ความหลากหลาย ความจำเพาะของราไมคอร์ไรซาต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Doritis pulcherrima* Lindl.

นายสมเจตน์ เอกมหาสวัสดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4872489023

# MYCORRHIZAL FUNGI OF *Doritis pulcherrima* Lindl.: DIVERSITY, SPECIFICITY AND EFFECTS ON SEED GERMINATION

Mr. Somjate Ekmahasawasdi

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

512060

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ความหลากหลาย ความจำเพาะของราไมคอร์ไรซาต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Doritis pulcherrima* Lindl. |
| โดย | นายสมเจตน์ เอกมหาสวัสดิ์ |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมเจตน์ เอกมหาสวัสดิ์ : ความหลากหลาย ความจำเพาะของราไมคอร์ไรซาต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Doritis pulcherrima* Lindl. MYCORRHIZAL FUNGI OF *Doritis pulcherrima* Lindl.: DIVERSITY, SPECIFICITY AND EFFECTS ON SEED GERMINATION อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ.ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว, 80 หน้า.

ไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้คือภาวะอยู่ร่วมกันระหว่างราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้ โดยรามีบทบาทต่อการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศเขตร้อนที่มีความหลากหลายของกล้วยไม้ ในปัจจุบันกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองไทยใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากภาวะคุกคามของการขยายเขตเมือง และการเก็บกล้วยไม้เพื่อจำหน่าย งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาความหลากหลายของราไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์กับกล้วยไม้ *Doritis pulcherrima* Lindl. และยังทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับไมคอร์ไรซา โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจากจังหวัดชัยภูมิ ชุมพร กาญจนบุรี กระบี่ พังงา และเลย ทำการแยกราจากพีโลตอนภายในเซลล์คอร์เทกซ์ของรากกล้วยไม้บนอาหาร Nutrient Dextrose Yeast Extract เจือจาง 6 เท่า ได้ 43 ไอโซเลต ระบุเอกลักษณ์ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล แบ่งราที่ได้ 2 กลุ่ม คือราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ที่มีรายงานว่าเป็นราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ได้แก่สกุล *Epulorhiza* และ *Ceratorhiza* และราอื่นๆได้แก่สกุล *Alternaria Amanita Fomes Eutypella* และ *Schizophyllum* สร้างแผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ตำแหน่ง internal transcribed spacer ของราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* 30 ไอโซเลต แผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการชี้ว่า ราแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ *Ceratobasidium* (ซึ่งเป็นระยะสมบูรณ์เพศของรา *Ceratorhiza*) และ *Epulorhiza* มีความสัมพันธ์กับ *D. pulcherrima* ในประเทศไทย โดยพบราสกุล *Epulorhiza* อย่างน้อย 4 ชนิด การทดสอบการงอกของเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลองของ *D. pulcherrima* กับราที่เป็นตัวแทนที่แยกได้ ได้แก่ Kr01 Cu02 Cy01 Cy03 Lo01 และ Pb02 แสดงให้เห็นว่าทุกไอโซเลตส่งเสริมการงอกในระยะที่ 1 ถึง 50% ของเมล็ดที่ยังมีชีวิต ขณะที่ชุดควบคุม (บนอาหาร Oat Meal Agar) มีอัตราการงอกที่ระยะเดียวกันเพียง 5.17% ภายใน 1 เดือน และพบราเพียงไอโซเลตเดียว คือ Kr01 ที่ส่งเสริมการงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มถึงระยะที่ 5 (24.9%) ภายใน 4 เดือน และเมล็ดที่เพาะบนอาหาร Vacin และ Went สามารถงอกและโปรโตคอร์มพัฒนาจนถึงระยะที่ 4 ภายในระยะเวลา 2 เดือน

สาขาวิชา....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.2551..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##4872489023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : ORCHID MYCORRHIZA / SYMBIOTIC SEED GERMINATION / ITS REGION

SOMJATE EKMAHASAWASDI: MYCORRHIZAL FUNGI OF *Doritis pulcherrima* Lindl.: DIVERSITY,SPECIFICITY AND EFFECTS ON SEED GERMINATION. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D., 80 pp.

Orchid mycorrhiza are symbiotic association between fungi and plants. The role of fungi is to provide nutrients for seed germination and protocorm development of orchids. Thailand is one of the countries in tropic region which has the greatest diversity of orchid mycorrhiza. Presently, Thai native orchids are threatened with extinction due to disturbance of urban sprawl and commercial collection. This research aims to study diversity of mycorrhizal fungi associated with orchid, *Doritis pulcherrima* Lindl. Symbiotic-seed germination of this orchid was also tested. *D. pulcherrima* orchids were surveyed and collected from various parts of Thailand such as Chaiyaphum, Chumphon, Krabi, Loei, Pangnga and Phetchabu. Forty-three fungal isolates were isolated from single pelotons within cortex cells of roots on 1/6 Nutrient Dextrose Yeast Extract medium. Fungal identification based on morphological and molecular characteristics revealed that most of isolates were *Rhizoctonia*-like fungi. They were previously reported as orchid mycorrhiza namely genera *Ceratorhiza* and *Epulorhiza*. The other fungi were genera *Alternaria*, *Amanita*, *Fomes Eutypella* and *Schizophyum*. Phylogenetic relationships based on the internal transcribed spacer sequences of 30 *Rhizoctonia*-like fungal isolates were analyzed. Phylogenetic tree suggested that two fungal genera, *Ceratobasidium* (perfect stage of *Ceratorhiza*) and *Epulorhiza* associated with Thai *D. pulcherrima*. There were at least four *Epulorhiza* species. Test of *in vitro* symbiotic seed germination of *D. pulcherrima* with representatives of fungal isolates such as isolate Kr01, Cu02, Cy01, Cy03, Lo01 and Pb02 demonstrated that all isolates supported seed germination at stage 1 with 50% of viable seeds while control treatment (seed sowing in Oat Meal medium) had the percentage of seed germination at the same stage only 5.17% within 1 month. Only fungal isolate Kr01 promoted germination and protocorm development to stage 5 (24.95%) within 4 months. The seeds sowing in Vacin and Went medium also exhibited germination and protocorm development to stage 4 within 2 months.

Field of Study:....Biotechnology..... Student's Signature.....

Academic Year:..2008..... Advisor's Signature.....

Co-Advisor's Signature.....

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ อันทรงคุณค่า ตลอดจนไมตรีจิตที่มีให้ลูกศิษย์ การสอนที่ไม่ใช่แค่บอก และให้ทำตอบ แต่ให้อิสระในความคิด ให้ลงมือทำและเรียนรู้จากสิ่งที่ทำ ไม่ใช่ทุกครั้งที่ประสบความสำเร็จ แต่ทุกความล้มเหลวคือประสบการณ์อันมีค่ายิ่ง ที่สอนให้ผู้เขียนคิด และแก้ไขปัญหาต่างๆ จนเป็นวิทยานิพนธ์ที่ท่านเปิดอ่านอยู่ในขณะนี้

รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความกรุณาแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ความเอาใจใส่ดูแลเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จัดสรรงบประมาณแผ่นดินอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2551 ให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต เป็นค่าใช้จ่ายบางส่วนของงานวิจัย

ครู อาจารย์ทุกท่านในชีวิตของผู้เขียน ร่วมถึงผู้เขียนตำรา เอกสาร บทความต่างๆ ที่ผู้เขียนได้ศึกษาค้นคว้า และนำมาอ้างอิงในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

เจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

คุณทาธฤษ กุณาศล ความสนใจกล้วยไม้การเรียนรู้ที่ไม่จำกัดเพียงในห้องเรียน และความเอื้อเฟื้อในโลกอินเตอร์เนต แปลเปลี่ยนเป็นตัวอย่างกล้วยไม้จากจังหวัดชุมพรที่ใช้ในงานวิจัย

สมาชิกห้องปฏิบัติการ 401 และ 408 ภาควิชาจุลชีววิทยา สมาชิกห้องปฏิบัติการ 212 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ขอบคุณสำหรับมิตรภาพ ข้อเสนอแนะ และความช่วยเหลือที่จริงใจต่อกัน

ฐิตรัตน์ เลิศเชาวยุทธ ความปรารถนาดีและความช่วยเหลือที่มีคุณค่ายิ่งขอบคุณมากครับเพื่อน คำทั่วไปแต่มีความหมายยิ่งของผู้เขียน แม้ผู้เขียนไม่กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ขอให้รับรู้ว่าทุกความช่วยเหลือและกำลังใจ คือมิตรภาพที่เรามีให้กันและกัน ผู้เขียนซาบซึ้งเสมอเมื่อระลึกถึง

บิดา มารดา คุณลุง คุณป้า สำหรับความรักและสายสัมพันธ์อันดีในครอบครัว ที่เป็นพลังผลักดัน และพร้อมสนับสนุนผู้เขียนในทุกด้านเสมอมา เป็นกำลังใจที่สำคัญและมีคุณค่ายิ่งในชีวิตของผู้เขียน

ประโยชน์และความดีงามอันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้เขียนขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้เขียนซาบซึ้ง และปลาบปลื้มใจ ในความกรุณาอันดียิ่งจากทุกท่าน และขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์..... 3

2.1 กล้วยไม้..... 3

2.2 การจำแนกกล้วยไม้..... 3

2.3 ไมคอร์ไรซา..... 5

2.4 ไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้..... 6

2.5 พีโลตอน ..... 7

2.6 เซลล์พืชให้อาศัยกับการสร้างพีโลตอน..... 10

2.7 กลไกการเข้าสู่รากกล้วยไม้ของราไมคอร์ไรซา..... 11

2.8 บทบาทของราไมคอร์ไรซาที่มีต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ 12

2.9 สรีรวิทยาของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้..... 14

2.10 ความจำเพาะของราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้..... 15

2.11 การระบุชนิดของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้..... 16

2.12 การสืบพันธุ์ของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้..... 17

2.13 งานวิจัยไมคอร์ไรซากล้วยไม้ในประเทศไทย..... 18

บทที่ 3 อุปกรณ์สารเคมีและวิธีการทดลอง..... 22

3.1 อุปกรณ์เครื่องมือ..... 22

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 24

3.2.1 การสำรวจ และเก็บตัวอย่างกล้วยไม้..... 24

3.2.2 การแยกราจากรากกล้วยไม้ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์..... 24

3.3 การระบุเอกลักษณ์ของราในรากกล้วยไม้..... 25

หน้า

3.3.1 การระบุเอกลักษณ์ของราในกล้วยไม้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา..... 25
3.3.2 การระบุเอกลักษณ์ของราในรากกล้วยไม้ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล..... 25
3.3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ..... 26
3.3.2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS..... 26
3.3.2.3 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ..... 27
3.3.2.4 การหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS..... 27
3.3.2.5 การสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ..... 27
3.4 การทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัย..... 28
3.4.1 การประเมินการงอกของเมล็ด และการเจริญกล้ากล้วยไม้..... 28
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 30
4.1 การแยกราจากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima*..... 30
4.2 การระบุเอกลักษณ์ของรา..... 35
4.2.1 การระบุเอกลักษณ์ของราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา..... 35
4.2.2 การระบุเอกลักษณ์ของราด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล..... 39
4.3 การทดสอบการงอกของเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลอง..... 44
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง..... 49
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 56

รายการอ้างอิง..... 57
ภาคผนวก..... 66
ภาคผนวก ก..... 67
ภาคผนวก ข..... 69
ภาคผนวก ค..... 71
ภาคผนวก ง..... 72
ภาคผนวก จ..... 73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | การจำแนกวงศ์ย่อยของกล้วยไม้ | 5 |
| 2 | สกุลของราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ในระยะที่สืบพันธุ์อาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ | 16 |
| 3 | สาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส | 26 |
| 4 | ระยะการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherrima* | 29 |
| 5 | ลักษณะเส้นใยและความสามารถในการเจริญของราที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima* | 33 |
| 6 | การระบุเอกลักษณ์ของราจากแหล่งต่างๆ โดยอาศัยลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS | 41 |
| 7 | การเปรียบเทียบลักษณะการงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ระยะต่างๆ ในการเพาะเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยและในสภาพปลอดเชื้อ | 47 |
| 8 | ราที่แยกได้จากกล้วยไม้ให้อาศัยชนิดต่างๆ | 51 |



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | เส้นใยราขดตัวกันหนาแน่นภายในเซลล์ และเส้นใยราที่เชื่อมต่อกันระหว่างพีโลตอน | 6 |
| 2 | กล้วยไม้ *D. pulcherrima* ที่พบตามธรรมชาติจากจังหวัดชุมพร | 24 |
| 3 | ก. ภาพตัดขวางรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima* พบพีโลตอนอยู่ภายในเซลล์ | 25 |
| | ข. เส้นใยราที่เจริญจากพีโลตอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร NDY เจือจาง 6 เท่า | 25 |
| 4 | โคโลนีราที่แยกจากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน | 30 |
| 5 | เส้นใยราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ที่มีเส้นใยตั้งฉาก | 35 |
| 6 | เส้นใยภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด | 36 |
| 7 | เส้นใยราที่มีลักษณะคล้ายราในกลุ่ม *Rhizoctonia* เมื่อย้อมนิวเคลียสด้วยสีเรืองแสง DAPI | 37 |
| 8 | เส้นใยราขดตัวบนอาหารเพาะเลี้ยง PDA คล้ายพีโลตอนภายในเซลล์ และลักษณะเซลล์โมนิลอยด์รูปทรงกระบอก | 38 |
| 9 | กลุ่มเซลล์โมนิลอยด์ และ เส้นใยราที่สร้างเซลล์โมนิลอยด์รูปทรงค่อนข้างกลม | 39 |
| 10 | ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยแบบจำลอง neighbor-joining | 43 |
| 11 | เมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherrima* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Oat Meal Agar บ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน | 44 |
| 12 | การงอกและการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ระยะต่างๆ บนอาหาร OMA ร่วมกับ ราไอโซเลต Kr01 | 45 |
| 13 | การงอกและการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ระยะต่างๆ บนอาหาร vw ร่วมกับ ราไอโซเลต Kr01 | 46 |
| 14 | เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. pulcherrima* เจริญร่วมกับรา *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลต Kr01 เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Oat meal agar ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน | 48 |

# บทที่ 1

# บทนำ

กล้วยไม้เป็นวงศ์พืชที่มีความหลากหลายมากที่สุดในบรรดาพรรณพืชทั่วโลก และเป็นพืชวงศ์ใหญ่ที่สุดในประเทศไทย มีความหลากหลายทั้งถิ่นที่อยู่และพันธุกรรม มีโครงสร้างดอกที่เป็นเอกลักษณ์ สีสันสวยงาม เป็นพืชที่มีความสำคัญเชิงเศรษฐกิจของประเทศไทย ขณะที่การใช้ประโยชน์จากกล้วยไม้ตามธรรมชาติอยู่ในทิศทางที่ไม่เหมาะสม ทำให้ปริมาณและจำนวนชนิดลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง หลายชนิดเริ่มเปลี่ยนสถานภาพจากกล้วยไม้ที่พบเห็นได้ทั่วไปเป็นกล้วยไม้หายาก จนกลายเป็นกล้วยไม้ที่ใกล้สูญพันธ์ และอาจสูญพันธุ์ในที่สุด การศึกษาไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้เป็นส่วนหนึ่งที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ในระบบนิเวศระหว่างรากับพืชในวงศ์กล้วยไม้ที่อาจเป็นส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อการจัดการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้และรักษาระบบนิเวศ เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการและพัฒนาไปในทิศทางที่เหมาะสมต่อไป

กล้วยไม้สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยเมล็ด เมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กเป็นผงละเอียด และมีอาหารสำรองอยู่น้อยมาก ทำให้อัตราการงอกและการพัฒนาของกล้ากล้วยไม้ตามธรรมชาติค่อนข้างต่ำ จำเป็นต้องอาศัยราไมคอร์ไรซาเพื่อช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ด ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของกล้วยไม้ ราไมคอร์ไรซาทำหน้าที่เป็นแหล่งสารอาหาร ให้กับเมล็ดกล้วยไม้ โดยเส้นใยราจะเจริญเข้าไปในเนื้อเยื่อของเมล็ดกล้วยไม้ และสร้างเส้นใยราขดตัวอย่างหนาแน่นอยู่ภายในเซลล์ แต่เดิมราไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในสกุล *Rhizoctonia* ที่มีเส้นใยแบบ sterile ไม่สร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ต่อมามีการจัดจำแนกราที่มีลักษณะคล้ายราในสกุล *Rhizoctonia* ในระยะไม่อาศัยเพศ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวนนิวเคลียสภายในเซลล์ และโครงสร้างของผนังกั้นภายในเส้นใยรา โดยจัดจำแนกใหม่และระบุชื่อสกุลคือ *Ceratorhiza Epulorhiza Monilopsis* และ *Rhizoctonia* รวมถึงระบุชื่อสกุลเมื่อพบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราในสกุลอื่น เช่น *Armillaria Sistotrema* เป็นราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ด้วย ปัจจุบันการศึกษาชีววิทยาโมเลกุลมีบทบาทในการจัดจำแนกราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้โดยศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลอง เป็นการจำลองบทบาทของราไมคอร์ไรซาในธรรมชาติ ราไมคอร์ไรซาจะย่อยสารอาหารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง ดูดซึมและถ่ายโอนสารอาหารให้เมล็ดกล้วยไม้ เอ็มบริโอที่ยังไม่เจริญเมื่อได้รับสารอาหารจะเจริญขึ้นและ

พัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์ม กล้ากล้วยไม้ และต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ ถึงแม้การเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อด้วยอาหารที่อุดมสมบูรณ์จะประสบผลสำเร็จแต่การย้ายกล้ากล้วยไม้ที่ได้ออกสู่สภาพแวดล้อมจริงอาจมีอัตราการรอดค่อนข้างต่ำ ด้วยเหตุนี้การเพาะเลี้ยงเมล็ดและขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่าและการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้เชิงการค้าบางชนิด อาจจำเป็นต้องอาศัยราไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

กล้วยไม้สกุล *Doritis pulcherima* Lindl. มีการกระจายพันธุ์ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบได้ตามธรรมชาติในประเทศไทย ที่หลายระดับสูงความจากระดับน้ำทะเล บริเวณป่าละเมาะใกล้ชายหาด ซอกหินบริเวณหน้าผาหรือลานหิน ปัจจุบันมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง จากการใช้ประโยชน์พื้นที่ ที่เป็นที่อยู่อาศัยของกล้วยไม้สกุลนี้ และจากการลักลอบเก็บกล้วยไม้ป่า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกราจากพีโลตอนภายในรากกล้วยไม้ *D. pulcherima* Lindl. พิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่แยกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล และทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับราไมคอร์ไรซาเพื่อช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของกล้ากล้วยไม้ งานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการจัดการและอนุรักษ์กล้วยไม้ป่าตามธรรมชาติ และเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจในการพัฒนาขยายพันธุ์กล้วยไม้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2

# วารสารปริทัศน์

## 2.1 กล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นวงศ์พืชที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดในอาณาจักรพืช ปัจจุบันมีประมาณ 20,000 ถึง 35,000 ชนิด (Dressler, 1993) เป็นพืชที่มีมาตั้งแต่ยุคโบราณ ก่อนการแยกของพื้นทวีป Gondawanaland เมื่อกว่า 125 ล้านปีก่อน และมีวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน โดยพบได้หลากหลายพื้นที่ทุกทวีปทั่วโลก ในประเทศไทยมีความหลากหลายและการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีพื้นที่ตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศร้อนชื้น และเป็นบริเวณรอยต่อของเขตพฤกษภูมิศาสตร์ ถึง 3 ภูมิภาคด้วยกัน ได้แก่ ภูมิภาคอินเดีย-พม่า (Indo-Burmese) ภูมิภาคอินโดจีน (Indo-Chinese) และภูมิภาคมาเลเซีย (Malesian) โดยมีการสำรวจพบกล้วยไม้มากกว่า 1,170 ชนิด กล้วยไม้ไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและถิ่นที่อยู่อาศัยไม่น้อยไปกว่าประเทศอื่นๆ ดอกกล้วยไม้มีสีสันสวยงามและรูปทรงที่เป็นเอกลักษณ์ กล้วยไม้จึงได้รับความนิยมอย่างต่อเนื่อง ทั้งเพื่อการเพาะปลูกและการศึกษาวิจัย ปัจจุบันกล้วยไม้ไทยมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ทั้งจากการลักลอบเก็บกล้วยไม้จากป่า การทำลายพื้นที่ป่า ด้วยฝีมือมนุษย์และจากภัยธรรมชาติ กล้วยไม้จึงเป็นทรัพยากรที่ควรได้รับการดูแลและพัฒนาในทิศทางที่เหมาะสม โดยอาศัยความรู้พื้นฐานและความเข้าใจในธรรมชาติของกล้วยไม้แต่ละชนิด เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดและคงอยู่อย่างยั่งยืนสืบไป

## 2.2 การจำแนกกล้วยไม้

กล้วยไม้ถูกจำแนกโดยอาศัยหลักเกณฑ์ต่างๆ เช่น ลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัย ลักษณะการดำรงชีพ รูปแบบการเจริญเติบโต เป็นต้น รวมถึงการจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล

**การจำแนกตามสภาพภูมิอากาศ** ลักษณะทางภูมิศาสตร์ ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล ส่งผลต่ออุณหภูมิเฉลี่ยในแต่ละพื้นที่ ทำให้การกระจายพันธุ์มีขอบเขตที่แตกต่างกันออกไป

กล้วยไม้เขตร้อน (tropical orchid) เจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูงกว่า 21 องศาเซลเซียส ในเวลากลางวัน และสูงกว่า 18 องศาเซลเซียส ในเวลากลางคืน

กล้วยไม้เขตอบอุ่น (temperate orchid) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ ประมาณ 15.5 องศาเซลเซียส ในเวลากลางวัน และประมาณ 12.8 องศาเซลเซียส ในเวลากลางคืน

กล้วยไม้เขตหนาวเย็น (cold climate orchid) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ ประมาณ 13.5 องศาเซลเซียส ในเวลากลางวัน และประมาณ 10 องศาเซลเซียส ในเวลากลางคืน บางชนิดสามารถทนต่ออากาศหนาวจัด ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสได้

**การจำแนกตามลักษณะการเจริญเติบโต และรูปทรง** รูปแบบการเจริญของกล้วยไม้พิจารณาการสร้างใบและดอก

การเจริญแบบโมโนโพเดียล (monopodial) คือ การเจริญของยอดอ่อนสู่ปลายยอดด้านเดียว มีลำต้นเดียว บางครั้งอาจเรียกการเจริญแบบฐานเดี่ยว หรือการเจริญทางปลายยอด

การเจริญแบบซิมโพเดียล (sympodial) คือ การเจริญของลำต้นที่มีลักษณะเป็นกอ มีลำลูกหัว หรือต้นอาศัยบนเหง้า บางครั้งเรียกการเจริญแบบฐานร่วม หรือการเจริญทางข้าง

**การจำแนกตามพื้นที่อาศัย** เป็นการจำแนกตามสภาพพื้นที่ที่กล้วยไม้เจริญเติบโตอยู่ตามธรรมชาติ

กล้วยไม้อาศัยบนดิน (terrestrial orchid) บางครั้งเรียกกล้วยไม้ดิน พบได้ตามพื้นป่าทุกประเภท บางครั้งพบระบบรากกล้วยไม้มีลักษณะฝอยคล้ายรากหญ้า

กล้วยไม้อาศัยบนหิน (lithophytic orchid) พบได้บนลานหินและซอกหินที่มีเศษซากอินทรีย์สะสมอยู่ ส่วนมากจะมีใบอวบหนา หรือมีลำลูกขนาดใหญ่เพื่อเก็บสะสมอาหาร และทนต่อความร้อนได้ดี บางชนิดอาจขึ้นบนหินที่มีร่มรำไร

กล้วยไม้อาศัยในน้ำ (aquatic orchid) พบได้ทั้งในลำธาร โขดหินปูนในน้ำตก และน้ำกร่อยในพื้นที่พรุ

กล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchid) พบได้บนต้นไม้ ตามกิ่งก้าน โดยกล้วยไม้จะเกาะอาศัยบนต้นไม้อยู่โดยไม่เบียดเบียดต้นไม้ให้อาศัย

**การจำแนกตามลักษณะการดำรงชีพ** โดยอาศัยลักษณะพื้นฐานของพืช คือ การสังเคราะห์ด้วยแสง

กล้วยไม้สร้างอาหารเองได้ (autophytic orchid) คือ กล้วยไม้ที่มีคลอโรฟิลล์ทำหน้าที่สังเคราะห์ด้วยแสงและผลิตสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต โดยปกติคลอโรฟิลล์มักอยู่ที่ใบ แต่ในกล้วยไม้บางชนิดอาจมีคลอโรฟิลล์ที่ส่วนราก หรือลำลูกกล้วยไม้

กล้วยไม้ที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ (heterotrophic orchid) คือ กล้วยไม้ที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ (achorophyllous orchid) ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ต้องอาศัยสารอาหาร

จากราที่เหมาะสม บางครั้งเรียกกล้วยไม้ในกลุ่มนี้ว่ากล้วยไม้กินซาก (saprophytic orchid) ตามความสัมพันธ์ในระบบนิเวศน์ ปัจจุบันนิยมเรียกกล้วยไม้ในกลุ่มนี้ว่า myco-heterotrophic orchid

กล้วยไม้ได้รับสารอาหารสองแบบ (mixotrophic orchid) คือ กล้วยไม้ที่สามารถสร้างอาหารเองได้ และรับสารอาหารที่ต้องการจากราไมคอร์ไรซาด้วย เสริมจากสารอินทรีย์หลักที่กล้วยไม้ได้รับจากการสังเคราะห์ด้วยแสง กล้วยไม้กลุ่มนี้อาจเป็นผลของการวิวัฒนาการ จากกล้วยไม้ที่สร้างอาหารเองได้ และกล้วยไม้ที่ไม่สามารถสร้างอาหารได้เอง

**การจำแนกตามหลักอนุกรมวิธาน** จำแนกตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ สัณฐานวิทยา และชีววิทยาโมเลกุล ปัจจุบันได้จำแนกพืชวงศ์กล้วยไม้ออกเป็น 5 วงศ์ย่อย (Dresser, 1993) ดังตารางที่ 1 ซึ่งยังมีการปรับเปลี่ยน และพัฒนาการจัดหมวดหมู่อย่างต่อเนื่อง

**ตารางที่** 1 การจำแนกวงศ์ย่อยของกล้วยไม้

| วงศ์ย่อย | จำนวนชนิด |
|---|---|
| Apostasasioideae | 16 |
| Vanilloideae | 249 |
| Crypripedioideae | 155 |
| Orchidoideae | 4,704 |
| Epidendrodeae | 19,785 |

## 2.3 ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza)

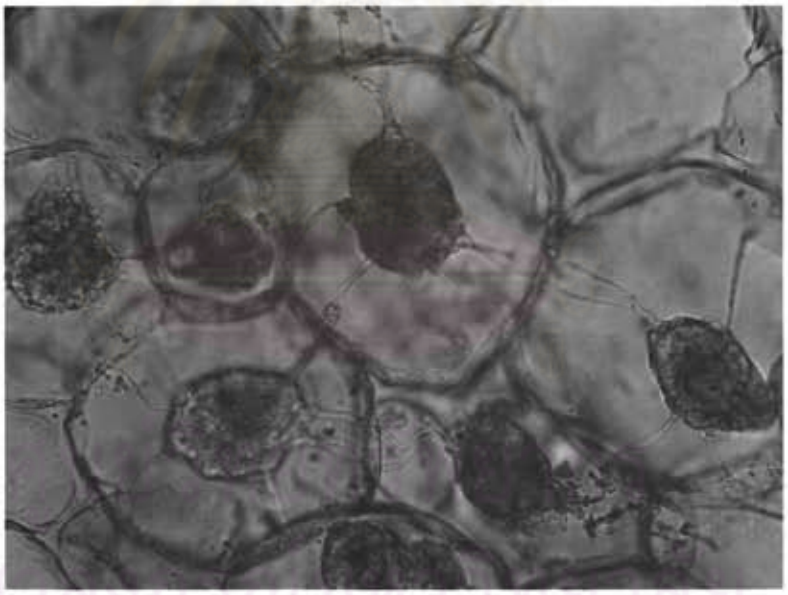
ไมคอร์ไรซา มาจากคำว่า mykès ในภาษากรีกแปลว่า รา และคำว่า rhiza ในภาษาละตินแปลว่า ราก ตามรากศัพท์หมายถึงรากับราก ต่อมาได้อธิบายถึงไมคอร์ไรไรซาในรูปแบบของความสัมพันธ์ระหว่างรากับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) โดยรานั้นต้องไม่ใช่ราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ซึ่งอาจจะอยู่ทั้งภายนอกและภายในเซลล์พืชหรืออย่างใดอย่างหนึ่ง

ราไมคอร์ไรซา ที่พบในปัจจุบันส่วนใหญ่อยู่ไฟลัม Basidiomycota และไฟลัม Ascomycota ความหลากหลายของราไมคอร์ไรซาขึ้นอยู่กับความหลากหลายของพืช และความสมบูรณ์ของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศวิทยา ราไมคอร์ไรซาบางชนิดมีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจและโภชนาการ โดยเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์ สปอร์โรคาร์ปของราไมคอร์ไรซาบางชนิดที่อยู่ใต้ดินหรือเหนือดินเป็น

อาหารให้กับมนุษย์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่มีถุงหน้าท้อง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมามีการนำเสนองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของไมคอร์ไรซาในแง่มุมต่างๆ เช่น การแลกเปลี่ยนสารอาหาร การเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมแร่ธาตุ การเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง ความต้านทานการติดเชื้อก่อโรค ความทนต่อสภาวะแห้งแรงและพิษของโลหะหนัก เป็นต้น

## 2.4 ไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้

ไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ เป็นความสัมพันธ์ระหว่างรากับพืชวงศ์กล้วยไม้ โดยราอาศัยอยู่ในรากและเนื้อเยื่อที่อยู่ใต้ดินอื่นๆ ของกล้วยไม้ (Batty และคณะ, 2001) ซึ่งแตกต่างจากราไมคอร์ไรซาชนิดอื่นที่พบราเฉพาะในรากพืชเท่านั้น เส้นใยราจะเข้าสู่เซลล์ และเจริญอยู่ภายในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ เส้นใยราจะขดตัวกันหนาแน่น เรียกว่า พีโลตอน (peloton) ดังรูปที่ 1 โดยพีโลตอนจะมีชีวิตอยู่ในระยะเวลาสั้นๆ หลังจากนั้นจะสลายตัว และกลายเป็นสารอาหารให้แก่กล้วยไม้



**รูปที่** 1 เส้นใยราขดตัวกันหนาแน่นภายในเซลล์ และเส้นใยราที่เชื่อมต่อกันระหว่างพีโลตอน

ความสนใจศึกษาราในกล้วยไม้ เท่าที่มีรายงานเป็นลายลักษณ์อักษร เริ่มจาก Reissek (1847) สังเกตความสัมพันธ์ของรากับรากกล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติ และพยายามแยกราจากรากกล้วยไม้ แต่เนื่องจากขาดระเบียบวิธีในการทดลองจึงยังไม่ประสบผลสำเร็จ ต่อมา Wahrlich (1886 )

สังเกตราภายในรากกล้วยไม้ และได้อธิบายการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในกล้วยไม้ รวมถึงการสลายเส้นใยราภายในเซลล์พืชให้อาศัย ในปีต่อมา Janse (1897) สำรวจและรายงานจำนวนกล้วยไม้ที่มีความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา Magnus (1900) อธิบายระยะต่างๆ ที่ราเข้าสู่เซลล์และเชื่อว่าภายในเซลล์มีพีโลตอน และมีการย่อยพีโลตอนเกิดขึ้นในเซลล์รากกล้วยไม้ อย่างไรก็ตามในช่วงแรกของการศึกษา ยังไม่มีการกล่าวถึงราไมคอร์ไรซาในแง่ที่เกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ จนกระทั่ง Benard (1899, 1909a, 1909b) ศึกษาราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้และตีพิมพ์ผลงานอย่างต่อเนื่อง เขาสังเกตเห็นว่าเมล็ดกล้วยไม้จะงอกได้เมื่อมีราที่เหมาะสมเจริญร่วมอยู่ด้วย ต่อมาจึงแยกราและระบุสกุลราที่แยกได้อยู่ในสกุล *Rhizoctonia* ในปีค.ศ. 1909 เขาได้เสนอผลงานเรื่องบทบาทของราไมคอร์ไรซาในการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัย Burgeff (1900) แยกราที่มีความสัมพันธ์กับกล้วยไม้ได้ เขาได้แสดงให้เห็นว่าราไมคอร์ไรซาถูกย่อยและดูดซึมสารอาหารโดยเซลล์พืชให้อาศัย ต่อมาเขายังได้ศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้และแสดงให้เห็นถึงการติดเชื้อราในโปรโตคอร์ม โดยกล้วยไม้ได้รับสารอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบจากรา Knudson (1922, 1924, 1930) ได้พยายามอย่างต่อเนื่องที่จะเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ และแสดงให้เห็นว่าให้สารอาหารที่อุดมสมบูรณ์สามารถทดแทนสารอาหารที่เมล็ดกล้วยไม้ได้รับจากราไมคอร์ไรซา จากนั้นการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อก็ได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่อง และถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเมล็ดกล้วยไม้จนถึงปัจจุบัน การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัย และการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อต่างก็มีข้อเด่นและด้อยแตกต่างกัน วิธีการเพาะเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยนิยมใช้สำหรับการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินในเขตอบอุ่น

## 2.5 **พีโลตอน** (Peloton)

พีโลตอน คือ เส้นใยราที่ขดตัวกันอย่างหนาแน่นอยู่ภายในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ในราก และโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ พีโลตอนมีช่วงชีวิตที่จำกัด เมื่อเส้นใยราเข้าสู่เซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ แตกกิ่งโค้งจรดกันเป็นวงขดตัวกันอยู่ และเกิดการย่อยสลายของพีโลตอนในเวลาต่อมา Burgeff (1936) รายงานว่าพีโลตอนในกล้วยไม้ *Dactylorhiza incarnate* จะถูกย่อยสลายของหลังจากที่เส้นใยเริ่มเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 1 เดือน Alconero (1969) ศึกษารา *Rhizoctonia solani* ในกล้วยไม้สกุล *Vanilla* spp. พบว่าการย่อยของเส้นใยราเกิดขึ้นกระจัดกระจายในเซลล์ราก แต่จะพบมากที่บริเวณรอบๆ เซลล์คอร์ทิคอล (cortical cell) ในกล้วยไม้บางชนิดการย่อยของเส้นใยราจะพบมากที่เซลล์คอร์ทิคอลชั้นนอก และน้อยลงในเซลล์คอร์ทิคอลชั้นใน Senthikumar และ Krishnamurthy (1998b) แยกพีโลตอนที่ถูก

ย่อยจากไซโทพลาซึมของเซลล์พืชให้อาศัยโดยอาศัยความแตกต่างของชั้นไซโทพลาซึมด้วยวิธีของ Nieuwdrop (1972) ที่เรียกว่าชั้นเมือกเซลลูโลส (cellulose slime layer) Peterson และ Currah (1990) รายงานว่าพบชั้นเมือกเซลลูโลสในโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Goodyera repens* เขาพบว่าชั้นนี้ย้อมไม่ติดสี cellufluor แต่ย้อมติดสี Aniline blue และเรืองแสงเมื่อสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวเลต จากการสังเกตปรากฏการณ์นี้ทำให้เขานึกถึงแคลโลส (callose) สารที่พืชหลั่งออกมาเมื่อเกิดบาดแผลเพื่อกันบริเวณที่เกิดการเสื่อมสลายของเส้นใย และเอนไซม์ที่ย่อยสลายออกจากไซโทพลาซึมของเซลล์พืชให้อาศัยซึ่งอาจเป็นการอธิบายการเสื่อมสลายของเส้นใยราภายในเซลล์ขณะที่เซลล์ยังคงรักษาสภาพเดิมไว้ แคลโลส คือ พอลิแซ็กคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อพันธะบีตาที่ตำแหน่ง 1 และ 3 มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารซึมผ่าน ต่อมามีรายงานถึงชั้นที่มีคุณสมบัติคล้ายแคลโลส ย้อมติดสี Aniline blue และพบว่าชั้นนี้อาจปรากฏอยู่ตลอดเวลาหรือปรากฏขึ้นบางขณะในการย่อยพีโลตอนของรา *Rhizoctonia cerealis* ในกล้วยไม้ *Platanthera hyperborean* (Rjchardson และคณะ 1992) Senthilkumar และ Krishnamurthy (1998b) ศึกษาเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ *Spathoglottis plicata* พบว่าเริ่มแรกชั้นนี้ปรากฏอยู่ไม่ต่อเนื่อง ต่อมาเมื่อพีโลตอนถูกย่อยกลับปรากฏชั้นนี้อยู่โดยรอบ ชั้นนี้ย้อมติดสี Aniline blue และ lucmoid blue (Krishnamurthy, 1988) และจุดประสงค์ของการสร้างชั้นนี้คือแยกพีโลตอนที่ถูกย่อยออกจากไซโทพลาซึมของเซลล์พืชอาศัย เรียกชั้นนี้ว่า ชั้นแคลโลสิก (callosic material) โดยชั้นนี้จะปรากฏอยู่จนการย่อยพีโลตอนระยะสุดท้าย มีการศึกษาเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการย่อยสลายเส้นใยราในกล้วยไม้ *Spathoglottis* sp. พบว่ายังไม่ทราบแน่ชัดว่าเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายมาจากเซลล์พืชให้อาศัย จากรา หรือจากทั้งเซลล์พืชให้อาศัย และรา แต่มีแนวโน้มว่าพืชให้อาศัยเป็นตัวควบคุมกระบวนการย่อยสลายเส้นใยรามากกว่า นิวเคลียสของพืชให้อาศัยที่มีพีโลตอนจะขยายขนาดเพราะปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยนิวเคลียสจะถูกล้อมรอบด้วยชั้นแคลโลสิก บ่อยครั้งจะพบว่านิวเคลียจะมีรูปทรงที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อศึกษาในรายละเอียดโครงสร้างสารเคมีในไซโทพลาซึมของเซลล์ที่มีพีโลตอน และเซลล์ที่พีโลตอนเริ่มสลาย พบว่าเส้นใยราจากปกติที่เรียงตัวอย่างหลวมๆ จะเริ่มวนขดกันจนแน่ และคลายตัวออกเมื่อพีโลตอนมีอายุมากขึ้นเนื่องจากความหนาแน่นของไซโทพลาซึมในเซลล์พืชที่มีมากกว่าหรือน้อยกว่าไซโทพลาซึมในเส้นใยรา

ผนังของพีโลตอนมี 2 ชั้น ชั้นในมีความหนาแน่นอิเล็กตรอนมาก ชั้นนอกมีความหนาแน่นอิเล็กตรอนน้อยกว่าชั้นในและมีลักษณะเป็นปุย ผนังชั้นนอกเป็นสารที่ประสานระหว่างราและพืช Peterson และ Currah (1990) รายงานว่าระหว่างการย่อยพีโลตอนเส้นใยราจะยุบแฟบลง เมื่อทำปฏิกริยากับ acriflavine-HCl ให้ผลบวกแสดงให้เห็นว่าชั้นนี้มีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นส่วนประกอบ ขณะที่การเสื่อมสภาพของผนังเส้นใยราจะทำปฏิกิริยารุนแรงกับ cellufluor ซึ่งตรงข้ามกับผนังเส้นใยราของ

พีโลตอนที่สมบูรณ์ สรุปได้ว่าผนังของเส้นใยราที่สมบูรณ์มีสารบางอย่างที่ขัดขวางการย้อมติดสีของไคติน และถูกกำจัดออกหลังจากพีโลตอนถูกย่อย มีการศึกษาพีโลตอนในกล้วยไม้ *Spathoglottis* sp. พบว่าผนังเส้นใยราประกอบด้วยไคติน ถึงแม้ว่าเส้นใยราย้อมติดสี chlorazol black E และ celluflour ได้ดี แต่ทำปฏิกริยาได้ไม่ดีกับ IKI-$H_2SO_4$ แสดงให้เห็นว่ามีเซลลูโลสอยู่เพียงเล็กน้อยภายในผนังเส้นใยรา แต่มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องขณะที่เกิดการย่อยพีโลตอน ต่อมารายงานว่าเกิดการย่อยของไคตินที่ผนังเซลล์รา Senthikumar และ Krishnamurthy (1998a) รายงานว่าบริเวณสารที่ประสานของพีโลตอน มีโปรตีนโครงสร้างและพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีฤทธิ์เป็นกรด คือเพกทินที่ถูก esterified และไม่ถูก esterified แต่ไม่มีสารประกอบฟีนอลิก เมื่อเกิดการย่อยสลายของเส้นใย โปรตีนโครงสร้างจะถูกย่อยอย่างต่อเนื่อง ขณะที่เพกทินที่ไม่ถูก esterified จะเพิ่มขึ้น แต่บางครั้งอาจไม่พบในระยะท้ายๆ ของการเสื่อมสภาพของพีโลตอน Williamson (1973) รายงานว่าขณะที่พีโลตอนอยู่ภายในเซลล์พืชอาศัยจะมีการทำงานของเอนไซม์ esterase โดยเฉพาะบริเวณปลายเส้นใย และพบการทำงานเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ acid phosphatase ขณะที่พีโลตอนถูกย่อย มีรายงานการทำงานของเอนไซม์ malate dehydrogenase starch phosphorylase succinate dehydrogenase glucose-6-phosphatase และ ß-glucosidase ในระดับที่สูงมากในพีโลตอนที่สดใหม่ แต่จะสลายตัวอย่างช้าๆ และต่อเนื่องระหว่างที่เกิดการย่อยพีโลตอน นอกจากนี้มีการทำงานของเอนไซม์ acid phosphatase และ ATP-ase ระดับปานกลาง ในพีโลตอนที่สดใหม่ และไม่พบเอนไซม์ peroxidase และ esterase ในพีโลตอนระยะแรกๆ

การสร้างและการเสื่อมสภาพของพีโลตอน มีการศึกษารายละเอียดไม่มากนัก Mollison (1943) พบว่าการติดเชื้อราของโปรโตคอร์มเกิดขึ้นภายในเวลาเพียง 5 วัน และมีการสร้างพีโลตอนที่สมบูรณ์ในระยะเวลา 7 วัน และย่อยสลายภายใน 11 วัน มีงานวิจัยในลักษณะคล้ายกันนี้ของ Hadley และ Williamson (1971) พบว่าราเข้าสู่รากพืชในเวลา 14 ชั่วโมง และสร้างพีโลตอนภายใน 29 ชั่วโมง ก่อนที่จะถูกย่อยในเวลาประมาณ 30 ถึง 40 ชั่วโมง บางครั้งอาจเกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ภายใน 24 ชั่วโมง การสร้างและการเสื่อมสภาพของพีโลตอนเกิดขึ้นซ้ำกันในเซลล์พืชให้อาศัย ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของรากกล้วยไม้บริเวณนั้นๆ

เส้นใยพีโลตอนที่สดใหม่ มีไซโตพลาซึมที่มีช่องว่างเล็กๆ รากกล้วยไม้ที่โตเต็มที่ไซโตพลาซึมจะจัดเรียงเป็นชั้นอยู่ภายในผนังเซลล์และมีช่องว่างเพิ่มขึ้น เห็นนิวเคลียสในแต่ละเซลล์ชัดเจน เมื่อย้อมด้วย Nile Blue Sulphate ติดสีน้ำเงิน แสดงว่ามีปริมาณนิวคลิโอฟอสเฟตอยู่มาก นิวเคลียสย้อมด้วย fast green FCF แสดงว่ามีฮีสโตนอยู่มาก ไซโตพลาซึมประกอบด้วยอาร์เอ็นเอ โพลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ แอลดีไฮด์ โพลิแซ็กคาไรด์ที่กรดอินทรีย์เป็นองค์ประกอบ โปรตีนพื้นฐาน ปริมาณมาก

โปรตีน ลิพิดและโพลีฟีนอล ปานกลาง โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน tyrosine tryptophan และ phenylalanine ที่ไม่ควรพบในไซโตพลาซึม มีการทำงานของเอนไซม์ acid plosphase และ ATP-ase ปานกลาง ในไซโตพลาซึมของเส้นใยพีโลตอนอ่อนพบมีการทำงานของเอนไซม์ malate dehydrogenase succinate dehydrogenase starch phosphorylase glucose-6-phosphatase และ ß-glucosidase อย่างสูง

ผนังเส้นใยของพีโลตอนประกอบด้วยไคติน พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีฤทธิ์เป็นกรด และโปรตีน ถึงแม้ว่าเส้นใยจะย้อมติดสี chlorazol black E และ celluflour ได้ดี ซึ่งอาจมีหรือไม่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบเพราะการย้อมติดสีทั้งสองชนิดนี้ ไม่จำเพาะเจาะจงต่อเซลลูโลส และถึงแม้วิธีทดสอบกับ IKI-$H_2SO_4$ จะเป็นวิธีที่จำเพาะอย่างมากกับเซลลูโลส แต่ผลทดสอบกลับไม่ให้ผลที่ชัดเจนเพียงพอ พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในผนังเส้นใยคือเพกทินที่ถูก esterified และไม่ถูก esterified ซึ่งสัดส่วนของสารทั้งสองกลุ่มนี้อาจแปรผันตามอายุของเส้นใยที่สร้างพีโลตอน เส้นใยพีโลตอนที่สดใหม่จะไม่มีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในผนังเซลล์ และเมื่อถึงเวลาเส้นใยพีโลตอนจะเสื่อมสภาพลง มีขนาดที่เล็กลง สูญเสียลักษณะเฉพาะของเส้นใย โดยเส้นใยจะแหลมเรียวขึ้นซึ่งไม่ปรากฏในเส้นใยราปกติ พีโลตอนจะเคลื่อนที่ไปใกล้ผนังของเซลล์พืชให้อาศัย มีปริมาณฟอสโฟลิพิดเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งไม่ปรากฏพีโลตอนระยะสุดท้าย ขณะที่ผนังเส้นใยพีโลตอนที่ถูกย่อยจะมีปริมาณเพกทินที่ไม่ถูก esterified โปรตีน ลิพิดที่เป็นกลาง โพลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้น แต่ปริมาณไคติน และเซลลูโลสในผนังผนังเส้นใยพีโลตอนที่ถูกย่อยกลับลดลงอย่างช้า มีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกในผนังเส้นใยรา ซึ่งเป็นกลไกป้องกันตัวเองจากการถูกย่อย และมีการสร้างสารล้อมรอบสารต่างๆ ที่อยู่รอบพีโลตอน และกลายเป็นชั้นกั้นระหว่างพีโลตอนกับสารโดยรอบ สารนี้คือแคลโลส ที่ได้อธิบายแล้วในตอนต้น ขณะที่เส้นใยพีโลตอนกำลังถูกย่อย เส้นใยราปกติยังคงอาศัยอยู่ในเซลล์พืช เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบในการสร้างพีโลตอนใหม่ในเซลล์ให้อาศัยเดิม และเมื่อพีโลตอนถูกย่อยเสร็จสิ้น พีโลตอนใหม่ก็พร้อมจะสร้างขึ้นภายในเวลาอันรวดเร็วต่อไป

## 2.6 เซลล์พืชให้อาศัยกับการสร้างพีโลตอน

ราอาศัยอยู่ภายในเซลล์พืชให้อาศัย โดยเซลล์พืชยังคงมีสภาพที่แข็งแรงสมบูรณ์ มีกิจกรรมภายในเซลล์อย่างต่อเนื่อง นิวเคลียสขยายตัวใหญ่ขึ้นกว่าเซลล์ที่ไม่มีราอาศัยอยู่ (เซลล์ไม่ติดเชื้อ) ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าในเซลล์ปกติ ในกล้วยไม้ *Spathoglottis plicata* เมื่อ (เกิดการติดเชื้อ) มีราอาศัยอยู่ภายในเซลล์ และขณะที่มีการสร้างพีโลตอน เซลล์จะมีการขยายขนาดขึ้น 3-5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อ

เทียบกับเซลล์ในภาวะปกติ ขณะที่เกิดการสร้างพีโลตอน แม้จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเด่นชัด แต่ก็พบว่าขนาดนิวเคลียสของเซลล์พืชให้อาศัยมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างต่อเนื่อง บางครั้งอาจมีขนาดใหญ่ขึ้นถึงสามเท่าของขนาดปกติ โดยทั้งดีเอ็นเอ และฮีสโตนเพิ่มขึ้นจนอาจเกิดภาวะโครโมโซมหลายแท่งมาสัมผัสกัน โดยนิวเคลียสพืชให้อาศัยอาจเป็นทรงกลม หรือเปลี่ยนแปลงรูปทรงไป โดยใช้สีย้อม toluidine blue O azurae B และ methyl green ย้อมนิวเคลียสเพื่อสังเกตความแตกต่างของรอยหยัก/แฉก/พูของนิวเคลียส (Krishnamurthy,1988)

ในสภาพปกติไซโทพลาซึมของเซลล์พืชอาศัยมีปริมาณโปรตีนรวม ไขมันรวม และไขมันที่มีฤทธิ์เป็นกรดในระดับปานกลาง และมีโพลิแซ็กคาไรด์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดมีปริมาณมาก แต่เมื่อพีโลตอนถูกย่อย ปริมาณไขมันที่มีฤทธิ์เป็นกรดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Differential interference contrast พบอนุภาคเรืองแสงสีแดงขนาดเล็กลอยอยู่ในไซโทพลาซึม เมื่อย้อมด้วยสีย้อมเรืองแสง DAPI อนุภาคนั้นก็เรืองแสงออกมา อนุภาคนั้นคือส่วนของดีเอ็นเอในไซโทพลาซึม โดยดีเอ็นเอจะพบมากกว่าปกติบริเวณใกล้กับผนังเซลล์พืชให้อาศัย (Alvarez 1968; Williumson and Hadley 1969; Williumson 1970)

## 2.7 กลไกการเข้าสู่รากกล้วยไม้ของราไมคอร์ไรซา

จากเมล็ดกล้วยไม้ที่เจริญร่วมกับราไมคอร์ไรซา พัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม และจนไปเป็นกล้ากล้วยไม้ที่มีรากพิเศษ (adventitious roots) และเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (shoot meristem) ที่จะเจริญต่อไปเป็นใบ ในกล้วยไม้ส่วนใหญ่ใบจะมีสีเขียว และสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ ซึ่งคาดว่าหลังจากการงอกและพัฒนาไปเป็นกล้ากล้วยไม้แล้ว ราไมคอร์ไรซาก็จะหมดความสำคัญ และไม่ปรากฏความสัมพันธ์นี้อีก แต่จากรายงานพบว่ามีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ไม่พบราไมคอร์ไรซาเมื่อกล้วยไม้โตเต็มที่ ขณะที่กล้วยไม้ส่วนใหญ่ โดยเฉพาะกลุ่มกล้วยไม้ดินยังคงมีราไมคอร์ไรซาอยู่ตลอดช่วงชีวิตของมัน ความสำคัญของราไมคอร์ไรซาในระยะที่กล้วยไม้โตเต็มที่ยังคงไม่ชัดเจนนักถึงแม้จะมีงานวิจัยที่ระบุว่าราทำหน้าที่ส่งแร่ธาตุ โดยเฉพาะสารละลายฟอสเฟตให้กับพืชให้อาศัย จนกระทั่ง Cameron และคณะ (2006) ได้แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุล *Goodyera repens* มีการส่งสารประกอบคาร์บอนจากกล้วยไม้ไปยังราภายในราก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าราไมคอร์ไรซาเป็นภาวะพึ่งพากันอย่างแท้จริง โดยเมื่อกล้วยไม้อยู่ในระยะที่ต้องการสารอาหารจากราในการงอก และพัฒนาไปเป็นกล้ากล้วยไม้ เมื่อกล้วยไม้เจริญเติบโตเต็มที่จึงส่งสารประกอบคาร์บอนที่กล้วยไม้สร้างได้ไปยังรา ขณะที่กล้วยไม้กินซาก ที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ต้องอาศัยสารอาหารจากราเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญตลอดช่วงชีวิตของมัน

กลไกการติดเชื้อของราก ซึ่งแตกต่างกับการติดเชื้อของโปรโตคอร์ม โดยเส้นใยราแทงผ่านขนรากหรือเซลล์เนื้อเยื่อผิวราก (rhizodermis) มีการศึกษากลไกของราในการเข้าสู่รากกล้วยไม้ พบว่าโครงสร้างของรากมีผลต่อบริเวณที่เส้นใยราจะเข้าสู่รากพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำแหน่งของเนื้อเยื่อชั้นนอกของคอร์เทกซ์ที่มีเซลล์แพสเซจ (passage cell) ในกล้วยไม้ชนิด *Spathoglottis plicata* มีเซลล์แพสเซจอยู่ที่ขนราก เส้นใยราจึงผ่านเข้าไปบริเวณขนรากเสมอ ขณะที่กล้วยไม้ชนิดอื่นเส้นใยอาจผ่านเข้าทางเซลล์เนื้อเยื่อผิวราก หรือทั้งสองทาง โดยเส้นใยราต้องผ่านชั้นวีเลเมน (velamen) ก่อนจะเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นนอกของคอร์เทกซ์บริเวณเซลล์แพสเซจ โดยตำแหน่งของเซลล์แพสเซจ และขนรากไม่มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน หรือบางครั้งอาจมีการพัฒนาของชั้นวีเลเมนขึ้นระหว่างเนื้อเยื่อชั้นนอกคอร์เทกซ์กับเนื้อเยื่อชั้นผิวรากก็ได้ ในพืชบางชนิดเมื่อราไมคอร์ไรซาเข้าสู่ขนรากจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของขนราก เช่น ขนรากบิดงอ เป็นต้น ซึ่งสัญญาณที่แสดงให้เห็นว่าเส้นใยราเข้าสู่ขนรากแล้ว โดยตำแหน่งที่ขนรากเกิดการบิดงอส่วนใหญ่คือตำแหน่งที่เส้นใยราแทงทุละผ่านเข้าไปภายในเซลล์เนื้อเยื่อที่ผิวรากหรือขนราก และไปขดตัวอยู่ในเซลล์คอร์เทกซ์ที่ราก

ราไมคอร์ไรซาเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นผิวรากผ่านเซลล์แพสเซจก่อนเข้าสู่เซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ มีรายงานว่าเซลล์แพสเซจควบคุมราที่จะเข้าสู่เซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ (Peterson, 1988) เซลล์แพสเซจเป็นเซลล์มีชีวิตเพียงชนิดเดียวในเนื้อเยื่อชั้นนอกของคอร์เทกซ์ ที่ผนังเซลล์ไม่มีลิกนินและซูเบอรินที่เซลล์ในเนื้อเยื่อผิวราก เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว (hypodermal cells) และเซลล์แพสเซจ ล้วนไม่พบเส้นใยราที่ขดตัวกันอยู่ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เหล่านี้เป็นเพียงช่องทางผ่านเข้าออกของเส้นใยราเท่านั้น

## 2.8 บทบาทของราไมคอร์ไรซาที่มีต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้

เมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก เป็นผงละเอียด ในแต่ละฝักมีเมล็ดตั้งแต่ 10-4,000,000 เมล็ด และมีน้ำหนักตั้งแต่ 0.31-24 ไมโครกรัม ขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ (Arditti และ Ghani, 2000) ถึงแม้เมล็ดกล้วยไม้จะมีจำนวนมาก แต่ในธรรมชาติเมล็ดกล้วยไม้เหล่านี้มีโอกาสงอกและเจริญเป็นต้นใหม่ได้ไม่มากนัก และการที่เมล็ดมีขนาดเล็กและน้ำหนักน้อยเนื่องจากมีอาหารสะสมในเมล็ดน้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการเจริญของเอ็มบริโอ ถึงแม้เมล็ดจะเจริญเต็มที่ แต่เอ็มบริโอภายในเมล็ดกล้วยไม้ยังไม่พัฒนา ประกอบด้วยเซลล์ที่ไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่างประมาณ 100-200 เซลล์ ไม่มีรากแรกเกิด และใบเลี้ยง ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ในระยะพักตัวของเมล็ด ดังนั้นจึงต้องอาศัยสารอาหารจากภายนอกเพื่อสนับสนุนให้เอ็มบริโอพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มที่มีเซลล์ที่ไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่างจำนวนมากขึ้น ตามธรรมชาติกล้วยไม้สร้างอาหารเองไม่ได้ในระยะแรกต้องอาศัยราไมคอร์ไรซา ด้วยเหตุนี้การเข้าสู่

เซลล์ ของราไมคอร์ไรซาจึงเป็นจุดสำคัญต่อการงอก และการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ โดยส่วนใหญ่ราจะเข้าสู่เอ็มบริโอโดยผ่านเซลล์ซัสเพนเซอร์ (suspensor cell) ที่อยู่บริเวณฐานของเอ็มบริโอ ขณะที่ราบางชนิดจะเข้าสู่เอ็มบริโอโดยผ่านเซลล์ชั้นนอกที่คล้ายราก (epidermal hairs) หรือเรียกว่าไรซอยด์ของโปรโตคอร์ม โดยราจะกระจายไปยังเซลล์อื่นๆ ยกเว้นเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด ด้วยเส้นใยเล็กและบาง ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อผนังเซลล์ทั้งในแง่ของรูปร่าง และความหนาที่จะเปลี่ยนแปลง แต่โดยปกติเส้นใยราจะอยู่เฉพาะในเซลล์ของโปรโตคอร์ม แต่ไม่ปรากฏในเซลล์เอพิเดอร์มอล ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจจะขาดคุณสมบัติในการย่อยสลายเส้นใยรา ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการรับสารอาหารของพืชให้อาศัย อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดถึงปัจจัยที่ดึงดูดราให้เข้าสู่โปรโตคอร์ม ถึงแม้ว่าจะมีสมมติฐานระบุว่าเอ็มบริโอ หรือโปรโตคอร์มสร้างสารเคมีไปดึงดูดราให้มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยเกิดขึ้นในกล้วยไม้ดินราไมคอร์ไรซาจะมีความสำคัญในระยะแรก ขณะที่โปรโตคอร์มอยู่ในดิน และไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ ขณะที่กล้วยไม้อิงอาศัยส่วนใหญ่โปรโตคอร์มจะมีโอกาสถูกแสงทำให้สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้ จนกระทั่งโปรโตคอร์มมีขนาดใหญ่ขึ้นและเริ่มสร้างใบและราก จนเป็นกล้ากล้วยไม้ที่สร้างอาหารจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเองได้ในที่สุด โดยราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้จะทำหน้าที่เป็นแหล่งสารอาหารที่เมล็ดต้องการ โดยอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดเตรียมได้ง่าย และกล้วยไม้ที่ได้มักจะแข็งแรง และทนต่อการติดเชื้อราก่อโรคได้ดีกว่า ขณะที่ข้อเสียคือราที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงร่วมกับเมล็ด จะต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม เพราะหากเป็นสายพันธุ์อื่นๆ อาจจะไม่ช่วยส่งเสริมการงอกเมล็ดและการเจริญของโปรโตคอร์ม หรือในทางตรงข้ามอาจทำให้เมล็ดไม่งอกและตายในที่สุด ซึ่งงานวิจัยไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้เขตร้อนยังคงจำกัดอยู่ ขณะที่กล้วยไม้ในเขตร้อนนิยมใช้การเพาะเมล็ดโดยปราศจากเชื้อ ซึ่งเมล็ดงอกและเจริญไปเป็นกล้ากล้วยไม้ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับกล้วยไม้ในเขตอบอุ่น แต่สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเมล็ดโดยปราศจากเชื้อมีความซับซ้อนมากกว่า และต้องคำนึงถึงสารอาหารต่างๆ ที่พืชต้องการ ทั้งสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และน้ำตาลที่เมล็ดกล้วยไม้นำไปใช้ได้ทันที Johnson และคณะ (2007) ทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Eulophia alta* พบว่าการเพาะเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยชักนำให้เมล็ดใช้ระยะเวลาเจริญเป็นโปรโตคอร์ม และพัฒนาได้เร็วกว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ และกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเมล็ดแบบพึ่งพาอาจจะมีความเหมาะสมที่จะนำไปปลูกในแหล่งธรรมชาติ Fang (2008) แยกราไมคอร์ไรซาจากรากของกล้วยไม้ดิน *Cymbidium goeringii* นำราไมคอร์ไรซาที่แยกได้ 6 สายพันธุ์มาทดสอบการเจริญร่วมกับกล้ากล้วยไม้ลูกผสม *Cymbidium* พบว่ากล้ากล้วยไม้ที่เจริญร่วมกับรา 3 สายพันธุ์ มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นกว่ากล้ากล้วยไม้เจริญเพียงลำพัง และเมื่อนำกล้ากล้วยไม้ที่เจริญร่วมกับราทดสอบไปแยกเชื้ออีกครั้งก็พบรา

ทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ในรากกล้วยไม้ ซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ ของกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมกับราไมคอร์ไรซา และการเป็นแหล่งสนับสนุนสารอาหารให้กับกล้วยไม้สายพันธุ์ลูกผสมนี้

## 2.9 สรีรวิทยาของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้

งานวิจัยจำนวนมากระบุว่าการเจริญในระยะแรกของกล้วยไม้ ต้องอาศัยแหล่งอาหารจากภายนอก ทั้งแหล่งคาร์บอน และสารอาหารต่างๆ โดยอาศัยราไมคอร์ไรซาที่เข้าไปตั้งแต่ระยะการงอกของเมล็ด ราทำหน้าที่จัดหาสารอินทรีย์ที่มีคาร์บอนประกอบเป็นองค์ประกอบ โดยการสลายคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำในดิน Beau (1920) ทำการทดลองโดยใช้อาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนของรา จากโมเลกุลขนาดเล็กจนถึงคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน เช่น ข้าวโอ๊ต แป้ง เซลลูโลส แสดงให้เห็นว่าบทบาทของราในการถ่ายโอนคาร์บอน ต่อมามีการใช้สารกัมมันตภาพรังสีมาติดตามการถ่ายโอนน้ำตาลกลูโคส และทรีฮาโลส (Smith และ Read 1997)

นักวิจัยบางคนเชื่อว่าราไมคอร์ไรซาเป็นแหล่งวิตามินบางชนิดให้กับกล้วยไม้ในระยะที่เมล็ดงอก (Hijner และ Arditti 1973) แต่มีหลักฐานไม่มากนักยืนยัน ในกล้วยไม้ที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ ราจะอาศัยอยู่ในรากกล้วยไม้ตลอดเวลา เพื่อจัดหาแหล่งคาร์บอนให้กับต้นกล้วยไม้ ส่วนกล้วยไม้สร้างอาหารเองได้ นักวิทยาศาสตร์เชื่อกันว่าราไมคอร์ไรซามีหน้าที่จัดหาสารอาหารบางชนิดที่กล้วยไม้ต้องการ ซึ่งยังขาดข้อมูลที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังมีการระบุว่ารามีหน้าที่จัดหาสารประกอบไนโตรเจนให้กับพืชให้อาศัย (Burgeff 1936) แต่ยังขาดการพิสูจน์ เหมือนกับรายงานที่ระบุว่ารามีหน้าที่จัดหาว่าสารประกอบฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้กับพืชให้อาศัย (Smith, 1967) Cameron (2006) ทดสอบการถ่ายโอนคาร์บอนและไนโตรเจนระหว่างกล้วยไม้ *Goodyera repens* และรา *Ceratobasidium cornigerum* ติดตามการโอนย้ายจากราไปยังกล้วยไม้ด้วยการติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีคาร์บอนไอโซโทป 13 และไนโตรเจนไอโซโทป 15 ในกรดอะมิโนไกลซีน และติดตามการโอนย้ายคาร์บอนจากกล้วยไม้ไปยังราด้วยคาร์บอนไอโซโทป 14 พบว่าราใช้สารกัมมันตภาพรังสีคาร์บอนไอโซโทป 13 และไนโตรเจนไอโซโทป 15 และถ่ายโอนไปยังรากและยอดของกล้วยไม้ ขณะที่พบคาร์บอนไอโซโทป 14 ถูกถ่ายโอนมายังเส้นใยรา การศึกษาแบบจำลองนี้เป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นภาวะพึ่งพาอาศัยอย่างแท้จริงของราไมคอร์ไรซาที่มีการถ่ายโอนคาร์บอนทั้ง 2 ทิศทางระหว่างกล้วยไม้ที่สร้างอาหารได้เองและโตเต็มที่กับราที่เจริญอยู่ร่วมด้วย Cameron (2007) ทดสอบการได้รับฟอสฟอรัสของกล้วยไม้ *Goodyera repens* จากราไมคอร์ไรซาภายในระบบจำลองที่ประกอบด้วยกล้วยไม้ ราไมคอร์ไรซา และกรดออโธฟอสฟอริกที่มีฟอสฟอรัสไอโซโทป 33 โดยกั้นไม่ให้รากกล้วยไม้

สัมผัสกับฟอสฟอรัสไอโซโทป 33 โดยตรง พบว่ากล้วยไม้รับฟอสฟอรัสจากราไมคอร์ไรซา ซึ่งสนับสนุนความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยของราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้ที่สร้างอาหารเองได้ในระยะโตเต็มที่

## 2.10 ความจำเพาะของราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้

Warcup (1971, 1973, 1981) สันนิษฐานว่าพืชและราไมคอร์ไรซามีความจำเพาะกันอย่างสูง ขณะที่ Curtis (1939) เสนอว่าราที่พบในรากกล้วยไม้เป็นเพียงการกระจายของสายพันธุ์ราในดินมากกว่าจะแสดงความสัมพันธ์ของรากับพืชให้อาศัยแบบความจำเพาะ โดยเฉพาะในกล้วยไม้ที่สร้างอาหารเองได้ อย่างไรก็ตามความจำเพาะของราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้มีอาจแปรผันได้หลายระดับขึ้นอยู่กับชนิดของรา และประเภทของกล้วยไม้ กล้วยไม้บางชนิดมีความสัมพันธ์กับรามากกว่า 1 ชนิด และราบางชนิดมีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยมากกว่า 1 ชนิด กล้วยไม้สกุล *Dactylorhiza* บางชนิดสามารถเจริญร่วมกับราทดสอบที่แยกได้จากกล้วยไม้ได้ทุกไอโซเลต (Harvais และ Hadley 1967) นอกจากนั้นยังพบว่าชนิดของรามีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของกล้วยไม้ (Zettler และคณะ, 2003) สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับความจำเพาะของราไมคอร์ไรซากับกล้วยส่วนใหญ่ทดลองภายในหลอดทดลองซึ่งมีสภาพแวดล้อมและองค์ประกอบของสารอาหารแตกต่างจากสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ซึ่งอาจมีผลต่อความสัมพันธ์ของราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้ได้แตกต่างกัน Masukara และ Katsuya (1994) แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของกล้วยไม้และราไมคอร์ไรซาในพื้นที่จริงมีความแตกต่างกัน เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง นอกจากนี้การทดสอบความจำเพาะของราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้ส่วนใหญ่แยกราจากรากกล้วยไม้ที่โตเต็มที่มาเพื่อทดสอบ ขณะที่เมล็ดกล้วยไม้อาจงอกได้จากความสัมพันธ์เพียงบางชนิดที่แยกได้ หรือกับราอื่นๆ ที่ไม่ได้อยู่ในรากกล้วยไม้ที่โตเต็มที่ก็เป็นได้ มีรายงานการแยกราจากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Platanthera praeclara* ได้ 2 ชนิด คือ *Ceratorhiza* sp. (UAMH 9847) และ *Epulorhiza* sp. เมื่อนำไปทดสอบการงอกของเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลองปรากฏว่ามีเพียงรา *Ceratorhiza* sp. (UAMH 9874) เท่านั้นที่กระตุ้นการเจริญของกล้ากล้วยไม้จนเริ่มมีใบปรากฏ (Sharma และคณะ, 2003) ปัจจุบันยังมีผู้วิจัยจำนวนมากที่พยายามทดสอบความจำเพาะของราไมคอร์ไรซาต่อการงอกเมล็ดไปจนถึงเป็นต้นกล้วยไม้ที่โตเต็มที่ทั้งในหลอดทดลอง และในสภาพพื้นที่จริง

## 2.11 การระบุชนิดของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้

ราในรากกล้วยไม้แต่เดิมมักระบุอยู่ในสกุล *Rhizoctonia* แต่ค่อนข้างมีอุปสรรคในการระบุชนิดสกุล เนื่องจากเป็นราที่ไม่สร้างสปอร์ และยากต่อการชักนำให้สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศในอาหารที่เพาะเลี้ยง ราส่วนใหญ่ที่แยกได้มักเจริญอยู่ในระยะไม่อาศัยเพศ การระบุชนิดของราในสกุลนี้ อาศัยสีโคโลนี ลักษณะของเส้นใยที่มีผนังกั้น จำนวนนิวเคลียสภายในเซลล์ การสร้างเซลล์โมนิลอยด์ (monilioid cells) และการสร้างสเคลอโรเทีย (sclerotia) เป็นต้น ต่อมาเมื่อชักนำราสกุลนี้ให้สร้างระยะสมบูรณ์เพศจึงจัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota และไฟลัม Ascomycota

กล้วยไม้ที่สร้างอาหารเองได้มักมีความสัมพันธ์กับราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ตามรายงานของ Moore (1987,1996) และ Sneh และคณะ (1996) แบ่งออกเป็น 5 สกุลในระยะสมบูรณ์เพศ ขณะที่กล้วยไม้ที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ จะมีความสัมพันธ์กับราในกลุ่ม homobasidio mycetes เช่น สกุล *Russula* สกุล *Coprinus* เป็นต้น และพบว่าราในกลุ่มนี้เป็นไมคอร์ไรซากับพืชยืนต้นด้วย

**ตารางที่** 2 สกุลของราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ในระยะที่สืบพันธุ์อาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ

| สกุลของราในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ | สกุลของราในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ |
|---|---|
| *Ceratobasidium* | *Ceratorhiza* |
| *Sebasina* | *Opadorhiza* |
| *Tulasnella* | *Epulorhiza* |
| *Thanetephorus* | *Moniliopsis* |
| *Waitea* | *Chrysorhiza* |

การระบุชนิดของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใย การทดสอบการทำงานของเอนไซม์บางชนิด การเข้ากันได้ของเส้นใย และการศึกษาชีววิทยาโมเลกุล ในการจัดจำแนก และระบุเอกลักษณ์ของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ (Zelmer และ Currah, 1995) ปัจจุบันการศึกษาชีววิทยาโมเลกุล มีส่วนสำคัญต่อการจำแนกตามวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic classification) ของราไมคอร์ไรซาเพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง และศึกษาความสัมพันธ์ของราไมคอร์ไรซาแต่ละสายพันธุ์ในระดับโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของสายดีเอ็นเอ ในรานิยมศึกษาในตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer) ที่

เป็นบริเวณอนุรักษ์ของสายดีเอ็นเอ และมีความแปรผันของลำดับเบสเพียงพอต่อการเปรียบเทียบราในแต่ละสกุล แต่หากต้องเปรียบเทียบชนิดของราแล้วอาจต้องใช้บริเวณที่มีการอนุรักษ์มากขึ้นเช่น ตำแหน่ง nuclear large subunit และ mitochondrial rDNA เป็นต้น

Ma (2003) แยกราจากรากและโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ในประเทศสิงคโปร์ได้ 24 ไอโซเลต แบ่งกลุ่มโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาได้ 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ระบุชนิดเป็น *Epulorhiza repens* และกลุ่มที่ 2 ระบุชนิดเป็น *E. calendulina* และระบุชนิดโดยอาศัยลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ได้เป็น *E. repens* และ *E. calendulina*

Porras-Alfaro (2007) ศึกษาความหลากหลาย ความจำเพาะและหน้าที่ของราในกล้วยไม้ *Vanilla* กล้วยไม้เขตร้อนซึ่งเป็นกล้วยไม้บนดิน และกล้วยไม้อิงอาศัย โดยระบุสกุลราที่เพาะเลี้ยงได้และเพาะเลี้ยงไม่ได้ด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS และ mtLSU และนับจำนวนนิวเคลียสภายในเซลล์ พบว่ามีความหลากหลายของราไมคอร์ไรซาในสกุล *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* และ *Tulasnella* และนำราในสกุล *Ceratobasidium* และ *Tulasnella* ทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัยกับกล้วยไม้สกุล *Vanilla* และ *Dendrobium* พบว่า *Ceratobasidium* สนับสนุนการงอกของเมล็ด และการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ทั้งสองสกุล ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้เพียงชนิดหนึ่งมีความสัมพันธ์กับราไมคอร์ไรซามากกว่าหนึ่งชนิดที่มีหน้าที่แตกต่างกันในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของกล้วยไม้

Irwin (2007) แยกราจากรากกล้วยไม้ *Pterostylis nutans* R. BR. แหล่งต่างๆ และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลใน GenBank พบราสกุล *Ceratobasidium* และราในกลุ่ม homobasidiomycete เช่น *Gymmomyces* sp., *Tricholoma* sp., *Leptodontidium orchidicola* และราในดินที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ เป็นต้น และทดสอบการงอกของเมล็ดภายในหลอดทดลอง ผลการทดลองแสดงให้เห็นความจำเพาะของราในกล้วยไม้ *P. nutans* และสนับสนุนแนวคิดในการอนุรักษ์กล้วยไม้ที่ใกล้สูญพันธ์ในประเทศออสเตรเลียด้วยราไมคอร์ไรซาในพื้นที่จริง

## 2.12 การสืบพันธุ์ของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้

การสืบพันธุ์ของราในรากกล้วยไม้ตามธรรมชาติยังคงมีข้อมูลอย่างจำกัด การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศของราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ที่เกิดขึ้นในสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงไม่มีข้อมูลมากนัก Senthikumar และ Krishnamurthy (1998a) ระบุว่าขนราก (root hair)

เป็นบริเวณที่สำคัญต่อการเข้าไปภายในเซลล์ของรา และเป็นบริเวณเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ โดยราจะสร้างแคลมิโดสปอร์ (chlamydospore) หรือบางครั้งอาจสร้างสเกลอโรเทียภายในขนราก โดยแคลมิโดสปอร์จำนวนมากจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม หรือสายสั้น หรือยาวที่ปลายเส้นใย หรือระหว่างเส้นใย แคลมิโดสปอร์ในขนรากจะมีรอยแยกเป็นเกลียวที่พร้อมจะปล่อยสปอร์ไปยังบริเวณรอบราก (rhizosphere)

## 2.13 งานวิจัยไมคอร์ไรซากล้วยไม้ในประเทศไทย

Pornpimon Athipunyakom (2004) กล่าวว่า เลขา มาโนช แยกราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้อิงอาศัย ระบุสกุลราที่แยกได้ คือ *Rhizoctonia* และทดสอบการงอกของเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 แต่ไม่มีการตีพิมพ์ผลงานวิจัยดังกล่าว จนกระทั่งปี พ.ศ. 2543 จึงเริ่มมีการเผยแพร่งานวิจัยในที่ประชุมระดับนานาชาติ (Leka Manoch, Pornpimon Athipunyakom, and Morakot Tanticharoen, 2000)

นันทนา คำเมือง, เลขา มาโนช, จิตราพรรณ พิลึก และ พรพิมล อธิปัญญาคม. (2543) สำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้อิงอาศัย 20 ชนิด ได้แก่ *Cymbidium aloifolium Dendrobium aphyllum D.leonis D. parishii D. Chrysotoxum D.lindleyi D. teres D. chrysanthum D. farmeri D. albosanguineum D. friedericksianum Pholidota articulate Aerides flabellate A. houlettiana A. lalcata Rhynchostylis retusa R. coelestis R. gigantean Asccentrum miniatum* Bulbophyllum sp. และกล้วยไม้อาศัยบนดิน 15 ชนิด ได้แก่ *Paphipedilium bellatulum P. callosum P. concolor var striatum P. exul P. villosum Phalaenopsis cornucervi Doritis pulcherrima Geodorum* sp. *Eulophia* sp. *Nervilia aragona Habenaria carnea H. militaris var. roseachiela Pecteillis sagarikii Calanthe rubens* และ *Spathoglottis* sp. ตรวจพบการเจริญของราไมคอร์ไรซาในรากกล้วยไม้อาศัยบนดินทุกชนิด และในรากกล้วยไม้อิงอาศัย 17 ชนิด ยกเว้น *D. leonis D. chrysanthum* และ *Asccentrum miniatum* แยกรา และจัดจำแนกชนิดอยู่ในสกุล *Rhizoctonia* spp.

Pornpimon Athipunyakom, Leka Manoch, Chitrapan Piluek, Suparp Artjariyasripong and Somwong Tragulrung (2004) แยกราจากพีโลตอนในรากกล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis plicata* (Blume.) ที่เก็บจากเชียงใหม่ จันทบุรี นครราชสีมา และกรุงเทพมหานคร ระบุชื่อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้ 4 ชนิด คือ *Epulorhiza repens, Rhizoctonia globularis Rhizoctonia*

sp. และ *Sabacina* sp. (Epulorhiza sp. anamorph) ศึกษาการงอกของเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยภายในขวดทดลองพบว่าเมื่อเพาะเมล็ดร่วมกับรา *Epulorhiza repens* และ *Rhizoctonia globularis* พบว่าเมล็ดงอกได้ถึง 99.2 เปอร์เซ็นต์ และ 96.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายใน 21 วัน และพัฒนาต่อจนเริ่มมีการสร้างใบ 8.1 เปอร์เซ็นต์ และ 1.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายใน 60 วันเมื่อเปรียบเทียบกับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบปราศจากเชื้อพบเมล็ดงอกเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีการพัฒนาต่อไปจนระยะที่ปรากฏใบ

Pornpimon Athipunyakom, Leka Manoch และ Chitrapan Piluek (2004) แยกราจากพีโลตอนในรากกล้วยไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Calanthe rubens*, *C. rosea*, *Cymbidium sinense*, *Cymbidium tracyanum*, *Goodyera procera*, *Ludisia discolor*, *Paphiopedilum concolor*, *P. exul*, *P. godefroyae*, *P. niveum* และ *P. villosum* ระบุชื่อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ราทั้งหมด 7 สกุล 14 ชนิด *Ceratorhiza cerealis*, *C. goodyerae-repentis*, *C. pernacatena*, *C. ramicola*, *Ceratorhiza* sp., *Epulorhiza calendulina*, *E. repens*, *Rhizoctonia globularis*, *Sistotrema* sp., *Trichosporiella multisporum*, *Tulasnella* sp. *Waitea circinata* และ *Rhizoctonia* spp. 2 ชนิด

Pornpimon Athipunyakom (2004) แยกราจากพีโลตอนในรากกล้วยไม้ 15 ชนิด ได้แก่ *Calanthe rubens*, *C. rosea*, *Cymbidium sinense*, *Cymbidium tracyanum*, *C. tracyanum*, *Goodyera procera*, *Ludisia discolor*, *Paphiopedilum* callosum *P.concolor*, *P. exul*, *P. godefroyae*, *P. niveum* *P. parishii* *P. villosum* *Phaius tankervill* และ *Spathoglottis plicata* ระบุชื่อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา *Ceratorhiza cerealis*, *C. goodyerae-repentis*, *C. pernacatena*, *C. ramicola*, *Ceratorhiza* sp., *Epulorhiza calendulina*, *E. repens*, *Rhizoctonia globularis*, *Sistotrema* sp., *Trichosporiella multisporum*, *Tulasnella* sp. *Waitea circinata* *Sebacina* sp. *Sistotrema* sp. *Rhizoctonia* spp. 3 ชนิด และไม่สามารถระบุชนิดได้ ทดสอบการงอกแบบพึ่งพาอาศัยของกล้วยไม้ *Spathoglottis plicata* กับรา *E. repens* *Rhizoctonia globularis* *C. goodyerae-repentis* ที่แยกได้ในขวดทดลอง พบว่า *E. repens* กระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของกล้ากล้วยไม้ได้ดีที่สุด ขณะที่เมล็ดที่เพาะร่วมกับรา *C. goodyerae-repentis* งอกได้เพียงเล็กน้อย และไม่เจริญออกมาจากเปลือกหุ้มเมล็ด

**กล้วยไม้** *Doritis pulcherrima* Lindl.

การจัดจำแนกกล้วยไม้ *D. pulcherrima* ตามหลักอนุกรมวิธาน

Kingdon: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Class: Liliopsida

Order: Orchidales

Family: Orchidaceae

Genus: *Doritis*

Species: *pulcherrima*

กล้วยไม้สกุลนี้พบครั้งแรกในประเทศเวียดนาม จากการสำรวจของ George Finlayson ต่อมาในปี ค.ศ. 1833 Sir John Lindley ตั้งชื่อพฤกษศาสตร์ (สลิล สิทธิสัจจธรรม, 2549) โดยมีรากศัพท์จากภาษากรีกว่า dory แปลว่าฉมวก ด้วยรูปทรงของกลีบปากที่แคบยาวคล้ายฉมวก บ้างก็ว่ามาจากชื่อของ Aphrodite เทพแห่งความรักและความงามของชาวกรีก

*D. pulcherrima* มีชื่อภาษาไทยว่า ม้าวิ่ง และแดงอุบล ประเทศไทยถือเป็นประเทศหนึ่งที่เป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้ชนิดนี้ เป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญแบบโมโนโพเดียล ลำต้นทรงกระบอกสั้นมาก มีหลายข้อ ใบออกตามข้อ1-3 คู่ ใบมีทั้งสีเขียว เขียวอมม่วง ไปจนถึงสีม่วงคล้ำ เรียงสลับ ค่อนข้างหนา ใบอ่อนพับตามยาว กาบใบติดคาต้น ทรงต้นเตี้ย ช่อดอกเป็นช่อกระจะ ออกข้างลำต้น ช่อยาว ตั้งตรง ดอกเล็ก มีหลาย เรียงเวียน บานและโรยไล่กันจากโคนไปปลายช่อ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกเป็นอิสระ กลีบมีสีชมพูอ่อน ม่วง ไปจนถึงสีม่วงแดง นอกจากนี้ยังพบดอกที่มีสีขาว ปากมีสีเหลือง อีกด้วย กลีบปากอยู่ทางด้านล่าง มีหูปากตั้งชัน โคนกลีบนอกคู่ล่างทั้งคู่เชื่อมติดอยู่กับฐานของเส้าเกสรประกอบเป็นเดือยดอก เส้าเกสรสั้น แต่มีคางยื่นยาว ในฝาครอบมีกลุ่มเรณู 4 กลุ่ม มีก้านและแป้นก้านกลุ่มเรณู กล้วยไม้สกุลนี้มีการกระจายพันธุ์ตามเขตภูมิพฤกษศาสตร์อินโดจีน เป็นกล้วยไม้ที่อาศัยบนหิน ทั้งบริเวณลานหิน ซอกหินหรือหน้าผา และพบบริเวณพื้นดินปนทรายในป่าละเมาะใกล้ชายหาด โดยพบอยู่ใต้ต้นไม้เตี้ยๆ และโปร่ง แต่เดิมกล้วยไม้สกุลนี้แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง ทางภาคใต้ พบตั้งแต่จังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร กระบี่ พังงา สงขลา ปัตตานี ลงไปถึงประเทศมาเลเซีย ภาคตะวันออก พบตั้งแต่จังหวัดนครนายก ปราจีนบุรี สระแก้ว จนถึงประเทศกัมพูชา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบตั้งแต่จังหวัดอุบลราชธานี ชัยภูมิ ศรีสะเกศ ขอนแก่น หนองคาย ปัจจุบันมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจากการใช้พื้นที่เพื่อทำประโยชน์ และจากการลักลอบเก็บจากธรรมชาติ งานวิจัยนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งที่ทำให้คนในสังคมตระหนักถึงความสำคัญต่อ

ทรัพยากรที่มีอยู่อย่างจำกัด ความสัมพันธ์ของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ เป็นเพียงส่วนหนึ่งของความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนในระบบนิเวศ แต่อาจมีความสำคัญยิ่งต่อแนวทางการอนุรักษ์และฟื้นฟูกล้วยไม้ตามธรรมชาติต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 3

# อุปกรณ์สารเคมีและวิธีการทดลอง

## 3.1 อุปกรณ์เครื่องมือ

| เครื่องมือ และอุปกรณ์ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| 1. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ รุ่น IX 70 (Inverted microscope) | Olympus Optical Co., Ltd., Japan |
| 2. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหักเหแสง รุ่น BX 51 (Light microscope) | Olympus Optical Co., Ltd., Japan |
| 3. กล้องจุลทรรศน์สามมิติ รุ่น SZ-60 (Stereo microscope) | Olympus Optical Co., Ltd., Japan |
| 4. กล้องบันทึกภาพ รุ่น DP71 และ อุปกรณ์เชื่อมต่อ รุ่น | Olympus Optical Co., Ltd., Japan |
| 5. ซอฟแวร์บันทึกภาพ DP Controller | Olympus Optical Co., Ltd., Japan |
| 6. แหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ | Olympus Optical Co., Ltd., Japan |
| 7. เครื่องอุ่นสารด้วยความร้อนแห้ง (AccuBLOCK™ Digital Dry Bath) | Labnet International Inc., USA |
| 8. เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รุ่น ES-315 (Autoclave) | Tomy Seiko Co., Ltd., Japan |
| 9. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น TP 600 (DNA thermo cycle) | Takara Bio Inc., Japan |
| 10. อุปกรณ์บันทึกภาพในงานชีววิทยาโมเลกุล รุ่น Gel Doc™ XR (Gel documentation system) | Bio-Rad Laboratories Inc., USA |
| 11. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 500 | Memmert GmbH + Co.KG, Germany |
| 12. ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น Clean Model. V6 (Laminar flow) | Lab Service, Thailand |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| เครื่องมือ และอุปกรณ์ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| 13. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น CM-610T (Micro centrifuge) | Hsiangtai Machinery Industry Co., Ltd., Taiwan |
| 14. ไมโครไปเปตขนาด 2, 20, 100 และ 1000 ไมโครลิตร พร้อมทิป (Micropipette and replacement tip) | Gilson Inc., USA |
| 15. อุปกรณ์แยกขนาดโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้า รุ่น Mupid®-ex (Mini agarose gel electrophoresis system) | Advance Co., Ltd., Japan |
| 16. เครื่องบด และผสม รุ่น MM400 (Mixer Mill) | Retsch GmbH, Germany |
| 17. เครื่องวัดความเป็นกรด ด่าง (pH meter) | Mettler Toledo, Switzerland |
| 18. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์รุ่น ELGASTAT MAXIMA UF. (Ultra Pure water) | ELGA, England |
| 19. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมความเย็น รุ่น 3700 (Refrigerated centrifuge) | Kubota Corporation, Japan |
| 20. เครื่องผสมสารรุ่นVX 100 (Vortex mixer) | Labnet International Inc., USA |
| 21. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น PG2002-S | Mettler Toledo, Switzerland |
| 22. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส | Sharp, Thailand |
| 23. อุปกรณ์ตัดเนื้อเยื่อพืช | - |
| 24. เครื่องแก้วสำหรับการทดลอง | - |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 การสำรวจ และเก็บตัวอย่างกล้วยไม้

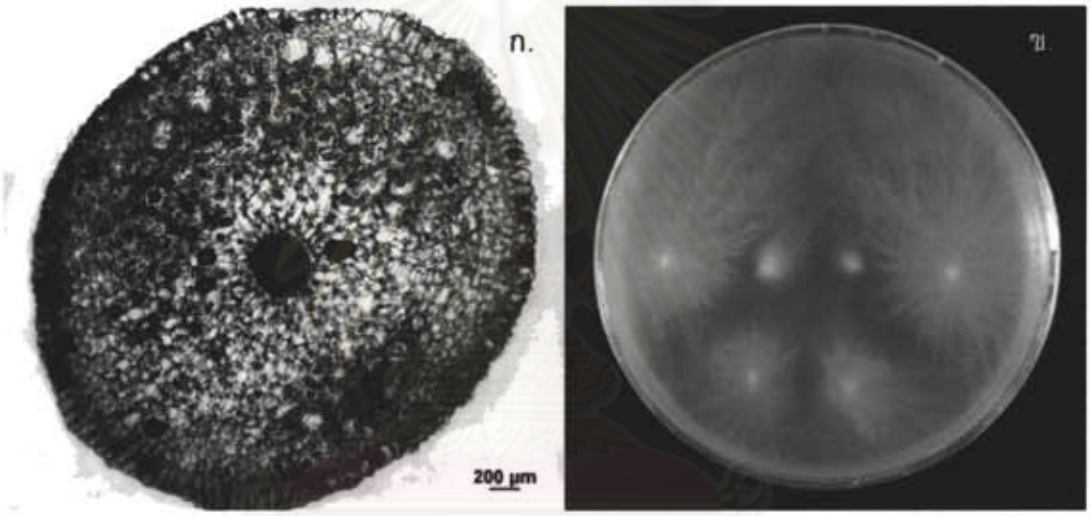
สำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ *D. pulcherrima* ตามธรรมชาติ (รูปที่ 2) ที่มีสภาพสมบูรณ์ไม่เป็นโรค จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก จังหวัดกระบี่ จังหวัดชุมพร จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดชัยภูมิ และจังหวัดเลย โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกล้วยไม้แหล่งละ 3 ต้น

**รูปที่** 2 กล้วยไม้ *D. pulcherrima* ที่พบตามธรรมชาติ จากจังหวัดชุมพร

### 3.2.2 การแยกราจากรากกล้วยไม้ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีสภาพสมบูรณ์ที่เก็บได้จากข้อ 1 ตัดรากต้นละ 3 ราก ล้างด้วยน้ำยาล้างจาน น้ำประปา และใช้แปรงทำความสะอาดเศษดินที่เกาะอยู่บนผิวรากให้สะอาด ฆ่าเชื้อที่ผิวรากด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที และสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง และซับด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง หลังจากนั้นใช้ใบมีดปราศจาก

เชื้อตัดรากยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ผ่าตามขวางให้ได้ชิ้นบางๆ วางบนแผ่นกระจก หยดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ สังเกตพีโลตอนภายในเซลล์ (รูปที่ 3 ก.) ใช้ปากคีบทำลายผนังเซลล์พืชให้แตกออก พีโลตอนจะลอยอยู่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ใช้ไมโครปิเปตปริมาตร 2 ไมโครลิตร ดูดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มีพีโลตอนลอยอยู่ หยดลงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Nutrient Dextrose Yeast Agar (NDY) ที่เจือจาง 6 เท่าของความเข้มข้นเดิม (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณภูมิห้อง สุ่มเลือกรากละ 5 พีโลตอน สังเกตเส้นใยราที่เกิดขึ้นภายใน 3 ถึง 5 วัน (รูปที่ 3 ข.) แล้วทำการย้ายเส้นใยราลงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) สำหรับเก็บรักษาเส้นใยราบริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป




**รูปที่** 3 ก. ภาพตัดขวางรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima* พบพีโลตอนอยู่ภายในเซลล์คอร์เทกซ์ (ดังแสดงลูกศร)

ข. เส้นใยราที่เจริญจากพีโลตอนบนอาหาร NDY เจือจาง 6 เท่า

## 3.3 การระบุเอกลักษณ์ของราในรากกล้วยไม้

### 3.3.1 การระบุเอกลักษณ์ของราในกล้วยไม้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะต่างๆ ด้วยตาเปล่า ได้แก่ลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี สังเกตลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ลักษณะของเส้นใย การสร้างเซลล์โมนิลอยด์

### 3.3.2 การระบุเอกลักษณ์ของราในรากกล้วยไม้ด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

การตรวจสอบสายพันธุ์ราที่แยกได้โดยศึกษาลำดับเบสในสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) มีวิธีการ ดังนี้

#### 3.3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยราที่แยกได้จากข้อ 2 เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Potato Dextrose Broth บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำเส้นใยที่ได้ประมาณ 50 ถึง 100 มิลลิกรัม บดตัวอย่างในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องบดด้วยความถี่ นาน 30 วินาที ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยด้วย Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ตามรายงานของ Zhou และคณะ (1999)

#### 3.3.2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ของรา ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์

ITS1 มีลำดับเบสคือ 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' และ

ITS4 มีลำดับเบสคือ 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' (White และคณะ, 1990)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ประกอบด้วยสารต่างๆ ที่ใช้ทำปฏิกิริยา ดังตารางที่ 3

**ตารางที่** 3 สาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

| สาร | ความเข้มข้นสุดท้าย | ปริมาตร(ปริมาตรรวม 50 µl) |
|---|---|---|
| 10X Taq PCR buffer without $MgCl_2$ | 1X | 5.0 |
| 2mM dNTP mix | 0.2 mM ของแต่ละชนิด | 5.0 |
| 5u/µl *Taq* DNA Polymerase | 1.25 u/50 µl | 0.5 |
| 25mM $MgCl_2$ | 1.5 mM | 3.0 |
| 2 mM Forward Priner | 2.0 µM | 2.5 |
| 2 mM Reverse Primer | 2.0 µM | 2.5 |
| DNA template | 10 pg -1 µg | 5.0 |
| Sterilized distilled water | | 26.5 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ โดยกำหนดสภาวะดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation | 94 | องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที | |
| Amplification | | | |
| Denaturation | 94 | องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที | 31 รอบ |
| Annealing | 51 | องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที | |
| Extension | 72 | องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที | |
| Final Extension | 72 | องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที | |
| Holding | 4 | องศาเซลเซียส | |

3.3.2.3 **ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ**

แยกขนาดโมเลกุลผ่านรูพรุนในแผ่นเจลภายใต้สนามไฟฟ้า (electrophoresis) บนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE 0.5 เท่า ที่เติมสีย้อมกรดนิวคลิอิก SYBR safe โดยเจือจางเป็น 1:10,000 เท่าของสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (ภาคผนวก ค) ผสมผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับสีติดตาม ในอัตราส่วน 5:2 ดูดสารผสมทั้งหมดหยอดลงในช่องบนแผ่นเจลอะกาโรส ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับอุปกรณ์แยกขนาดโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่ถึงตำแหน่งที่ต้องการ เปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานที่มีความยาวต่างๆ ภายใต้แสงอัลตราไวเลตที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร

3.3.2.4 **การหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง** ITS

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ที่ผ่านการตรวจสอบและให้ผลที่ชัดเจน ส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ณ สาธารณรัฐเกาหลี ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส รุ่น Biosystems 3730XL sequencers

3.3.2.5 **การสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ**

นำลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของราที่แยกได้ มาเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับเบสกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn (NCBI Advanced Blast Search) ทำการเลือกราที่มีรายงานว่าเป็นไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้มาจัดเรียงลำดับเบสใหม่ด้วยโปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ที่แยกได้ โดยใช้แบบจำลอง Neighbour-joining ด้วยโปรแกรม PAUP*

4.08b (PPC) Swofford (1999) วิเคราะห์ Neighbour-joining ด้วยแบบจำลอง Kimura's two parameter และคำนวณค่า Bootstrap ซ้ำ 1000 ครั้ง

### 3.4 การทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัย

คัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่แยกได้ เป็นตัวแทนแต่ละสกุลจากแต่ละกลุ่มที่ได้จากผลการทดลองจากข้อ 3.3.2.5 มาทดสอบ นำฝักกล้วยไม้ *D. pulcherrima* ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและน้ำประปา จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวในตู้ปลอดเชื้อโดยนำฝักกล้วยไม้จุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และลนไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ทันที ผ่าฝักกล้วยไม้ด้วยใบมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเมล็ดลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำเมล็ดกล้วยไม้ที่ได้มาทดสอบการงอกของเมล็ด โดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เมล็ดกล้วยไม้บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Oat Meal Agar (ภาคผนวก ก)

ชุดการทดลองที่ 2 เมล็ดกล้วยไม้บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Oat Meal Agar ร่วมกับราไมคอร์ไรซาที่ทดสอบ

ชุดการทดลองที่ 3 เมล็ดกล้วยไม้บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Vacin และ Went (ภาคผนวก ก)

โดยทำการเพาะเมล็ดในจานเพาะเลี้ยง บรรจุอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร หากเป็นชุดการทดลองที่ 2 เตรียมราไมคอร์ไรซาทดสอบโดยตัดเส้นใยราที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร PDA ขนาดกว้างxยาว 5x5 มิลลิเมตรวางตรงกลางจานเพาะเลี้ยง และวางกระดาษกรองหมายเลข 1 บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ ย้ายเมล็ดที่แขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อโดยใช้ลูป ลงบนกระดาษกรอง แต่ละชุดทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง เพาะเมล็ดในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง จนปรากฏลักษณะที่คล้ายใบ นำไปเลี้ยงต่อในที่มีแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงเฉลี่ย 30-35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของเมล็ดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 เดือน ด้วยกล้องจุลทรรศน์สามมิติ

#### 3.4.1 การประเมินการงอกของเมล็ด และการเจริญกล้ากล้วยไม้

การงอกของเมล็ด และการเจริญของกล้ากล้วยไม้เมล็ดสกุล *D. pulcherrima* แบ่งเป็น 5 ระยะ ปรับปรุงจากรายงานของ Batty และคณะ (2001) การประเมินระยะการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherrima* ดังตารางที่ 4

**ตารางที่** 4 ระยะการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherrima*

| ระยะ | ลักษณะที่ปรากฏ |
|---|---|
| 0 | เมล็ดกล้วยไม้ที่ยังไม่งอกมีเปลือกหุ้มเมล็ด |
| 1 | เอ็มบริโอขยายขนาด เปลือกหุ้มเมล็ดเริ่มปริ และหลุดออกในที่สุด |
| 2 | โปรโตคอร์มมีไรซอยด์ปรากฏ |
| 3 | โปรโตคอร์มมีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด |
| 4 | เริ่มปรากฏใบแท้จริง |
| 5 | ใบขยายขนาด และมีการสร้างราก |

การหาเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ในแต่ละระยะคำนวณจากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เจริญในแต่ละระยะ}}{\text{จำนวนเมล็ดที่มีชีวิตทั้งหมด}}$$

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

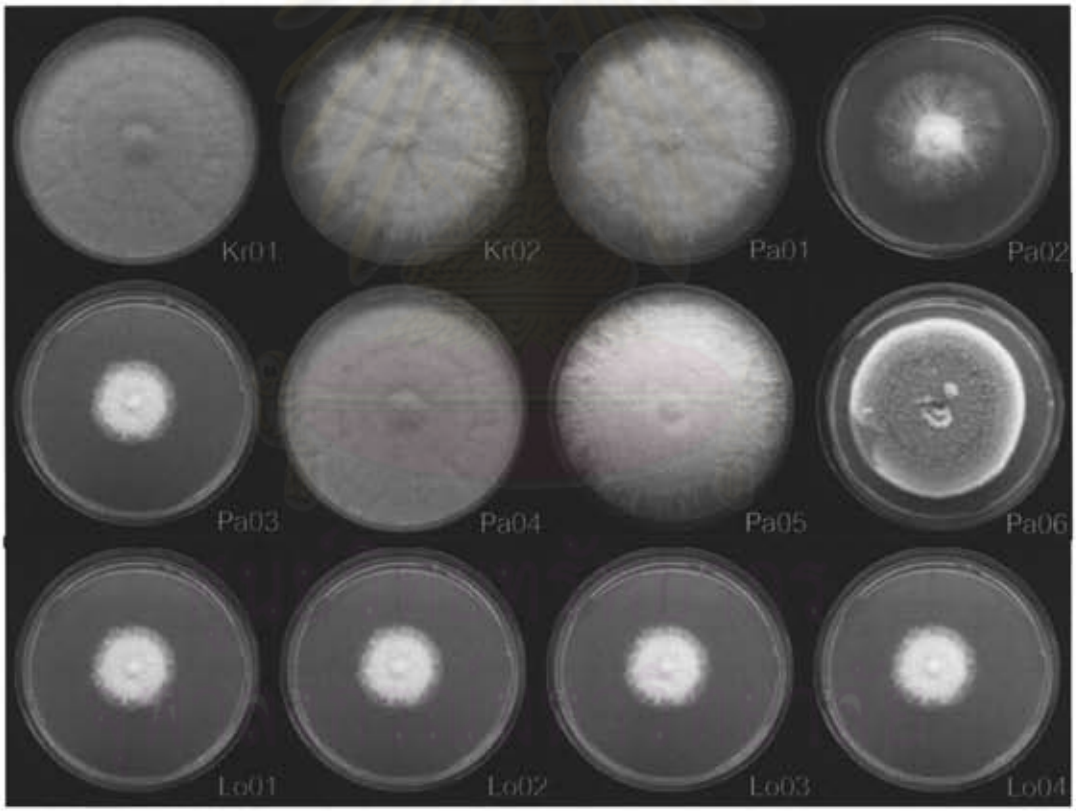
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 4

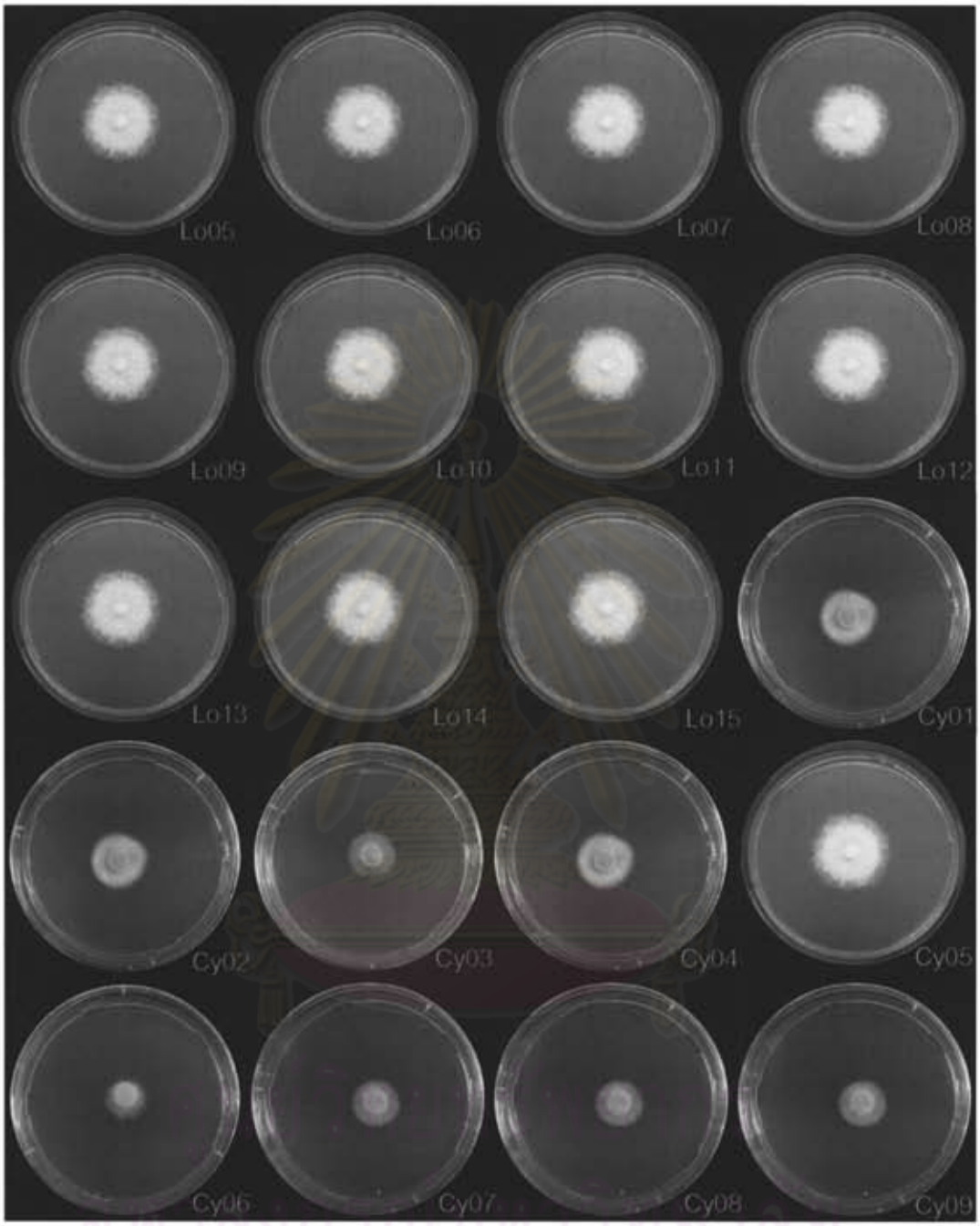
# ผลการทดลอง

## 4.1 การแยกราจากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima*

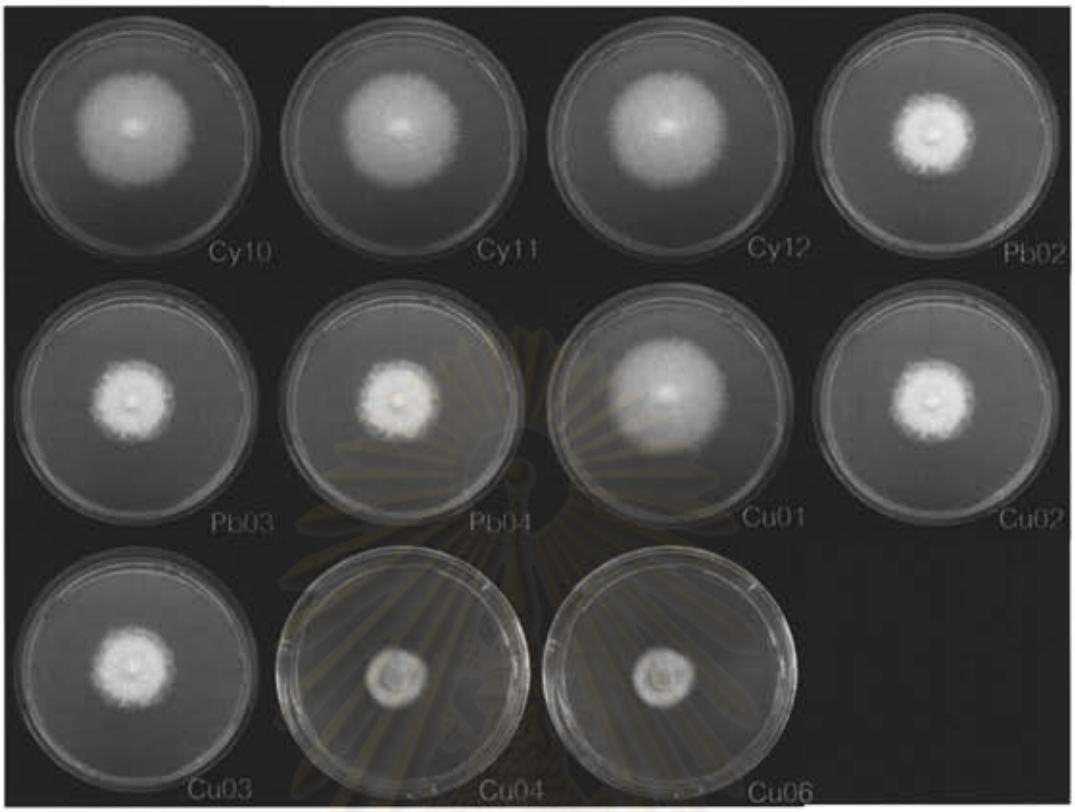
การแยกพีโลตอนของราจากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima* ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ได้ทั้งหมด 43 ไอโซเลต แบ่งเป็นจากจังหวัดกระบี่ 2 ไอโซเลต ชุมพร 5 ไอโซเลต ชัยภูมิ 12 ไอโซเลต พังงา 6 ไอโซเลต เพชรบูรณ์ 3 ไอโซเลต และเลย 15 ไอโซเลต โดยมีลักษณะโคโลนี บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA ที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4 ลักษณะเส้นใยราและความสามารถในการเจริญ ดังแสดงในตารางที่ 5




**รูปที่** 4 โคโลนีราที่แยกจากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน




**รูปที่ 4** (ต่อ) โคโลนีราที่แยกจากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน




**รูปที่** 4 (ต่อ) โคโลนีราที่แยกจากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่** 5 ลักษณะเส้นใยและความสามารถในการเจริญของราที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima*

| สถานที่เก็บ | รหัสรา | ลักษณะเส้นใยราบนอาหาร PDA | ความสามารถในการเจริญ |
|---|---|---|---|
| กระบี่ | Kr01 | เส้นใยละเอียด ฟู หนาแน่น สีขาว เห็นเป็นวง | +++ |
| กระบี่ | Kr02 | เส้นใยละเอียด หนาแน่น | +++ |
| ชุมพร | Cu01 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญได้เร็ว | ++ |
| ชุมพร | Cu02 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญช้า | ++ |
| ชุมพร | Cu03 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญช้า | ++ |
| ชุมพร | Cu04 | เส้นใยละเอียดสีขาว สลับเหลืองอ่อน | + |
| ชุมพร | Cu06 | เส้นใยละเอียดสีขาว สลับเหลืองอ่อน | + |
| ชัยภูมิ | Cy01 | เส้นใยละเอียดสีขาว สลับเหลืองอ่อน | + |
| ชัยภูมิ | Cy02 | เส้นใยละเอียดสีขาว สลับเหลืองอ่อน | + |
| ชัยภูมิ | Cy03 | เส้นใยละเอียดสีขาว | + |
| ชัยภูมิ | Cy04 | เส้นใยละเอียดสีขาว สลับเหลืองอ่อน | + |
| ชัยภูมิ | Cy05 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญได้น้อย | ++ |
| ชัยภูมิ | Cy06 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญได้น้อย | + |
| ชัยภูมิ | Cy07 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญได้น้อย | + |
| ชัยภูมิ | Cy08 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญได้น้อย | + |
| ชัยภูมิ | Cy09 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญได้น้อย | + |
| ชัยภูมิ | Cy10 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญได้เร็ว | ++ |
| ชัยภูมิ | Cy11 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญได้เร็ว | ++ |
| ชัยภูมิ | Cy12 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญได้เร็ว | ++ |
| พังงา | Pa01 | เส้นใยละเอียด ฟู หนาแน่น สีขาว | +++ |
| พังงา | Pa02 | เส้นใยละเอียด ฟู สีขาว กระจุกด้านใน | ++ |

หมายเหตุ ความสามารถในการเจริญประเมินจากเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในเวลา 6 วัน +++ หมายถึง โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 เซนติเมตร ++ หมายถึง โคโลนีมีศูนย์กลางโคโลนีระหว่าง 3 ถึง 5 เซนติเมตร + หมายถึง โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีน้อยกว่า 3 เซนติเมตร

**ตารางที่** 5 (ต่อ) ลักษณะเส้นใยและความสามารถในการเจริญของราที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ *D. pulcherrima*

| สถานที่เก็บ | รหัสรา | ลักษณะเส้นใยราบนอาหาร PDA | ความสามารถในการเจริญ |
|---|---|---|---|
| พังงา | Pa03 | เส้นใยละเอียด เจริญช้า | ++ |
| พังงา | Pa04 | เส้นใยละเอียดสีขาว | +++ |
| พังงา | Pa05 | เส้นใยหยาบสีขาว หนาแน่น | +++ |
| พังงา | Pa06 | เส้นใยละเอียด ตรงกลางสีเทาอมเขียว | +++ |
| เพชรบูรณ์ | Pb02 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญช้า | ++ |
| เพชรบูรณ์ | Pb03 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญช้า | ++ |
| เพชรบูรณ์ | Pb04 | เส้นใยละเอียดสีขาว เจริญช้า | ++ |
| เลย | Lo01 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo02 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo03 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo04 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo05 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo06 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo07 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo08 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo09 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo10 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo11 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo12 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo13 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo14 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |
| เลย | Lo15 | เส้นใยละเอียดสีขาว | ++ |

หมายเหตุ ความสามารถในการเจริญประเมินจากเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในเวลา 6 วัน +++ หมายถึง โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 เซนติเมตร ++ หมายถึง โคโลนีมีศูนย์กลางโคโลนีระหว่าง 3 ถึง 5 เซนติเมตร + หมายถึง โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีน้อยกว่า 3 เซนติเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

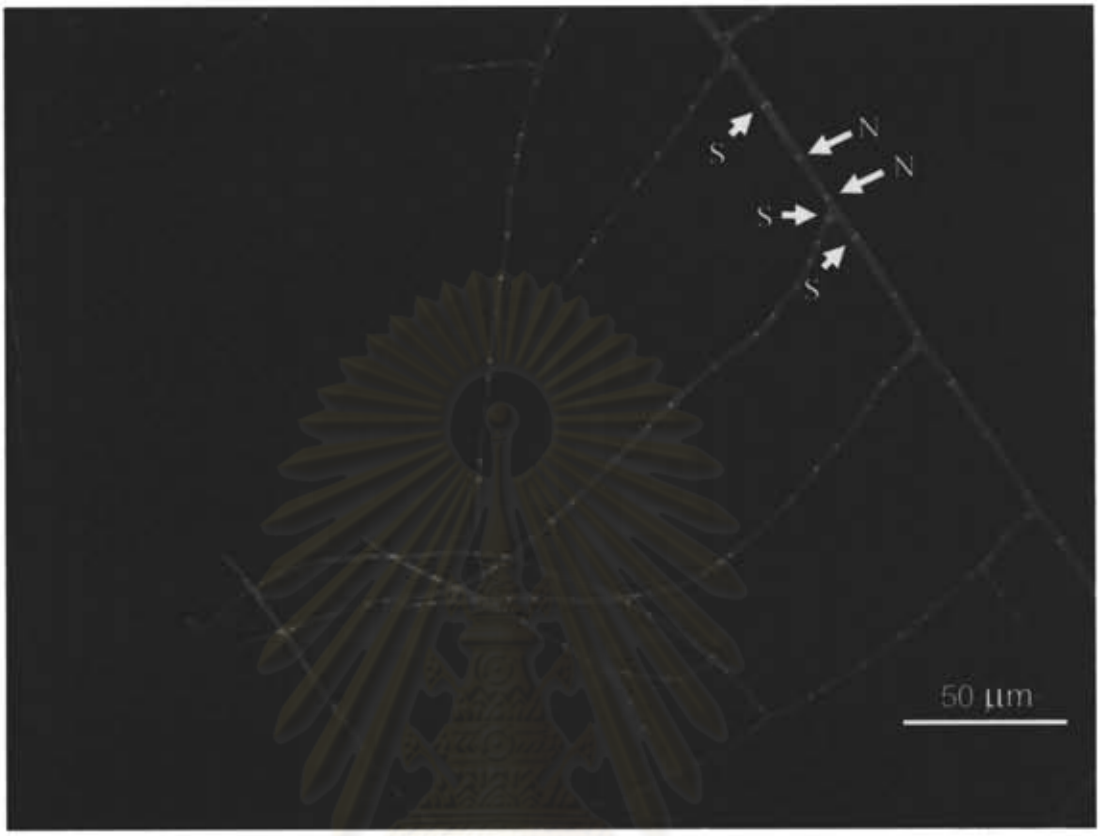
**4.2 การระบุเอกลักษณ์ของรา**

**4.2.1 การระบุเอกลักษณ์ของราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา**

แบ่งราที่แยกได้ออกเป็น 2 กลุ่มคือ ราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* มี 31 ไอโซเลต และรา อื่นๆ อีก 12 ไอโซเลต ราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* คือ เส้นใยมีผนังกั้น เส้นใยราใหม่ตั้งฉากกับเส้นใยราเดิม ไม่สร้างสปอร์ ดังรูปที่ 5 และทุกไอโซเลตที่แยกได้มีจำนวนนิวเคลียส 2 นิวเคลียสภายในเซลล์ ดังรูปที่ 6 และสร้างเส้นใยม้วนขดมีลักษณะคล้ายพีโลตอนที่พบภายในเซลล์พืชบนอาหารอาหารเพาะเลี้ยง PDA ดังรูปที่ 7

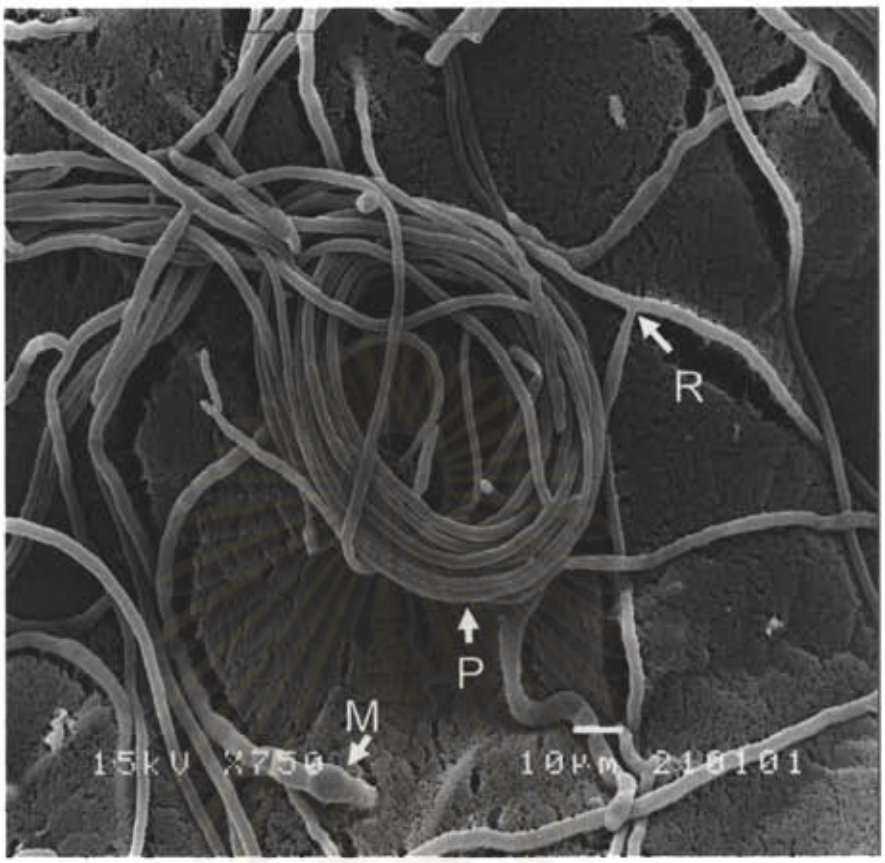
**รูปที่** 5 เส้นใยราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ที่มีเส้นใยตั้งฉาก (แสดงดังลูกศร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 6** เส้นใยราที่มีลักษณะคล้ายราในกลุ่ม *Rhizoctonia* เมื่อย้อมนิวเคลียสด้วยสีเรืองแสง DAPI (ภาคผนวก ง) ตัวอักษรบนรูปแสดงถึงผนังกั้นเส้นใยรา (S) และนิวเคลียส (N)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่** 7 เส้นใยภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (ภาคผนวก ค) ตัวอักษรบนรูปแสดงถึง พีโลตอน (P) ลักษณะเส้นใยตั้งฉากกับเส้นใยเดิม (R) และเซลล์โมนิลอยด์ (M)

การจัดจำแนกราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ตามหลักอนุกรมวิธาน

**Kingdom:** Fungi

**Phylum:** Basidiomycota

**Class:** Basidiomycetes

**Order:** Ceratobasidiales

**Family:** Ceratobasidiaceae

**Genus:** *Ceratorhiza* (Anamorph)

โคโลนีเจริญได้เร็วมาก มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน ลักษณะโคโลนีมีสีขาวคล้ายขนสัตว์ สร้างเส้นใยอากาศ โดยเส้นใยรา

กว้าง 2 ไมโครเมตร มีผนังกั้น เส้นใยย้อมไม่ติดสี เส้นใยใหม่สร้างตั้งฉากกับเส้นใยเดิม และสร้างเซลล์โมนิลอยด์รูปทรงกระบอก ดังรูปที่ 8

**รูปที่ 8** เส้นใยราขดตัวบนอาหารเพาะเลี้ยง PDA คล้ายพีโลตอนภายในเซลล์ และลักษณะเซลล์โมนิลอยด์รูปทรงกระบอก (แสดงดังลูกศร)

**Kingdom:** Fungi

**Phylum:** Basidiomycota

**Class:** Basidiomycetes

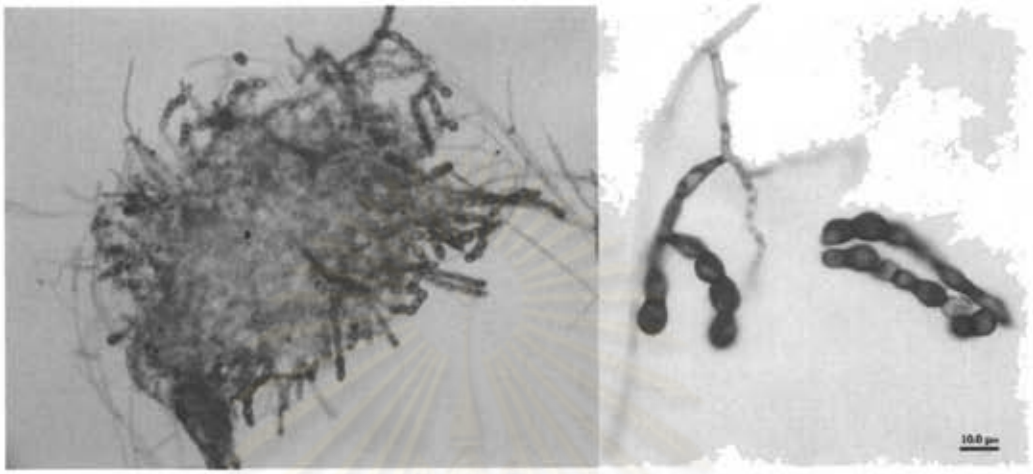
**Order:** Tulasnellales

**Family:** Tulasnellaceae

**Genus:** *Epulorhiza* (Anamorph)

โคโลนีเจริญได้ช้า มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 2.5 เซนติเมตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน โคโลนีมีสีขาว สร้างเส้นใยราอากาศ โดยเส้นใยรากว้าง 2 ไมโครเมตร มี

ผนังกั้น เส้นใยย้อมไม่ติดสี เส้นใยใหม่สร้างตั้งฉากเส้นใยเดิม และสร้างเซลล์โมนิลอยด์ค่อนข้างกลม ดังรูปที่ 9



**รูปที่** 9 กลุ่มเซลล์โมนิลอยด์ และ เส้นใยราที่สร้างเซลล์โมนิลอยด์รูปทรงค่อนข้างกลม

**4.2.2 การระบุเอกลักษณ์ของราด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล**

จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ได้ผลิตภัณฑ์ของราที่แยกได้จากพีโลตอนจำนวน 43 ไอโซเลต มีจำนวนคู่เบสประมาณ 600 ถึง 700 คู่เบส และเมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวไปหาลำดับเบส และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS กับฐานข้อมูลใน GenBank ให้ผลการเปรียบเทียบดังตารางที่ 6 ซึ่งแบ่งราได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ ได้แก่ราในสกุล *Epulorhiza* และ *Rhizoctonia* จำนวน 34 ไอโซเลตและ 3 ไอโซเลต ตามลำดับ การทดลองนี้มีลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ใกล้เคียงที่สุดกับราในสกุล *Epulorhiza* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank 4 ชนิด คือ *Epulorhiza* sp. ไอโซเลต Onv4.3 (AJ313449) ที่แยกได้จากกล้วยไม้ลูกผสม *Oncidium* varimyce x *O.* nona ในสวนกล้วยไม้ Mandai ประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์ โดยมีค่าความเหมือน 96 เปอร์เซ็นต์ *Epulorhiza* sp. ไอโซเลต Am8 (AJ313442) จากกล้วยไม้ลูกผสม *Archnis* "Maggie oei" จากพื้นที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ริมถนน Lim Chu Kang ในประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์ โดยมีค่าความเหมือน 98 เปอร์เซ็นต์ *Epulorhiza* sp. ไอโซเลต H0402-40 (FJ613194) ที่แยกได้จากกล้วยไม้ *Cymbidium faberi* ในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยมีค่าความเหมือน 93 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และ *Epulorhiza* sp. ไอโซเลต CH06X1-1 (EF393629) ที่แยกได้จากกล้วยไม้ *Cymbidium* sp. ในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยมีค่า

ความเหมือน 96 เปอร์เซ็นต์ สำหรับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ที่ใกล้เคียงที่สุดกับราในสกุล *Rhizoctonia* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มี 1 ชนิด คือ *Rhizoctonia* sp. ไอโซเลต Moam 3 (AJ318431) ที่แยกได้จากกล้วยไม้ในประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์ โดยมีค่าความเหมือน 98 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์และมีความใกล้เคียงกับรา *Ceratobasidium* sp. (DQ 102430) โดยมีค่าความเหมือน 95 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 2 กลุ่มราสกุลอื่นๆ ได้แก่ *Alternaria* sp. และ *Schizoplyllum commune* มีค่าความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ *Amanita* sp. มีค่าความเหมือน 96 ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ *Eutypella* sp. มีค่าความเหมือน 98 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และ *Fomes fomentarius* มีค่าความเหมือน 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ด้วยแบบจำลอง neighbor-joining ดังรูปที่ 10 แบ่งราออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยมี *Fomes fomentarius* (AY849305) เป็นราที่มีลำดับเบสแตกต่างจากมากพอ เพื่อแยกกลุ่มให้เห็นสายสัมพันธ์ภายในกลุ่มราที่ศึกษา

กลุ่ม A ราที่แยกได้จากจังหวัดกระบี่ ไอโซเลต Kr01 Kr02 และจังหวัดพังงา ไอโซเลต Pa04 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน มีค่า bootstrap สนับสนุน 75 เปอร์เซ็นต์

กลุ่ม B ราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับราในสกุล *Epulorhyza* แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย

กลุ่มที่ B1 ราที่แยกได้จากจังหวัดชุมพร ไอโซเลต Cu02 และ Cu03 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน มีค่า bootstrap สนับสนุน 66 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ B2 ราที่แยกได้จากจังหวัดเลย เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ พังงามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน มีค่า bootstrap สนับสนุน 94 เปอร์เซ็นต์ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ

กลุ่มที่ 1 ราที่แยกได้จังหวัดชัยภูมิ ไอโซเลต Cy06 มีค่า bootstrap สนับสนุน 66 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 2 ราที่แยกได้จังหวัดเลยทุกไอโซเลตมีความเหมือนกันมาก มีค่า bootstrap สนับสนุน 84 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 3 ราที่แยกได้จังหวัดเพชรบูรณ์ ไอโซเลต Pb02 Pb03 และ Pb04 ชัยภูมิ ไอโซเลต Cy05 และพังงา ไอโซเลต Pa03 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน มีค่า bootstrap สนับสนุน 94 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ B3 ราที่แยกได้จากจังหวัดชัยภูมิ ไอโซเลต Cy03 Cy08 Cy07 และ Cy09 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน มีค่า bootstrap สนับสนุน 93 เปอร์เซ็นต์

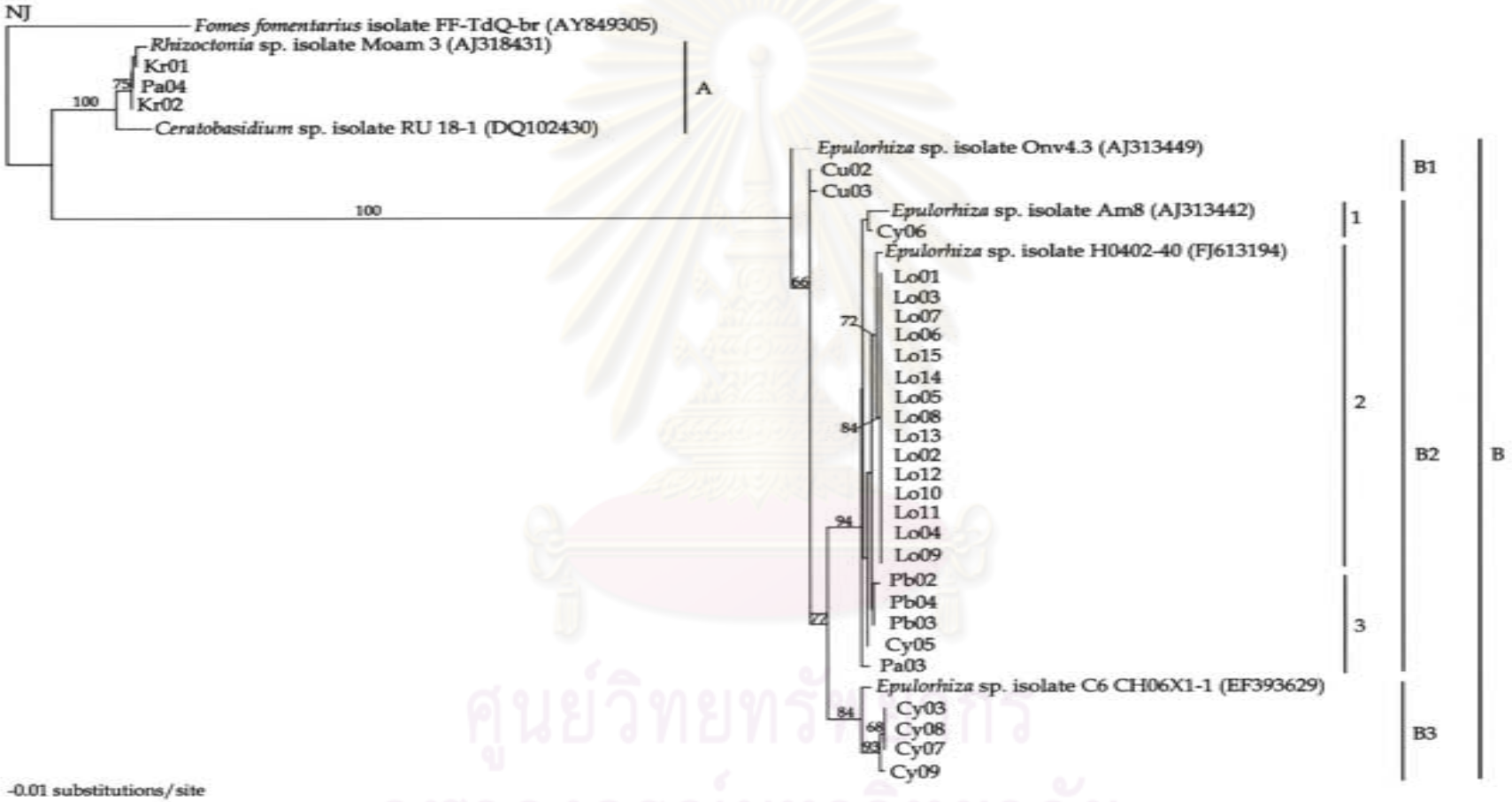
**ตารางที่ 6** การระบุเอกลักษณ์ของราจากแหล่งต่างๆ โดยอาศัยลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS

| จังหวัด | ไอโซเลต | ราที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันใกล้เคียงที่สุด และ Accession codes | | จำนวนเบสตัวอย่างเทียบกับจำนวนเบสอ้างอิง (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน) |
|---|---|---|---|---|
| กระบี่ | Kr01 | *Rhizoctonia* sp. | AJ318431 | 608/612 (99%) |
| | Kr02 | *Rhizoctonia* sp. | AJ318431 | 611/615 (99%) |
| ชุมพร | Cu01 | *Eutypella* sp. | FJ172283 | 466/468 (99%) |
| | Cu02 | *Epulorhiza* sp. | AJ313449 | 481/499 (96%) |
| | Cu03 | *Epulorhiza* sp. | AJ313449 | 471/486 (96%) |
| | Cu04 | *Amanita* sp. | AY208789 | 527/535 (98%) |
| | Cu06 | *Amanita* sp. | AF085492 | 500/520 (96%) |
| ชัยภูมิ | Cy01 | *Amanita* sp. | AY208789 | 561/570 (98%) |
| | Cy02 | *Amanita* sp. | AY208789 | 562/570 (98%) |
| | Cy03 | *Epulorhiza* sp. | EF393629 | 515/533 (96%) |
| | Cy04 | *Amanita* sp. | AY208789 | 562/570 (98%) |
| | Cy05 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 512/517 (99%) |
| | Cy06 | *Epulorhiza* sp. | AJ313442 | 553/564 (98%) |
| | Cy07 | *Epulorhiza* sp. | EF393629 | 574/592 (96%) |
| | Cy08 | *Epuorhiza* sp. | EF393629 | 574/592 (96%) |
| | Cy09 | *Epuorhiza* sp. | EF393629 | 573/592 (96%) |
| | Cy10 | *Eutypella* sp. | EF488380 | 470/474 (99%) |
| | Cy11 | *Eutypella* sp. | FJ172283 | 495/501 (98%) |
| | Cy12 | *Eutypella* sp. | FJ172283 | 498/501 (99%) |
| พังงา | Pa01 | *Rhizoctonia* sp. | AJ318431 | 386/392 (98%) |
| | Pa02 | *Fomes fomentarius* | AY849305 | 570/630 (91%) |
| | Pa03 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 555/569(97%) |
| | Pa04 | *Rhizoctonia* sp. | AJ318431 | 608/612(99%) |
| | Pa05 | *Schizophyllum commune* | FJ478109 | 629/629 (100%) |
| | Pa06 | *Alternaria* sp. | AY154699 | 570/570 (100%) |

**ตารางที่ 6** (ต่อ) การระบุเอกลักษณ์ของราจากแหล่งต่างๆ โดยอาศัยลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS

| จังหวัด | ไอโซเลต | ราที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันใกล้เคียงที่สุด และ Accession codes | | จำนวนเบสตัวอย่างเทียบกับจำนวนเบสอ้างอิง (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน) |
|---|---|---|---|---|
| เพชรบูรณ์ | Pb02 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 480/511 (93%) |
| | Pb03 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 469/470 (99%) |
| | Pb04 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 467/470 (99%) |
| เลย | Lo01 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo02 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo03 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo04 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo05 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo06 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo07 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo08 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo09 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo10 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo11 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo12 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo13 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo14 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |
| | Lo15 | *Epulorhiza* sp. | FJ613194 | 614/619 (99%) |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่** 10 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยแบบจำลอง Neighbor-joining

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**4.3 การทดสอบการงอกของเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลอง**

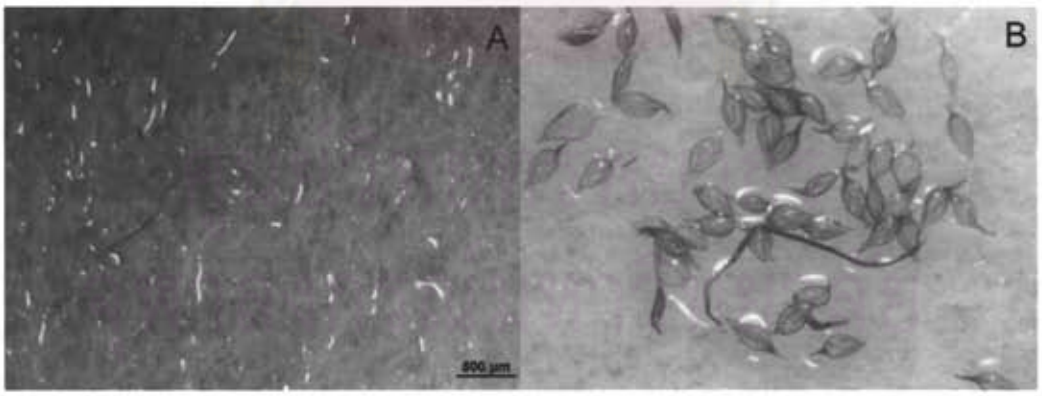
จากการนำเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherrima* มาทดสอบการงอกและการพัฒนาของเมล็ดโดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เมล็ดกล้วยไม้เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Oat Meal Agar

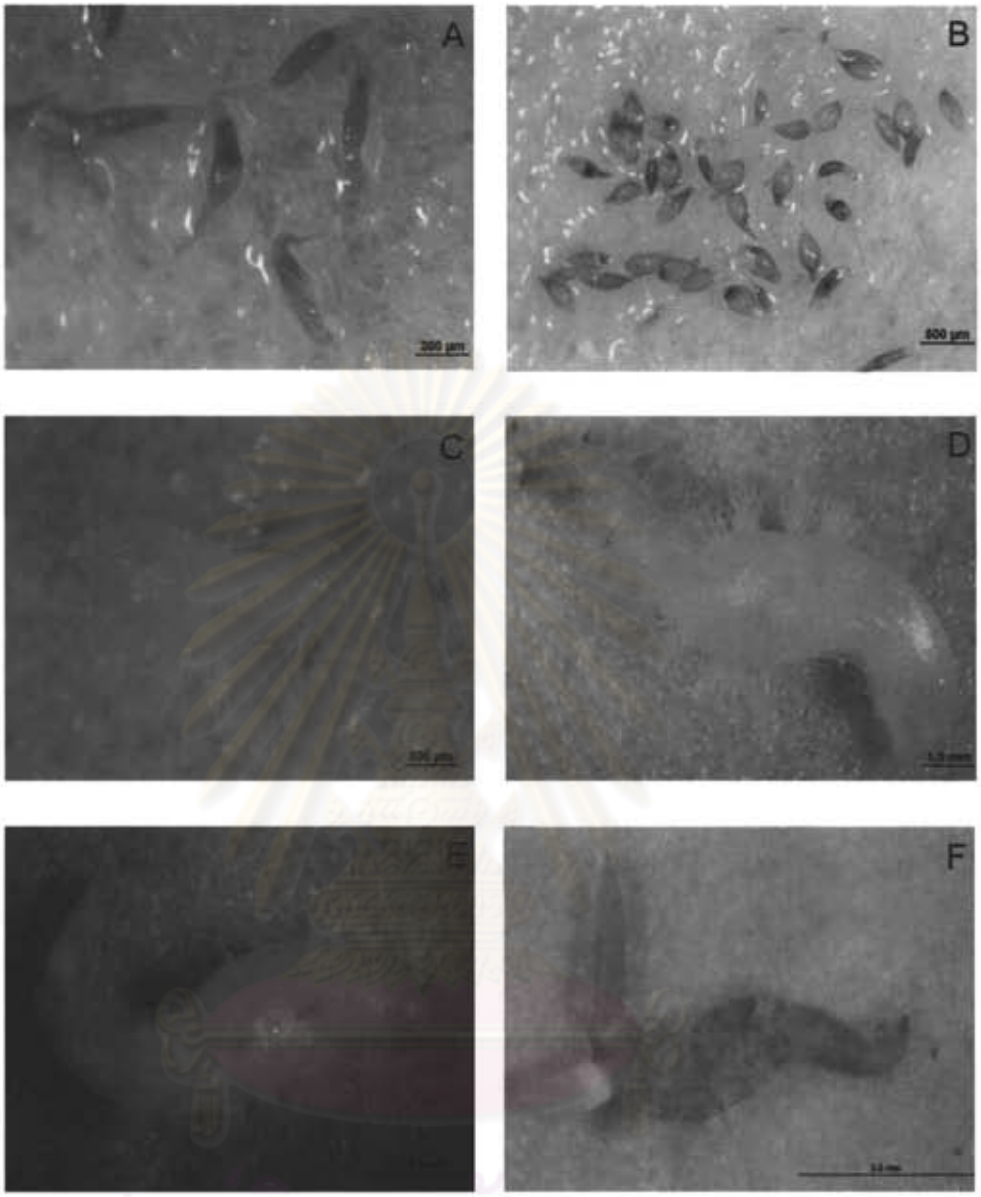
ชุดการทดลองที่ 2 เมล็ดกล้วยไม้เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Oat Meal Agar ร่วมกับราที่แยกได้จากรากกล้วยไม้จำนวน 8 ไอโซเลต โดยเป็นตัวแทนราไมคอร์ไรซาของแต่ละกลุ่มที่ได้จากแผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และราในสกุลอื่นๆ ที่แยกได้ ได้แก่ ไอโซเลต Kr01 Cu02 Cy06 Lo01 Pb02 Cy03 และ Cy01

ชุดการทดลองที่ 3 เมล็ดกล้วยไม้เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin และ Went

โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด และสังเกตการณ์การเปลี่ยนแปลง ใน 1 เดือน พบว่าทุกชุดการทดลองเมล็ดพัฒนาถึงระยะที่ 1 โดยชุดการทดลองที่ 1 มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอก 5.17 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 2 และ 3 มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ในชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 ที่เพาะเมล็ดร่วมกับราไอโซเลต Cu02 Cy01 Cy03 Cy06 Lo01 และ Pb02 เมล็ดจะพัฒนาได้ถึงระยะที่ 1 เท่านั้น (รูปที่ 11) สำหรับชุดการทดลองที่ 2 ที่เพาะเมล็ดร่วมกับราไอโซเลต Kr01 และชุดการทดลองที่ 3 พบว่ามีการพัฒนาของเมล็ดจนถึงระยะที่ 5 ดังรูปที่ 12 และ 13 ตามลำดับ




**รูปที่** 11 เมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherrima* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Oat Meal Agar บ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน A. เมล็ดไม่เจริญ B. เอ็มบริโอขยายขนาด เมล็ดบวมขึ้น




**รูปที่** 12 การงอกและการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ระยะต่างๆ บนอาหาร Oat Meal Agar ร่วมกับ ราไอโซเลต Kr01

A. เมล็ดกล้วยไม้ไม่เจริญ B. เอ็มบริโอขยายขนาดจนดันเปลือกหุ้มเมล็ด เมล็ดบวมขึ้น

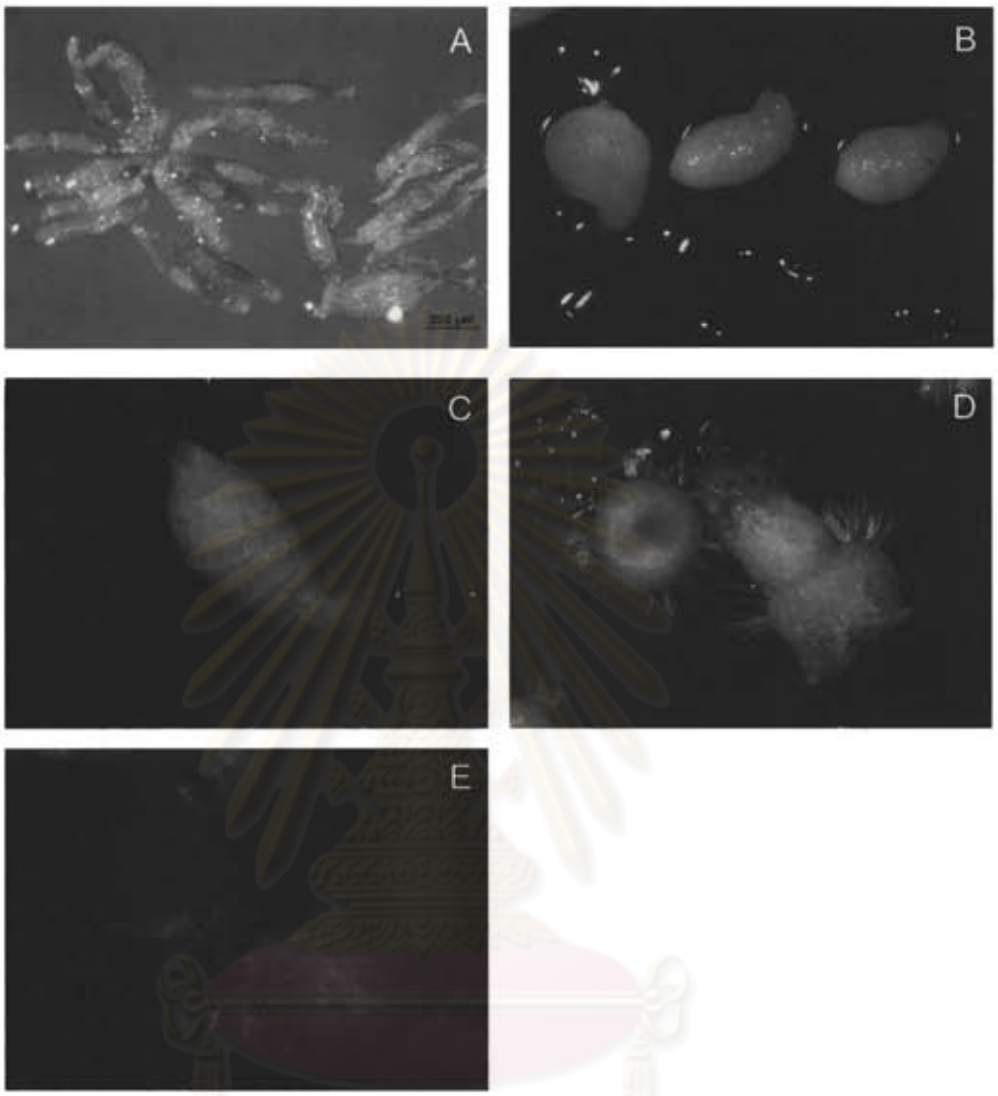
C. โปรโตคอร์มขยายใหญ่ขึ้นมีการสร้างไรซอยด์

D.โปรโตคอร์มขยายใหญ่ขึ้น ไรซอยด์เพิ่มขึ้น มีการสร้างเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอด

E. โปรโตคอร์มขยายใหญ่ขึ้น มีใบปรากฏที่ปลายยอด

F. โปรโตคอร์มขยายใหญ่ขึ้น ใบขยายขนาดตามแนวยาว มีรากปรากฏ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่** 13 การงอกและการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ระยะต่างๆ บนอาหาร Vacin และ Went

A. เมล็ดกล้วยไม้ไม่เจริญ

B. เอ็มบริโอขยายขนาดจนดันเปลือกหุ้มเมล็ด

C. โปรโตคอร์มขยายใหญ่ขึ้น มีไรซอยด์ปรากฏตรงข้ามกับเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอด

D. โปรโตคอร์มขยายใหญ่ขึ้น มีรอยคอดบริเวณก่อนถึงปลายยอด และมีไรซอยด์ปรากฏบริเวณรอยคอดบริเวณก่อนถึงปลายจำนวนมาก

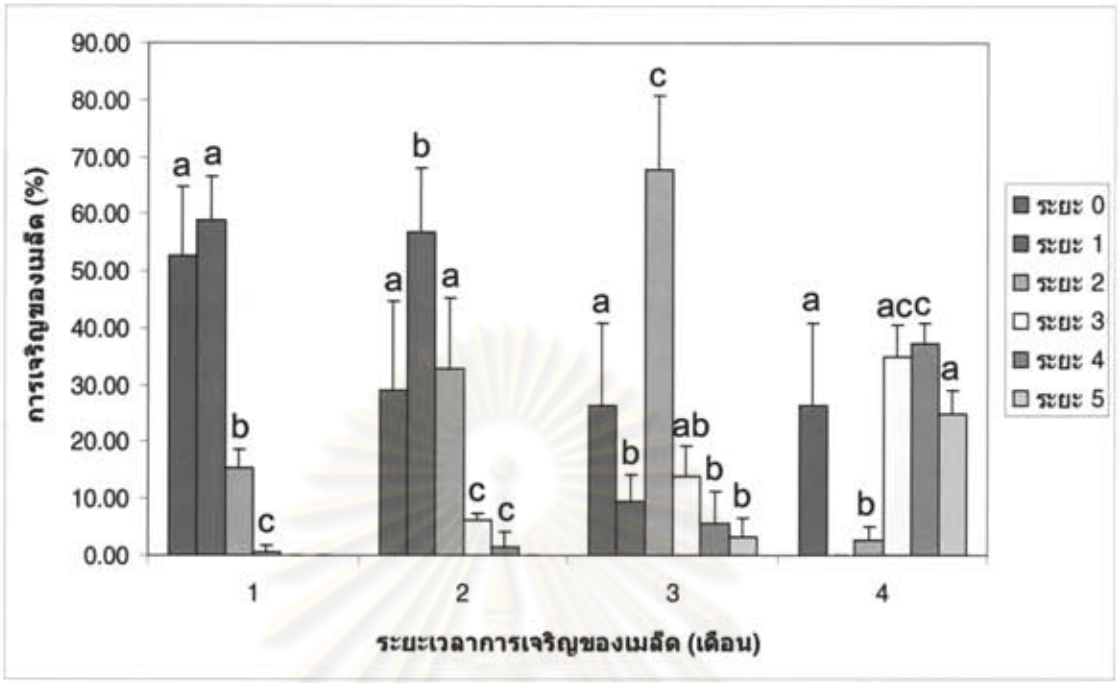
E. โปรโตคอร์มขยายใหญ่ขึ้น มีใบปรากฏที่ปลายยอด และมีไรซอยด์ปรากฏบริเวณรอยคอดบริเวณก่อนถึงปลายจำนวนมาก

จากรูปที่ 12 และ 13 จะเห็นว่าเมล็ดกล้วยไม้มีลักษณะการพัฒนาได้แตกต่างกันในการเพาะเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยบนอาหาร OMA และการเพาะเมล็ดแบบปราศจากเชื้อบนอาหาร vw มีระยะการงอกและพัฒนาของโปรโตคอร์มจนเป็นต้นอ่อนได้ ดังตารางที่ 7

**ตารางที่** 7 การเปรียบเทียบลักษณะการงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ระยะต่างๆ ในการเพาะเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยและในสภาพปลอดเชื้อ

| ระยะ | ลักษณะการเจริญบนอาหาร OMA ร่วมกับรา ไอโซเลต Kr01 | ลักษณะการเจริญบนอาหาร VW |
|---|---|---|
| 0 | เมล็ดเรียวยาว มีเปลือกหุ้ม ภายในมีเอ็มบริโอที่ยังไม่มีการพัฒนา | เมล็ดเรียวยาว มีเปลือกหุ้ม ภายในมีเอ็มบริโอที่ยังไม่มีการพัฒนา |
| 1 | เมล็ดที่เริ่มพัฒนาในระยะแรก เอ็มบริโอขยายขนาด จนเมล็ดหุ้มเปลือกหุ้มเมล็ดปริ และฉีกออก | เมล็ดที่เริ่มพัฒนาในระยะแรก เอ็มบริโอขยายขนาด จนเมล็ดหุ้มเปลือกหุ้มเมล็ดปริ และฉีกออก |
| 2 | เมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มมีไรซอยด์ โปรโตคอร์มขยายขนาดตามแนวยาว | เมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มขยายขนาดค่อนข้างกลมรี มีไรซอยด์ปรากฏเล็กน้อย |
| 3 | โปรโตคอร์มขยายขนาดมีไรซอยด์เพิ่มขึ้น เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเนื้อเจริญส่วนปลาย | โปรโตคอร์มขยายขนาด เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย |
| 4 | โปรโตคอร์มขนายขนาดมีไรซอยด์ บริเวณเนื้อเยื่อเจริญเปลี่ยนแปลง ใบปรากฏ | โปรโตคอร์มขยายขนาด เริ่มปรากฏใบ และมีไรซอยด์เกิดขึ้นที่ปลายด้านตรงข้ามกับใบจำนวนมาก |
| 5 | โปรโตคอร์มเริ่มพัฒนาเป็นต้นอ่อน ใบขยายขนาด และมีรากปรากฏข้างๆ ใบ | โปรโตคอร์มพัฒนาเป็นต้นอ่อน ใบขยายขนาด และมีรากปรากฏ |

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับรา *Ceratorhiza* ไอโซเลต Kr01 มีการงอกและพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ในระยะต่างๆ ภายในเวลา 4 เดือนให้ผลดังรูปที่ 14




**รูปที่** 14 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. pulcherrima* เจริญร่วมกับราไอโซเลต Kr01 เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง Oat meal agar ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือนตามลำดับ ตัวอักษรต่างกันบนแท่งฮิสโทแกรมในแต่ละช่วงเวลาหมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระยะการเจริญของเมล็ด ($P \leq 0.05$)

จากรูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่าภายใน 1 เดือนเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherrima* ที่เจริญร่วมกับราไอโซเลต Kr01 พัฒนาได้ในระยะที่ 1 พบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด 59.02 ± 7.51 เปอร์เซ็นต์ และมีบางเมล็ดที่เจริญในระยะที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ขณะในเดือนที่ 2 เมล็ดในระยะที่ 1 ยังคงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระยะอื่นๆ โดยเมล็ดในระยะ 0 จะลดลง ขณะที่เมล็ดในระยะ 1 บางส่วนจะพัฒนาไปยังระยะต่อไป อย่างไรก็ตามในเดือนที่ 3 โปรโตคอร์มส่วนใหญ่จะพัฒนาอยู่ในระยะที่ 2 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับระยะอื่นๆ และมีเมล็ดบางส่วนพัฒนาต่อไปในระยะที่ 3 4 และ 5 ตามลำดับ จะเห็นว่าการปรากฏของใบและรากเริ่มปรากฏในเดือนที่ 3 และในเดือนที่ 4 โปรโตคอร์มส่วนใหญ่จะมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และปรากฏใบและรากอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นความสำเร็จของการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับราไมคอร์ไรซา

# บทที่ 5

## อภิปรายผลการทดลอง

ราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในไฟลัม Basiomycota เดิมอยู่ในกลุ่มราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ปัจจุบันนำวิธีชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการระบุเอกลักษณ์ของรา พบว่านอกจากราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* แล้วราบางชนิดในชั้น homobasidiomycetes และราในไฟลัม Ascomycota บางชนิด (ตารางที่ 8) ดังนั้นการเลือกศึกษาเฉพาะราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* อาจทำให้การศึกษาไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ไม่สมบูรณ์ การแยกราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้ทำได้ 2 วิธี คือการแยกราจากพีโลตอน และการแยกราโดยวางชิ้นส่วนของกล้วยไม้บนอาหารเพาะเลี้ยงรา ผู้วิจัยเลือกวิธีแยกราจากพีโลตอน เพื่อให้แน่ใจว่าราที่แยกได้อาศัยอยู่ในเซลล์ของรากกล้วยไม้จริง และแสดงให้เห็นว่าในรากกล้วยไม้อาจมีราอาศัยอยู่มากกว่าหนึ่งชนิด การระบุเอกลักษณ์ของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของราที่เหมาะสมกับกล้วยไม้ อย่างไรก็ตามการทดสอบการงอกแบบพึ่งพาอาศัยเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ทดสอบความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ การระบุราชนิดใดเป็นราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้จึงต้องใช้ความระมัดระวัง เพราะนอกจากความสัมพันธ์ของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้แล้วยังมักพบความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้อีกด้วย

จากการทดลองพบว่ารากกล้วยไม้ส่วนใหญ่สามารถสังเกตเห็นพีโลตอนของราได้ ยกเว้นรากที่ยังอ่อนอยู่ แต่เมื่อแยกพีโลตอนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าพีโลตอนจำนวนมากไม่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยง PDA อาจมีสาเหตุจากเป็นพีโลตอนที่กำลังสลายตัว และไม่มีชีวิตแล้ว หรืออีกสาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากพีโลตอนของราไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเพาะเลี้ยง จึงมีการนำวิธีชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ตรวจสอบราที่อาศัยอยู่ในรากกล้วยไม้โดยตรง (Kristiansen และคณะ, 2001, 2004) แต่ก็ไม่สามารถสรุปได้ว่าราชนิดที่พบเป็นไมคอร์ไรซาหรือไม่ จนกว่าจะมีหลักฐานบ่งชี้ว่าราอาศัยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับกล้วยไม้

ในการทดลองนี้สามารถแบ่งราออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มราอื่นๆ และราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ราในกลุ่มอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 6) ได้แก่ ราสกุล *Amanita Fomes* และ *Schizophyllum* จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota มีรายงานว่าราในไฟลัมนี้บางชนิดมีความสัมพันธ์แบบ ectomycorrhiza กับพืชยืนต้นชนิดอื่น Girlanda และคณะ (2006) รายงานว่ากล้วยไม้ *Limodorum* spp. มีความสัมพันธ์กับราสกุล *Russula* ในสาธารณรัฐ

ฝรั่งเศสและสาธารณรัฐอิตาลี Dearnaley และ Le Brocque (2006) รายงานว่ากล้วยไม้ *Dipodium humiltonianum* มีความสัมพันธ์กับราในวงศ์ Russulaceae ที่อยู่ดอกเห็ดอยู่ใต้ดิน โดยราในกลุ่มนี้จะถ่ายโอนสารอาหารจากพืชยืนต้นไปยังกล้วยไม้ ราสกุล *Eutypella* และ *Alternaria* ที่จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota และปัจจุบันมีรายงานว่าราในไฟลัมนี้บางชนิดเป็นไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ Bidartondo และคณะ (2004) รายงานว่าพบราสกุล Tuber ในกล้วยไม้ *Epipactis* spp. และระบุว่าราสกุล *Wilcoxina* และ *Phialophora* อาจมีบทบาทเป็นราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ ขณะที่ราทั้งสองสกุลที่แยกได้มีรายงานว่าเป็นผู้ย่อยสลายในระบบนิเวศ และเป็นราก่อโรคในพืชชนิดอื่น แต่จากการทดลองผู้วิจัยแยกราจากพีโลตอนในเซลล์คอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าราเหล่านี้อาจเข้ามาอาศัยในราก แต่ยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจน

ราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ *Epulorhiza* spp. และ *Ceratorhiza* spp.

*Epulorhiza* spp. เป็นระยะไม่สมบูรณ์เพศของราสกุล *Tulasnella* และ *Ceratorhiza* spp. เป็นระยะไม่สมบูรณ์เพศของราสกุล *Ceratobasidium* ราทั้งสองสกุลนี้มีรายงานว่าเป็นราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้อาศัยบนดิน และกล้วยไม้อิงอาศัยในหลายประเทศ

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดจำแนกราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ได้เป็น 2 กลุ่ม ตามรูปแบบการเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยง ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์โมนิลอยด์ และจำนวนนิวเคลียสภายในเซลล์ สอดคล้องกับข้อมูลทางชีววิทยาโมเลกุล

จะเห็นได้ว่างานวิจัยส่วนใหญ่ที่เคยมีมาเป็นการศึกษาราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้เขตอบอุ่นซึ่งการศึกษาไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้เขตร้อนยังมีไม่มากนัก จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้แบ่งราออกได้ 6 กลุ่ม โดยทุกกลุ่มมีความใกล้เคียงกับราที่แยกได้จากสาธารณรัฐสิงคโปร์ สาธารณรัฐประชาชนจีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 8** ราที่แยกได้จากกล้วยไม้ให้อาศัยชนิดต่างๆ

| รา | กล้วยไม้ให้อาศัย | แหล่ง | รายการอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| *Phialophora* sp. | *Cypripedium candidum* | สหรัฐอเมริกา | Bidartondo และคณะ (2004) |
| | *C. fasciculatum* | สหรัฐอเมริกา | Bidartondo และคณะ (2004) |
| | *C. montanum* | สหรัฐอเมริกา | Bidartondo และคณะ (2004) |
| | *C. parviflorum* | สหรัฐอเมริกา | Bidartondo และคณะ (2004) |
| | *Plantanthera chlorantha* | สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี | Bidartondo และคณะ (2004) |
| *Wilcoxina* | *Epipactis atrorubens* | สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี | Bidartondo และคณะ (2004) |
| | *E. distans* | สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี | Bidartondo และคณะ (2004) |
| | *E. gigantea* | สหรัฐอเมริกา | Bidartondo และคณะ (2004) |
| *Epulorhiza* sp. | *Epidendrum conopseum* | สหรัฐอเมริกา | Zettler และคณะ (1998) |
| | *Eulophia flava* | สาธารณรัฐประชาชนจีน | Shan และคณะ (2002) |
| | *Habenaria macroceratitis* | สหรัฐอเมริกา | Stewart และ Zettler (2002) |
| | *Platanthera integra* | สหรัฐอเมริกา | Zettler และคณะ (2000) |
| | *P. praeclara* | สหรัฐอเมริกา | Sharma และคณะ (2003) |
| | *Spiranthes brevilabris* | สหรัฐอเมริกา | Minso และคณะ (2001) |
| | *S. hongkongensis* | เขตบริหารพิเศษฮ่องกง | Shan และคณะ (2002) |
| | *Epidendrum rigidum* | สหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล | Pereira และคณะ (2003) |
| | *Polystachya concreta* | สหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล | Pereira และคณะ (2003) |
| *E. albertaensis* | *Platanthera orbiculata* | แคนาดา | Currah และคณะ (1990) |
| *E. anaticula* | *Calypso bulbosa* | แคนาดา | Currah และคณะ (1987) |
| | *Coeloglossum viride* | แคนาดา | Currah และคณะ (1990) |
| | *Platanthera dilatata* | แคนาดา | Currah และคณะ (1987) |
| | *P. hyperborea* | แคนาดา | Currah และคณะ (1990) |
| | *P. obtusata* | แคนาดา | Currah และคณะ (1987) |
| *E. calendulina* | *Amerorchis rotundifolia* | แคนาดา | Zelmer และ Currah (1995) |
| *E. inquilina* | *Platanthera clavellata* | สหรัฐอเมริกา | Currah และคณะ (1997) |
| | *P. cristata* | สหรัฐอเมริกา | Currah และคณะ (1997) |
| | *P. integrilabia* | สหรัฐอเมริกา | Currah และคณะ (1997) |
| *E. repens* | *Brassia gireoudiana* | สาธารณรัฐคอสตาริกา | Curtis (1993) |
| | *Goodyera schlechtendaliana* | ญี่ปุ่น | Masuhara และ Katsuya (1991) |
| | *Liparis krameri* | ญี่ปุ่น | Masuhara และ Katsuya (1991) |
| | *Microtis parviflora* | เครือรัฐออสเตรเลีย | Perkins และคณะ (1995) |
| | *Orchis fauriei* | ญี่ปุ่น | Masuhara และ Katsuya (1991) |
| | *Platanthera obtusata* | แคนาดา | Currah และคณะ (1987) |
| | *Spiranthes magnicamporum* | แคนาดา | Anderson (1991) |
| | *S. sinensis* | ญี่ปุ่น | Masuhara และ Katsuya (1994) |

**ตารางที่ 8** (ต่อ) ราที่แยกได้จากกล้วยไม้ให้อาศัยชนิดต่างๆ

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Ceratorhiza* sp. | *Habenaria quinqueseta* | สหรัฐอเมริกา | Stewart และ Zettler (2002) |
| | *Platanthera leucophaea* | สหรัฐอเมริกา | Zettler และคณะ (2001) |
| | *P. praeclara* | สหรัฐอเมริกา | Sharma และคณะ (2003) |
| | *Rodriguezia compacta* | สาธารณรัฐคอสตาริกา | Richardson และคณะ (1993) |
| | *Campylocentrum micranthum* | สาธารณรัฐคอสตาริกา | Richardson และคณะ (1993) |
| | *Coeloglossum viride* | แคนาดา | Currah และคณะ (1990) |
| *C. goodyerae-repentis* | *Goodyera repens* | ทวีปยุโรป | Constantin และ Dufour (1920) |
| | *Platanthera obtusata* | แคนาดา | Currah และคณะ (1990) |
| *C. pernacatena* | *Platanthera praeclara* | แคนาดา | Zelmer และ Currah (1995) |
| *Moniliopsis anomala* | *Coeloglossum viride* | แคนาดา | Currah และคณะ (1990) |
| | *Platanthera hyperborean* | แคนาดา | Currah และคณะ (1990) |
| *M. solani* | *Dactylorhiza purpurella* | ทวีปยุโรป | Marchisio และคณะ (1985) |
| | *Pterostylis acuminate* | เครือรัฐออสเตรเลีย | Perkins และ McGee (1995) |
| | *Rodriguezia compacta* | สาธารณรัฐคอสตาริกา | Richardson และคณะ (1993) |
| | *Spiranthes sinensis* | ญี่ปุ่น | Terashita (1982) |
| | *Vanilla* spp. | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Alconero (1969) |
| *Tulasnella* sp. | *Dactylorhiza majalis* | ราชอาณาจักรเดนมาร์ก | Kristiansen และคณะ (2001) |
| | *Goodyera pubescens* | สหรัฐอเมริกา | McCormick และคณะ (2004) |
| | *Liparis lilifolia* | สหรัฐอเมริกา | McCormick และคณะ (2004) |
| | *Tipularia discolor* | สหรัฐอเมริกา | McCormick และคณะ (2004) |
| | *Disa bracteata* | เครือรัฐออสเตรเลีย | Bonnardeaux และคณะ (2007) |
| | *Diuris magnifica* | เครือรัฐออสเตรเลีย | Bonnardeaux และคณะ (2007) |
| | *Prasophyllum guganteum* | เครือรัฐออสเตรเลีย | Bonnardeaux และคณะ (2007) |
| | *Pyrochis nigricans* | เครือรัฐออสเตรเลีย | Bonnardeaux และคณะ (2007) |
| *Salix* sp. | *Corallorhiza trifida* | สหราชอาณาจักร | McKendrick และคณะ (2000) |
| | *Neottia nidus-avis* | สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี | McKendrick และคณะ (2002) |
| *Betula* sp. | *Corallorhiza trifida* | สหราชอาณาจักร | McKendrick และคณะ (2000) |
| *Sebacina* sp. | *Neottia nidus-avis* | สาธารณรัฐฝรั่งเศส | Selosse และคณะ (2002) |
| *Tuber* sp. | *Epipactis dunensis* | สหราชอาณาจักร | Bidartondo และคณะ (2004) |

**ตารางที่ 8** (ต่อ) ราที่แยกได้จากกล้วยไม้ให้อาศัยชนิดต่างๆ

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Ceratobasidium* | *Campylocentrum fasciola* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2002) |
| sp. | *C. filiforme* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2002) |
| | *Erythrodes plantaginea* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2002) |
| | *Ionopsis satyrioides* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2002) |
| | *I. utricularioides* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2002) |
| | *Oeceoclades maculata* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2002) |
| | *Oncidium altissimum* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2002) |
| | *Tolumnia variegata* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2002) |
| | *Goodyera procera* | สาธารณรัฐประชาชนจีน | Shan และคณะ (2002) |
| | *Ionopsis utricularioides* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2004) |
| | *Tolumnia variegata* | เครือรัฐเปอร์โตริโก | Otero และคณะ (2004) |
| *Russula* sp. | *Corallorhiza maculata* | สหรัฐอเมริกา | Taylor และคณะ (2004) |
| | *Dipodium hamiltonianum* | เครือรัฐออสเตรเลีย | Dearnaley และ Le Brocque (2006) |
| | *Limodorum abortivum* | สาธารณรัฐอิตาลีและ | Girlanda และคณะ (2006) |
| | | สาธารณรัฐฝรั่งเศส | Girlanda และคณะ (2006) |
| | | สาธารณรัฐอิตาลี | Girlanda และคณะ (2006) |
| | *L. brulloi* | สาธารณรัฐอิตาลี | Girlanda และคณะ (2006) |
| | *L. trabutianum* | สาธารณรัฐอิตาลี | Girlanda และคณะ (2006) |
| *Thanatephorus* sp. | *Hexalectris spicata* | สหรัฐอเมริกา | Taylor และคณะ (2003) |
| | *H. spicata* | สหรัฐอเมริกา | Taylor และคณะ (2003) |
| | *H. revoluta* | สหรัฐอเมริกา | Taylor และคณะ (2003) |

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลองเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ศึกษาความจำเพาะต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซา และการผลิตกล้ากล้วยไม้เพื่อกลับคืนสู่ป่า ประเทศไทยมีความหลากหลายของชนิดพันธุ์กล้วยไม้มาก แต่พบว่ามีศึกษาการเพาะเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลองน้อยมาก โดยงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์ แต่ก็พบว่าเมล็ดกล้วยไม้บางชนิดไม่สามารถเจริญในสภาพปลอดเชื้อได้ ซึ่งอาจต้องอาศัยราไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด ไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้มีความจำเพาะต่อการงอกของเมล็ด และพัฒนาของโปรโตคอร์มได้แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของกล้วยไม้อาศัย และราไมคอร์ไรซา งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherrima* แบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับราที่แยกได้จากรายกล้วยไม้ชนิดเดียวกันในระยะโตเต็มที่ จากผลการทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherrima* พบว่ามีรา *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลต Kr01 ที่กระตุ้นการงอกของเมล็ดและส่งเสริมการพัฒนาโปรโตคอร์มจนปรากฏใบและราก ขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ ที่ทดสอบพบ

เอ็มบริโอขยายขนาดขึ้นแต่ไม่พัฒนาต่อ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Porras และ Bayman (2007) ที่ศึกษาทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สกุล *Vanilla* แบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลองร่วมกับราที่แยกได้จากกล้วยไม้ในระยะโตเต็มที่พบว่ามีเพียงราสกุล *Ceratobasidium* บางไอโซเลตที่ส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สกุล *Vanilla* ขณะที่ราสกุล *Tulasnella* ไอโซเลตที่ทดสอบกลับไม่ส่งเสริมการงอกของเมล็ด สนับนุนงานวิจัยของ Zelmer และ Currah (1997) ที่รายงานว่าแยกรา *Ceratorhiza goodyerae-repentis* (*Ceratobasidium* sp.) และ *Epulorhiza repens* (*Tulasnella* sp.) จากกล้วยไม้ *Spiranthes lacera* ในระยะโตเต็มที่ แต่เมื่อนำไปทดสอบการงอกของเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยพบว่ามีเพียงรา *C. goodyerae-repentis* ที่อาศัยในโปรโตคอร์ม โดยมีงานวิจัยสนับสนุนว่ากล้วยไม้ที่สร้างอาหารได้เองมีความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างจำเพาะกับราไมคอร์ไรซา (Shefferson และคณะ, 2005, 2007; McCormick และคณะ, 2006; Bonnarddeaux และคณะ,2007; Irwin และคณะ, 2007)

ส่วนราสกุล *Epulorhiza* ที่มีรายงานว่าเป็นราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้หลายชนิด แต่จากการทดลองพบว่าราในสกุลดังกล่าวกระตุ้นให้เอ็มบริโอขยายขนาดขึ้น แต่ไม่สามารถพัฒนาสร้างไรซอยด์ ใบและรากได้ ซึ่งมีรายงานการทดสอบการงอกของเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับราที่แยกได้จากกล้วยไม้ที่โตเต็มที่หลายครั้งไม่ประสบความสำเร็จในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ (Rasmussen, 2002) เนื่องจากบทบาทของราที่แตกต่างกันในแต่ละระยะการเจริญของกล้วยไม้อาจมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของราไมคอร์ไรซาในระยะการงอกเมล็ดและการพัฒนาโปรโตอร์มแตกต่างจากระยะโตเต็มที่ (Zelmer และ Currah, 1996) หรือราไมคอร์ไรซาที่อยู่ในระยะการงอกและพัฒนาเมล็ดเป็นราไมคอร์ไรซาชนิดเดียวกับระยะโตเต็มที่ แต่มีสภาพสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงทำให้กล้วยไม้ที่โตเต็มที่มีความสัมพันธ์กับราชนิดใหม่แทนที่ชนิดเดิม (McCormick และคณะ, 2006) อีกเหตุผลหนึ่งคือราที่อาศัยอยู่ในเซลล์รากล้วยไม้อาจไม่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัย ซึ่งหากเป็นความแตกต่างของราไมคอร์ไรซาในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ ก็จำเป็นต้องแยกราจากระยะการเจริญต่างๆของกล้วยไม้ และทดสอบบทบาทในแต่ละระยะการเจริญของกล้วยไม้เพื่อการอนุรักษ์ ฟื้นฟูกล้วยไม้ในธรรมชาติ และการขยายพันธุ์ประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้น

*D. pulcherrima* กระจายพันธุ์อยู่ทั่วประเทศไทย และในแถบอินโดจีน การขยายพันธ์ด้วยเมล็ดเป็นการรักษาความหลากหลายทางพันธุ์กรรมกล้วยไม้ และความหลากหลายของประชากรในแต่ละพื้นที่ ถึงแม้การเพาะเมล็ดแบบปลอดเชื้อของ *D. pulcherrima* จะประสบความสำเร็จด้วยดีในการผลิตกล้ากล้วยไม้จำนวนมากเพื่อการค้า แต่การเพาะเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยอาจจะมีบทบาทสำคัญต่อความสัมพันธ์ระหว่างราไมคอร์ไรซาและกล้วยไม้ และอัตราการอยู่รอดของกล้ากล้วยไม้เมื่อย้ายออกไปเจริญเติบโตในธรรมชาติ ประเทศไทยมีความหลากหลายของพันธุ์กล้วยไม้ หลายชนิดเป็น

กล้วยไม้หายาก และใกล้สูญพันธ์ การไม่รบกวนธรรมชาติ ไม่บุกรุกพื้นที่อาศัย และไม่ค้าขายกล้วยไม้ป่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการอนุรักษ์กล้วยไม้ป่า แต่ในความเป็นจริงแล้วแตกต่างจากการอนุรักษ์ในอุดมคติอย่างสิ้นเชิง ประชากรมนุษย์เพิ่มสูงขึ้นทุกขณะ พื้นที่หลายๆ พื้นที่เดิมเป็นที่อยู่อาศัยของกล้วยไม้ถูกแปรสภาพเปลี่ยนเป็นพื้นที่เพื่อทำประโยชน์ ความสวยงามของดอกกล้วยไม้ป่าเป็นที่ปรารถนามาครอบครองของผู้พบเห็น ค่าตัวกล้วยไม้ป่าที่มีราคาสูง สิ่งเหล่านี้ปฏิเสธไม่ได้ว่ากล้วยไม้ป่ากำลังถูกคุกคามจากฝีมือมนุษย์ ผู้วิจัยตระหนักถึงความสำคัญต่อการอนุรักษ์ระบบนิเวศของกล้วยไม้ การขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่าด้วยวิธีเพาะเมล็ดในสภาวะปลอดเชื้อ ยังไม่ประสบความสำเร็จในกล้วยไม้บางชนิด งานวิจัยนี้จึงเป็นการเริ่มต้นศึกษาความหลากหลายของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ และบทบาทของราไมคอร์ไรซาต่อการเจริญและพัฒนาของกล้วยไม้ในระยะต่างๆ เพื่อจุดประกายให้ผู้ที่สนใจหันมาศึกษากล้วยไม้ชนิดอื่นเพื่อเติมเต็มความรู้และความเข้าใจในความสัมพันธ์ระหว่างรากับกล้วยไม้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งผู้จัยเชื่อมั่นว่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการอนุรักษ์ และขยายพันธุ์กล้วยไม้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 6

## สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองแยกพีโลตอนราจากเซลล์คอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ *D. pucherrima* ที่เก็บจากจังหวัดชัยภูมิ ชุมพร กาญจนบุรี กระบี่ พังงา และเลย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NDY เจือจาง 6 เท่า สามารถแยกราได้ทั้งสิ้น 43 ไอโซเลต จากการระบุเอกลักษณ์ของราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีชีววิทยาโมเลกุลที่ตำแหน่ง ITS เปรียบเทียบกับข้อมูลราที่มีอยู่ใน GenBank สามารถแบ่งราที่แยกได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ได้แก่ *Ceratorhiza* โคโลนีสีขาวเจริญเร็วมาก สร้างโมนิลอยด์รูปทรงกระบอก และ *Epulorhiza* โคโลนีสีขาวเจริญช้า สร้างโมนิลอยด์ค่อนข้างกลม และกลุ่มราอื่นๆ ได้แก่สกุล *Alternaria Amanita Fomes Eutypella* และ *Schizophyllum*

เมื่อนำลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* จำนวน 30 ไอโซเลต มาสร้างแผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าแบ่งราที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ ราที่มีความใกล้เคียงกับราในสกุล *Ceratobasidium* ซึ่งเป็นระยะสมบูรณ์เพศของราสกุล *Ceratorhiza* ได้แก่ Kr01 Kr02 และ Pa04 และราที่มีความใกล้เคียงกับราในสกุล *Epulorhiza* อย่างน้อย 4 ชนิดได้แก่ ราที่มีความใกล้เคียงกับ *Epulorhiza* sp. ไอโซเลต Onv4.3 คือ Cu02 Cu03 ราที่มีความใกล้เคียงกับ *Epulorhiza* sp. ไอโซเลต Am8 คือ Cy06 ราที่มีความใกล้เคียงกับ *Epulorhiza* sp. ไอโซเลต H0402-40 คือ ทุกไอโซเลตของราที่แยกได้ตัวอย่างกล้วยไม้จากจังหวัดเลย และ Pa03 Pb02 Pb03 Pb04 และ Cy05 และราที่มีความใกล้เคียงกับ *Epulorhiza* sp. ไอโซเลต C6 CH06x1-1 คือ Cy03 Cy07 Cy08 Cy09

การทดสอบการงอกของเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลองของ *D. pulcherrima* กับราที่เป็นตัวแทนที่แยกได้ ได้แก่ Kr01 Cu02 Cy01 Cy03 Lo01 และ Pb02 แสดงให้เห็นว่าทุกไอโซเลตส่งเสริมการงอกในระยะที่ 1 ถึง 50% ของเมล็ดที่ยังมีชีวิต ขณะที่ชุดควบคุม ที่เพาะเมล็ดบนอาหาร OMA มีอัตราการงอกที่ระยะเดียวกันเพียง 5.17% ภายใน 1 เดือน และพบราเพียงไอโซเลตเดียว คือ *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลต Kr01 ที่ส่งเสริมการงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มถึงระยะที่ 5 (24.9%) ภายใน 4 เดือนและเมล็ดที่เพาะบนอาหาร VW สามารถงอกและมีการพัฒนาของโปรโตคอร์มจนถึงระยะที่ 4 ภายในระยะเวลา 2 เดือน แต่มีระยะการพัฒนาที่แตกต่างกัน ซึ่งการทดลองนี้เป็นรายงานแรกในประเทศไทยที่แสดงให้เห็นความสำเร็จของการงอกของเมล็ดและการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับราในหลอดทดลองของกล้วยไม้ *D. pulcherrima* สายพันธุ์แท้ตามธรรมชาติของประเทศไทย

# รายการอ้างอิง


## ภาษาไทย

นันทนา คำเมือง, เลขา มาโนช, จิตราพรรณ พิลึก และพรพิมล อธิปัญญาคม. (2543). **การแยกเชื้อและจัดจำแนกชนิดไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้**. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 38. หน้า 428-435.

สลิล สิทธิสัจจธรรม. **กล้วยไม้ป่าเมืองไทย** = Wild orchid of Thailand. -กรุงเทพฯ: บ้านและสวน, 2549. 491 หน้า: ภาพประกอบ (สี). (ชุดไม้ดอกไม้ประดับ ลำดับที่ 35)

## ภาษาอังกฤษ

Abadie, J.C., Püttsepp. Ü., Gebauer, G., Faccio, A., Bonfante, P., and Selosse, M.A. 2006 *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. **Can. J. Bot.** 84: 1462-1477

Alconero, R. 1969. Mycorrhizal synthesis and pathology of *Rhizoctonia solani* in *Vanilla* orchid roots. **Phytopath.** 59: 426-430

Alvarez, M.R. 1968. Quantitative changes in nuclear DNA accompanying post germination embryonic development in *Vanda* (Orchidacceae). **Am. J. Bot.** 55: 1036-1041

Anderson, A.B. 1991. Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae). **Lindleyana**. 6: 183–186.

Arditti, J., and Ghani, AKA. 2000. Numericical and physical properties of orchid seeds and their biological implication. **New Phytologist**. 145: 146-569

Batty, A.L., Dixon, K.W., Brundrett, M., and Sivasithamparam, K. 2001. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. **New Phylogist.** 152: 511-520

Beau, C. 1920. Sur le role trophique des endophytes d' orchidees. **Comptes Rendus de l'Academic des sciences.** 171: 675-677

Bernard, N. 1899. Sur la germination du Neottia nidus-avis. **Conpetes Rendus de l' Academic des Sciences.** 128: 618-622

Bernard, N. 1909a. L'evolation dans la symbise es orchidees et leur champignons commenseuse. **Annales des Sciences Naturelles' Botanique, Paris.** 9: 1-196

Bernard, N. 1909b. Ramarques sur l'immunite che res plantes. **Bulletin de l' Instture Pasteur.** 7: 369-386

Bidartondo, M.I., Burghardt, B., Gebauer, G., Bruns, T.D., and Read, D.J. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. **Proc. Royal. Soc. Lond. B.** 271: 1799-1806

Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J., and Sivasithamparam 2007. Diversity of mycorrhizal fungi in terrestrial orchids: compatability webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycol. Res.** 111: 51-61

Bougoure, J.J., Bougoure, D.S., Cairney, J.W.G., and Dearnaley, J.D.W. 2005. ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. **Mycol. Res.** 109: 452-460

Bougoure, J.J., and Dearnaley, J.D.W. 2005. The fungal endophytes of *Dipodium variegatum* (Orchidaceae). **Australas. Mycol.** 24: 15-19

Burgeff, H. 1900. Studienander endotropher Mycorrhiza von *Neottia nidus-avis* L. Jahr f. Wissench. **Bot.** 205-272

Burgeff, H. 1936. Samenkeimung der Orchideen. **Fischer, Jena.**

Cameron, D.D., Leake, J.R., and Read, D.J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens.* **New Phytologist.** 174: 405-416

Cameron, D.D., Johnson, I., Leake, J.R., and Read, D.J. 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens.* **Annals of Botany.** 99: 831-834

Constantin, J., and Dufour, L. 1920. Sur la biologie du *Goodyera repens.* **Rev. gen. Bot.** 32, 529

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

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

Currah, R.S., Zettler, L.W., and McInnis, T.M. 1997. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera (Orchidaceae)* and a key to *Epulorhiza* species, **Mycotaxon**. 61: 335–342

Curtis, J.T. 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. **Am. J. Bot.** 26: 390-399

Dearnaley, J.D.W. 2006. The fungal endophytes of *Erythrorchis cassythoides* – is this orchid saprophytic or parasitic? **Australas. Mycol.** 25: 51-57

Dearnaley, J.D.W., and Le Brocque, A.F. 2006. Molecular identification of the primary root fungal endophytes of *Dipodium hamiltonianum* (Yellow hyacinth orchid). **Aust. J. Bot.** 54: 487-491

Dressler, R.L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. **Dioscorides Press**, Portland.

Fang, D., Hog-xia, L., Hui, J., and Yi-bo, L. 2008. Symbiosis between fungi and the hybrid Cymbidium and its mycorrhizal microstructures. **For. Stud. China.** 10(1): 41-44

Girlanda, M., Selosse, M.A., Cafasso, D., Brilli, F., Delfine, S., Fabbian, R., Ghignone, S., Pinelli, P., Segreto, R., Loreto, F., Cozzolino. S., and Perotto, S. 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. **Mol. Ecol.** 15: 491-504

Hadley, G., and Williamsin, B. 1971. Analysis of the post infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. **New Phytol.** 70: 445-455

Harvais, G., and Haley, G. 1967. The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. **New Phytol.** 66: 205-215

Hijner, J.A., and Arditti, J. 1973. Orchid mycorrhiza: vitamin production and requirements by the symbionts. **Am. J. Bot.** 60: 829-835

Illyes, Z., Rudnoy, S., and Bratek, Z. 2005. Aspects of *in situ*, *in vitro* germination and mycorrhizal parteers of *Liparis loeselii*. **Acta. Biologica. Szegediensis.** 49: 137-139

Irwin, M.J., Bougoure, J.J., David, J., and Dearnaley, W. 2007. *Pterostylis nutans* (Orchidaceae) has a specific association with two Ceratobasidium root-associated fungi across its range in eastern Australia. **Mycoscience.** 48: 231-239.

Janse, J.M. 1897. Les Endophytes radicause de quelques plants Javanise. **Annales du Jardin de Buitenzorg.** 14: 53-212.

Johnson, T.R., Stewart, D.D., Kane, M.E., and Richardson, L. 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)-preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. **Plant cell Tiss Organ Cult.** 90: 313-323.

Julou, T., Burghardt, B., Gebauer, G., Berveiller, D., Damesin, C., and Selosse, M.A. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. **New Phytol.** 166: 639-653

Knudson, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. **Bot. Gaz.** 73:1-25.

Knudson, L. 1924. Further observations on non-symbiotic germination of orchid seeds. **Bot Gaz.** 77: 212-219

Knudson, L. 1930. Flower production by orchid grown non-symbiotically. **Bot.Gaz.** 89: 192-199

Krishamurthy, K.V. 1988. Methods in plant histochemistry. **S.Viswanathan Printers and Publishers,** Chennai, India.

Kristiansen, K.A., Taylor, D.L., Kjoller, R., Rasmussen, H.N., and Rosendahl, S. 2001. Identification of mycorrhizal fungi from single pelotons of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. **Mol. Ecol.** 10: 2089-2093

Kristiansen, K.A., Freudenstein, J.V., Rasmussen, F.N., and Rasmussen, H.N. 2004 Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). **Mol. Phylogenet Evol.** 33: 251-258

Leka Manoch, Pornpimon Athipunyakom, and Morakot 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.

Ma, M., Tan, T.K., and Wong, S.M. 2003. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. **Mycol.Res.** 107(9): 1041-1049

Magnus, N. 1900. Studienander endrotrophen mycorrhiza von *Neottia nindus-avis.* L. Jahr. f. Wissench. **Bot.** 205-272

Marchisio,V.F., Berta, G.: 1985. Endophytes of wild orchids native to Italy, their morphology, caryology, ultrastructure and cytochemical characterisation. **New Phytologist.** 100: 623-641

Masuhara, G., and Katsuya, K. 1991. Fungal coil formation of *Rhizoctonia repens* in seedlings of *Galeola septentrionalis* (Orchidaceae). **Botanical Magazine of Tokyo.** 104: 275–281

Masuhara, G. K., Katsuya 1994. *In situ* and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). **New Phytologist.** 127: 711-718

McCormick, M.K., Whigham, D.F., and O'Neill, J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytol.** 163: 425-438

McCormick, M.K., Whigham, D.F., Sloan, D., O'Malley, K., and Hodkinson, B. 2006. Orchid-fungus fidelity: A marriage meant to last? **Ecology.** 87: 903-911

McKendrick, S.L., Leake, J.R., and Read, D.J. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. **New Phytol.** 145: 539-548

McKendrick, S.L., Leake, J.R., Taylor, D.L., and Read, D.J. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytol.** 154: 233-247

Minso, J., Stewart, S.L., Zettler, L.W., and Brown, P.M. 2001. Seed germination and reintroduction of an endangered orchid, *Spiranthes brevilabris*, from Florida. *Assoc. Southeastern* **Biol. Bull.** 48(2): 167

Mollison, J.E. 1943. *Goodyera repens* and its endophyte. **Trans. Bot. Soc. Edin.** 33: 391-403.

Moore, R.T. 1987. The genera of Rhizoctonia-like fungi: Ascorhizoctonia, Ceratorhiza gen.nov., Epulorhiza gen,nov, Monliopsis, and Rhizoctonia. **Mycotaxon.** 29: 91-99

Nieuwdorp, P.J. 1972. Some observations with electron microscope on the endophytic mycorrhiza of orchids. **Acta Bot. Neerl.** 21: 128-144

Otero, J.T., Ackerman, J.D., and Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **Am. J. Bot.** 89:1852-1858

Otero, J.T., Ackerman, J.D., and Bayman, P. 2004. Diversity in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Mol. Ecol.** 13: 2393-2404

Otero, J.T., Bayman, P., and Ackerman, J.D. 2005. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata in vitro*: the potential for natural selection. **Evol. Ecol.** 19: 29-43

Pereira, O.L., Rollemberg, C.L., Borges, A.C., Matsuokae, K., and Kasuya, M.C.M. 2003 *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolatated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience.** 44: 153-155

Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Borges, A.C., and de Araujo, E.F. 2005. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Can. J.Bot.** 83: 54-65

Perkins, A.J., and McGee, P.A. 1995. Distribution of the orchid mycorrhizal fungus, *Rhizoctonia solani*, in relation to its host, *Pterostylis acuminata*, in the field. **Australian Journal of Botany.** 43: 565–575.

Peterson, C.A. 1988. Exodermal casparian bands: their significance for ion uptake by roots. **Physiologia Plantarum.** 72: 204-208.

Peterson, R.L., and Currah, R.S. 1990. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. **Can. J. Bot.** 68: 1117-1125.

Pornpimon Athipunyakom, Leka Manoch and Chitrapan Piluek, **Isolation and Identification of Mycorrhizal Fungi from Eleven Terrestrial Orchids.** KASETSART

JOURNAL: NATURAL SCIENCE, Volume 038, Issue 2, April 2004- June 2004, Pages 216-228.

Pornpimon Athipunyakom, Leka Manoch, Chitrapan Piluek, Suparp Artjariyasripong and Somwong Tragulrung. 2004. **Mycorrhizal Fungi from *Spathoglottis plicata* and the Use of these Fungi to Germinate Seeds of S. plicata in vitro.** KASETSART JOURNAL: NATURAL SCIENCE, Volume 038, Issue 1, January 2004- March 2004, Pages 83-93.

Pornpimon Athipunyakom. 2004. **Mycorrhizal fungi of terrestrial orchids : isolation, identification and symbiotic germination.** Dissertations. Ph.D.. International Graduate Programs in Tropical Agriculture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University.

Porras-Alfaro, A., and Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. **Mycologia.** 99(4): 510-525.

Richardson, K. A., and Currah, R. S. 1993. Basidomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic Orchidaceae. **Lindleyana.** 8: 127–137

Richardson, K.A., Peterson, R.L., and Currah, R.S. 1992. Seed resevers and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). **Can J. Bot.** 70: 291-330.

Reissek, S. 1847. Uber Endophyten der pflanzenzella. **Naturwiss.** 1: 31-46

Selosse, M.A. Weiß, M., Jany, J.L., and Tillier, A. 2002. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. **Mol. Ecol.** 11: 1831-1844

Selosse, M.A., Faccio, A., Scappaticci, G., and Bonfante, P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. **Micro. Ecol.** 47: 416-426

Senthilkumar, S., and Krishnamurthy, K.V. 1998a. The role of root hairs in the mycorrhixa association in the ground orchid. **Mycorrhiza News.** 10: 15-17.

Senthilkumar, S., and Krishnamurthy, K.V. 1998b. A cytochemical study on the mycorrhizae of *Spathoglottis plicata*. **Biologia Plantarum.** 41: 111-119.

Shan, X.C., Liew, E.C.Y., Weatherhead, M.A., and Hodgkiss, I.J. 2002. Characterisation and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. **Mycologia**. 94: 230-239

Sharma, J., Zettler, L.W., and Van Sambeek, J.W. 2003. A survey of mycobionts of federally threatened Platanthera praeclara (Orchidaceae). **Symbiosis**. 34(2): 145-155.

Shefferson, R.P., Weiß, M., Kull, T., and Taylor, D.L. 2005. High specificity generally characterises mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. **Mol. Ecol**. 14: 613-626

Smith, S.E. 1967. Carbohydrate translocation in orchid mycorrizas. **New Phytol**. 66: 371-378.

Stewart, S. L., and Zettler, L. W. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinqueseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. **Aquat. Bot**. 72: 25–35

Suarez, J.P., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., and Kottke, I. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycol. Res**. 110: 1257-1270

Swofford, D.L. 2001. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Taylor, D.L., Bruns, T.D., Szaro, T.M., and Hodges, S.A. 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. **Am. J. Bot**. 90: 1168-1179

Taylor, D.L., Bruns, T.D., and Hodges, S.A. 2004. Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. **Proc Royal Soc Lond**. 271: 35-143

Terashita, T. 1982. Fungi inhabiting wild orchids in Japan (II). Isolation of symbionts from *Spiranthes sinensis* var. *amoena*. Trans. mycol. **Soc. Japan**. 23: 319-328

Wahrlich, W. 1886. Beitrag Iur Kebbtniss der Orchideenwurzelplize. **Bot.Zeit**. 44: 481-488

Warcup, J.H. 1971. Perfect states of *Rhizoctonias* associates with orchids.II. **New Phytol**. 70: 35-40

Warcup, J.H. 1973. Acid phosphatase and esterase activity in orchid mycorrhiza. **Planta**. 112: 149-158

Warcup, J.H. 1981. The mycorrhiza relationship in Australian orchids. **New Phytol**. 87: 371-381.

Williamson, B. 1970. Induced DNA synthesis in orchid mycorrhiza. **Planta**. 92: 347-354.

Williamson, B. 1973. Acid phosphatase and esterase activity in orchid mycorrhiza. **Planta**. 112: 149.

Williamson, B., and Hadley, G. 1969. DNA content of nuclei in orchid protocorms symbiotically infected with *Rhizoctonia*. **Nature**. 222: 582-583.

Whitridge. H, and Southworth, D. 2005. Mycorrhizal symbionts of the terrestrial orchid *Cypripedium fasciculatum*. **Selbyana**. 26: 328-334

Yamato, M., Yagame, T., Suzuki, A., and Iwase, K. 2005. Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). **Mycoscience**. 46: 73-77

Zelmer, C.D., and Currah, R. S. 1995. Evidence for fungal liaison between *Corallorhiza trifida* (Orchidaceae) and *Pinus contorta* (Pinaceae). **Canadian Journal of Botany**. 73: 862-866

Zelmer, C.D., and Currah, R. S. 1995. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae)with a naturally occurring endophyte. **Lindleyana**. 12(3): 142-148

Zettler, L.W., Sharma, J., and Rasmussen, F.N. 2003. Mycorrhizal diversity. In: *Orchid Conservation*. K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett, and P.J. cribb, eds. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, pp. 205-226

Zettler, L. W., Stewart, S.L., Bowles, M.L., and Jacobs, K.A. 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. Am. **Midl. Nat.** 145: 168–175

# ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ก
# สูตรอาหารเพาะเลี้ยง

1. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร Nutrient Dextrose Yeast เจือจาง 6 เท่า

| | | |
|---|---|---|
| โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) | 0.1 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) | 0.1 | กรัม |
| เฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3$) | 0.1 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) | 0.8 | กรัม |
| สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) | 0.5 | กรัม |
| วุ้น | 12 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000.00 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.5

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร Potato Dextrose Agar (PDA)

| | | |
|---|---|---|
| มันฝรั่งปอกเปลือก | 200.00 | กรัม |
| เดกซ์โทรส (Dextrose) | 20.00 | กรัม |
| วุ้น | 15.00 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000.00 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH ให้ได้ค่า $5.6 \pm 0.2$

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือดประมาณ 20 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้ นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร Oat Meal Agar (OMA)

| | | |
|---|---|---|
| ข้าวโอ๊ตบดหยาบ | 5.00 | กรัม |
| วุ้น | 7.00 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000.00 | มิลลิลิตร |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.0 ± 0.2

ต้มข้าวโอ๊ตในน้ำกลั่นโดยต้มให้เดือดประมาณ 10-15 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงไปในอาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ Vacin และ Went

| | | |
|---|---|---|
| แอมโมเนียมซัลเฟต : $(NH_4)_2SO_4$ | 500.0 | มิลลิกรัม |
| แคลเซียมฟอสเฟต : $Ca_3(PO_4)_2$ | 200.0 | มิลลิกรัม |
| เฟอริคตาร์เตต : $Fe_2(C_4H_4O_6)_3$ | 28.0 | มิลลิกรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต : $MgSO_4.7H_2O$ | 250.0 | มิลลิกรัม |
| แมงกานีสซัลเฟต : $MnSO_4.4H_2O$ | 5.7 | มิลลิกรัม |
| โปแตสเซียมไนเตรท : $KNO_3$ | 525.0 | มิลลิกรัม |
| โปแตสเซียมฟอสเฟต : $KH_2PO_4$ | 250.0 | มิลลิกรัม |
| น้ำตาลทราย Sucrose | 20.0 | กรัม |
| น้ำมะพร้าวอ่อน | 150 | มิลลิลิตร |
| วุ้น | 7 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000.00 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH ให้ได้ค่า 4.8-5.0

เตรียม Stock Solution ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้มาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำตาล วุ้น เติมน้ำกลั่นลงไปในอาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 4.8-5.0 นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ข
# บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1. ทริสบัฟเฟอร์ (Tris Buffer) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

| | | |
|---|---|---|
| ทริส เบส (Tris base) | 121.00 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 800.00 | มิลลิลิตร |

ละลาย ทริส เบส ให้เข้ากันกับน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) ความเข้นข้น 0.5 โมลาร์

| | | |
|---|---|---|
| EDTA | 186.10 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 800.00 | มิลลิลิตร |

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Washing buffer

| | | |
|---|---|---|
| โพลีไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone (PVP)) | 2.00 | กรัม |
| กรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) | 1.76 | กรัม |
| ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0 | 20.00 | มิลลิลิตร |
| 2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) | 4.00 | มิลลิลิตร |

เติมน้ำปราศจากประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 2X Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) lysis buffer

| | | |
|---|---|---|
| เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) | 4.00 | กรัม |
| ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0 | 20.00 | มิลลิลิตร |

เอทิลลีนไดอะมีนเททระเอซิติกเอซิด (Ethylene Diamine Tetra-acetic-Acid (EDTA)) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0 8.00 มิลลิลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 16.36 กรัม

2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) 4.00 มิลลิลิตร

เติมน้ำปราศจากประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

คลอโรฟอร์ม (Chloroform) 192.00 มิลลิลิตร

ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) 8.00 มิลลิลิตร

6. 20% Polyethylene glycol 6000 (PEG)

โพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) 20.00 กรัม

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 14.61 กรัม

เติมน้ำปราศจากประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. 1% Agarose gel

อะกาโรส (agarose) 1.00 กรัม

0.5 X TBE 100.00 มิลลิลิตร

8. 10X Tris-boric acid EDTA (10X TBE)

Tris (hydroxymethyl) amino methane 54.00 กรัม

EDTA 4.64 กรัม

กรดบอริค (boric acid) 27.50 กรัม

เติมน้ำปราศจากประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ค
# การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อศึกษา ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

1. นำตัวอย่างสดแช่ในกลูทาราลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอย่างคงสภาพ

2. ล้างตัวอย่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 10 นาที สองครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที

3. แช่ตัวอย่างในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 นาทีในแต่ละความเข้มข้น เริ่มจาก 30, 50, 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และแช่ตัวอย่างในเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้งโดยเปลี่ยนเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ใหม่ทุกครั้ง

4. ทำตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Balzer รุ่น CPD 020)

5. ยึดตัวอย่างแห้งกับแท่งทองเหลือง (brass stub) ด้วยแถบกาวสองหน้า และฉาบทองคำด้วยเครื่องฉาบผิวตัวอย่าง (Balzer รุ่น SCD 040)

6. นำตัวอย่างที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL รุ่น 5410LV) ที่ต่อด้วยความต่างศักย์15 กิโลโวลต์

7. บันทึกภาพด้วยคอมพิวเตอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ง
# การย้อมนิวเคลียสภายในเส้นราด้วยสีย้อมเรืองแสง

4',6-diamidine-2'-phenylindole (DAPI) คือ สีย้อมเรืองแสงที่ย้อมติดกรดนิวคลิอิก จึงสามารถย้อมติดนิวเคลียสภายในรา และเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ มีวิธีการย้อมสีตัวอย่าง ดังนี้

1. เตรียมเส้นใยราบนแผ่นกระจกใส
2. ย้อมตัวอย่างด้วยสียอมเรืองแสง DAPI ความเข้มข้น 1 ส่วนในล้านส่วน เป็นเวลา 10 นาที
3. ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น และปิดทับด้วยแผ่นกระจกใส
4. นำตัวอย่างไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก จ
# ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherima* เจริญร่วมกับรา *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลท Kr01 เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Oat meal agar ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน

| | ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ม | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ระยะเวลา (เดือน) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 52.70 ± 11.99 | 59.02 ± 7.51 | 15.45 ± 3.30 | 0.64 ± 1.28 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 2 | 29.05 ± 15.51 | 56.74 ± 11.21 | 32.99 ± 12.37 | 6.22 ± 1.30 | 1.35 ± 2.70 | 0.00 ± 0.00 |
| 3 | 26.35 ± 14.37 | 9.33 ± 5.01 | 67.82 ± 12.93 | 13.95 ± 5.27 | 5.75 ± 5.59 | 3.15 ± 3.48 |
| 4 | 26.35 ± 14.37 | 0.00 ± 0.00 | 2.59 ± 2.45 | 35.01 ± 5.54 | 37.45 ± 3.47 | 24.95 ± 4.01 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherima* เจริญร่วมกับรา *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลท Kr01 ในระยะที่ 0 เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Oat meal agar ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน

**ANOVA**

GROWTH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 1962.456 | 3 | 654.152 | 3.285 | .058 |
| Within Groups | 2389.758 | 12 | 199.147 | | |
| Total | 4352.215 | 15 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

**GROWTH**

Duncan[a]

| | | Subset for alpha = .05 | |
|---|---|---|---|
| MONTH | N | 1 | 2 |
| 3 | 4 | 26.3525 | |
| 4 | 4 | 26.3525 | |
| 2 | 4 | 29.0550 | |
| 1 | 4 | | 52.7025 |
| Sig. | | .801 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherima* เจริญร่วมกับรา *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลท Kr01 ในระยะที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Oat meal agar ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน

**ANOVA**

GROWTH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 11512.83 | 3 | 3837.611 | 74.073 | .000 |
| Within Groups | 621.703 | 12 | 51.809 | | |
| Total | 12134.54 | 15 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

**GROWTH**

Duncan[a]

| | | Subset for alpha = .05 | |
|---|---|---|---|
| MONTH | N | 1 | 2 |
| 4 | 4 | .0000 | |
| 3 | 4 | 9.3275 | |
| 2 | 4 | | 56.7400 |
| 1 | 4 | | 59.0225 |
| Sig. | | .092 | .662 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherima* เจริญร่วมกับรา *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลท Kr01 ในระยะที่ 2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Oat meal agar ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน

**ANOVA**

GROWTH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 9609.503 | 3 | 3203.168 | 38.007 | .000 |
| Within Groups | 1011.334 | 12 | 84.278 | | |
| Total | 10620.84 | 15 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

**GROWTH**

Duncan[a]

| | | Subset for alpha = .05 | | |
|---|---|---|---|---|
| MONTH | N | 1 | 2 | 3 |
| 4 | 4 | 2.5900 | | |
| 1 | 4 | 15.4475 | | |
| 2 | 4 | | 32.9825 | |
| 3 | 4 | | | 67.8250 |
| Sig. | | .071 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherima* เจริญร่วมกับรา *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลท Kr01 ในระยะที่ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Oat meal agar ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน

**ANOVA**

GROWTH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 2721.996 | 3 | 907.332 | 58.702 | .000 |
| Within Groups | 185.479 | 12 | 15.457 | | |
| Total | 2907.475 | 15 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

**GROWTH**

Duncan[a]

| | | Subset for alpha = .05 | | |
|---|---|---|---|---|
| MONTH | N | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 4 | .6400 | | |
| 2 | 4 | 6.2225 | | |
| 3 | 4 | | 13.9500 | |
| 4 | 4 | | | 35.0125 |
| Sig. | | .068 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherima* เจริญร่วมกับรา *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลท Kr01 ในระยะที่ 4 เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Oat meal agar ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน

**ANOVA**

GROWTH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 3764.760 | 3 | 1254.920 | 99.153 | .000 |
| Within Groups | 151.876 | 12 | 12.656 | | |
| Total | 3916.636 | 15 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

**GROWTH**

Duncan[a]

| | | Subset for alpha = .05 | | |
|---|---|---|---|---|
| MONTH | N | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 4 | .0000 | | |
| 2 | 4 | 1.3525 | 1.3525 | |
| 3 | 4 | | 5.7475 | |
| 4 | 4 | | | 37.4500 |
| Sig. | | .601 | .106 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเมล็ดกล้วยไม้ *D. pulcherima* เจริญร่วมกับรา *Ceratorhiza* sp. ไอโซเลท Kr01 ในระยะที่ 5 เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Oat meal agar ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน

**ANOVA**

GROWTH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 1739.809 | 3 | 579.936 | 82.111 | .000 |
| Within Groups | 84.754 | 12 | 7.063 | | |
| Total | 1824.563 | 15 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

**GROWTH**

Duncan[a]

| | | Subset for alpha = .05 | |
|---|---|---|---|
| MONTH | N | 1 | 2 |
| 1 | 4 | .0000 | |
| 2 | 4 | .0000 | |
| 3 | 4 | 3.1475 | |
| 4 | 4 | | 24.9475 |
| Sig. | | .136 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

# ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสมเจตน์ เอกมหาสวัสดิ์ เกิดเมื่อวันอังคารที่ 10 พฤษภาคม พ.ศ. 2526 ที่โรงพยาบาลรามาธิบดี จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2548 มีความสนใจในงานทางด้านจุลินทรีย์ในอาหาร และการเกษตร ปี พ.ศ. 2546 เป็นนิสิตฝึกงานในแผนกควบคุมคุณภาพ โรงงานอุตสาหกรรมนมไทย อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ปี พ.ศ. 2547 มีผลงานการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Boletinellus meruloides* ตามโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ศึกษา และเริ่มสนใจงานด้านไมคอร์ไรซาในพืชเศรษฐกิจ จนเป็นที่มาของการศึกษาต่อในปี พ.ศ. 2548 ระดับมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนจากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต บัณฑิตวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย