บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ผ้าไนลอนเมช (Nylon mesh) ขนาดความพรุน 45 ไมโครเมตร
2. กรอบสไลด์ (Photograph frame)
3. ตาข่ายพลาสติก (Plastic mesh)
4. ช้อนตักสารขนาดเล็ก (Micro spatula)
5. สแฟกนัมมอส (Sphagnum mosses)
6. ขวดโหล (jars)
7. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
8. ปากคีบปลายแหลม (forcept)
9. กระบอกตวง (Cylinder)
10. กล่องพลาสติก (Plastic box)
11. สำลี (Conton)
12. กล้องถ่ายรูป (Camara)
13. วัสดุธรรมชาติ ได้แก่ ขุยมะพร้าว พีทมอส ทราย เวอร์คูมิไลท์
14. ใบมีดโกน
15. เข็มเขี่ยปลายแหลม (Needle)
16. ปากคีบปลายแหลม (Forcept)
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
18. หลอดหยด (Dropper)
19. กระจกสไลด์ (Grass slide)
20. กระจกปิดสไลด์ (Cover slip)
21. แท่งเจาะวุ้น (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 มิลลิเมตร
22. หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (Microcentrifuge tube)
23. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micropipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร
24. ทิปไมโครปิเปต (Micropipette tip) ขนาด 100 ไมโครลิตร
25. กระบอกฉีดยา (Syringe)
26. ออคคูลาร์ไมโครมิเตอร์ (Ocular micrometer)
27. สเตทไมโครมิเตอร์ (Stage micrometer)
28. หลอดดักแก๊ส กระดาษทิชชู่ และยางรัดของ
29. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
30. บีกเกอร์ (Breaker)
31. ขวดแก้ว (Glass bottle) ขนาด 200 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

32. พาราฟิล์ม (Parafilm)
33. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น Hiclive HVE-50
34. ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น Model 600
35. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น AV-100
36. เตาไฟฟ้าชนิดแผ่ความร้อน (Hot plate) ยี่ห้อ Rommelsbacher รุ่น Mark ll
37. เครื่องชั่งไฟฟ้า (Analytical balance) 2 ตำแหน่ง รุ่น MB 16025
38. กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ (Sterio microscope) ยี่ห้อ Nikon รุ่น SMZ-10 DIA STAND
39. กล้องจุลทรรศน์สองมิติแบบใช้แสงธรรมดา (Light microscope) รุ่น Olympus Optical Model CH30RF200
40. เอกซเรย์ฟลูออเรสเซนต์ (X ray fluorescence analysis spectrometry: XRF) รุ่น XG1000WR
41. อุปกรณ์ถ่ายภาพ

อาหารวุ้นสังเคราะห์

1. Fungi isolating medium (FIM) ที่เติมยาสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) และยาเตตราซัยคลิน (Tetracyclin)
2. Potato Dextrose Agar (PDA)
3. Oat Milk Agar (OMA)
4. Murashige and Skoog (MS)
5. Vacin and Went (VW)

สารเคมีและสีย้อม

1. โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCL) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
2. สารลดแรงตึงผิว (Tween 20)
3. เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
4. เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์
5. ยาสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)
6. ยาเตตราซัยคลิน (Tetracyclin)
7. ซิลิกาเจล (Silica gel)
8. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Sterile distilled water)
9. เมทานอล (Metanol) สำหรับเติมตะเกียงแอลกอฮอล์
10. สีย้อมเส้นใยรา Lactophenol cotton blue

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

พืชตัวอย่าง

1. เมล็ดและรากของกล้วยไม้ลิ้นมังกร (*Habenaria rhodocheila* Hance)

วิธีดำเนินการวิจัย

ลักษณะทางชีววิทยากล้วยไม้ลิ้นมังกร

สำรวจกล้วยไม้ลิ้นมังกรในบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิ้ว บันทึกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด ขนาดของเมล็ด และความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรหลังการเก็บเกี่ยวทุกเดือน เป็นเวลา 12 เดือน

การคัดแยกราไมคอร์ไรซา

1. การตรวจสอบการเข้าอาศัยของกลุ่มเส้นใยรา

ล้างรากกล้วยไม้ลิ้นมังกรให้สะอาด ตัดรากตามขวางด้วยมีดโกน ย้อมและไม่ย้อมสีชิ้นส่วนรากด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue ตรวจสอบการเข้าอาศัยของกลุ่มเส้นใยราที่ขดตัวกันเป็นก้อน เรียกพีโลตอน (peloton) ในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ของราก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การคัดแยกราออร์คิดไมคอร์ไรซา

เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้ที่แข็งแรงสมบูรณ์ในระยะเจริญเติบโตทางลำต้นและระยะออกดอกระยะละ 20 ราก ให้คลอบคลุมบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิ้ว นำรากใส่ถุงพลาสติกซิบ แช่ในกระติกน้ำแข็ง และรีบนำกลับเข้าห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี โดยเร็ว ล้างทำความสะอาดรากกล้วยไม้ให้สะอาด ตัดรากแต่ละชิ้นให้มีความยาว 1 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ตัดรากตามยาวด้วยมีดโกนและเขี่ยพีโลตอน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ดูดพีโลตอนที่แยกได้ลงในจานเพาะเลี้ยง ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 6 ครั้ง โดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นดูดพีโลตอนในน้ำสุดท้าย หยดลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ 1/6 Nutrient Dextrose Yeast Extract Agar (1/6NDY) ที่เติมสารปฏิชีวนะ Streptomycin และ Tetracyclin 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เอียงจานเพาะเลี้ยงไปมาเพื่อให้พีโลตอนกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืด เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตการเจริญของเส้นใยราไมคอร์ไรซาที่ได้จะมีลักษณะของ *Rhizoctonia*-like fungi โดยมีลักษณะเด่น คือ เส้นใยมีการแตกแขนงเป็นมุมฉากใกล้ผนังกั้น (Septum) และการรอยคอดบริเวณที่เส้นใยแตกแขนง รวมทั้งการรวมกันของเซลล์ที่คล้ายรูปกระบองหรือลูกปัด เรียกว่า เซลล์โมนิลอยด์ (Moniloid cells) เจาะเส้นใยที่กำลังเจริญ ย้ายลงอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อให้ได้ราไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์ (Pure culture) ย้ายไปเลี้ยงใน water agar ที่อุณหภูมิห้องสำหรับรักษาและนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3. การจำแนกราไมคอร์ไรซา

ระบุชนิดราไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีของ Athipunyakom et al. (2004 : 84) และ Khamchatra (2015 : 15) และระบุชนิดราที่แยกได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยราไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์ตามวิธีของ Zhou et al. (1999 : 55) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ของรา ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ส่งผลิตภัณฑ์ไปวิเคราะห์ที่บริษัท ATGC ประเทศไทย วิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของราที่ตำแหน่งเดียวกันในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST เทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) ดังนี้

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเส้นใยราบนอาหารเหลวสูตร PDB บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเกี่ยวเส้นใยขนาดเท่าหัวไม้ขีด (ประมาณ 0.05 กรัม) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม lysis buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบน vertex ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาทีใช้แท่งพลาสติกสำหรับบดเส้นใย บดเส้นใยตัวอย่างให้ละเอียด แล้วเติมสารละลาย potassium acetate (pH 4.8) 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบน vertex นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใส supernatant ปริมาตร 300-350 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใส supernatant ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม isopropyl alcohol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมสารโดยการเอียงหลอดกลับไปมาอย่างเบามือเป็นระยะเวลาสั้น ๆ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใส supernatant ทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนอย่างเบามือ เติม ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาติ 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน ตากให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1X Tris-EDTA (TE) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ดีดก้นหลอดเบามือให้ดีเอ็นเอละลาย เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองถัดไป

3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้ไพเมอร์ ITS1 (5’ TCCGTAGGTGAACCTGCGG3’) และ ITS4 (5’TCCTCCGCTTATTGATATGC3’) (White et al., 1990 : 316) ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ที่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ddH20	34.5
10X PCR buffer	5
10 mM dNTP	1
10 μM ITS1	1
10 μM ITS4	1
5X Band Helper™	5
Taq Polymerase	0.5
DNA sample	2
รวม	50

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติด้วยสภาวะ ดังนี้

Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
Annealing	57 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
Holding	12 องศาเซลเซียส		

3.3 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ทำการแยกขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอผ่านรูพรุนในแผ่นเจลภายใต้สนามไฟฟ้า (Electrophoresis) บนเจลอะกาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า ที่เติมสีย้อม Red Safe ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อเจลอะกาโรส 20 มิลลิลิตร ปิเปตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอลงในช่องบนแผ่นเจลอะกาโรส ต่อขั้วกระแสไฟฟ้าเข้ากับอุปกรณ์แยกขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเจลอะกาโรสไปเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานที่ความยาวลำดับเบสต่าง ๆ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator) บันทึกภาพรูปเจล

3.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ที่ผ่านการตรวจสอบให้ผลแถบของดีเอ็นเอชัดเจน ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท ATGC ประเทศไทย และนำลำดับเบสของตัวอย่างมาทำการ Blast เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) ที่แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันกับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุจากเส้นใยราไมคอร์ไรซา

ย้ายราไมคอร์ไรซาที่แยกจากรากกล้วยไม้ลิ้นมังกรระยะออกดอก 26 ไอโซเลต และระยะเจริญเติบโตทางลำต้น 47 ไอโซเลต รวม 73 ไอโซเลต ที่เก็บรักษาไว้ใน Water agar ลงเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร PDB อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เก็บเกี่ยวเฉพาะเส้นใยราออกมาใส่ในกระป๋องสแตนเลส อบที่ตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บดเส้นใยราให้ละเอียดในโกร่ง เก็บผงราไมคอร์ไรซาในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุโดยเทคนิคเอกซเรย์ฟลูออเรสเซนต์ (X ray fluorescence analysis spectrometry: XRF) รุ่น XGT-1000WR บริษัท Horiba ประเทศญี่ปุ่น ที่ความต่างศักย์ 50 กิโลโวลต์ สแกนตัวอย่างให้ครอบคลุมตัวอย่างละ 200 วินาที

การคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่สร้าง IAA

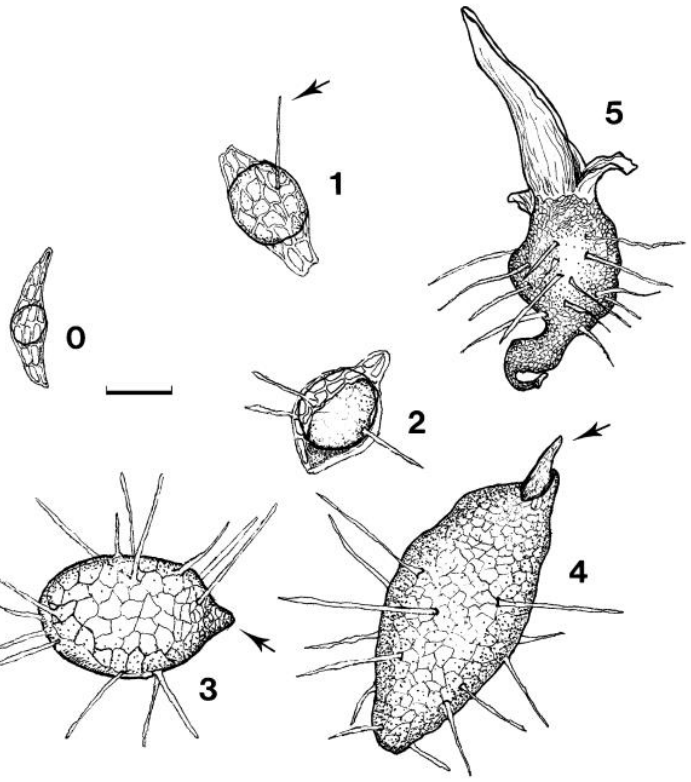
ทำการคัดเลือกราออร์คิดไมคอร์ไรซาที่มีศักยภาพในการสร้างสาร idole-3-acetic acid หรือ IAA ได้สูงสุด 3-5 อันดับแรก เพื่อนำไปใช้ร่วมกับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกร ดัดแปลงจาก Chutima and Lumyong (2012) ดังนี้

การวิเคราะห์โดยการเทียบสี (Colorimetric analysis)

ราไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ที่เติม L-tryptophan 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ วางบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดนาน 14 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตรลงในหลอดที่มี Salkowski's reagent และบ่มในสภาพมืดนาน 30 นาที สารละลายจะมีสีชมพู-แดง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลาย IAA มาตรฐาน และคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่ผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติก (Idole-3-acetic acid: IAA) ได้ ≥ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (นิยมใช้ IAA 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ (Nongdam and Tikendra, 2014 : 1) เพื่อนำไปทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรแบบสมชีพต่อไป

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกร

ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรตามวิธีของ Batty et al. (2001 : 378) ด้วยสารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง เพาะเมล็ดลงบนกระดาษกรองที่ตัดเป็นรูปสามเหลี่ยม ซึ่งวางอยู่บนผิวหน้าอาหาร Oat Meal Agar (OMA) ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เลือกเชื้อราออร์คิดไมคอร์ไรซาที่สร้าง IAA สูงสุด 3-5 อันดับแรก มา subculture จากนั้นเจาะเส้นใยราแต่ละไอโซเลท วางลงตรงกลางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จานเพาะเลี้ยงละ 1 ชิ้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดนาน 4-5 เดือน เปรียบเทียบกับการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อหรือแบบอสมชีพ แต่ละทรีทเมนต์ทำ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 4 เดือน โดยในแต่ละเดือนให้บันทึกการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ ตามวิธีของ Stewart and Zettler (2002 : 28) โดยแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ตั้งแต่ระยะ 0-5 ดังภาพ 3.1 จากนั้นย้ายโปรโตคอร์มในระยะ 3 ลงในกระบอกพลาสติกปริมาตร 650 มิลลิลิตร ที่มีทรายเททับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ OMA กระบอกพลาสติกละ 5 โปรโตคอร์ม ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 4 เดือน โดยในแต่ละเดือนให้บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดของโปรโตคอร์ม การพัฒนาเข้าสู่ระยะถัดไป จำนวนใบและความสูงต้นของต้นอ่อนกล้วยไม้



ภาพที่ 3.1 การงอกและระยะการเจริญและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้สกุล *Habenaria*
ระยะ 0 เมล็ดมีชีวิต แต่ไม่งอก
ระยะ 1 เอมบริโอบวม เริ่มสร้างไรซอยด์ (ปลายศรชี้)
ระยะ 2 เอมบริโอขยายขนาด ดันจนหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด
ระยะ 3 สร้างปลายยอดแหลม เรียก โปรโตคอร์ม (ปลายศรชี้)
ระยะ 4 ใบแรกปรากฏให้เห็น (ปลายศรชี้)
ระยะ 5 ใบแรกขยายขนาด ยืดยาว
ที่มา : (Stewart and Zettler, 2002 : 28)

การฟื้นฟูประชากรกล้วยไม้ลิ้นมังกรโดยการเพาะเมล็ด

1. การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรในถิ่นกำเนิดด้วยวิธี *In situ* seed baiting

นำเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรประมาณ 300 เมล็ด วางบนผ้าไนลอนเมช (nylon mesh) ขนาดกว้าง 5 เซนติเมตร x ยาว 10 เซนติเมตร พับทบแล้วนำไปอัดเข้ากรอบสไลด์พลาสติกขนาด 35 มิลลิเมตร ดัดแปลงวิธีของ Brundrett et al. (2003 : 1213) (ภาพที่ 3.2ก) จำนวน 30 กรอบตาข่าย นำไปสอดไว้ใต้ต้นกล้วยไม้ลิ้นมังกรที่เจริญเติบโตเต็มที่ในช่วงต้นฤดูฝน ทับกลบด้วยสแฟกนัมมอส เป็นเวลา 4 เดือน (ภาพที่ 3.2ข และ 3.2ค) ในแต่ละเดือนให้นำกรอบตาข่าย nylon mesh นั้นกลับมา ตรวจดูการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มในแต่ละระยะ ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3.1 สุ่มเลือกโปรโตคอร์มที่มีสมบูรณ์และขนาดใหญ่กรอบตาข่ายละ 3 โปรโตคอร์ม เพื่อนำมาคัดแยกและจำแนกราไมคอร์ไรซา

ภาพที่ 3.2 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรแบบในถิ่นกำเนิดด้วยวิธี *in situ* baiting
ก. เมล็ดกล้วยไม้ในกรอบตาข่าย nylon mesh
ข. การวางกรอบเมล็ดใต้รากสะสมอาหารของต้นแม่
ค. การทับกลบกรอบตาข่าย nylon mesh ด้วยสแฟกนัมมอส

2. การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรนอกถิ่นกำเนิดด้วยวิธี *Ex vitro* seed baiting

นำเศษซากใบไม้ทับถมบริเวณรอบลำต้นกล้วยไม้ลิ้นมังกรในธรรมชาติวางบนอาหารสังเคราะห์ OMA ที่เททับด้วยทราย จากนั้นนำกรอบตาข่ายที่บรรจุเมล็ดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับ *in situ* baiting method สอดใต้ซากใบไม้ทับถมนั้น (ภาพที่ 3.3) ตรวจดูการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มในแต่ละระยะ ในเดือนที่ 3 และเดือนที่ 6 สุ่มเลือกโปรโตคอร์มที่มีสมบูรณ์และขนาดใหญ่กรอบตาข่ายละ 3 โปรโตคอร์ม เพื่อนำมาคัดแยกและจำแนกราไมคอร์ไรซา

ภาพที่ 3.3 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรแบบในถิ่นกำเนิดด้วยวิธี *ex situ* baiting
ก. วางกรอบเมล็ดบนซากใบไม้ทับถมที่นำมาจากบริเวณรอบรากกล้วยไม้ต้นแม่
ข. การทับกลบด้วยซากใบไม้ทับถม
ค. ปิดช่องเจาะด้วยแผ่นพลาสเตอร์ เพื่อให้อากาศถ่ายเท

สิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Differenceที่ระดับความเชื่อมั่น 95%