

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการศึกษา

การผลิตต้นพันธุ์ปทุมมาปลอดเชื้อ

3.1 การเตรียมเนื้อเยื่อปทุมมาผ่านเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ

ช่อดอกอ่อนของปทุมมาพันธุ์ลูกผสมเทพวาลีกถูกตัดออกจากก้านช่อ นำช่อดอกอ่อนมาล้างด้วยสบู่เหลวและล้างสบู่ออกจากช่อดอกอ่อนภายใต้ น้ำไหล จุ่มช่อดอกอ่อนปทุมมาลงในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที และฟอกด้วยสารละลายคลอโรกซ์ (Clorox, 1.40 เปอร์เซ็นต์ (v/v) sodium hypochlorite) 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที และฟอกครั้งที่ 2 ด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ช่อดอกอ่อนถูกล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดลอกกลีบดอกออก และเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่เติม BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ ปรับความเป็นกรดอยู่ที่ 5.7 เติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เนื้อเยื่อที่ได้จากการเจริญช่อดอกอ่อนของปทุมมาถูกเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 5 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อเพิ่มจำนวนต้นปทุมมา

3.2 การเตรียมเนื้อเยื่อปทุมมาปลอดเชื้อโดยผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (Meristem culture)

ต้นปทุมมาที่มีความยาว 1.0 ± 0.2 เซนติเมตร ถูกนำมาบ่มเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่อุณหภูมิ 29.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพมืด เป็นเวลา 1 เดือน ยอดปทุมมาที่ผ่านการบ่มเพาะเลี้ยง ถูกนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.15 ± 0.05 เซนติเมตร ด้วยใบมีดโกน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Zeiss Stemi SV6, Germany) ที่กำลังขยาย 40 เท่า และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ภายใต้สภาพมืดเป็นเวลา 3 วัน อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips, Thailand) และย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอด

ฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips, Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อผลิตต้นพันธุ์ปทุมมาปลอดเชื้อ

3.3 การเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ปทุมมา

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ถูกนำมาตัดยอดสูงจากฐาน 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ ปรับความเป็นกรดต่างที่ 5.7 และเติม Phytagel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ต้นพันธุ์ปทุมมาถูกเปลี่ยนอาหารใหม่ โดยใช้อาหารสูตรเดิมทุก ๆ 5 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ปทุมมา

วิธีการทดลองการผลิตต้นพันธุ์ปทุมมา

3.4 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของจำนวนยอดปทุมมาบนอาหาร MS ที่เติม BA Kinetin หรือ 2iP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ และผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ ถูกนำมาตัดยอดสูงจากฐาน 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA Kinetin หรือ 2iP เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของจำนวนยอดของปทุมมาโดยมีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 8.89 ไมโครโมลาร์ (Control)
2. BA 4.44 ไมโครโมลาร์
3. BA 13.32 ไมโครโมลาร์
4. Kinetin 4.65 ไมโครโมลาร์
5. Kinetin 13.94 ไมโครโมลาร์
6. Kinetin 23.23 ไมโครโมลาร์

7. 2iP 4.92 ไมโครโมลาร์

8. 2iP 14.76 ไมโครโมลาร์

9. 2iP 24.60 ไมโครโมลาร์

อาหารปรับความเป็นกรดต่างที่ 5.7 และเติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญทางด้านจำนวนยอด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.5 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของจำนวนยอดของปทุมมาบนอาหาร MS ที่เติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ และผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ ถูกตัดยอดสูงจากฐาน 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของจำนวนต้นของปทุมมาบนอาหารที่เติม TDZ โดยมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 8.89 ไมโครโมลาร์ (Control)

2. TDZ 4.54 ไมโครโมลาร์

3. TDZ 13.62 ไมโครโมลาร์

4. TDZ 22.70 ไมโครโมลาร์

5. TDZ 31.78 ไมโครโมลาร์

6. TDZ 40.86 ไมโครโมลาร์

7. TDZ 45.40 ไมโครโมลาร์

อาหารเพิ่มจำนวนยอดของปทุมมาปรับความเป็นกรดต่างที่ 5.7 และเติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญทางด้านจำนวนยอด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.6 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของจำนวนยอดปทุมมาบนอาหาร MS ที่เติม TDZ เป็นเวลา 3 สัปดาห์และย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA Kinetin หรือ 2iP เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ และผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ นำมาตัดยอดสูงจากฐาน 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ เติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่เติม BA Kinetin หรือ 2iP เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยมีการทดลองดังนี้

1. เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 8.89 ไมโครโมลาร์ ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ (Control)
2. เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 4.54 13.62 22.70 31.78 40.86 หรือ 45.40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 4.44 8.89 13.32 ไมโครโมลาร์ หรือ Kinetin 4.65 13.94 23.23 ไมโครโมลาร์ หรือ 2iP 4.92 14.76 24.60 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

อาหารเพิ่มจำนวนยอดของปทุมมาปรับความเป็นกรดต่างที่ 5.7 และเติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตร ต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวนยอด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

วิธีการทดลองการผลิต T-roots ของปทุมมา

3.7 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหาร MS ที่เติม NAA และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ และผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ ถูกตัดยอดสูงจากรู้น 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA และน้ำตาลซูโครส เพื่อชักนำ T-roots โดยมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ (Control)
2. NAA 8.88 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
3. NAA 17.76 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
4. NAA 26.64 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
5. NAA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์

อาหารชักนำ T-roots ปรับปรุงความเป็นกรดต่าง ที่ 5.7 และเติม Phytigel® 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots ขนาด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.8 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหาร MS ที่เติม NAA และน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ NAA ตามวิธีข้อ 3.7 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของ NAA ที่สามารถชักนำให้เกิด T-roots ได้จำนวนมากที่สุด คือ 8.88 ไมโครโมลาร์ ซึ่งนำมาสู่การทดลองชักนำ T-roots บนอาหารที่เติม NAA 8.88 ไมโครโมลาร์ และเติมน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ (Control)
2. กลูโคส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์
3. ฟรุคโตส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์
4. มอลโตส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์
5. แมนนิทอล 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์

อาหารชักนำ T-roots ปรับความเป็นกรดต่าง ที่ 5.7 และเติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots ขนาดน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.9 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหาร MS ที่เติม BA และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ และผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ ถูกตัดยอดสูงจากฐาน 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA และน้ำตาลซูโครส เพื่อชักนำ T-roots โดยมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ (Control)
2. BA 8.88 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
3. BA 17.76 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
4. BA 26.64 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
5. BA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์

อาหารชักนำ T-roots ปรับความเป็นกรดต่าง ที่ 5.7 และเติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots ขนาดน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.10 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหาร MS ที่เติม BA และน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ BA ตามวิธีข้อ 3.9 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของ BA ที่สามารถชักนำให้เกิด T-roots ได้จำนวนมากที่สุด คือ 26.64 ไมโครโมลาร์ ซึ่งนำมาสู่การทดลองชักนำ T-roots ของปทุมมาบนอาหารที่เติม BA 26.64 ไมโครโมลาร์ และเติมน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ (Control)
2. กลูโคส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์
3. ฟรุคโตส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์
1. มอลโตส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์
2. แมนนิทอล 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์

อาหารชักนำ T-roots ปรับความเป็นกรดต่าง ที่ 5.7 และเติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร หนึ่งชั่วโมงอาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots ขนาด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.11 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหาร MS ที่เติม Kinetin และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ และผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ ถูกตัดยอดสูงจากฐาน 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin และน้ำตาลซูโครส เพื่อชักนำ T-roots โดยมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ (Control)
2. Kinetin 9.29 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
3. Kinetin 18.59 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์

4. Kinetin 27.88 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78

มิลลิโมลาร์

5. Kinetin 37.17 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78

มิลลิโมลาร์

อาหารชักนำ T-roots ปรับความเป็นกรดต่าง ที่ 5.7 และเติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots ขนาดน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.12 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหาร MS ที่เติม Kinetin และน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ Kinetin ตามวิธีข้อ 3.11 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของ Kinetin ที่สามารถชักนำให้เกิด T-roots ได้จำนวนมากที่สุด คือ 18.59 ไมโครโมลาร์ ซึ่งนำมาสู่การทดลองชักนำ T-roots ของปทุมมาบนอาหารที่เติม Kinetin 18.59 ไมโครโมลาร์ และเติมน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ (Control)

2. กลูโคส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์

1. ฟรุคโตส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์

2. มอลโตส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์

3. แมนนิทอล 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์

อาหารชักนำ T-roots ปรับความเป็นกรดต่าง ที่ 5.7 และเติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots ขนาดน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.13 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหาร MS ที่เติม 2iP และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ และผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ ถูกตัดยอดสูงจากฐาน 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2iP และน้ำตาลซูโครส เพื่อชักนำ T-roots โดยมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ (Control)
2. 2iP 9.84 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
3. 2iP 19.69 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
4. 2iP 29.53 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์
5. 2iP 39.37 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 116.89 175.34 233.78 มิลลิโมลาร์

อาหารชักนำ T-roots ปรับความเป็นกรดต่าง ที่ 5.7 และเติม Phytagel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร หนึ่งชั่วโมงอาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots ขนาด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.14 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหาร MS ที่เติม 2iP และน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ 2iP ตามวิธีข้อ 3.13 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของ 2iP ที่สามารถชักนำให้เกิด T-roots ได้จำนวนมากที่สุด คือ 19.69 ไมโครโมลาร์ ซึ่งนำมาสู่การทดลองชักนำ T-roots ของปทุมมาบนอาหารที่เติม 2iP 19.69 ไมโครโมลาร์ และเติมน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. BA 35.51 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ (Control)
2. กลูโคส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์
2. ฟรุคโตส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์
3. มอลโตส 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์
4. แมนนิทอล 222.02 333.04 444.05 มิลลิโมลาร์

อาหารชักนำ T-roots ปรับความเป็นกรดต่าง ที่ 5.7 และเติม Phytagel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร หนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots ขนาดน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

3.15 การศึกษาการชักนำ T-roots ภายใต้อุณหภูมิ 20 25 หรือ 30 องศาเซลเซียส

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ และผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ ตัดยอดสูงจากฐาน 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 8.88 BA 26.64 Kinetin 18.59 หรือ 2iP 19.69 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ ภายใต้อุณหภูมิ 20 25 หรือ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots

3.16 การศึกษาการชักนำ T-roots ภายใต้ความเข้มแสง 0 60 หรือ 120 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที

ต้นพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ และผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 87.00 มิลลิโมลาร์ และ BA 8.89 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ ถูกตัดยอดสูงจากฐาน 0.7 ± 0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 8.88 BA 26.64 Kinetin 18.59 หรือ 2iP 19.69 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ ความเข้มแสง 0 60 หรือ 120 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านจำนวน T-roots

วิธีการทดลองการย้ายต้นปทุมมาที่มี T-roots ออกปลูกลงแปลงทดลอง

3.17 การศึกษาการย้ายต้นปทุมมาที่ผ่านการชักนำ T-roots ที่แตกต่างกันออกปลูกลงแปลงทดลอง

ต้นปทุมมาที่ผ่านการชักนำ T-roots บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 26.64 ไมโครโมลาร์ Kinetin 18.59 ไมโครโมลาร์ หรือ 2iP 19.69 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 233.78 มิลลิโมลาร์ หรือน้ำตาลกลูโคส 333.04 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นำมาย้ายออกปลูกลงแปลงทดลองเปรียบเทียบกับต้นพันธุ์ที่ไม่ผ่านการชักนำ T-roots (Control) ณ บริษัท ไพร์ม ออเนเมนทอล จังหวัดเชียงใหม่ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญด้านอัตราการรอดชีวิต ความยาวลำต้นเทียม จำนวนดอก จำนวน T-roots จำนวนท่อนพันธุ์ และน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของ T-roots

3.18 วัสดุปลูกและการฆ่าเชื้อ

วัสดุปลูกประกอบด้วยแกลบดิบและดิน ถูกนำมาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร อบฆ่าเชื้อด้วยสารดาไซเมท (Dazomet; Tetrahydro - 3, 5 - dimethyl - 1, 3 - 5 thiadiazine - 2 - thione 9 - 1) โดยนำวัสดุปลูกมากองบนผ้าพลาสติก ขนาด 12 ตารางเมตร ความหนาชั้นละ 30 เซนติเมตร โรยสลับด้วยสารดาไซเมท 180 กรัม เป็นจำนวน 2 ชั้น นำวัสดุปลูกมากลบทับชั้นบนหนา 30 เซนติเมตร คลุมวัสดุปลูกด้วยพลาสติกทึบ อบเป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นกลับวัสดุปลูก 2-3 ครั้ง สลับกับตากทิ้งไว้ 2-3 วัน

3.19 การย้ายต้นปทุมมาที่มี T-roots ออกปลูกและดูแลรักษา

ต้นปทุมมาที่มี T-roots จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถูกปลูกในถุงพลาสติกดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 20 เซนติเมตร พับขอบถุง 5 เซนติเมตร โดยใส่วัสดุปลูกรองก้นถุง 10 เซนติเมตร และปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตรา 5 กรัม ต่อหนึ่งกอ จากนั้นขุดดินเป็นหลุมปลูกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ลึก 2 เซนติเมตร นำต้นปทุมมาที่มี T-roots ปลูกถุงละ 1 ต้น โดยให้ส่วนยอดของต้นปทุมมาที่มี T-roots โผล่พ้นเหนือดิน รดน้ำให้ชุ่ม นำฟางข้าวห่มเป็นท่อนขนาดยาว 5 เซนติเมตร คลุมผิวดินเพื่อรักษาระดับความชื้น ทำการจัดวางถุงปลูกเป็น 5

แถว ๆ ละ 10 ต้น ตามแนวทิศเหนือและใต้ ระยะห่างระหว่างแถวและระหว่างต้น 50×50 เซนติเมตร ภายในโรงเรือนที่ถูกพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ (ซาแลน 50 เปอร์เซ็นต์) อุณหภูมิ 22 ± 13 องศาเซลเซียส ความชื้น 50 ± 20 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มแสง $1,200 \pm 200$ ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 12 ± 1 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากปลูกเป็นเวลา 30 วัน ให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ในอัตรา 5 กรัมต่อต้น พรวันดิน กลบปุ๋ย และพูนโคนต้นด้วยวัสดุปลูก ทำการพรวันดิน และพูนโคนต้น กำจัดวัชพืชอย่างสม่ำเสมอทุกสัปดาห์ ปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 180 วัน ณ บริษัท ไพรม์ ออนาเมนต์ทอล จังหวัดเชียงใหม่

การวางแผนการทดลอง และการบันทึกผลการทดลอง

3.20 การทดลองการผลิตต้นพันธุ์ปทุมมา

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ในหัวข้อการทดลองที่ 3.4 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของจำนวนยอดปทุมมาบนอาหารที่เติม BA Kinetin หรือ 2iP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ การทดลองที่ 3.5 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของจำนวนยอดของปทุมมาบนอาหารที่เติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ การทดลองที่ 3.6 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของจำนวนยอดปทุมมาบนอาหารที่เติม TDZ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA Kinetin หรือ 2iP เป็นเวลา 5 สัปดาห์ แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น โดยทำการบันทึกผลการทดลองดังนี้

1. บันทึกจำนวนยอดปทุมมาขนาดเล็ก หลังการเพาะเลี้ยงต้นพันธุ์ปทุมมา ตลอดระยะเวลาการทดลอง
2. บันทึกน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง หลังการเพาะเลี้ยงต้นพันธุ์ปทุมมา ตลอดระยะเวลาการทดลอง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อหาค่าน้ำหนักแห้ง

3.21 การทดลองการผลิต T-roots ของปทุมมา

การทดลองที่ 3.7 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหารที่เติม NAA และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน การทดลองที่ 3.8 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหารที่เติม NAA และน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน การทดลองที่ 3.9 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหารที่เติม BA และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความ

เข้มข้นต่างกัน การทดลองที่ 3.10 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหารที่เติม BA และน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน การทดลองที่ 3.11 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหารที่เติม Kinetin และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน การทดลองที่ 3.12 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหารที่เติม Kinetin และน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน การทดลองที่ 3.13 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหารที่เติม 2iP และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน และการทดลองที่ 3.14 การศึกษาการชักนำ T-roots บนอาหารที่เติม 2iP และน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส หรือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ทำการวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น

และการทดลองที่ 3.15 การศึกษาการชักนำ T-roots ภายใต้อุณหภูมิ 20 25 หรือ 30 องศาเซลเซียส การทดลองที่ 3.16 การศึกษาการชักนำ T-roots ภายใต้ความเข้มแสง 0 60 หรือ 120 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น

1. บันทึกจำนวน ขนาด ของ T-roots ต่อต้น หลังการเพาะเลี้ยงต้นพันธุ์ปทุมมา เป็น เวลา 1 3 5 และ 7 สัปดาห์
2. บันทึกน้ำหนักสดของ T-roots ของปทุมมาหลังการชักนำเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 สัปดาห์ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อหา ค่าน้ำหนักแห้ง

3.22 การทดลองในแปลงปลูกทดลอง ณ บริษัท ไพร์ม ออานาเมนทอล จังหวัดเชียงใหม่

วางแผนการทดลองวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Block Design สำหรับการทดลองในแปลงปลูกทดลอง แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น และทำการบันทึกผลการทดลองดังนี้

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 16 วัน ถึง 90 วัน
2. บันทึกจำนวนลำต้นเทียมหรือยอด ความยาวลำต้นเทียมหรือยอด ภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 16 วัน ถึง 90 วัน
3. บันทึกจำนวนดอกของปทุมมาภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 16 วัน ถึง 90 วัน
4. บันทึกจำนวน T-roots ปทุมมาภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 180 วัน
5. บันทึกจำนวนท่อนพันธุ์ปทุมมาภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 180 วัน
6. น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของ T-roots และท่อนพันธุ์ปทุมมาภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 180 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง

3.23 การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ผลการวิจัยมีดังนี้

- การผลิตต้นปทุมมาพันธุ์ลูกผสมเทพรำลึก ในหลอดทดลอง

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Descriptive Statistics และทดสอบผลของปัจจัยโดย One way analysis of variance จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ระหว่างการทดลอง โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ($p \leq 0.01$)

- การผลิต T-roots ของปทุมมาพันธุ์ลูกผสมเทพรำลึก ในหลอดทดลอง

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Descriptive Statistics และทดสอบผลของปัจจัยโดย Tests of Between-Subjects Effects จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ระหว่างการทดลอง โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ($p \leq 0.01$)

- การผลิตท่อนพันธุ์ปทุมมาพันธุ์ลูกผสมเทพรำลึก ในแปลงปลูกทดลอง

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Descriptive Statistics และทดสอบผลของปัจจัยโดย One way analysis of variance จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ระหว่างการทดลอง โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ($p \leq 0.01$)