การศึกษาชนิดราไมโคไรซ่ากล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์และการใช้ประโยชน์ราในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

Study on identification of Endangered Orchid Species and Using Symbiotic Germination

จงวัฒนา พุ่มหิรัญ[1/] พรพิมล อธิปัญญาคม[2/]

ชนินทร ดวงสะอาด[2/] สุภาภรณ์ สาชาติ[1/]

บทคัดย่อ

รวบรวมและจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์ โดยเก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ กะเรกะร่อนอินทนนท์ รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีฝาหอย รองเท้านารีสุขะกุล รองเท้านารีเหลืองกระบี่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีอินทนนท์ สิงโตกลอกตา และ เอื้องปากนกแก้ว ที่จังหวัดกระบี่ กาญจนบุรี เชียงราย เชียงใหม่ และอุบลราชธานี จำนวน 25 ตัวอย่าง แยกได้ราทั้งหมด 22 isolates โดยทำการแยกราจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ ซึ่งสามารถจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซาเป็นรา *Rhizoctonia* – like fungi 4 ชนิด ได้แก่ *Ceratorhiza goodyerae-repentis, Epulorhiza calendulina, Epulorhiza repens, Tulasnella* sp. ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่แยกได้ทุกชนิดมีนิวเคลียส 2 อัน และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 15 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ร่วมกับราไมคอร์ไรซย

เมื่อนำราไมคอร์ไรซาทั้งหมดมาทำการคัดเลือกการเจริญเติบโตบนอาหาร oat meal agar (OMA) พบเจริญได้ดีบน OMA 4 isolates คือ *C. goodyerae-repentis* (RZ 0067), *E. calendulina* (RZ 0050), *E. repens* (RZ 0066) และ *Tulasnella* sp. (RZ 0059) เมื่อนำทั้ง 4 isolates มาทดสอบการมีประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน พบว่า รา *E. calendulina* มีศักยภาพในการกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่งอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 58 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน ซึ่งแตกต่างกับ *E. repens* และ *Tulasnella* sp. ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ 85.3 และ 75.8 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนในเวลา 120 วัน ได้เพียง 18.5 และ 17.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่รา *C. goodyerae-repentis* และกรรมวิธีเพาะเมล็ดที่ไม่ได้ใส่ราไมคอร์ไรซา สามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 9.5 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเท่านั้น ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้และตายในที่สุด จากการทดลองนี้รา *E. calendulina* (RZ 0050) มีศักยภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการงอกและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่และได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงในการนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนทดลอง ราไมคอร์ซาทั้งหมดได้เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[1/]สถาบันวิจัยพืชสวน

[2/]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำนำ

ในปัจจุบันกล้วยไม้เมืองไทย มีจำนวนประมาณ 1,125 ชนิด สูญพันธุ์ไปแล้ว 20 ชนิด และใกล้สูญพันธุ์อีก 20 ชนิด และกล้วยไม้ชนิดใหม่ของโลกที่ค้นพบในประเทศไทยมีมากกว่า 20 ชนิด ราไมคอร์ไรซามีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันระหว่างกล้วยไม้กับรา ในด้านช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก มีอาหารสะสมในเมล็ดน้อยมากทำให้ไม่มีอาหารไปเลี้ยงในขณะที่กล้วยไม้งอก ดังนั้นเมล็ดกล้วยไม้บางชนิดจึงงอกยากหรือไม่งอกเลย แต่อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติพบว่ามีราไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ในรากกล้วยไม้แบบ เกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน และส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Rhizoctonia* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ โดยให้ธาตุอาหารและกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Clements, 1988)

ราไมคอร์ไรซาเป็นราชนิดหนึ่งที่เจริญอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ โดยที่ราสร้างเส้นใยเข้าไปในรากกล้วยไม้เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ สร้างโครงสร้างภายในเซลล์เรียกว่า peloton ราชนิดนี้ไม่ได้เข้าทำลายรากพืช แต่จะให้ธาตุอาหารแก่พืช เช่นธาตุคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญกับพืช เป็นความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันระหว่างกล้วยไม้กับราไมคอร์ไรซา เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก มีอาหารสะสมในเมล็ดน้อยมาก ทำให้เมล็ดกล้วยไม้งอกยาก แต่ในสภาพธรรมชาติพบว่ามีราไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ในรากกล้วยไม้ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ โดยให้ธาตุอาหาร และกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้า ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ราไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้ โดยการจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ดินและรากกล้วยไม้เกาะอาศัยที่เพาะเมล็ดยากและนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบเกื้อกูลซึ่งกันและกัน (symbiotic germination) ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อกลุ่มผู้เลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการค้าโดยเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ หรือการผลิตโดยใช้เนื้อเยื่อ จากการตรวจเอกสารการศึกษาราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ในประเทศไทยนั้นพบว่ามีการจำแนกราไมคอร์ไรซาในระดับ genus เท่านั้น ยังไม่มีการศึกษาการจำแนกชนิดถึงระดับ species เนื่องจากราในสกุล *Rhizoctonia* เป็นราที่ไม่สร้างสปอร์ ทำให้การจำแนกชนิดของราค่อนข้างยาก การชักนำให้ราสร้างระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจะช่วยในการจำแนกชนิดราในกลุ่มนี้ได้ดีแต่การชักนำให้ราสร้างระยะนี้ก็ค่อนข้างยากเช่นกัน ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่ควรจะทำการศึกษาโดยเฉพาะการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ราไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้ โดยการรวบรวมและจำแนกชนิดราในระดับ species เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบเกื้อกูลซึ่งกันและกัน (symbiotic germination) โดยเฉพาะเมล็ดกล้วยไม้ที่งอกยาก เมล็ดกล้วยไม้ที่กำลังสูญพันธุ์ ซึ่งจะเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ และยังเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มผู้เลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการค้าต่อไปในอนาคต

1. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างราก ได้แก่ พลั่ว กรรไกรตัดแต่งกิ่ง และภาชนะเก็บราก

2. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายคลอร็อกซ์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75% สารปฏิชีวนะ streptomycin และ tetracyclin สีย้อม : safranin – O และ KOH
สารเคมีที่ใช้ในการเก็บรักษา : paraffin oil

3. อาหารวุ้นสังเคราะห์ NDY (1/6), corn meal agar (CMA), water agar (WA), V8 juice agar และ potato dextrose agar (PDA)

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ ขวดเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ กระจกนาฬิกา เป็นต้น

5. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ยปลายแหลม ฟอร์เซ็บปลายแหลม ใบมีดผ่าตัด กระดาษกรอง (Whatman #2)

8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น

9. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

-วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

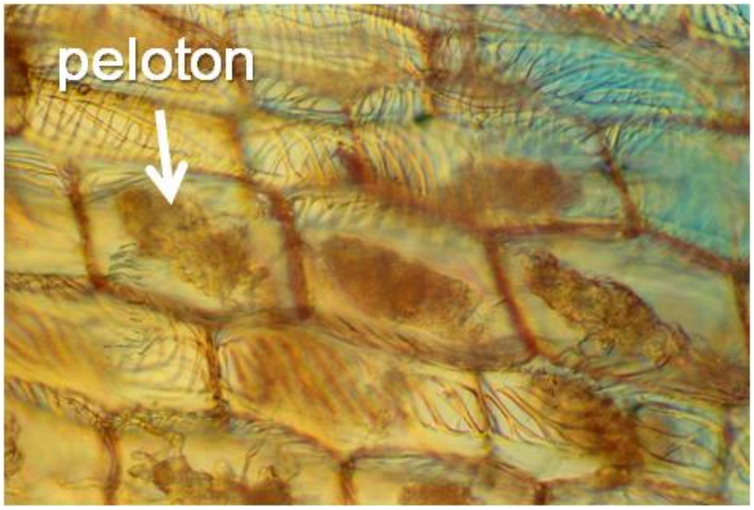
เก็บรากกล้วยไม้ดินที่ปลูกในกระถาง (ภาพที่ 1) และปลูกในดินจากแหล่งต่าง ๆ ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ โดยตัดรากห่อกระดาษ ใส่ถุงพลาสติค และบันทึกรายละเอียดชนิดกล้วยไม้ แหล่งที่เก็บ และวันที่เก็บ เก็บบรรจุรากกล้วยไม้ห่อตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ภาพที่ 1: รากกล้วยไม้ในกระถางที่เก็บมาแยกราไมคอร์ไรซา

2. การแยกราจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้

แยกราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ โดยทำความสะอาดรากกล้วยไม้ ตัดชิ้นส่วนรากเป็นท่อนยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วแช่ชิ้นส่วนรากในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และนำชิ้นส่วนรากมาตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo ในตู้ปลอดเชื้อ ใช้เข็มปลายแหลมเล็กและปากคีบปลายแหลมที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยราที่เจริญอยู่รวมกันในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ (ภาพที่ 2) มาวางบนอาหารวุ้นสังเคราะห์สูตร NDY (1/6) ผสมสารปฏิชีวนะ steptomycin และ tetracycline บ่มไว้ที่

อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 3-10 วัน เมื่อราเจริญขึ้นมา ใช้เข็มปลายแหลมตัดปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บรักษาสายพันธุ์ราไมคอร์ไรซาไว้ในอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2: แสดงภาพตัดขวางรากกล้วยไม้ที่เก็บมาแยกราไมคอร์ไรซา โดยแยกจากเส้นใยราที่เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ (ลูกศรชี้)

3. การจำแนกราไมคอร์ไรซา

นำราไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ เพื่อการจัดจำแนกชนิดของรา

3.1 ลักษณะของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ด sclerotium

3.2 ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ light microscope โดยการ mount สไลด์ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อหรือ Shear's solution ศึกษาลักษณะและวัดขนาดของเส้นใย ลักษณะเส้นใยตั้งฉาก ลักษณะรูปร่างและขนาดของ monilioid cell ของราที่เจริญบนอาหาร และ การสร้าง sclerotiumถ่ายภาพราจากกล้องจุลทรรศน์แบบ compound เปรียบเทียบลักษณะของราดังกล่าวกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดรา (Moore, 1987; Sneh *et al.,* 1991; Roberts, 1999)

3.3 ศึกษาจำนวนนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์โดยการย้อมสีด้วย Safranin O (Bandoni, 1979) เลี้ยงรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากพืชต่าง ๆ บนอาหาร PDA, ½ PDA และ V8 agar นาน 1-2 วัน การทำสไลด์โดยหยดสี safranin-o ลงบนสไลด์ 1 หยด และหยด 3% KOH ลงบน safranin O 1 หยด แล้วเขี่ยปลายเส้นใยของราวางในหยดสีบนสไลด์ และปิดด้วย cover slip และนำไปตรวจดูจำนวนนิวเคลียส ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกจำนวนนิวเคลียสที่พบในแต่ละสายพันธุ์ และถ่ายภาพราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4 การชักนำให้ราสร้างระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศ โดยเลี้ยงราบนอาหาร OPDMA (potato extract 15 g, marmite yeast extract 40 g, dextrose 7.5 g, agar 20 g, distilled water 1,000 ml, pH 5.3), ODMA (marmite 25 g, dextrose 12.5 g, distilled water 1,000 ml, pH 5.2) และใน V8 juice agar (10% V8 juice, CaCO3 2g, agar 18 g, water 900 ml) เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และย้ายเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร tap water agar (agar 15 g, tap water 1,000 ml) บ่มเชื้อไว้ในสภาพที่มีแสง

4. คัดเลือกราไมคอร์ไรซา

4.1 นำราไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากรากกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเลี้ยงรา บนอาหาร PDA สำเร็จรูป ให้เชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นาน 5-7 วัน

4.2 และนำมาคัดเลือกโดยเลี้ยงบนอาหาร OMA โดยเทอาหาร OMA ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้เย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของรา นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแต่ละชนิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

Ceratorhiza goodyerae-repentis, Epulorhiza calendulina, Epulorhiza repens, Tulasnella sp.

5. ทดสอบศักยภาพของราไมคอร์ไรซาที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 กรรมวิธี 5 ซ้ำ คือ

กรรมวิธีที่ 1 เพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ใส่รา *Epulorhiza calendulina* (RZ 0050) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 2 เพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ใส่รา *Epulorhiza repens* (RZ 0066) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 3 เพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ใส่รา *Tulasnella* sp. (RZ 0059) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 4 เพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ใส่รา *Ceratorhiza goodyerae-repentis* (RZ 0067) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 6 เพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ โดยไม่ใส่ราไมคอร์ไรซา เลี้ยงบนอาหาร OMA

5.1 การเตรียมฝักกล้วยไม้

ผสมเกสรตัวผู้และตัวเมียของดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ เมื่อผสมพันธุ์กันแล้วก็จะเจริญเป็นฝัก และนำฝักกล้วยไม้มาใช้ในการเพาะเมล็ดเมื่อฝักเริ่มแก่ ข้อควรระวังอย่าให้ฝักแตกเพราะจะทำให้เกิดการปนเปื้อน

5.2 เตรียมราไมคอร์ไรซา

เลี้ยงราไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกมาได้จากข้อ 4 โดยคัดเลือกมาจำนวน 5 isolates ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร OMA จนกระทั่งเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.3 เตรียมอาหาร OMA ใส่ลงในขวดขนาด 5x10 เซนติเมตร และเตรียมกระดาษกรอง Whatman No. 1 ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 1x4 เซนติเมตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5.4 เพาะเมล็ดแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน (Symbiotic Germination)

ทำการเพาะเมล็ดรองเท้านารีเหลืองกระบี่ ในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธีของ Athipunyakom (2004) โดยการนำฝักกล้วยไม้ที่เก็บมาจากต้น เลือกฝักที่สมบูรณ์และไม่มีรอยแตก ล้างฝักให้สะอาดด้วยสบู่เหลว และฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้สำลีจุ่มแอลกอฮอล์ 70% ทาให้ทั่วฝัก แล้วใช้ปากคีบคีบฝักกล้วยไม้จุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปลนเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ ให้เปลวไฟลุกทั่วฝักเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว

ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วกรีดฝักกล้วยไม้ตามแนวยาว ผ่าครึ่งเป็น 2 ซีก ใช้ปากคีบคีบเมล็ดกล้วยไม้ใส่ลงในขวดน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปรับปริมาณของเมล็ดด้วย Haemacytometer ให้มีปริมาณเมล็ดกล้วยไม้จำนวน 100 เมล็ด/มิลลิลิตร และหยด Tween20 ลงไป

ใช้ปากคีบคีบกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 1x4 เซนติเมตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.3 มาวางลงบนอาหาร OMA ที่อยู่ในขวดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำเมล็ดกล้วยไม้ในขวดที่อยู่ในน้ำมาเขย่าให้สม่ำเสมอและใช้ไปเปตที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายที่มีเมล็ดกล้วยไม้มาจำนวน 1 มิลลิลิตร (มีเมล็ดกล้วยไม้ 100

เมล็ด) ใส่ลงบนกระดาษกรองที่วางบนอาหาร OMA แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของราไมคอร์ไรซาที่เตรียมไว้ในข้อ 5.2 นำมาวางบนอาหาร OMA ห่างจากกระดาษกรอง 1.5 เซนติเมตร เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ จนกระทั่งเมล็ดกล้วยไม้เริ่มงอกจึงนำออกมาวางภายใต้แสง

บันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้เป็นต้นอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo ในช่วงระยะ 21, 60 และ 120 วันหลังจากทำการเพาะเมล็ด

วิธีการประเมินผลโดยใช้วิธีของ Athipunyakom (2004)

0	=	เมล็ดที่สมบูรณ์ ยังไม่งอก (no germination)
1	=	embryo ขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตก (seed coat ruptured by enlarged embryo)
2	=	embryo มีลักษณะเป็นก้อนกลมปลายแหลมมีรากขนอ่อนเจริญออกมา (presence of rhizoids)
3	=	ผลิใบยอดปลายแหลม 1 ใบ (presence of leaf primordium)
4	=	สร้างใบจริง (appearance of the first true leaf)
5	=	ต้นอ่อนมีใบยอด (elongation of initial leaf)
6	=	สร้างระบบราก (elongation of root)

- เวลาและสถานที่

เวลา **เริ่มต้น – สิ้นสุด**

ตุลาคม 2552 – กันยายน 2555

สถานที่ แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

รวบรวมและจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์ โดยเก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ กะเรกะร่อนอินทนนท์ รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีฝาหอย รองเท้านารีสุขะกุล รองเท้านารีเหลืองกระบี่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีอินทนนท์ สิงโตกลอกตา และ เอื้องปากนกแก้ว ที่จังหวัดกระบี่ กาญจนบุรี เชียงราย เชียงใหม่ และอุบลราชธานี จำนวน 25 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

2. การแยกราจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้

ผลจากการแยกราจากรากกล้วยไม้ 9 ชนิด โดยแยกราจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ ได้ราทั้งหมด 22 isolates (ตารางที่ 2) ดังนี้

กะเรกะร่อน จากจังหวัดเชียงใหม่ และอุบลราชธานี แยกได้รา 4 isolates โคโลนีบนอาหาร PDA สีขาว เจริญใต้อาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือวุ้นอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน (concentric zonation)

รองเท้านารีขาวสตูล จากจังหวัดเชียงใหม่ แยกได้รา 1 isolates โคโลนีบนอาหาร PDA สีขาว ใต้อาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือวุ้นอาหาร

รองเท้านารีฝาหอย จากจังหวัดกระบี่ แยกได้รา 2 isolates โคโลนีบนอาหาร PDA สีขาว เจริญใต้อาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือวุ้นอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน (concentric zonation)

รองเท้านารีสุขะกุล จากจังหวัดเชียงราย แยกได้รา 1 isolates โคโลนีบนอาหาร PDA สีขาว เจริญใต้อาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือและใต้วุ้นอาหาร

รองเท้านารีเหลืองกระบี่ จากจังหวัดกระบี่ แยกได้รา 9 isolates โคโลนีบนอาหาร PDA สีขาว ใต้อาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือวุ้นอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน และโคโลนีบนอาหาร PDA สีน้ำตาล เจริญเหนือวุ้นอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน

รองเท้านารีเหลืองปราจีน จากจังหวัดกาญจนบุรี แยกได้รา 2 isolates โคโลนีบนอาหาร PDA สีขาว ใต้อาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือวุ้นอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน และไม่มีวงเรียงซ้อนกัน

รองเท้านารีอินทนนท์ จากจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย แยกได้รา 3 isolates โคโลนีบนอาหาร PDA สีขาว ใต้อาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือวุ้นอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน และไม่มีวงเรียงซ้อนกัน

สิงโตกลอกตา จากจังหวัดเชียงใหม่ แยกราไมคอร์ไรซาไม่ได้ เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิด

เอื้องปากนกแก้ว จากจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย แยกราไมคอร์ไรซาไม่ได้ เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิด

3. การจำแนกราไมคอร์ไรซา

จากการจำแนกราไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างรากกล้วยไม้ ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ แยกเชื้อได้ 30 สายพันธุ์ จำแนกชนิดของราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ลักษณะของโคโลนี ลักษณะและขนาดของเส้นใย ลักษณะ รูปร่าง และขนาดของ monilioid cell ของราที่เจริญบนอาหาร การสร้าง sclerotium และจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ จากการศึกษาได้รา *Rhizoctonia* – like fungi จำนวน 22 isolates จำแนกชนิดได้รา *Ceratorhiza goodyerae-repentis, Epulorhiza calendulina, Epulorhiza repens, Tulasnella* sp. รายละเอียดของรามีดังนี้

Ceratorhiza goodyerae - repentis Costantin & Dufour) Moore, Mycotaxon 29: 94. 1987

ชื่อพ้อง: *Rhizoctonia goodyerae - repentis* **Costantin & Dufour**)

สายพันธุ์: RZ 0056, RZO 0067

Class Agonomycetes, Order Agonomycetales

Teleomorph: *Ceratobasidium cornigerum* (Bourd.) Rogers

พืชอาศัย: รากของกล้วยไม้รองเท้านารี

ราเจริญเข้าไปในรากพืชและสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า pelotons ในชั้นคอร์เท็กซ์

โคโลนี เจริญอย่างเร็วบนอาหาร PDA และโคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร เมื่ออายุ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โคโลนีมีสีขาว ถึง ครีม เมื่ออ่อนและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมส้มเมื่อแก่ เกิด concentric zonation บนอาหาร เส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหารไม่มีสีและเปลี่ยนเป็นสีแทน หลังอายุ 14 วัน มักพบเส้นใยหรือ moniliod cells รวมตัวกันเป็นกลุ่ม ต่อมาพัฒนาเป็น sclerotium เจริญอยู่ใต้วุ้นอาหารเรียกว่า microsclerotium

เส้นใยกว้าง 4.0 – 5.3 ไมครอน มีผนังกั้นเซลล์ เส้นใยตั้งฉาก monilioid cells รูปร่างคล้ายถังเบียร์ ถึงรูปรี ขนาด 15.4–(20.6)–26.4 x 6.9–(10.6)–11.3 ไมครอน นิวเคลียสมี 2 นิวเคลียส ต่อ 1 เซลล์ (binucleate)

การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถชักนำราให้สร้างสปอร์ระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศได้ รา *Ceratobasidium corginerum* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศของราชนิดนี้

R. goodyerae – repentis เป็นราไมคอร์ไรซาที่พบในกล้วยไม้ดินหลายชนิด (Alexander and Hadley, 1985; Currah *et al*., 1990; Zelmer and Currah, 1997) และยังพบในกล้วยไม้เกาะอาศัยด้วย Richardson *et al.* (1993) รายงานแยกได้ราชนิดนี้จากกล้วยไม้เกาะอาศัย *Campylocentrum micranthum* ในประเทศคอสตาริก้า

Warcup and Talbot (1971) ศึกษาการชักนำรา *R. goodyerae – repentis* ให้สร้างระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศ โดยแยกราจากรากกล้วยไม้เกาะอาศัย 2 ชนิด ได้แก่ *Pomatocalpa macphersonii* และ *Robiquetia wassellii* จากรัฐควีนแลนส์ตอนเหนือ ประเทศออสเตรเลีย จำแนกชนิดได้รา *R. goodyerae-repentis* และสามารถชักนำราให้สร้างระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ คือ รา *C. corginerum*

Epulorhiza calendulina Zelmer & Currah, Can.J.Bot. 73: 1995

สายพันธุ์: RZ 0064, RZ 0065, RZ 0057, RZ 0054, RZ 0063, RZ 0049, RZ 0050, RZ 0052, RZ 0053, RZ 0068, RZ 0055, RZ 0060, RZ 0062

Class Agonomycetes, Order Agonomycetales

พืชอาศัย : รากของกะเรกะร่อนอินทนนท์ (RZ 0064, RZ 0065, RZ 0057) รองเท้านารีฝาหอย (RZ 0054) รองเท้านารีสุขะกุล (RZ 0063) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (RZ 0049, RZ 0050, RZ 0052, RZ 0053, RZ 0068, RZ 0055) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (RZ 0060) รองเท้านารีอินทนนท์ (RZ 0062)

ราสร้างเส้นใยเจริญอยู่ในชั้นคอร์แท็กซ์รากกล้วยไม้

โคโลนี บนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซ็นติเมตร เมื่ออายุ 10 วัน ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนี สีขาว ถึงขาวอมชมพู เส้นใยเจริญอยู่ใต้อาหาร และเส้นใยเจริญขึ้นมาเหนือและใต้อาหาร potato dextrose agar เส้นใยเจริญใต้อาหาร และรวมตัวกันอย่างหลวม ๆ เกิดเป็น sclerotia

เส้นใยมีขนาด 3.3-4.0 ไมครอน ไม่มีสี มีผนังกั้นเซลล์ นิวเคลียสเป็น binucleate เส้นใยตั้งฉาก แต่ส่วนใหญ่เอียงเป็นมุม 45 องศาเซลเซียส มากกว่าเส้นใยตั้งฉาก

Monilioid cells ไม่มีสี รูปร่างคล้ายกระบอง ถึงรูปร่างไม่ บางครั้ง monilioid cells รวมตัวกันเป็นกลุ่มต่อมาพัฒนาเป็น sclerotium เจริญอยู่ใต้วุ้นอาหารเรียกว่า microsclerotium

Epulorhiza repens (N. Bernard) Moore, Mycotaxon 29:95, 1987

สายพันธุ์: RZO 0058, RZO 0051, RZO 0066, RZO 0061, RZO 0069, RZO 0070

Class Agonomycetes, Order Agonomycetales

Teleomorph : *Tulasnella deliquescens* (Juel) Juel

พืชอาศัย : รากของกะเรกะร่อนอินทนนท์ (RZ 0058) รองเท้านารีฝาหอย (RZ 0051) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (RZ 0066) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (RZ 0061) รองเท้านารีอินทนนท์ (RZ 0069, RZ 0067) ;

โคโลนี บนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนีสีขาว ถึง ครีม เส้นใยเจริญอยู่ใต้อาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้องกัน บนอาหาร Corn meal agar โคโลนี สีขาวถึงครีม เส้นใยเจริญใต้อาหาร และรวมตัวกันอย่างหลวม ๆ เกิดเป็น sclerotia

เส้นใยไม่มีสี ขนาด 2.5-4.0 ไมครอน มีผนังกั้นเซลล์ นิวเคลียสเป็น binucleate เส้นใยตั้งฉาก

Monilioid cells ไม่มีสี รูปร่างกลมถึงรี ขนาด 6.5-10.8 x 7.5-14.2ไมครอน เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่สั้น ๆ แตกกิ่งก้านสั้น ๆ หรือไม่แตกกิ่งก้านเลย บางครั้ง monilioid cells รวมตัวกันเป็นกลุ่ม ต่อมาพัฒนาเป็น sclerotium เจริญอยู่ใต้วุ้นอาหารเรียกว่า microsclerotium การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถชักนำราให้สร้างสปอร์ระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศได้

รา *Tulasnella deliquescens* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศของราชนิดนี้

รา *R. repens* เป็นราที่พบแพร่หลายในรากกล้วยไม้หลายชนิด ซึ่ง Bernard (1909) เป็นบุคคลแรกที่แยกราชนิดนี้มาจากรากกล้วยไม้แคทลียา (*Laelio-Cattleya canhamiana)* ซึ่งมีลักษณะของโคโลนี ขนาดของเส้นใย และลักษณะต่าง ๆ ใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้

ต่อมา Curtis (1939) และ Burgeff (1959) ทำการศึกษาแยกราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้หลายชนิดใน Wisconsin และจำแนกชนิดเป็นรา *R. repens* มีลักษณะของเส้นใยเจริญอยู่ใต้อาหาร และมีขนาดของ monilioid cells ใกล้เคียงกับลักษณะของ Bernard บรรยายไว้

Currarh *et al* (1987) พบรา *R. repens* .ในรากของกล้วยไม้ *Platanthera obtusata* ในเมืองอัลเบอร์ต้า ประเทศแคนาดา

ในประเทศอินเดีย Senthikumar และ Krishnamurthy (1998) ได้ศึกษาลักษณะทางเซลล์วิทยาของรา *R. repens* ที่แยกได้จากรากของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ซึ่งตรงกับการศึกษาครั้งนี้ที่แยกราชนิดนี้ได้ในเอื้องดินใบหมากเช่นเดียวกัน

Epulorhiza calendulina Zelmer & Currah, Can.J.Bot. 73: 1995

สายพันธุ์: RZ 0064, RZ 0065, RZ 0057, RZ 0054, RZ 0063, RZ 0049, RZ 0050, RZ 0052, RZ 0053, RZ 0068, RZ 0055, RZ 0060, RZ 0062

Class Agonomycetes, Order Agonomycetales

พืชอาศัย : รากของกะเรกะร่อนอินทนนท์ (RZ 0064, RZ 0065, RZ 0057) รองเท้านารีฝาหอย (RZ 0054) รองเท้านารีสุขะกุล (RZ 0063) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (RZ 0049, RZ 0050, RZ 0052, RZ 0053, RZ 0068, RZ 0055) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (RZ 0060) รองเท้านารีอินทนนท์ (RZ 0062)

ราสร้างเส้นใยเจริญอยู่ในชั้นคอร์แท็กซ์รากกล้วยไม้

โคโลนี บนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซ็นติเมตร เมื่ออายุ 10 วัน ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนี สีขาว ถึงขาวอมชมพู เส้นใยเจริญอยู่ใต้อาหาร และเส้นใยเจริญขึ้นมาเหนือและใต้อาหาร potato dextrose agar เส้นใยเจริญใต้อาหาร และรวมตัวกันอย่างหลวม ๆ เกิดเป็น sclerotia

เส้นใยมีขนาด 3.3-4.0 ไมครอน ไม่มีสี มีผนังกั้นเซลล์ นิวเคลียสเป็น binucleate เส้นใยตั้งฉาก แต่ส่วนใหญ่เอียงเป็นมุม 45 องศาเซลเซียส มากกว่าเส้นใยตั้งฉาก

Monilioid cells ไม่มีสี รูปร่างคล้ายกระบอง ถึงรูปร่างไม่ บางครั้ง monilioid cells รวมตัวกันเป็นกลุ่ม ต่อมาพัฒนาเป็น sclerotium เจริญอยู่ใต้วุ้นอาหารเรียกว่า microsclerotium

***Tulasnella* sp.**

สายพันธุ์: RZ 0059

Class Agonomycetes, Order Agonomycetales

พืชอาศัย : รากของรองเท้านารีขาวสตูล (RZ 0059)

โคโลนี บนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร เมื่ออายุ 14 วัน ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนี สีขาว เส้นใยเจริญอยู่ใต้อาหาร บนอาหาร Corn meal agar โคโลนี สีขาวถึงครีม เส้นใยเจริญใต้อาหาร และรวมตัวกันอย่างหลวม ๆ เกิดเป็น sclerotia

เส้นใยไม่มีสีถึงสีน้ำตาลอ่อน ขนาด 3.0-5.0 ไมครอน มีผนังกั้นเซลล์ นิวเคลียสเป็น binucleate เส้นใยตั้งฉาก

Monilioid cells สีน้ำตาลอ่อน รูปร่างกลมถึงรี ขนาด 10.0-12.5 ไมครอน เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่สั้น ๆ แตกกิ่งก้านสั้น ๆ หรือไม่แตกกิ่งก้านเลย บางครั้ง monilioid cells รวมตัวกันเป็นกลุ่ม ต่อมาพัฒนาเป็น sclerotium เจริญอยู่ใต้วุ้นอาหารเรียกว่า microsclerotium การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถชักนำราให้สร้างสปอร์ระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศได้

4. คัดเลือกราไมคอร์ไรซา

การคัดเลือกราไมคอร์ไรซาจากจำนวน 22 isolates คัดเลือกจากราที่เจริญได้ดีบนอาหาร oat meal agar (OMA) จากการคัดเลือกครั้งนี้สามารถคัดเลือกได้ 4 isolates โดยราเจริญบนอาหาร OMA เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 5 วัน คือ *C. goodyerae-repentis* (RZ 0067), *E. calendulina* (RZ 0050), *E. repens* (RZ 0066) และ *Tulasnella* sp. (RZ 0059) จากนั้นนำราทั้ง 4 isolates นี้ไปทดสอบศักยภาพในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร OMA ซึ่งเป็นอาหารสำหรับการเจริญของราไมคอร์ไรซา ไม่ใช่อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ ในการคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่เจริญบนอาหาร OMA ภายในเวลา 3 วัน นั้น เพราะว่าราไมคอร์ไรซาที่เจริญได้เร็วนั้นจะสามารถสัมผัสเมล็ดกล้วยไม้ได้เร็วกว่าและสร้างเส้นใยเข้าไปในเมล็ดกล้วยไม้ได้อย่างเร็วก็มีผลทำให้สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้อย่างรวดเร็ว สำหรับราที่เจริญบนอาหาร OMA ได้ช้านั้น โอกาสที่ราจะสัมผัสกับเมล็ดก็ช้าไปด้วยทำให้เกิดการกระตุ้นการงอกของเมล็ดช้าลงไปด้วย ดังนั้นจึงต้องทำการคัดเลือกราไมคอไรซาเพื่อนำไปทดสอบศักยภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้

5. ทดสอบศักยภาพของราไมคอร์ไรซาที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

การทดสอบการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากร่วมกับราไมคอร์ไรซาแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน และได้คัดเลือกมา 4 isolates พบว่า ราไมคอร์ไรซาทั้ง 4 ชนิดนี้ สามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ภายใน 21 วัน ในสภาพปลอดเชื้อ (ตารางที่ 3) และจากการตรวจสอบการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าหลังจากเพาะเมล็ด 21 วัน พบว่า embryo เริ่มขยายตัว และพบเส้นใยเจริญอยู่รอบเมล็ด ซึ่งเส้นใยของรานี้มีลักษณะตั้งฉาก เป็นลักษณะของราไมคอร์ไรซาที่ปลูกเชื้อไป เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดกล้วยไม้ก่อนที่จะปลูกเชื้อลงไป ต่อมาเอ็มบิโอขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก และราสร้างกลุ่มของเส้นใย(peloton) เข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ในเมล็ด กลุ่มของเส้นใยที่ราสร้างขึ้นนี้เมื่อสลายตัวไปกลายเป็นน้ำตาล และธาตุอาหารที่เมล็ดไปใช้ในการเจริญเป็นต้นอ่อน

เมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะร่ามกับราไมคอร์ไรซาหลังจาก 21 วัน พบว่า รา *E. calendulina* มีศักยภาพในการกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่งอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 58 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน ซึ่งแตกต่างกับ *E. repens* และ *Tulasnella* sp. ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ 85.3 และ 75.8 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนในเวลา 120 วัน ได้เพียง 18.5 และ 17.0 เปอร์เซ็นต์ ในทางตรงกันข้ามกับรา *C. goodyerae-repentis* และกรรมวิธีเพาะเมล็ดที่ไม่ได้ใส่ราไมคอร์ไรซา สามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 9.5 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเท่านั้น ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้และตายในที่สุด โดยที่รา *C. goodyera-repentis* เมื่อนำไปเพาะกับเมล็ดกล้วยไม้นั้นพบว่ากล้วยไม้สามารถงอกได้ในระยะที่ embryo ขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตก (ระยะที่ 1) เพียง 8 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นและไม่สามารถพัฒนาเป็นระยะอื่น ๆ ได้ ทั้ง ๆ ที่ราชนิดนี้ก็แยกมาจากกล้วยไม้ชนิดเดียวกัน แสดงว่าชนิดของราไมคอร์ไรซามีความจำเพาะเจาะจงต่อรากกล้วยไม้

จากการทดลองนี้รา *E. calendulina* (RZ 0050) มีศักยภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการงอกและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่และได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงในการนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนทดลองหลังจากเพาะเมล็ด 120 วัน ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับราไมคอร์ไรซาอื่น ๆ ที่แยกได้ (ตารางที่ 4) สำหรับการเมล็ดกล้วยไม้ที่ไม่ได้ใส่ไมคอร์ไรซานั้นเมล็ดสามารถงอกได้ในระยะที่ embryo ขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตก แต่ไม่สามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ เพราะฉะนั้นการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซานั้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งของการขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่

ราไมคอร์ซาทั้งหมดได้เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

รวบรวมและจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์ โดยเก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ กะเรกะร่อนอินทนนท์ รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีฝาหอย รองเท้านารีสุขะกุล รองเท้านารีเหลืองกระบี่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีอินทนนท์ สิงโตกลอกตา และ เอื้องปากนกแก้ว ที่จังหวัดกระบี่ กาญจนบุรี เชียงราย เชียงใหม่ และอุบลราชธานี จำนวน 25 แยกได้ราทั้งหมด 22 isolates จำแนกชนิดราไมคอร์ไรซาเป็นรา *Rhizoctonia* – like fungi 4 ชนิด ได้แก่ *Ceratorhiza goodyerae-repentis, Epulorhiza calendulina, Epulorhiza repens, Tulasnella* sp. ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่แยกได้ทุกชนิดมีนิวเคลียส 2 อัน นำราไมคอร์ไรซาทั้งหมดมาทำการคัดเลือกการเจริญเติบโตบนอาหาร oat meal agar (OMA) พบเจริญได้ดีบน OMA 4 isolates คือ *C. goodyerae-repentis* (RZ 0067), *E. calendulina* (RZ 0050), *E. repens* (RZ 0066) และ *Tulasnella* sp. (RZ 0059) เมื่อนำทั้ง 4 isolates มาทดสอบการมีประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน พบว่า รา *E. calendulina* มีศักยภาพในการกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่งอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 58 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน ซึ่งแตกต่างกับ *E. repens* และ *Tulasnella* sp. ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ 85.3 และ 75.8 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนในเวลา 120 วัน ได้เพียง 18.5 และ 17.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่รา *C. goodyerae-repentis* และกรรมวิธีเพาะเมล็ดที่ไม่ได้ใส่ราไมคอร์ไรซา สามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 9.5 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเท่านั้น ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้และตายในที่สุด จากการทดลองนี้รา *E. calendulina* (RZ 0050) มีศักยภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการงอกและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่และได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงในการนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนทดลอง ราไมคอร์ซาทั้งหมดได้เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

4. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. กรมวิชาการเกษตรมีราไมคอร์กล้วยไม้สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยและมีศักยภาพในการช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากสามารถนำไปต่อยอดเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

2. ผู้ประกอบการด้านการผลิตกล้วยไม้และเกษตรกรสามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้อย่างง่าย ไม่ยุ่งยาก และประหยัดค่าใช้จ่าย

3. นำเทคนิคการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซาไปใช้ในงานอนุรักษ์ โดยเฉพาะกล้วยไม้ที่ขยายพันธุ์ยาก และกล้วยไม้ชนิดใกล้สูญพันธุ์

5. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -ขอขอบคุณ ดร. นาตยา ดำอำไพ นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ฝักกล้วยไม้รองเท้านารีเพื่อใช้ในการทดลอง

6. เอกสารอ้างอิง

นันทนา คำเมือง เลขา มาโนช จิตราพรรณ พิลึก และพรพิมล อธิปัญญาคม. 2543. การแยกเชื้อและจัดจำแนกชนิดไมคอร์ไรซากล้วยไม้, (หน้า 428-435) *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาพืช และส่งเสริมนิเทศศาสตร์เกษตร, 1-4 กุมภาพันธ์ 2543, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Alexander, C. and G. Hadley. 1985. Carbon movement between host and endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. New Phytol. 101 : 657-656.

Athipunyakom, P. L. Manoch and M. Tanticharoen. 2001. Diversity of orchid mycorrhiza in Thailand, (pp. 41.) *In* Program and Extended Abstract of the First International Orchid Conservation Congress. September 24-28, 2001, Perth, Australia.

Athipunyakom, P., L. Manoch and M. Tanticharoen. 2002a. Mycohhizal fungi of seven *Paphiopedilum* species in Thailand, (pp. 141.) *In* The 7th International Mycological Congress. August 11-17, 2002 Olso , Norway.

Athipunyakom, P, L. Manoch and C. Piluek. 2002b. Mycorrhizal fungi from Terrestrial ordhids and symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume, (pp. 110.) *In* The 1st International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases. November 5-8, Chiang Mai, Thailand.

Bandoni, R.J. 1979. Safranin as a rapid nuclear strain for fungi. Mycologia 71: 873-847.

Bernard, N. 1909. L’evolution dans la symbiose des orchide’es et leur champignons commensaux. Ann. Sci. Nat. Paris 9. Se’r. 9 : 1-196.

Burgeff, H. 1959. Mycorrhiza of orchids, (pp. 361-395) *In* C.L. Withner, eds. The Orchids : A Scientific Survey. The Ronald Press Company, New York.

Clements, M.A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. Lindleyana 3 : 73-86.

Currah, R.S., L.Sigler and S. Hambleton. 1987. New records and new taxa of fungi from mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. Can. J. Bot. 65 : 2473-2482.

Currah, R.S., A Smreciu and S.Hambleton. 1990. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). Can. J. Bot. 68 : 1171-1181.

Curtis, J.T. 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. Am. J. Bot. 26 : 390.

Hadley, G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. New Phytol. 69 ; 1015

Hadley, G. 1982. Orchid mycorrhiza, (pp. 81-118) *In* J. Arditti, ed. Orchid Biology : Reviews and Prespective, II. Cornell University Press, Ithaca, New York.

Harley, J.L. and S.E. Smith. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. London. Academic Press. 483 pp.

Manoch, L., P. Athipunyakom and M. Tanticharoen. 2000. *Rhizoctonia* – like fungi associated terrestrial orchid in Thailand, (pp. 63) *In* The 3rd International Symposium on *Rhizoctonia* (ISR 2000), National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan (ROC), 17-20 August.

Moore, R.T. 1985. The challenge of the dolipore/ parenthesome septum. (P. 175-212) *In* Developmental Biology of Higher Fungi. Cambridge Universi Press, Cambridge.

Moore, R. T. 1987. The genera of *Rhizoctonia* – like fungi : *Ascorhizoctonia*, C*eratorhiza* gen. Nov., *Epulorhiza* gen. Nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*. Mycotaxon 29 : 91-99.

Moore, R. T. 1996. The dolipore/parenthesome septum modern taxonomy, (pp. 13-35.) *In* Sneh, B, Suha Jabji-Hare, Stephen Neate and Gerda Dijst (eds). *Rhizoctonia* Speciec ; Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Narmatha, L.S., T.K. Tan and C.S. Loh. 2000. Symbiotic abilities of mycorrhizae isolated from terrestrially grown and epiphytic orchids, (pp. 56) *In* The 3rd International Symposium on *Rhizoctonia* (ISR 2000), national Chung Hsing University, Taichung, Taiwan (ROC), 17-20 August 2000.

Richardson, K.A., R.S. Currah and S. Hampleton. 1993. Basidiomycetous endophytes from roots of Neotropical epiphytic Orchidaceae. Lindleyana 8: 127-137.

Roberts, P. 1999. *Rhizoctonia* – forming fungi : A tanonomic guide. Whistable Litho Printers Ltd., Whistable, Kent. 239

Senthikimar, S. and K.V. Krishnamurthy. 1998a. A cytochemical atudy on the mycorrhizae of *Spathoglottis plicata*. Biologia Plantarum 41(1) : 111-119.

Sneh, B.,L. Burpee and A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. APS Press. 133 pp.

Warcup, J.H. and P.H.B. Talbot. 1971. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids II. New Phytol. 70 : 35-40.

Zelmer, C.D., and R.S. Currah. 1997. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occuring endophyte. Lindleyana 12 (3) : 142-148.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1: สำรวจและเก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยระหว่างเดือนกันยายน 2549 – เดือนตุลาคม 2552

ลำดับ	ชื่อกล้วยไม้	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งเก็บ
1	กะเรกะร่อนอินทนนท์	*Cymbidium tracyanum* O' Brien	3 1	เชียงใหม่ อุบลราชธานี
2	รองเท้านารีขาวสตูล	*Paphiopedilum niveum*	2	เชียงใหม่
3	รองเท้านารีฝาหอย	*Paphiopedilum bellatulum*	1	กระบี่
4	รองเท้านารีสุขะกุล	*Paphiopedilum sukhakulii* Schoser & Senghas	1	เชียงราย
5	รองเท้านารีเหลืองกระบี่	*Paphiopedilum exul*	5	กระบี่
6	รองเท้านารีเหลืองปราจีน	*Paphiopedilum concolor*	3	กาญจนบุรี
7	รองเท้านารีอินทนนท์	*Paphiopedilum villosum*	4 3	เชียงใหม่ เชียงราย
8	สิงโตกลอกตา	*Bulbophyllum r blepharistes* Rchb. f.	1	เชียงใหม่
9	เอื้องปากนกแก้ว	*Dendrobium cruentum* Rchb. f.	1	เชียงราย

ตารางที่ 2 : ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ จากแหล่งต่าง ๆของประเทศไทย ระหว่างเดือนกันยายน 2552 – เดือนตุลาคม 2554

ชื่อกล้วยไม้	แหล่งเก็บ	สายพันธุ์	ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้
กะเรกะร่อนอินทนนท์	อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	RZ 0058	*Epulorhiza repens*
		RZ 0064	*Epulorhiza calendulina*
		RZ 0065	*Epulorhiza calendulina*
	อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี	RZ 0057	*Epulorhiza calendulina*
รองเท้านารีขาวสตูล	อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	RZ 0059	*Tulasnella* sp.
รองเท้านารีฝาหอย	อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่	RZ 0051	*Epulorhiza repens*
	อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่	RZ 0054	*Epulorhiza calendulina*
รองเท้านารีสุขะกุล	อำเภอดอยตุง จังหวัดเชียงราย	RZ 0063	*Epulorhiza calendulina*
รองเท้านารีเหลืองกระบี่	อำเภอเหนือคลอง จังหวัดกระบี่	RZ 0049	*Epulorhiza calendulina*
		RZ 0050	*Epulorhiza calendulina*
		RZ 0056	*Ceratorhiza goodyerae-repentis*
	อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่	RZ 0052	*Epulorhiza calendulina*
		RZ 0066	*Epulorhiza repens*
	อำเภอเขาพนม จังหวัดกระบี่	RZ 0053	*Epulorhiza calendulina*
		RZ 0067	*Ceratorhiza goodyerae-repentis*
		RZ 0068	*Epulorhiza calendulina*
	อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่	RZ 0055	*Epulorhiza calendulina*
รองเท้านารีเหลืองปราจีน	อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี	RZ 0060	*Epulorhiza calendulina*
	อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	RZ 0061	*Epulorhiza repens*
รองเท้านารีอินทนนท์	อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	RZ 0069	*Epulorhiza repens*
		RZ 0070	*Epulorhiza repens*
	อำเภอดอยตุง จังหวัดเชียงราย	RZ 0062	*Epulorhiza calendulina*
สิงโตกลอกตา	อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	-	ปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น
เอื้องปากนกแก้ว	อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	-	ปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น
	อำเภอดอยตุง จังหวัดเชียงราย	-	

ตารางที่ 3: เปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาการเจริญของต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่หลังจากเพาะเมล็ดร่วมกับราไมคอร์ไรซา 21, 60, 120 วัน

ราไมคอร์ไรซา	**การพัฒนาของกล้วยไม้ระยะต่าง ๆ หลังทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซา**												
	21 วัน			**60 วัน**					**120 วัน**				
	0	**1**	**2**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Epulorhiza calendulina (RZ 0050)	2.8	21.0	87.0	0	0.1	25.0	42.5	9.0	0	8	8	29.0	58.0
Epulorhiza repens (RZ 0066)	2.5	4.8	78.0	0.7	21.9	12.0	25.0	1.0	0	13.0	17.0	23.0	18.5
Tulasnella sp. (RZ 0059)	2.5	5.5	67.8		3.9	17	13	34	0	0	18.7	21.0	17.0
Ceratorhiza goodyerae-repentis (ROZ 0067)	1.5	9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 4 ระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนของเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่เพาะร่วมกับราไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆเปรียบเทียบกับการเพาะเมล็ดกล้วยมีไม่ใส่ราไมคอร์ไรซา (control)

ชนิดของราไมคอร์ไรซา	**การพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อน ระยะที่ 6 (%)**
Epulorhiza calendulina (RZ 0050)	58.0a[1/]
Epulorhiza repens (RZ 0066)	18.5b
Tulasnella sp. (RZ 0059)	17.0b
Ceratorhiza goodyerae-repentis (ROZ 0067)	0d
ไม่ใส่ราไมคอร์ไรซา (control)	0d

[1/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมภ์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT