บทที่ 3
วิธีวิจัย

3.1 ชนิดของกล้วยไม้และบริเวณที่เก็บตัวอย่าง

ชนิด/ลูกผสมกล้วยไม้ บริเวณที่เก็บตัวอย่าง และที่มาของต้นกล้วยไม้แสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ชนิดกล้วยไม้ บริเวณที่เก็บตัวอย่าง และที่มาของต้นกล้วยไม้ที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อวิทยาศาสตร์[a]	ชื่อไทย	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง[b]	ที่มาของต้นกล้วยไม้[c]
C. lowianum (Cl)	ปากนกแก้ว	QS	0
C. sinense (Cs)	กะเรกะร่อนนิล	QS	0
C. tracyanum (Ct)	เอื้องกำเบ้อ	PC	1
C. Golden Elf (C1)	-	DT	TC
C. Miniature (C2)	-	DT	TC
C. Golden Elf x *Grammatophyllum measuresianum* (C3)	-	DT	TC
D. anosmum (Da)	สายหลวง	KP	0
D. crystallinum (Dcr)	สายมรกต	QS	0
D. friedericksianum (Df)	เหลืองจันทบูร	QS	3
D. Salaya Red (D1)	-	KT	TC
P. callosum (Pca)	รองเท้านารีคางกบ	QS	0
P. charlesworthii (Pch)	รองเท้านารีดอยตุง	SM	TC
P. charlesworthii (Pch)	รองเท้านารีดอยตุง	QS	0
P. exul (Pe)	รองเท้านารีเหลืองกระบี่	QS	0
P. sukhakulii (Ps)	รองเท้านารีสุขะกุลหรือ	KT	0
P. sukhakulii (Ps)	รองเท้านารีปีกแมลงปอ	AT	0
P. villosum (Pv)		PC	2
P. villosum (Pv)	รองเท้านารีอินทนนท์	PC	1
P. villosum (Pv)		QS	0

[a] *Cymbidium* (C.), *Dendrobium* (D.) และ *Paphiopedilum* (P.); ตัวหนังสือในวงเล็บแสดงรหัสของชนิด/ลูกผสมกล้วยไม้

[b] แสดงโดยรหัสดังนี้: QS สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่; PC โครงการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ตามพระราชดำริในพื้นที่ภาคเหนือ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่; DT โครงการพัฒนาดอยตุง อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย; KT ตลาดคำเที่ยง อ.เมือง จ.เชียงใหม่; SM สวนบัวแม่สาออร์คิด อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่; AT โรงเรือนกล้วยไม้ของนายอรรถพล ตลึงจิตร อ.เมือง จ.เชียงราย; KP โรงเรือนกล้วยไม้ของนายกิตติชัย ภู่เล็ก อ.เมือง จ.เชียงราย

[c] แสดงโดยรหัสดังนี้: 0 ไม่ทราบแหล่งดั้งเดิมของต้น; 1 อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อ.เชียงใหม่; 2 อ.ขุนยวม จ.แม่ฮ่องสอน; 3 อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน; TC ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.2 การแยกราจากรากตัวอย่างและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา

การแยกราจากรากตัวอย่างมีขั้นตอนคือ การเก็บรากจากต้นกล้วยไม้ที่แข็งแรงสมบูรณ์และไม่พบการเข้าทำลายของโรคและแมลงลงในถุงพลาสติก เก็บในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง และลำเลียงกล่องโฟมมายังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง การแยกราจะทำภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บราก โดยการนำรากมาตัดตามขวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereomicroscope) จากนั้นคัดเลือกเฉพาะรากที่มี peloton ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (compound microscope) รากที่มี peloton จะถูกนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดย 3% (v/v) H_2O_2 และ 70% เอธิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที ใช้เทคนิคปลอดเชื้อตัดรากตามขวางเป็นชิ้นหนา 1-2 มิลลิเมตร ด้วยใบมีดโกนใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ใช้ forceps และมีดดึงส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อชั้น epidermis ของราก หรือ velamen ทิ้งไป จากนั้นจึงวางชิ้นรากบนอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะดังต่อไปนี้ 50 µg/ml oxytetracycline 50 µg/ml streptomycin และ 50 µg/ml penicillin (Otero et al. 2002) ประมาณ 3 ชิ้นรากต่อ 1 petri dish อย่างน้อย 3 petri dish ต่อ 1 รากตัวอย่าง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอทุก ๆ 2 วันเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ หากพบราที่เจริญออกมามีลักษณะของรา *Rhizoctonia* คือ 1) มีการแตกแขนงของเส้นใยเป็นมุมฉาก 2) มีรอยคอดในบริเวณที่เส้นใยแตกแขนง 3) แขนงเส้นใยมีผนังกั้น (septum) ใกล้จุดกำเนิด (Otero et al. 2002) ก็จะตัดส่วนปลายของเส้นใย (hyphal tip) มาเลี้ยงบนอาหารใหม่

เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ของราจะถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์หรือนานกว่านี้หากเป็นราที่โตช้าเพื่อถ่ายรูปโคโลนี (colony) การศึกษาลักษณะทางจุลทรรศน์ เตรียมสไลด์โดยการใช้น้ำหรือสารละลาย 0.5% (W/V) Safranin O 1 หยดและสารละลาย 3% KOH 1 หยด สังเกตลักษณะของราและถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (Axiotech, Carl Zeiss, Jena, Germany) ที่ต่อกับกล้องถ่ายรูป (DSC-S85, Sory, Tokyo, Japan)

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ เทคนิคพีซีอาร์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เส้นใยของราเก็บจากราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะดังที่แสดงไว้ในหัวข้อ 3.1 เมื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อพันธุ์บริสุทธิ์ของราชนิดที่ต้องการโดยลักษณะของโคโลนีและลักษณะทางจุลทรรศน์ จะตัดวุ้นอาหารที่มีเส้นใยของเชื้อราเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ซม. x 1 ซม. ละลายอาหารบนเตาไฟฟ้า (hot plate) เก็บเส้นใยราใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C จนกระทั่งใช้ การสกัดดีเอ็นเอทำโดยการบดเส้นใยของราใน Buffer

PL (Vivantis Technologies, Selangor DE, Malaysia) โดยใช้ tube pestle จากนั้นจึงดำเนินการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ GF-1 Plant Extraction Kit (Vivantis Technologies) ตามคู่มือของชุดสกัด

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ เริ่มจากการเลือกคู่ไพรเมอร์ (primer) และอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมโดยใช้ amplification reaction ปริมาตร 15 µl ซึ่งประกอบด้วย Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1X PCR Buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 400 nM ไพรเมอร์ forward และ 400 nm ไพรเมอร์ reverse คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ได้แก่ 1) ITS1-OF-1 (5'-AACTCGGCCATTTAGAGGAAGT-3')/ITS4-OF, 2) ITS1-OF-2 (5'-AACTGGTCATTTAGAGGAAGT-3'/ITS4-OF, และ 3) ITS1-OF-1/ITS4 (Taylor and McCormick 2008; White et al. 1990) ตั้งอุณหภูมิและเวลาของโปรแกรมพีซีอาร์ดังต่อไปนี้: 95°C เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ ตามด้วย 1) 94°C 1 นาที, 2) 55°C-58°C 30 วินาที ขึ้นอยู่กับชนิดของรา, และ 3) 72°C 1 นาที จำนวน 35 รองและ 72°C 10 นาที 1 รอบ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับ PCR purification ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วแต่เพิ่มปริมาตรเป็น 100 µl PCR purification ใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ถูกส่งไปที่ Fist Base Pte Ltd (Singapore) สำหรับการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (White et al. 1990)

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จะถูกรวมให้เป็น contig เดียวกัน โดยใช้โปรแกรม CAP3 (Huang and Madan 1999) การค้นหาชนิดของราที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ ใช้ BLAST Searches (Atschul et al. 1997) ค้นหาจากฐานข้อมูลของ NCBI การปรับแต่งและการจัดการลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้โปรแกรม BIOEDT (Hall 1999) การเปรียบเทียบเพื่อหา sequence identity ใช้โปรแกรม CLUSTALW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการใช้โปรแกรม CLUSTALX version 2.0 (Larkin et al. 2007) การสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการใช้การวิเคราะห์ maximum parsimony (MP) การยืนยันชนิดของราและการจำแนกไอโซเลตออกเป็นกลุ่มหลักใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะบริเวณ 5.8S rDNA สำหรับการหาความสัมพันธ์ของสมาชิกในแต่ละ clade หลักใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA การวิเคราะห์ MP ใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0 beta 10 (Swofford 2002) และใช้ heuristic search ซึ่งประกอบด้วย random stepwise addition 1000 ซ้ำ โดยใช้อัลกอริทึม (algorithm) แบบ tree bisection and reconnection (TBR) branch swapping, MulTrees option in effect, และ zero length branches collapsed การวิเคราะห์ bootstrap ทำโดยใช้

1000 replicates แต่ละ replicate ประกอบด้วย random addition heuristic search 100 รอบ, TBR branch swapping, และ MulTrees option in effect โดยที่ tree arrangement ถูกจำกัดไว้ที่ 5000 ครั้งต่อ 1 bootstrap replicate

3.4 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับรา

3.4.1 ไอโซเลตของรา

ใช้ราจำนวน 8 ไอโซเลตจาก 27 ไอโซเลต ได้แก่ ราที่อาจเป็น anamorph species ชนิดใหม่ในสกุล Tulasnella จาก Clade I จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ Pv-QS-0-2 และ C1-DT-TC-1 รา *Epulorhiza repens* (Clade II) จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ Cs-QS-0-1, Da-KP-0-1 และ Pv-PC-1-1 ราที่ถูกระบุว่าเป็น anamorph ของ *Tulasnella irregularis* (Clade III) จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ C3-DT-TC-2 ราที่ถูกระบุว่าเป็น *Epulorhiza calendulina*-like (Clade V) จำนวน 1 ไอโซเลต และราที่อาจเป็น anamorphic species ใหม่ในวงศ์ Tulasnellaceae จำนวน 1 ไอโซเลตได้แก่ P v-QS-0-1

3.4.2 ฝักกล้วยไม้

ใช้กล้วยไม้ 4 ชนิดได้แก่ กะเรกะร่อนนิล (*Cymbidium sinense*) จำนวน 3 ฝัก เอื้องสายน้ำเขียว (*Dendrobium crepidatum*) จำนวน 4 ฝัก ว่านเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum*) จำนวน 1 ฝัก และเอื้องเงิน (*Dendrobium draconis*) จำนวน 1 ฝัก

3.4.3 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้

การทดลองใช้แผนทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) โดยทำการเปรียบเทียบการงอกและพัฒนาการของเมล็ดและโปรโตคอร์ม (protocorm) ของกล้วยไม้ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS, Murashige and Skoog 1962), oat meal agar (OMA; 10 g/l OMA, Himedia Laboratories, Mumbai, India, 8 g/l agar), หรือ OMA ที่มีการปลูกเชื้อราไอโซเลตใดไอโซเลตหนึ่ง โดยแต่ละ treatment มี 3 ซ้ำ (replicate) การฆ่าเชื้อที่ผิวฝักกล้วยไม้ทำโดยการจุ่มฝักในเอธิลแอลกอฮอร์ 95% แล้วผ่านไฟ ถ่ายเมล็ดไปใส่ใน Petri dish แล้วคลุกให้สม่ำเสมอ วางกระดาษกรอง (Whatman International, Kent, UK) ที่ตัดเป็นสามเหลี่ยมบนอาหารเตรียมไว้ แล้วย้ายเมล็ดในปริมาณที่ใกล้เคียงกันไปวางบนกระดาษกรองในทุกหน่วยทดลอง สำหรับ treatment ที่มีการปลูกเชื้อราทำโดยการวางชิ้น PDA ขนาด 5 x 5 mm^2 ที่มีเส้นใยของราชนิดนั้น ๆ บนอาหาร OMA ตรงจุดศูนย์กลางของ Petri dish เก็บทุก Petri dish ใน plant growth chamber (Model 6150CP4 Contherm Scientific, Petone, New Zealand) ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 25°C เก็บในที่มืด เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงให้แสง 16 ชั่วโมงในรอบ 1 วันเป็นเวลา 15 สัปดาห์ บันทึกระยะการเจริญของเมล็ดและโปรโตคอร์ม (ตารางที่ 3-2) ถ่ายภาพแต่ละหน่วย

ทดลองจำนวน 3 ภาพ โดยกล้องดิจิตอล (Moticam 2000, Motic, Xiamen, China) ที่ติดอยู่บนกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ เพื่อนับระยะการเจริญของเมล็ดและโปรโตคอร์มในสัปดาห์ที่ 13 หลังจากการเพาะเมล็ด เปอร์เซ็นต์ของเมล็ดและโปรโตคอร์มที่ระยะการเจริญต่าง ๆ คำนวณโดยการหารจำนวนเมล็ดหรือโปรโตคอร์มระยะนั้น ๆ ด้วยจำนวนเมล็ดและโปรโตคอร์มทั้งหมดบนภาพ ค่าเฉลี่ยของระยะการเจริญของแต่ละ treatment คำนวณโดยสูตรดังต่อไปนี้ $[(0\times a)+(1\times b)+(2\times c)+(3\times d)+(4\times e)+(5\times f)]/100$ โดยที่ *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, และ *f* หมายถึงเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดหรือโปรโตคอร์มที่ระยะ 0, 1, 2, 3, 4, และ 5 ตามลำดับ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระยะการเจริญใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และ Duncan's Multiple Range Test ($P<0.05$) โปรโตคอร์มจากแต่ละ treatment ถูกสุ่มมาตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Axiotech, Carl Zeiss) ที่ต่อกับกล้องดิจิตอล (PowerShot G9, Canon, Tokyo, Japan) เพื่อยืนยันการมีหรือไม่มี peloton

ตารางที่ 3-2 ระยะการเจริญของเมล็ดและโปรโตคอร์ม (ดัดแปลงจาก Johnson et al. 2007)

ระยะ	คำบรรยายลักษณะ
0	เมล็ดไม่งอก ไม่พบการฉีกขาดของเปลือกหุ้มเมล็ด
1	เริ่มงอก: เอมบริโอ (embryo) มีขนาดใหญ่ขึ้น เปลือกหุ้มเมล็ดฉีกขาดจากการขยายขนาดของเอมบริโอ
2	เอมบริโอมีลักษณะกลม พบเห็น rhizoids
3	โปรโตคอร์มมี protomeristem
4	เริ่มเกิดใบแรก
5	ใบแรกขยายขนาดและมีพัฒนาการต่อไป