สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.) เชิงการค้าโดยการชักนำให้เกิดต้นผ่านขบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

(Induction of somatic embryo for commercial seedlings propagation of *Stemona curtisii* Hook.f.)

โดย

นางสาวนาตยา มนตรี

นายเฉลิมพล สุวรรณภักดี

นางสาวจินดา สุดวัดแก้ว

นางสาวศศิดารา เจริญศิริ

RCH
SB
292
.S7
ก491

สขหมู่.....
เลขทะเบียน.....120312
วัน,เดือน,ปี.....15 ก.ค. 2555

b.12324456
i.....

ที่ปรึกษาโครงการ

นางสาวสุเม อรัญนารถ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณประจำปี 2552

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ประเทศไทยกำลังประสบปัญหาจากการกีดกันทางการค้า จากสหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และอเมริกา ในการส่งผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เนื่องจากการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม และเกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในสินค้าเกษตร นอกจากนี้แล้วการนำสารเคมีทางการเกษตรมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชมาเป็นเวลานาน มีผลทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของสารเคมีสู่สภาพแวดล้อมและเป็นพิษต่อเกษตรกรและผู้บริโภค ทำให้นักวิจัยมีความสนใจในการศึกษาวิจัยหาพืชที่มีศักยภาพ ในการนำมาสกัดสารทุติยภูมิเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อใช้แทนสารเคมีอันตรายต่าง ๆ และลดการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ จากรายงานของนักวิจัยไทยพบว่าสมุนไพรหลายชนิดมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช และหนอนตายหยากเป็นหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งศัตรูพืชได้ในส่วนของราก ปัจจุบันได้มีการนำส่วนของรากไปใช้ประโยชน์ในการสกัดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ปัญหาของวัตถุดิบเป็นเรื่องสำคัญในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ทั้งการจำแนกชนิดที่ถูกต้องรวมทั้งปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการ ถึงแม้หนอนตายหยากจะสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเมล็ดและการแยกกอ แต่ในการเพาะเมล็ดพบว่าเมล็ดงอกได้ช้าและใช้ระยะเวลานาน ส่วนการแยกกอนั้นพบว่าส่วนใหญ่ประสบปัญหาต้นตายเนื่องจากโรคเน่า ในปี 2548-2549 ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากการเลี้ยงส่วนของยอด แต่พบว่าการเพิ่มปริมาณยังทำได้น้อยและสิ้นเปลืองแรงงานและเนื้อที่ ดังนั้นการผลิตต้นจากโซมาติกเอ็มบริโอ อาจเป็นแนวทางในการผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยากให้ได้ปริมาณมากและมีต้นทุนต่ำ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช่ประโยชน์ในการผลิตสารสกัดเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อไปได้

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณ จาก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ประจำปี 2552 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.สุเมอรัญนารถ ที่กรุณาให้คำปรึกษาอันเป็นประโยชน์ต่อการทำการวิจัย คุณสุรชาติ ไชยศรีหา และคุณกีรติ ข่อยแก้ว ที่ได้ช่วยในการเก็บข้อมูลงานวิจัย

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
บทนำ	3
วัตถุประสงค์	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	13
ผลการวิจัย	16
วิจารณ์	28
สรุป	32
เอกสารอ้างอิง	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนยอดของหนอนตายหยากที่ได้จาการเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน	17
2	ลักษณะของแคลลัส สีและการเกิดแคลลัสของต้นอ่อนหนอนตายหยากที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 เดือน	18
3	ลักษณะการพัฒนาของโซมาติเอ็มบริโอในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพแสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	24
4	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหนอนตายหยากหลังการเลี้ยงเป็นเวลาต่าง ๆ กัน	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะดอกหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.F.)	6
2	โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์ที่พบในพืชสกุล *stemona*	7
3	โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ใน *S. Curtisii* Hook f.	9
4	รูปแบบการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของพืชทั่วไป	11
5	ลักษณะชิ้นส่วนยอดและตาข้างที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์	16
6	ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเมล็ดของหนอนตายหยากในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน	18
7	การเกิด embryogenic callus ของเมล็ดอ่อนหนอนตายหยากที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 เดือน	20
8	ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเลี้ยง embryogenic callus ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์	21
9	ลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของแคลลัสหนอนตายหยากที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพมืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์	22
10	การเกิดต้นที่ได้จากการเลี้ยงโซมาติกในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพมืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	24
11	การเกิดต้นที่สมบูรณ์จากการเลี้ยงของโซมาติกเอ็มบริโอ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพมืด เป็นเวลา 8 สัปดาห์	24
12	ลักษณะต้นของหนอนตายหยากที่ได้หลังจากการนำต้นจากสภาพมืด มาเลี้ยงในสภาพมีแสงเป็นเวลา 6 เดือน	25
13	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหนอนตายหยากหลังการเลี้ยงเป็นเวลาต่าง ๆ กัน	26
14	ต้นกล้าที่ได้จากการอนุบาลเป็นเวลา 12 สัปดาห์	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.) เชิงการค้า โดยการชักนำให้เกิดต้นผ่านขบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

บทคัดย่อ

การศึกษาการนำส่วนต่าง ๆ ของหนอนตายหยากมาเลี้ยง ได้แก่ ยอด ตาข้าง ลำต้น และราก มาชักนำให้เกิดแคลลัสของหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook. F.) ในอาหารแข็งและเหลวสูตร Murashige and skoog (MS, 1964) ที่เติม 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีการเกิดแคลลัส แต่มีการเกิดแคลลัสหลังการเลี้ยงเมล็ดในอาหารอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแคลลัสส่วนใหญ่เป็นแคลลัสแบบแน่น และการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด 58 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเกิดแคลลัสได้ทั้งแบบหลวมและแบบแน่น

ส่วนการเพิ่มปริมาณแคลลัสพบว่า การเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D หรือ TDZ หรืออาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆแคลลัสมีมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 4 และตายในที่สุด ส่วนการเลี้ยงในอาหารแข็ง ที่เติม 2,4-D 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิด embryogenic callus ได้ในเดือนที่ 8

จากการนำ compact callus และ embryogenic callus มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ พบว่า การเลี้ยง embryogenic callus ในอาหารเป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ แต่หลังจาก 1 สัปดาห์ มีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนการเลี้ยง embrygenic callus ในอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการพัฒนาเป็น globular ได้หลังการเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อนำเอ็มบริโอระยะ globular มาเลี้ยงต่อพบว่ามีการเกิดต้นได้หลังการเลี้ยง 4 สัปดาห์ และต้นที่เลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 3-6 เดือน สามารถนำไปย้ายปลูกได้

การนำต้นที่ได้จากการชักนำผ่านการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอไปปลูกในสภาพภายนอกโดยการแช่ในน้ำเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน พบว่าอัตราการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลา และการแช่ในน้ำ เป็นเวลา 7 วัน ต้นกล้ามีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induction of somatic embryo for commercial seedlings propagation of *Stemona curtisii* Hook.f.

Abstract

The study on callus induction of *Stemona curtis ii* Hook. F. was done. Different explants; shoot lateral bud, stem and root from seedlings were cultured on Murashig and skoog (MS, 1964) supplemented with 0-10 mg L^{-1} 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The recult found that callus induction was not successful in all treatments. While culturing seeds on MS media supplemented in 0-1 mg L^{-1} 2,4-D were achieved for callus induction. Compact callus could induced in all treatment and highest percentage of callus induction at 58 % were achieved from 0.2 mg L^{-1} 2,4-D while friable callus were found only in 0.4 mg L^{-1} 2,4-D treatment.

For callus proliferation, callus were culture in liquid media supplemented with different concentrations of 2,4-D or TDZ or 2,4-D combination with TDZ. After 4 weeks the color of callus were changed from light green to brown and died. The culturing on solid media supplemented with 0-1 mg L^{-1} 2,4-D could not increased callus size however embryogenic callus were found in 0.4 and 0.6 mg L^{-1} 2,4-D treatments.

Somatic embryogenesis were induced by culturing compact callus and embryogenic callus on liquid MS media supplemented with 0-1 mg L^{-1} 2,4-D in liquid and solid media. The results found that somatic embryo could not develop in all liquid media. The culturing embryogenic callus on solid MS media supplemented with 0-1 mg L^{-1} 2,4-D in dark condition could promote somatic embryo at globular stage after cultured for 2 weeks and embryo could develop to plantlet after culture on solid MS in dark condition for 4 weeks. The 8 weeks plantlets were transfer to light condition and able to transfer to outside after culture for 3-6 month.

S. curtisii plantlets were soaked in water for 0, 1, 3, 5 and 7 days before transfer to outside. The survival rate was decreased gradually timing of acclimatization. The highest survival at 20 percent was achieved in 7 days treatment.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

หนอนตายหยาก เป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Stemona* วงศ์ Stemonaceae ซึ่งพืชในสกุลนี้มีอยู่หลายชนิดในประเทศไทย แต่ละชนิดล้วนมีชื่อเรียกเหมือนกันคือหนอนตายหยาก มีการนำมาใช้ประโยชน์โดยไม่ได้มีการแยกชนิดที่ชัดเจน เช่น ใช้เป็นพืชสมุนไพรรักษาอาการแก้ไอ ขับเสมหะ ขับลม ฆ่าพยาธิ ใช้เป็นสมุนไพรป้องกันกำจัดศัตรูพืช (เลาจนา และประคอง, 2520) ใช้เป็นสมุนไพรในการกำจัดเห็บ หมัด และไร ในฟาร์มปศุสัตว์ (ทวีศักดิ์, 2542) สำหรับ *S. curtisii* มีรายงานการกระจายพันธุ์บริเวณภาคใต้ สารสกัดจากหนอนตายหยากชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของหนอนกระทู้ผักและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ *Fusarium* sp., *Pytium sp, Phytopthera sp.* และ *Collectoticum sp.* (ชนนิกานต์, 2550) เนื่องจากหนอนตายหยากชนิดนี้มีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ได้แก่ Stemocurtisin, Stemofolin และ Stemocurtisinol (Kaltenegger *et al.*, 2003) ปัจจุบันได้มีปริมาณลดน้อยลงมาก เนื่องจากการขุดต้นเพื่อนำรากมาขายในปริมาณมาก โดยเฉพาะเพื่อการสกัดสำหรับทำสารสกัดป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมต้องใช้ต้นพันธุ์จำนวนมาก และมีการควบคุมเพื่อให้ได้มาตรฐานตามที่ต้องการ ถึงแม้ว่าหนอนตายหยากจะสามาถขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเมล็ดและการตัดแยกหน่อจากรากนั้น พบว่าการเพาะเมล็ดทำได้ช้าเนื่องจากการพักตัวของเมล็ด ส่วนการตัดแยกหน่อจากรากนั้นเกิดการตายเนื่องจากโรคเน่า ส่วนการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *S. curtisii* โดยผ่านการชักนำให้เกิดยอดนั้น สามารถชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ (Montri et., 2004) แต่พบว่ายังไม่สามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากข้อจำกัดของต้นทุน โดยเฉพาะการตัดย้ายเนื้อเยื่อต้องใช้แรงงานปริมาณมาก และมีต้นทุนสูงจากการอนุบาลต้นพันธุ์ปลอดโรค

การชักนำให้เกิดต้นผ่านขบวนการ Somatic embryogenesis เป็นเทคนิคหนึ่งของการลดต้นทุนการผลิตพืชปลอดเชื้อ เนื่องจากทำการผลิตต้นพันธุ์ผ่านการชักนำแคลลัสและการเลี้ยงโซมาติกเซลล์ ซึ่งใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงยอดโดยทั่วไป นอกจากนี้ยังลดแรงงานในการตัดย้ายเนื้อเยื่อ และต้นกล้าที่ได้จากโซมาติกเอ็มบริโอ มีความเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูง ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาการผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยากให้ได้ปริมาณมาก โดยการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอและผลิตโซมาติกเอ็มบริโอ เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์เพียงพอต่อการใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรมและทดแทนการใช้สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ลดการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและอนุรักษ์ต้นหนอนตายหยากในสภาพธรรมชาติต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริ ตามโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริ โดย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. เพื่อศึกษาชิ้นส่วน สูตรอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส การเพิ่มปริมาณแคลลัส และการชักนำให้เกิดโซมาติดเอ็มบริโอ และการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.) ในสภาพปลอดเชื้อ
3. เพื่อศึกษาแนวทางการย้ายปลูกและการอนุบาลต้นกล้าหนอนตายหยากที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ต้นทุนต่ำ
4. เพื่อผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยากให้ได้จำนวนต้นในปริมาณมาก รองรับอุตสาหกรรมการผลิตสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากพืชสมุนไพรไทยเพื่อใช้ภายในประเทศรวมทั้งเพื่อการส่งออก และลดการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช และนำผลงานวิจัยไปใช้ทำการทดลองในการคัดเลือกเซลล์และปรับปรุงพันธุ์เพื่อใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

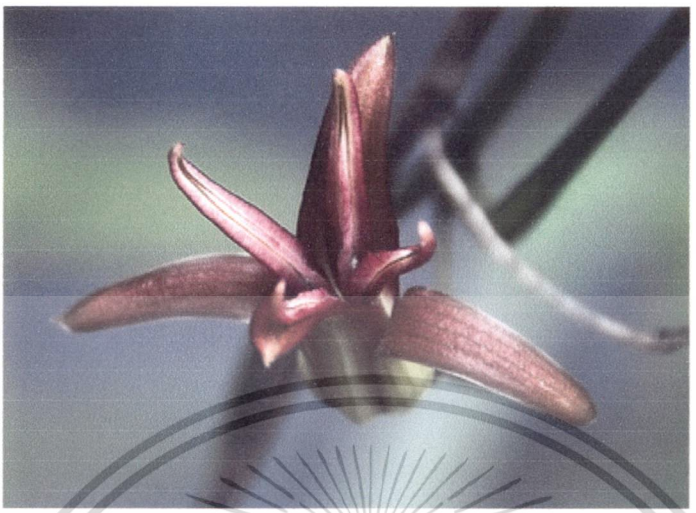
หัว (Rhizome) มีลักษณะเป็นพวงคล้ายกระชายเป็นช่อยาว เมื่อเจริญเต็มที่จะมีความยาว 20-25 เซนติเมตร

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



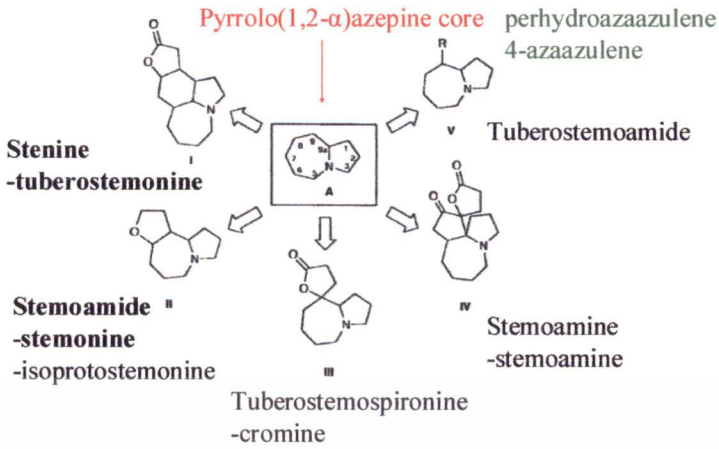
ภาพที่ 1 ลักษณะของดอก *Stemona curtisii* Hook. f.

สารออกฤทธิ์และประโยชน์ของหนอนตายหยาก

นักวิทยาศาสตร์ในหลายประเทศได้มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ (active ingredient) และสารอื่นในรากของหนอนตายหยากชนิดต่าง ๆ โดยในช่วงปี ค.ศ. 1934-1958 มีนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นทำการแยกสารอัลคาลอยด์ (alkaloid) จาก *Stemona tuberosa* Lour. พบว่ามีสารอัลคาลอยด์ คือ stemonidine ($C_{19}H_{30}O_5N$) และ tuberstemonine ($C_{22}H_{23}O_4N$) isotuberstemonine hypotuberstemonine และ oxatuberstemonine และต่อมาได้มีการศึกษาโครงสร้างของ tuberstemonine อีกด้วย

ซึ่งสารอัลคาลอยด์ในสกุล 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์ที่พบในพืชสกุล *stemona* (ดัดแปลงจาก Brem et al., 2001)

สำหรับประเทศไทยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหนอนตายหยากต่อสัตว์ทดลอง และ จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น บุณย์ธนิสร์ (2549) รายงานว่า ยาชงสกัดหนอนตายหยากด้วยอีเทอร์จะได้ปริมาณ อัลคาลอยด์สูง มีฤทธิ์ฆ่าพยาธิไส้เดือนได้มากกว่ายาชงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ และยาชงสกัดด้วยแอลกอฮอล์สามารถฆ่าหนอนได้ดีเมื่อหนอนกินเข้าไป เพราะยานี้ทำให้หนอนมึนเมาและเข้าไปมีผลต่อระบบประสาท แล้วทำให้หนอนตายในที่สุด

ประคอง (2520) รายงานว่า สารสกัดหนอนตายหยากจะไม่มีฤทธิ์แบบสัมผัสตาย (contact poisoning) ต่อยุงลาย แต่มีผลต่อลูกน้ำยุงลาย โดยจะมีผลทำให้การปิดเปิดของปากท่อหายใจ (abdominal spiracles) และปลายสุดของท่อหายใจ (siphon) ไม่เป็นจังหวะ จึงทำให้ลูกน้ำยุงลายหายใจไม่ได้และตายในที่สุด

ประคอง (2523) รายงานว่า สารสกัดหนอนตายหยากที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อยู่ในรูปของยาครีมจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเหาได้ดีกว่าในรูปของยาน้ำ และมีพิษตกค้างเพียงหนึ่งสัปดาห์เท่านั้น

ขจรศักดิ์ (2538) ได้ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช อันได้แก่ *Fusarium* sp. *Colletotrichum* sp. *Alternaria* sp. *Aspergillus niger* และเชื้อราสาเหตุโรคผิวหนัง อันได้แก่ *Epidermophyton floccosum Microsporum gypseum Trichophyton mentagrophytes* และ *T. rubrum* โดยนำผงสมุนไพรบดแห้งมาผสมในอาหาร potato dextrose agar ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าหนอนตายหยากมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและโรคผิวหนังรองลงมาจากการใช้สารสกัดจากกานพลูและว่านน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กวินหาญ (2539) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อหนอนกระทู้หอม พบว่า สารสกัดจากรากหนอนตายหยากที่ระดับความเข้มข้น 4% (w/v) มีประสิทธิภาพต่อการกำจัดหนอนกระทู้หอมในวัยที่ 2 3 และ 4 ได้ดี

วาสนา (2544) ทำการศึกษาสารสกัดจากหนอนตายหยากที่มีฤทธิ์ต่อการฆ่าแมลง พบว่าสารสกัดจากรากของหนอนตายหยากที่สกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโลมีเทน และ 70 % เมทานอล เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี feeding leaf disc กับหนอนกระทู้ผักวัย 2 ใช้วิธี residual film กับด้วงงวงข้าวโพดตัวเต็มวัยอายุ 5 วัน และใช้วิธี test with aqueous dispersion กับลูกน้ำยุงลายวัย 3 พบว่า สารสกัดหยาบด้วยไดคลอโรมีเทนจากรากของ หนอนตายหยากแสดงความเป็นพิษสูงต่อหนอนกระทู้ผัก โดยมีอัตราการตายที่ระดับความเข้มข้น 40,000 ppm เป็น 44 % ส่วนสารสกัดหยาบด้วย 70 % เมทานอล แสดงความเป็นพิษสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm กับด้วงงวงข้าวโพดมีอัตราการตาย 48 %

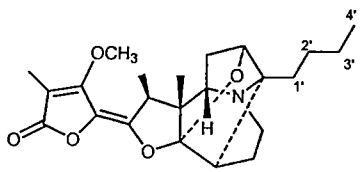
นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรหนอนตายหยากเพื่อควบคุมปริมาณการเกิดหนอนแมลงวันในมูลไก่ โดยใช้รากหนอนตายหยากอบแห้งบดละเอียดผสมเพิ่มในสูตรอาหารไก่ที่ระดับต่าง ๆ พบว่า จำนวน ขนาด และน้ำหนักของหนอนแมลงวันที่เพาะจากมูลไก่ที่กินอาหารสูตรดังกล่าวนี้มีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด (สุทธาพันธ์, 2544)

สารออกฤทธิ์และประโยชน์ของหนอนตายหยาก ใน *S.curtisii*

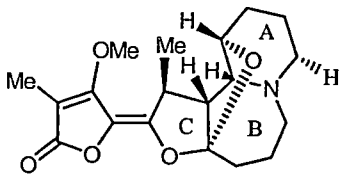
ได้มีรายงานสารออกฤทธิ์ใน *S. curtisii* พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ มีสารที่สำคัญได้แก่ stemofoline, stemocurtisin และ stemocurtisinol ซึ่งมีประสิทธิ์ภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera littoralis*) (Kaltenegger *et al.*, 2003) (ภาพที่ 3) และมีรายงานการใช้ประโยชน์จากหนอนตายหยาก โดยไม่ได้มีการจำแนกชนิดในสกุล *Stemona* ในการใช้รากเป็นยาทางการแพทย์แผนโบราณ และการสาธารณะสุข ตลอดทั้งทางด้านการเกษตร สำหรับทางด้านการแพทย์แผนโบราณและการสาธารณะสุข สำหรับ *S. curtisii* .พบว่ามีการนำสารสกัดไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดย ขจรศักดิ์ (2538) ได้ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช อันได้แก่ *Fusarium* sp. *Colletotrichum* sp. *Alternaria* 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 ตัวหนอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

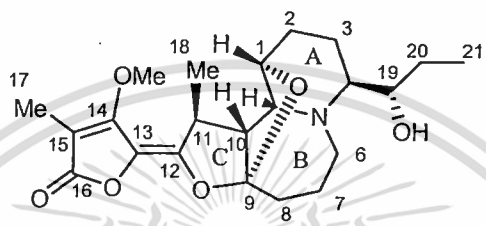
ที่รอดตายจะเจริญเป็นดักแด้ได้ แต่ดักแด้จะมีลักษณะผิดปกติ คือ ผนังปล้องของดักแด้จะโป่งนูนออก ดักแด้มีขนาดเรียวเล็ก หงิกงอจนผิดรูปร่าง ดักแด้ดังกล่าวนี้จะไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้



Stemofoline



Stemocurtisin



Stemocurtisinol

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ใน *S. Curtisii* Hook f. (Kaltenegger *et al.*, 2003)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก

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

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยากนั้น ได้มีรายงานการเพาะเลี้ยงหนอนตายหยากชนิดต่าง ๆ ไว้ดังนี้

ประทุมวัน (2542) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *S. collinsae* โดยการนำชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4.0 ppm ร่วมกับ NAA 1.0 ppm ชิ้นส่วนใบอ่อนมีการตอบสนองสูตรอาหารโดยขอบใบจะม้วนขึ้นบริเวณกลางใบมีการเจริญเป็นตุ่มของแคลลัสแต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสที่สมบูรณ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุมนาและคณะ (2538) ได้นำชิ้นส่วนใบอ่อนของ S. *tuberosa* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 2,4-D 1.0 ppm ร่วมกับ BA 3.0 ppm สามารถชักนำให้ใบอ่อนเกิดแคลลัสได้ดีในสภาพมืด

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

Montri et., al. (2004) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *S. curtisii* โดยนำชิ้นส่วนยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 20 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดปริมาณมาก และการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 5-20 μM สามารถชักนำให้ราก และสามารถย้ายต้นออกปลูกในโรงเรือนได้ และเมื่อต้นที่ได้สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับต้นที่ได้จากสภาพธรรมชาติ

Montri et., al (2005) ได้ทำการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอของ *S. tuberosa* โดยการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 20 μM จนได้แคลลัส จากนั้นชักนำให้เกิดโซมาติดเอ็มบริโอโดยการย้ายแคลลัสลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 μM

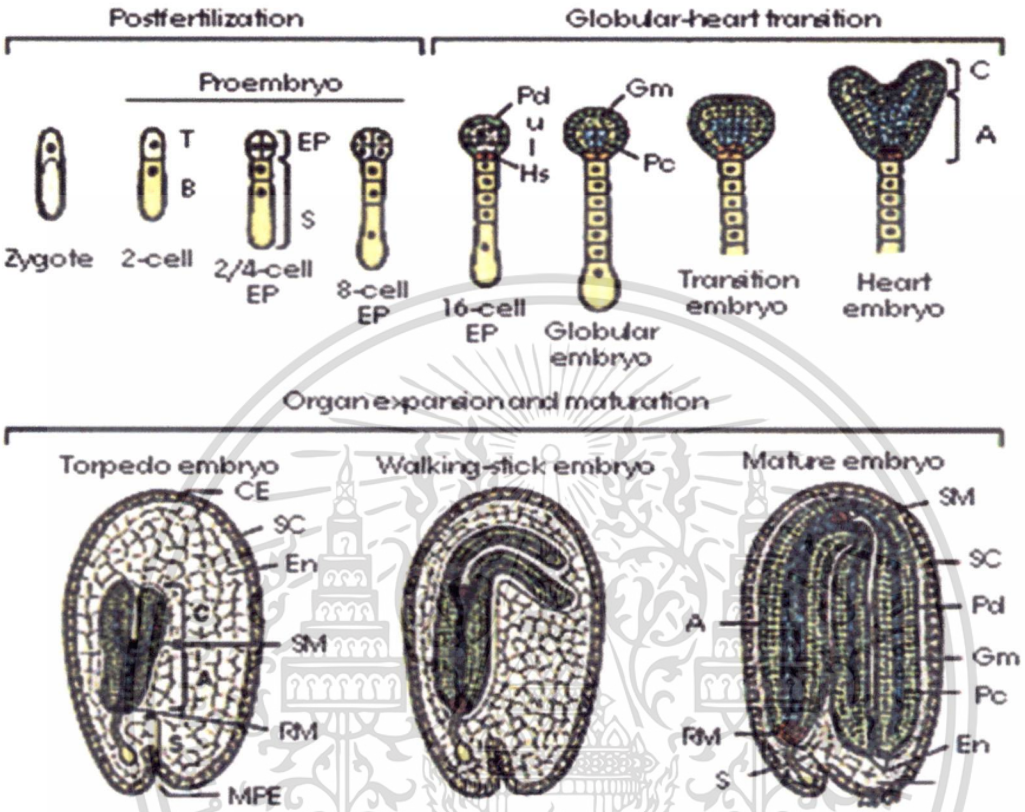
โซมาติกเอ็มบริโอและการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

ปัจจุบันการผลิตต้นกล้าพืชปริมาณมาก เพื่อการค้าและอุตสหกรรมนิยมใช้การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เรื่องจากสามารถชักนำให้เกิดต้นได้เลยโดยการชักนำจากโซมาติกเอ็มบริโอหรือเพาะเมล็ดเทียมที่ทำจากโซมาติกเอ็มบริโอ (Ghosh and Sen, 1994) พืชหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จโดยการชักนำผ่านขบวนการ somatic embryogenesis ทั้งในไม้ดอก เช่น คาร์เนชั่น (Karami et., al., 2006) เบญจมาศ, cyclamen persicum, กุหลาบ, บีโกเนีย (Rout et.al., 2006) พืชอาหารสัตว์ เช่น ถั่ว alfalfa (Denchev et.al., 1993) พืชสมุนไพร เช่น โสมเกาหลี (Choi et.,al. 1998) พืชน้ำมัน เช่น ปาล์มน้ำมัน (Kanchanapoom and Chourykaew, 1998) และพืชผัก เช่น แครอท (Mizukami et.al., 2007) และแตงโม (Kintzios et.al., 2004) เป็นต้น ซึ่งนอกจากเพื่อการขยายพันธุ์ การทำเมล็ดเทียม แล้วยังมีการผลิตโซมาติกเอ็มบริโอ เพื่อใช้ในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช และการปรับปรุงพันธุ์ (Manoharan et.al., 1998)

ในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ สามารถชักนำได้ 2 แบบ คือ direct somtic embryogenesis คือการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชโดยตรง และ indirect somatic embryogenesis เป็นการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอโดยการชักนำผ่านแคลลัส (Mizukami et.al., 2007) โดยรูปแบบการพัฒนามีความแตกต่างไปตามชนิดพืช โดยทั่วไปการพัฒนาของพืชใบเลี้ยงคู่ค่อนข้างมีแบบแผนเช่นเดียวกับการเกิดไซโกติกเอ็มบริโอ โดยมีการพัฒนาผ่านระยะ globular stage, heart shape, torpedo shape และ cotyledon embryo (ภาพที่ 4) (Goldberg et al., 1994) ส่วนในใบเลี้ยงเดี่ยวโดยทั่วไปมีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พัฒนาที่ไม่มีแบบแผน เช่นในกรณีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของหนอนตายหยากชนิด *Stemona tuberosa* (Montri, 2005)



ภาพที่ 4 รูปแบบการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอของพืชทั่วไป (Goldberg et al., 1994)

ซึ่งมีปัจจัยสำคัญในการชักนำคือปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยภายนอก ทั้งการให้สารอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปแล้วการดัดแปลงอาหารโดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารและการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถทำได้ง่ายที่สุด โดยพืชแต่ละชนิดประสบความสำเร็จในการเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ในสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ดังเช่น

Karami et.al. (2006) ได้ทำการชักนำให้เกิด somatic embryo ในคาร์เนชั่น โดยการนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9 μM และ BA ความเข้มข้น 0.8 μM พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาเป็น embryogenic callus และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริยเติบโตสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

Mizukami et.al. (2007) ได้ทำการชักนำให้เกิดขบวนการ somatic embryogenesis ในแครอท โดยการนำส่วนของลำต้นอ่อนของแครอทมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก.ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิตร เก็บไว้ในสภาพที่มีแสง 200 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการย้ายลงอาหารสูตร MS ที่ไม่มี 2,4-D เป็นเวลา 30 วัน พบว่าแครอทสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

Wang et.al. (2004) ได้ทำการชักนำให้เกิดเกิดต้นใหม่ผ่านขบวนการ somatic embryogenesis ใน *Scripus robustus* โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 มก.ต่อลิตร จากนั้นย้ายลงอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ก่อนการนำไปชักนำให้เกิดต้นโดยการเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มก.ต่อลิตร และย้ายลงอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสามารถผลิตต้นกล้า *Scripus robustus* ได้ปริมาณมาก

Kintzios et.al. (2004) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ในแตงโมโดยการดัดแปลงปริมาณของธาตุอาหารหลัก (macronutrient) ต่าง ๆ พบว่า ไอออนหลักต่าง ๆ เช่น NH_4^+ Ca^{2+}, Mg^{2+} $Fe2^{2+}$ ให้ผลแตกต่างในการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

Sreedhar and Bewley (1998) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอในถั่ว alfafa (*Medicago sativa* L.) พบว่าในระหว่างการพัฒนาของเอ็มบริโอนั้น ระดับของ ABA มีปริมาณเพิ่มขึ้น การเติมสารประกอบของกำมะถันและไนโตรเจน ในสูตรอาหารเลี้ยงแคลลัสมีผลทำให้การพัฒนาของโซมาติกดีขึ้น

Murch et.al. (2003) ได้ทำการเพาะเลี้ยงอัฟริกันไวโอเลต พบว่า 1400 เอมบริโอมีการพัฒนาจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงลำต้น

Hohe et.al. (2001) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Cyclamen* ในอาหารเหลว พบว่า TDZ ช่วยในการพัฒนาของ somatic embryo

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

ทำการเก็บเมล็ดพันธุ์หนอนตายหยาก มาทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคอลไรด์ที่ความเข้มข้น 5 % เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเมล็ดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เมื่อเมล็ดงอกเป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นทำการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

1.1 ผลของ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของหนอนตายหยากในอาหารเหลว เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

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

ปัจจัยที่ 1 ชิ้นส่วนเริ่มต้น ได้แก่ ยอด ราก ลำต้นและตาข้าง

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ความเข้มข้นของ 2,4-D ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการตัดชิ้นส่วน ยอด ราก และลำต้นของต้นกล้าที่มีอายุ 2 เดือนมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลการพัฒนาของชิ้นส่วน การเกิดแคสทุกสัปดาห์ และถ่ายภาพ

1.2 ผลของ 2,4-D ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของหนอนตายหยากในอาหารแข็ง เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

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

ปัจจัยที่ 1 ชิ้นส่วนเริ่มต้น ได้แก่ ยอด ราก ลำต้นและตาข้าง

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ความเข้มข้นของ 2,4-D ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการตัดชิ้นส่วน ยอด ราก และลำต้นของต้นกล้าที่มีอายุ 2 เดือนมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลการพัฒนาของชิ้นส่วน การเกิดแคสทุกสัปดาห์ และถ่ายภาพ

1.3 ผลของ 2,4-D ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหนอนตายหยากในอาหารแข็ง เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 ทรีทเมนต์ ได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดลองโดยนำฝักที่มีเมล็ดอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์จากนั้นทำการลนไฟ แกะส่วนของเปลือกออก และทำการเพาะเมล็ดอ่อนลงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลการพัฒนาของเมล็ด การเกิดแคสทุกสัปดาห์ และถ่ายภาพ

การทดลองที่ 2. การศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัส

แบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

2.1 การศึกษาผลของการเติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 ทรีทเมนต์ ได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 , 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 , 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บันทึกการเกิดและลักษณะของแคลลัส และบันทึกภาพทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์

2.2 การศึกษาผลของความผลของการเติม TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 ทรีทเมนต์ ได้แก่ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 , 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารอาหารเหลว ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บันทึกการเกิดและลักษณะของแคลลัส และบันทึกภาพทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์

2.3 การศึกษาผลของการเติม 2,4-D และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ 0, 0.5, 1 , 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของ TDZ ที่ 0, 0.5, 1 , 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บันทึกการเกิดและลักษณะของแคลลัส และบันทึกภาพทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การศึกษาผลของการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 ทรีทเมนต์ ได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยนำเมล็ดมาเลี้ยงในอาหารอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 , 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการย้ายทั้งชิ้นส่วนลงในอาหารใหม่สูตรเดิม บันทึกการเกิดและลักษณะของแคลลัส และบันทึกภาพหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน

การทดลองที่ 3. **การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ**

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ สภาพการให้แสง ได้แก่ การให้แสงและการเลี้ยงในที่มืด ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของ 2,4-D ได้แก่ 0, 0.2, 0.4 , 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรทำการทดลองโดยนำแคลลัส 0.5 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 , 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บันทึกการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 4. **การศึกษาผลของการให้แสงต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ**

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 สภาพการให้แสง ได้แก่ การให้แสงและการเลี้ยงในที่มืด ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาของการได้รับแสง ได้แก่ 0, 2 และ 4 วัน โดยการนำโซมาติกเอ็มบริโอมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เลี้ยงในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสงเป็นเวลา 0, 2 และ 4 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในสภาพที่มีแสง บันทึกผลโดยการเปรียบเทียบการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยนับจำนวนต้นที่สมบูรณ์และเป็นปกติ นำไปส่องใต้กล้องเพื่อดูพัฒนาการ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 5. **การนำต้นออกปลูก**

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 3 ทรีทเมนต์ คือการแช่ต้นกล้าในน้ำเป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน โดยนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาอนุบาลโดยนำมาเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการแช่ในน้ำเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน ชั่งน้ำหนักสดจึงนำไปปลูกในวัสดุปลูกทรายเพอร์ไลท์และเวอร์มิคูไลท์ อัตราส่วน 1:1 บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการย้ายเป็นเวลา 1 เดือน จนครบ 3 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัย

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในหนอนตายหยากเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์หนอนตายหยาก โดยการชักนำให้เกิดแคลลัว การเพิ่มปริมาณแคลลัส การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอในสูตรอาหาร และสภาพแสงต่าง ๆ รวมทั้งการอนุบาลต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบว่า

การทดลองที่ 1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

การทดลองที่ 1.1 ผลของ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของหนอนตายหยากในอาหารเหลว เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการตัดชิ้นส่วน ยอด ราก และลำต้นของต้นกล้าที่มีอายุ 2 เดือนมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลการเกิดแคลลัส พบว่า ชิ้นส่วนทุกชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2-10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาล ส่วนในอาหารที่ไม่เติม 2,4-D พบว่า รากมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในสองสัปดาห์แรกและเปลี่ยน เป็นสีดำในช่วงต่อมา ในขณะที่ชิ้นส่วนอื่น ๆ เกิดการตอบสนองต่ออาหารได้ดีในช่วง 2 สัปดาห์แรก (ภาพที่ 5) แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 6 พบว่า ชิ้นส่วนเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด โดยที่ชิ้นส่วนทั้งหมดในทุกทรีทเมนต์ไม่มีการตอบสนองในการเกิดแคลลัส

ภาพที่ 5 ลักษณะของชิ้นส่วนยอดและตาข้างที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การทดลองที่ 1.2 ผลของ 2,4-D ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของหนอนตายหยากในอาหารแข็ง เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการตัดชิ้นส่วน ยอด ราก และลำต้นของต้นกล้าที่มีอายุ 2 เดือนมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลการพัฒนาของชิ้นส่วน พบว่า พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดเท่ากับ 1.4 ยอดต่อชิ้นส่วน การเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดเท่ากับ 1.4 ยอดต่อชิ้นส่วน ชิ้นส่วนลำต้น ลิตร สามารถชักนำจำนวนยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดเท่ากับ 0.2 ยอดต่อชิ้นส่วน ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อ และการเลี้ยงชิ้นส่วนราก ไม่มีการเกิดยอดในทุกทรีทเมนต์ และไม่มีการเกิดแคลลัสในทุกวิธีการทดลอง

ตารางที่ 1 จำนวนยอดของหนอนตายหยากที่ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน

2,4-D (มก.ต่อ ล.)	จำนวนยอด[1/]			
	ยอด	ตาข้าง	ลำต้น	ราก
0	1.10 b	1.35	0	0
2	1.15 b	1.05	0	0
4	1.40 a	1.05	0	0
6	1.00 b	1.25	0.20	0
8	1.10 b	1.40	0	0
10	0.95 b	1.20	0.10	0
F-test	*	ns		
CV (%)	45.24	27.03		

[1/]ตัวเลขในแนวตั้งที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 1.3 ผลของ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดหนอนตายหยากในอาหารแข็ง เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการนำเมล็ดหนอนตายหยากมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน บันทึกผลการพัฒนาของชิ้นส่วน พบว่า พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

120312

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และแคลลัสมีสีเหลืองถึงเขียวอ่อน และมีลักษณะกันแน่น ยกเว้นในความเข้มข้นที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีทั้งการเกาะกันแน่นและแบบรวม และชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด 50 % และจากการสังเกตพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 2 ลักษณะของแคลลัส สีของแคลลัส และการเกิดแคลลัสของต้นอ่อนหนอนตายหยาก ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นของ ต่าง ๆ เป็นเวลา 4 เดือน

ความเข้มข้นของสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ลักษณะของแคลลัส[1/]	สีของแคลลัส	การเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)[2/]
0	C	เขียวอ่อน	33.33 b
0.2	C	เหลือง	50.00 a
0.4	F, C	เขียวอ่อน	22.22 b
0.6	C	เหลือง	33.35 b
0.8	C	เหลือง	37.50 b
1	C	เหลือง	30.00 b
F-test			*
CV (%)			118.58

[1/] ลักษณะของแคลลัส: C = Compact callus = แคลลัสแบบแน่น,
F = Friable callus = แคลลัสแบบหลวม

[2/] ตัวเลขในแนวตั้งที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

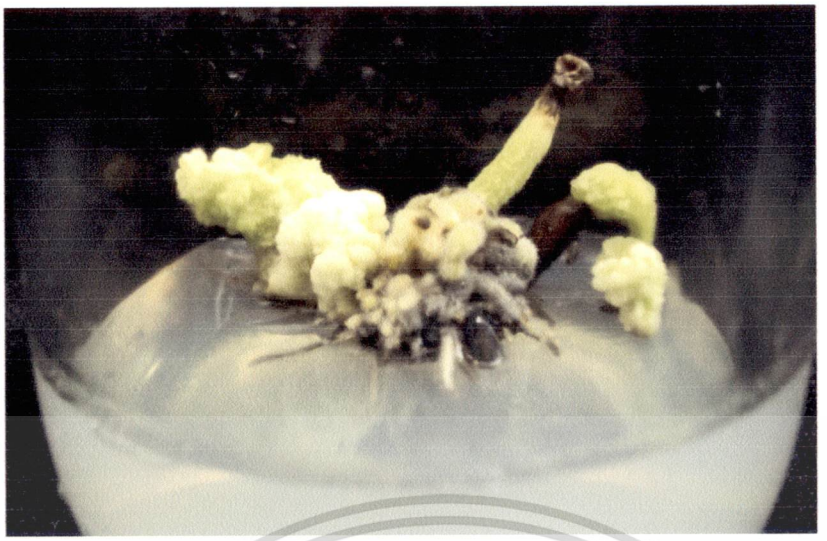
การทดลองที่ 1 การศึกษาการชักนำแคลลัส

การนำเมล็ดหนอนตายหยากมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน บันทึกผลการพัฒนาของชิ้นส่วน พบว่า พบว่าเปอร์เซ็นต์เการเกิดแคลลัสไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และแคลลัสมีสีเหลืองถึงเขียวอ่อน และมีลักษณะกันแน่น ยกเว้นในความเข้มข้นที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีทั้งการเกาะกันแน่นและแบบรวม และชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด 50 % และจากการสังเกตพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของสุรชาติ (2552) ที่ได้ทำการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของ 2,4-D 0.2 มิลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส และการเกิดแคลลัสมีแนวโน้มที่ต่ำลง เมื่อ 2,4-D มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ พีรเดช (2537) ที่ได้กล่าวว่า 2,4-D เป็นออกซินที่มีประสิทธิภาพต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้เหมาะสมนั้นจะแตกต่างกันไปตามส่วนต่าง ๆ ที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง และพืชบางชนิดตอบสนองต่อการใช้ 2,4-D ในการชักนำให้เกิดราก ซึ่งจากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า การเลี้ยงชิ้นส่วน ยอด ราก และลำต้นของต้นกล้าในอาหารเหลวและแข็งสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนทั้งหมดในทุกทรีทเมนต์ไม่มีการตอบสนองต่อการเกิดแคลลัส โดยในอาหารแข็ง พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดเท่ากับ 1.4 ยอดต่อชิ้นส่วน การเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดเท่ากับ 1.4 ยอดต่อชิ้นส่วน ชิ้นส่วนลำต้น ลิตร สามารถชักนำจำนวนยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดเท่ากับ 0.2 ยอดต่อชิ้นส่วน ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อ และการเลี้ยงชิ้นส่วนราก ไม่มีการเกิดยอดในทุกทรีทเมนต์ และไม่มีการเกิดแคลลัสในทุกวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 2. **การศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัส**

พืชแต่ละชนิดต้องการฮอร์โมนต่าง ๆ แตกต่างกัน ทั้งชนิด และความเข้มข้น ต่อการเพิ่มขนาดของแคลลัส เช่น Novak และคณะ (1989) พบว่าการใช้ TDZ ความเข้มข้น 5 µM มีผลต่อการเพิ่มขนาดแคลลัสของ *Musa sp*. Shah และคณะ 2003 พบว่าการเติม BAP ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้นข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือการเติม BAP ความเข้มข้น 4.0 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการเพิ่มขนาดของแคลลัสข้าวสาลี สายพันธุ์ Lu-26S นาตยาและเฉลิมพล (2552) พบว่าในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดมีการขยายตัวของแคลลัสหนอนตายหยากและมีปริมาณการเพิ่มมากที่สุด ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเมล็ดของหนอนตายหยากในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้ในทุกทรีทเมนต์ไม่มีความแตกต่างทั้งลักษณะของแคลลัสแต่แตกต่างที่สี โดยที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัส มีทั้งแบบหลวมและแน่น และสีของแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเขียวอ่อน และแคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น

การทดลองที่ 2. **การศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัส**

การทดลองที่ 2.1 **การศึกษาผลของ** 2,4-D **ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส**

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 , 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บันทึกการน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ขนาดและลักษณะของแคลลัส และบันทึกภาพทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวอ่อนเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 2 และอาหารมีการเปลี่ยนเป็นสีดำ

การทดลองที่ 2.2 **การศึกษาผลของ** TDZ **ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส**

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บันทึกการน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ขนาดและลักษณะของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

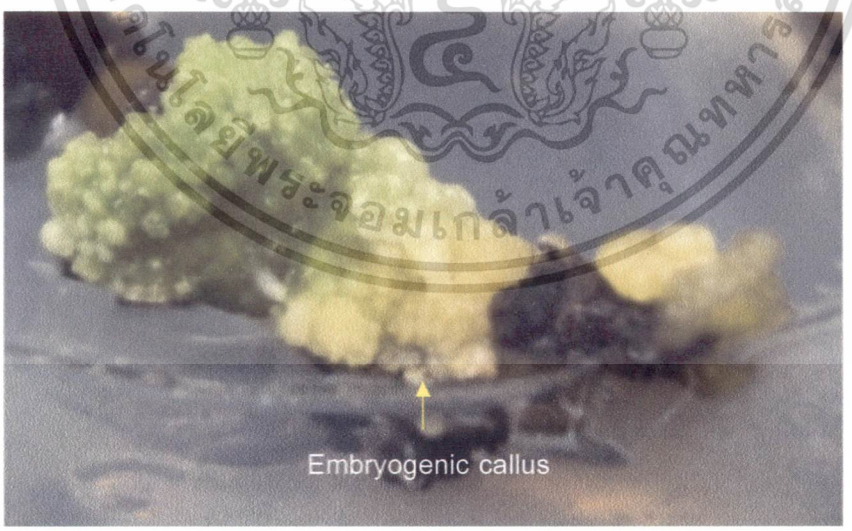
แคลลัส และบันทึกภาพทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวอ่อนเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 2 และอาหารมีการเปลี่ยนเป็นสีดำ

การทดลองที่ 2.3 การศึกษาผลของ 2,4-D และ TDZ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ 2,4-D และ TDZ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บันทึกการน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ขนาดและลักษณะของแคลลัส และบันทึกภาพทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวอ่อนเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 2 และอาหารมีการเปลี่ยนเป็นสีดำ

การทดลองที่ 2.4 การศึกษาผลของ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารแข็ง ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

จากการเลี้ยงเมล็ดหนอนตายหยากในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน และ 8 เดือน บันทึกผลการพัฒนาของชิ้นส่วน พบว่า พบว่า มีการเกิด embryogenic callus ในชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 7) เป็นเวลา 8 เดือน



ภาพที่ 7 การเกิด embryogenic callus ของเมล็ดอ่อนหนอนตายหยากที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3. **การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ**

การทดลองที่ 3.1 **ผลของ** 2,4-D **ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำแคลลัสแบบแน่น ให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ**

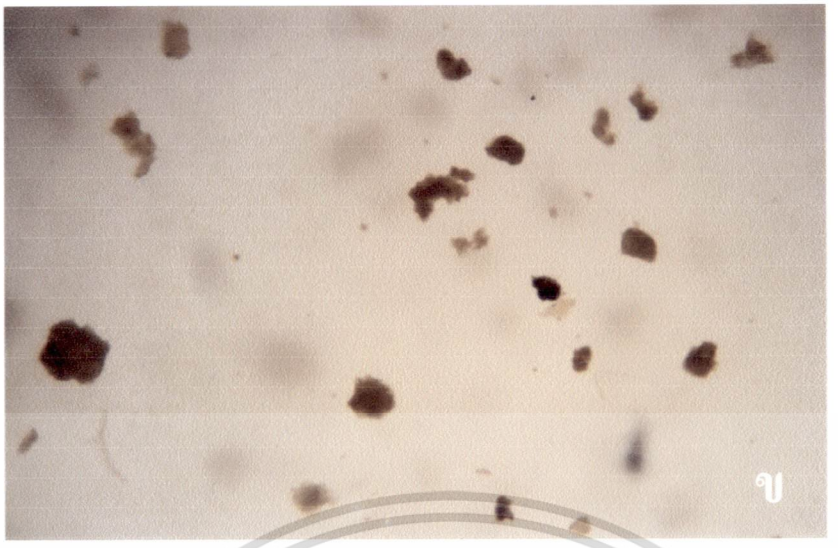
จากการนำแคลลัส 0.5 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 , 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เปลี่ยนถ่ายอาหารทุกสัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่ได้มีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายในสัปดาห์แรก

การทดลองที่ 3.2 **ผลของ** 2,4-D **ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้** embryogenic callus **พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ**

นำ embryogenic callus ที่มีน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม มาเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 , 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการกรองและเปลี่ยนลงในอาหรเหลวสูตร MS ที่ไม่เติม 2,4-D เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า มีการเกิดเซลล์แขวนลอย (ภาพที่ 8) หลังจากเลี้ยงเซลล์แขวนลอยต่อไปได้อีกประมาณ 1 สัปดาห์ เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ภาพที่ 8 ลักษณะของแซลล์แขวนลอย (ก และ ข) ที่ได้จากการเลี้ยง embryogenic callus ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรและย้ายลงอาหารเหลวที่ไม่เติม 2,4-D เป็นเวลา 1 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



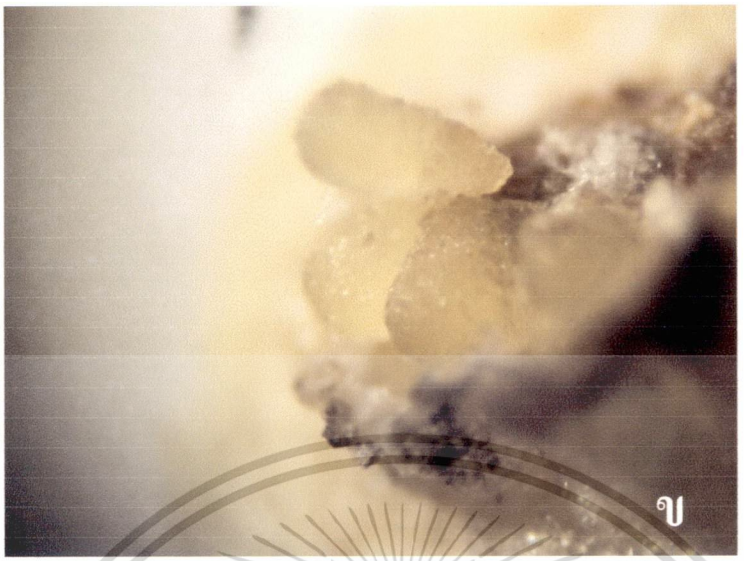
ภาพที่ 8 (ต่อ) ลักษณะของแซลล์แขวนลอย (ก และ ข) ที่ได้จากการเลี้ยง embryogenic callus ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรและย้ายลงอาหารเหลวที่ไม่เติม 2,4-D เป็นเวลา 1 สัปดาห์

การทดลองที่ 3.3 **ผลของ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้** embryogenic callus **พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ในที่มืด**

นำ embryogenic callus ที่มีน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม มาเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 , 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ามีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอในระยะ globular (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 9 ลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของแคลลัสหนอนตายหยากที่เลี้ยงในอาหาร (ก และ ข) แข็งสูตร MS ในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 (ต่อ) ลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของแคลลัสหนอนตายหยากที่เลี้ยงในอาหาร (ก และ ข) แข็งสูตร MS ในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 4. **การศึกษาผลของการให้แสงต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ**

จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอในระยะ globular มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เลี้ยงในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสงเป็นเวลา 0 2 และ 4 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในสภาพที่มีแสง พบว่า ไม่มีการพัฒนาใน 4 วันแรกของการเลี้ยงและในสภาพที่มีแสงพบว่าเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนในที่มืดเมื่อทำการเลี้ยงต่อ 4 สัปดาห์ พบว่ามีการพัฒนาเป็นราก ยอด และต้น โดยเอ็มบริโอมีการตาย 54.84 เปอร์เซ็นต์ มีชีวิต 45.16 เปอร์เซ็นต์ แบ่งการพัฒนาของเอ็มบริโอที่ยังมีชีวิตเป็นสามลักษณะ ได้แก่ การเกิดยอดและรากพร้อมกัน ซึ่งพบมากที่สุด 25.81 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10 และ 11) การเกิดยอดก่อนราก 12.90 เปอร์เซ็นต์ การเกิดรากก่อนยอด 6.45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) โดยเมื่อทำการเลี้ยงในที่มืดต่อเนื่องเป็นเวลา 2 เดือน พบว่ามีการพัฒนาของยอดและรากสมบูรณ์ (ภาพที่ 11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 10 การเกิดต้นที่ได้จากการเลี้ยงของโซมาติกเอ็มบริในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เลี้ยงในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3 ลักษณะการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ลักษณะของการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ	เปอร์เซ็นต์
เกิดต้นและรากพร้อมกัน	25.81
เกิดการพัฒนาของยอดก่อนราก	6.45
เกิดการพัฒนาของรากก่อนยอด	12.90
ตาย	54.84

ภาพที่ 11 การเกิดต้นที่สมบูรณ์จากการเลี้ยงของโซมาติกเอ็มบริในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เลี้ยงในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจากการนำต้นที่พัฒนาจากการเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอมาเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MSในที่มีแสงเป็นเวลา 3-6 เดือน พบว่ารากมีการพัฒนาเป็นสีเขียวอ่อน และใบกางเต็มที่ (ภาพที่ 12)

ภาพที่ 12 ลักษณะของต้นหนอนตายหยากที่ได้หลังการนำต้นจากสภาพมืดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีแสงเป็นเวลา 6 เดือน

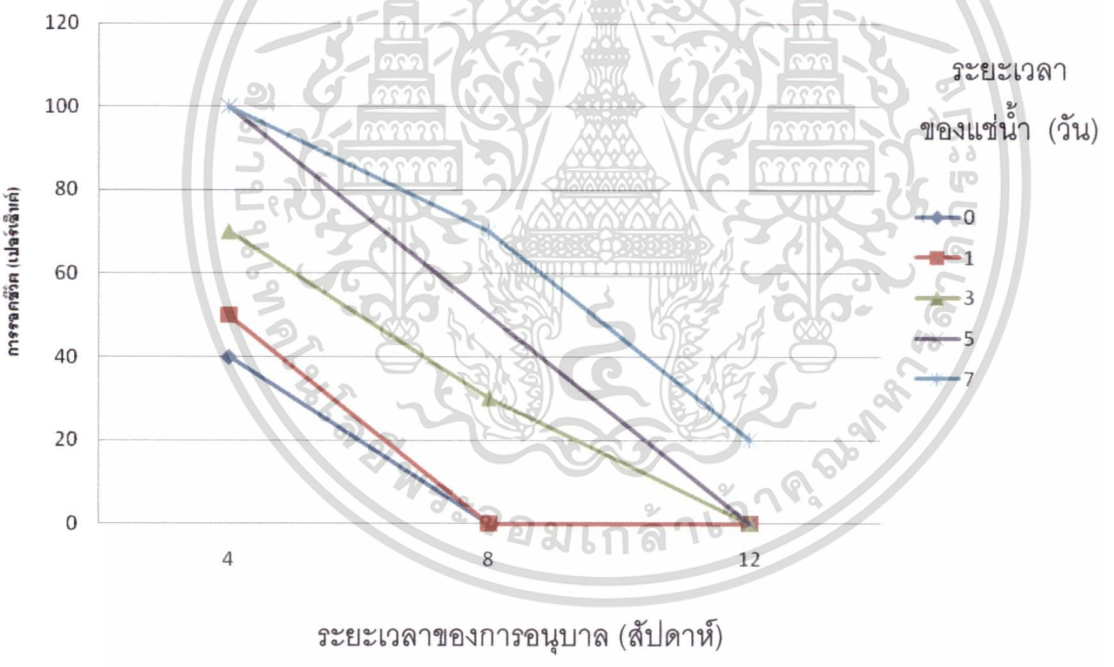
การทดลองที่ 5. **การนำต้นออกปลูก**

จากการนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อ เยื่อมาอนุบาลโดยนำมาเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการแช่ในน้ำเป็นเวลา 0 1 3 และ 5 วัน นำไปปลูกในวัสดุปลูกเพอร์ไลท์และเวอร์มิ-คูไลท์ อัตราส่วน 1:1 ทำการฉีดพ่นน้ำเช้าเย็น บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการย้ายเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ต้นที่ได้มีอัตราการการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาของการอนุบาล โดยการแช่ในน้ำเป็นเวลาเจ็ดวันก่อนการย้ายกล้ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ หลังการอนุบาลเป็นเวลา 3 เดือน (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

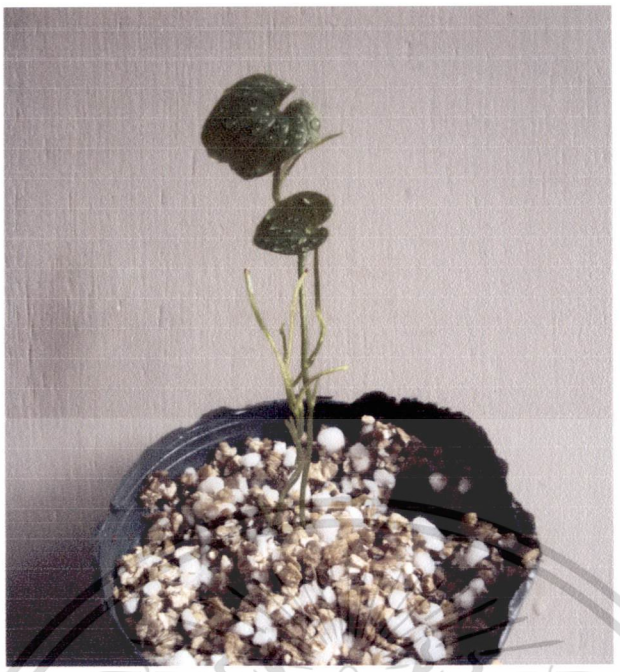
ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหนอนตายหยากหลังการเลี้ยงเป็นเวลาต่าง ๆ กัน

ระยะเวลาการแช่	ระยะเวลาของการอนุบาล (สัปดาห์)		
(วัน)	4	8	12
0	40	0	0
1	50	0	0
3	70	30	0
5	100	50	0
7	100	70	20



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหนอนตายหยากหลังการเลี้ยงเป็นเวลาต่าง ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 ต้นกล้าที่ได้จากการอนุบาลเป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนอนตายหยากแต่ละชนิดตอบสนองได้แตกต่างกัน สุมนาและคณะ (2538) ที่ได้ทดลองเลี้ยงใบอ่อนของหนอนตายหยากพบว่ามีการเกิดแคลลัสได้ดีในอาหารที่เติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D หรือ TDZ หรือ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 , 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวอ่อนเป็นสีน้ำตาล และอาหารมีการเปลี่ยนเป็นสีดำ ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ในครั้งนี้อาจจากความเข้มข้นของฮอร์โมนนั้นอยู่ในระดับที่สูงจนเกินไปจนมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตทุกส่วนของพืช สอดคล้องกับการทดลองของ Novak และคณะ (1989) การใช้ TDZ ความเข้มข้น 5 µM มีผลต่อการเกิด browning ของ *Musa sp.*และโดยทั่วไปแล้วที่ความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินต่ำจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการขยายขนาดของเซลล์และการสร้างแคลลัสได้ดี (Shah และคณะ 2003) โดยจากการนำเมล็ดหนอนตายหยากมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน และ 8 เดือน พบว่า มีการเกิด embryogenic callus ในชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2-,4-D ความเข้มข้น 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับ Carmen (1990) ที่ได้กล่าวว่าการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสสามารถชักนำได้ด้วยการเติมออกซิน และโดยออกซินส่วนใหญ่นิยมใช้คือ 2,4-D (Lo Schiavo et al., 1989) และนาตยาและเฉลิมพล (2552) ที่ได้รายงานว่า การนำเอาแคลลัสหนอนตายหยากมาเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรในที่มีแสงมีการขยายตัวของแคลลัสและมีปริมาณการเพิ่มมากที่สุด

การทดลองที่ 3. ***การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ***

ในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องทั้งความแตกต่างของสายพันธุ์และปัจจัยอื่น ๆ ซึ่ง May และ Sink (1995) รายงานว่าความแตกต่างของสายพันธุ์มีผลต่อการพัฒนาของไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้แตกต่างกัน ส่วนปัจจัยอื่น ๆ ที่สำคัญได้แก่การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต และการใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสม (Luo et al., 1999)

จากผลการทดลองพบว่า พบว่า การเลี้ยง embryogenic callus มาเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอในระยะ globular ได้ สอดคล้องกับงานทดลองของ Saito และคณะ (1991) ที่รายงานว่าการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 µM สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอของหน่อไม้ฝรั่งได้ดี

การใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสม (Luo et al., 1999) มีผลต่อการพัฒนาให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Roa และ Singh, 1991) และจากผลการทดลองพบว่า การนำแคลลัส มา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 , 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เปลี่ยนถ่ายอาหารทุกสัปดาห์ แคลลัสไม่สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ นอกจากนี้ แคลลัสที่ได้มีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายในสัปดาห์แรก ในขณะที่การนำ embryogenic callus มาเลี้ยงในอาหารเหลวมีผลทำให้เกิดการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอได้ สอดคล้องกับ Buyukalaca และ Mavituna (1996) ที่ได้รายงานว่าการเลี้ยง embryogenic callus ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D มีผลต่อการเพิ่มปริมาณและการเกิดเอ็มบริโอในพริก (*Capsicum annuum* var. Ace)

อย่างไรก็ตามรูปแบบการเลี้ยง embryogenic callus มีผลต่อการเกิด โซมาติกเอ็มบริโอ โดยการเลี้ยง embryogenic callus ในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 , 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารเหลวไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการกรองและเปลี่ยนลงในอาหรเหลวสูตร MS ที่ไม่เติม 2,4-D เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า มีการเกิดเซลล์แขวนลอย หลังจากเลี้ยงเซลล์แขวนลอยต่อไปได้อีกประมาณ 1 สัปดาห์ เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด ขณะที่ การเลี้ยง embryogenic callus มาเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 , 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอในระยะ globular ได้ สอด คล้องกับการทดลองของ ยิ่งยศ (2550) ที่ได้รายงานว่าโซมาติกเอ็มบริโอขององุ่นสามารถงอกได้ดีในอาหารแข็ง อย่างไรก็ตามผลการทดลองมีความขัดแย้งกับรายงานของ Jayasankar และคณะ (2003) ที่พบว่าการเลี้ยงในอาหารแข็งมีผลต่อการพักตัวของโซมาติกเอ็มบริโอ ในขณะที่การเลี้ยงในอาหารเหลวไม่มีผลต่อการพักตัวของพืชทั่วไป

การทดลองที่ 4. **การศึกษาผลของการให้แสงต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ**

จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอในระยะ globular มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เลี้ยงในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสงเป็นเวลา 0 2 และ 4 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในสภาพที่มีแสง พบว่า ไม่มีการพัฒนาใน 4 วันแรกของการเลี้ยงและในสภาพที่มีแสงพบว่าเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนในที่มืดเมื่อทำการเลี้ยงต่อ 4 สัปดาห์ พบว่ามีการพัฒนาเป็นราก ยอด และต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของยิ่งยศ (2550) ที่พบว่า การให้แสงมีผลเชิงลบต่อการเกิดและพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ และการเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลดีต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอโดยทั่วไปจะมีการพัฒนาจาก Globular stage เป็นรูปร่าง heart shape หรือ Torpedo shape (Rao, 1996; Zimmerman, 1995) อย่างไรก็ตามการพัฒนาของหนอนตายห

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยากชนิดนั้นไม่ได้พัฒนาตามรูปแบบของการพัฒนาและการงอกของพืชทั่วไป เป็นการพัฒนาที่ไม่มีแบบแผน เช่นเดียวกับงานทดลองของ Montri (2005) ซึ่งทำการทดลองในหนอนตายหยากชนิด *S. tuberose* พบว่าการพัฒนาไม่เป็นไปตามรูปแบบปกติเช่นกัน

และจากผลการทดลองพบว่าเอ็มบริโอที่งอกมีการตาย 54.84 เปอร์เซ็นต์ มีชีวิต 45.16 เปอร์เซ็นต์ แบ่งการพัฒนาของเอ็มบริโอที่ยังมีชีวิตเป็นสามลักษณะ ได้แก่ การเกิดยอดและรากพร้อมกัน ซึ่งพบมากที่สุด 25.81 เปอร์เซ็นต์ การเกิดยอดก่อนราก 12.90 เปอร์เซ็นต์ การเกิดรากก่อนยอด 6.45 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อทำการเลี้ยงในที่มืดต่อเนื่องเป็นเวลา 2 เดือน พบว่ามีการพัฒนาของยอดและรากสมบูรณ์ สอดคล้องกับงานทดลองของ Montri และคณะ (2548) ที่ได้รายงานว่าการเกิดและพัฒนาของโซมาติก หนอนตายหยาก ไม่มีรูปแบบที่แน่นอน สามารถเกิดการพัฒนาเป็นยอดและรากพร้อมกัน หรืออาจเกิดรากหรือยอดก่อนได้

การทดลองที่ 5. **การนำต้นออกปลูก**

จากการนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาอนุบาลโดยนำมาเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการแช่ในน้ำเป็นเวลา 0 1 3 5 และ 7 วัน นำไปปลูกในวัสดุปลูกเพอร์ไลท์และเวอร์มิคูไลท์ (1:1) พบว่า ต้นที่ได้มีอัตราการการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาของการอนุบาล โดยการแช่ในน้ำเป็นเวลาเจ็ดวันก่อนการย้ายกล้ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ หลังการอนุบาลเป็นเวลา 3 เดือน โดยการรอดชีวิตของต้นกล้ามีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการรอดชีวิตจากงานทดลองของ Montri (2005) ที่ได้ทดลองในหนอนตายหยาก *S. curtisii* และ S. *tuberosa* ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของต้นกล้าที่ได้รับก่อนการนำออกจากขวด หรือ การปรับสภาพให้เหมาะสม เนื่องจากต้นกล้ามีความอ่อนแอเนื่องจากได้รับความชื้นที่สูงเมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและแสงที่ต่ำ ดังนั้นหากนำมาอนุบาลควรมีการปรับสภาพก่อน และจากการอนุบาลครั้งนี้ไม่ได้มีการควบคุมความชื้นและอุณหภูมิ ทำให้ต้นกล้ารอดตายในปริมาณที่ต่ำ ในขณะที่งานทดลองของ Montri (2005) ได้ทำการปรับสภาพโดยการเลี้ยงในที่มีแสง 40 μM ต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส และความชื้นเริ่มต้น 90 % และลดลงเป็น 60 % ภายในสองสัปดาห์ ก่อนการย้ายเข้าโรงเรือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

การผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.) เชิงการค้าโดยการชักนำให้เกิดต้นผ่านขบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอการศึกษาการนำส่วนต่าง ๆ ของหนอนตายหยากมาเลี้ยง ผลการทดลอง สรุปได้ดังนี้

1. การเลี้ยงเมล็ดในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด 58 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเกิดแคลลัสทั้งแบบหลวมได้

2. การเลี้ยงเมล็ดในอาหารแข็งที่เติมที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิด embryogenic callus ได้ในเดือนที่ 8

3. การเลี้ยง embrygenic callus ในอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการพัฒนาเป็น globular ได้หลังการเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อนำเอ็มบริโอระยะ globular มาเลี้ยงต่อพบว่ามีการเกิดต้นได้หลังการเลี้ยง 4 สัปดาห์ และต้นที่เลี้ยงครบ 8 สัปดาห์

4. เมื่อนำต้นกล้าที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ในที่มีแสง เป็นเวลา 3 เดือน ไปย้ายปลูก โดยการแช่ในน้ำ พบว่าการแช่ในน้ำ เป็นเวลา 7 วัน ต้นกล้ามีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กวินหาญ พลหาญ. 2539. ผลของสารสกัดจากพืชต่อหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Hubner). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขากีฏวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 71 หน้า.

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.

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

นาตยา มนตรี และ เฉลิมพล สุวรรณภักดี. 2552. การชักนำให้เกิดแคลลัสเพื่อการผลิตสารอัลคาลอยด์ในหนอนตายหยาก. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2551 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, จังหวัดชุมพร.

ประคอง พันธุ์อุไร. 2520. รายงานการศึกษาชีววิเคราะห์รากของหนอนตายหยาก. วารสารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 19 (3) : 145 – 155.

ประคอง พันธุ์อุไร. 2523. สารสกัดจากรากหนอนตายหยากเพื่อใช้ในการฆ่าเหา. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กรุงเทพฯ

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

พีรเดช ทองอำไพ. 2537.ฮอร์โมนพืช และสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย.ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพ ฯ.195 น.

ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์ยา. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยิ่งยศ จิตตะยโศธร. 2250. การปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมและการคัดเลือกเซลล์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสุรนารี, จังหวัดนครราชสีมา.

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

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

วาสนา ไชยคำ. 2544. ฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจากหนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) และเถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens* Benth.). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขากีฏวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

สุธาพันธ์ โพกำเนิด. 2544. การศึกษาความเป็นไปได้การใช้สมุนไพรหนอนตายหยากผสมอาหาร ๆ ไก่เพื่อควบคุมปริมาณหนอนแมลงวันบ้านในมูลไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ (เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.ชุมพร.156 หน้า.

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

สุรชาติ ไชยศรีหา. 2552. การชักนำให้เกิดแคลลัสของหนอนตายหยาก. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร.

Buyukalaca S and F. Mavituna. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell Tissue Organ Cult 46:227-235

Carman, J.G. 1990.Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology, 26:746-753.

Choi Y. E., D. C. Yang, E S. Yoon and ·K.T. Choi. 1998. Plant regeneration via adventitious bud formation from cotyledon explants of Panax ginseng C. A. Meyer. Plant Cell Reports 17: 731–736

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Denchev P.D., A.I. Kuklin, A.I. Atanassov and A.H. Scragg. 1993. Kinetic studies of embryo development and nutrient utilization in an alfafa direct somatic embryogenic system. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 33: 67-73.

Ghosh B., and S.Sen. 1994. Effect of explant, light intensity and growth regulators on stable regeneration of Asparagus plumosus. Baker. Nucl. Calcutta., 37: 24-29

Goldberg R.B., G. Depaiva and R. Yadegari. 1994 Plant embryogenesis: zygote to seed. Science 266, 605-614.

Hohe A., Winkelmann T. Schwenkel H.G. Development of somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. In liquid culture. Gartenbauwissenschaft (66): 219-224.

Jayasankar S., B.R. Bondada, Z. Li and D.J.Gray. 2003. Comparative anatomy and morphology of Vitis vinfera (Vitaceae) somatic embryos from solid and liquid culture derived proembryonic masses. Amer.J. Bot. 90:973-979

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

Kanchanapoo, K. And B. Chourykaew. 1998. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineesis* Jacq.). J. Sc.Soc.Thailand 24: 241-250

Karami O., Deljou A., Esna-Ashari M., Ostad-Ahmadi P. 2006. Effect of sucrose concentrations on somtaic embryogenesis in carnation (*Danthus caryophyllus* L.). Scientia Horticulturae (110): 340-344.

Kintzios S., Stavropoulou Er., Skameli S. 2004. Acclimatization of selected macronutirent and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of in vitro dedifferentiation and differentiation (organigenesis, somatic embryogenesis). Plant Science (167): 655-664.

Lo Schiavo F, Pitto L, Giuliano G,Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R., Orselli S, Terzi M (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theor Appl Genet 77 : 325-331

Luo J., J. Jia, Y. Gu and J. Liu. 1999. High Frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. Plant Science 143: 93-99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Manoharan M., C.S. Sree Vidya and G. Lakshmi Sita, 1998. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. Pusa jwala), *Plant Sci* 131: 77–83.

May R.A. and K.C. Sink. 1995. Genotype and auxin influence direct somatic embryogenesis from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of *Asparagus officinalis* L. Plant Scinece. 108: 71-84.

Mizukami M., Takeda T., Satonaka H., Matsuoka H., 2007. Improvement of propagation frequency with two-step direct somatic embryogenesis from carrot hypocotyls.

Montri N. 2005. Biotechnological approaches to the biologically active compounds of the Thai medicinal plants Stemona tuberosa Lour. and Stemona curtisii Hook f. (Stemonaceae). Doctoral Thesis, Institute of Pharmacognosy. University of Vienna.

Montri N., Wawrosch C., Kopp B. 2004. Micropropagation of *Stemona curtisii* Hook f., a Thai medicinal plant. 5th International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, 12-17 September, 2004 Debrecen Hungary.

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.

Murch S.J., Vector J.M.R., Saxena P.K. 2003. Auxin, calcium and sodium in somatic embryogenesis of African violet (*Saintpualia ionanha* Wendl.) cv. Benjamin. Acta Hortic. 625 : 201-209.

Novak, F.J., R. Afza, M.Duren. M. Perea-Dallos, B.V. Conger and T. X. Tang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) banana (Musa spp.). Bio/Technology. 7:154-159.

Rao, K.S. 1996. Embryogenesis in flowering plants –recent approaches and prospects. Journal of Biosciences, 21:827-841

Rao, P. V L. and B. Singh. 1991. Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum melongena* L. Plant Cell Rep. 10:7–11.

Rout G.R., Mohapatra A., Jain S.M. 2006. Tissue culture of ornamental pot palnt: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology adavacnes (24) 531-560.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saito T., S.Nishizawa and S.Nishimura., 1991. Improved culture conditions for somatic embryogenesis from *Asparagus officinalis* L. using an aseptic ventilative filter. Plant Cell Rep. 10 : 230-234.

Shah, M.I., M. Jabeen and I. Ilahi. 2003. *In vitro* callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) var. LU-26S. *Pak. J. Bot.*, 35(2): 209-217.

Seedhar L., Bewley J.D. 1998. Nitrogen- and silfur-containing compounds enhance the synthesis of storage reserves in developing somatic embryo of alfalfa (*Medicago sativa* L.) 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.

Wang, J., D. M. Seliskar, and J. L. Gallagher. 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the brackish wetland monocot *Scirpus robustus*. Aquat. Bot. 79:163–174.

Zimmerman J. L .1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell 5: 1411-1423

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้