สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

42

รายงานการวิจัย

การผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยากเชิงการค้าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวอย่างง่าย

Commercial production of *Stemona curtisii* Hook.f. plantlets in simplify Temporary Immersion Bioreactor (TIB)

โดย

นางสาวจินดา สุดวัดแก้ว

นางสาวนาตยา มนตรี

RCH
SB
292
.S7
ค4691ก
ฉ.1

สขมฺ.....
เลขทะเบียน 115541
วัน,เดือน,ปี 21 ธ.ค. 2554

b.12313233
i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2553

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

จาการศึกษาการผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยากเชิงการค้าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวอย่างง่าย โดยความถี่และระยะเวลาของการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายอยาก โดยความถี่ของการให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน มีผลต่อจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุด และระยะเวลาของการให้อาหารครั้งละ 5 นาที มีจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุด ซึ่งทำให้กระตุ้นการเจริญของยอดได้ดี วัสดุรองรับที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงในระบบการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายอยาก ซึ่งวัสดุรองรับที่เหมาะสมคือ glass bead มีผลต่อจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุด มีแนวโน้มในการช่วยการแตกยอดได้ดี และมีผลต่อการกระตุ้นการพัฒนาของยอด การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อขยายขนาดและการพัฒนาของแคลลัสหนอนตายอยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว ซึ่งการเลี้ยงยอดให้เกิดแคลลัสในสูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อขนาดของแคลลัส น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด ซึ่งมีผลกระตุ้นทำให้ยอดเกิดแคลลัสได้ดี การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายอยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว ซึ่งการเลี้ยงยอดในสูตรอาหาร MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อจำนวนยอด ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งมากที่สุด ซึ่ง BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มในการช่วยการแตกยอดและพัฒนายอดได้ดี และ IAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการเกิดรากได้ดี การศึกษาผลของระยะเวลาการหยุดการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตหลังการอนุบาล การงดการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตหลังการอนุบาล เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีจำนวนใบ สีใบ น้ำหนัก ความสูงของลำต้น และความยาวรากมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The study of Commercial production of *Stemona curtisii* Hook.f. plantlets in simplify Temporary Immersion Bioreactor (TIB). The frequency and duration of feeding in Bioreactor sank temporarily to the development of the total die like worms. The frequency of feeding 3 times per day affect the amount and the total length of most And duration of feeding time is 5 minutes long, total amount and most Which stimulates the growth of the total good. Support materials appropriate to the culture in the feeding system in the bioreactor a temporary sink to the development of the total die like worms. The substrate is a glass bead with the appropriate amount of the total length and most likely to help better balance the difference. And the effect of stimulating the development of the total. The effect of growth regulators to expand the size and development of callus died like worms in Bioreactor sink temporarily The amount of culture to the callus in the medium MS + 2,4-D 0.5 mg / l + BA 0.1 mg per liter. Affect the size of the callus fresh weight and dry weight of most This has boosted the amount of callus was the best. The effect of growth regulators on the development of the total worm death I sank in Bioreactor temporary The balance in the culture medium MS + BA 5 mg / l + IAA 5 mg per liter. Effects on total root length, height, weight from dry weight, which most BA concentration of 5 milligrams per liter. Likely to help develop balance and breaking a good balance and IAA 5 mg per liter. Affecting the roots well. The effect of time to stop feeding in Bioreactor temporary sink for growth after kindergarten. By refraining from feeding in Bioreactor temporary sink for growth after a period of one week the Kindergarten form of leaf color, weight, and height of the stem. And most root length.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ที่ให้ทุนงบประมาณเงินรายได้สนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปี 2553

ขอขอบคุณคณะกรรมการกลั่นกรองโครงการวิจัยเงินรายได้ที่แก้ไขโครงการวิจัยและงานบริหารการวิจัย วิทยาเขตชุมพร จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

จินดา สุดวัดแก้ว

กุมภาพันธ์ 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข

กิตติกรรมประกาศ..... ค

สารบัญ..... ง

สารบัญตาราง..... ฉ

สารบัญภาพ..... ช

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม..... 3

- หนอนตายอยาก..... 3

- ลักษณะทางพฤกษศาสตร์หนอนตายอยาก (*Stemona curtisii* Hook f.)..... 3

- สารออกฤทธิ์และประโยชน์ของหนอนตายอยาก..... 4

- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร..... 5

- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายอยาก..... 5

- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ หรือ Bioreactor..... 6

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย..... 10

- การเตรียมยอดหนอนตายอยาก..... 10

- การเตรียมแคลลัสหนอนตายอยาก..... 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

- การติดตั้งระบบ TIB แบบ Twin flask system..... 10

- ผลการวิจัย..... 14

บทที่ 4 อภิปรายผลการวิจัยและวิจารณ์..... 24

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ..... 27

บรรณานุกรม..... 29

ภาคผนวก..... 33

- ตารางที่ 1 stock solution ของอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) 34

- ตารางที่ 2 การเตรียม Stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโต..... 35

- วิธีการเตรียมอาหาร 35

ประวัติคณะผู้วิจัย..... 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนยอดและความยาวยอดที่ได้จากความถี่และระยะเวลาของการให้อาหาร.....	17
2	จำนวนยอดและความยาวยอดที่ได้จากวัสดุรองรับที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง..... ในระบบการให้อาหาร.....	18
3	การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อขยายขนาดและการพัฒนา..... ของแคลลัสหนอนตายอยาก.....	20
4	การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของยอดหนอนตายอยาก.....	22
5	การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของยอดหนอนตายอยาก.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การทำงานของ TIB.....	8
2	ยอดหนอนตายอยาก.....	14
3	แคลลัสหนอนตายอยาก.....	15
4	จำนวนยอดและความยาวยอดที่ได้จากความถี่และระยะเวลาของการให้อาหาร.....	17
5	จำนวนยอดและความยาวยอด.....	19
6	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อขยายขนาดและการพัฒนาของ..... แคลลัสหนอนตายยาก.....	21
7	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของยอดหนอนตายอยาก.....	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

หนอนตายหยากเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ประโยชน์โดยหมอพื้นบ้านเพื่อรักษาอาการแก้ไอ ขับเสมหะ ขับลม และฆ่าพยาธิ นอกจากนี้ยังใช้ในการกำจัดศัตรูพืช (เลาจนา และประคอง, 2520) กำจัดเห็บ หมัด และไรในฟาร์มปศุสัตว์ (ทวีศักดิ์, 2542) ปัจจุบันนี้มีการนำสารสกัดจากรากหนอนตายหยากมาใช้ในการเกษตรแพร่หลายมากขึ้น โดยเฉพาะเป็นทางเลือกของวิธีการควบคุมศัตรูพืชแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลผลิตทางการเกษตรที่มีความปลอดภัยจากสารเคมีตกค้าง ได้คุณภาพมาตรฐานเป็นที่ยอมรับของตลาดทั้งในและต่างประเทศ แม้ว่าในธรรมชาติจะพบต้นหนอนตายหยากขึ้นกระจายอยู่ทั่วไปในป่าตามภาคต่างๆ ทั่วประเทศ แต่พบว่ามีการขุดต้นหนอนตายหยากเพื่อนำรากมาขายกันคราวละมากๆ โดยเฉพาะเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทำให้น่าเป็นห่วงว่าการนำพืชจากป่ามาใช้มากๆ โดยไม่ระมัดระวังและไม่มีมาตรการควบคุมนั้น จะก่อให้เกิดปัญหาการสูญเสียทรัพยากรธรรมชาติของประเทศได้ในอนาคต หนอนตายหยากชนิด *Stemona curtisii* Hook. f. มีแหล่งกำเนิดที่ ต.ชุมโค อ.ปะทิว จ.ชุมพร มีปริมาณลดลงเนื่องจากการใช้พื้นที่เพื่อการเกษตรและมีการขุดรากจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในการทำสารสกัด ซึ่งเป็นการทำลายต้นและไม่มีการปลูกทดแทน ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการปลูก ดูแลรักษา และการขยายพันธุ์ พบว่า การขยายพันธุ์โดยเมล็ดทำได้ช้าเนื่องจากเมล็ดมีการพักตัวและมีอัตราการงอกต่ำ ส่วนการขยายพันธุ์โดยการแยกกอมักเกิดการติดเชื้อทำให้ประสบปัญหาเรื่องต้นพันธุ์ที่นำมาใช้ในการปลูก ส่วนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีอัตราการเกิดยอดได้ปริมาณมาก และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี อย่างไรก็ตามในการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงยอดนั้น พบว่าต้องใช้แรงงานในการเตรียมอาหารและตัดย้ายเนื้อเยื่ออยู่ตลอดเวลา ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว (Temporary Immersion Bioreactor: TIB) จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการนำมาใช้ในการผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยากในระดับอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากเป็นระบบที่มีการให้อาหารอัตโนมัติ และสามารถเปลี่ยนถ่ายอาหารได้สะดวก ทำให้ลดแรงงานในการผลิตได้มาก อีกทั้งประหยัดพื้นที่และภาชนะในการเลี้ยงโดยใช้ภาชนะที่มีขนาดใหญ่ได้ ทำให้เลี้ยงเนื้อเยื่อได้คราวละมาก ๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำผลการวิจัยที่ได้จากการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส และการเพิ่มปริมาณยอด ที่ได้จากการทำวิจัยต่อเนื่องตั้งแต่ปีงบประมาณ 2548 – 2551 มาใช้ร่วมกับระบบ TIB ในการผลิตต้นพันธุ์หนอนตายหยาก เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการนำมาใช้ผลิตต้นพันธุ์ที่มีคุณภาพ สม่ำเสมอ ปลอดโรค ได้ปริมาณมาก และประหยัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาชนะ พื้นที่และแรงงาน สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมและประโยชน์ต่าง ๆ ได้โดยไม่ต้องไปรบกวนหรือทำลายนิเวศน์ที่หนอนตายหยากอยู่ตามธรรมชาติต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

หนอนตายหยาก

หนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) เป็นพืชที่อยู่ในวงค์ 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 จะมีข้อปล้องเถากลมเล็กเรียวสีเขียวพาดพันต้นไม้อื่น เห็นได้ชัดเป็นไม้พุ่มลำต้นเดี่ยวเลื้อยยาวได้สูงถึงประมาณ 4 เมตร บริเวณลำต้นมีการแตกแขนงประมาณ 2-3 แขนง บริเวณแขนงจะเกิดดอกยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร (วิชัย, 2546)

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

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 (วิชัย, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

สารออกฤทธิ์และประโยชน์ของหนอนตายหยาก

ได้มีรายงานสารออกฤทธิ์ใน *S. curtisii* พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ มีสารที่สำคัญได้แก่ stemofoline, stemocurtisin และ stemocurtisinol (ภาพที่ 1) เป็นต้น ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera littoralis*) (Kaltenegger *et al.*, 2003) และมีรายงานการใช้ประโยชน์จากหนอนตายหยากโดยไม่ได้มีการจำแนกชนิดในสกุล *Stemona* ในการใช้รากเป็นยาทางการแพทย์แผนโบราณ และการสาธารณสุข ตลอดทั้งทางด้านการเกษตร เช่น การใช้ในการควบคุมแมลงวันใน มูลไก่ (สุธาพันธ์, 2544) ใช้ฆ่าเห็บและเหา การควบคุมศัตรูพืช (กวินหาญ, 2539 และ วาสนา, 2544) 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 ตัวหนอนที่รอดตายจะเจริญเป็นดักแด้ได้ แต่ดักแด้จะมีลักษณะผิดปกติ คือ ผนังปล้องของดักแด้จะโป่งนูนออก ดักแด้มีขนาดเรียวเล็ก หงิกงอจนผิดรูปร่าง ดักแด้ดังกล่าวนี้จะไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร

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

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก

ได้มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยากชนิดต่าง ๆ ไว้ดังนี้

ประทุมวัน (2542) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *S. collinsae* โดยการนำชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4.0 ppm ร่วมกับ NAA 1.0 ppm ชิ้นส่วนใบอ่อนมีการตอบสนองสูตรอาหารโดยขอบใบจะม้วนขึ้นบริเวณกลางใบมีการเจริญเป็นตุ่มของรากแต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นรากที่สมบูรณ์ได้ 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 ยอด จากการเลี้ยง โดยการเลี้ยงยอดและตาข้างในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก.ต่อลิตร และภายหลังจากนำต้นที่ได้มาสกัดสาระสำคัญพบว่ามีสารออกฤทธิ์ Stemofoline และ dehydrodtemofoline Montri et., al (2005) ได้ทำการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอของ *S. tuberosa* โดยการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 20 μM จนได้แคลลัส จากนั้นชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยการย้ายแคลลัสลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 μM และMontri et., al. (2006) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *S. curtisii* โดยนำชิ้นส่วนยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 20 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดปริมาณมาก และการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 5-20 μM สามารถชักนำให้ราก และสามารถย้ายต้นออกปลูกในโรงเรือนได้ และเมื่อต้นที่ได้สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับต้นที่ได้จากสภาพธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ หรือ Bioreactor

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ หรือ Bioreactor เป็นการเลี้ยงเซลล์ แคลลัส เนื้อเยื่อ หรือชิ้นส่วนพืชในภาชนะที่มีอาหารเหลวซึ่งผสมสารอาหารที่จำเป็นบรรจุอยู่ภายใน พร้อมทั้งมีระบบควบคุมสภาพแวดล้อม ให้เหมาะสมต่อการการเจริญของเซลล์ แคลลัส เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะพืชนั้นๆ ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชมีลักษณะคล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ แต่มีความยุ่งยากมากกว่า เนื่องจากพืชมีความจำเพาะต่อสารอาหารพิเศษที่ต้องการและมีการเจริญเติบโตที่ช้า นอกจากความต้องการที่จำเพาะเหล่านี้ การเอื้ออำนวยของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่ออัตราการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ อาทิเช่น อุณหภูมิ พีเอช และปริมาณออกซิเจนละลาย เป็นต้น

สำหรับการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของพืชนั้น ๆ เริ่มต้นจากการเตรียมวัตถุดิบที่จะต้องมีสารอาหารเพียงพอต่อการเติบโตของเซลล์หรือชิ้นส่วนพืช โดยบรรจุอาหารซึ่งผ่าการฆ่าเชื้อในภาชนะที่ประกอบด้วยท่อให้อากาศ และอุปกรณ์ควบคุมต่างๆ เมื่อมีการนำชิ้นส่วนพืชลงสู่ภาชนะและมีการให้อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงอย่างเหมาะสมจนกระทั่งได้ชิ้นส่วนขยายได้ในปริมาณมาก และเมื่ออาหารถูกใช้หมดไป จึงหยุดการให้อาหารและถ่ายเอาชิ้นส่วนออก ซึ่งขบวนการดังกล่าวอาจทำต่อเนื่อง (continuous culture)

การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีประสิทธิภาพ คือการที่สามารถผลิตต้นพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาที่สั้น ดังนั้นการการพัฒนาของต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้สามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติในระยะของการอนุบาลและมีความทนทานต่อการย้ายปลูกสู่สภาพภายนอกนั้นนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง (Ziv 1991a,b, 1995) กลไกและการขยายพันธุ์ที่เป็นระบบอัตโนมัติของขบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลดีต่อการลดต้นทุนการผลิตในส่วนของค่าแรงเนื่องจากระบบการเลี้ยงเป็นระบบอัตโนมัติสามารถผลิตต่อเนื่องได้ (Preil, 1991; Vasil, 1994) มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารได้ง่าย อัตโนมัติและยังสามารถตัดและแยกชิ้นส่วนได้ง่ายจึงได้มีการผลิตต้นพืชหลายชนิดจาก การเลี้ยงใน bioreactor ได้แก่ alfalfa, birch, carrot, coffee, sandalwood, spruce, sweet potato (Aitken-Christie et al. 1995; Vasil 1994)

นอกเหนือจากการขยายพันธุ์พืชแล้ว ยังมีรายงานการนำ bioreactor มาใช้ในการเลี้ยงเซลล์เพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ โดยมีการนำมาใช้เพื่อการเลี้ยงขนราก หรือ hairy roots เพื่อใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิเป็นหลัก และการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ในพืชหลายชนิด เช่น พืชสมุนไพรต่าง ๆ กาแฟ กล้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และยางพารา (Takayama and Akita 1998) โดยในกล้วยไม้ มีการใช้ bioreactor ใช้ในการเพิ่มปริมาณของ protocorms (Aitken-Christie et al.,1995)

Temporary immersion Bioreactor (TIB)

Temporary Immersion bioreactor (TIB) เป็นการเลี้ยงเซลล์พืชในภาชนะที่มีอาหารเหลวบรรจุอยู่ มีการให้อาหารอัตโนมัติแบบจมชั่วคราว ซึ่งมีความถี่ของการจุ่มแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด เพื่อปรับปรุงคุณภาพของพืชและเพิ่มอัตราการขยายพันธุ์ ซึ่งปัจจุบันพืชหลายชนิด เช่น กล้วย กาแฟ และยางพารา (Alvard et al. 1993; Teisson and Alvard 1995; Etienne et al. 1997) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIB เพื่อผลิตต้นพันธุ์ปริมาณมากผ่านขบวนการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งระบบ TIB มีหลักการคือ เมื่อ solenoid value เปิด อากาศผ่านและดันอาหารเข้าสู่ขวดที่บรรจุต้นพืช หลังการครบกำหนดเวลา solenoid value จะเปิด และแรงดันอากาศจะกลับเข้าสู่ขวดบรรจุอาหาร ต่อเนื่องไปตามระยะเวลาและความถี่ที่ได้กำหนด (http://www.vitropic.fr/rita) โดยระบบมีการแลกเปลี่ยนอากาศได้จากภายนอก และมีการกำหนดภาชนะ เช่น single flask system เป็นการใช้ภาชนะเดี่ยว และ twin flask system เป็นการแยกภาชนะเป็น 2 อัน โดยถังแรกเป็นถังอาหารและถังที่สองสำหรับเลี้ยงต้น ชิ้นส่วน หรือเซลล์พืช ดังภาพ

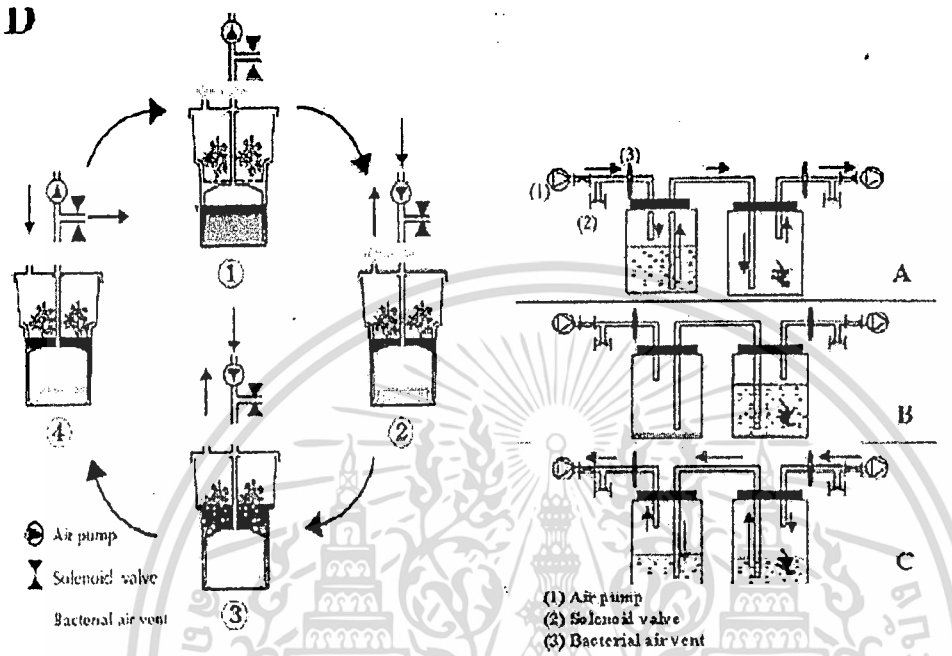
และรูปแบบการพัฒนาที่เกิดใน TIB มีรูปแบบการพัฒนาผ่านขบวนการเกิดเอ็มบริโอ การเกิดอวัยวะ และการเกิดแคลลัสได้เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยง ในอาหารแข็ง กึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารเหลว อย่างไรก็ตามในระบบนี้สามารถปรับปรุงให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่เช่น ยอด หรือตาข้างเช่นเดียวกับการเลี้ยงในอาหารแข็ง และการเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือเอ็มบริโอเช่นเดียวกับการเลี้ยงในอาหารเหลว หรือการปรับสภาพต้นเพื่อการอนุบาล โดยการปรับเปลี่ยนความถี่และระยะเวลาของการจุ่ม และการเลี้ยงในระบบนี้ยังสามารถเพิ่มขนาดของภาชนะได้ตามความเหมาะสมในแต่ละพืช (Weather et.,al. 1989)

ได้มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIB ของพืชหลายชนิด โดยพืชแต่ละชนิดมีเงื่อนไขในการเลี้ยงที่แตกต่างกัน เช่น

Tahardi และคณะ (2003) รายงาน การชักนำให้เกิด โซมาติกเอ็มบริโอในชา (*Camella sinensis* L. O. Kuntze) โดยการเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตร WPM ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายลงอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ABA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการจุ่มเอ็มบริโอในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวน 4 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 3 นาที ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ามีการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้นสองเท่าตัว



ภาพที่ 1 การทำงานของ TIB แบบ single flask system (ซ้าย, Rita ®) (http://www.vitropic.fr/rita) และ twin flask system (ขวา, BIT ®) (Etienne and Berthouly, 2002)

Etienne-Barry และคณะ (1999) รายงานการเพาะเลี้ยงกาแฟในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว ขนาด 1 ลิตร โดยทำการจุ่มเอ็มบริโอในอาหารครั้งละ 1 นาที ทุก 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตโซมาติกเอ็มบริโอได้ถึง 4,000 เอ็มบริโอ

Ilczuk และคณะ (2005) รายงานการเลี้ยงกลีบหัวของว่านสี่ทิศลูกผสม *Hippeastrum x chmielii* Chn. ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวแบบ Twin flask system โดยการจุ่มกลีบหัวในอาหารเป็นเวลา 15 นาที จำนวน 8 ครั้งต่อวัน เปรียบเทียบกับการเติมหรืออาหารทุกสัปดาห์ พบว่าการเติมน้ำมีผลในการเพิ่มอัตราการขยายพันธุ์สูงสุด ส่วนการจุ่มจำนวน 1 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 32 นาที เปรียบเทียบกับ การจุ่ม 4 นาที 8 ครั้งต่อวัน และ 8 นาที 4 ครั้งต่อวัน พบว่า การจุ่มนาน 32 นาที จำนวน 1 ครั้งต่อวันมีผลต่อการเพิ่มปริมาณมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tisserat และ Vandercook (1985) ได้ทำการเลี้ยงยอดของ date palm (*Phenix dactylifera*) ในระบบ TIB พบว่าการจุ่มชั่วครามเป็นเวลา 5-10 นาที ทุก 12 ชั่วโมง ทำให้เกิดการพัฒนาของเอ็มบริโอ และต้นที่ได้ไม่มีอาการผิดปกติ

Alvard และคณะ (1993) ได้เลี้ยงยอดของกล้วย ในระบบ TIB ขนาด 1 ลิตร โดยมีการจุ่มยอดในอาหารทุก 2 ชั่วโมง ครั้งละ 20 นาที พบว่ามีการเพิ่มปริมาณยอดจำนวนมาก ส่วน Escalant และคณะ (1994) ได้ทำการเลี้ยงเอ็มบริโอในระบบ TIB ขนาดเดียวกัน โดยมีการจุ่มเป็นเวลา 1 นาที ทุก ๆ 6 ชั่วโมง พบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอปริมาณมาก

ซึ่งจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในระบบการให้อาหารอัตโนมัติแบบจมชั่วครานั้น มีรายงานการวิจัย วัสดุรองรับชิ้นส่วนพืชและภาชนะบรรจุ เช่น

Prakash และคณะ (1993) ได้รายงานการใช้วัสดุรองรับชิ้นส่วนพืชและภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการให้อาหารเหลวได้ หลายชนิด โดยในส่วนของภาชนะรองรับชิ้นส่วนพืชนั้นสามารถใช้ สำลี และ Glass, wool, polystyrene foam ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ, การใช้ glass beads ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ raspberry, *Saintpaulia, Syngonium, Philodendron Spathiphyllum, Vamila* และการใช้กระดาษกรองในการเพาะเลี้ยงเบญจมาศ และมันฝรั่ง ส่วนการใช้ภาชนะ ได้มีรายงานการใช้ขวดประเภทต่าง ๆ การใช้ถุงพลาสติกที่ทำจากวัสดุทนร้อน การใช้วัสดุที่ทำจาก PVC, Polythene และ ยาง silicom โดยภาชนะที่ใช้ในการบรรจุควรมีการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

การเตรียมยอดหนอนตายหยาก

นำเมล็ดหนอนตายหยากมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5% นาน 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน นำยอดอ่อนจากต้นกล้าอายุสองเดือนมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้ยอดจำนวนมาก จากนั้นนำยอดที่ได้มาใช้ในการทดลองที่ 1 2 และ 4

การเตรียมแคลลัสหนอนตายหยาก

นำเมล็ดหนอนตายหยากมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5% นาน 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มาใช้ในการทดลองที่ 3

การติดตั้งระบบ TIB แบบ Twin flask system

ทำการติดตั้งระบบการให้อาหารอัตโนมัติอย่างง่าย ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ twin flask system ตามแบบของ BIT ® มีการใช้ filter ในการกรองจุลินทรีย์ ทำการต่อท่ออากาศจากระบบเข้ากับ air pump และจากนั้นติดตั้ง timer เข้ากับระบบการให้อาหาร ทำการทดสอบระบบโดยการทดสอบจากการให้น้ำอัตโนมัติ การให้อาหารเหลว และการทดสอบด้วยการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในระบบก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อระบบมีการใช้งานได้อัตโนมัติจึงนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1 ความถี่และระยะเวลาของการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 ความถี่ของการให้อาหาร แบ่งออกเป็น 2 ทรีทเมนต์ ได้แก่ การให้อาหาร 1 และ 3 ครั้งต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ระยะเวลาของการให้อาหาร แบ่งเป็น 3 ทรีตเมนต์ ได้แก่ การให้อาหารครั้งละ 1 3 และ 5 นาที

นำยอดที่มีขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 50 ต้น มาเลี้ยงในขวดขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บันทึกผลการทดลองโดยการให้นับจำนวนยอด วัดความยาวยอด และทำการถ่ายภาพ ทุก 1 เดือน จนครบ 2 เดือน

ผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 2 วัสดุรองรับที่เหมาะสม ต่อการเลี้ยงในระบบการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (Factorial in CRD) ประกอบด้วย 4 ทรีทเมนต์ ได้แก่ สำลี glass bead กระดาษกรอง และผ้าขาวบาง

นำยอดที่มีขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 50 ต้น มาเลี้ยงในขวดขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กำหนดความถี่และระยะเวลาของการจุ่ม และใช้วัสดุรองรับในระบบต่าง ๆ ได้แก่ สำลี glass bead กระดาษกรอง และผ้าขาวบางตามผลการทดลองที่ได้จากการทดลองที่ 1 บันทึกผลการทดลองโดยการให้นับจำนวนยอด วัดความยาวยอด และทำการถ่ายภาพ ทุก 1 เดือน จนครบ 2 เดือน

ผลที่ได้จากการทดลองที่ 2 นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อขยายขนาดและการพัฒนาของแคลลัสหนอนตายหยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบไปด้วย 4 ทรีทเมนต์ ได้แก่

ทรีทเมนต์ที่ 1 สูตรอาหาร MS

ทรีทเมนต์ที่ 2 สูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 3 สูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 + BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 4 สูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 + TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดลองโดยนำยอด มาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวโดยมีอัตราความถี่และระยะเวลาที่พบว่ามีผลดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากการทดลองที่ 1 และวัสดุรองรับที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2

ทำการบันทึกการขนาดของแคลลัส น้ำหนักสด น้ำหนัก แห้ง การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของแต่ละทรีทเมนต์ทุก 30 วัน โดยเปรียบเทียบ จำนวนยอด ความสูงของต้น และความยาวราก ทำการชั่งน้ำหนักสดและแห้งของรากและบันทึกภาพ

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของยอดหนอนตายหยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบจมชั่วคราว

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบไปด้วย 4 ทรีทเมนต์ ได้แก่

ทรีทเมนต์ที่ 1 สูตรอาหาร MS

ทรีทเมนต์ที่ 2 สูตรอาหาร MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 3 สูตรอาหาร MS + IAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีทเมนต์ที่ 4 สูตรอาหาร MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการทดลองโดยนำยอด มาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวโดยมีอัตราความถี่และระยะเวลาที่พบว่ามีผลดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากการทดลองที่ 1

ทำการบันทึกการเจริญเติบโตของแต่ละทรีทเมนต์ทุก 30 วัน โดยเปรียบเทียบ จำนวนยอด ความสูงของต้น และความยาวราก ทำการชั่งน้ำหนักสดและแห้งของรากและบันทึกภาพ

การทดลองที่ 5 การศึกษาผลของระยะเวลาการหยุดการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตหลังการอนุบาล

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 4 treatment โดยทำการเลี้ยงต้นในอาหารสูตรเหลว MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการงดการให้อาหารภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ก่อนทำการย้ายกล้าลงในระบบการปลูกพืชไม่ใช้ดิน โดยใช้วัสดุปลูกผสมได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขุยมะพร้าว ทราย ดิน และ perlite ในอัตราส่วน 1:1:1:1 จากนั้นนำต้นกล้าไปเลี้ยงในโรงเรือนพรางแสง ทำการฉีดพ่นน้ำ ด้วยระบบน้ำแบบพ่นหมอกในช่วง 2 สัปดาห์แรก จากนั้นทำการให้น้ำด้วยการฉีดพ่นน้ำที่มีการเติมปุ๋ยสูตร 15-15-15 ร่วมกับธาตุอาหารรอง Micro mix ® ทุกเช้าเย็น จากนั้นทำการบันทึกการรอดชีวิตทุกสัปดาห์และบันทึกการเจริญเติบโต โดยการนับจำนวนใบ วัดสีใบ ชั่งน้ำหนัก วัดความสูงของลำต้น และวัดความยาวรากทุก 30 วันจนครบ 3 เดือน

การวิเคราะห์ข้อมูล

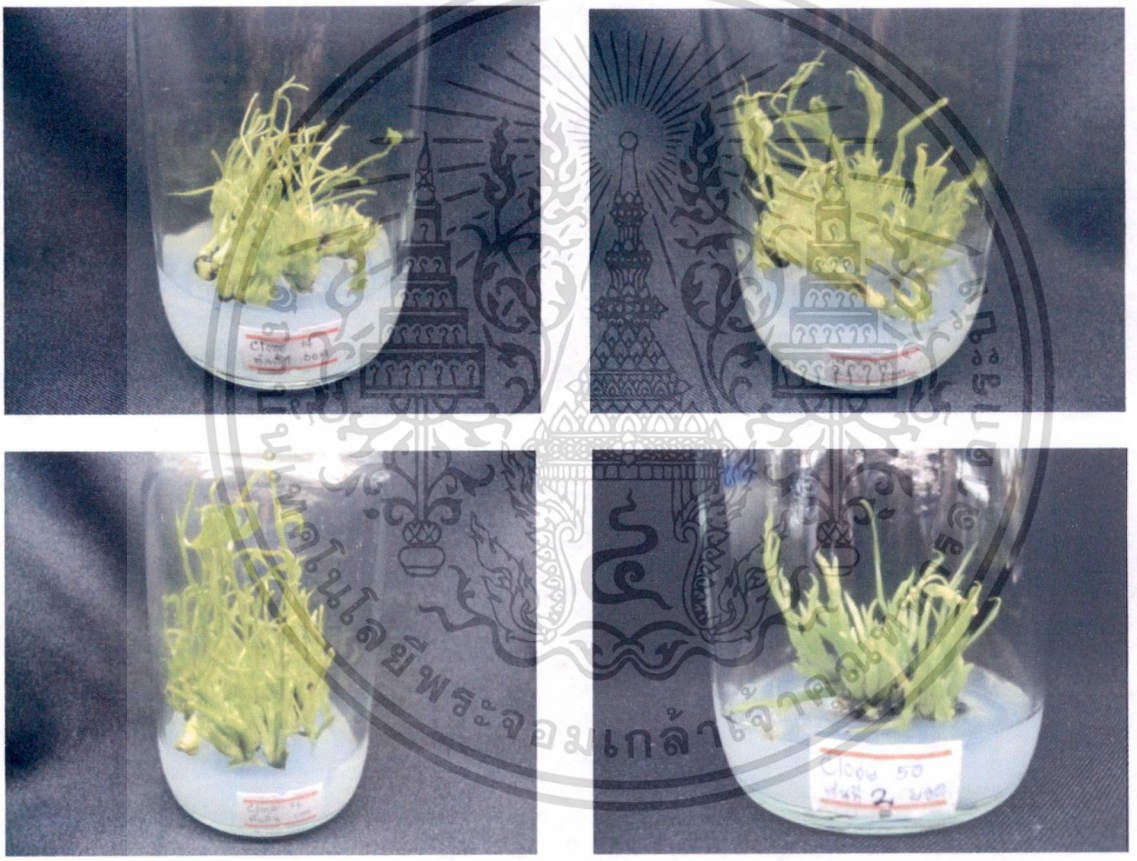
วิเคราะห์ข้อมูลที่ศึกษาทั้งหมดโดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มโดยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัย

การเตรียมยอดหนอนตายหยาก

นำเมล็ดหนอนตายหยากมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5% นาน 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน นำยอดอ่อนจากต้นกล้าอายุสองเดือนมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้ยอดจำนวนมาก จากนั้นนำยอดที่ได้มาใช้ในการทดลองที่ 1 2 และ 4 (ภาพที่ 2)

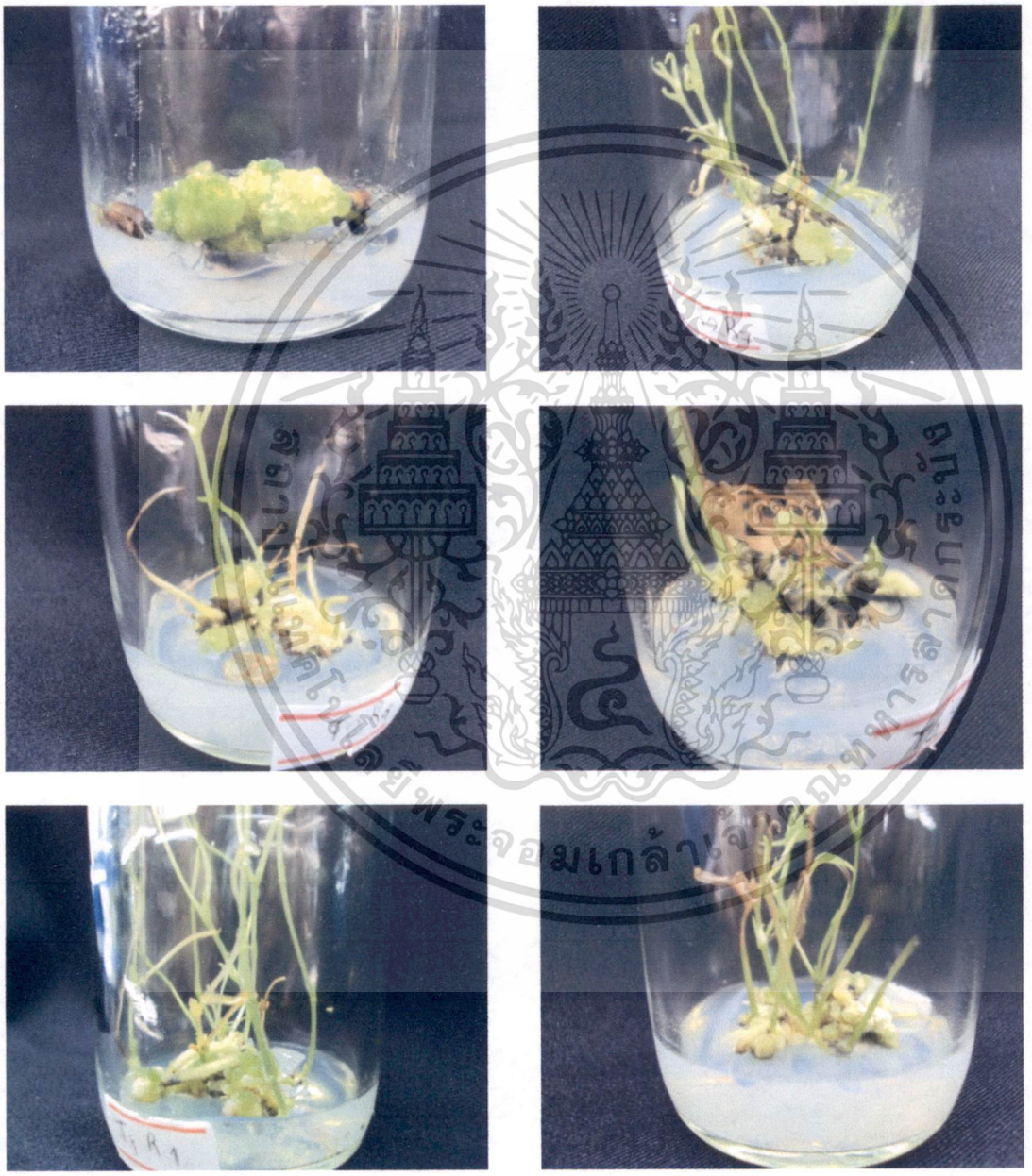


ภาพที่ 2 ยอดหนอนตายหยาก

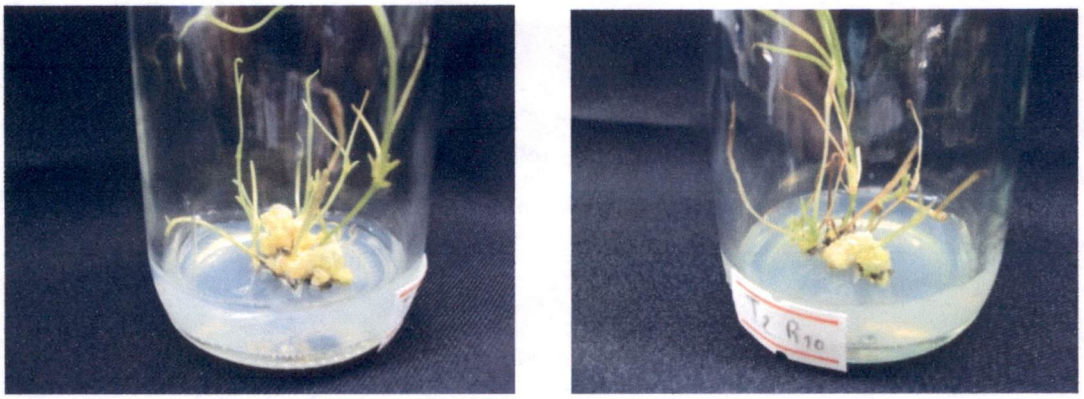
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมแคลลัสหนอนตายหยาก

นำเมล็ดหนอนตายหยากมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5% นาน 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มาใช้ในการทดลองที่ 3 (ภาพที่ 3)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 แคลลัสหนอนตายหยาก

การทดลองที่ 1 ความถี่และระยะเวลาของการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก

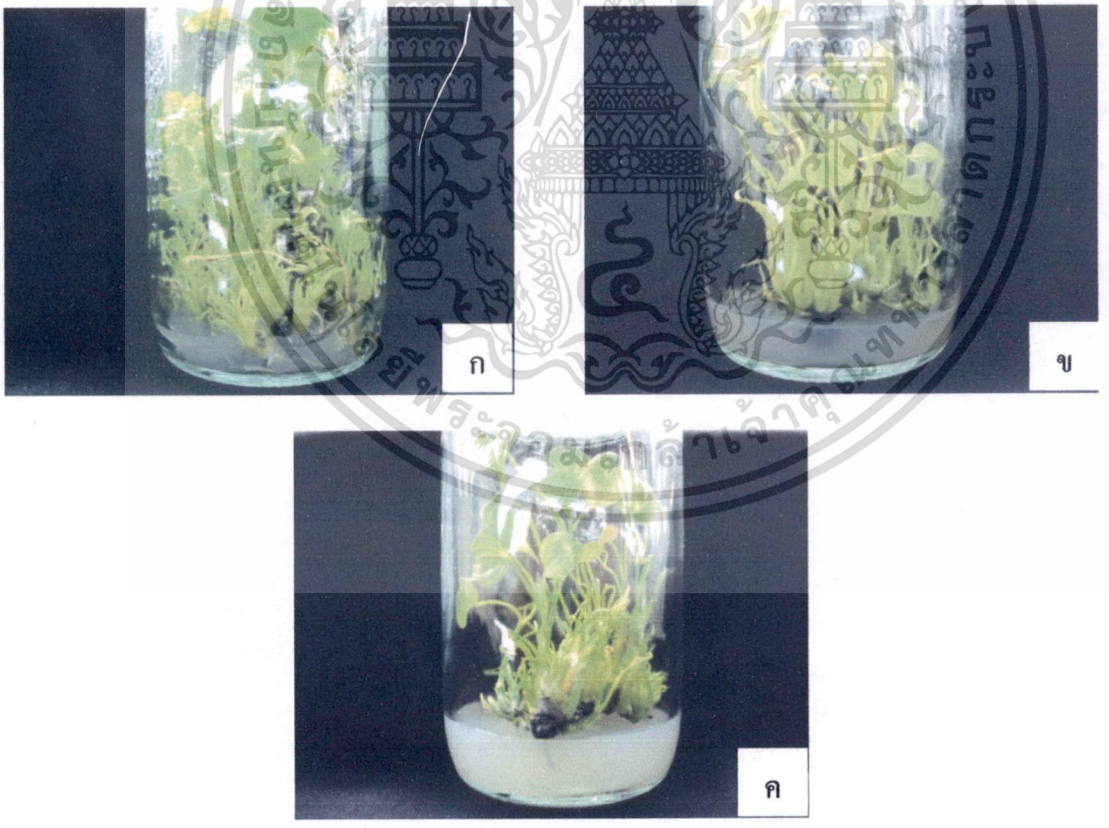
จากการวิจัยถึงความถี่และระยะเวลาของการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก โดยการนำยอดที่มีขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 50 ต้น มาเลี้ยงในขวดขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 2 ปัจจัย คือความถี่ของการให้อาหาร ได้แก่ การให้อาหาร 1 และ 3 ครั้งต่อวัน และระยะเวลาของการให้อาหาร ได้แก่ การให้อาหารครั้งละ 1 3 และ 5 นาที เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า จำนวนยอด และความยาวยอด ในแต่ละ treatment มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ความถี่ของการให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน มีจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุดคือ 12.55 และ 3.00 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และระยะเวลาของการให้อาหารครั้งละ 5 นาที มีจำนวนยอดและความยาวยอด มากที่สุดคือ 15.77 และ 3.60 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1 ภาพที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 1 จำนวนยอดและความยาวยอด ที่ได้จากความถี่และระยะเวลาของการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายอยาก เป็นเวลา 2 เดือน

ปัจจัย	จำนวนยอด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)
ความถี่ของการให้อาหาร		
การให้อาหาร 1 ครั้งต่อวัน	10.05a	3.28a
การให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน	12.55ab	3.00b
ระยะเวลาของการให้อาหาร		
การให้อาหารครั้งละ 1 นาที	10.85b	2.02a
การให้อาหารครั้งละ 3 นาที	11.45ab	2.74a
การให้อาหารครั้งละ 5 นาที	15.77c	3.60ab
F-test	*	*
C.V.(%)	13.48	2.06



ภาพที่ 4 จำนวนยอดและความยาวยอด ที่ได้จากความถี่และระยะเวลาของการให้อาหาร

ก. การให้อาหารครั้งละ 1 นาที ข. การให้อาหารครั้งละ 3 นาที ค. การให้อาหารครั้งละ 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

115541

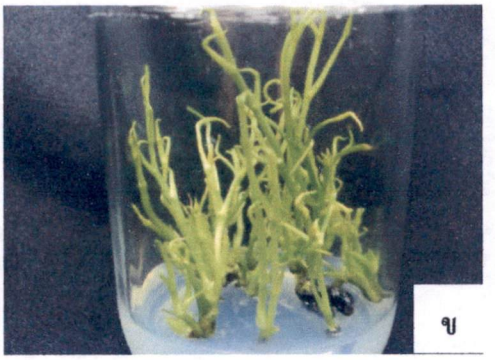
การทดลองที่ 2 วัสดุรองรับที่เหมาะสม ต่อการเลี้ยงในระบบการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก

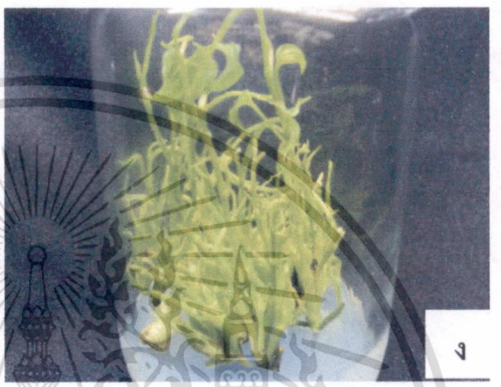
นำยอดที่มีขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 50 ต้น มาเลี้ยงในขวดขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กำหนดความถี่และระยะเวลาของการจุ่ม และใช้วัสดุรองรับในระบบต่าง ๆ ได้แก่ สำลี glass bead กระดาษกรอง และผ้าขาวบาง เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า จำนวนยอด และความยาวยอดในแต่ละ treatment มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ความถี่ของการให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน มีจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุดคือ 14.55 6.35 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 5) ระยะเวลาของการให้อาหารครั้งละ 5 นาที มีจำนวนยอดและความยาวยอด มากที่สุดคือ 16.77 และ 8.60 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 5) และวัสดุรองรับที่เหมาะสมคือ glass bead มีจำนวนยอดและความยาวยอดคือ 18.20 และ 7.30 เซนติเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 2 จำนวนยอดและความยาวยอด ที่ได้จากวัสดุรองรับที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงในระบบการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก เป็นเวลา 2 เดือน

ปัจจัย	จำนวนยอด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)
ความถี่ของการให้อาหาร		
การให้อาหาร 1 ครั้งต่อวัน	11.25a	3.34a
การให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน	14.55ab	6.35ab
ระยะเวลาของการให้อาหาร		
การให้อาหารครั้งละ 1 นาที	10.95b	3.02a
การให้อาหารครั้งละ 3 นาที	12.45ab	2.85a
การให้อาหารครั้งละ 5 นาที	16.77c	8.60ab
วัสดุรองรับที่เหมาะสม		
สำลี	15.45a	5.47a
Glass bead	18.20ab	7.30ab
กระดาษกรอง	17.34a	6.20a
ผ้าขาวบาง	16.56a	5.30a
F-test	*	*
C.V.(%)	11.58	3.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





ภาพที่ 5 จำนวนยอดและความยาวยอด

ก. สำลี ข. Glass bead

ค. กระดาษกรอง ง. ผ้าขาวบาง

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อขยายขนาดและการพัฒนาของแคลลัสหนอนตายหยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว

จากการนำยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ขนาดของแคลลัส น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ในแต่ละ treatment มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดของแคลลัส น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมากที่สุดคือ มีขนาดใหญ่ (++++) 25.33 มิลลิกรัม และ 10.00 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อขยายขนาดและการพัฒนาของแคลลัสหนอนตายหยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว

สูตรอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ขนาดของแคลลัส	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
MS	_	0.00a	0.00a
MS + 2,4-D 0.5	++	11.00a	2.35a
MS + 2,4-D 0.5 + BA 0.1	++++	25.33ab	10.00ab
MS + 2,4-D 0.5 + TDZ 0.1	+++	10.56a	5.38a
F-test		*	*
C.V.(%)		6.33	4.57

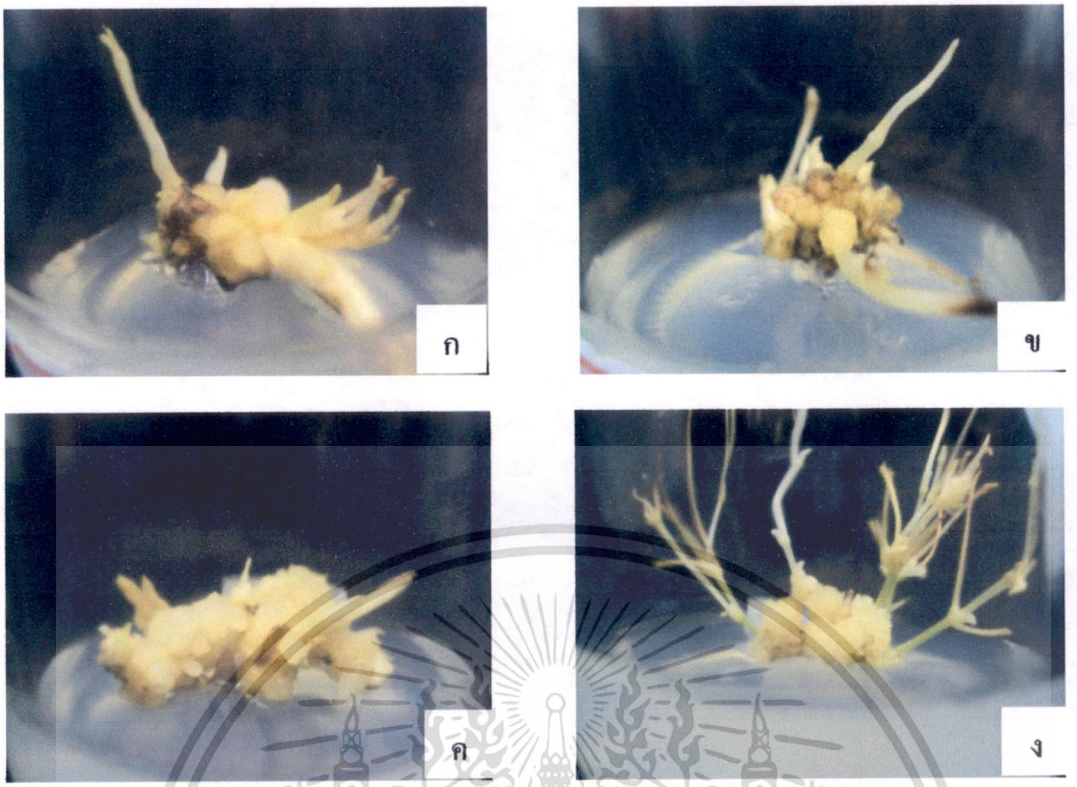
หมายเหตุ ขนาดของแคลลัส - หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส

++ หมายถึง ขนาดเล็ก

+++ หมายถึง ขนาดปานกลาง

++++ หมายถึง ขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อขยายขนาดและการพัฒนาของแคลลัสหนอนตายหยาก

ก. สูตรอาหาร MS

ข. สูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 มล./ล.

ค. สูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 มล./ล. + BA 0.1 มล./ล.

ง. สูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 มล./ล. + TDZ 0.1 มล./ล.

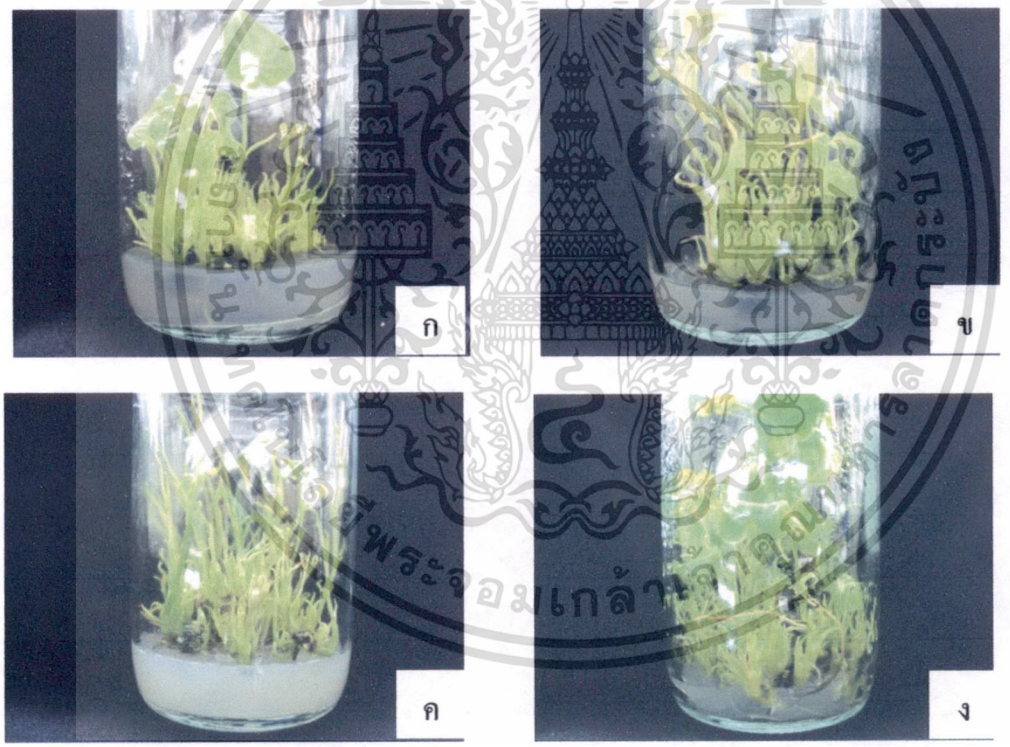
การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของยอดหนอนตายหยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว

จากการนำยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า จำนวนยอด ความสูงของต้น ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ในแต่ละ treatment มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสูตรอาหาร MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอด ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งมากที่สุดคือ 35.28 8.29 เซนติเมตร 4.35 เซนติเมตร 15.47 มิลลิกรัม 10.33 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4 ภาพที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของยอดหนอนตายหยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว

สูตรอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอด	ความสูงต้น	ความยาวราก	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
MS	13.29a	3.40a	2.23a	2.34a	1.23a
MS + BA 5	15.87a	4.45a	2.50a	2.32a	1.15a
MS + IAA 5	14.89a	3.56a	3.45a	3.45a	2.12a
MS + BA 5 + IAA 5	35.28ab	8.29b	4.35a	15.47ab	10.33ab
F-test	*	*	*	*	*
C.V.(%)	9.45	8.34	7.43	5.67	4.89



ภาพที่ 7 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก

ก. สูตรอาหาร MS

ข. สูตรอาหาร MS + BA 5 มล./ล.

ค.สูตรอาหาร MS + IAA 5 มล./ล.

ง. สูตรอาหาร MS + BA 5 มล./ล. + IAA 5 มล./ล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 5 การศึกษาผลของระยะเวลาการหยุดการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตหลังการอนุบาล

จากการเลี้ยงต้นในอาหารสูตรเหลว MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการงดการให้อาหารภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ก่อนทำการย้ายกล้าลงในระบบการปลูกพืชไม่ใช้ดิน โดยใช้วัสดุปลูกผสมได้แก่ ขุยมะพร้าว ทราย ดิน และ perlite ในอัตราส่วน 1:1:1:1 จากนั้นนำต้นกล้าไปเลี้ยงในโรงเรือนพรางแสง ทำการฉีดพ่นน้ำ ด้วยระบบน้ำแบบพ่นหมอกในช่วง 2 สัปดาห์แรก จากนั้นทำการให้น้ำด้วยการฉีดพ่นน้ำที่มีการเติมปุ๋ยสูตร 15-15-15 ร่วมกับธาตุอาหารรอง Micro mix ® ทุกเช้าเย็น พบว่า การงดการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตหลังการอนุบาล เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีจำนวนใบ สีใบ น้ำหนัก ความสูงของลำต้น และความยาวรากมากที่สุดคือ 10.22 สีเขียว 5.30 มิลลิกรัม 8.77 เซนติเมตร และ 3.42 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของยอดหนอนตายหยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว

เวลา (สัปดาห์)	จำนวนใบ	สีใบ	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม)	ความสูงของลำต้น (เซนติเมตร)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
1	10.22b	เขียว	5.30b	8.77b	3.42b
2	3.20a	เขียว	2.28a	3.29a	2.18a
3	3.43a	เขียว	2.50a	2.26a	2.05a
4	5.25a	เขียว	2.67a	2.02a	2.12a
F-test	*		*	*	*
C.V.(%)	4.25		3.29	2.35	2.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

อภิปรายผลการวิจัยและวิจารณ์

จากการวิจัยการผลิตต้นพันธุ์หนอนตายอยากเชิงการค้าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว อย่างง่าย

การทดลองที่ 1 ความถี่และระยะเวลาของการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว ต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก

จากการวิจัยถึงความถี่และระยะเวลาของการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว ต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก โดยการนำยอดที่มีขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 50 ต้น มาเลี้ยงในขวดขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 2 ปัจจัย คือความถี่ของการให้อาหาร ได้แก่ การให้อาหาร 1 และ 3 ครั้งต่อวัน และระยะเวลาของการให้อาหาร ได้แก่ การให้อาหารครั้งละ 1 3 และ 5 นาที เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ความถี่ของการให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน มีจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุดคือ 12.55 และ 3.00 เซนติเมตร ตามลำดับ และระยะเวลาของการให้อาหารครั้งละ 5 นาที มีจำนวนยอดและความยาวยอด มากที่สุดคือ 15.77 และ 3.60 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Alvard และคณะ (1993) ได้เลี้ยงยอดของกล้วย ในระบบ TIB ขนาด 1 ลิตร โดยมีการจุ่มยอดในอาหารทุก 2 ชั่วโมง ครั้งละ 20 นาที พบว่ามีการเพิ่มปริมาณยอดจำนวนมาก

การทดลองที่ 2 วัสดุรองรับที่เหมาะสม ต่อการเลี้ยงในระบบการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายหยาก

นำยอดที่มีขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 50 ต้น มาเลี้ยงในขวดขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กำหนดความถี่และระยะเวลาของการจุ่ม และใช้วัสดุรองรับในระบบต่าง ๆ ได้แก่ สำลี glass bead กระดาษกรอง และผ้าขาวบาง เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า วัสดุรองรับที่เหมาะสมคือ glass bead มีจำนวนยอดและความยาวยอดคือ 18.20 และ 7.30 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Prakash และคณะ (1993) ได้รายงานว่าการใช้วัสดุรองรับชิ้นส่วนพืชและภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการให้อาหารเหลวได้ หลายชนิด โดยในส่วนของภาชนะรองรับชิ้นส่วนพืชนั้นสามารถใช้ สำลีและ Glass, wool, polystyrene foam ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ, การใช้ glass beads ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ raspberry, *Saintpaulia, Syngonium, Philodendron Spathiphyllum, Vamila* และการใช้กระดาษกรองในการเพาะเลี้ยงเบญจมาศ และมันฝรั่ง ส่วนการใช้ภาชนะได้มีรายงานการใช้ขวดประเภทต่าง ๆ การใช้ถุงพลาสติกที่ทำจากวัสดุทนร้อน การใช้วัสดุที่ทำจาก PVC,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Polythene และ ยาง silicom โดยภาชนะที่ใช้ในการบรรจุควรมีการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนได้

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อขยายขนาดและการพัฒนาของแคลลัสหนอนตายหยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว

จากการนำยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ขนาดของแคลลัส น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง โดยสูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดของแคลลัส น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมากที่สุดคือ มีขนาดใหญ่ (++++) 25.33 มิลลิกรัม และ 10.00 มิลลิกรัม ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Tahardi และคณะ (2003) ได้รายงานว่า การชักนำให้เกิด โซมาติกเอ็มบริโอในชา (*Camella sinensis* L. O. Kuntze) โดยการเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารสูตร WPM ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายลงอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ABA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการจุ่มเอ็มบริโอในอาหารจำนวน 4 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 3 นาที ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า มีการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอเพิ่มขึ้นสองเท่าตัว

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของยอดหนอนตายหยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว

จากการนำยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า จำนวนยอด ความสูงของต้น ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง โดยสูตรอาหาร MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอด ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งมากที่สุดคือ 35.28 8.29 เซนติเมตร 4.35 เซนติเมตร 15.47 มิลลิกรัม 10.33 มิลลิกรัม ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Montri et., al. (2006) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *S. curtisii* โดยนำชิ้นส่วนยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 20 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดปริมาณมาก และการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 5-20 μM สามารถชักนำให้รากได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 5 การศึกษาผลของระยะเวลาการหยุดการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตหลังการอนุบาล

จากการเลี้ยงต้นในอาหารสูตรเหลว MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการงดการให้อาหารภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวเป็นเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ก่อนทำการย้ายกล้าลงในระบบการปลูกพืชไม่ใช้ดิน โดยใช้วัสดุปลูกผสมได้แก่ ขุยมะพร้าว ทราย ดิน และ perlite ในอัตราส่วน 1:1:1:1 จากนั้นนำต้นกล้าไปเลี้ยงในโรงเรือนพรางแสง ทำการฉีดพ่นน้ำ ด้วยระบบน้ำแบบพ่นหมอกในช่วง 2 สัปดาห์แรก จากนั้นทำการให้น้ำด้วยการฉีดพ่นน้ำที่มีการเติมปุ๋ยสูตร 15-15-15 ร่วมกับธาตุอาหารรอง Micro mix ® ทุกเช้าเย็น พบว่า การงดการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตหลังการอนุบาล เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีจำนวนใบ สีใบ น้ำหนัก ความสูงของลำต้น และความยาวรากมากที่สุดคือ 10.22 สีเขียว 5.30 มิลลิกรัม 8.77 เซนติเมตร และ 3.42 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Montri et., al. (2006) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *S. curtisii* โดยนำชิ้นส่วนยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 20 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดปริมาณมาก และการเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 5-20 μM สามารถชักนำให้ราก และสามารถย้ายต้นออกปลูกในโรงเรือนได้ และเมื่อต้นที่ได้สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับต้นที่ได้จากสภาพธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยการผลิตต้นพันธุ์หนอนตายอยากเชิงการค้าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวอย่างง่าย สรุปผลได้ดังนี้

1. ความถี่และระยะเวลาของการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายอยาก โดยความถี่ของการให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน มีผลต่อจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุด และระยะเวลาของการให้อาหารครั้งละ 5 นาที มีจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุด ซึ่งทำให้กระตุ้นการเจริญของยอดได้ดี

2. วัสดุรองรับที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงในระบบการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายอยาก ซึ่งวัสดุรองรับที่เหมาะสมคือ glass bead มีผลต่อจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุด มีแนวโน้มในการช่วยการแตกยอดได้ดี และมีผลต่อการกระตุ้นการพัฒนาของยอด

3. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อขยายขนาดและการพัฒนาของแคลลัสหนอนตายอยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว ซึ่งการเลี้ยงยอดให้เกิดแคลลัสในสูตรอาหาร MS + 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อขนาดของแคลลัส น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมากที่สุด ซึ่งมีผลกระตุ้นทำให้ยอดเกิดแคลลัสได้ดี

4. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของยอดหนอนตายอยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว ซึ่งการเลี้ยงยอดในสูตรอาหาร MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อจำนวนยอด ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งมากที่สุด ซึ่ง BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มในการช่วยการแตกยอดและพัฒนายอดได้ดี และ IAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการเกิดรากได้ดี

5. การศึกษาผลของระยะเวลาการหยุดการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตหลังการอนุบาล การงดการให้อาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตหลังการอนุบาล เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีจำนวนใบ สีใบ น้ำหนัก ความสูงของลำต้น และความยาวรากมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ทราบถึงปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตต้นพันธุ์หนอนตายอยากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมชั่วคราว (TIB) เพื่อนำไปสู่แนวทางการผลิตต้นพันธุ์หนอนตายอยากในระดับอุตสาหกรรม โดยไม่ทำลายธรรมชาติต่อไป

2. นำผลการวิจัยไปใช้ต่อยอดในการวิจัยเพื่อการผลิตต้นกล้าหนอนตายอยากเชิงอุตสาหกรรม โดยต้นพันธุ์มีการสร้างสารอัลคาลอยด์เช่นเดียวกับต้นในธรรมชาติ

3. เป็นแนวทางในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ และการผลิตสารทุติยภูมิโดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

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

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

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.

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

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

ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย (2534) ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ กรุงเทพฯ, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิริวรรณ บุรีคำ มณฑา วงศ์มณีโรจน์ สุรัตน์วดี จิวะจินดา และหรอง หวมหวน. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยากและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 18(2): 8-11

สุธาพันธ์ โพธิ์กำเนิด. 2544. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรหนอนตายหยากผสมอาหารไก่เพื่อควบคุมปริมาณหนอนแมลงวันบ้านในมูลไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ (เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. 156 หน้า.

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

Alvard D., Cote J. and Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture of banana micropropagation. Effects of Temporary immersion of explants. Plant Cell. Tiss.Org.Cul. 32:55-60.

Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y & Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus*L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep. 18: 743–748

Etienne H, Bertrand B, Anthony F, Côte F & Berthouly M (1997a) L'embryogenèse somatique: un outil pourl'amélioration génétique du caféier. In: ASIC Publishers (eds) 17th International Scientific Colloquiun on Coffee, Nairobi (pp 457–465), Vevey

Etienne H, Lartaud M, Michaux–Ferrière N, Carron MP, Berthouly M & Teisson C (1997b) Improvement of somaticembryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. In Vitro Cell. Dev. Biol. 33: 81–87

Etienne–Barry D, Bertrand B, Vásquez N & Etienne H (1999) Direct sowing of *Coffea arabica* somatic Embryo smass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. Plant Cell Rep. 19: 111–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

117

Etienne H. and M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 215–231

Ilczuk A., T. Winkelmann, S Richartz, M. Witomska and M. Serek. 2005. In vitro propagation of Hippeastrum ×chmielii Chm. – influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion systems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture83: 339–346

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

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

Montri, N., Wawrosch, C.H. and Kopp, B. 2006. MICROPROPAGATION OF *STEMONA CURTISII* HOOK. F., A THAI MEDICINAL PLANT. Acta Hort. (725):341-346

Prakash, S., M.I. Hoque and T.Brinks. Culture media and container.2002. p 29-39. In Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a technical meeting organizatioed by the joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna, Austria, 26-30 August 2002

Preil W (2005) General introduction: a personal re.ection on the use of liquid media for in vitro culture. In: Hvoslef-Eide AK & Preil W (eds) Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation (pp 1–18). Springer Verlag, Berlin Verlag, Berlin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Takayama, S. 1991. Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques. p. 1–46. In:

Teisson, C., and D. Alvard. 1995. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. p. 105–110. In: M. Terzi et al. (eds.), Current issues in plant molecular and cellular biology. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands.

Tisserat B & Vandercook CE (1985) Development of an automated plant culture system. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5: 107–117

Vasil, I. K. 1994. Automation of plant propagation. Plant Cell Tissue Organ Culture 39:105–108.

Ziv, M. 1991a. Vitrification: Morphological and physiological disorders of in vitro plants. p. 45–69. In: P G.

Debergh and R. H. Zimmerman (eds.), Micropropagation: Technology and application. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands.

Ziv, M. 1991b. Morphogenic pattern of plants in liquid medium in shaken flasks or large scale bioreactor cultures. Israel J. Bot. 40:145–153.

Ziv, M. 1995. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. Acta Hort. 319:25–38. http://www.vitropic.fr/rita

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 stock solution ของอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962)

Stock/ความเข้มข้น	สารเคมี	ความเข้มข้น/ลิตร
Stock 1/100 เท่า	NH_4NO_3	160 กรัม
	KH_2PO_4	17 กรัม
	H_3BO_3	620 มิลลิกรัม
	$CoCl_2.6H_2O$	2.5 มิลลิกรัม
	$CuSO_4.5H_2O$	25 มิลลิกรัม
	$MnSO_4.H_2O$	2230 มิลลิกรัม
	KI	83 มิลลิกรัม
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	25 มิลลิกรัม
	$ZnSO_4.H_2O$	860 มิลลิกรัม
Stock 2/100 เท่า	KNO_3	190 กรัม
Stock 3/100 เท่า	$CaCl_2.2H_2O$	44 กรัม
Stock 4/100 เท่า	$MgSO_4.7H_2O$	37 กรัม
Stock 5/100 เท่า	Na_2-EDTA	3.73 กรัม
Stock 6/200 เท่า	Glycine	400 มิลลิกรัม
	Myo-inositol	20 กรัม
	Nicotinic acid	100 มิลลิกรัม
	Pyridoxine-HCl	100 มิลลิกรัม
	Thiamine-HCl	20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 การเตรียม Stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโต

สารเคมี	อักษรย่อ	ตัวทำละลาย	มก/50 มล (1 mM)
Cytokinins			
Benzyladenine	BA	1N NaOH	11.25
Isopentenyl adenine	2-iP	1N NaOH	10.15
Kinetin	KIN	1N NaOH	10.75
Zeatin	ZEA	1N NaOH	10.95
Auxins:			
Indole-3-acetic acid	IAA	1N NaOH	8.25
Indole-3-butyric acid	IBA	1N NaOH	10.16
1-Naphthalenacetic acid	NAA	1N NaOH	9.31
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	50% EtOH	11.05
2,4,5-Trichirophenyoxyacetic acid	2,4,5-T	50% EtOH	11.78
Gibberellic acid	GA_3	50% EtOH	17.32
Abscisic acid	ABA	1N NaOH	13.20

วิธีการเตรียมอาหาร

การเตรียมอาหารสูตรอาหาร MS (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

1. ใส่น้ำลงไปในบีกเกอร์ 300 มิลลิลิตร
2. ดูดสารละลายเข้มข้นใส่ลงในบีกเกอร์จนครบ

   stock 1 จำนวน 10 มิลลิลิตร

   stock 2 จำนวน 10 มิลลิลิตร

   stock 3 จำนวน 10 มิลลิลิตร

   stock 4 จำนวน 10 มิลลิลิตร

   stock 5 จำนวน 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

stock 6 จำนวน 5 มิลลิลิตร

3. ใส่น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร

4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

5. ปรับความเป็นกรดด่าง ให้ได้ pH 5.6-5.8

6. เติมวุ้น 8 กรัมต่อลิตร

7. เคี่ยววุ้นให้ละลาย

8. ใส่ขวดแก้วและปิดฝาให้สนิท

9. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. นำอาหารออกจากหม้อนึ่งเมื่อครบเวลาที่กำหนด แล้วนำไปเก็บในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1.1 ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวจินดา สุดวัดแก้ว

(ภาษาอังกฤษ) Miss. Jinda Sudwatkaew

1.2 ประวัติการศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชสวน)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิทยาเขตชุมพร

1.3 หน่วยงานและสถานที่ทำงานปัจจุบัน

งานบริการห้องปฏิบัติการ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิทยาเขตชุมพร

หมู่ที่ 6 ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 86160

โทรศัพท์ 0-7750-6410 โทรสาร 0-7759-1445, 0-7759-446

1.4 ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร สังกัดงานบริการห้องปฏิบัติการ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิทยาเขตชุมพร

1.5 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

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

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

2.1 ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวนาตยา มนตรี

(ภาษาอังกฤษ) Miss Nattaya Montri

2.2 ประวัติการศึกษา Dr.rer.nat. Plant Biotechnology University of Vienna Austria

2.3 หน่วยงานและสถานที่ทำงานปัจจุบัน

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร หลักสูตรพืชสวน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิทยาเขตชุมพร

หมู่ที่ 6 ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 86160

โทรศัพท์ 0-7750-6410 โทรสาร 0-7759-1445, 0-7759-446

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ตำแหน่ง อาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร หลักสูตรพืชสวน
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
วิทยาเขตชุมพร

2.5 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

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

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

Montri N. 1997. Tissue culture of *Phyllanthus emblica* Linn. The forth annual conference of Thai researcher in Japan, 23 February 1997 Tokyo, Japan.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้