การจำแนกและคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่มีผลต่อการงอกของกล้วยไม้

Identification and Screening of Mycorrhizal Fungi for Seed Germination of Orchid

พรพิมล อธิปัญญาคม[1] ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช[2]
[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

ราไมคอร์ไรซาเป็นราที่เจริญอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เพื่อให้ทราบชนิดของราไมคอร์ไรซาที่อยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย จึงได้รวบรวม แยก และจำแนกราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ 8 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีฝาหอย รองเท้านารีเหลืองกระบี่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน เอื้องช้าง ว่านน้ำทอง อั้วพวงมณี เอื้องข้าวเหนียวลิง และ เอื้องดินใบหมาก จากจังหวัดเชียงใหม่ อุบลราชธานี กาญจนบุรี กระบี่ และกรุงเทพ ฯ ระหว่างเดือนตุลาคม 2549 – เดือนกันยายน 2551 โดยทำการแยกราจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ ผลการดำเนินงานได้ราทั้งหมด 40 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถจำแนกชนิดราเป็นราสกุล *Rhizoctonia* 3 ชนิด เป็น Binucleate *Rhizoctonia* ได้แก่ *Rhizoctonia globularis, R. goodyerae-repentis* และ *R. repens* เมื่อนำราไมคอร์ไรซาทั้งหมดมาทำการคัดเลือกการเจริญเติบโตบนอาหาร oat meal agar (OMA) พบเจริญได้ดีบน OMA 5 isolates คือ *R. globularis* (RZO 0009), *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และ *R. repens* (RZO 0010, 0021, 0022) เมื่อนำทั้ง 5 isolates มาทดสอบการมีประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน พบว่า รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพในการกระตุ้นให้เมล็ดเอื้องดินใบหมากงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 45 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน ซึ่งแตกต่างกับ *R. repens* (RZO 0021, 0022) และ *R. globularis* (RZO 0009) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ 98.8, 98.2 และ 96.0 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน แต่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนในเวลา 120 วัน ได้เพียง 23.2, 22.0 และ 17.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่รา *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และกรรมวิธีเพาะเมล็ด

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-24-51

ที่ไม่ได้ใส่ราไมคอร์ไรซา สามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 20 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เท่านั้น ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้และตายในที่สุด จากการทดลองนี้รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการงอกและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องดิน ใบหมากและได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงในการนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนทดลอง ราไมคอร์ซาทั้งหมดได้เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำนำ

ราสกุล *Rhizoctonia* เป็นราไมคอร์ไรซาชนิดหนึ่งที่เจริญอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้โดยมีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน (symbiosis) โดยราสร้างเส้นใยเข้าไปในรากกล้วยไม้ เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ สร้างโครงสร้างภายในเซลล์เรียกว่า peloton ราชนิดนี้ไม่ได้เข้าทำลายรากพืช แต่จะให้ธาตุอาหารแก่พืช เช่นธาตุคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญกับพืชและช่วยส่งเสริมให้เมล็ดกล้วยไม้งอก (Hadley, 1982; Harley and Smith, 1983) ในทางตรงกันข้ามราสกุลนี้เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิดได้แก่ โรคใบติดของทุเรียนสาเหตุเกิดจาก *Rhizoctonia solani* โรคกาบใบแห้งของข้าว สาเหตุเกิดจาก *R. solani* เป็นต้น (Sneh *et al*., 1991) แต่สำหรับความสัมพันธ์กับพืชตระกูลกล้วยไม้แล้ว ราชนิดนี้มีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันระหว่างกล้วยไม้กับรา ในด้านช้วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก มีอาหารสะสมในเมล็ดน้อยมากทำให้ไม่มีอาหารไปเลี้ยงในขณะที่กล้วยไม้งอก ดังนั้นเมล็ดกล้วยไม้บางชนิดจึงงอกยากหรือไม่งอกเลย แต่อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติพบว่ามีราไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ในรากกล้วยไม้แบบ เกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน และส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Rhizoctonia* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ โดยให้ธาตุอาหารและกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Clements, 1988)

งานวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ของราไมคอร์ไรซากับรากกล้วยไม้เริ่มมีการศึกษาตั้งแต่ปี 1899 โดย Bernard เป็นบุคคลแรกที่ศึกษาไมคอร์ไรซากล้วยไม้ พบความสัมพันธ์ที่เฉพาะเจาะจงของรากับกล้วยไม้โดยราช่วยกระตุ้นการเจริญและการงอกของเมล็ด Bernard ได้ดำเนินการทดลองโดยแยกราจากรากกล้วยไม้ *Cattleya* และพบว่ารานี้ช่วยกระตุ้นการเจริญของกล้วยไม้ *Cattleya* แต่เมื่อนำราชนิดนั้นมาเลี้ยงร่วมกับกล้วยไม้ *Phalaenopsis* และ *Odontoglossum* ปรากฏว่าราไม่ได้ช่วยกระตุ้นการเจริญของต้นกล้าทั้งสองชนิดนี้แต่ทำให้กล้วยไม้ดังกล่าวตาย จากการทดลอง Bernardสรุปว่าราไมคอร์ไรซาที่เจริญร่วมกับรากกล้วยไม้ มีความเฉพาะเจาะจงต่อกล้วยไม้แต่ละ

ชนิด(Bernard, 1909) ต่อมา Hadley (1970) ศึกษาการเพาะเมล็ดแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน ระหว่างรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ต่าง ๆ รวม 32 สายพันธ์ พบว่าราเหล่านั้นไม่มีความเฉพาะเจาะจงต่อกล้วยไม้ จากนั้นก็มีการศึกษาถึงความเฉพาะเจาะจงของราและรากกล้วยไม้กันมาก และพอสรุปว่ากล้วยไม้บางชนิดก็มีความเฉพาะเจาะจงกับราบางชนิดเช่นกัน

ในต่างประเทศได้มีการศึกษาราไมคอร์ไรซากล้วยไม้กันมาก ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย สหราชอาณาจักร เดนมาร์ก แคนาดา สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ไต้หวัน สิงคโปร์ อินเดีย และประเทศไทย โดยเฉพาะในประเทศออสเตรเลีย ที่ Kings Park Botanic Garden ได้ผลิตไมคอร์ไรซากับเมล็ดกล้วยไม้ขายเป็นการค้า เน้นทางด้านการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้

ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ไม่มากนัก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้ดิน ที่มีรายงานได้แก่ นันทนาและคณะ (2543) Manoch และคณะ (2000) Athipunyakom และคณะ (200; 2002a; 2002b) เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่ควรจะทำการศึกษาโดยเฉพาะการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ราไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้ โดยการรวบรวมและจำแนกชนิดราในระดับ species เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบเกื้อกูลซึ่งกันและกัน (symbiotic germination) โดยเฉพาะเมล็ดกล้วยไม้ที่งอกยาก เมล็ดกล้วยไม้ที่กำลังสูญพันธุ์ ซึ่งจะเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ และยังเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มผู้เลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการค้าต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างราก ได้แก่ พลั่ว กรรไกรตัดแต่งกิ่ง และภาชนะเก็บราก
2. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายคลอร็อกซ์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%
3. อาหารวุ้นสังเคราะห์
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ในการแยกเชื้อ
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

เก็บรากกล้วยไม้ดินที่ปลูกในกระถาง และปลูกในดิน จากแหล่งต่าง ๆ ในภาคเหนือ ภาค

กลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ โดยตัดรากห่อกระดาษ ใส่ถุงพลาสติค และบันทึกรายละเอียดชนิดกล้วยไม้ แหล่งที่เก็บ และวันที่เก็บ เก็บบรรจุรากกล้วยไม้ห่อตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกราจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้

แยกราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ โดยทำความสะอาดรากกล้วยไม้ แช่ชิ้นส่วนรากในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และนำชิ้นส่วนรากมาตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo ในตู้ปลอดเชื้อ แยกเส้นใยราที่เจริญอยู่รวมกันในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ มาวางบนอาหารวุ้นสังเคราะห์สูตร NDY (1/6) ผสมสารปฏิชีวนะ steptomycin และ tetracycline บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 3-10 วัน ใช้เข็มปลายแหลมตัดปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

3. การจำแนกราไมคอร์ไรซา

3.1 ลักษณะของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ด sclerotium

3.2 ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ light microscope โดยศึกษาลักษณะและวัดขนาดของเส้นใย 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)

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

บันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยของราบนอาหารแต่ละชนิดเมื่อเส้นใยของราบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. ทดสอบศักยภาพของราไมคอร์ไรซาที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 กรรมวิธี 5 ซ้ำ คือ

กรรมวิธีที่ 1 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R. repens* (ROZ 0010) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 2 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R. repens* (ROZ 0021) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 3 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R. repens* (ROZ 0022) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 4 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R.a globularis* (ROZ 0021) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 5 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R. goodyerae-repentis* (ROZ 0036) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 6 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากโดยไม่ใส่ราไมคอร์ไรซา เลี้ยงบนอาหาร OMA

5.1 เตรียมฝักกล้วยไม้

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)

ทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธีของ Athipunyakom (2004) และใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วกรีดฝักกล้วยไม้ตามแนวยาว ผ่าครึ่งเป็น 2 ซีก ใช้ปากคีบคีบเมล็ดกล้วยไม้ใส่ลงในขวดน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปรับปริมาณของเมล็ดด้วย Haemacytometer ให้มีปริมาณเมล็ดกล้วยไม้จำนวน 100 เมล็ด/มิลลิลิตร

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

เริ่มต้น – สิ้นสุด ตุลาคม 2548 – กันยายน 2552

สถานที่ - แหล่งพืชธรรมชาติ

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

จากสำรวจและเก็บรวบรวมกล้วยไม้จากจังหวัดเชียงใหม่ อุบลราชธานี กาญจนบุรี กระบี่ และกรุงเทพ ฯ ระหว่างเดือนตุลาคม 2548 – เดือนกันยายน 2551 จากกล้วยไม้ 8 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีฝาหอย (*Paphiopedilum bellatulum*) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*P. exul*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*P. concolor*) เอื้องช้าง (*Cymbidium tracyanum*) ว่านน้ำทอง *(Ludisia discolor*) อั้วพวงมณี (*Calanthe rubens*) เอื้องข้าวเหนียวลิง (*C. rosea*) และ เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata*)

2. การจำแนกราไมคอร์ไรซา

จากการจำแนกราไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างรากกล้วยไม้ ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ แยกเชื้อได้ 30 สายพันธุ์ จำแนกชนิดของราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ลักษณะของโคโลนี ลักษณะและขนาดของเส้นใย ลักษณะ รูปร่าง และขนาดของ monilioid cell ของราที่เจริญบนอาหาร การสร้าง sclerotium และจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ จากการศึกษาได้รา *Rhizoctonia* จำนวน 30 สายพันธุ์ จำแนกชนิดได้รา *Rhizoctonia globularis, R. goodyerae-repentis* และ *R. repens* (ตารางที่ 1)

รายละเอียดของรามีดังนี้

Rhizoctonia globularis H.K. Saksena & Vaartaja, Can.J.Bot. 38: 939, 1960

พืชอาศัย : เอื้องดินใบหมาก

โคโลนี บนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนี สีขาว ถึงขาวอมชมพู เส้นใยเจริญอยู่ใต้อาหาร และเส้นใยเจริญขึ้นมาเหนืออาหารบริเวณตรงกลางโคโลนีเกิดเป็นวงเรียงซ้องกัน บนอาหาร potato dextrose agar เส้นใยเจริญใต้อาหาร และรวมตัวกันอย่างหลวม ๆ เกิดเป็น sclerotia

เส้นใยมีขนาด 2.5-3.5 ไมครอน ไม่มีสี มีผนังกั้นเซลล์ นิวเคลียสเป็น binucleate เส้นใยตั้งฉาก แต่ส่วนใหญ่เอียงเป็นมุม 45 องศาเซลเซียส มากกว่าเส้นใยตั้งฉาก

Monilioid cells ไม่มีสี รูปร่างกลมถึงค่อนข้างกลม ขนาด 8.0- x 10.5 ไมครอน แตกกิ่งก้านสั้น ๆ หรือไม่แตกกิ่งก้านเลย เรียงต่อกันประมาณ 3-8 เซลล์ บางครั้ง monilioid cells รวมตัวกันเป็นกลุ่ม ต่อมาพัฒนาเป็น sclerotium เจริญอยู่ใต้วุ้นอาหารเรียกว่า microsclerotium

การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถชักนำราให้สร้างสปอร์ระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศได้ ซึ่งการชักนำให้ราสร้างสปอร์ระยะนี้ยากมาก ส่วนใหญ่มักพบในสภาพธรรมชาติ รา *Endoperplexa enodulosa* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศของราชนิดนี้

ราชนิดนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับรา *R. repens* ที่บรรยายลักษณะของราโดย Curtis (1939) และ Burgeff (1959) ซึ่งลักษณะของโคโลนีของรา *R. globularis* ที่มีเส้นใยเจริญขึ้นมาเหนืออาหารบริเวณตรงกลางโคโลนีเกิดเป็นวงเรียงซ้องกันชัดเจนกว่า *R. repens* และมีขนาดของ monilioid cells ที่เล็กกว่า ทำให้สามารถแยกชนิดได้อย่างชัดเจน (Saksena and Vaartaja, 1960)

Rhizoctonia repens N. Bernard, Ann. Sci. Nat, IX (9) ; 31 (1909)

พืชอาศัย : เอื้องข้าวเหนียวลิง เอื้องช้าง รองเท้านารีฝาหอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกระบี่ อั้วพวงมณี เอื้องดินใบหมาก

โคโลนี บนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนี สีขาว 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 รวมตัวกันเป็นกลุ่มต่อมาพัฒนาเป็น 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

Rhizoctonia goodyerae - repentis Costantin & Dufour, Mycotaxon 29: 94. 1987

พืชอาศัย: ว่านน้ำทอง (*Lusidia discolor)* เอื้องดินใบหมาก

โคโลนี เจริญอย่างเร็วบนอาหาร PDA และโคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร 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*

4. คัดเลือกราไมคอร์ไรซา

การคัดเลือกราไมคอร์ไรซาจากจำนวน 25 isolates คัดเลือกจากราที่เจริญได้ดีบนอาหาร oat meal agar (OMA) จากการคัดเลือกครั้งนี้สามารถคัดเลือกได้ 5 isolates โดยราเจริญบนอาหาร OMA เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 3 วัน คือ *Rhizoctonia globularis* (RZO 0009), *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และ *R. repens* (RZO 0010, 0021, 0022) จากนั้นนำราทั้ง 5 isolates นี้ไปทดสอบศักยภาพในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร OMA ซึ่งเป็นอาหารสำหรับการเจริญของราไมคอร์ไรซา ไม่ใช่อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ ในการคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่เจริญบนอาหาร OMA ภายในเวลา 3 วัน นั้น เพราะว่าราไม-คอร์ไรซาที่เจริญได้เร็วนั้นจะสามารถสัมผัสเมล็ดกล้วยไม้ได้เร็วกว่าและสร้างเส้นใยเข้าไปในเมล็ดกล้วยไม้ได้อย่างเร็วก็มีผลทำให้สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้อย่างรวดเร็ว สำหรับราที่เจริญบนอาหาร OMA ได้ช้านั้นโอกาสที่ราจะสัมผัสกับเมล็ดก็ช้าไปด้วยทำให้เกิดการกระตุ้นการงอกของเมล็ดช้าลงไปด้วย ดังนั้นจึงต้องทำการคัดเลือกราไมคอไรซาเพื่อนำไปทดสอบศักยภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้

5. ทดสอบศักยภาพของราไมคอร์ไรซาที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

การทดสอบการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากร่วมกับราไมคอร์ไรซาแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน และได้คัดเลือกมา 5 isolates พบว่า ราไมคอร์ไรซาทั้ง 5 ชนิดนี้ สามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ภายใน 21 วัน ในสภาพปลอดเชื้อ (ตารางที่ 2) และจากการตรวจสอบการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าหลังจากเพาะเมล็ด 21 วัน พบว่า embryo เริ่มขยายตัว และพบเส้นใยเจริญอยู่รอบเมล็ด ซึ่งเส้นใยของรานี้มี

ลักษณะตั้งฉาก เป็นลักษณะของราไมคอร์ไรซาที่ปลูกเชื้อไป เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดกล้วยไม้ก่อนที่จะปลูกเชื้อลงไป ต่อมาเอ็มบิโอขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก และราสร้างกลุ่มของเส้นใย(peloton) เข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ในเมล็ด กลุ่มของเส้นใยที่ราสร้างขึ้นนี้เมื่อสลายตัวไปกลายเป็นน้ำตาล และธาตุอาหารที่เมล็ดไปใช้ในการเจริญเป็นต้นอ่อน

เมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะร่วมกับราไมคอร์ไรซาหลังจาก 21 วัน พบว่า รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสามารถกระตุ้นให้เมล็ดเอื้องดินใบหมากงอกได้สูงสุดคือ 100% ในระยะเวลา 21 วันหลังจากเพาะ (ตารางที่ 2) ซึ่งเช่นเดียวกับ *R. repens* (RZO 0021, 0022) และ *R. globularis* (RZO 0009) ก็สามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ถึง 98.8, 98.2 และ 96.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 21 วัน ในขณะที่รา *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และกรรมวิธีการเพาะเมล็ดที่ไม่ใส่ราไมคอร์ไรซาสามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 20 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น จากการทดลองนี้รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสูงที่สุดในการกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากงอกได้สูงสุดภายในเวลา 21 วัน ในทางตรงกันข้ามกับรา *R. goodyera-repentis* เมื่อนำไปเพาะกับเมล็ดกล้วยไม้นั้นพบว่ากล้วยไม้สามารถงอกได้ในระยะที่ embryo ขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตก (ระยะที่ 1) เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นและไม่สามารถพัฒนาเป็นระยะอื่น ๆ ได้ ทั้ง ๆ ที่ราชนิดนี้ก็แยกมาจากกล้วยไม้ชนิดเดียวกัน แสดงว่าชนิดของราไมคอร์ไรซามีความจำเพาะเจาะจงต่อรากกล้วยไม้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Narmatha *et al.* (2000) ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากและ *Dendrobium* โดยใช้ราไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากเอื้องดินใบหมากพบว่าราไมคอร์ไรซาสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดเอื้องดินใบหมากถึง 98 เปอร์เซ็นต์ . ในขณะที่ราไมคอร์ไรซาชนิดนี้สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Dendrobium* ได้เพียง 36 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

หลังจากเพาะเมล็ด 120 วัน พบว่า รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสามารถส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 45 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน ซึ่งเช่นเดียวกับ *R. repens* (RZO 0021, 0022) และ *R. globularis* (RZO 0009) สามารถช่วยในการพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้ในเวลา 120 วัน ได้เพียง 23.2, 22.0 และ 17.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่รา *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และกรรมวิธีการเพาะเมล็ดที่ไม่ใส่ราไมคอร์ไรซาสามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 20 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น และไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ จากการทดลองนี้คัดเลือกได้รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการงอกและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก และได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงในการนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนทดลอง ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับราไมคอร์ไรซาอื่น ๆ ที่แยกได้ (ตารางที่ 3) สำหรับการเมล็ดกล้วยไม้ที่ไม่ได้ใส่ไมคอร์ไรซานั้นเมล็ดสามารถงอกได้ในระยะที่ embryo ขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตก แต่ไม่สามารถ

เจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ เพราะฉะนั้นการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซานั้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งของการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก

ราไมคอร์ซาทั้งหมดได้เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการรวบรวมและจำแนกราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ปกติ จำนวน 8 ชนิด ระหว่างเดือนตุลาคม 2549 – เดือนกันยายน 2551 และทำการแยกราไมคอร์ไรซาจากเส้นใยของราที่เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ ได้ราทั้งหมด 30 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถจำแนกชนิดราเป็นราสกุล *Rhizoctonia* 3 ชนิด เป็น Binucleate *Rhizoctonia* ได้แก่ *Rhizoctonia globularis, R. goodyerae-repentis* และ *R. repens* และนำราไมคอร์ไรซาทั้งหมดมาทำการคัดเลือกการเจริญเติบโตบนอาหาร oat meal agar (OMA) พบราไมคอร์ไรซาจำนวน 5 isolates คือ *R. globularis* (RZO 0009), *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และ *R. repens* (RZO 0010, 0021, 0022) ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร OMA มาทดสอบศักยภาพที่มีประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน พบว่า รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสามารถกระตุ้นให้เมล็ดเอื้องดินใบหมากงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 45 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน และได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงในการนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนทดลอง ราไมคอร์ซาทั้งหมดได้เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ภายใต้อุณหภูมิที่ 15 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

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 taxonomic guide. Whistable Litho Printers Ltd., Whistable, Kent. 239

4BSenthikimar, 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 : ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ จากแหล่งต่าง ๆของประเทศไทยระหว่างเดือนกันยายน 2548 – เดือนตุลาคม 2551

ชื่อกล้วยไม้	แหล่งเก็บ	สายพันธุ์	ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้
รองเท้านารีเหลืองกระบี่	อ. เหนือคลอง จ. กระบี่ อ. เมือง จ.กระบี่ อ. เขาพนม จ. กระบี่ อ. อ่าวลึก จ. กระบี่	RZO 0012 RZO 0013 RZO 0029 RZO 0030	*Rhizoctonia repens*
รองเท้านารีเหลืองปราจีน	อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี อ. เมือง จ. กาญจนบุรี	RZO 0018 RZO 0019 RZO 0020	*Rhizoctonia repens*
รองเท้านารีฝาหอย	อ. เมือง จ.กระบี่ อ. เขาพนม จ. กระบี่ อ. อ่าวลึก จ. กระบี่ อ. เหนือคลอง จ. กระบี่	RZO 0014 RZO 0015 RZO 0025 RZO 0026	*Rhizoctonia repens*
ว่านน้ำทอง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จ. เชียงใหม่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่	RZO 0028 RZO 0017 RZO 0008	*Rhizoctonia goodyerae-repens*
เอื้องดินใบหมาก	อ.มูเซอ จ.ตาก	RZO 0053	*Rhizoctonia goodyerae-repens*
อั้วพวงมณี	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ	RZO 0027	*Rhizoctonia repens*
เอื้องช้าง	อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จ. เชียงใหม่ อุบลราชธานี	RZO 0005 RZO 0006 RZO 0007 RZO 0016	*Rhizoctonia repens*

เอื้องข้าวเหนียวลิง	อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จ. เชียงใหม่ อ. พร้าว จ. เชียงใหม่	RZO 0001 RZO 0002 RZO 0003 RZO 0004	*Rhizoctonia repens*
เอื้องดินใบหมาก	เขตบางซื่อ กรุงเทพ ฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ วงศ์สว่าง กรุงเทพ ฯ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ เอ. พร้าว จ. เชียงใหม่	RZO 0021 RZO 0037 RZO 0039 RZO 0040 RZO 0041 RZO 0022 RZO 0042 RZO 0043 RZO 0023 RZO 0010 RZO 0044 RZO 0048 RZO 0011 RZO 0024	*Rhizoctonia repens*
เอื้องดินใบหมาก	สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จ. เชียงใหม่	RZO 0009 RZO 0038	*Rhizoctonia globularis*

ตารางที่ 2: เปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาการเจริญของต้นอ่อนของเอื้องดินใบหมากหลังจากเพาะเมล็ดร่วมกับราไมคอร์ไรซา 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
Rhizoctonia repens (ROZ 0010)	0	8.0	92.0	2.4	5.1	30.0	47.5	14.0	0	13.0	13.0	34.0	45.0
Rhizoctonia repens (ROZ 0021)	1.2	9.8	89.0	5.7	26.9	20.5	30.2	6.0	0	18	22	28	23.2
Rhizoctonia repens (ROZ 0022)	1.8	26.0	72.2	8.8	22.8	18	39	5	0	30	23.6	26	22
Rhizoctonia globolaris (ROZ 0009)	4.0	26.0	70.0	11.0	43.0	29.0	11.0	2.2	14.0	16.0	25.4	25.0	17.6
Rhizoctonia goodyerae-repentis (ROZ 0036)	80.0	20.0	0	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	85.0	15.0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1385

ตารางที่ 3 ระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata*) ที่เพาะร่วมกับราไมคอร์ไรซา (*Rhizoctonia* spp.) ชนิดต่าง ๆเปรียบเทียบกับการเพาะเมล็ดกล้วยมีไม่ใส่ราไมคอร์ไรซา (control)

ชนิดของราไมคอร์ไรซา	**การพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อน ระยะที่ 6 (%)**
R. repens (ROZ 0010)	45.0a[1/]
R. repens (ROZ 0021)	23.2b
R. repens (ROZ 0022)	22.0b
R. globularis (ROZ 0009)	12.0c
R. goodyerae-repentis (ROZ 0036)	0d
ไม่ใส่ราไมคอร์ไรซา (control)	0d

[1/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT