที่ให้ผลผลิตของรากสูง เพื่อนำมาใช้ในการปลูกเพื่อการผลิตสาร

อัลคาลอยด์ ตลอดจนการสกัดสารอัลคาลอยด์จากรากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อโดยตรงนั้น น่าจะเป็นวิธีหนึ่งในการแก้ปัญหาขาดแคลนต้นพันธุ์และเพิ่มคุณภาพของต้นพันธุ์ที่มีการสะสมสารสำคัญที่ต้องการและปลอดจากเชื้อ นอกจากนี้และการศึกษาความเป็นไปได้ในการของการให้ abiotic elicitor บางชนิด ที่มีผลต่อการการชักนำให้เกิดความเครียด และมีผลต่อสารตั้งต้นและวิถีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืช ได้แก่ Ethylene, Jasmonic acid, ABA, Ca^{2+} (Zhao et.al. 2005) ต่อการชักนำสารอัลคาลอยด์ให้ได้ปริมาณมาก เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาปรับปรุงการผลิตสารสารอัลคาลอยด์จากรากในสภาพปลอดเชื้อโดยการกระตุ้นจากการให้สารต่าง ๆ ในเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำไปใช้ต่อยอดในการศึกษาผลของสารดังกล่าวที่ทำหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สารอัลคาลอยด์แต่ละชนิด ตลอดจนการศึกษาบทบาทของสารต่าง ๆ ต่อวิถีการสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องต่อไปได้ เพื่อนำไปเพิ่มการผลิตหนอนตายหยากที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ โดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม และทดแทนการใช้สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ลดการนำเข้าสารเคมีและอนุรักษ์หนอนตายหยากในสภาพธรรมชาติ โดยไม่ต้องไปรบกวนหรือทำลายนิเวศน์ซึ่งเป็นแหล่งที่หนอนตายหยากอยู่ตามธรรมชาติต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริ ตามโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริ โดย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2. เพื่อศึกษาและคัดเลือก clone ของหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.) ที่มีศักยภาพการผลิตรากได้ปริมาณมาก และผลิตวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพ ปลอดเชื้อ และได้ตรงความต้องการของตลาดทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

3. เพื่อศึกษาผลของการให้สารต่าง ๆ ได้แก่ Ethylene, Jasmonic acid, ABA และ สาร Ca^{2+} ต่อปริมาณสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ

4. เพื่อนำไปสู่การวิจัยเพื่อพัฒนาพันธุ์ ตลอดจนการผลิตต้นกล้าหนอนตายหยากที่มีสารอัลคาลอยด์สูงเชิง ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รองรับอุตสาหกรรมการผลิตสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช และลดการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อไป

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษา clone ของหนอนตายหยากที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตเชิงอุตสหากรรม โดยดูอัตราการผลิตราก ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการสร้างสารอัลคาลอยด์ เพื่อนำ clone นี้ไปใช้ในการผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อและมีมาตรฐานเดียวกันในปริมาณมากเพื่อรองรับการผลิตสารสกัดในระดับอุตสาหกรรมของหนอนตายหยาก *S. curtisii* และทำการศึกษาผลของ abiotic elicitors ที่เป็น signal ของการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ และศึกษาเปรียบเทียบผลของสารเหล่านี้ได้แก่ Ethylene รูปของ Ethephon, Jasmonic acid รูปของ Methyl Jasmonate (MeJA), Abscissic acid (ABA), Ca^{2+} รูปของ Calcium chloride ($CaCl_2$) ต่อปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวม เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ชักนำให้เกิดการสะสมสารอัลคาลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อต่อไป

1.4 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวความคิดในการวิจัย

จากปัญหาการกีดกันทางการค้า ทำให้ประเทศไทยประสบประสบปัญหาในการส่งผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เนื่องจากการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม และการปนเปื้อนของสารเคมีในสินค้าเกษตร ทำให้มีการศึกษาวิจัยหาพืชที่มีศักยภาพในการนำมาสกัดสารทุติยภูมิเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อใช้แทนสารเคมีอันตรายต่าง ๆ ลดการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ และช่วยลดภาวะโลกร้อนจากการใช้สารเคมีทางการเกษตร จากการวิจัยของนักวิจัยไทย พบว่ามีสมุนไพรหลายชนิดที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยหนอนตายหยากเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งศัตรูพืชที่สำคัญ โดยมีการนำส่วนของรากไปใช้ประโยชน์ในการสกัดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชดังกล่าว อย่างไรก็ตามการขาดแคลนวัตถุดิบทำให้ไม่สามารถผลิตสารสกัดในเชิงพาณิชย์และอุตสาหกรรมได้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ารากของหนอนตายหยากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสารอัลคาลอยด์ได้เช่นเดียวกับต้นที่เก็บจากธรรมชาติ ดังนั้นการศึกษา clone ที่มีศักยภาพในการผลิตรากปริมาณมากในสภาพปลอดเชื้อ น่าจะเป็นแนวทางในการนำรากมาสกัดสารได้โดยตรง รวมถึงการนำไปผลิตเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารสำคัญต่อไป นอกจากนี้อัลคาลอยด์เป็นสารทุติยภูมิที่ได้จากการสังเคราะห์ของพืชเมื่อเกิดความเครียด ทั้งจากปัจจัยที่เป็น abiotic และ biotic factor โดยปัจจุบันได้มีการประยุกต์เอาปัจจัยต่างๆ มาใช้เป็น elicitors ในการปรับปรุงปริมาณของสารทุติยภูมิในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นการให้ elicitors ต่าง ๆ โดยเฉพาะสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับส่งสัญญาณในสภาวะที่เกิดความเครียด เช่น Ca^{2+} และ Jasmonic acid (JA) หรือ Methyl Jasmonic acid (MeJA), abcissic acid (ABA) และ ethylene อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการช่วยปรับปรุงปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากของหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ นำไปสู่การนำรากไปสกัดสารอัลคาลอยด์โดยตรงโดยไม่ต้องปลูกเลี้ยงหรือทำลายธรรมชาติ และรองรับอุตสาหกรรมของการผลิตสารสกัดเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อไปได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. หนอนตายหยาก

หนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Stemonaceae **มีลักษณะเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี** มีเหง้าหรือหัวอยู่ใต้ดิน ลำต้นเหนือดินตั้งตรงหรือเลื้อย ใบเลี้ยงเดี่ยว เรียงสลับหรืออยู่ตรงข้ามกันเป็นคู่หรือเป็นวงรอบข้อ เส้นใบหลายเส้น ออกจากโคนใบขนานกันไปตามความยาวของแผ่นใบ ดอกออกเป็นดอกเดี่ยวหรือออกเป็นช่อสั้น ๆ ตามซอกใบ มีกลีบ 4 กลีบ เรียงกัน 2 วง เกสรตัวผู้ 4 อัน ก้านเกสรตัวผู้สั้นมาก เกสรตัวเมีย 1 อัน รังไข่อยู่เหนือชั้นต่าง ๆ ของดอก ผลเป็นแบบผลแห้งแก่แล้วแตก (ภาควิชาพฤกษศาสตร์, 2535) พืชสกุล *Stemona* มีอยู่ประมาณ 30 ชนิด มีหลายชนิดที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Stemona aphylla* Craib, *Stemona burkillii* Prain, *Stemona collinsae* Craib, *Stemona curtisii* Hook. f., *Stemona griffithiana* Kurz, *Stemona kerrii* Craib, *Stemona phyllantha* Gangep. และ *Stemona tuberosa* Lour. (ณุฉัตรา, 2528) ปัจจุบันประเทศสวิตเซอร์แลนด์ได้สั่งซื้อผลิตภัณฑ์ของหนอนตายหยากจากประเทศไทยเดือนละประมาณ 3,000-4,000 ลิตร เพื่อนำไปฉีดพ่นฆ่าเห็บ หมัด ไรและแมลงศัตรูอื่น ๆ ในฟาร์มปศุสัตว์ (ทวีศักดิ์, 2542)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ หนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook f.)

ลำต้น (Stem) ต้นที่เกิดใหม่เหนือพื้นดิน จะมีข้อปล้องเถากลมเล็กเรียวสีเขียวพาดพันต้นไม้อื่นเห็นได้ชัดเป็นไม้พุ่มลำต้นเดี่ยวเลื้อยยาวได้สูงถึงประมาณ 4 เมตร บริเวณลำต้นมีการแตกแขนงประมาณ 2-3 แขนง บริเวณแขนงจะเกิดดอกยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร

หัว (Rhizome) มีลักษณะเป็นพวงคล้ายกระชายเป็นช่อยาว เมื่อเจริญเต็มที่จะมีความยาว 20-25 เซนติเมตร (วิชัย, 2546) (ภาพที่ 1 ก)

ดอก (Flower) ดอกคล้ายช่อออกที่ซอกใบ ดอกย่อย 2-6 ดอก ก้านช่อดอกยาว 2-8 เซนติเมตร ใบประดับยาว 5-15 มิลลิเมตร กลีบดอกรวม 4 กลีบ เรียงเป็น 2 วง ๆ ละ 2 กลีบ กลีบดอกสีเขียวแกมเหลืองมีแถบสีม่วงปลายสีเขียว ด้านในสีม่วงปลายสีเขียว มีแถบสีแดงเข้ม กว้าง 4-41 มิลลิเมตร ยาว 25-50 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้สีม่วง ยาว 25-40 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1 ข)

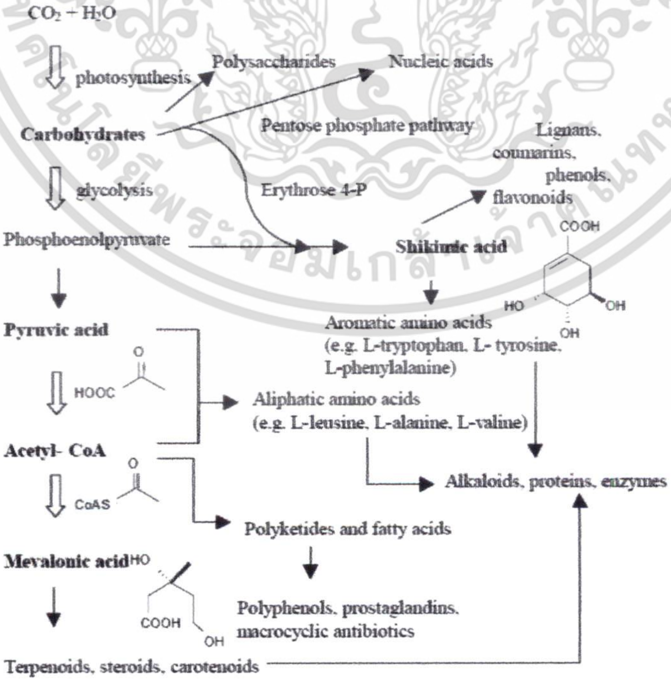
ใบ (Leaves) ใบเดี่ยวเรียวตรงข้ามบริเวณปลายยอดมักเรียวสลับ ผิวใบขอบเรียบสีเขียวเข้มรูปไข่หรือกว้าง 3-14 เซนติเมตร ยาว 9-19.5 เซนติเมตร โคนใบรูปหัวใจ ปลายใบเรียวแหลมเส้นใบ 9-13 เส้น ก้านใบยาว 1.5-7 เซนติเมตร (วิชัย, 2546)

ฝักและเมล็ด (Fruit and Seeds) ผลแตกได้รูปกระสวย สีเขียวห้อยลงกว้าง 15-20 มิลลิเมตร มีเมล็ด 10-20 เมล็ด สีน้ำตาลยาว 9-17 มิลลิเมตร ที่ขั้วมีเยื่อสีขาวคล้ายนิ้วมือ ฝักเล็กปลายแหลม (วิชัย, 2546)

ภาพที่ 1 ราก (ก) และดอก (ข) ของหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.)

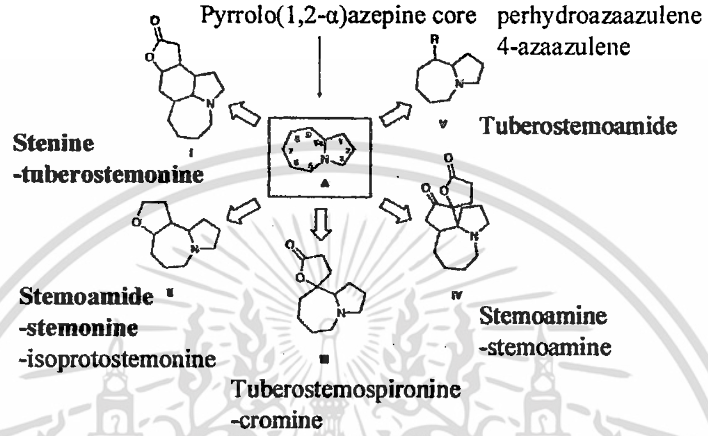
2 อัลคาลอยด์ (Alkaloid) และ Stemona alkaloids

อัลคาลอยด์ เป็นสารอินทรีย์ ที่มีไนโตรเจน เป็นส่วนประกอบ (Organic Nitrogen Compound) มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกัน ปัจจุบันพบแอลคาลอยด์มากกว่า 5,000 ชนิด ซึ่งคุณสมบัติส่วนใหญ่ ของแอลคาลอยด์ คือมีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ (Organic Solvent) มีฤทธิ์เป็นด่าง และมีการนำเอาแอลคาลอยด์มาใช้ประโยชน์หลากหลาย มีการนำมาใช้รักษาโรคต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผล ในกระเพาะ และลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุม การเต้นของหัวใจ นอกจากประโยชน์ทางด้านการแพทย์ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรอื่น ๆ เช่น ใช้เป็นยาป้องกันกำจัดแมลงและเชื้อราศัตรูพืช (สมพร, 2542) โดยอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่สังเคราะห์ผ่าน acetyl-CoA, shikimic acid, mevalonic acid และ amino acid (ภาพที่ 2)


CO2 + H2O
photosynthesis
Polysaccharides
Nucleic acids
Carbohydrates
Pentose phosphate pathway
Lignans, coumarins, phenols, flavonoids
glycolysis
Erythrose 4-P
Phosphoenolpyruvate
Shikimic acid
COOH
HO
OH
OH
Aromatic amino acids (e.g. L-tryptophan, L- tyrosine, L-phenylalanine)
Pyruvic acid
O
HOOC
Aliphatic amino acids (e.g. L-leusine, L-alanine, L-valine)
Acetyl- CoA
O
CoAS
Alkaloids, proteins, enzymes
Polyketides and fatty acids
Mevalonic acid
HO
COOH
OH
Polyphenols, prostaglandins, macrocyclic antibiotics
Terpenoids, steroids, carotenoids

ภาพที่ 2 วิถีการสังเคราะห์ อัลคาลอยด์ผ่าน acetyl-CoA, shikimic acid, mevalonic acid และ amino acid (Dewick, 1997)

สารอัลคาลอยด์ในสกุล Stemona จำแนกตามโครงสร้างหลักของสาร ซึ่งประกอบด้วย Pyrrolo(1,2-α)azepine และ perhydroazaazulene 4-azaazulene โดยแบ่งสารออกเป็น 5 กลุ่มหลักใหญ่ ๆ คือ Stenine ได้แก่ tuberostemonine, Stemoamide ได้แก่ stemonine และ isoprotostemonine, Tuberostemospironine ได้แก่ cromine, Stemoamine ได้แก่ stemoamine และ Tuberostemoamide (ภาพที่ 3)

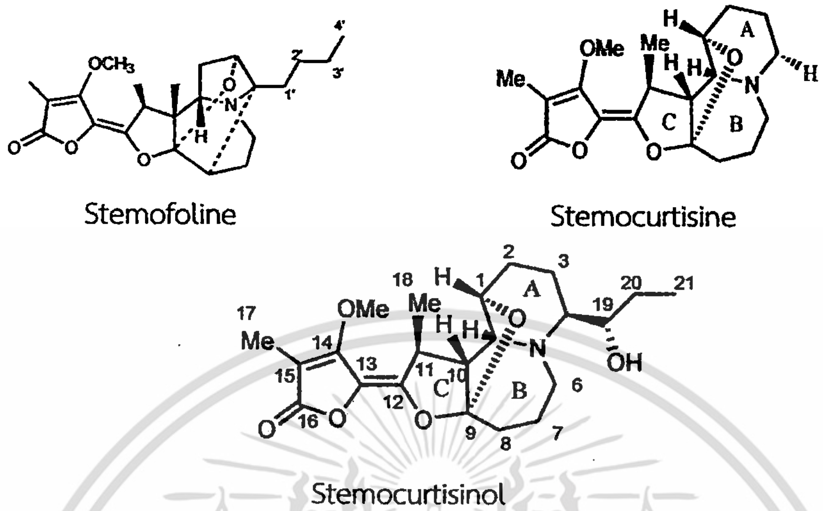

Pyrrolo(1,2-α)azepine core
perhydroazaazulene
4-azaazulene
Tuberostemoamide
Stenine
-tuberostemonine
Stemoamide
-stemonine
-isoprotostemonine
Stemoamine
-stemoamine
Tuberostemospironine
-cromine

ภาพที่ 3 โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์ที่พบในพืชสกุล *stemona* (ดัดแปลงจาก Brem et al., 2001)

3 สารออกฤทธิ์และประโยชน์ของหนอนตายหยาก

ได้มีรายงานสารออกฤทธิ์ใน *S. curtisii* พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ มีสารที่สำคัญได้แก่ stemofoline, stemocurtisine และ stemocurtisinol (ภาพที่ 4) เป็นต้น ซึ่งมีประสิทธิ์ภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera littoralis*) (Kaltenegger *et al.*, 2003) และมีรายงานการใช้ประโยชน์จากหนอนตายหยาก โดยไม่ได้มีการจำแนกชนิดในสกุล *Stemona* ในการใช้รากเป็นยาทางการแพทย์แผนโบราณ และการสาธารณะสุข ตลอดทั้งทางด้านการเกษตร สำหรับทางด้านการแพทย์แผนโบราณและการสาธารณะสุข สำหรับ *S. curtisii* พบว่ามีการนำสารสกัดไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดย ขจรศักดิ์ (2538) ได้ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช อันได้แก่ *Fusarium* sp. *Colletotrichum* sp. *Altemaria* sp. *Aspergillus niger* และเชื้อราสาเหตุโรคผิวหนัง อันได้แก่ *Epidermophyton floccosum Microsporum gypseum Trichophyton mentagrophytes* และ *T. rubrum* โดยนำผงสมุนไพรบดแห้งมาผสมในอาหาร potato dextrose agar ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าหนอนตายหยากมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและโรคผิวหนัง และชนนิกานต์ (2550) ได้รายงานว่า สารสกัดจากหนอนตายหยากสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. *Fusarium* sp. *Phytopthora* sp. *Pythium* sp. ได้ 100 % ส่วนในการป้องกันกำจัดหนอนและแมลง เลาจนา และ ประคอง (2520) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด *S. curtisii* ต่อหนอนแมลงวัน พบว่า สารสกัดมีผลทำให้ตัวหนอนตายหรือทำให้ตัวหนอนมีสีเขียวคล้ำจนถึงน้ำตาลดำ ตัวหนอนที่รอดตายจะเจริญเป็นดักแด้ได้ แต่ดักแด้จะมีลักษณะผิดปกติ คือ ผนังปล้องของ

ดักแด้จะโป่งนูนออก ดักแด้มีขนาดเรียวเล็ก หงิกงอจนผิดรูปร่าง ดักแด้ดังกล่าวนี้จะไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้



Stemofoline

Stemocurtisine

Stemocurtisinol

ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของสาออกฤทธิ์ใน *S. Curtisii* Hook f. (Kaltenegger *et al.*, 2003)

4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพจึงเข้ามามีบทบาทในการพัฒนาวัตถุดิบสมุนไพรมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร มีวัตถุประสงค์ในการนำมาใช้เป็นเป็นแหล่งทดแทนพืชสมุนไพรที่ได้จากธรรมชาติ และยังสามารถควบคุมคุณภาพของสมุนไพรให้คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติ เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงได้ตามต้องการตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยมีพืชที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการผลิตสารทุติยภูมิได้สำเร็จหลายชนิด ได้แก่ ดองดึง บุก กลอย ขมิ้นชันแพงพวยฝรั่ง พริก (ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย, 2534) เป็นต้น

ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการขยายพันธุ์พืชสมุนไพรด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งการขยายพันธุ์ดังกล่าวอาจชักนำยอดโดยตรงจากชิ้นส่วนของพืชที่ทำการเพาะเลี้ยง เช่น จากส่วนของยอด ข้อ และตาข้าง หรือผ่านการสร้างแคลลัสในช่วงเวลาหนึ่งแล้วพัฒนาเป็นยอดต่อไป สำหรับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจะมีสูตร ต่าง ๆ กัน เช่น การใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 ระดับ คือ 1.0 และ 4.0 ppm กับเนื้อเยื่อของดองดึง พบว่า เนื้อเยื่อส่วนปลายของไรโซมสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดี และหากนำไปเลี้ยงต่อในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแคลลัสที่เกิดจากอาหารที่มี NAA เข้มข้น 4.0 ppm ไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ และตายในที่สุด แต่หากเลี้ยงเนื้อเยื่อของดองดึงในอาหารที่มี NAA 1.0 ppm BA 1.0 ppm และ น้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยากชนิดต่าง ๆ นั้นได้มีผู้รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ดังนี้ ประทุมวัน (2542) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *S. collinsae* โดยการนำชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4.0 ppm ร่วมกับ NAA 1.0 ppm ชิ้นส่วนใบ

อ่อนมีการตอบสนองสูตรอาหารโดยขอบใบจะม้วนขึ้นบริเวณกลางใบมีการเจริญเป็นตุ่มของแคลลัสแต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสที่สมบูรณ์ได้

สุมนาและคณะ (2538) ได้ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนของ S. *tuberosa* ในอาหารสูตร B5 ที่เติม 2,4-D 1.0 ppm ร่วมกับ BA 3.0 ppm สามารถชักนำให้ใบอ่อนเกิดแคลลัสได้ดีในสภาพมืด และในพืชชนิดเดียวกัน Montri และคณะ (2005) ได้ทำการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ โดยการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 20 μM จนได้แคลลัส จากนั้นชักนำให้เกิดโซมาติดเอ็มบริโอโดยการย้ายแคลลัสลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 μM

ศิริวรรณและคณะ (2547) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก *Stemona sp.* โดยการชักนำให้เกิดยอดได้ 2-3 ยอดจากการเลี้ยง โดยการเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก.ต่อลิตร และภายหลังจากนำต้นที่ได้มาสกัดสาระสำคัญพบว่ามีสารออกฤทธิ์ Stemofoline และ dehydrodtemofoline

อริยาภรณ์ และคณะ (2546) รายงานว่า การชักนำยอดจากส่วนยอด พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสาร BA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 5 และ 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนยอดได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนยอดต่อหนึ่งชิ้นส่วนยอด เท่ากับ 6 7 และ 5 ยอด ตามลำดับ และการชักนำยอดจากส่วนของปล้อง ราก และใบ ไม่สามารถชักนำยอดได้ในอาหารสูตรดังกล่าว ส่วนการชักนำรากเพื่อพัฒนาเป็นต้นใหม่ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสาร IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดรากจากส่วนยอดได้ 76.67 - 100 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS ที่เติมสาร IBA ระดับความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดรากได้สูงสุด (เท่ากับ 100 100 และ 96.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามหากนำหนอนตายหยากจากช่องเม็ก อำเภอสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี มาชักนำรากในอาหารสูตรดังกล่าวไม่สามารถชักนำรากได้ และถ้านำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล ร่วมกับสาร IBA ที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 30 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสาร IBA 2.5 หรือ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้เท่ากับ 77.78 และ 95.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นาตยา (2549) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงยอดหนอนตายหยาก ในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้ kinetin ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลต่อลิตร มีความยาวยอดและจำนวนยอดมากที่สุด ส่วนรากพบว่าการลดระดับแอมโมเนียมไนเตรทและโปแตสเซียมไนเตรทลง ¼ เท่า มีเปอร์เซ็นต์ การเกิดรากสูงสุด และต้นที่ออกปลูกมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง สามารถเจริญเติบโตออกดอกและติดผล และสะสมสารทุติยภูมิบางชนิดได้เช่นเดียวกับต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

กีรติ (2552) รายงานว่า การศึกษาการชักนำรากโดยนำเมล็ดหนอนตายหยาก *S.curtisii* เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสาร IBA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุด 4.00 ราก และชักนำให้เกิดยอดโดยนำยอดไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งการเลี้ยงยอดในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับรูปแบบการเลี้ยงต่าง ๆ นั้น ไม่มีผลต่อการเกิดราก แต่มีผลกระตุ้นการพัฒนาของยอด

สุรชาติ (2551) รายงานว่า การเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดดีที่สุด 5 ยอด ส่วนการเลี้ยงยอดในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 4-6 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงกว่ายอดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์

Montri และคณะ (2006) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *S. curtisii* โดยนำชิ้นส่วนยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 20 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดปริมาณมาก และการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 5-20 μM สามารถชักนำให้ราก และสามารถย้ายต้นออกปลูกในโรงเรือนได้ และเมื่อต้นที่ได้สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับต้นที่ได้จากสภาพธรรมชาติ

5 การผลิตสารทุติยภูมิโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร

สารทุติยภูมิเป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ของพืช เมื่อพืชเกิดสภาวะความเครียด การเข้าทำลายของโรคและแมลง การกัดกินของสัตว์ หรือการปล่อยสารพิษจากพืช จุลินทีรย์และแมลงเข้าทำลาย โดยพืชชนิดนั้น ๆ จะมี receptor มาทำหน้าที่กระตุ้นให้พืชสร้างสารทุติยภูมิต่าง ๆ เพื่อช่วยให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะความเครียดนั้น ๆ โดยสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นมานี้ไม่ได้มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่จำเป็นต่อการอยู่รอด ซึ่งสารเป็น receptor และทำหน้าที่รับส่งสัญญาณที่สำคัญได้แก่ Ca^{2+}, Methyl Jasmonic acid (MEJA), Salicylic acid (JA), ABA และ ethylene ทำให้เซลล์พืชหยุดการพัฒนาหรือชะงักการเจริญเติบโต และสังเคราะห์สารต่าง ๆ ขึ้น (Zhao et.al. 2005) โดยสังเคราะห์สารแตกต่างกันไปตามชนิดพืช และการกระตุ้นที่ได้รับ ปัจจุบันมีการนำสารทุติยภูมินี้มาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ใช้เป็นยารักษาโรค ยาฆ่าแมลง สารให้สีและกลิ่น เป็นต้น

โดยปกติแล้วสารทุติยภูมินี้สารมารถสกัดได้จากต้นพืช บางครั้งต้องใช้วัตถุดิบในปริมาณที่สูงเพื่อสกัดสารให้ได้ในปริมาณที่ต้องการ การสกัดสารโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาช่วยเป็นวิธีที่สามารถช่วยในการอนุรักษ์ต้นพืชไว้ ทั้งด้านการคัดต้นพันธุ์ หรือเซลล์พืชที่ผลิตสาระสำคัญ การผลิตต้นพันธุ์ และการสกัดสารจาก เซลล์ เนื้อเยื่อและต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้สามารถสกัดสารได้ต่อเนื่องตามต้องการ โดยเฉพาะจากการเลี้ยงเซลล์ที่สามารถผลิตสารสำคัญ โดยการควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ ในสภาพปลอดเชื้อโดยที่ไม่ต้องขึ้นสภาพแวดล้อม สามารถกำหนดระบบการผลิต ตลอดจนคุณภาพและปริมาณผลผลิตได้ ซึ่งปัจจุบันพบว่าประสบความสำเร็จในการใช้ในการผลิตสารสำคัญ ได้แก่ *Taxol, Morphine, Codeine, Ginsenosides, L-DOPA, Berberine, Diosgenin, Capsaicin, Camptothecin, Vinblastine, Vincristine, Tanshinone* และ *Podophyllotoxin* (Vanisree *et.al. 2003)* จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืช หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช โดยใช้สถานะของอาหารแตกต่างกัน ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว แตกต่างกันไปตามชนิดพืช และสารที่ต้องการ (Dixon, 1985)

โดยพบว่าปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตสารทุติยภูมิในพืชในอาหารเพาะเลี้ยง โดยผ่านวิธีการ ดังนี้

1. การเติมสารที่สามารถเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นให้เกิดชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ (Eilicitation)

การให้ elicitors ต่าง ๆ เพื่อทำให้พืชเกิดความเครียด หรือสารที่มีผลต่อสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สาระสำคัญนั้น ๆ ที่ต้องการ ซึ่งในการสังเคราะห์สารนั้นปัจจุบัน elicitor หรือสิ่งที่พืชได้รับแล้วมีผลต่อการสังเคราะห์หรือการเพิ่มปริมาณสาระสำคัญนั้น โดยการสะสมอาจสะสมได้หลังจากเติมสารเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นให้เกิดชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิลงไปในเนื้อเยื่อ และมีผลต่อตัวรับสัญญาณในพืชสัญญาณ ได้แก่ Ion fluxes, Ca^{2+}, MeJA, SA, ethylene, G-protein และ ABA แล้วทำให้ระดับกิจกรรม

ของเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมินั้นเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้มีการผลิตสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นได้ (ศุภวรรณ, 2549)

1.1 สิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต (Biotic elicitors) ได้แก่ การให้ปัจจัยที่เป็นสิ่งมีชีวิตซึ่งที่นำมาประยุกต์ได้ง่ายคือการให้ เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ทั้งรา แบคทีเรีย และ yeast รวมทั้งสารที่สร้างจากพืช และสารหรือเอ็นไซม์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตแล้วมีผลต่อการสังเคราะห์สาร (Namdeo, 2007) ได้มีรายงานการนำสิ่งกระตุ้นที่มีชีวิตมาใช้ในการเพิ่มการสะสมของสารสำคัญในพืช ดังเช่น

Zhao และคณะ (2005) ได้รายงานการนำสารสกัดจากยีสต์มาใช้กระตุ้นใน Coleus blumei ให้มีการสร้างสาร rosmarinic acid, การกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Phythium aphanidermatum* ในแครอท ให้ผลิตสาร 6-hydroxymellein; 4-hydroxybenzoic acid และ การใช้เชื้อรามากระตุ้นให้ *Eschscholtzia californica* มีการสร้างสาร benzophenanthridines และ sanguinarine (ตารางที่ 1)

Zhao และคณะ (2001) ได้รายงานการใช้เชื้อราจำนวน 12 ชนิด เป็น biotic elicitor ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Catharanthus roseus* เพื่อการปรับปรุงการสังเคราะห์สาร indole alkaloid 3 ชนิด ได้แก่ ajmalicine, serpentine และ catharanthine พบว่าเชื้อราแต่ละชนิดมีผลต่อการสังเคราะห์สารอัลคอลอยด์แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยพบว่า *Fusarium solani, Penicillium spimulorum, Penicillium citrium, Verticilliumdahliae, Pythium irregulare, Ustilaginodia verens* และ *Armilluria melleu* ทำให้มีการสังเคราะห์ ajmalicine ได้ดีขึ้น และช่วงเวลาที่ผลิตสารมากที่สุดคือหลังการเลี้ยงร่วมกับเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน และการย้ายเซลล์พืชไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีเชื้อราแล้ว 7 วัน

Villegas และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของการให้ปัจจัยร่วมทั้ง abiotic และ biotic elicitors คือ สาร sodium orthovanadate และ yeast เพื่อกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ benzophenanthridine alkaloid ในเซลล์ *Eschscholtzia californica* พบว่าการให้ elicitor ร่วมกันนั้นสารมารถกระตุ้นการสร้างสารเพิ่มขึ้นถึง 50 เปอร์เซ็นต์

และได้ยังมีรายงานการใช้ elicitor ทั้งชนิดเดี่ยว ๆ และการใช้หลายชนิดร่วมกัน ในการกระตุ้นให้เกิดการสะสมและสร้างสารสำคัญในพืชต่าง ๆ โดย Zhao และคณะ (2005) ดังตารางที่ 1

1.2 สิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (Abiotic elicitors) เป็นการใช้สิ่งไม่มีชีวิตเหนี่ยวนำให้เกิดชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ โดยอาจทำการเหนี่ยวนำด้วยสารที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณในวิถีการสังเคราะห์โดยตรง ซึ่ง Zhao และคณะ (2005) กล่าวว่า การสังเคราะห์สารสำคัญในพืชเกิดขึ้นผ่านทางสัญญาณหลาย ได้แก่ Ion fluxes, Ca^{2+}, MeJA, SA, ethylene, G-protein และ ABA ซึ่งเป็นตัวรับ elicitors ทำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนอง เพื่อป้องกันตัวของพืช (ภาพที่ 5) ซึ่งการให้สารที่ทำหน้าที่รับสัญญาณมากระตุ้นในการสร้างสารทุติยภูมิ รวมถึง สิ่งไม่มีชีวิตอื่น ๆ เช่น

Farber และคณะ (2003) ได้รายงานการเติม methyl jasmonate (MeJA), SA และ JA กระตุ้นให้ *Arabidopsis thaliana* มีการสร้างสาร indole glueosinolates และ camalexin และการใช้ MeJA ในการกระตุ้น Eschscholtzia californica ให้มีการผลิตสาร benzophenanthridines และ sanguinarine

พิทักษ์ และ กัณยารัตน์ (2552) ได้รายงานการเติมสารกระตุ้นในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อการสร้างสารอาร์ทีมิซินินในรากเพาะเลี้ยงของชิงเฮา โดยที่สาร CPPU มากระตุ้นเซลล์รากเพาะเลี้ยงให้สร้างสารอาร์

ทีมิซินินเพิ่มขึ้น ซึ่งรากที่กระตุ้นด้วยสาร CPPU ปริมาณสารอาร์ทีมิซินิน 0.086 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งมีการสร้างสารเพิ่มขึ้นประมาณ 2.7-3.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับรากที่ไม่เติมปัจจัยกระตุ้น (0.023 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)

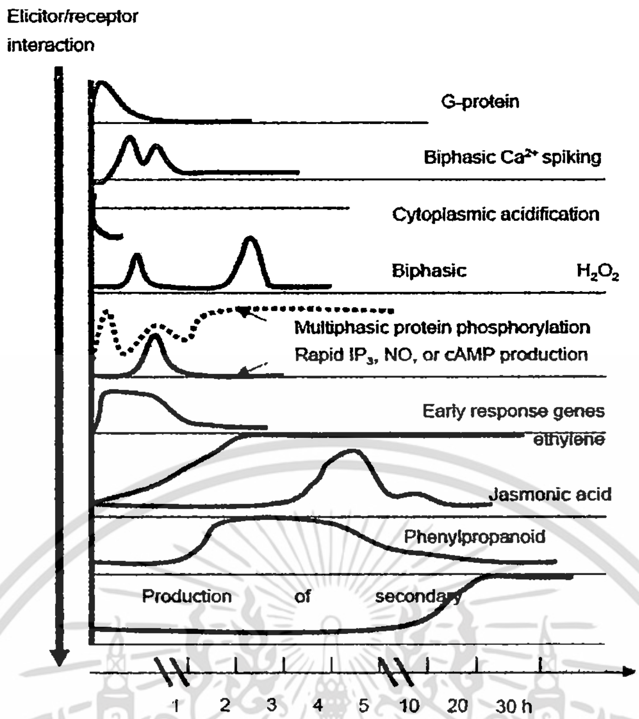
Zhang และ Bjorn (2009) ได้รายงานการปรับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น การเพิ่มอุณหภูมิ การให้แสง เป็นต้น ซึ่งได้มีการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV-B) ในการกระตุ้นเนื้อเยื่อพืชชนิดต่าง ๆ ให้มีการผลิตสาร flavonoids, stilbenes, phenolics ต่าง ๆ alkaloids กลุ่ม Indole alkaloids, purine alkaloids, sterol alkaloids, essential oils, terpenoids, cannabioids, glucosinolates และ isothiocyanates เพิ่มขึ้น

Villegas และคณะ (2000) ในการใช้ sodium orthovanadate เป็น abiotic elicitor เพื่อทำให้เกิดการสังเคราะห์ benzophenanthridine alkaloid ในเซลล์ *Eschscholtzia californica* พบว่ามีการสังเคราะห์สารอัลคาลอยด์เพิ่มขึ้นถึง 20 เท่า

Curtis และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาผลของการให้แคลเซียม ต่อเซลล์ของ *Hyoscyamus muticus* พบว่า การให้แคลเซียมในรูปของ *Calcium alginate* สามารถปรับปรุงการสังเคราะห์สาร sesquiterpene เพิ่มขึ้นในเซลล์พืชดังกล่าวได้ดี

Zheng และ Wu (2004) ได้ทำการศึกษาผลของการให้แคดเมียม ต่อการสังเคราะห์สาร ajmalicine ในเซลล์ *Catharanthus roseus* โดยใช้แคดเมียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.05 - 0.4mM และระยะเวลา 24 – 48 ชั่วโมง พบว่าการให้แคดเมี่ยมมีผลต่อการการเพิ่มปริมาณของ tryptophan และ tryptamine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์สาร ajmalicine โดยที่ความเข้มข้น 0.1mM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีผลต่อการสังเคราะห์สาร ajmalicine มากที่สุด

Chen และคณะ (2006) ได้ทำการทดลองใช้ methyl-JA (MeJA) ความเข้มข้น 0.001- 1 ไมโครโมล เป็นเวลา 1-6 วัน ต่อปริมาณของสาร caffeoylputrescine (CP) ในมะเขือเทศ พบว่า การให้ MeJA มีผลต่อการสะสมสาร CP โดยปริมาณสารเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ MeJA และระยะเวลาที่ได้ให้สาร แต่มีแนวโน้มลดลงที่ความเข้มข้นสูงคือ 1 ไมโครโมล และในวันที่ 4 เป็นต้นไป



ภาพที่ 5 การตอบสนองของพืชต่อ elicitors ต่าง ๆ (Zhao et.al. 2005)

ตารางที่ 1 ผลของการใช้ elicitors ต่อชนิดของ receptors และการสังเคราะห์ทุติยภูมิในพืชสมุนไพรบางชนิด

พืช	Elicitors	Receptors	สารทุตยภูมิ
Arabidopsis thaliana	MeJA, SA, Fungal	JA, SA	Indole glucosinolates
Catharanthus rosea	Yeast elicitors, MeJa	Ca2+, JA	Ajmalicine, catharanthine,
Citrus limon	*Alternaria altenata*	G-protein, Ca2+	Umbelliforone, scoparone
Coleus blumei	Yeast elicitor	MeJA	Rosmaric acid
Cupressus lusitanica	MeJA	Ca2+, JA	β-thujaplicin
Daucus carota	Pythium sp.	Ca2+, ethylene, JA	6-methoxymellein
Eschscholtzia califonica	MeJA, Fungal elicitor	JA	Benzophenanthridines

ที่มา : Zhao และคณะ (2005)

2. การเติมสารตั้งต้นของกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารที่ต้องการ (Biotransformation of precursors) ทำได้โดยการเติมสารตั้งต้นของกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารที่ต้องการลงในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (biotransformation) แล้ว จะได้ผลผลิตคือสารทุติยภูมิที่ต้องการเพิ่มมากขึ้น อัตราการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพควรจะมากกว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงหรือสลายตัวต่อไป จึงจะได้ปริมาณสารทุติยภูมิมากขึ้นตามที่ต้องการ (ศุภวรรณ, 2549) ซึ่งได้ใช้วิธีการ นี้ในการเพิ่มผลผลิตของ alkaloidที่ผลิตโดยเซลล์ Ailanthus และเนื้อเยื่อรากของซิงโคน่า ที่มีการเติม L-tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ tryptophan พบว่าเนื้อเยื่อของอิแลนทุส และซิงโคน่า สามารถสร้างสาร alkaloid canthinone ควินนีน และ ควินนิดีน เป็นต้น (พรรนิภา, 2534)

6 การตรวจสอบสารอัลคาลอยด์ในพืช

โดยอาศัยหลักการตกตะกอนของอัลคาลอยด์กับน้ำยาตกตะกอนชนิดต่าง ๆ ถ้ามี Alkaloid จะได้ผลดังนี้

- Wagner’s reagent ได้ตะกอนสีน้ำตาล
- Mayer’s reagent ได้ตะกอนสีขาว
- Tannic acid reagent ได้ตะกอนสีขาว
- Dragendorff’s reagent ได้ตะกอนสีส้ม (ศิริรัตน์, 2543)

และสามารถวิเคราะห์หาปริมาณอัลคาอลยด์ทั้งหมด (Total alkaloids) หรืออัลคาลอยด์รวมโดยใช้วิธี UV spectroscopy โดยใช้หลักการ การดูดกลืนแสงของสารประกอบที่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลต (UV) และในช่วงคลื่นที่ตามองเห็น (Visible) ตามวิธีของ Balakrishna และคณะ (1992)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียม clone ของหนอนตายหยาก

ทำการเก็บเมล็ดพันธุ์หนอนตายหยาก มาทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5 % เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเมล็ดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เมื่อเมล็ดงอกเป็นเวลา 2 เดือน มาเพิ่มปริมาณยอดให้ได้จำนวนมากโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาใช้ในการทดลองเพื่อคัดเลือก clone ที่สามารถผลิตรากได้ดีในสภาพปลอดเชื้อ

ทำคัดเลือกครั้งที่ 1 จากจำนวน clone 100 clone โดยดูระยะเวลาในการงอกและระยะเวลาของการเกิดรากให้เหลือ 50 clone และคัดเลือกครั้งที่สองจาก 50 clone โดยดู clone ที่มีอัตราการเพิ่มปริมาณยอดที่ดีที่สุดในช่วงระยะเวลาเท่ากัน ให้เหลือ 5 clone ได้แก่ NM04 NM05 NM09 NM10 NM19

การทดลองที่ 1. การคัดเลือก clone ที่ผลิตรากปริมาณมากและมีการสะสมของสารอัลคาลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomize design (factorial in CRD) ประกอบไปด้วย 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 cloneของหนอนตายหยาก จำนวน 5 clone ได้แก่ ได้แก่ NM04 NM05 NM09 NM10 NM19

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของ IAA ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 2, และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ใช้ผลการทดลองจากปี 2548 ที่ดีที่สุดมากำหนด treatment โดยการใช้ค่า ± 2 ซึ่งผลการทดลองที่ดีที่สุดคือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ทำการทดลองโดยตัดยอดที่มีขนาด 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 2, และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกการเกิดราก การนับจำนวนราก วัดความยาวราก และถ่ายภาพ ทุกสองสัปดาห์ และชั่งน้ำหนักสดและแห้งของรากหลังทำการทดลองได้ 2 เดือน และนำรากที่ได้ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV spectroscopy ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (T90 UV-Vis P&G Instrument ®)

การทดลองที่ 2 ผลของการให้สาร Ethylene ต่อปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ระยะเวลาในการแช่สาร คือ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ ความเข้มข้นของสาร Ethephon คือ 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยนำต้นของหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร สูตร MS ที่เติม Ehylene ในรูปของสารละลาย Ethephon ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกการน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก และนำรากที่ได้ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent และวัดปริมาณ

รวมโดยใช้วิธี UV spectroscopy ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (T90 UV-Vis P&G Instrument ®)

การทดลองที่ 3 ผลของการให้สาร jasmonic acid (JA) ต่อปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ระยะเวลาในการแช่สาร คือ 24 และ 48 ชั่วโมง

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ ความเข้มข้นของสาร JA คือ 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยนำต้นของหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม JA ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกการน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก และนำรากที่ได้ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV spectroscopy ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (T90 UV-Vis P&G Instrument ®)

การทดลองที่ 4 ผลของการให้สาร ABA ต่อปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ระยะเวลาในการแช่สาร คือ 24 และ 48 ชั่วโมง

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ ความเข้มข้นของสาร ABA คือ 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยนำต้นของหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร สูตร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกการน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก และนำรากที่ได้ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV spectroscopy ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (T90 UV-Vis P&G Instrument ®)

การทดลองที่ 5 ผลของการให้สาร Ca^{2+} ต่อปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ระยะเวลาในการแช่สาร คือ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ ความเข้มข้นของสาร Ca^{2+} คือ 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยนำต้นของหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร สูตร MS ที่เติม Ca^{2+} ในรูปของ $CaCal_2$ ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกการน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก และนำรากที่ได้ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV spectroscopy ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (T90 UV-Vis P&G Instrument ®)

การตรวจสอบสารอัลคาลอยด์จากรากของหนอนตายหยากโดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent

1. นำรากของหนอนตายหยากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่ง แล้วนำมาร่อนโดยใช้ตะแกรงขนาด 200 mesh

2. นำผงรากหนอนตายหยากที่ผ่านการร่อนมาจำนวน 2 กรัม ใส่ลงใน test tube ขนาด 15 มล. เติมเมธานอล 7 มล. แช่ทิ้งไว้นานประมาณ 2 คืน แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นเมธานอลกับตะกอน และเก็บเฉพาะชั้นเมธานอลมาจำนวน 5 มล. ส่วนเมธานอลที่เหลือให้ทิ้งไปพร้อมตะกอน นำสารเมธานอลที่เก็บมาใส่ลงใน eppendroff tube หลอดละ 500 μl จนหมด 5 มล.

3. ทำให้แห้งโดยการลดความดัน (savant speed vacuum) จะทำให้ได้สารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก ติดอยู่ที่ก้นหลอด eppendroff tube

4. นำสารสกัดหยาบทั้งหมดมาเติม 5% HCl 500 μl นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลานาน 3 นาทีและค่อย ๆ เก็บส่วนใส ๆ ออกมาใส่ใน eppendroff tube ขนาด 1.5 มล. อันใหม่จนหมด

5. เติมสาร conc. Ammonia ลงไปจำนวน 200μl ตรวจสอบความเป็นด่างด้วยกระดาษลิสมัส ถ้าหากยังไม่เป็นด่าง ก็ให้เติมสาร conc. Ammonia ลงไปอีก 100 μl แล้ว เติม ethyl acetate จำนวน 500 μl และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกชั้น ethyl acetate (อยู่ด้านบน) กับน้ำ (อยู่ด้านล่าง)

6. เก็บเฉพาะชั้น ethyl acetate ออกใส่ใน eppendroff tube ใหม่ที่มีขนาด 1.5 มล. และทำให้แห้งโดยลดความดัน ทำซ้ำตั้งแต่การเติม ethyl acetate จนกว่าจะแน่ใจว่าไม่มีแอลคาลอยด์เหลืออยู่ในชั้นน้ำ สารสกัดที่ได้เป็นสารสกัดแอลคาลอยด์ซึ่งจะนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

7. นำสารสกัดจากรากของหนอนตายหยากที่ได้มาตรวจเอกลักษณ์ โดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) finger print ซึ่งทำโดยใช้ silica gel GF 250 TLC plate (Merck) เป็น stationary phase และใช้ dichloromethane : methanol (99 : 3) เป็น mobile phase แล้วนำไปตรวจสอบโดยส่องกับ UV 254 และนำไปตรวจหาแอลคาลอยด์โดยใช้ dragendroff's reagent

การวิเคราะห์หาปริมาณอัลคาอลยด์ทั้งหมด (Total alkaloids) โดยใช้วิธี UV spectroscopy

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของอัลคาลอยด์ทั้งหมดโดยใช้วิธี UV spectroscopy ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (T90 UV-Vis P&G Instrument ®) ตามวิธีของ Balakrishna และคณะ (1992) จากนั้นนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ของอัลคาลอยด์ทั้งหมดในรากของหนอนตายหยากเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน *Stemona* alkaloids

1. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมา สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 297 nm กับค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐาน โดยให้เป็นแกน y และ x ตามลำดับ

2. สร้างกราฟให้เป็นสมการเส้นตรง $y=a + bx$ ตามลำดับ และคำนวณค่าความชันหรือ slop ของกราฟ จากสมการเส้นตรง เมื่อ $a=0$, $b = y/x$

3. นำค่าดูดกลืนแสงขอตัวอย่างรากหนอนตายหยาก มาคำนวณหาพื้นที่ได้กราฟโดยเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน

$$\text{พื้นที่ได้กราฟ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = (\text{ค่าการดูดกลืนแสง/ความชัน}) \times 10^{-3}$$

$$\underset{\text{(\% mg)}}{\text{ปริมาณอัลคาลอยด์ทั้งหมด}} = \left(\frac{\text{ปริมาณสารที่นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (ml)}}{\text{น้ำหนักผงของรากหนอนตายหยาก (g)}}\right) \times \text{พื้นที่ใต้กราฟ (mg/ml)} \times 10^{2}$$

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลที่ศึกษาทั้งหมดโดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มโดยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT)

สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

1. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ต.ชุมโค อ.ปะทิว จ.ชุมพร
2. หลักสูตรพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

141506

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1. การคัดเลือก clone ที่ผลิตรากปริมาณมากและมีการสะสมของสารอัลคาลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการทดลองโดยตัดยอดที่มีขนาด 1 เซนติเมตร จาก clone จำนวน 5 โคลน ได้แก่ NM04 NM05 NM09 NM10 NM19 มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 2, และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกการเกิดราก การนับจำนวนราก วัดความยาวราก และถ่ายภาพผลการทดลอง พบว่า

โคลน และโคลนร่วมกับระดับความเข้มข้นของ IAA ไม่มีความแตกต่างทางสถิติใน ความสูงต้น จำนวนยอด จำนวนข้อ และจำนวนแขนง แต่ ระดับความเข้มข้นของ IAA มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งใน ความสูงต้น จำนวนยอด จำนวนข้อ และจำนวนกิ่งแขนง โดย IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NM19 มีความสูงต้นมากที่สุด คือ 7.37 เซนติเมตร จำนวนข้อพบว่า IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NM19 มีจำนวนยอด จำนวนข้อ และจำนวนกิ่งแขนงมากที่สุด คือ 4.53 ยอด 19.00 ข้อ และ 2.80 กิ่งแขนง ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6)

ความเข้มข้นของ IAA และ ความเข้มข้นของ IAA ร่วมกับโคลนของหนอนตายหยาก ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในจำนวนใบ จำนวนราก และความยาวราก แสดงว่า ความเข้มข้นของ IAA และ โคลนของหนอนตายหยากไม่มีความสัมพันธ์กันต่อการเพิ่มจำนวนใบ จำนวนราก และความยาวรากของหนอนตายหยาก แต่ชุดโคลนมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในจำนวนใบ จำนวนราก และความยาวราก โดย IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับชุดโคลน NM05 มีจำนวนใบมากที่สุด รองลงมาคือ ชุดควบคุมร่วมกับชุดโคลน NM05 และ IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโคลน NM05 ได้แก่ 3.73 3.47 และ 2.80 ใบ ตามลำดับ จำนวนราก พบว่า IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคลน NM04 มีจำนวนรากมากที่สุด คือ 2.67 ราก รองลงมา คือ IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคลน NM04 และ IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคลน NM09 ได้แก่ 1.17 และ 0.53 ราก ตามลำดับ ส่วนความยาวราก พบว่า ชุดควบคุม และ IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคลน NM04 มีความยาวรากมากที่สุด คือ 0.28 เซนติเมตร รองลงมาคือ IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคลน NM09 และ NM04 ได้แก่ 0.27 และ 0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 2 ความสูงต้น จำนวนยอด จำนวนข้อ และจำนวนกิ่งแขนงของโคลนหนอนตายหยาก (NM04 NM05 NM09 NM10 และ NM19) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

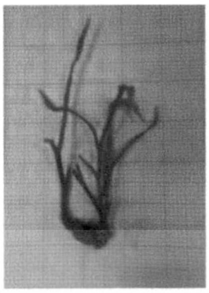
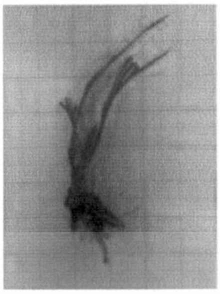
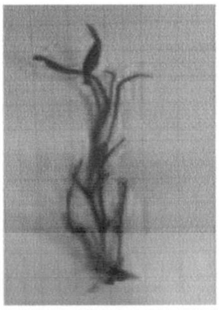
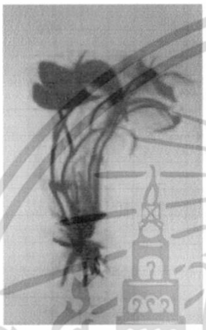
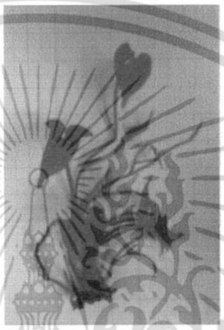
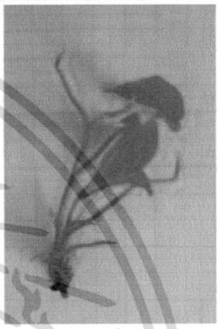
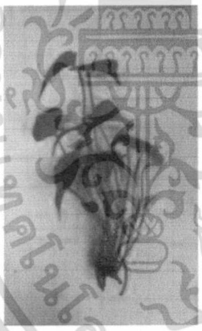
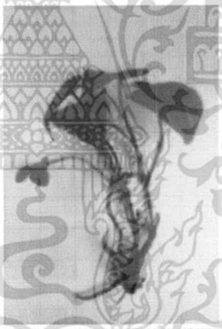
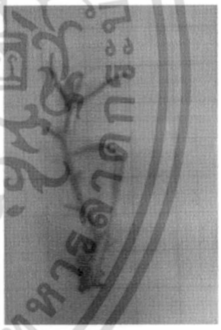
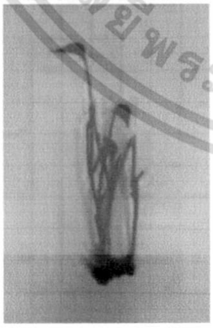
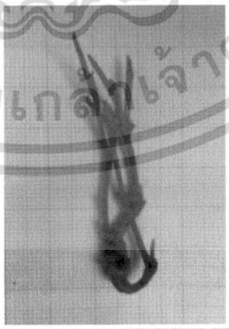
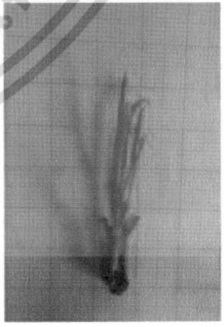
ความเข้มข้นของ IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	รหัสโคลน	ความสูงต้น (ซม.) [1/]	จำนวนยอด [1/]	จำนวนข้อ [1/]	จำนวนกิ่งแขนง [1/]
0	NM 04	5.63bc	2.92ef	9.17e	1.50bcd
	NM 05	6.57abc	4.20ab	16.27ab	2.13abc
	NM 09	5.40c	3.93abcd	15.27abc	2.13abc
	NM 10	5.90bc	3.39bcdef	12.33bcde	2.20abc
	NM 19	7.00ab	3.13cdef	13.93bcd	2.27abc
2	NM 04	6.33abc	3.17cdef	11.42cde	1.33cd
	NM 05	6.60abc	4.07abc	15.93ab	2.53ab
	NM 09	6.40abc	3.87abcd	15.73ab	2.53ab
	NM 10	6.53abc	2.80f	9.47e	1.00d
	NM 19	6.87ab	3.13cdef	12.80bcde	2.07abc
4	NM 04	5.84bc	3.58bcdef	12.17bcde	1.92abcd
	NM 05	6.90ab	4.53a	19.00a	2.80a
	NM 09	5.87bc	3.00def	13.20bcde	1.53abc
	NM 10	5.87bc	3.40bcdef	10.00de	1.87abcd
	NM 19	7.37a	3.20cdef	15.47abc	2.40ab
C.V. (%)		14.17	18.10	19.93	34.09
ความเข้มข้นของ IAA (A)		ns	ns	ns	ns
รหัสโคลน (B)		**	**	**	**
A*B		ns	ns	ns	ns

[1/] ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ** แตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99% ตามลำดับ

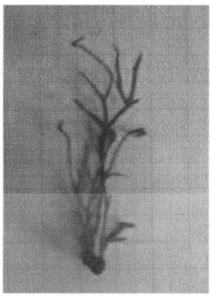
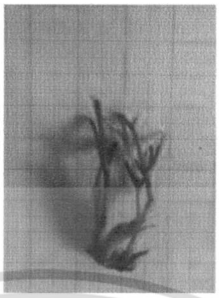
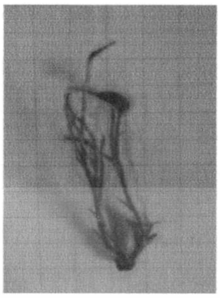
ตารางที่ 3 จำนวนใบที่กางเต็มที่ จำนวนราก และ ความยาวราก ของโคลนหนอนตายหยาก (NM04 NM05 NM09 NM10 และ NM19) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้นของ IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	รหัสโคลน	จำนวนใบที่กางเต็มที่ [1/]	จำนวนราก [1/]	ความยาวราก [1/]
0	NM 04	0.92ed	0.25b	0.28a
	NM 05	3.47ab	0.80b	0.06bc
	NM 09	7.20a	0.33b	0.13abc
	NM 10	1.27ed	0.00b	0.00c
	NM 19	2.27cbde	0.07b	0.01c
2	NM 04	0.92ed	2.67a	0.26ab
	NM 05	3.73b	0.40b	0.09abc
	NM 09	5.87a	0.53b	0.27a
	NM 10	1.07ed	0.00b	0.00c
	NM 19	1.53aed	0.00b	0.00c
4	NM 04	0.92ed	1.17b	0.28a
	NM 05	2.80cbd	0.40b	0.07abc
	NM 09	3.67b	0.07b	0.04c
	NM 10	0.60e	0.07b	0.04c
	NM 19	2.67abd	0.00b	0.00c
C.V. (%)		50.62	216.16	169.76
ความเข้มข้นของ IAA (A)		ns	ns	ns
รหัสโคลน (B)		**	**	**
A*B		ns	ns	ns

[1/,2/] ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ** แตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99% ตามลำดับ

	ระดับความเข้มข้นของ IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	0	2	4
NM 04			
NM 05			
NM 09			
NM 10			

ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของหนอนตายหยากชุดโคลน รหัส NM01 NM04 NM05 NM09 และ NM19ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ระดับความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

	ระดับความเข้มข้นของ IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	0	**2**	**4**
NM 19			

ภาพที่ 6 (ต่อ) การเจริญเติบโตของหนอนตายหยากชุดโคลน รหัส NM01 NM04 NM05 NM09 และ NM19 ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ระดับความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จากการนำรากของโคลนหนอนตายหยากรหัส NM04 NM05 NM09 NM 10 และ NM 19 ที่ได้ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV-Vis spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 297 นาโนเมตร พบว่ารากหนอนตายหยากทุกโคลนเกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วย dragendorff's reagent ส่วนเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าโคลนรหัส NM19 มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 11.151 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม รองลงมาคือโคลนรหัส NM04 และ NM05 โดยมีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสาร 10.715 และ 9.195 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การเกิดปฏิกิริยากับสาร dragendorff's reagent และ ปริมาณ total stemona alkaloids ในโคลนของรากหนอนตายหยาก รหัส NM04 NM05 NM09 NM 10 และ NM 19 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอดเป็นเวลา 2 เดือน

โคลน	การเกิดปฏิกริยากับ Dragendorff's reagent [1/]	Total stemona alkaloids (% mg) [2/, 3/]
NM04	+	10.715 b
NM05	+	7.991 d
NM09	+	9.195 c
NM10	+	7.961 d
NM19	+	11.151 a
CV (%)		0.302
F-test		*

[1/] + = เกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วยสาร dragendroff's reagent

[2/] วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (T90 UV/Vis, P&G Instrument) ที่ความยาวคลื่น 297 นาโนเมตร

[3/] * แตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

การทดลองที่ 2 ผลของการให้สารละลายเอทธิฟอนต่อการเกิดรากและปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

จากนำต้นของหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร สูตร MS ที่เติม Ethephon ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า

จำนวนรากไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา

ความยาวรากมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างระยะเวลาของการแช่ แต่ไม่มีความแตกต่างความเข้มข้น และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักสดมากที่สุด ที่ 5.00 เซนติเมตร

น้ำหนักสด มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างระยะเวลาของการแช่ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น และความเข้มขันร่วมกับเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักสดมากที่สุด ที่ 0.67 กรัม

น้ำหนักแห้ง มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างระยะเวลาของการแช่ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น และความเข้มขันร่วมกับเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด ที่ 0.08 กรัม (ตารางที่ 5)

จากการนำสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากที่ได้จากการเลี้ยงต้นกล้าในอาหารที่เติม Ethephon ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV-Vis spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 297 นาโนเมตร พบว่ารากหนอนตายหยากจากทุกทรีทเมนท์เกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วย dragendorff's reagent ส่วนเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 20.045 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 5 จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของราก ที่ได้จากการนำต้นกล้าของหนอนตายหยากไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม ethylene ในรูปของ ethephon ความเข้มข้น 0 2 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Ethephon (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	จำนวนราก	ความยาวราก (เซนติเมตร) [1/]	น้ำหนักสด (กรัม) [1/]	น้ำหนักแห้ง	
					(กรัม) [1]	(เปอร์เซ็นต์)
0	0	3.20	1.60c	0.15b	0.01b	6.67
	24	3.60	5.82a	0.33ab	0.05ab	15.15
	48	5.80	3.54bc	0.64a	0.08a	12.50
2	0	3.20	1.60c	0.15b	0.01b	6.67
	24	5.20	2.88bc	0.38ab	0.04ab	10.53
	48	3.80	5.00ab	0.67a	0.06ab	8.96
4	0	3.20	1.60c	0.15b	0.01b	6.67
	24	3.60	3.70abc	0.63a	0.06ab	9.52
	48	3.60	2.96bc	0.22ab	0.02b	9.09
C.V.(%)		40.51	50.96	49.77	87.11	
A (ความเข้มข้น)		ns	ns	ns	ns	
B (ระยะเวลา)		ns	**	**	**	
A x B		ns	*	ns	ns	

[1/] ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*, ** แตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99% ตามลำดับ

การทดลองที่ 3 ผลของการให้สาร Methyl Jasmonate (MeJA) ต่อการเกิดรากและปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

จากการทดลองโดยนำต้นของหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม JA ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า

จำนวนรากความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา

โดย จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง มากที่สุดที่ 5.00 ราก 4.50 เซนติเมตร 0.72 กรัม และ 0.70 กรัม ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการแช่ 0 ชั่วโมง (ไม่แช่สาร) ที่การแช่ต้นกล้าในสารละลาย JA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งมากที่สุด 11.90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

จากการนำสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากที่ได้จากการเลี้ยงต้นกล้าในอาหารที่เติม JA ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV-Vis spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 297 นาโนเมตร พบว่ารากหนอนตายหยากจากทุกทรีทเมนท์เกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วย dragendorff's reagent ส่วนเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 13.815 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 6 จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของราก ที่ได้จากการนำต้นกล้าของหนอนตายหยากไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Methyl Jasmonate (MeJA) ความเข้มข้น 0 2 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 2 เดือน

MeJA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	จำนวนราก	ความยาวราก (เซนติเมตร) [1/]	น้ำหนักสด (กรัม) [1/]	น้ำหนักแห้ง	
					(กรัม) [1]	(เปอร์เซ็นต์)
0	0	5.00	4.50	0.72	0.07	9.72
	24	4.60	3.52	0.44	0.04	9.09
	48	5.00	4.50	0.72	0.07	9.72
2	0	5.00	4.50	0.72	0.07	9.72
	24	4.60	3.26	0.45	0.05	11.11
	48	4.00	2.76	0.32	0.03	9.38
4	0	5.00	4.50	0.72	0.07	9.72
	24	4.80	3.64	0.42	0.05	11.90
	48	4.20	3.24	0.45	0.05	11.11
C.V.(%)		53.19	49.58	55.33	71.96	
A (ความเข้มข้น)		ns	ns	ns	ns	
B (ระยะเวลา)		ns	ns	ns	ns	
A x B		ns	ns	ns	ns	

[1/] ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

การทดลองที่ 4 ผลของการให้สาร Abscissic acid (ABA) ต่อการเกิดรากและปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

จากการทดลองโดยนำต้นของหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร สูตร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน จากตารางที่ 5 พบว่า

จำนวนรากความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา

โดย จำนวนรากมากที่สุด 4.30 ราก ที่การแช่ต้นกล้าในสารละลาย ABA ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร 48 ชั่วโมง ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง มากที่สุด 5.22 เซนติเมตร 0.56 กรัม และ 0.10 กรัม ตามลำดับ ที่การแช่ต้นกล้าในสารละลาย ABA ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งมากที่สุด 26.32 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการแช่ 0 ชั่วโมง (ไม่แช่สาร) (ตารางที่ 7)

จากการนำสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากที่ได้จากการเลี้ยงต้นกล้าในอาหารที่เติม ABA ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff’s reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV-Vis spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 297 นาโนเมตร พบว่ารากหนอนตายหยากจากทุกทรีทเมนท์เกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วย dragendorff’s reagent ส่วนเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 21.008 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 7 **จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของราก ที่ได้จากการนำต้นกล้าของหนอนตายหยากไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Abscissic acid (ABA) ความเข้มข้น 0 2 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 2 เดือน**

ABA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	จำนวนราก	ความยาวราก (เซนติเมตร) [1/]	น้ำหนักสด (กรัม) [1/]	น้ำหนักแห้ง (กรัม) [1]	น้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์)
0	0	2.40	4.70	0.19	0.05	26.32
	24	4.00	5.22	0.56	0.10	17.86
	48	4.30	2.70	0.34	0.01	2.94
2	0	2.40	4.70	0.19	0.05	26.32
	24	2.20	1.80	0.14	0.02	14.29
	48	3.20	3.46	0.37	0.04	10.81
4	0	2.40	4.70	0.19	0.05	26.32
	24	3.80	2.48	0.40	0.04	10.00
	48	3.40	2.62	0.21	0.02	9.52
C.V.(%)		67.57	80.36	100.76	106.68	
A (ความเข้มข้น)		ns	ns	ns	ns	
B (ระยะเวลา)		ns	ns	ns	ns	
A x B		ns	ns	ns	ns	

[1/] ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

การทดลองที่ 5 ผลของการให้สาร Ca^{2+} ต่อการเกิดรากและปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

จากการทดลองโดยนำต้นของหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Ca^{2+}ในรูป $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า

จำนวนรากไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา

ความยาวรากมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างระยะเวลาของการแช่ แต่ไม่มีความแตกต่างความเข้มข้น และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีความยาวรากมากที่สุด ที่ 3.68 เซนติเมตร

น้ำหนักสด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างระยะเวลาของการแช่ ความเข้มข้น และความเข้มขันร่วมกับเวลา

น้ำหนักแห้ง มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างระยะเวลาของการแช่ และความเข้มขันร่วมกับเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด ที่ 0.129 กรัม และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งมากที่สุด 25.20 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการแช่ 0 ชั่วโมง (ไม่แช่สาร) (ตารางที่ 8)

จากการนำสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากที่ได้จากการเลี้ยงต้นกล้าในอาหารที่เติม $CaCl_2$ ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ dragendorff's reagent และวัดปริมาณรวมโดยใช้วิธี UV-Vis spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 297 นาโนเมตร พบว่ารากหนอนตายหยากจากทุกทรีทเมนท์เกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วย dragendorff's reagent ส่วนเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 20.045 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของราก ที่ได้จากการนำต้นกล้าของหนอนตายหยากไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Ca^{2+} ($CaCl_2$) ความเข้มข้น 0 2 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 2 เดือน

$CaCl_2$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	จำนวนราก	ความยาวราก (เซนติเมตร) 1/	น้ำหนักสด (กรัม) 1/	น้ำหนักแห้ง	
					(กรัม) 1	(เปอร์เซ็นต์)
0	0	3.85	3.72a	0.49	0.125a	25.20
	24	3.80	2.97ab	0.39	0.061b	15.60
	48	4.00	2.71b	0.46	0.054b	11.78
2	0	3.85	3.72a	0.49	0.125a	245.2
	24	4.00	3.07ab	0.52	0.075b	14.29
	48	4.05	3.55ab	0.53	0.129a	24.30
4	0	3.85	3.72a	0.49	0.125a	25.20
	24	3.80	3.40ab	0.39	0.053b	13.50
	48	3.72	3.68a	0.57	0.113ab	10.45
C.V.(%)		30.44	38.67	53.67	45.97	
A (ความเข้มข้น)		ns	ns	ns	**	
B (ระยะเวลา)		ns	*	ns	ns	
A x B		ns	ns	ns	ns	

1/ ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * แตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามลำดับ

ตารางที่ 9 ปริมาณ Stemona Alkaloids รวมจากสารสกัดอย่างหยาบด้วยเมธานอลจากรากของหนอนตายหยากที่นำต้นกล้าไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม Abscissic acid (ABA) Methyl-Jasmonate (Me-JA) Ethelyne (Ethephon) และ Ca^{2+} (CaCl$_2$) ในความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แล้วย้ายลงไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	Total Stemona Alkaloids (% มิลลิกรัม)			
		ABA	MeJA	Ethephon	CaCl$_2$
0	0	17.698 a	9.797 c	14.582 b	7.946 g
	24	18.119 d	13.815 a	9.752 d	9.842 b
	48	18.510 b	7.810 f	20.045 a	9.466 d
2	0	17.698 a	9.797 c	14.582 b	7.946 g
	24	21.008 a	8.618 e	9.451 e	9.676 c
	48	18.179 c	9.646 d	10.865 c	10.128 a
4	0	17.698 a	9.797 c	14.582 b	7.946 g
	24	17.998 e	10.068 b	9.195 f	9.360 d
	48	17.381 f	9.767 c	8.427 g	8.352 f
C.V. (%)		0.107	0.242	0.167	0.214
ระยะเวลา (A)		**	**	**	**
ความเข้มข้น (B)		**	**	**	**
A x B		**	**	**	**

[1/] ** แตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

[2/] วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (T90 UV/Vis, P&G Instrument) ที่ความยาวคลื่น 297 นาโนเมตร

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1. การคัดเลือก clone ที่ผลิตรากปริมาณมากและมีการสะสมของสารอัลคาลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ

จากการนำยอดของหนอนตายหยาก โคลน NM04 NM05 NM09 NM10 NM19 มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 2, และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ระดับความเข้มข้นของ IAA มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งใน ความสูงต้น จำนวนยอด จำนวนข้อ และจำนวนกิ่งแขนง โดย IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NM19 มีความสูงต้นมากที่สุด IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NM19 มีจำนวนยอด จำนวนข้อ และจำนวนกิ่งแขนงมากที่สุด คือ 4.53 ยอด 19.00 ข้อ และ 2.80 กิ่งแขนง ตามลำดับ จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวราก ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในแต่ละโคลน โดย IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับชุดโคลน NM05 มีจำนวนใบมากที่สุด รองลงมาคือ ชุดควบคุมร่วมกับชุดโคลน NM05 และ IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับชุดโคลน NM05 ได้แก่ 3.73 3.47 และ 2.80 ใบ ตามลำดับ จำนวนราก พบว่า IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับชุดโคลน NM04 มีจำนวนรากมากที่สุด คือ 2.67 ราก รองลงมา คือ IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับชุดโคลน NM04 และ IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับชุดโคลน NM09 ได้แก่ 1.17 และ 0.53 ราก ตามลำดับ ส่วนความยาวราก พบว่า ชุดควบคุม และ IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับชุดโคลน NM04 มีความยาวรากมากที่สุด คือ 0.28 เซนติเมตร รองลงมาคือ IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับชุดโคลน NM09 และ NM04 ได้แก่ 0.27 และ 0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับงานทดลองของ Montri (2005) ที่พบว่าหนอนตายหยากแต่ละโคลนมีการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่อสารควบคุมการเจริญทั้งชนิดและความเข้มข้นแตกต่างกัน และ Montri และคณะ (2006) ได้รายงานว่าการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 5-20 µM สามารถชักนำให้ราก และสามารถย้ายต้นออกปลูกในโรงเรือนได้ และเมื่อต้นที่ได้สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับต้นที่ได้จากสภาพธรรมชาติ

สารทุติยภูมิเป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ของพืช เมื่อพืชเกิดสภาวะความเครียด การเข้าทำลายของโรคและแมลง การกัดกินของสัตว์ หรือการปล่อยสารพิษจากพืช จุลินทรีย์และแมลงเข้าทำลาย โดยพืชชนิดนั้น ๆ จะมี receptor ทำให้เซลล์พืชหยุดการพัฒนาหรือชะงักการเจริญเติบโต และสังเคราะห์สารต่าง ๆ ขึ้น มาทำหน้าที่กระตุ้นให้พืชสร้างสารทุติยภูมิต่าง ๆ เพื่อช่วยให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะความเครียดนั้น ๆ โดยสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นมานี้ไม่ได้มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่จำเป็นต่อการอยู่รอด (Zhao et.al. 2005) โดยสังเคราะห์สารแตกต่างกันไปตามชนิดพืช และการกระตุ้นที่ได้รับ จากผลการทดลองพบว่า รากหนอนตายหยากทุกโคลนเกิดสีส้มหลังส่วนเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าโคลนรหัส NM19 มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 11.151 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม รองลงมาคือโคลนรหัส NM04 และ NM05 โดยมีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสาร 10.715 และ 9.195 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สอดคล้องกับงานทดลองของ Montri (2005) ที่พบว่าหนอนตายหยากแต่ละโคลนมีความแตกต่างของการสะสมสารอัลคาลอยด์แตกต่างกัน

การทดลองที่ 2 ผลของการให้สารละลายเอทธิฟอนต่อการเกิดรากและปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

เอทิลีน (ethylene) เป็นฮอร์โมนพืชที่มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการเติบโตที่เกี่ยวข้องกับการชราภาพ และควบคุมการเจริญของพืชเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม มีส่วนในการกระตุ้นการเกิดของใบ แต่เมื่อเกิดใบขึ้นแล้วจะยับยั้งการแผ่ขยายของใบ (Dugardeyn, and Van Der Straeten, 2008) ส่งผลให้การเจริญของกิ่งและใบลดลง โดยเฉพาะบริเวณปล้อง ทำให้ไปยับยั้งการยืดยาวของลำต้น และลำต้นจะอ้วนหนาขึ้น (วันทนี, 2542) และกรณีที่ลำต้นมีการแตกกอสูง มีทรงพุ่มแผ่ขยาย มีใบมากลักษณะใบจะกางออก จึงสามารถสังเคราะห์แสง ได้มากขึ้น เพื่อให้ได้พลังงานและคาร์บอน ทำให้เกิดการแตกรากใหม่มากขึ้น (ลิลลี่, 2546) และ ชักนำให้เกิดขนรากมากขึ้น (Dugardeyn, and Van Der Straeten, 2008) ซึ่งจากผลการทดลองโดยนำต้นหนอนตายหยากที่มีราก มาแช่สาร Ethephon ความเข้มข้น 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับระยะเวลาในการแช่สารที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 2 เดือนพบว่า จำนวนรากไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา จำนวนรากมาที่สุดที่ 5.80 ราก ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของสุกัญญา (2554) ที่ทำการทดลองพบว่าการแช่สาร ethephon ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง มีจำนวนรากมากที่สุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากกอที่ไม่ได้เติมสารเอทีฟอน ไม่ได้ถูกยับยั้งกระบวนการเจริญเติบโตจึงสามารถพัฒนาทางลำต้นได้เต็มที่ และโดยทั่วไปเอทิลีนมีผลต่อการยับยั้งความยาวของราก ผลของเอทิลีนต่อรากจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด (Dugardeyn, and Van Der Straeten, 2008) ส่วนความยาวรากมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างระยะเวลาของการแช่ แต่ไม่มีความแตกต่างความเข้มข้น และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีความยาวมากที่สุด ที่ 5.00 เซนติเมตร น้ำหนักสด มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างระยะเวลาของการแช่ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น และความเข้มขันร่วมกับเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักสดมากที่สุด ที่ 0.67 กรัม น้ำหนักแห้ง มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างระยะเวลาของการแช่ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น และความเข้มขันร่วมกับเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด ที่ 0.08 กรัม

ได้มีรายงานการนำ ethephon มาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน เนื่องจาก ethephon เป็นหนึ่งในสารที่ทำหน้าที่กระตุ้นสารเป็น receptor และทำหน้าที่รับส่งสัญญาณที่สำคัญในการสร้างสารทุติยภูมิในพืช (Zhao et.al. 2005) ซึ่ง Saw และคณะ (2010) ประสบความสำเร็จในใช้สาร ethephon ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารแอนโทไซยานินในองุ่น และพบว่าปริมาณของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของวันที่เลี้ยงจนมากที่สุดเมื่อเลี้ยงเซลล์องุ่นจนถึงวันที่ 18 อย่างไรก็ตามจากการเลี้ยงแคลลัสของ *Rubia cordifolia* พบว่าการเติม ethephon ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของสาร anthraquinone (Bulgakov et al., 2002) และจากการทดลองครั้งนี้พบว่า รากหนอนตายหยากจากทุกทรีทเมนท์เกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วย dragendorff's reagent ส่วนเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 20.045 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม

การทดลองที่ 3 ผลของการให้สาร jasmonic acid (JA) ต่อการเกิดรากและปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

Methyl Jasmonate เป็นสารกลุ่ม oxylipin มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช และเป็นสารอินทรีย์ที่พบในพืชหลายชนิด มีผลในด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตและกระตุ้นการชราและการหลุดร่วงของใบ การลงหัว การขดของมือพืช การสุกและการสร้างเม็ดสีในผล ยับยั้งการงอกของเมล็ด ยับยั้งการเจริญของราก ยับยั้งการสังเคราะห์แสงของพืช (วันทนี, 2542 และสัมฤทธิ์, 2544) ซึ่งจากการทดลองแช่ต้นกล้าในสารอาหาร MS ที่เติม Jasmonic acid ความเข้มข้นและเวลาต่างกัน แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือนพบว่า จำนวนรากความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา

รากของหนอนตายหยากเกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วย dragendorff's reagent และมีการสะสมสารอัลคาลอยด์ในทุกทรีทเมนท์ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก methyl-Jasmonate เป็นสารที่ทำหน้าที่กระตุ้นสารเป็น receptor และทำหน้าที่รับส่งสัญญาณที่สำคัญในการสร้างสารทุติยภูมิในพืช (Zhao et.al. 2005) สอดคล้องกับรายงานของ Chen และคณะ (2006) ได้ทำการทดลองใช้ methyl-Jasmonate (MeJA) ความเข้มข้น 0.001- 1 ไมโครโมล เป็นเวลา 1-6 วัน ต่อปริมาณของสาร caffeoylputrescine (CP) ในมะเขือเทศ พบว่า การให้ MeJA มีผลต่อการสะสมสาร CP โดยปริมาณสารเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ MeJA และระยะเวลาที่ได้ให้สาร แต่มีแนวโน้มลดลงที่ความเข้มข้นสูงคือ 1 ไมโครโมล และในวันที่ 4 เป็นต้นไป และ Chicana and Dheeranupattana (2012) ได้ทดลองใช้ สาร MeJA การกระตุ้นให้เกิดการสร้างสาร Stemona alkaloids ใน *Stemona* sp. พบว่าปริมาณสารมากที่สุด ที่ความเข้มข้นของ MeJA 1.0 mMหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยมีปริมาณสาร1,2-didehydrostemofoline และ stemofoline เพิ่มขึ้น 1.16 และ 1.42 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ได้รับสาร จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 13.815 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม

การทดลองที่ 4 ผลของการให้สาร ABA ต่อการเกิดรากและปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

Abscisic acid เป็นฮอร์โมนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช ทำให้พืชทนต่อสภาวะเครียดต่างๆได้ดี มีบทบาทในการเจริญพัฒนาของเอ็มบริโอ และมีผลต่อการพักตัวของเมล็ดและของตาพืชกรดแอบไซซิกมีผลในการลดการคายน้ำและเพิ่มการดูดซึมน้ำของราก กระตุ้นการดูดไอออนเข้าสู่ราก ชักนำการเติบโตของราก กระตุ้นการเกิดรากแขนง (สัมฤทธิ์, 2544) อย่างไรก็ตามจากการทดลองนำต้นหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร สูตร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า จำนวนรากความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา

ส่วนสารสกัดจากรากหนอนตายหยากเมื่อนำมาตรวจสอบการสะสมสารอัลคาลอยด์พบว่าเกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วย dragendorff's reagent และเกิดการสะสมของสารอัลคาลอยด์ในทุกทรีทเมนท์ อาจเนื่องจาก ABA เป็นตัวรับ elicitors ทำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนอง เพื่อป้องกันตัวของพืช ซึ่งการให้สารที่ทำหน้าที่รับสัญญาณมากระตุ้นในการสร้างสารทุติยภูมิในพืช (Zhao et.al. 2005) โดยเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 21.008 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม

การทดลองที่ 5 ผลของการให้สาร Ca^{2+} ต่อการเกิดรากและปริมาณของสารอัลคาลอยด์รวมในรากหนอนตายหยาก

แคลเซียมทำหน้าที่ในการควบคุมการเคลื่อนย้ายของสารอาหารต่างๆเข้าสู่พืช และยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการ ทำงานของเอนไซม์พืชหลายชนิด (Allen et al., 2007) จากการทดลองโดยนำต้นของหนอนตายหยากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Ca^{2+} ในรูป $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า การเกิดรากของหนอนตายหยากในอาหารที่เติม $CaCl_2$ ระยะเวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวนรากไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา ความยาวรากมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างระยะเวลาของการแช่ แต่ไม่มีความแตกต่างความเข้มข้น และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีความยาวรากมากที่สุด ที่ 3.68 เซนติเมตร น้ำหนักสด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างระยะเวลาของการแช่ ความเข้มข้น และความเข้มข้นร่วมกับเวลา และน้ำหนักแห้ง มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับเวลา โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด ที่ 0.129 กรัม และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งมากที่สุด 25.20 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการแช่ 0 ชั่วโมง (ไม่แช่สาร)

แคลเซียมไอออนทำหน้าที่กระตุ้นสารเป็น receptor และทำหน้าที่รับส่งสัญญาณที่สำคัญในการสร้างสารทุติยภูมิในพืช (Zhao et.al. 2005) ซึ่งจากการเลี้ยงต้นกล้าในอาหารที่เติม $CaCl_2$ ไปตรวจสอบอัลคาลอยด์ พบว่ารากหนอนตายหยากจากทุกทรีทเมนท์เกิดสีส้มหลังการฉีดพ่นด้วย dragendorff's reagent ส่วนเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 20.045 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม สอดคล้องกับการทดลองของ Curtis และคณะ (1995) ที่ได้ทำการศึกษาผลของการให้แคลเซียม ต่อเซลล์ของ *Hyoscyamus muticus* พบว่า การให้แคลเซียมในรูปของ *Calcium alginate* สามารถปรับปรุงการสังเคราะห์สาร sesquiterpene เพิ่มขึ้นในเซลล์พืชดังกล่าวได้ดี โดยจากการนำสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากที่ได้

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเพิ่มคุณภาพต้นพันธุ์หนอนตายหยากเพื่อการผลิตสารอัลคาลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยทำการคัดเลือกโคลนที่ให้ผลผลิตรากสูงและผลของอะไบโอติกอิลิซิเตอร์บางชนิดต่อการสะสมสารอัลคาลอยด์ของรากในสภาพปลอดเชื้อ สรุปผลได้ดังนี้

1. โคลน NM04 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุด คือ 2.67 ราก และที่ความเข้มข้นของ IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากมากที่สุด คือ 0.28 เซนติเมตรรากหนอนตายหยากทุกโคลนมีการสะสมสารอัลคาลอดย์ได้ในสภาพปลอดเชื้อ และโคลนรหัส NM19 มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารอัลคาลอยด์มากที่สุดที่ 11.151 เปอร์เซ็นต์

2. การแช่ ethephon ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีจำนวนรากมาที่สุดที่ 5.80 ราก และมีน้ำหนักแห้งมากที่สุด ที่ 0.08 กรัม ส่วนการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีความยาวรากมากที่สุด ที่ 5.00 เซนติเมตร และมีน้ำหนักสดมากที่สุด ที่ 0.67 กรัม รากหนอนตายหยากจากที่ได้รับ ethephon ทุกทรีทเมนท์มีการสะสมสารอัลคาลอยด์รวม โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 20.045 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม

3. การแช่ methyl jasmonate ที่ความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อจำนวนรากความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง รากหนอนตายหยากจากที่ได้รับ methyl jasmonate ทุกทรีทเมนท์มีการสะสมสารอัลคาลอยด์รวม และเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 13.815 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม

4. การแช่ abscisic acid ที่ความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อจำนวนรากความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง รากหนอนตายหยากจากที่ได้รับ abscisic acid ทุกทรีทเมนท์มีการสะสมสารอัลคาลอยด์รวม และเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 21.008 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม

5. การแช่แคลเซียม ที่ ระยะเวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวนรากไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้น ระยะเวลาของการแช่ และความเข้มข้นร่วมกับระยะระยะเวลา ความยาวรากมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่ต้นกล้าที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักสดมากที่สุด ที่ 3.68 เซนติเมตร น้ำหนักสด ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด ที่ 0.129 กรัม และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งมากที่สุด 25.20 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการแช่ 0 ชั่วโมง รากหนอนตายหยากจากที่ได้รับ แคลเซียมทุกทรีทเมนท์มีการสะสมสารอัลคาลอยด์รวม และเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของ total stemona alkaloids มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาการแช่สาร และความเข้มข้นร่วมกับ

ระยะเวลาของการแช่ โดยการแช่สารที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์มิลลิกรัมของสารมากที่สุดที่ 20.045 เปอร์เซ็นต์มิลลิกรัม

เอกสารอ้างอิง

กีรติ ข่อยแก้ว. 2552. ผลของออกซินต่อการพัฒนาของหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี หลักสูตรพืชสวน สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว. 2538. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 8 ชนิดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและโรคผิวหนังที่กำหนด. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ชนนิกานต์ ขวัญช่วย. 2550. ผลของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อการยับยั้งเชื้อราโรคพืชบางชนิด. ปัญหาพิเศษ สาขาวิชาพืชสวน สถาบันเทคโนดลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, ชุมพร.

ณุฉัตรา วีระฉัตร. 2528. ผลของสารสกัดหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib) ต่อสัตว์น้ำบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 41 หน้า.

นาตยา มนตรี. 2549. การขยายพันธุ์หนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.). โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. การประชุมวิชาการ ม.อุบลวิจัย ครั้งที่ 1 วันที่ 27-29 กรกฎาคม 2549, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี

ทวีศักดิ์ ชัยเรืองยศ. 2542. พัฒนาหนอนตายหยากเป็นสมุนไพรฆ่าแมลง. หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ฉบับวันพุธที่ 17 พฤศจิกายน พ.ศ. 2542. หน้า 27.

ประทุมวัน เสาร์ประโคน. 2542. ผลของ BA และ NAA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ราก และตาข้อของต้นหนอนตายหยาก (*Stemona collonsae* Craib) ในสภาพปลอดเชื้อ. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พิทักษ์ อินธิมา และ กัณยารัตน์ สุไพบูลย์วัฒน. 2552. การกระตุ้นการสร้างสารอาร์ทีมิซินินในรากเพาะเลี้ยงของชิงเฮา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40, 1: 75.

พรรนิภา ชุมศรี. 2534. การผลิตชีววัตถุออกฤทธิ์ทางเภสัชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพร. *ใน* ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. 442-462. กรุงเทพมหานคร: ภาคเภสัชนิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาลัยมหิดล.

ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์ยา. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ภาควิชาพฤกษศาสตร์. 2535. พรรณพฤกษชาติประเทศไทย. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ฟ จำกัด. กรุงเทพ ฯ . 118 หน้า.

เลาจนา ธีรภัทรสกุล และ ประคอง พันธุ์อุไร. 2520. การศึกษาพิษของหนอนตายหยากที่มีต่อหนอนแมลงวันบ้าน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 19(3): 217-226.

วันทนี สว่างอารมณ์. 2542. การเจริญและการเติบโตของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

วิชัย หญ้าปรัง. 2546. การเจริญเติบโตและลักษณะทางพฤษศาสตร์ของหนอนตายหยาก. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร.

ศุภวรรณ บุญระเทพ. 2549. การผลิตสารทุติยภูมิโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเทคโนโลยีชีวภาพ.

วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 20, 2: 185-196.

ศิริรัตน์ พูลศรีกาญจน์. 2543. การพัฒนาของผลและระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวมะแว้งเครือเพื่อให้ได้สารเสตียรอยด์และอัลคาลอยด์สูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาพืชไร่นา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิริวรรณ บุรีคำ มณฑา วงศ์มณีโรจน์ สุรัตน์วดี จิวะจินดา และรงรอง หอมหวล. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยากและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง ปีที่ 18 (2) : 8-11

สุมนา นีระ ปรีชา นีระ และรวมชาติ แต่พงษ์โสรัถ. 2538. การศึกษาการขยายพันธุ์และการปลูกเลี้ยงต้นหนอนตายหยาก. เอกสารรวบรวมผลงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ครบรอบ 10 ปี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 196-197.

สุรชาติ ไชยศรีหา. 2551. การชักนำให้เกิดแคลลัสของหนอนตายหยาก. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี หลักสูตรพืชสวน สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมพร ภูติยานันต์, 2542. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทยว่าด้วยสมุนไพรไทยและการแพทย์แผนไทย. โครงการพัฒนาตำรา สถาบันการแพทย์แผนไทย, กรุงเทพฯ.

สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2544. สรีรวิทยาการพัฒนาการของพืช. กรุงเทพฯ: คลังนานาวิทยา.

อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์. 2546. การศึกษาการผลิต และการขยายพันธุ์หนอนตายหยาก. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

Allen V. Barker and D. J. Pilbeam, 2007. Handbook of plant nutrition, CRC Press

Brem, B., T.Pacher, C. Seger., O.Hofer, S.Vajroday. H.Greger. 2001. *Stemona* alkaloids - a source of potent natural insecticides. - J. Agric. Food. Chem.

Chen H., A. D. Jones, G. A. Howe. 2006. Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. FEBS Letters 580: 2540–2546

Curtis W.R., P. Wang, A. Humphrey. 1995. Role of calcium and differentiation in enhanced sesquiterpene elicitation from calcium alginate-immobilized plant tissue. Enzyme and Microbial Technology 17:554-557

Dugardeyn, J., and Van Der Straeten, D. 2008. Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. Plant Science, 175, 59 – 70

Dewick PM (1997) Medicinal natural products. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Dixon, R.A. 1985. Plant Cell Culture. IRL Press, Oxford. 236 pp.

Kaltenegger, E., Brem, B., Mereiter, K., Kalchhauser, H., Kahlig, H., Hofer, O., Vajrodaya, S. and Greger H. 2003. Insecticidal pyrido (1,2-a)azepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species. Phytochem. 63: 803-816

Montri N. 2005. Biotechnological approaches to the biologically active compounds of the Thai medicinal plants *Stemona tuberose* Lour. and *Stemona curtsii* Hook.f.

(Stemonaceae). Dotoral Thesis, Institute of Pharmacognosy, Faculty of Life Science, University of Vienna, Austria.

Montri N., 2006. In vitro propagation and some secondary compounds production of *Stemona curtisii* Hook.f. International Horticultural Congress. 12-19 August 2006, Seoul, Korea.

Montri, N., Wawrosch, C.H. and Kopp, B. 2006. Micropropaation of *Stemona curtisii* Hook.f.., A Thai medicinal plant. Acta Hort. (725):341-346

Montri N., Wawrosch C., Kopp B. 2005. Embryogenic callus induction of *Stemona tuberosa* Lour. the 2005 In Vitro Biology Meeting, 5-7 June, 2005 Baltimore Maryland USA.

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

Namdeo A.G. 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review.
Pharmacognosy Reviews vol 1. 1: 69-75.

Villegas Ma, M. Sommarina, P. E. Brodelius. 2000. Effects of sodium orthovanadate on benzophenanthridine alkaloid formation and distribution in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica. Plant Physiol. Biochem.*, 2000, 38 (3), 233–241

Wang J., Seliskar D.M. Gallagher J.L. 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the brackish wetland monocot *Scirpus robustus*. Aquatic Botany (79): 163-174.

Zhao J., T. Lawrence, C. Davis, R. Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23 (2005) 283–333

Zhao J., W. Zhu, Q. Hu. 2001. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture. Enzyme and Microbial Technology 28: 666–672

Zheng Z., M. Wu. 2004. Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. Plant Science 166 : 507–514.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากจำนวน 5 โคลน ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	4	26.6795	6.6699	82434.46	0.0001**
Error	10	0.0055	0.0081	0.0008	
Total	14	11.6116			

C.V. (%) = 0.302

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน จำนวนรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	35.24	4.41	1.75	0.1192ns
A	2	4.58	2.29	0.91	0.4110ns
B	2	11.91	5.96	2.31	0.1078ns
A*B	4	18.76	4.69	1.87	0.1375ns
Error	36	90.40	2.51		
Total	44	125.64			

C.V. (%)= 40.52

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ความยาวรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	91.54	11.44	4.33	0.0010**
A	2	6.09	3.05	1.15	0.3269ns
B	2	57.48	28.74	10.88	0.0002**
A*B	4	27.97	6.99	2.65	0.0491*
Error	36	95.10	2.64		
Total	44	186.64			

C.V. (%) = 50.97

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* และ ** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญและสำคัญยิ่งจากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักสดรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	2.01	0.25	2.45	0.0316*
A	2	0.03	0.01	0.15	0.8654ns
B	2	1.11	0.56	5.42	0.0088**
A*B	4	0.87	0.22	2.11	0.0996ns
Error	36	3.69	0.10		
Total	44	5.70			

C.V. (%) = 87.19

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* และ ** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญและสำคัญยิ่งจากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักแห้งของรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	0.023	0.003	2.61	0.0232*
A	2	0.002	0.001	0.72	0.4935ns
B	2	0.014	0.007	6.47	0.0040**
A*B	4	0.007	0.002	1.62	0.1906ns
Error	36	0.040	0.001		
Total	44	0.063			

C.V. (%) = 89.64

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* และ ** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญและสำคัญยิ่งจากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน จำนวนรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	0.023	0.003	2.61	0.0232*
A	2	0.002	0.001	0.72	0.4935ns
B	2	0.014	0.007	6.47	0.0040**
A*B	4	0.007	0.002	1.62	0.1906ns
Error	36	0.040	0.001		
Total	44	0.063			

C.V. (%) = 89.64

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* และ ** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญและสำคัญยิ่งจากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ความยาวรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	18.73	2.34	0.65	0.7296ns
A	2	3.36	1.68	0.47	0.6309ns
B	2	10.27	5.14	1.43	0.2529ns
A*B	4	5.10	1.27	0.35	0.8392ns
Error	36	129.44	3.60		
Total	44	148.16			

C.V. (%) = 89.64

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักสดรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	1.08	0.13	1.45	0.2094ns
A	2	0.13	0.07	0.73	0.4903ns
B	2	0.66	0.33	3.57	0.0387*
A*B	4	0.28	0.07	0.76	0.5602ns
Error	36	3.34	0.08		
Total	44	4.41			

C.V. (%) = 55.33

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* แตกต่างทางสถิติจากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักแห้งรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม MeJA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	0.011	0.001	0.081	0.6022ns
A	2	0.001	0.005	0.032	0.7300ns
B	2	0.006	0.003	1.47	0.1906ns
A*B	4	0.004	0.001	0.58	0.6765ns
Error	36	0.06	0.001		
Total	44	0.07			

C.V. (%) = 71.97

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน จำนวนรากหนอนของต้นกล้าตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	32.58	4.07	0.88	0.54400ns
A	2	9.64	4.82	1.05	0.3618ns
B	2	15.24	7.62	1.65	0.2057ns
A*B	4	7.69	1.92	0.42	0.7953ns
Error	36	166.00	4.61		
Total	44	198.58			

C.V. (%)= 67.57

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ความยาวรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	62.69	7.84	0.94	0.4988ns
A	2	8.36	4.18	0.50	0.6107ns
B	2	27.77	13.88	1.66	0.2044ns
A*B	4	26.56	6.64	0.79	0.5369ns
Error	36	301.10	8.36		
Total	44	363.79			

C.V. (%)= 80.38

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักสดรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	0.78	0.10	1.09	0.3939ns
A	2	0.14	0.07	0.78	0.4653ns
B	2	0.25	0.12	1.39	0.2617ns
A*B	4	0.39	0.10	1.09	0.3769ns
Error	36	0.23	0.09		
Total	44	4.01			

C.V. (%)= 103.76

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักแห้งรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ABA ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	9.38	1.17	0.93	0.5013ns
A	2	0.84	0.42	0.34	0.7166ns
B	2	1.64	0.82	0.65	0.556ns
A*B	4	6.89	1.72	1.37	0.2631ns
Error	36	45.20	1.26		
Total	44	54.84			

C.V. (%)= 61.49

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน จำนวนรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	1.858	0.309	0.20	0.9770ns
A	2	1.342	0.671	0.43	0.6527ns
B	2	0.162	0.081	0.05	0.9497ns
A*B	4	0.353	0.176	0.11	0.8935ns
Error	36	205.511	1.568		
Total	44	207.369			

C.V. (%) = 32.187

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ความยาวรากหนอนของต้นกล้าตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	17.597	2.931	1.84	0.0953ns
A	2	3.690	1.845	1.16	0.3165ns
B	2	4.877	2.438	1.53	0.2195ns
A*B	4	9.023	4.511	2.84	0.0622ns
Error	36	208.267	1.589		
Total	44	225.858			

C.V. (%)= 38.242

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักสดของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม $CaCl_2$ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	6.5868	1.0978	1.47	0.1934ns
A	2	1.8920	0.9460	1.27	0.2853ns
B	2	1.8859	0.9429	1.26	0.2864ns
A*B	4	2.8088	1.4044	1.88	0.1567ns
Error	36	98.6145	0.7470		
Total	44	105.2014			

C.V. (%)= 156.7014

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน น้ำหนักแห้งรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	0.011	0.001	0.081	0.6022ns
A	2	0.001	0.005	0.032	0.7300ns
B	2	0.006	0.003	1.47	0.1906ns
A*B	4	0.004	0.001	0.58	0.6765ns
Error	36	0.06	0.001		
Total	44	0.07			

C.V. (%) = 71.97

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม ethephon ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	313.3727	52.2287	99999.99	0.0001**
A	2	150.3698	0.0003	99999.99	0.0001**
B	2	87.7122	75.1849	99999.99	0.0001**
A*B	4	75.2907	43.8561	99999.99	0.0001**
Error	36	0.0054	37.6453		
Total	44	313.378			

C.V. (%)= 0.167

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม jasmonic acid ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	65.1725	10.8620	18774.00	0.0001**
A	2	6.9755	3.4877	6028.29	0.0001**
B	2	13.4564	6.7282	111629.06	0.0001**
A*B	4	44.7405	22.370	38664.64	0.0001**
Error	36	0.0081	0.0005		
Total	44	65.1806			

C.V. (%) = 0.242

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม absissic acid ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	25.8976	4.3162	11066.02	0.0001**
A	2	12.331	6.1655	15807.10	0.0001**
B	2	6.4597	3.2298	8280.71	0.0001**
A*B	4	7.1068	3.5534	9110.24	0.0001**
Error	36	0.0054	0.0003		
Total	44	25.9030			

C.V. (%)= 0.107

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณอัลคาลอยด์รวมจากรากของต้นกล้าหนอนตายหยากที่ผ่านการแช่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม CaCl$_2$ ความเข้มข้นต่าง 0 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน

Source	DF	SS	MS	F-Value	Pr>F
Treatment	8	11.6060	1.9343	4904.77	0.0001**
A	2	3.7283	1.8641	4726.89	0.0001**
B	2	6.4133	3.2066	8130.93	0.0001**
A*B	4	1.4643	0.7321	1856.49	0.0001**
Error	36	0.0055	0.0003		
Total	44	11.6116			

C.V. (%) = 71.97

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ประวัตินักวิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวนาตยา มนตรี
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Nattaya Montri
2. ตำแหน่งปัจจุบัน : ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)**

สถานที่ทำงาน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร
หมู่ที่ 6 ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 86160
โทรศัพท์ 0-7750-6431 โทรสาร 0-7759-1445, 0-7759-446
E-mail : kmnattay@kmitl.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชาเอก	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2548	เอก	Dr.rer.nat	Pharmacy	Plant Biotechnology	University of Vienna	Austria
2541	โท	วท.ม.	เกษตรศาสตร์	พืชสวน	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2536	ตรี	วท.บ.	เกษตรศาสตร์	พืชสวน	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, การผลิตสารทุติยภูมิ
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ประสบการณ์งานวิจัย

7.1.1 ปีงบประมาณ 2537 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะขามป้อม สถานะภาพ : ผู้ร่วมโครงการวิจัย

7.1.2 ปีงบประมาณ 2543 รวบรวมพันธุ์ไม้พื้นเมืองในจังหวัดชุมพร สถานะภาพ : หัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.3 ปีงบประมาณ 2544 การผลิตดองดึงเพื่อการค้า สถานะภาพ : ผู้ร่วมโครงการวิจัย

7.1.4 ปีงบประมาณ 2545-2546 การผลิตผักเหลียงเชิงพาณิชย์ สถานะภาพ : ผู้ร่วมโครงการวิจัย

7.1.5 ปีเงินงบประมาณ 2551 การขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้เพชรหึงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการปลูกพืชไม่ใช้ดิน สถานะภาพ : หัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.6 ปีเงินงบประมาณ 2551 การชักนำแคลลัสในหนอนตายหยากเพื่อการผลิตสาร สารอัลคาลอยด์ สถานะภาพ : หัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.7 ปีเงินงบประมาณ 2551 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในกล้วยหอมทอง สถานะภาพ : ผู้ร่วมโครงการวิจัย

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

นาตยา มนตรี ชูพงษ์ สุกุมลนันทน์ สุรศักดิ์ นิลนนท์ สุรียา ตันติวิวัฒน์ และ พรชัย จุฑามาศ. 2542. การขยายพันธุ์มะขามป้อมในสภาพปลอดเชื้อ. *ใน* เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการครั้งที่ 38 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 356-361.

จินดา สุดวัดแก้ว กนกพร บุญญอติชาติ และนาตยา มนตรี. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตนกยูงทอง. *ใน* เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 41 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วันที่ 4-11 กุมภาพันธ์ 2545 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 285-289.

อัญจนา จันทร์ปะทิว ปรัศนี สุขจีบ และนาตยา มนตรี. 2549. ผลของ Benzyladenine และสารอินทรีย์บางชนิดต่อการเจริญเติบโตของกล้วยเอื้องเงินหลวงในสภาพปลอดเชื้อ. *ใน* เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 44 สาขาพืช, วันที่ 28 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2549 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 695-702.

อัญจนา จันทร์ปะทิว วรลักษณ์ นิลสังข์ และนาตยา มนตรี. 2549. การขยายพันธุ์กล้วยไม้สร้อยระย้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *ใน* เอกสารประกอบการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ครั้งที่ 7. วันที่ 25-26 พฤษภาคม 2549 ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จังหวัดเชียงใหม่.

นาตยา มนตรี. 2549. การขยายพันธุ์หนอนตายหยากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. 27-29 กรกฎาคม 2549. การประชุม ม.อุบล วิจัย ครั้งที่ 1, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินทร์ชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

นาตยา มนตรี และชนนิกานต์ ขวัญช่วย. 2551. ผลของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชบางชนิด. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7. คณะเกษตร ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

นาตยา มนตรี และจิตรเบญญา สมสมัคร, 2552, ผลของสารอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เพชรหึง, วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 40: 331-334.

นาตยา มนตรี และอุกฤษณ์ ฉิมระฆัง, 2552, การใช้วัสดุปลูกในการย้ายปลูกต้นกล้ากล้วยไม้กล้วยไม้เพชรหึง, วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 40: 335-338.

นาตยา มนตรี ผัสโสภาคย์ รัตนบันดาล และกนกพร บุญญะอติชาติ., 2552, ผลของสารพาโคลบิวทราโซลต่อการอนุบาลต้นกล้ากล้วยไม้เพชรหึง, งานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 19, วันที่ 24-25 ก.ย. 2552 ณ โรงแรม เจ บี อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา.

นาตยา มนตรี กนกพร บุญญะอติชาติ และ พงศ์พล ลือจันทึก. 2553. ผลของการใช้สารสกัดจากหนอนตายหยากต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมทอง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร41 : 1 (พิเศษ) : 333-336

กนกพร บุญญะอติชาติ, นาตยา มนตรี และเจณรงค์ มะลิพันธ์. 2553. คุณภาพของผลมะละกอในพื้นที่จังหวัดชุมพร. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร41 : 1 (พิเศษ) : 55-58

นาตยา มนตรี ผัสโสภาคย์ รัตนบันดาล และ กนกพร บุญญะอติชาติ. 2553. ผลของวัสดุปลูกร่วมกับการพรางแสงต่อการอนุบาลต้นกล้ากล้วยไม้เพชรหึง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41(3/1) (พิเศษ): 273-276

นาตยา มนตรี จุฑามาศ สุวรรณจันทร์ และ พรประพา คงตระกูล. 2553. ผลของสารสกัดอย่างหยาบจากเสม็ดขาวต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชบางชนิด. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41(3/1) (พิเศษ): 89-92

นาตยา มนตรี และสิทธิโชค วีณะคุปต์. 2553, ผลของสารแอนซิมิดอล ต่อการอนุบาลกล้วยไม้พื้นเมืองบางชนิด, งานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 20, วันที่ 18-19 ก.ย. 2553 ณ โรงแรม เจ บี อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา.

Montri N., Wawrosch C., Kopp B. 2005. Embryogenic callus induction of *Stemona tuberosa* Lour. the 2005 *In Vitro* Biology Meeting, 5-7 June, 2005 Baltimore Maryland USA.

Montri N., 2006. *In vitro* propagation and some secondary compounds production of *Stemona curtisii* Hook.f. International Horticultural Congress. 12-19 August 2006, Seoul, Korea.

Montri, N., Wawrosch C., Kopp B. 2006. Micropropagation of *Stemona curtisii* Hook f., a Thai Medicinal Plant. Acta Hort. 725: 341-346.

Montri N. and E. Wattanapreechanon. 2007. Soilless culture in Thailand. Acta Hort 759: 187-194.

Montri, N., Wawrosch, C.H. and Kopp, B. 2009. *IN VITRO* PROPAGATION OF *STEMONA TUBEROSA* LOUR., AN ANTITUSSIVE MEDICINAL HERB . Acta Hort. 812:165-172

Montri, N., Niumthong, W. and Janpatiw, A. 2009. TISSUE CULTURE OF *GRAMMATOPHYLLUM SPECIOSUM* BLUME, THE WORLD LARGEST ORCHID. Acta Hort. 812:205-210

Montri N., S. Chaisriha and C.Suwannapakdi. 2011. Callus induction of *Stemona curtisii* Hook. F. VIIth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 18-22 September 2011, Ghent, Belgium

Montri N. 2011. Selection of high total alkaloids clone of *Stemona curtisii* Hook. F. VIIth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 18-22 September 2011, Ghent, Belgium

Montri N. 2012. *In vitro* Propagation of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. International Symposium of Orchids and Ornamental Plants, 9-12 January 2012 Chiang Mai, Thailand

Montri N. 2012. Effect of Auxins and Cytokinins on Proliferation Rate and Growth of *Papilionanthe Hookeriana* Protocorms and Seedlings . International Symposium of Orchids and Ornamental Plants, 9-12 January 2012 Chiang Mai, Thailand

2. ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัย

2.1 ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายเฉลิมพล สุวรรณภักดี

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Chalermpol Suwanphakdee

2.1.1 รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี) -

2.1.2 **ตำแหน่ง** พนักงาน

2.1.3 **หน่วยงานที่สังกัด และที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์** โทรสาร และ E-mail

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร หมู่ที่ 6 ตำบล ชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 86160 โทรศัพท์ 0-7750-6431 และโทรสาร 0-7759-1445, 0-7759-446 E-mail : kschaler@kmitl.ac.th

2.1.4 ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ. ชีววิทยา	พฤกษศาสตร์	ม. เกษตรศาสตร์	2543
วท.ม. พฤกษศาสตร์	อนุกรมวิธานพืช	ม. เกษตรศาสตร์	2548

2.1.5 สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

สาขาอนุกรมวิธานพืช

2.1.6 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

2.1.6.1ผลงานวิจัยที่พิมพ์ออกเผยแพร่และ/หรือนำเสนอในการประชุมทางวิชาการ

เฉลิมพล สุวรรณภักดี. 2548. การศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลพริกไทย (*Piper* L.)ในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

C. Suwanphakdee, S. Masuthon, P. Chantharanothai, K. Chayamarit & N. Chansuvanich. 2006. Notes on the Genus *Piper* L. (Piperaceae) in Thailand. Thai Forest Bulletin Vol. 34

2.2 ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวศศิดารา เจริญศิริ

(ภาษาอังกฤษ) Miss Sasidara Jareounsiri

2.2.1 รหัสประจำตัว –

2.2.2 ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

2.2.3 หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร หมู่ 6 ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 86160 โทรศัพท์และโทรสาร (077) 591-454 e-mail : kjsasid@kmitl.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2548	ตรี	วท.บ.	พืชสวน	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	ไทย

2.2.5 สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.3 ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวจินดา สุดวัดแก้ว

(ภาษาอังกฤษ) Ms. Jinda Sudwadkeaw

2.3.1 รหัสประจำตัว –

2.3.2 ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร

2.3.3 หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร หมู่ 6 ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 86160 โทรศัพท์และโทรสาร (077) 591-454 e-mail : kmjinda@kmitl.ac.th

2.3.4 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2544	ตรี	วท.บ.	พืชสวน	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	ไทย

2.3.5 สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช