

ปริมาณ dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน

Dioscorealide B content of *in vitro* Khao-Yen-Tai (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) shoots at different culture periods

ทิพย์สุคนธ์ บุญยีน¹, เยาวพา จิระเกียรติกุล^{*}, ภาณุมาศ ฤทธิไชย¹,

ศรีโสภา เรืองหนู² และ อรุณพร อิฐรัตน์²

Thipsukon Boonyuen¹, Yaowapha Jirakiattikul^{*},

Panumart Rithichai¹, srisopa Ruangnoo² and Arunporn Itharat²

บทคัดย่อ: dioscorealide B เป็นสารสำคัญที่สกัดได้จากข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ลดอาการอักเสบ รักษาโรคโลหิตเป็นพิษ มะเร็ง และเอดส์ พืชชนิดนี้สามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนยอดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณสาร dioscorealide B จากยอดข้าวเย็นใต้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างกัน โดยเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลานาน 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และปริมาณสาร dioscorealide B ของยอดที่พัฒนา จากการทดลองพบว่ายอดข้าวเย็นใต้มีน้ำหนักสดต่อยอดสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 10 และ 12 สัปดาห์ เท่ากับ 299.35 ± 17.24 และ 332.33 ± 5.45 มิลลิกรัม ตามลำดับ น้ำหนักแห้งต่อยอดสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์เท่ากับ 45.31 ± 0.06 มิลลิกรัม และมีปริมาณสาร dioscorealide B สูงสุด 0.90 ± 0.05 และ 0.97 ± 0.00 % (w/w) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 10 และ 12 สัปดาห์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณ dioscorealide B ของยอดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4, 6 และ 8 สัปดาห์

คำสำคัญ: ข้าวเย็นใต้, ปริมาณ dioscorealide B, ระยะเวลาเพาะเลี้ยง

ABSTRACT: Dioscorealide B, an important secondary metabolite, is isolated from Khao-Yen-Tai (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) which used for the treatments of inflammation, septicemia disease, cancers and AIDS. This medicinal plant can be proliferated by plant tissue culture technique. Therefore, the aim of this study was to determine dioscorealide B content from the *in vitro* shoots of Khao-Yen-Tai at different culture periods. Single node segments were cultured on MS medium supplemented with 2 mg/l BA for 4, 6, 8, 10 and 12 weeks. Fresh weight, dry weight and dioscorealide B content of regenerated shoots were recorded. The results indicated that the highest fresh weight per shoot occurred when shoots were cultured for 10 and 12 weeks as 299.35 ± 17.24 and 332.33 ± 5.45 mg, respectively. The highest dry weight per shoot of 45.31 ± 0.06 mg was recorded at 12 weeks after culture. In addition, the shoots cultured for 10 and 12 weeks exhibited the highest contents of Dioscorealide B as 0.90 ± 0.05 and 0.97 ± 0.00 % (w/w), respectively, which were significantly different with dioscorealide B content from shoots culture for 4, 6 and 8 weeks.

Keywords: *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill, dioscorealide B content, cultured period

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120
Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathum-thani 12120

² ภาควิชาแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120
Department of Applied Thai Traditional medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum-thani 12120

* Corresponding author: yjirakia@tu.ac.th

บทนำ

ข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) เป็นไม้เถาเลื้อยเนื้อแข็ง มีเหง้าใต้ดิน เกิดตามป่าเบญจพรรณ ป่าดงดิบ และป่าโปร่งทั่วทุกภาคของประเทศไทย (วิทย์, 2538; แก้ว, 2547) มีสารทุติยภูมิที่สำคัญคือ dioscorealide B (Sukkarn and Itharat, 2009) ข้าวเย็นใต้เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาหลากหลาย เช่น แก้ปวดงอ คุดทะราด ร้อนในกระหายน้ำ น้ำเหลืองเสีย เส้นเอ็นพิการ กามโรค พยาธิในท้อง ฝีแผลเน่าเปื่อยพุพอง และทำให้แผลยุบแห้ง นอกจากนี้ยังนิยมใช้เป็นยาแก้กษัยในร่างกาย รักษาโรคมะเร็ง และเอดส์ (วิทย์, 2538; วุฒิ, 2540; เพ็ญญา และนิจศิริ, 2545) จากสรรพคุณดังกล่าวทำให้ข้าวเย็นใต้เป็นที่ต้องการมากขึ้นเพื่อนำมาผลิตเป็นยารักษาโรค การขยายพันธุ์สามารถทำได้โดยใช้เหง้าแต่ให้ผลผลิตช้า และไม่เพียงพอต่อการใช้ในอุตสาหกรรมยา นอกจากนี้ปริมาณสารทุติยภูมิในเหง้าที่ปลูกตามธรรมชาติมักแปรผันตามสภาพแวดล้อมที่ปลูก และใช้เวลานานในการสร้างสารทุติยภูมิ ดังรายงานของ Rithichai et al. (2013) ที่พบว่าเหง้าอายุ 15 เดือนหลังปลูก มีปริมาณสาร dioscorealide B เพียง 2.7% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในขณะที่หัวพันธุ์ที่ใช้ปลูกมีสาร dioscorealide B สูงถึง 4% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มการผลิตสารทุติยภูมิได้ ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสามารถควบคุมสภาพการเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดเวลา ซึ่งการผลิตสารทุติยภูมิที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนี้ไม่มีปัจจัยภายนอกจากสภาพภูมิประเทศ สภาพภูมิอากาศ หรือฤดูกาลเข้ามาเกี่ยวข้อง (วรภรณ์, 2551) มีรายงานการศึกษาถึงปริมาณสารทุติยภูมิที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังเช่น Chen and Chen (2000) เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Salvia miltiorrhiza* เป็นเวลา 5 ถึง 16 วัน พบว่าปริมาณ total cryptotanshinone และ cryptotanshinone เพิ่มขึ้นตาม

อายุที่เพาะเลี้ยง แต่ปริมาณ rosmarinic acid เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่ออายุ 10 วัน หลังจากนั้นปริมาณสารดังกล่าวลดลงเรื่อยๆ ตามอายุการเพาะเลี้ยง ส่วน De and De (2005) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *D. floribunda* เป็นเวลา 6 ถึง 18 วัน พบว่าปริมาณ diosgenin สูงขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 9 วัน หลังจากนั้นลดลงอีกเล็กน้อยและมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ จากการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นวาระระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสร้างและสะสมสารสำคัญของพืช แต่ยังไม่มียางานปริมาณสาร dioscorealide B จากการเพาะเลี้ยงยอดของข้าวเย็นใต้ที่ระยะเวลาต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสาร dioscorealide B ในยอดข้าวเย็นใต้ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีการทดลอง

พืชทดลองและสภาพเพาะเลี้ยง

นำยอดข้าวเย็นใต้ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตรมาใช้ในการทดลอง โดยตัดเป็นท่อนๆ ให้แต่ละท่อนมีขนาด 1 เซนติเมตร และมี 1 ข้ออาหารที่เพาะเลี้ยงในการทดลองครั้งนี้เติมน้ำตาล 3% ปรับ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.6-5.8 ด้วย 1N NaOH เติมผงวุ้น (agar) 0.8% และนำไปนึ่งกำจัดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ห้องเพาะเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง และมีด 8 ชั่วโมง ความชื้นแสง 3,000 ลักซ์ ด้วยหลอด fluorescence ชนิด cool white

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณ dioscorealide B

นำชิ้นส่วนข้อที่ตัดได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นระยะเวลา 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 5 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 2 ซ้ำ 1 ซ้ำมีจำนวน

ยอดมากพอที่ให้น้ำหนักแห้ง 2 กรัม เมื่อครบกำหนดตามระยะเวลา นำยอดที่พัฒนาไปทำการทดลอง โดยบันทึกน้ำหนักสดต่อยอด จากนั้นนำยอดที่อายุต่างๆไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้งต่อยอด นำเนื้อเยื่อแห้งนี้มาสกัดด้วย chloroform 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 3 วัน อัตราส่วนเนื้อเยื่อพืชแห้ง:chloroform 1:3 โดยปริมาตร จากนั้นกรอง และนำไประเหยให้แห้งใน hot air oven นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสาร dioscorealide B

การวิเคราะห์หาปริมาณสาร dioscorealide B ดัดแปลงจากวิธีของ Sukkam and Itharat (2009) โดยนำสารสกัดของยอดข้าวเย็นใต้ 10 มิลลิกรัม เติมด้วย acetonitrile 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที กรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร dioscorealide B ด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยมี mobile phase คือ น้ำ (A) และ acetonitrile (B) มีอัตราส่วนการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที และฉีดสารเข้าไปปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยใช้ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร คำนวณพื้นที่ใต้กราฟจากสมการของสาร dioscorealide B มาตรฐาน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS

ผลและวิจารณ์

ยอดข้าวเย็นใต้ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ มีน้ำหนักสดและแห้งต่อยอด และปริมาณสาร dioscorealide B เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยมีน้ำหนักสดต่อยอดสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ 299.35 และ 332.33 มิลลิกรัม เมื่อเพาะเลี้ยง

นาน 10 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ และน้ำหนักสดต่อยอดต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญ 143.56 และ 180.55 มิลลิกรัม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 และ 6 สัปดาห์ ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักแห้งต่อยอดพบว่า มีค่าสูงสุด 45.31 มิลลิกรัม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ และต่ำสุด 15.49 มิลลิกรัม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ (Table 1) แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อน้ำหนักสดและแห้งของยอดข้าวเย็นใต้ โดยระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงนานขึ้น มีน้ำหนักสดและแห้งเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากต้นพืชมีการเจริญเติบโตและพัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น ต้นพืชมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มปริมาณของโปรโตพลาสซึม ขยายขนาดและยึดตัวของเซลล์ เพิ่มน้ำหนัก และเพิ่มขนาดของต้น (ลิลลี่, 2546)

ส่วนปริมาณสาร dioscorealide B พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 6 ถึง 10 สัปดาห์ โดยเพาะเลี้ยงนาน 4 และ 6 สัปดาห์ มีปริมาณสาร dioscorealide B น้อยสุด 0.03 และ 0.14% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 10 และ 12 สัปดาห์ มีปริมาณสาร dioscorealide B สูงสุด 0.90 และ 0.97% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งปริมาณสาร dioscorealide B ที่พบในยอดของข้าวเย็นใต้นี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอด คือมีปริมาณสาร dioscorealide B สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลานาน 10 และ 12 สัปดาห์ แสดงว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสร้างและสะสมสารสำคัญของข้าวเย็นใต้ ซึ่งปริมาณสารที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของอรอุมา (2556) ที่ศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสาร dioscorealide B พบว่าไคโตซานไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสาร dioscorealide B แต่การเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น คือ 8 สัปดาห์มีปริมาณสาร dioscorealide B สูงกว่าระยะเวลาเพาะเลี้ยง 4 และ 6 สัปดาห์ และยังสอดคล้องกับ Chen and Chen (2000) ที่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Salvia miltiorrhiza* เป็นเวลา 5 ถึง 16 วัน พบว่า ปริมาณ total cryptotanshinone และ

cryptotanshinone เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง แต่ปริมาณ rosmarinic acid เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่ออายุ 10 วัน หลังจากนั้นปริมาณสารดังกล่าวลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ส่วน De and De (2005) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *D. floribunda* เป็นเวลา 6 ถึง 18 วัน พบว่าปริมาณ diosgenin สูงขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 9 วัน หลังจากนั้นลดลงอีกเล็กน้อยและมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ จากการทดลองนี้สนับสนุนคำกล่าวของ วราภรณ์ (2551) ที่ได้รายงานว่าต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีคุณลักษณะทางพันธุกรรมที่คงไว้ซึ่งความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิเหมือนกับพืชในธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ปริมาณสาร dioscorealide B ที่ได้จากการทดลองนี้ยังค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Rithichi et al. (2013) ที่พบว่าหัวพันธุ์ที่ใช้ปลูกมีปริมาณสาร dioscorealide B สูงถึง 4% หรือเหง้าหัวลูกอายุ 15 เดือนหลังปลูกมีปริมาณสาร 2.7% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) อย่างไรก็ตามการผลิตสารจากต้นที่

ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีข้อดีกว่าพืชที่เพาะปลูกในธรรมชาติ เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงได้ตลอดเวลา และยังไม่เกี่ยวข้องกับปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศ สภาพภูมิประเทศ หรือฤดูกาลต่างๆ (วราภรณ์, 2551) ซึ่งจากการทดลองนี้ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพียง 10-12 สัปดาห์ก็สามารถผลิตสารได้ 0.90-0.97% (w/w)

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงควรเก็บยอดชำวเย็นได้ที่อายุ 10 สัปดาห์ เพื่อผลิตสาร dioscorealide B เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่า โดยมีปริมาณสาร dioscorealide B ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับยอดอายุ 12 สัปดาห์ ทำให้ประหยัดเวลาในการผลิตสาร อย่างไรก็ตามสาร dioscorealide B ที่ผลิตได้จากยอดชำวเย็นได้ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นยังมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเหง้าที่ปลูกในแปลง จึงควรศึกษาเพิ่มเติมถึงการเพิ่มสารกระตุ้นเพื่อเพิ่มสารสำคัญต่อไป

Table 1 Fresh weight per shoot (mg), dry weight per shoot (mg) and dioscorealide B content (% w/w) of *D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill regenerated shoots after single node segments were cultured on MS medium supplemented with 2 mg/l BA for 4, 6, 8, 10 and 12 weeks.

culture periods (weeks)	fresh weight per shoot (mg)	dry weight per shoot (mg)	dioscorealide B content (%w/w)
4	143.56±17.38 ^{c1/}	15.49±2.61 ^a	0.03±0.02 ^c
6	180.55±19.33 ^c	21.91±2.97 ^d	0.14±0.04 ^c
8	220.43±8.45 ^b	26.85±0.64 ^c	0.47±0.08 ^b
10	299.35±17.24 ^a	36.96±1.46 ^b	0.90±0.05 ^a
12	332.33±5.45 ^a	45.31±0.06 ^a	0.97±0.00 ^a
F-test	**	**	**

^{1/} mean value ± SD (n=2) within a column followed by the different letters were significantly different at P<0.01 according to Duncan's New Multiple Range Test (DMRT).

** the statistical significantly different at 99% (P<0.01).

สรุป

ยอดข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 10 และ 12 สัปดาห์มีน้ำหนักสดต่อยอดสูงสุด 299.35 และ 332.33 มิลลิกรัม ตามลำดับ และมีน้ำหนักแห้งต่อยอดสูงสุด 45.31 มิลลิกรัม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ ปริมาณสาร dioscorealide B สูงสุด 0.90 และ 0.97% (w/w) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 10 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- แก้ว กาญจน. 2547. ตำราสมุนไพรบำบัดโรคชุดที่ 2 สูตรตำรับสมุนไพรรักษาโรคเบาหวาน. สำนักพิมพ์นีนอนบุ๊คมีเดีย, นนทบุรี.
- เพ็ญภา ทพย์เจริญ และ นิจศิริ เรืองรังษี. 2545. สมุนไพรในอุทยานแห่งชาติภาคกลาง. องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, กรุงเทพฯ.
- ลิลลี่ กาวิตุ. 2546. การเปลี่ยนแปลงสัณฐานและพัฒนาการพืช. โรงพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิทย์ เทียงบุญธรรม. 2538. พจนานุกรมสมุนไพรไทยฉบับสรรพคุณยาไทย. โรงพิมพ์นิยมวิทยา, กรุงเทพฯ.
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. เกษตรกรรมไทยสมุนไพรฉบับปรับปรุงใหม่. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- วราภรณ์ ภูตะสุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด, ขอนแก่น.
- อรอุมา สองศรี. 2556. ผลของโคโคซานต่อการเจริญเติบโตและปริมาณ Dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการเกษตร. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. รังสิต, ปทุมธานี.
- Chen, H. and F. Chen. 2000. Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension culture. *Plant Cell Rep.* 19: 710-717.
- De, D. and B. De. 2005. Elicitation of diosgenin production in *Dioscorea floribunda* by ethylene-generating agent. *Fitoterapia.* 76: 153-156.
- Rithichai, P., A. Itharat, Y. Jirakiattikul and S. Ruangnoo. 2013. Growth of *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill and dioscorealide B content at different harvest times. *Pharmacology online.* 1: 225-229.
- Sukkarn, B. and A. Itharat. 2009. Development of the HPLC quantitative analysis of dioscorealide B from *Dioscorea membranacea* Pierre. *Thammasat Medical Journal.* 9: 156-163.