บทที่ 4
ผลการวิจัย

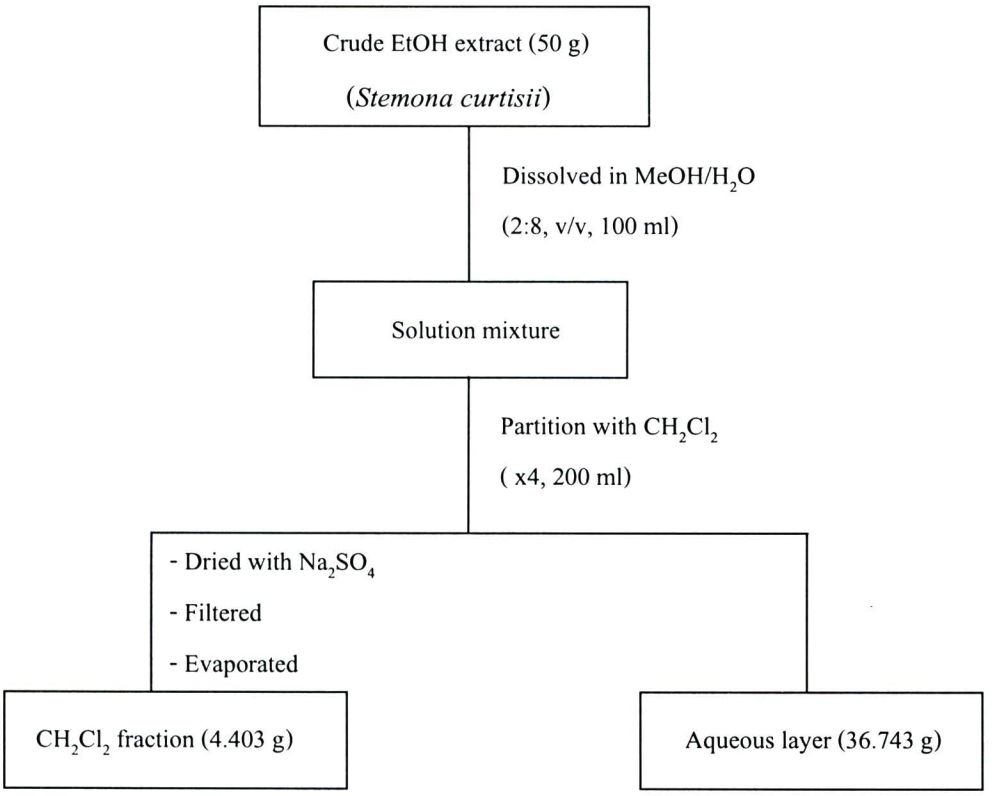
การทดลองที่ 1 การสกัดและแยกสารองค์ประกอบจากรากหนอนตายหยากให้บริสุทธิ์

จากการสกัดรากหนอนตายหยาก *Stemona curtisii* ด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ได้สารสกัดหยาบเอทานอล (crude extract) ทั้งหมด 259.886 กรัม ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับน้ำหนักแห้งได้เท่ากับ 10.40 % และ *Stemona aphylla* ได้สารสกัดหยาบเอทานอล (crude extract) ทั้งหมด 78.0 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสองชั้น ชั้นบนสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่างสีน้ำตาลเข้ม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับน้ำหนักแห้งได้เท่ากับ 7.92 % ดังแสดงในตาราง (ตาราง 2)

ตาราง 2 ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก

ข้อมูล	น้ำหนัก (กรัม)		% เทียบกับน้ำหนักแห้ง	
	Stemona curtisii	*Stemona aphylla*	*Stemona curtisii*	*Stemona aphylla*
พืชสด	17,500	6,800	-	-
พืชแห้ง	2,500	985	-	-
สารสกัดหยาบ	259.886	78.0	10.40 %	7.92 %

ทำการละลายสารสกัดหยาบเอทานอล (*Stemona curtisii*) 50 กรัม ด้วยเมทานอลกับน้ำในอัตราส่วน (2:8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดต่อโดยวิธี partition กับไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) เพื่อกำจัดน้ำที่ปนมา จากนั้นกรองและนำชั้นส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator จนได้สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน 4.403 กรัม (ภาพ 5)



ภาพ 5 แผนภูมิขั้นตอนการสกัดสาร (partition) ของหนอนตายหยาก *Stemona curtisii*

เมื่อได้สารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2 fraction) แล้ว แบ่งมาประมาณ 2.776 g นำมาแยกต่อด้วย column chromatography (CC) โดยใช้ silica gel 60 F_{254} เป็น stationary phase และ มี mobile phase คือ ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) กับ เมทานอล (MeOH) โดยค่อยๆ เพิ่มอัตราส่วนของเมทานอล เก็บตัวอย่างทีละ 400 ml แล้วนำมาวิเคราะห์ TLC โดยรวม fraction ที่ให้ผล TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 6 fraction แล้วนำแต่ละ fraction ไปทำการแยกต่อ

fraction ที่ 3 (361 mg) ถูกแยกด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) กับ เมทานอล (MeOH) (gradient elution) ได้ทั้งหมด 4 fraction จากนั้น fraction ที่ 3.3 (169 mg) ถูกแยกต่อด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ hexane:EtOAC (gradient elution) จนได้อีก 2 fraction คือ fraction 3.3.1 (66 mg) และ fraction 3.3.2 (48 mg)

fraction ที่ 3.3.1 (66 mg) ถูกแยกต่อด้วย preparative TLC โดยมี mobile phase คือ EtOAC:hexane (30:70) ได้สารใหม่ในกลุ่ม benzofuran compounds คือ stemofuran S (MW 270, 30 mg) และ fraction 3.3.2 (48 mg) ถูกแยกต่อด้วย preparative TLC โดยมี mobile phase คือ

EtOAC:hexane (10:90) ได้สาร oxystemokerrin (MW 405, 9 mg) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม alkaloids โดยทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารเทียบกับ (Kaltenegger *et al.*, 2003)

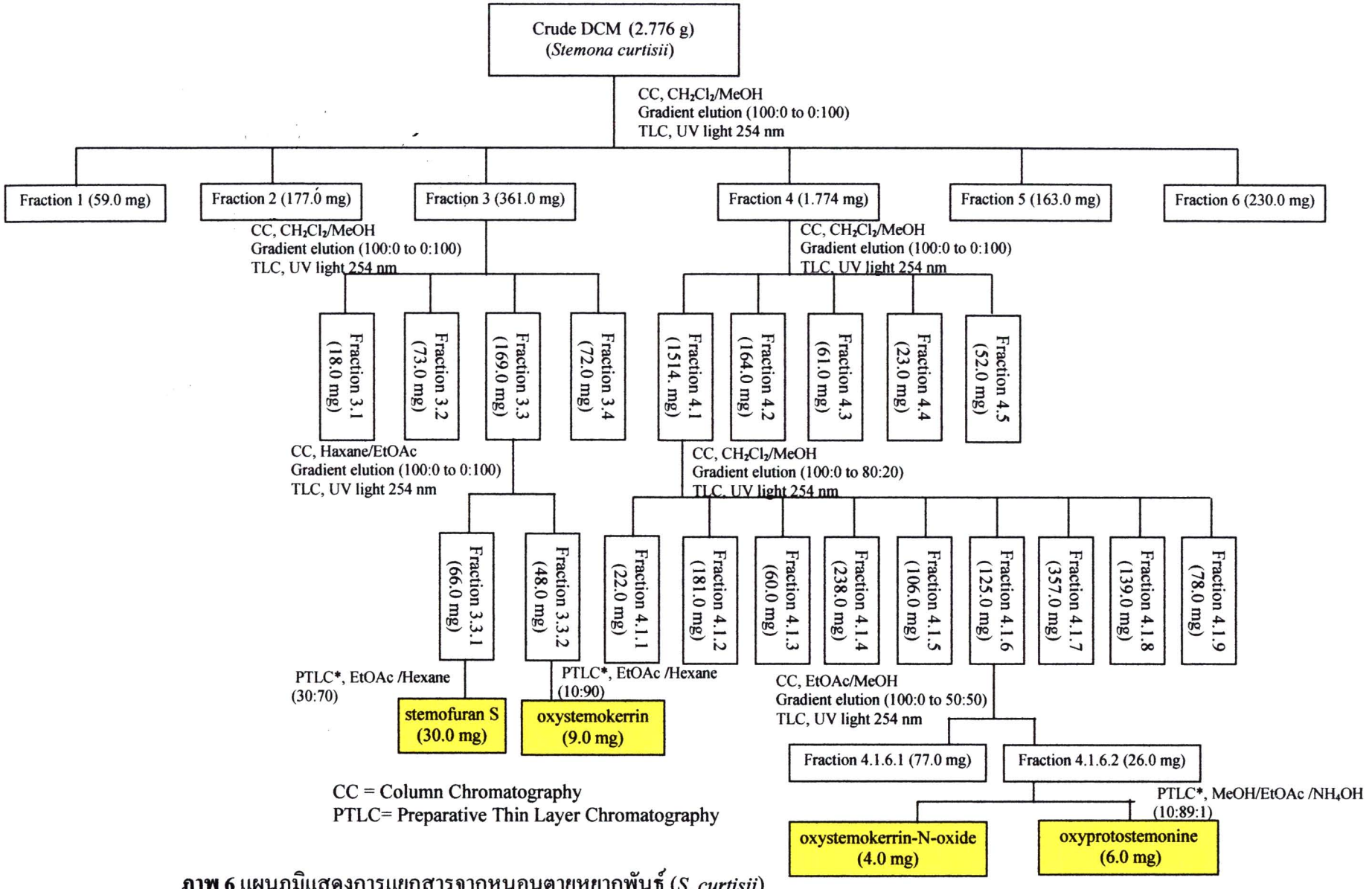
fraction ที่ 4 (1,774 mg) ถูกแยกด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) กับ เมทานอล (MeOH) (gradient elution) ได้ทั้งหมด 5 fraction จากนั้น fraction ที่ 4.1 (1,514 mg) ถูกแยกต่อด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ MeOH:DCM (gradient elution) จนได้อีก 9 fraction คือ fraction 4.1.1 (22 mg), fraction 4.1.2 (181 mg), fraction 4.1.3 (60 mg), fraction 4.1.4 (238 mg), fraction 4.1.5 (106 mg), fraction 4.1.6 (125 mg), fraction 4.1.7 (357 mg), fraction 4.1.8 (139 mg) และ fraction 4.1.9 (78 mg)

fraction ที่ 4.1.6 (125 mg) ถูกแยกด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ EtOAC:MeOH (gradient elution) ได้ทั้งหมด 2 fraction คือ fraction 4.1.6.1 (77 mg) และ fraction 4.1.6.2 (26 mg) จากนั้น fraction 4.1.6.2 (26 mg) ถูกแยกต่อด้วย preparative TLC โดยมี mobile phase คือ MeOH:EtOAC:NH_4OH (10:89:1) ได้สาร oxystemokerrin-N-oxide (MW 421, 4 mg) และ oxyprotostemonine (MW 431, 6 mg) ซึ่งสารทั้ง 2 ตัวเป็นสารในกลุ่ม alkaloids โดยทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารเทียบกับ (Kaltenegger *et al.*, 2003)

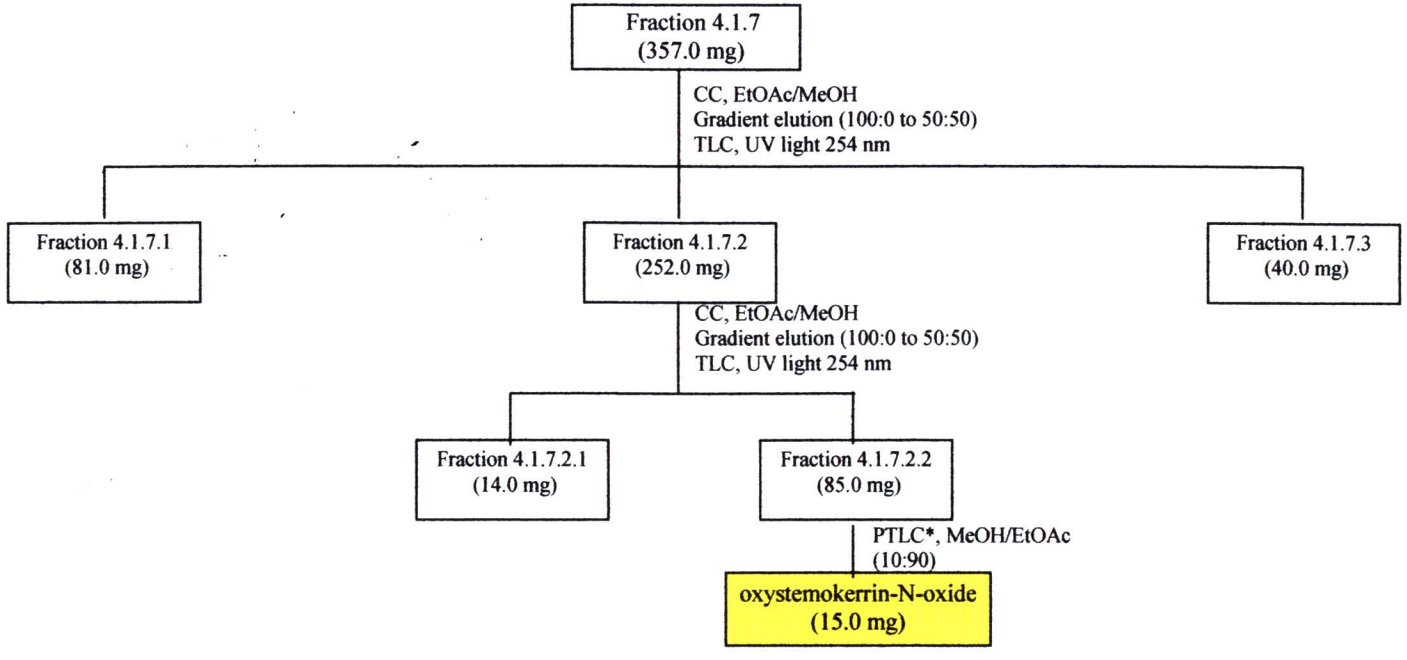
fraction ที่ 4.1.7 (357 mg) ถูกแยกด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ EtOAC:MeOH (gradient elution) ได้ทั้งหมด 3 fraction คือ fraction 4.1.7.1 (81 mg), fraction 4.1.7.2 (252 mg) และ fraction 4.1.7.3 (40 mg) จากนั้น fraction 4.1.7.3 (40 mg) ถูกแยกต่อด้วย preparative TLC โดยมี mobile phase คือ MeOH:EtOAC (20:80) ได้สาร oxystemokerrin-N-oxide (MW 421, 7 mg)

fraction ที่ 4.1.7.2 (252 mg) ถูกแยกต่อด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ EtOAC:MeOH (gradient elution) ได้ทั้งหมด 2 fraction คือ fraction 4.1.7.2.1 (14 mg) และ fraction 4.1.7.2.2 (85 mg) จากนั้นทำการแยกต่อ fraction นี้ ด้วย preparative TLC โดยมี mobile phase คือ MeOH:EtOAC (10:90) ได้สาร oxystemokerrin-N-oxide (MW 421, 15 mg)

การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ทำโดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี เช่น ^{1}H NMR, ^{13}C NMR spectra , HSQC, HMBC, NOESY และ MS เป็นต้น ช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารจากค่า chemical shift (δ) ดังแสดงการ assignment (ตาราง 3-4)



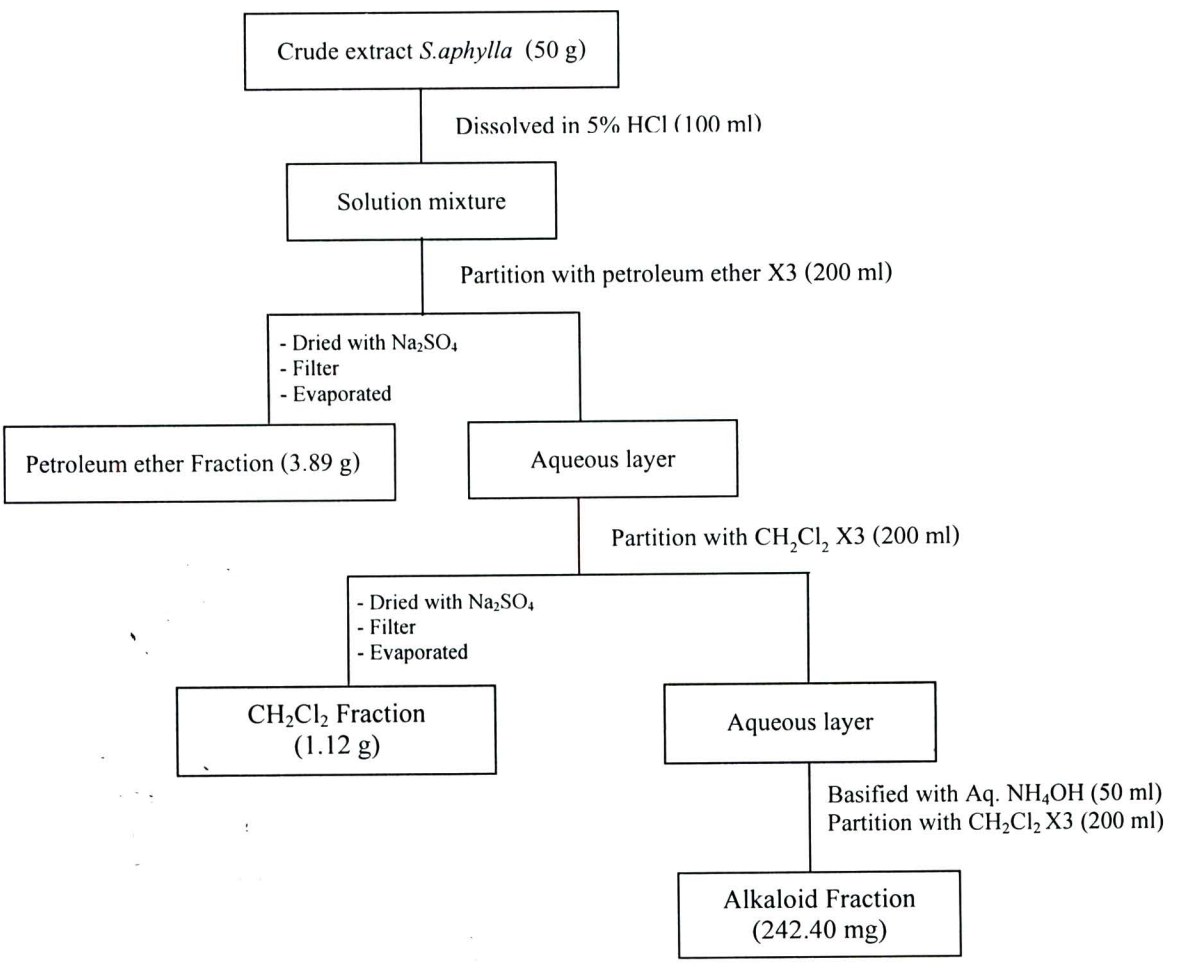
ภาพ 6 แผนภูมิแสดงการแยกสารจากหนอนตายหยากพันธุ์ (*S. curtisii*)



CC = Column Chromatography
PTLC= Preparative Thin Layer Chromatography

ภาพ 6 แผนภูมิแสดงการแยกสารจากหนอนตายหยากพันธุ์ (*S. curtisii*) (ต่อ)

สำหรับการแยกสารจากรากหนอนตายหยากพันธุ์ (*Stemona aphylla*) เริ่มต้นด้วยการละลายสารสกัดหยาบเอทานอล 50 กรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกกับน้ำในอัตราส่วน (5:95) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดต่อโดยวิธี partition กับปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) เพื่อกำจัดน้ำที่ปนมา จากนั้นกรองและนำชั้นส่วนสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator จนได้สารสกัดชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ 3.89 กรัม จากนั้นส่วนที่เป็นชั้นน้ำทำการสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทนปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) เพื่อกำจัดน้ำที่ปนมา จากนั้นกรองและระเหยแห้งด้วย rotary evaporator จนได้สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน 1.12 กรัม นำชั้นน้ำที่เหลือมาปรับสภาพให้เป็นด่างด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง กรองและนำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator จนได้สารสกัดส่วนอัลคาลอยด์ (ภาพ 7)



ภาพ 7 แผนภูมิขั้นตอนการสกัดสาร (partition) ของหนอนตายหยาก *Stemona aphylla*

เมื่อได้สารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2 fraction) แล้ว 1.12 g นำมาแยกต่อด้วย column chromatography (CC) โดยใช้ silica gel 60 F_{254} เป็น stationary phase และ มี mobile phase คือ ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) กับ เมทานอล (MeOH) โดยค่อยๆ เพิ่มอัตราส่วนของเมทานอล เก็บตัวอย่างทีละ 400 ml แล้วนำมาวิเคราะห์ TLC โดยรวม fraction ที่ให้ผล TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 12 fraction แล้วนำแต่ละ fraction ไปทำการแยกต่อ

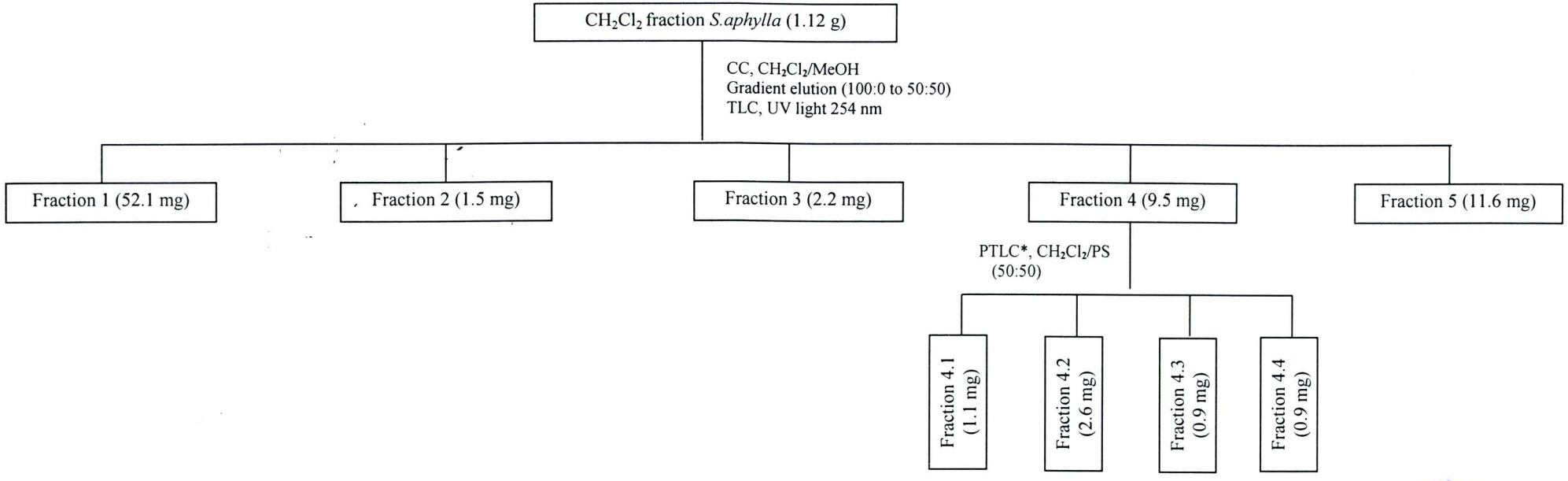
fraction ที่ 6 (55.3 mg) ถูกแยกด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) กับ เมทานอล (MeOH) (96:4) จนได้สารใหม่คือ stemofuran L (MW 268, 1.0 mg) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม benzofuran compounds

ส่วนสารสกัดหยาบชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ 3.89 g ถูกแยกด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ ปิโตรเลียมอีเทอร์กับเอททิลอะซีเตท (gradient elution) ได้ทั้งหมด 6 fraction

fraction ที่ 3 (65 mg) ถูกแยกต่อด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ toluene:EtOAc (gradient elution) จนได้อีก 7 fraction คือ fraction 3.1 (2.9 mg) fraction 3.2 (1.5 mg) fraction 3.3 (2.3 mg) fraction 3.4 (2.5 mg) fraction 3.5 (45.1 mg) fraction 3.6 (40.0 mg) และ fraction 3.7 (25.8 mg) จากนั้นนำ fraction 3.5 (45.1 mg) มาแยกต่อด้วย preparative TLC โดยมี mobile phase คือ toluene:EtOAc (1:99) ได้สาร dehydro-δ-tocopherol (MW 401, 20.9 mg) ซึ่งทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารเทียบกับ (Brem *et al.*, 2004)

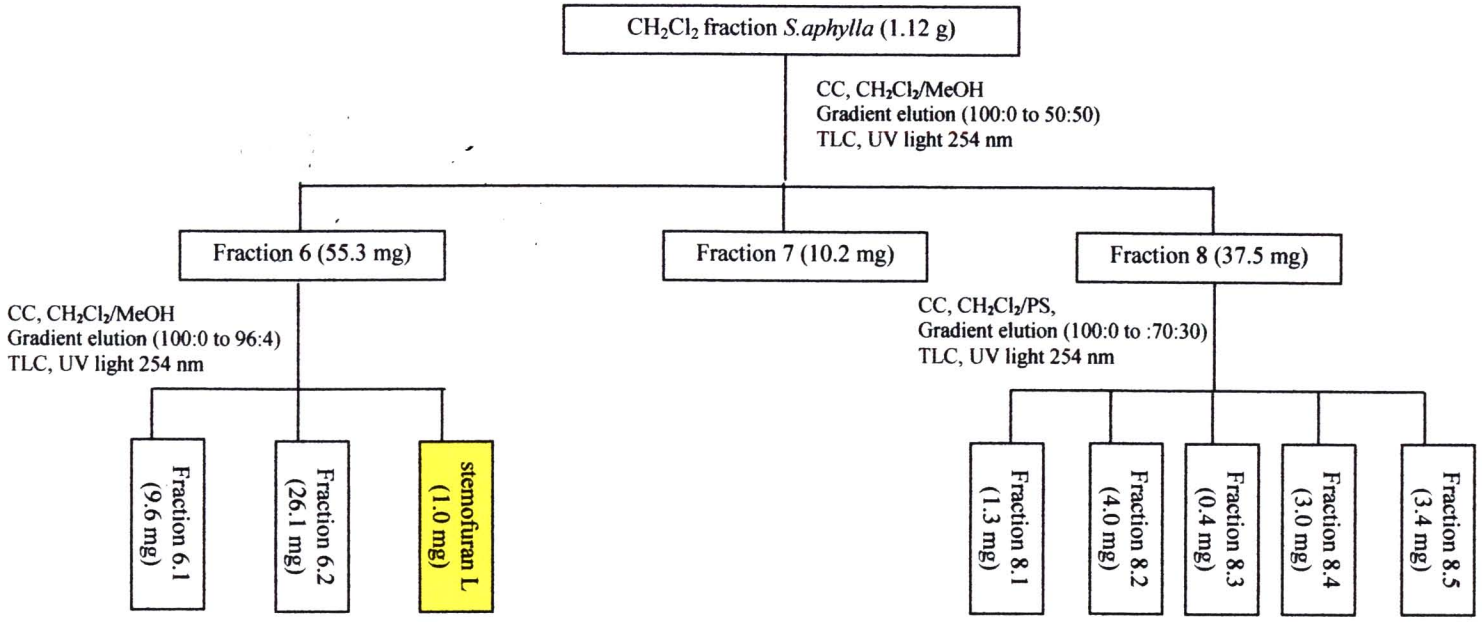
fraction ที่ 6 (121.9 mg) ถูกแยกต่อด้วย column chromatography โดยมี mobile phase คือ Petroleum ether:CH_2Cl_2:MeOH (gradient elution) จนได้ สาร stigmasterol (MW 412, 34.0 mg) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสเตียรอยด์ โดยทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารเทียบกับ (Forgo *et al.*, 2004) และ stemofuran J (MW 298, 11.4 mg) เทียบกับ (Pacher *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม benzofuran compounds

การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ทำโดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี เช่น ^{1}H NMR, ^{13}C NMR spectra , HSQC, HMBC, NOESY และ MS เป็นต้น ช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารจากค่า chemical shift (δ) ดังแสดงการ assignment (ตาราง 3-4)



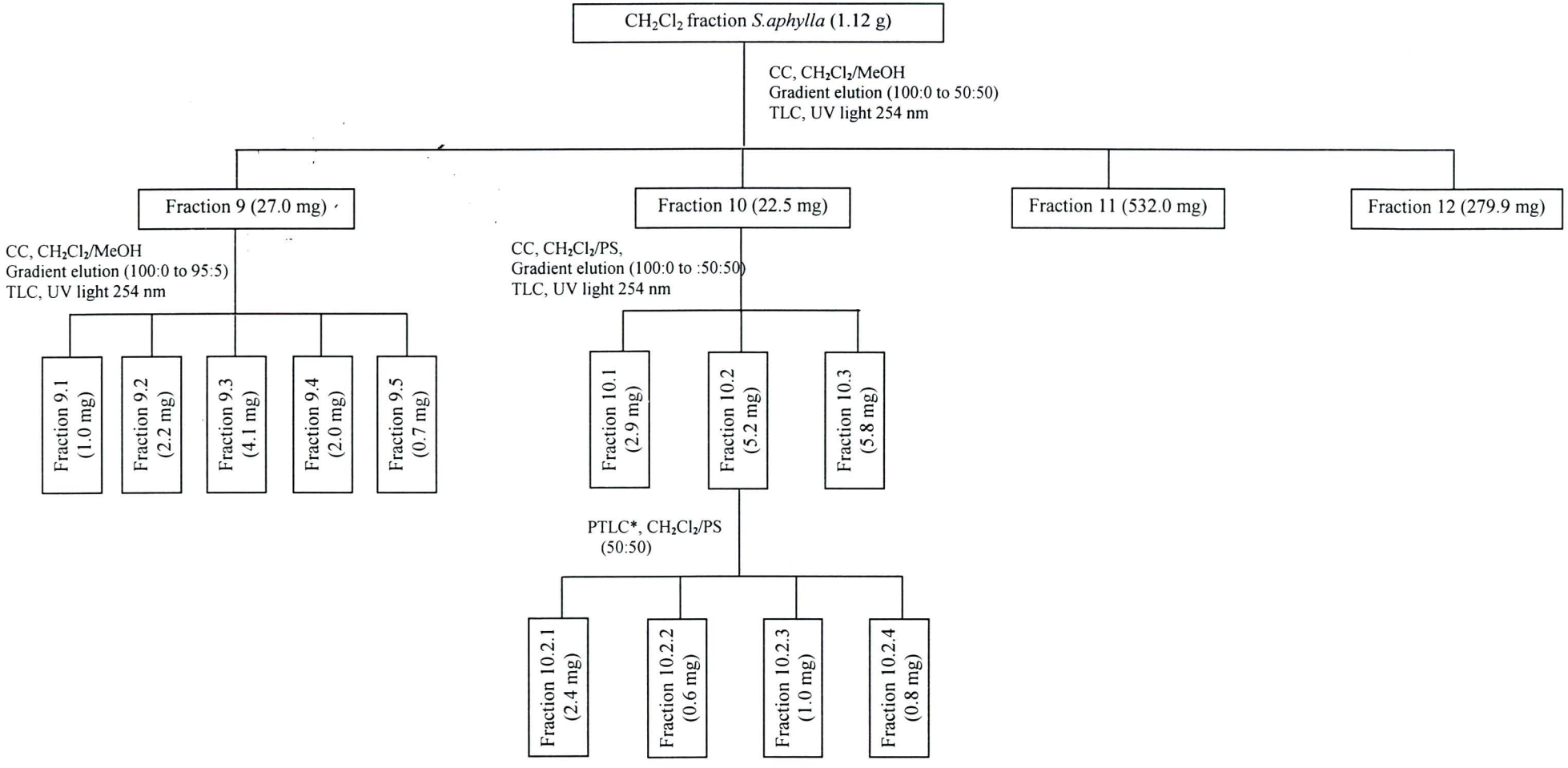
CC = Column Chromatography
PTLC= Preparative Thin Layer Chromatography

ภาพ 8 แผนภูมิแสดงการแยกสารจากหนอนตายหยากพันธุ์ (*S. aphylla*)



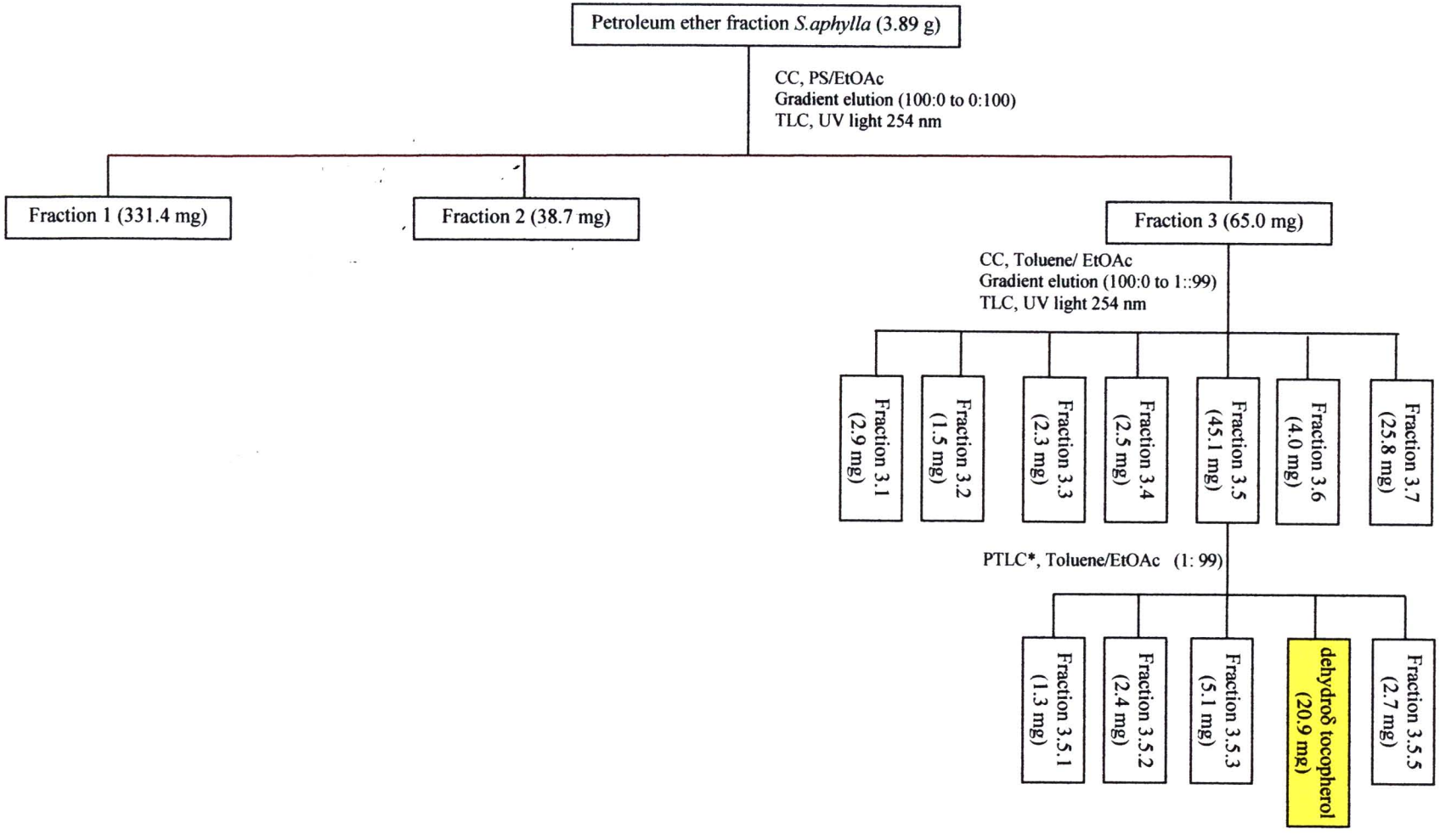
CC = Column Chromatography
PTLC= Preparative Thin Layer Chromatography

ภาพ 8 แผนภูมิแสดงการแยกสารจากหนอนตายหยากพันธุ์ (*S. aphylla*) (ต่อ)



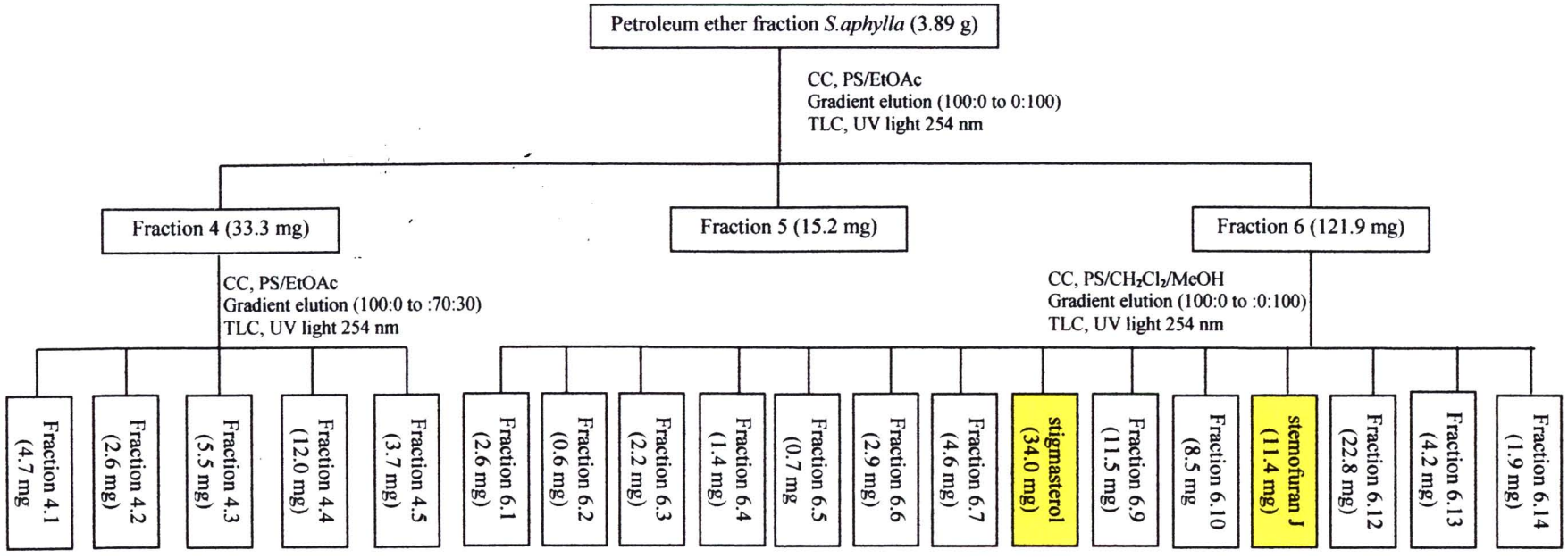
CC = Column Chromatography
PTLC= Preparative Thin Layer Chromatography

ภาพ 8 แผนภูมิแสดงการแยกสารจากหนอนตายหยากพันธุ์ (*S. aphylla*) (ต่อ)



CC = Column Chromatography
PTLC= Preparative Thin Layer Chromatography

ภาพ 8 แผนภูมิแสดงการแยกสารจากหนอนตายหยากพันธุ์ (*S. aphylla*) (ต่อ)

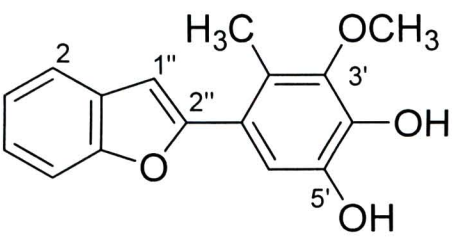


CC = Column Chromatography
PTLC= Preparative Thin Layer Chromatography

ภาพ 8 แผนภูมิแสดงการแยกสารจากหนอนตายหยากพันธุ์ (*S. aphylla*) (ต่อ)

ตาราง 3 ^{13}C NMR (125 MHz) and ^{1}H NMR (500 MHz) spectroscopic data of stemofuran S MW 270 ($C_{16}H_{14}O_4$) in $(CD_3)_2CO$

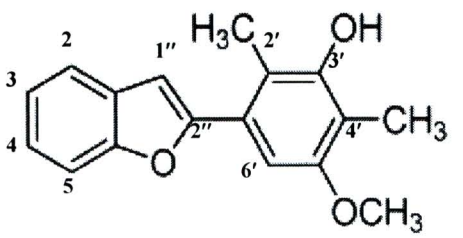
position	δ_C	DEPT	δ_H	gHMBC	NOESY
1	121.7	C	-	-	-
2	121.6	CH	7.62 (dd, J= 5 Hz)	154.9, 124.7	-
3	123.6	CH	7.22	130.3, 111.4	-
4	124.7	CH	7.28	154.9, 121.7	-
5	111.4	CH	7.52 (dd, J= 5 Hz)	124.7	-
6	154.9	C	-	-	-
1'	130.3	C	-	-	-
2'	122.0	C	-	-	-
3'	147.8	OH	-	-	-
4'	144.7	OH	-	-	-
5'	140.0	C	-	-	-
6'	111.7	CH	7.18 (s)	156.8, 144.7, 140.0, 122.0	6.90
1''	104.7	CH	6.90 (s)	156.8, 154.9, 130.3	7.62, 7.22, 2.39
2''	156.8	C	-	-	-
2'-Me	13.6	CH_3	2.39 (s)	147.8, 122.0	6.90, 3.81
3'-OMe	60.5	OCH_3	3.81 (s)	147.8	2.39



ภาพ 9 stemofuran S (new compound)

ตาราง 4 ^{13}C NMR (125 MHz) and ^{1}H NMR (500 MHz) spectroscopic data of stemofuran L MW 268 ($C_{17}H_{16}O_3$) in $CDCl_3$

position	δ_C	DEPT	δ_H	gHMBC	NOESY
1	121.7	C	-	-	-
2	121.6	CH	7.62 (dd, J= 5 Hz)	154.9, 124.7	-
3	123.6	CH	7.22	130.3, 111.4	-
4	124.7	CH	7.28	154.9, 121.7	-
5	111.4	CH	7.52 (dd, J= 5 Hz)	124.7	-
6	154.9	C	-	-	-
1'	130.3	C	-	-	-
2'	122.0	C	-	-	-
3'	147.8	OH	-	-	-
4'	144.7	OH	-	-	-
5'	140.0	C	-	-	-
6'	111.7	CH	7.18 (s)	156.8, 144.7, 140.0, 122.0	6.90
1''	104.7	CH	6.90 (s)	156.8, 154.9, 130.3	7.62, 7.22, 2.39
2''	156.8	C	-	-	-
2'-Me	13.6	CH_3	2.39 (s)	147.8, 122.0	6.90, 3.81
3'-OMe	60.5	OCH_3	3.81 (s)	147.8	2.39



ภาพ 10 stemofuran L (new compound)

การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นโดยใช้ไรทะเล

จากการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นกับไรทะเล โดยการหาค่า LC_{50} ด้วยวิธี probit analysis พบว่า stemofuran J มีค่า LC_{50} ต่ำที่สุดคือ มีค่าต่ำกว่า 1.0 ppm รองลงมาคือ stemofuran S, stemofuran L, oxystemokerrin, oxyprotostemonine, dehydro-δ-tocopherol, oxystemokerrin-N-oxide และ stigmasterol โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.83, 4.96, 13.45, 21.71, 82.62, 211.25 และ 285.69 ppm ตามลำดับ (ตาราง 5) และจากการคำนวณค่า % mortality พบว่า stemofuran J มีฤทธิ์ต่อไรทะเลสูงสุด โดยพบค่า mortality 100% ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ppm รองลงมาได้แก่ stemofuran S และ stemofuran L พบที่ความเข้มข้น 10 ppm oxystemokerrin และ oxyprotostemonine พบที่ความเข้มข้น 50 ppm oxystemokerrin-N-oxide พบที่ความเข้มข้นมากกว่า 250 ppm dehydro-δ-tocopherol พบที่ความเข้มข้น 500 ppm และ stigmasterol พบที่ความเข้มข้น มากกว่า 500 ppm (ตาราง 6-13)

ตาราง 5 ค่า LC_{50} ของสารประกอบจากรากหนอนตายหยาก

สารประกอบ	LC_{50} ± SD (ppm)
stemofuran S (new compound)	2.83 ± 0.70
stemofuran L (new compound)	4.96 ± 0.13
stemofuran J	< 1
stigmasterol	285.69 ± 0.28
dehydro-δ-tocopherol	82.62 ± 0.98
oxystemokerrin	13.45 ± 0.39
oxyprotostemonine	21.71 ± 0.36
oxystemokerrin-N-oxide	211.25 ± 0.21

ตาราง 6 เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังจากการได้รับสาร stemofuran S เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Dose (ppm)	Dosage (log dose)	Dead	Alive	Accumulated dead	Accumulated alive	Ratio Dead:Total	Mortality (%)
250	2.3979	30	0	125	0	30/30	100
100	2.0000	30	0	95	0	30/30	100
50	1.6989	30	0	65	0	30/30	100
10	1	30	0	35	0	30/30	100
1	0	5	25	5	25	5/30	16.67

ตาราง 7 เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังจากการได้รับสาร stemofuran L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Dose (ppm)	Dosage (log dose)	Dead	Alive	Accumulated dead	Accumulated alive	Ratio Dead:Total	Mortality (%)
250	2.3979	30	0	123	0	30/30	100
100	2.0000	30	0	93	0	30/30	100
50	1.6989	30	0	63	0	30/30	100
10	1	30	0	33	0	30/30	100
1	0	3	27	3	27	3/30	10.00

ตาราง 8 เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังจากการได้รับสาร stemofuran J เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Dose (ppm)	Dosage (log dose)	Dead	Alive	Accumulated dead	Accumulated alive	Ratio Dead:Total	Mortality (%)
250	2.3979	30	0	150	0	30/30	100
100	2.0000	30	0	120	0	30/30	100
50	1.6989	30	0	90	0	30/30	100
10	1	30	0	60	0	30/30	100
1	0	30	0	30	0	30/30	100

ตาราง 9 เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังจากการได้รับสาร stigmasterol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Dose (ppm)	Dosage (log dose)	Dead	Alive	Accumulated dead	Accumulated alive	Ratio Dead:Total	Mortality (%)
500	2.6989	24	6	29	6	24/30	80.0
100	2.0000	3	27	5	33	3/30	10.0
50	1.6989	2	28	2	61	2/30	6.67
10	1	0	30	0	91	0/30	0.0
1	0	0	30	0	121	0/30	0.0

ตาราง 10 เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังจากการได้รับสาร dehydro-δ-tocopherol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Dose (ppm)	Dosage (log dose)	Dead	Alive	Accumulated dead	Accumulated alive	Ratio Dead:Total	Mortality (%)
500	2.6989	30	0	55	0	30/30	100.0
100	2.0000	24	6	25	6	24/30	80.0
50	1.6989	1	29	1	35	1/30	3.33
10	1	0	30	0	65	0/30	0.0
1	0	0	30	0	95	0/30	0.0

ตาราง 11 เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังจากการได้รับสาร oxystemokerrin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Dose (ppm)	Dosage (log dose)	Dead	Alive	Accumulated dead	Accumulated alive	Ratio Dead:Total	Mortality (%)
250	2.3979	30	0	94	0	30/30	100
100	2.0000	30	0	64	0	30/30	100
50	1.6989	30	0	34	0	30/30	100
10	1	4	26	4	26	4/30	13.33
1	0	0	30	0	56	0/30	0

ตาราง 12 เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังจากการได้รับสาร oxyprotostemonine เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

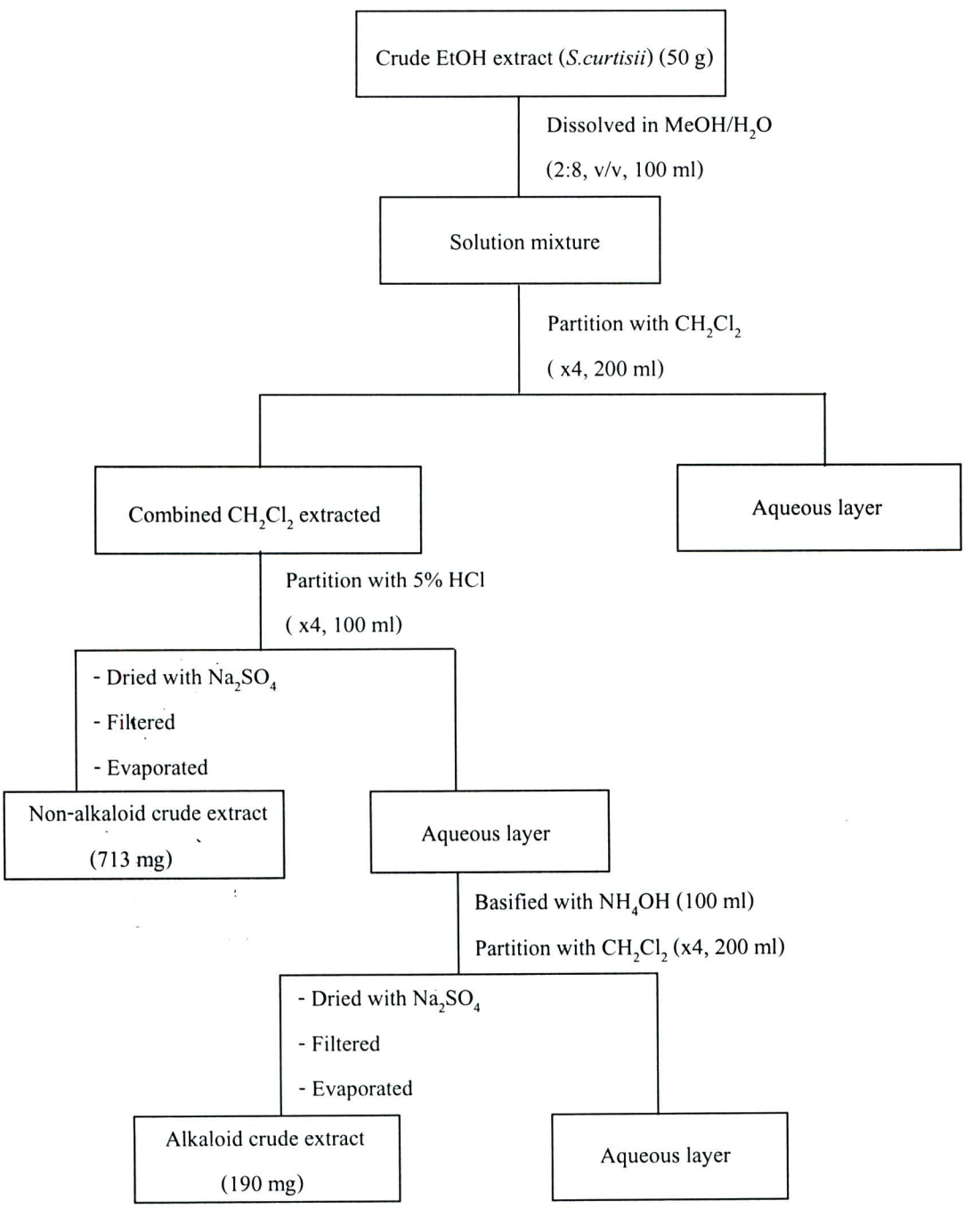
Dose (ppm)	Dosage (log dose)	Dead	Alive	Accumulated dead	Accumulated alive	Ratio Dead:Total	Mortality (%)
250	2.3979	30	0	94	0	30/30	100
100	2.0000	30	0	64	0	30/30	100
50	1.6989	30	0	34	0	30/30	100
10	1	3	27	4	27	3/30	10.00
1	0	1	29	1	56	0/30	0

ตาราง 13 เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังจากการได้รับสาร oxystemokerrin-N-oxide เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Dose (ppm)	Dosage (log dose)	Dead	Alive	Accumulated dead	Accumulated alive	Ratio Dead:Total	Mortality (%)
250	2.3979	19	11	29	11	19/30	63.33
100	2.0000	4	26	10	37	4/30	13.33
50	1.6989	4	26	6	63	4/30	13.33
10	1	2	28	2	91	2/30	6.67
1	0	0	30	0	121	0/30	0

การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อแมลงศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มีปริมาณน้อยมาก จึงไม่เพียงพอต่อการทดสอบกับแมลงศัตรูพืชได้ ในการทดลองนี้จึงต้องใช้สารสกัดหยาบหนอนตายหยาก *S. curtisii* (crude extract) แทนสารบริสุทธิ์ ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการสกัดสารออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นอัลคาลอยด์ (alkaloid crude extract) ซึ่งเมื่อ spot ลงบนแผ่น TLC แล้ว spray ด้วย Dragendroff's reagent จะปรากฏสีส้มบนแผ่น TLC แสดงว่าเป็นส่วนอัลคาลอยด์ และส่วนที่ไม่ใช่อัลคาลอยด์ (non-alkaloid crude extract) ดังแผนภูมินี้ (ภาพ 11) ส่วนสารสกัดหยาบหนอนตายหยาก *S. aphylla* มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการสกัดสาร (partition) จึงไม่ได้ทดสอบฤทธิ์ต่อแมลงศัตรูพืช



ภาพ 11 แผนภูมิแสดงการสกัดสารส่วนชั้นที่เป็นอัลคาลอยด์และไม่ใช่อัลคาลอยด์

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อแมลงศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ พบว่าสารสกัดส่วนอัลคาลอยด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการกิน (antifeedant) ของหนอนกระทู้ผักที่ระดับความเข้มข้น 0.05% รองลงมาได้แก่สารสกัดส่วนที่ไม่ใช่อัลคาลอยด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการกิน (antifeedant) ของหนอนกระทู้ผักที่ระดับความเข้มข้น 0.5% และ สารสกัดหยาบ (crude ethanol extract) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการกิน (antifeedant) ของหนอนกระทู้ผักที่ระดับความเข้มข้น 1% ขณะที่ methomyl มีฤทธิ์ในการยับยั้งการกิน (antifeedant) ของหนอนกระทู้ผักดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 0.01% ส่วนกลุ่มควบคุม (methanol) จะไม่มีฤทธิ์ต่อหนอนกระทู้ผัก (ตาราง 14)

ตาราง 14 ลักษณะการออกฤทธิ์ของสารสกัดหนอนตายหยากที่ความเข้มข้นต่างๆต่อหนอนกระทู้ผัก

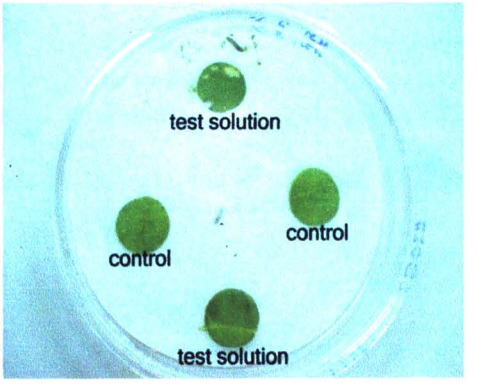
S.curtisii	Concentration						
	10%	5%	1%	0.5%	0.1%	0.05%	0.01%
Crude alkaloid	R	S	S	S	A	A	-
Crude non-alkaloid	R	S	S	A	-	-	-
Crude ethanol	S	A	A	-	-	-	-
Methomyl (positive control)	R	R	R	R	S	A	A
Methanol (negative control)	-	-	-	-	-	-	-

Repellent activity = ไม่มีการกินใบคะน้าเกิดขึ้นเลย

Strong antifeedant activity = พื้นที่โดยรวมของใบคะน้าถูกกินน้อยกว่า 5 %

Antifeedant activity = พื้นที่โดยรวมของใบคะน้าถูกกิน 5 – 20 %

Inactive = พื้นที่โดยรวมของใบคะน้าถูกกินมากกว่า 20 %



ภาพ 12 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดด้วยวิธี leaf disk choice

1. การผสมพันธุ์พืชสกุลเปราะ (*Kaemferia*)

ในการศึกษาพื้นที่ ณ ศูนย์การศึกษามหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หริภุญไชยพบพืชสกุลเปราะอยู่ 4 ชนิดด้วยกัน ได้แก่

1.1 ว่านหาวนอน (*Kaempferia* sp.)

ซึ่งเปราะชนิดนี้ เกิดดอกก่อนการเกิดใบ ออกดอกในช่วงเดือนเมษายน – พฤษภาคม กลีบดอกมีสีขาว ขาวชมพู และขาวม่วง ออกดอกครั้งละ 2-5 ดอก บานนาน 2-5 วัน หลังออกดอกมีการพัฒนาส่วนของใบขึ้นมา ใบแผ่คลุมดิน (ภาพที่ 13)

ภาพที่ 13 ลักษณะต้น ใบและดอกของว่านหาวนอน

1.2 เปราะใต้ใบม่วง (*Kaempferia* sp.)

เปราะชนิดนี้ ดอกมีขนาดเล็ก มีการพัฒนาของใบขึ้นมาก่อนจึงมีการพัฒนาของดอก ดอกมีขนาดเล็ก ไม่เป็นที่น่าสนใจมากนัก แต่ใบแผ่คลุมดิน เส้นใบเป็นคลื่น และมีแต้มสีเทานกระจายอยู่บนใบ และใบอ่อนที่มีการพัฒนาขึ้นมาใหม่ มักม้วนเป็นหลอด เห็นส่วนของใต้ใบที่มีสีม่วง (ภาพที่ 14)

ภาพที่ 14 ลักษณะต้น ใบและดอกของเปราะใต้ใบม่วง

1.3 เปราะต้นสูง (*Kaempferia* sp.)

เปราะชนิดนี้ ดอกมีขนาดเล็กมาก ดอกเกิดที่ส่วนโคนของต้น มีลำต้นที่มองเห็นได้ เกิดจากส่วนของโคบกาบใบที่ยืดยาวขึ้นใบชูขึ้น ใบมีลักษณะเป็นรูปหอก มีเส้นใบนูนเล็กน้อย มีแต้มสีเทาอยู่บนขอบใบ ซึ่งในแต่ละต้นแต้มหรือแถบสีเทาที่เกิดขึ้นมีความหลากหลายอยู่บาง (ภาพที่ 15)

ภาพที่ 15 ลักษณะของลำต้นและใบ ของเปราะต้น

1.4 เปราะใบลาย (*Kaempferia* sp.)

เปราะชนิดนี้ ยังไม่พบดอก เมื่อเข้าสู่ฤดูฝน ใบมีการพัฒนาขึ้นมาแผ่คลุมดิน ใบหนามีลักษณะอวบน้ำ ใบมีปื้นสีเขียวเข้ม มองดูเหมือนเป็นขอบ (ภาพที่ 16)

ภาพที่ 16 ลักษณะต้นและใบของเปราะใบลาย

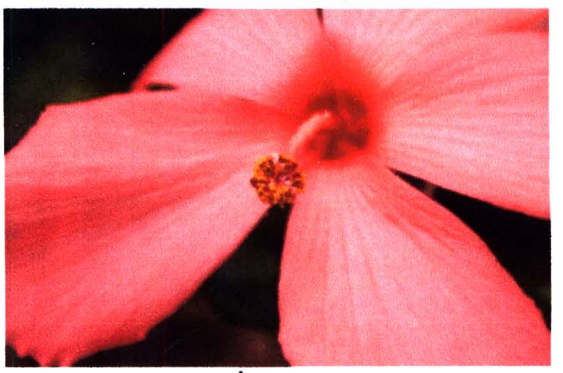
ได้ทำการผสมดอกของเปราะแต่ละชนิดให้มีการผสมตัวเอง และผสมข้ามชนิด พบว่าการควบคุมการผสมไม่สามารถทำได้ และเนื่องจากดอกบานในช่วงระยะเวลาที่ค่อนข้างสั้นและดอกแต่ละชนิดบานไม่พร้อมกัน การเก็บละอองเกสรเพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ทำได้ยากมาก จึงไม่สามารถทำการผสมพันธุ์ได้ แต่เมื่อปล่อยให้มีการผสมพันธุ์ในสภาพธรรมชาติ พบการติดเมล็ดของ ว่านหาวนอนและได้เก็บเมล็ดมาเพาะ พบว่าเมล็ดสามารถงอกได้ประมาณ 80% และได้ทดลองหยอดสาร Colchicine ที่ความเข้มข้น 0.05 % และ 1 % บนยอดของต้นอ่อนไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ

2. การผสมพันธุ์โสมชบา

ผลการศึกษาการผสมตัวเองของโสมชบา (ภาพที่ 17) และการผสมข้ามชนิดของโสมชบากับชบาพันธุ์การค้า และ โสมชบากับชบาดำ พบว่า โสมชบาสามารถผสมตัวเองได้ 100 % (ตารางที่ 15) ในขณะที่การผสมข้ามกับชบาพันธุ์การค้า ผสมติดเพียง 30 % และโสมชบาไม่สามารถผสมข้ามกับชบาดำได้

การตอนเกสรตัวผู้ออก

การผสมเกสร



ดอกที่ได้รับการผสมแล้ว

ฝักที่พัฒนาจากดอกที่ได้รับการผสมแล้ว

ฝักที่แก่เต็มที่ (อายุ 21 วัน)

เมล็ดที่ได้

ภาพที่ 17 ขั้นตอนการผสมเกสรโสมชบา

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การผสมตัวเอง และผสมข้ามชนิดของโสมชบา

กรรมวิธี	จำนวนดอก ที่ใช้ผสม (ดอก)	จำนวนดอก ที่ผสมติด (ดอก)	เปอร์เซ็นต์ การผสมติด (%)
1. การผสมตัวเอง	10	10	100
2. การผสมข้ามกับชบาพันธุ์การค้า	10	3	30
3. การผสมข้ามกับชบาคำ (พันธุ์ป่า)	10	0	0

การปรับปรุงพันธุ์เปราะโดยการผสมพันธุ์ยังไม่สามารถดำเนินการได้ เนื่องมาจากดอกบานในระยะเวลาที่สั้นมาก และการเก็บรักษาละอองเกสรเพื่อใช้ผสมกับชนิดอื่นที่มีการบานดอกไม่พร้อมกัน เป็นเรื่องที่ต้องมีการศึกษาต่อไป ส่วนการผสมพันธุ์โสมชบานั้นพบว่า โสมชบาสามารถผสมตัวเองได้ดี และสามารถผสมข้ามกับชบาที่เป็นพันธุ์การค้าได้ ลูกผสมที่ได้จะต้องดูผลในปีถัดไป เนื่องจากเมล็ดที่การพักตัวที่ค่อนข้างนาน และได้มีการวิจัยเพื่อหาวิธีการให้เมล็ดพ้นระยะการพักตัวต่อ โดยเมล็ดลูกผสมของโสมชบา มีเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนา จึงต้องมีการศึกษาวิธีการทำลายการพักตัว เพื่อให้เมล็ดของลูกผสมงอกเป็นต้นได้ โดยได้มีการวางแผนการทดลองดังนี้

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 7 กรรมวิธีทดลอง ได้แก่

1.1 ใช้เมล็ดที่เก็บได้ โดยไม่ผ่านกรรมวิธีใดๆ

1.2 ถูเมล็ดกับกระดาษทราย

1.3 ขลิบเมล็ดด้วยกรรไกร

1.4 ถูเมล็ดกับกระดาษทราย และแช่ในสารละลาย GA 500 ppm นาน 20 นาที

1.5 ถูเมล็ดกับกระดาษทราย และแช่ในสารละลาย NAA 500 ppm นาน 20 นาที

1.6 ขลิบเมล็ดด้วยกรรไกร และแช่ในสารละลาย GA 500 ppm นาน 20 นาที

1.7 ขลิบเมล็ดด้วยกรรไกร และแช่ในสารละลาย NAA 500 ppm นาน 20 นาที

โดยในแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำๆละ 3 เมล็ด เมื่อเมล็ดผ่านกรรมวิธีที่ได้กำหนดไว้แล้ว นำเมล็ดไปเพาะในถาดหลุมที่มีขุยมะพร้าว:ทรายหยาบ อัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุปลูก ทำการรดน้ำ

เมื่อเพาะเมล็ดไปได้ประมาณ 4 วัน เมล็ดที่ได้รับการถูเมล็ดกับกระดาษทราย และแช่ในสารละลาย GA 500 ppm นาน 20 นาที เริ่มงอก หลังจากนั้นอีก 3 วัน เมล็ดที่เพาะในกรรมวิธีอื่นๆ เริ่มงอกมาให้เห็นในขณะที่เมล็ดที่ไม่ผ่านกรรมวิธีใดไม่งอก การถูเมล็ดกับกระดาษทราย และแช่ในสารละลาย GA 500 ppm นั้นให้ผลเท่าๆ กับการถูเมล็ดกับกระดาษทรายและการขลิบเมล็ดด้วยกรรไกร (ตาราางที่ 16) แสดงให้เห็นว่าเปลือกหุ้มเมล็ดแข็ง น้ำไม่สามารถซึมผ่านได้ เมื่อทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดบางลงหรือ การใช้ฮอร์โมนกระตุ้น ทำให้เมล็ดงอกได้เร็วขึ้น และมีต้นอ่อนที่สามารถจะพัฒนาเป็นต้นได้

ตารางที่ 16 จำนวนต้นของโสมชบาที่งอก หลังจากได้รับกรรมวิธีต่างๆ

กรรมวิธี	จำนวนต้นที่งอก (ต้น)
1. เมล็ดที่ไม่ผ่านกรรมวิธีใดๆ	0
2. ถูเมล็ดกับกระดาษทราย	1.4
3. ขลิบเมล็ดด้วยกรรไกร	1.4
4. ถูเมล็ดกับกระดาษทราย และแช่ในสารละลาย GA 500 ppm	1.4
5. ถูเมล็ดกับกระดาษทราย และแช่ในสารละลาย NAA 500 ppm	1.0
6. ขลิบเมล็ดด้วยกรรไกร และแช่ในสารละลาย GA 500 ppm	0.6
7. ขลิบเมล็ดด้วยกรรไกร และแช่ในสารละลาย NAA 500 ppm	0.8

เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้จำนวนเมล็ดมีจำนวนจำกัด ผลการศึกษาอาจมีความคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป แต่ทำให้เข้าใจถึงกลไกการทำลายการพักตัวของเมล็ด

ข. การปรับปรุงพันธุ์โดยการใช้สารเคมี

การเตรียมต้น *Kaemferia* เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์นั้นได้ดำเนินการในสภาพปลอดเชื้อด้วย โดยได้นำยอด มาทำการฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox ความเข้มข้น 15 % เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วนำไปตัดปลายยอดภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ นำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นดัดแปลงสูตร MS พบว่าปลายยอดสามารถเจริญได้เป็นต้นสูงขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร ภายในเวลา 2.5 เดือน โดยได้มีการทดลองเพิ่มปริมาณต้น (ภาพที่ 18) เพื่อนำพืชไปทำการทดลองปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการชักนำโดยใช้สารเคมีเพื่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในสภาพปลอดเชื้อ

ภาพที่ 18 ต้น *Kaemferia* ในสภาพปลอดเชื้อ

1. การเพิ่มจำนวนต้น *Kaemferia* ในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองผลของ BAP NAA และน้ำมะพร้าวต่อการเจริญเติบโตของเปราะดอกออกก่อนใบ ทำโดยนำเอาต้นเปราะที่มีขนาดสูง 1.5 ซม ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีระดับความเข้มข้นของ BAP 3 ระดับคือ 0, 0.1, และ 1.0 มก/ล NAA ที่ความเข้มข้น 2 ระดับคือ 0, และ 0.25 มก/ล และน้ำมะพร้าว (CW) ที่ความเข้มข้น 2 ระดับคือ 0, และ 20 % วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) รวมทั้งหมด 12 กรรมวิธี บันทึกผลเป็นเวลา 8 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 1 =	BAP 0 มก/ล	NAA 0 มก/ล	CW 0 %
กรรมวิธีที่ 2 =	BAP 0.1 มก/ล	NAA 0 มก/ล	CW 0%
กรรมวิธีที่ 3 =	BAP 1.0 มก/ล	NAA 0 มก/ล	CW 0 %
กรรมวิธีที่ 4 =	BAP 0 มก/ล	NAA 0 มก/ล	CW 20 %
กรรมวิธีที่ 5 =	BAP 0.1 มก/ล	NAA 0 มก/ล	CW 20 %
กรรมวิธีที่ 6 =	BAP 1.0 มก/ล	NAA 0 มก/ล	CW 20 %
กรรมวิธีที่ 7 =	BAP 0 มก/ล	NAA 0.25 มก/ล	CW 0 %
กรรมวิธีที่ 8 =	BAP 0.1 มก/ล	NAA 0.25 มก/ล	CW 0 %
กรรมวิธีที่ 9 =	BAP 1.0 มก/ล	NAA 0.25 มก/ล	CW 0 %
กรรมวิธีที่ 10 =	BAP 0 มก/ล	NAA 0.25 มก/ล	CW 20 %
กรรมวิธีที่ 11 =	BAP 0.1 มก/ล	NAA 0.25 มก/ล	CW 20 %
กรรมวิธีที่ 12 =	BAP 1.0 มก/ล	NAA 0.25 มก/ล	CW 20 %

จากการศึกษาผลของ BAP, NAA, และน้ำมะพร้าวต่อการเจริญของเปราะในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า

จำนวนยอด

BAP, NAA, และน้ำมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 0, มก/ล และ 0 มล ตามลำดับ มีผลต่อการแตกยอดของเปราะโดยทำให้มีจำนวนยอดมากเฉลี่ย คือ 3.17 ยอด (ตารางที่ 17) โดยที่เมื่อพิจารณาเฉพาะปัจจัยเดียวนั้น การให้ NAA หรือ CW ไม่มีผลต่อจำนวนยอดที่เกิดขึ้นใหม่ แต่ BAP ที่ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ส่งผลให้เกิดยอดจำนวน 2.14 ยอดซึ่งแตกต่างจากความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 18) เมื่อพิจารณา 2 ปัจจัยร่วม พบว่าทั้งสามปัจจัยต่างมีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (ตารางที่ 19, 20, 21)

ตารางที่ 17 จำนวนยอดเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่มีระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ BAP, NAA, และ CW

NAA (mg/l)	CW (%)	BAP (mg/l) 0	0.1	1.0
0	0	1.80^{bc}	1.88^{bc}	3.17^{a}
	20	1.71^{bc}	1.17^{c}	1.84^{bc}
0.25	0	1.25^{c}	1.29^{c}	1.83^{bc}
	20	1.00^{c}	1.71^{bc}	2.79^{ab}

Interactions: BAP x NAA **

NAA x CW **

BAP x CW **

BAP x NAA x CW **

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 18 จำนวนยอดเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

BAP (mg/l)	ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด
0	1.44^{b}
0.1	1.51^{b}
1.0	2.41^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับคุวามเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 19 จำนวนยอดเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม BAP และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

BAP (mg/l) / NAA(mg/l)	0	0.1	1.0
0	1.75^{bc}	1.52^{c}	2.50^{a}
0.25	1.13^{c}	1.50^{c}	2.31^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 20 จำนวนยอดเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม BAP และ CW ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

BAP (mg/l) / CW (%)	0	0.1	1.0
0	1.52[b]	1.58[b]	2.50[a]
20	1.35[b]	1.44[b]	2.31[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 21 จำนวนยอดเฉลี่ยของเปราะดอกออกก่อนใบที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม NAA และ CW ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

NAA (mg/l) / CW (%)	0	0.25
0	2.28[a]	1.46[b]
20	1.57[b]	1.83[ab]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

จำนวนราก

จากการทดลองพบว่า การให้ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มก/ล NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มก/ล และน้ำมะพร้าวที่ระดับ 20 มล ทำให้เปราะมีจำนวนรากมากเฉลี่ย 9.09 ราก (ตารางที่ 22) เมื่อพิจารณาปัจจัยเดียว พบว่า BAP หรือ NAA หรือ CW ไม่ทำให้จำนวนรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณา 2 ปัจจัยร่วม พบว่า เฉพาะ NAA และ CW เท่านั้นที่มีปฏิสัมพันธ์ ทำให้จำนวนรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 22 จำนวนรากเฉลี่ยของเปราะดอกออกก่อนใบที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ BAP, NAA, และ CW

NAA (mg/l)	CW (%)	BAP (mg/l) 0	0.1	1.0
0	0	5.92[ab]	6.79[ab]	4.92[ab]
	20	6.04[ab]	4.59[ab]	5.25[ab]
0.25	0	4.96[ab]	4.50[b]	4.17[b]
	20	5.17[ab]	9.09[a]	8.42[ab]

Interactions: BAP x NAA = NS

NAA x CW **

BAP x CW = NS

BAP x NAA x CW **

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 23 จำนวนรากเฉลี่ยของเปราะดอกออกก่อนใบที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม NAA และ CW ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

CW (%) \ NAA (mg/l)	0	0.25
0	5.88[ab]	4.54[b]
20	5.29[ab]	7.56[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ความยาวราก

พบว่า BAP, NAA หรือ CW ในความเข้มข้นระดับต่างๆ ไม่ว่าเป็นปัจจัยเดี่ยว หรือ 2 หรือ 3 ปัจจัย ไม่ส่งผลหรือมีปฏิสัมพันธ์กัน ทำให้ความยาวรากไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 ความยาวรากเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ BAP, NAA, และ CW

NAA (mg/l)	CW (%)	BAP (mg/l) 0	0.1	1.0
0	**0**	3.84	3.83	1.90
	20	3.40	3.50	3.55
0.25	**0**	3.68	2.70	2.85
	20	3.01	3.84	3.60

หมายเหตุ NS = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จำนวนใบ

ความเข้มข้นระดับต่างๆ ของ BAP, NAA, และ CW ทำให้จำนวนใบของเปราะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ความเข้มข้นของ BAP, NAA, และน้ำมะพร้าวที่ระดับ 0 ให้จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 2.71ใบ ส่วนความเข้มข้นของ BAP, NAA ที่ระดับ 1.0, 0, มก/ล และ CW ที่ระดับ 20 % ตามลำดับ ทำให้มีจำนวนใบน้อยที่สุด คือ 1.42 ใบ (ตารางที่ 25) เมื่อพิจารณาปัจจัยเดียว พบว่าเฉพาะ BAP ทำให้จำนวนใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 26) เมื่อพิจารณา 2 ปัจจัยร่วม พบว่าทั้งสามปัจจัยคือ NAA, BAP และ CW ต่างมีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน ทำให้จำนวนใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 27, 28, 29)

ตารางที่ 25 จำนวนใบเฉลี่ยของเปราะดอกออกก่อนใบที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ BAP, NAA, และน้ำมะพร้าว

NAA (mg/l)	CW (%)	BAP (mg/l) 0	0.1	1.0
0	0	2.71[a]	2.00[abcd]	1.80[bcd]
	20	2.09[abcd]	1.55[cd]	1.42[d]
0.25	0	2.21[abc]	2.09[abcd]	2.13[abcd]
	20	2.25[abc]	2.34[ab]	2.00[abcd]

Interactions: BAP x NAA **

NAA x CW **

BAP x CW **

BAP x NAA x CW **

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 26 จำนวนใบเฉลี่ยของเปราะดอกออกก่อนใบที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

BAP (mg/l)	ค่าเฉลี่ยจำนวนใบ
0	2.31[a]
0.1	1.99[ab]
1.0	1.83[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 27 จำนวนใบเฉลี่ยของเปราะดอกออกก่อนใบที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม BAP และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

BAP (mg/l) / NAA(mg/l)	0	0.1	1.0
0	2.40^{a}	1.77^{bc}	1.61^{c}
0.25	2.23^{ab}	2.21^{ab}	2.07^{abc}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 28 จำนวนใบเฉลี่ยของเปราะดอกออกก่อนใบที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม BAP และ CW ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

BAP (mg/l) / CW (%)	0	0.1	1.0
0	2.46^{a}	2.04^{ab}	1.96^{ab}
20	2.16^{ab}	1.94^{b}	1.71^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 29 จำนวนใบเฉลี่ยของเปราะดอกออกก่อนใบที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม NAA และ CW ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

NAA (mg/l) / CW (%)	0	0.25
0	2.17^{a}	2.14^{a}
20	1.68^{b}	2.20^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ความสูง

ความเข้มข้นของ BAP 0.1 มก/ล และ NAA ที่ระดับ และ 0.25 มก/ล และ CW ที่ระดับ 20% ทำให้ความสูงเฉลี่ยของเปราะคือ 5.97 ซม ซึ่งความเข้มข้นระดับต่างๆ ของ BAP, NAA, และ

CW ทำให้ความสูงของเปราะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกรรมวิธี ยกเว้นกรรมวิธีที่มี BAP 1.0 มก/ล และ NAA, CW เป็น 0 ซึ่งต้นมีความสูง 3.8 ซม (ตารางที่ 30) เมื่อพิจารณาปัจจัยเดียว พบว่าเฉพาะ BAP ทำให้ความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 31) เมื่อพิจารณา 2 ปัจจัยร่วม พบว่าทั้งสามปัจจัยคือ NAA, BAP และ CW ต่างมีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน ทำให้ความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 32, 33, 34)

ตารางที่ 30 ความสูงเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ BAP, NAA, และ CW

NAA	**CW**	**BAP (mg/l)**		
(mg/l)	**(%)**	**0**	**0.1**	**1.0**
0	**0**	4.85^{ab}	5.22^{ab}	3.80^{b}
	20	5.83^{a}	4.68^{ab}	4.18^{ab}
0.25	**0**	5.80^{a}	4.92^{ab}	4.81^{ab}
	20	5.87^{a}	5.97^{a}	5.11^{ab}

Interactions: BAP x NAA **

NAA x CW **

BAP x CW **

BAP x NAA x CW **

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 31 ความสูงเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

BAP (mg/l)	**ค่าเฉลี่ยความสูง (cm)**
0	5.59^{a}
0.1	5.20^{ab}
1.0	4.47^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 32 ความสูงเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม BAP และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

BAP (mg/l) / NAA(mg/l)	0	0.1	1.0
0	5.34^{a}	4.95^{ab}	3.99^{b}
0.25	5.84^{a}	5.45^{a}	4.96^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 33 ความสูงเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม BAP และ CW ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

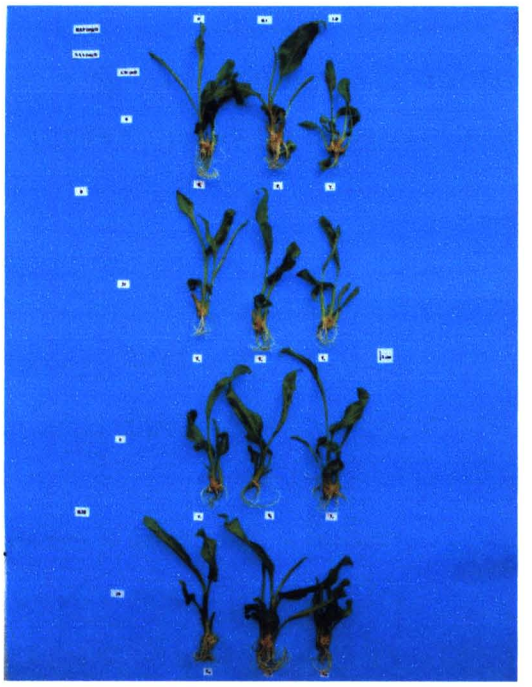
BAP (mg/l) / CW (%)	0	0.1	1.0
0	5.33^{ab}	5.07^{ab}	4.31^{b}
20	5.85^{a}	5.32^{ab}	4.64^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 34 ความสูงเฉลี่ยของเปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม NAA และ CW ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

NAA (mg/l) / CW (%)	0	0.25
0	4.62^{b}	5.18^{ab}
20	4.90^{ab}	5.65^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05



ภาพที่ 19 เปราะที่เลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ดัดแปลง ที่มี BAP, NAA, และน้ำมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

BAP, NAA, และน้ำมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 0, มก/ล และ 0 มล ตามลำดับ มีผลต่อการแตกยอดของเปราะโดยทำให้มีจำนวนยอดมากเฉลี่ย คือ 3.17 ยอด โดยที่เมื่อพิจารณาเฉพาะปัจจัยเดียวนั้น BAP ที่ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ส่งผลให้เกิดยอดจำนวน 2.14 ยอดซึ่งแตกต่างจากความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน NAA หรือ CW ไม่มีผลต่อจำนวนยอดที่เกิดขึ้นใหม่ และพบว่า เฉพาะ NAA และ CW เท่านั้นที่มีปฏิสัมพันธ์ ทำให้จำนวนรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ BAP, NAA หรือ CW ในความเข้มข้นระดับต่างๆไม่ส่งผลหรือมีปฏิสัมพันธ์กัน ไม่ทำให้ความยาวรากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นระดับต่างๆ ของ BAP, NAA, และ CW ทำให้จำนวนใบของเปราะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าการไม่ใส่สารทั้ง 3 ชนิด ให้จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 2.71ใบ เมื่อพิจารณาปัจจัยเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง BAP ทำให้จำนวนใบ และความสูงแตกต่างกัน โดยเมื่อใส่ BAP ทำให้จำนวนใบและความสูงลดลง ทั้งนี้การใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่ม cytokinin หรือ auxin ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หาก cytokinin มากกว่า auxin จะทำให้เนื้อเยื่อนั้นเจริญทางตา ใบ และลำต้น หากสัดส่วนของ auxin มากกว่า cytokinin จะทำเนื้อเยื่อนั้นสร้างราก (ดนัย, 2539) ในการทดลองนี้ได้ทดลองเติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารด้วย น้ำมะพร้าวจัดเป็น Liquid endosperm จัดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีฮอร์โมนกลุ่มที่เป็นไซโตไคนินอยู่ด้วยซึ่งส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ ดังนั้นในการเลือกสัดส่วนและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม จะทำ

ให้มีการเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ และถ้าพืชสร้างฮอร์โมนได้เพียงพอแล้ว เมื่อเติมสารควบคุมการเจริญในอาหารที่เลี้ยงอีก อาจมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามสำหรับพืชสกุลเปราะนี้ อาจมีการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารกลุ่มไซโตไคนินเพื่อกระตุ้นให้มีการแตกยอดเพิ่มขึ้นได้อีก

2. ผลของ Colchicine ต่อการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมและการเจริญของเปราะ

นำต้นเปราะที่มีเฉพาะส่วนโคนใบแช่ใน Colchicine ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 0.02, 0.05, 0.1, และ 0.2 มก/ล เป็นเวลา 6, 24, และ 48 ชั่วโมง โดยเขย่าตลอดเวลา รวม 15 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 Colchicine 0 มก/ล เวลา 6 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 2 Colchicine 0 มก/ล เวลา 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 3 Colchicine 0 มก/ล เวลา 48 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 4 Colchicine 0.02 มก/ล เวลา 6 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 5 Colchicine 0.02 มก/ล เวลา 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 6 Colchicine 0.02 มก/ล เวลา 48 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 7 Colchicine 0.05 มก/ล เวลา 6 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 8 Colchicine 0.05 มก/ล เวลา 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 9 Colchicine 0.05 มก/ล เวลา 48 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 10 Colchicine 0.1 มก/ล เวลา 6 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 11 Colchicine 0.1 มก/ล เวลา 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 12 Colchicine 0.1 มก/ล เวลา 48 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 13 Colchicine 0.2 มก/ล เวลา 6 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 14 Colchicine 0.2 มก/ล เวลา 24 ชั่วโมง
กรรมวิธีที่ 15 Colchicine 0.2 มก/ล เวลา 48 ชั่วโมง

จากนั้นนำต้นมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มี BAP 1.0 มก/ล บันทึกผลการเจริญเติบโตเปราะ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และนำรากมาตรวจนับโครโมโซม โดยมีขั้นตอนการศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชดังนี้

1. เตรียมรากพืชโดย โดยใช้รากที่ปลายรากมีสีขาวขุ่น

2. หยุดวงจรของเซลล์ โดยนำปลายรากมาแช่ในสารละลาย PDB ที่อิ่มตัว เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง

3. รักษาสภาพเซลล์ โดยนำรากที่แช่ในสารละลาย PDB ออกมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายที่มีส่วนผสมของ Absolute ethanol และ Glacial acetic acid อัตราส่วน 3:1 เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างรากให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

4. แช่รากในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วล้าง ราก ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

5. แยกเซลล์ โดยการแช่รากลงใน HCL เข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

6. ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย Fuchsin เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

7. นำปลายรากที่ผ่านการย้อมสีแล้ววางบนแผ่นสไลด์ หยดสี Fuchsin 1-2 หยด ตรงบริเวณปลายราก กดปลายรากด้วยเข็มเขี่ยให้เซลล์กระจาย แล้วปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ กดแผ่นบนกระจกปิดสไลด์ ซับสีที่มากเกินไปออก

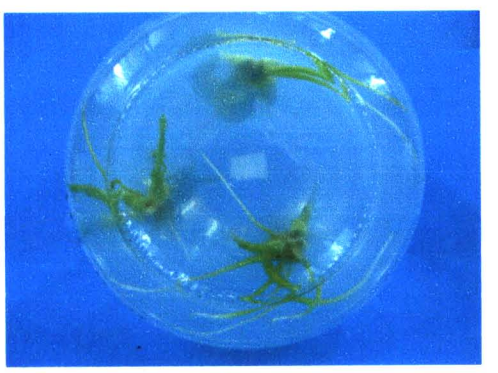
8. นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนโครโมโซมแล้วบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการทดลองพบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย (ข้อมูลไม่ได้นำเสนอ) และจำนวนใบของต้นเปราะที่แช่ใน Colchicine แต่ละความเข้มข้น คือ 0, 0.02, 0.05, 0.1, และ 0.2 มก/ล เป็นเวลา 6, 24, และ 48 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในขณะที่ความสูงต้นและจำนวนรากมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 35)

ตารางที่ 35 ความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนรากของเปราะดอกที่แช่ใน Colchicine ในแต่ละความเข้มข้นและเวลาแตกต่างกัน

กรรมวิธีที่	ความสูงต้น (cm)	จำนวนใบ^{NS}	จำนวนราก
1	10.75^{abc}	4.00	10.50^{ab}
2	10.50^{abc}	4.00	12.00^{ab}
3	8.25^{c}	4.00	8.50^{b}
4	12.50^{a}	4.00	12.50^{ab}
5	12.75^{a}	4.00	11.50^{ab}
6	8.50^{c}	4.00	10.50^{ab}
7	10.75^{abc}	3.50	13.50^{a}
8	12.25^{ab}	4.00	10.50^{ab}
9	9.00^{bc}	3.50	8.50^{b}
10	10.50^{abc}	4.00	9.00^{ab}
11	12.90^{a}	3.50	12.00^{ab}
12	8.50^{c}	4.00	8.00^{b}
13	10.40^{abc}	3.50	11.00^{ab}
14	9.50^{abc}	3.50	11.00^{ab}
15	10.50^{abc}	4.00	12.00^{ab}

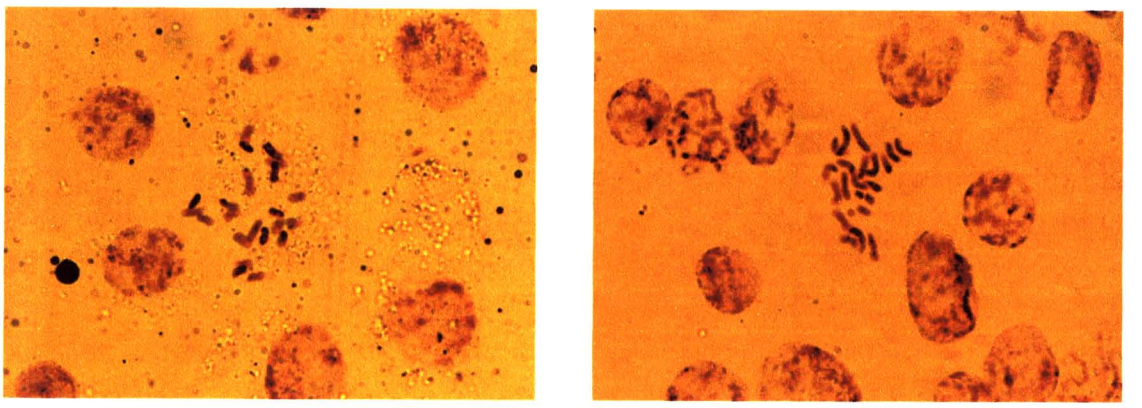
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05



ก

ภาพที่ 20 รากของเปราะจากต้นอายุ 20วัน

เมื่อนำเนื้อเยื่อปลายรากไปผ่านขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นแล้ว พบเซลล์ที่มีแบ่งตัวเป็นจำนวนมาก มีการแบ่งตัวอยู่ในหลายระยะ พบว่าจำนวนโครโมโซมของเปราะชนิดนี้คือ 2n=22 และไม่พบจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างไปของต้นที่ผ่านการแช่ Colchicine ในกรรมวิธีต่างๆ



ก ข

ภาพที่ 21 ก. ข. โครโมโซมของเปราะ 2n=22

ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของเปราะภายใต้สภาพและระยะเวลาที่ทำการทดสอบดังกล่าว และไม่พบลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งต้นพืชที่เจริญมาจากชิ้นส่วนต้นพืชที่เขย่าเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง มีแนวโน้มที่มีความสูงต้นน้อยกว่าพืชที่มาจากชิ้นส่วนที่ผ่านการเขย่าเป็นเวลาสั้นกว่า คือ 6 และ 24 ชั่วโมง ไม่ว่าจะมีการใช้สาร Colchicine หรือไม่ก็ตาม ซึ่งเป็นสิ่งปกติที่พบในหลายพืชเนื่องจากการเขย่าอาจทำให้มีการลดการเจริญทางด้านสูงขึ้นได้ โดยอาจเกี่ยวข้องกับ Apical dominant ด้วย อย่างไรก็ตามน่าจะได้มีการทดลองการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเปราะเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต โดยอาจเพิ่มความเข้มข้นของสาร หรือมีการใช้สารชนิดอื่นๆที่มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และมีการใช้สารเหนี่ยวนำในสภาพนอกห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมอีกนอกเหนือจากการที่ได้ทดลองหยดสาร Colchicine ที่ความเข้มข้น 0.05 % และ 1 % บนยอดของต้นอ่อนแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ