

การแยกและการคัดเลือกราไมคอร์ไรซาเพื่อกระตุ้นการเจริญของต้นกล้ากล้วยไม้หน้า *Epipactis flava*
Seidenf.



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND SCREENING OF MYCORRHIZAL FUNGI FOR SEEDLING DEVELOPMENT
STIMULATION OF STREAM ORCHID *Epipactis flava* Seidenf.



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Botany
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกและการคัดเลือกราไมคอร์ไรซาเพื่อกระตุ้นการเจริญของต้นกล้ากล้วยไม้หน้า <i>Epipactis flava</i> Seidenf.
โดย	น.ส.ญานิตา พันธุ์สังข์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)	
.....	กรรมการ
(ดร.ยุพิน จินตภากร)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด)	

ญานิศา พันธุ์สังข์ : การแยกและการคัดเลือกราไมคอร์ไรซาเพื่อกระตุ้นการเจริญของต้นกล้ากล้วยไม้
น้ำ *Epipactis flava* Seidenf.. (ISOLATION AND SCREENING OF MYCORRHIZAL FUNGI
FOR SEEDLING DEVELOPMENT STIMULATION OF STREAM ORCHID *Epipactis flava*
Seidenf.) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว

จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถแยกราเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้ น้ำ *Epipactis flava* Seidenf. ซึ่งเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต เป็นราที่แยกได้จากราก 35 ไอโซเลต และจากโปรโตคอร์ม 15 ไอโซเลต ราที่แยกได้ทั้งหมดถูกนำมาตรวจสอบการกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำ พบว่ามีรา 7 ไอโซเลต ได้แก่ MSR07 MSR24 MSR34 MSP01 MSP02 MSP04 และ MSP13 ที่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat Meal Agar (OMA) ได้ภายใน 30 วัน หลังหว่านเมล็ด การกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มด้วยราทั้ง 7 ไอโซเลตถูกทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ OMA เป็นเวลา 4 เดือน หลังหว่านเมล็ด พบว่ามีรา 6 ไอโซเลตที่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มจนถึงระยะที่ 2 ยกเว้นราไอโซเลต MSP04 ที่ไม่ส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์ม ค่าดัชนีของอัตราการงอก (Germination rate index, GRI) ของราทั้ง 7 ไอโซเลตมีค่าอยู่ระหว่าง 56.62-148.14 โดยไอโซเลต MSP13 ให้ค่า GRI สูงที่สุด (148.14) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า GRI ของราไอโซเลต MSP01 (139.41) ค่าดัชนีของอัตราการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (developmental rate index, DRI) ของราทั้ง 7 ไอโซเลตมีค่าอยู่ระหว่าง 0-33.20 จากการศึกษพบว่า ราไอโซเลต MSP01 ให้ค่า DRI สูงที่สุด (33.20) ขณะที่เมล็ดที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับรา (ชุดควบคุม) มีค่า GRI และ DRI เท่ากับ 6.76 และ 0 ตามลำดับ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ทางชีววิทยาโมเลกุลที่ตำแหน่ง ITS ของ nuclear rDNA พบว่าราทั้ง 7 ไอโซเลตถูกระบุเป็น *Fusarium oxysporum* (MSR34 และ MSP01) *F. solani* (MSR07 และ MSR24) *Plectosphaerella cucumerina* (MSP02 และ MSP04) และ *Curvularia lunata* (MSP13) ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ น้ำ มีความสัมพันธ์กับราไมคอร์ไรซามากกว่า 1 ชนิดภายในถิ่นอาศัยเดียวกัน และมีความเฉพาะเจาะจงที่ค่อนข้างกว้างเมื่อเพาะเลี้ยงภายในหลอดทดลอง ข้อมูลที่ได้ครั้งนี้จะเป็นความรู้พื้นฐานสำคัญที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนกล้วยไม้ น้ำ ซึ่งเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในประเทศไทย

สาขาวิชา พฤษศาสตร์
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5972105323 : MAJOR BOTANY

KEYWORD: orchid mycorrhiza, symbiotic seed germination, endangered species

Yanisa Punsung : ISOLATION AND SCREENING OF MYCORRHIZAL FUNGI FOR SEEDLING DEVELOPMENT STIMULATION OF STREAM ORCHID *Epipactis flava* Seidenf.. Advisor: Asst. Prof. Dr. Jittra Piapukiew

In this study, 50 endophytic fungi were isolated from roots (35 isolates) and protocorms (15 isolates) of endangered rheophytic orchid, *Epipactis flava* Seidenf. All fungal isolates were tested for stimulating seed germination. The results showed that 7 fungal isolates, MSR07, MSR24, MSR34, MSP01, MSP02, MSP04, and MSP13 were able to stimulate seed germination of *E. flava* on oat meal agar in 30 days after sowing. The stimulation of seed germination and protocorm development were evaluated on oat meal agar inoculated with each selected isolate within 4 months after sowing. Six isolates were able to stimulate seed germination and promote protocorm development up to stage 2 except fungal isolate MSP04 which did not promote protocorm development. Germination rate index (GRI) of 7 selected isolates ranged from 56.62 to 148.14. The from GRI was highest (148.14) when seeds were inoculated with fungal isolate MSP13 which was not significantly different GRI (139.41) of seeds inoculated with fungal isolate MSP01. The selected isolates showed developmental rate index (DRI) ranged from 0 to 33.20. The DRI was significantly highest (33.20) when seeds were inoculated with fungal isolate MSP01. Without fungal treatment (control), GRI and DRI were 6.76 and 0, respectively. Morphological characters and molecular analysis based on internal transcribed spacer regions of nuclear rDNA indicated that 7 selected isolates were identified as *Fusarium oxysporum* (MSR34 and MSP01), *F. solani* (MSR07 and MSR24), *Plectosphaerella cucumerina* (MSP02 and MSP04), and *Curvularia lunata* (MSP13). The results of this study show that *E. flava* is associated with more than one mycorrhizal fungus in its habitat and has widely potential specificity *in vitro*. The results obtained from this study will be alternative way for conservation and propagation of this endangered orchid in Thailand.

Field of Study: Botany

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตรวจแก้ไข พร้อมทั้งได้อบรมสั่งสอน และให้กำลังใจในการทำงาน จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกวรรณ เสรีภาพ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีรดา หวังสมบุญดี อาจารย์ ดร. ยุพิน จินตภาพกร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุพันธ์ กงบังเกิด กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จัดสรรงบประมาณแผ่นดินอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2561 ให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต เพื่อเป็นค่าใช้จ่ายบางส่วนของงานวิจัย

บวร คุณากรนุรักษ์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ทำให้การทำงานราบรื่น และผ่านไปได้ด้วยดี

คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ

สมาชิกห้องปฏิบัติการกลางชีวโมเลกุล 212 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สำหรับมิตรภาพ ข้อเสนอแนะ และความช่วยเหลือที่จริงใจต่อกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ญาณิศา พันธุ์สังข์

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ชีวิตวิทยาของกล้วยไม้และสถานภาพปัจจุบันของกล้วยไม้ในประเทศไทย.....	5
2.2 ไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ (orchid mycorrhiza).....	7
2.3 กลไกการเข้าสู่กล้วยไม้ของราไมคอร์ไรซา.....	7
2.4 สรีรวิทยาของไมคอร์ไรซากกล้วยไม้.....	9
2.5 ความหลากหลายของราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้และการระบุชนิด.....	11
2.6 การพัฒนาของเมล็ดและโปรโตคอร์มกล้วยไม้.....	14
2.7 ความเฉพาะเจาะจงของราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้	16
2.8 การแยกราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้.....	17
2.9 การงอกของเมล็ดแบบพึ่งพา (symbiotic seed germination).....	17
บทที่ 3 อุปกรณ์เครื่องมือและวิธีดำเนินงานวิจัย.....	22
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	33

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	56
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	61
บรรณานุกรม.....	62
ภาคผนวก.....	73
ประวัติผู้เขียน.....	130



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	การจัดกลุ่มและสกุลของรากกลุ่ม Rhizoctonia (Smith and Read, 2010).....	12
ตารางที่ 2	ระยะการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ (ปรับปรุงจาก (S. L. Stewart and Kane, 2006).....	27
ตารางที่ 3	เกณฑ์การให้คะแนนความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้.....	27
ตารางที่ 4	สาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส.....	31
ตารางที่ 5	เปอร์เซ็นต์การงอก (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ (ระยะที่ 2-5)	35
ตารางที่ 6	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน.....	37
ตารางที่ 7	ผลของการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพากับราทั้ง 7 ไอโซเลต แสดงด้วยค่า GRI และ DRI เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (asymbiotic) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร OMA เป็นเวลา 4 เดือน	48
ตารางที่ 8	การระบุชนิดของราโดยอาศัยลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS.....	54
ตารางที่ 9	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับราคัดเลือกและชุดควบคุมบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 1 เดือน	77
ตารางที่ 10	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับราคัดเลือกและชุดควบคุมบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 2 เดือน	78
ตารางที่ 11	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับราคัดเลือกและชุดควบคุมบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน	78
ตารางที่ 12	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับราคัดเลือกและชุดควบคุมบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน	79
ตารางที่ 13	ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดย Oneway- ANOVA ของเปอร์เซ็นต์ การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ได้จากเทคนิค <i>in situ</i> seed baiting ในระยะที่ 0, 1 และ 2 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน	80

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1	ลักษณะดอกกล้วยไม้ในสกุล (ก) <i>Phalaenopsis</i> ; (ข) <i>Oncidium</i> ; (ค) <i>Cymbidium</i> และ (ง) ลักษณะเฉพาะของดอกกล้วยไม้ (ตัดแปลงภาพจาก (Hsiao and al., 2011).....	6
รูปที่ 2	โครงสร้างภายในของรากกล้วยไม้ <i>Microtis media</i> เมื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ (ก) ภาคตัดขวางของราก พบพิโลตอนอยู่ภายในเซลล์คอร์เทกซ์ (ลูกศรชี้) และ (ข) ภาพขยายพิโลตอนที่มีเส้นใยภายในเซลล์ราก (ตัดแปลงจาก Ong et al., 2016).....	8
รูปที่ 3	ภาคตัดขวางของรากกล้วยไม้ (ก) แสดงเขตพิโลตอนภายในเซลล์ (ลูกศรชี้) และ (ข) เส้นใยภายในเซลล์แพสเชจ (ลูกศรชี้) (Senthilkumar and Krishnamurthy, 1998).....	9
รูปที่ 4	ภาพวาดโครงสร้างของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ <i>Rhizoctonia repens</i> (<i>Tulasnella calospora</i>) แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยและรูปร่างของเซลล์โมนิลอยด์ (monilioid cell) (Smith and Read, 2010).....	12
รูปที่ 5	ระยะต่าง ๆ ของการพัฒนาของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุล <i>Phalaenopsis</i> ; (ก) เมล็ด ; (ข,ค) เอ็มบริโอที่ยังไม่เปลี่ยนแปลง ; (ง) โปรโตคอร์มที่มีราไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ และ (จ,ฉ) โปรโตคอร์มที่สร้างไรซอยด์ (ตัดแปลงจาก (Smith and Read, 2010)).....	16
รูปที่ 6	ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้ <i>E. flava</i> แสดง (ก) ลำต้นและใบ; (ข) ดอก; (ค) ฝัก และ (ง) ช่อดอก.....	21
รูปที่ 7	(ก) ลักษณะพื้นที่ศึกษาช่วงฤดูน้ำหลาก; (ข) โรโซมที่เกาะกับโชดหิน; (ค) หน่ออ่อนที่เริ่มพัฒนา และ (ง) ต้นกล้วยไม้ <i>E. flava</i>	21
รูปที่ 8	(ก) พื้นที่เก็บตัวอย่างที่ลำธารห้วยแม่ตาว และ (ข) ลักษณะทางกายภาพของลำธารห้วยแม่ตาว และกอกกล้วยไม้ <i>E. flava</i> (ลูกศรชี้).....	25
รูปที่ 9	(ก) ภาพตัดขวางของรากกล้วยไม้ <i>E. flava</i> และ (ข) พิโลตอนอยู่ภายในเซลล์คอร์เทกซ์ (ลูกศรชี้). 26	
รูปที่ 10	ผลทดสอบตรวจสอบความมีชีวิตทางชีวเคมี (ก) เมล็ดไม่มีชีวิต และ (ข) เมล็ดมีชีวิต.....	28
รูปที่ 11	(ก) ลักษณะราก และ (ข) ฝักกล้วยไม้ <i>E. flava</i> ที่เก็บได้จากลำธารห้วยแม่ตาว อ.แม่สอด จ.ตาก 33	
รูปที่ 12	โคโลนีราที่แยกจากรากกล้วยไม้ <i>E. flava</i> บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	34

รูปที่ 13 โคโลนิราที่แยกจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ น้ำ <i>E. flava</i> บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	35
รูปที่ 14 ลักษณะเมล็ดและโปรโตคอร์มกล้วยไม้ น้ำที่ได้จากเทคนิค <i>in situ</i> seed baiting ที่อายุ 1-4 เดือน พบเมล็ดกล้วยไม้บางส่วนไม่พัฒนา (ระยะที่ 0) บางส่วนเอ็มบริโอขยายใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และบางส่วนเอ็มบริโอขยายใหญ่ เปลือกหุ้มเมล็ดปริแตก และพบมีการสร้างไรซอยด์ (ระยะที่ 2).....	36
รูปที่ 15 (ก) ลักษณะเมล็ดกล้วยไม้ น้ำถูกร้าเข้าทำลาย; (ข) เส้นใยราไม่เจริญปกคลุม แต่เอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีดำ; (ค) เส้นใยราเจริญคลุมเมล็ดและเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีดำ	37
รูปที่ 16 เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ <i>E. flava</i> เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA (asymbiotic) บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวมเล็กน้อย (ระยะที่ 1).....	38
รูปที่ 17 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA โดยไม่มีรา (control) ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).....	39
รูปที่ 18 เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ <i>E. flava</i> เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSP13 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1); (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ลูกศรชี้) (ระยะที่ 2) และ (ง) เมล็ดเปลี่ยนเป็นสีคล้ำมีเส้นใยราปกคลุม.....	40
รูปที่ 19 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSP13 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$).....	40
รูปที่ 20 เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ <i>E. flava</i> เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับรา MSP01 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2).....	41
รูปที่ 21 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSP01 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดย	

- ตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)..... 41
- รูปที่ 22** เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSR24 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2)..... 42
- รูปที่ 23** เพอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSP24 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)..... 43
- รูปที่ 24** เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSP02 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2)..... 43
- รูปที่ 25** เพอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSP02 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)..... 44
- รูปที่ 26** เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับรา ไอโซเลต MSR34 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2)..... 45
- รูปที่ 27** เพอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSR34 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)..... 45

รูปที่ 28 เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSR07 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2)..... 46

รูปที่ 29 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSR07 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)..... 46

รูปที่ 30 เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSP04 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1)..... 47

รูปที่ 31 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) ของกล้วยไม้ น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSP04 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) 47

รูปที่ 32 การย่อยสลายไปบางส่วนของขดเส้นใยฟิโลตอนภายในเซลล์โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ น้ำ ที่ 4 เดือนหลังการเพาะเลี้ยง..... 49

รูปที่ 33 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSR07 แสดงลักษณะเส้นใย และเซลล์โมโนลอยด์ (ลูกศรทึบ) 49

รูปที่ 34 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSR24 แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรทึบ) และไมโครสปอร์ (ลูกศรโปร่ง)..... 50

รูปที่ 35 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSR34) แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรทึบ) และไมโครสปอร์ (ลูกศรโปร่ง)..... 50

รูปที่ 36 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSP01 แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรทึบ) และไมโครสปอร์ (มุมบนขวา) 51

รูปที่ 37 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSP02 แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรทึบ) และโคนิเดีย (conidia) (ลูกศรโปร่ง)..... 51

รูปที่ 38 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSP04 แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรชี้) และโคนิเดีย (conidia) (มุมล่างซ้าย)..... 52

รูปที่ 39 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSP13 แสดงลักษณะเส้นใย ไมโครสปอร์ (ลูกศรทึบ) แมคโครสปอร์ (ลูกศรโปร่ง) โคนิเดียรูปร่าง boat shape (ลูกศรเล็ก) และพบ Clamydospore..... 52

รูปที่ 40 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราที่กระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำ ที่ตำแหน่ง ITS (ขีดเส้นใต้) ด้วยแบบจำลอง Maximum-likelihood แสดงเปอร์เซ็นต์ bootstrap จากการทดสอบ 100 ครั้ง..... 55



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (orchid mycorrhiza) คือ ความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) ระหว่างรากับพืชในวงศ์กล้วยไม้ (Batty et al., 2001) ราไมคอร์ไรซามีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อการการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของกล้ากล้วยไม้ตามธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็ก และมีอาหารสะสมอยู่น้อยมาก ไม่เพียงพอที่จะทำให้เมล็ดกล้วยไม้งอกและพัฒนาเป็นต้นกล้าได้เอง จำเป็นต้องอาศัยราไมคอร์ไรซาทำหน้าที่เป็นแหล่งสารอาหาร โดยเส้นใยราจะเจริญเข้าไปในเนื้อเยื่อของเมล็ดกล้วยไม้ สร้างเส้นใยขดตัวหนาแน่นอยู่ในเซลล์ เรียกว่า พีโลตอน (Peloton) (Alghamdi, 2017) ขดเส้นใยดังกล่าวเป็นบริเวณที่เกิดการแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างรากับกล้วยไม้ (Kuga, Sakamoto and Yurimoto, 2014) พีโลตอนนี้จะมีชีวิตอยู่ในระยะเวลาสั้น ๆ ประมาณ 10 วัน (Mollison, 1943) หลังจากนั้นจะสลายตัวเป็นสารอาหารให้กับกล้วยไม้ ขณะเดียวกันพีโลตอนใหม่ก็จะถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วในเซลล์ที่อยู่ข้างเคียง ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่มที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายราในสกุล *Rhizoctonia* โดยมีการแตกแขนงของเส้นใยแบบมุมฉาก มีผนังกันตามขวาง (septum) มักสร้างเซลล์ที่มีลักษณะกลมต่อกันสั้น ๆ ที่เรียกว่า เซลล์โมนิลอยด์ (moniloid cell) รวมทั้งสร้างโครงสร้างที่ใช้พักตัวเรียกว่า สเคลอโรเทีย (sclerotia) ราในกลุ่มนี้เมื่อสร้างโครงสร้างที่ใช้สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจัดอยู่ในวงศ์ *Tulasnellaceae*, *Ceratobasidiaceae* และ *Sebacinaceae* ของไฟลัม Basidiomycota นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าราวงศ์อื่น ๆ ทั้งในไฟลัม Basidiomycota และไฟลัม Ascomycota สามารถเป็นราไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้ได้ คือสามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของกล้ากล้วยไม้ (Rasmussen, 1995; Bidartondo et al., 2004; Smith and Read, 2010) นับได้ว่าราไมคอร์ไรซานั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการขยายพันธุ์และการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ในธรรมชาติ

จากบทบาทของราไมคอร์ไรซาที่มีต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้จึงได้มีการศึกษาเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซาในสภาพปลอดเชื้อที่เรียกว่า การงอกเมล็ดแบบพึ่งพาอาศัย (symbiotic seed germination) เป็นการเลียนแบบบทบาทของราในธรรมชาติ โดยราไมคอร์ไรซาจะทำหน้าที่ย่อยและถ่ายโอนสารอาหารจากอาหารเพาะเลี้ยงส่งให้กับเมล็ดกล้วยไม้ เอ็มบริโอภายในเมล็ดเมื่อได้รับสารอาหารจากรากก็จะพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์ัม ต้นกล้า และกล้วยไม้ที่สมบูรณ์

ในที่สุด แม้ว่าในปัจจุบันการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อที่เรียกว่า asymbiotic seed germination แต่เมล็ดกล้วยไม้ในธรรมชาติอีกหลายชนิดไม่สามารถงอกและเพาะเลี้ยงได้ในอาหารสังเคราะห์ดังกล่าว เนื่องจากประสบปัญหา เช่น ต้นกล้าในขวดหยุดพัฒนา หรือมีอัตราการตายสูงหลังจากย้ายออกปลูก (Chugh, Guha and Rao, 2009) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเมล็ดร่วมกับราไมคอร์ไรซาจึงนับว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ โดยเฉพาะกล้วยไม้ป่าที่ถูกคุกคามและใกล้จะสูญพันธุ์ให้มีจำนวนมากขึ้น เพื่อประโยชน์ในแง่ของการอนุรักษ์หรือเพื่อการค้า มีรายงานว่า การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซาสามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกเจริญไปเป็น โปรโตคอร์ัมและต้นกล้าได้มากและรวดเร็วกว่าเมล็ดที่เพาะบนอาหารสังเคราะห์ อีกทั้งต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเมล็ดแบบพึ่งพานั้นมีความแข็งแรงทนทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชต่าง ๆ ได้ดี ทำให้มีความเหมาะสมต่อการย้ายปลูกในธรรมชาติได้ดีกว่าต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ (Withner, Nelson and Wejksnora, 1974; Rasmussen, Andersen and Johansen, 1990; Stewart and Kane, 2006; Johnson et al., 2007; Yam and Arditti, 2009; Nontachaiyapoom, Sasirat and Manoch, 2011; Khamchatra et al., 2016b) แม้ว่าการเพาะเมล็ดร่วมกับราไมคอร์ไรซาจะเป็นทางเลือกที่ดีและน่าสนใจ แต่อย่างไรก็ตาม ชนิดของราไมคอร์ไรซาที่จะกระตุ้นการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้นั้นมีความจำเพาะกับชนิดกล้วยไม้ ซึ่งความจำเพาะของราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้มีหลายระดับขึ้นอยู่กับชนิดของราและชนิดของกล้วยไม้ กล้วยไม้บางชนิดมีความสัมพันธ์กับรามากกว่า 1 ชนิด และราบางชนิดมีความสัมพันธ์กับกล้วยไม้มากกว่า 1 ชนิด (Harvais and Hadley, 1967) พบว่ากล้วยไม้สกุล *Dactylophiza* บางชนิดสามารถเจริญร่วมกับราทดสอบที่แยกจากรากกล้วยไม้ได้ทุกไอโซเลต ในขณะที่กล้วยไม้ *Platanthera praeclara* มีรา *Ceratorhiza* sp. (UAMH 9874) เพียงหนึ่งสายพันธุ์ที่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเจริญเป็นต้นกล้า ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่มีความเหมาะสมเพื่อใช้ในการกระตุ้นการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้แต่ละชนิด

กล้วยไม้น้ำ *Epipactis flava* Seidenf. เป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญอยู่ตามโขดหินหรือโคนรากไม้ใหญ่ที่ขึ้นอยู่ในลำธารที่มีน้ำไหล จัดอยู่ในกลุ่ม rheophytic orchid พบกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศไทย ลาว พม่า และเวียดนาม (Pedersen, Watthana and Srimuang, 2013) สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบครั้งแรกที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี ในปี พ.ศ. 2469 และถูกตั้งเป็นกล้วยไม้ชนิดใหม่ของโลกในปี พ.ศ. 2521 มีถิ่นอาศัยตามโขดหินปูน บริเวณลำธารที่มีน้ำไหล เจริญอยู่เป็น

กลุ่มกอ ลำต้นตั้งตรงเจริญออกจากเหง้าที่อยู่ใต้น้ำ สูงประมาณ 40-80 เซนติเมตร ใบรูปหอก ช่อดอกแบบกระจง (Raceme) ตั้งตรง ดอกประมาณ 1.5 เซนติเมตร กลีบดอกรูปรีแกมรูป ขอบขนาน กลีบเบี้ยว ปลายมน กลีบปาก 3 แฉก แฉกข้างมีขนาดใหญ่ มีสันที่โคนกลีบจำนวน 2 สัน กลีบเลี้ยงรูปขอบขนานสีเขียวแกมเหลืองมีขนกำมะหยี่ปกคลุม ออกดอกในช่วงเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ พบการกระจายพันธุ์ที่จังหวัดกาญจนบุรี ตาก และน่าน (สลิล สิทธิสังธรรม, 2549; บวร คุณากรนุรักษ์, 2557) เนื่องจากความจำเพาะต่อแหล่งอาศัย จากการสำรวจพบว่าหากมีการเปลี่ยนแปลงทิศทางหรือความแรงของกระแสน้ำไม่ว่าจะเกิดขึ้นตามธรรมชาติหรือเป็นผลจากการกระทำของมนุษย์ เช่นการบุกรุกถิ่นอาศัยเพื่อทำการเกษตร หรือการเปลี่ยนแปลงสภาพพื้นที่บริเวณแม่น้ำแควน้อย จังหวัดกาญจนบุรี เพื่อสร้างเขื่อนวชิราลงกรณ์ (Pedersen, Watthana and Srimuang, 2013) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น สภาวะโลกร้อน ส่งผลกระทบทำให้จำนวนประชากรกล้วยไม้ในธรรมชาติลดลงอย่างมาก อีกทั้งกล้วยไม้มีวงชีวิตที่ต่างจากกล้วยไม้ชนิดอื่น คือจะลดรูปเหลือเพียงเหง้าในฤดูฝนและเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์อีกครั้งในช่วงฤดูแล้งเท่านั้น จึงยากที่จะขยายพันธุ์ ด้วยเหตุผลต่าง ๆ ที่กล่าวมาจึงถูกจัดให้เป็นกล้วยไม้ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Endangered species) ของไทย (Santisuk et al., 2006) จากสถานภาพของกล้วยไม้ที่อยู่ในธรรมชาติกำลังเผชิญกับภาวะวิกฤตจึงจำเป็นต้องเร่งขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนกล้วยไม้ให้มากขึ้น แม้ว่าปัจจุบันจะมีรายงานการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ด้วยอาหารสังเคราะห์ได้สำเร็จโดยใช้เวลาพัฒนาของเมล็ดจนสร้างยอดอ่อนประมาณ 10 สัปดาห์ แต่ต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 8-9 เดือน เลี้ยงในขวดทดลองก่อนย้ายออกปลูกบนวัสดุเพาะที่เฉพาะเจาะจง และการพัฒนาของหน่ออ่อนหลังย้ายปลูกเป็นไปค่อนข้างช้า (คุณากรนุรักษ์, 2557) อีกทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาความหลากหลายของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้และการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ชนิดนี้ร่วมกับราไมคอร์ไรซามาก่อน ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้จะนำไปสู่การคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ ซึ่งจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มจำนวนประชากรกล้วยไม้เพื่อการอนุรักษ์และลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของกล้วยไม้ชนิดนี้ของไทยต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

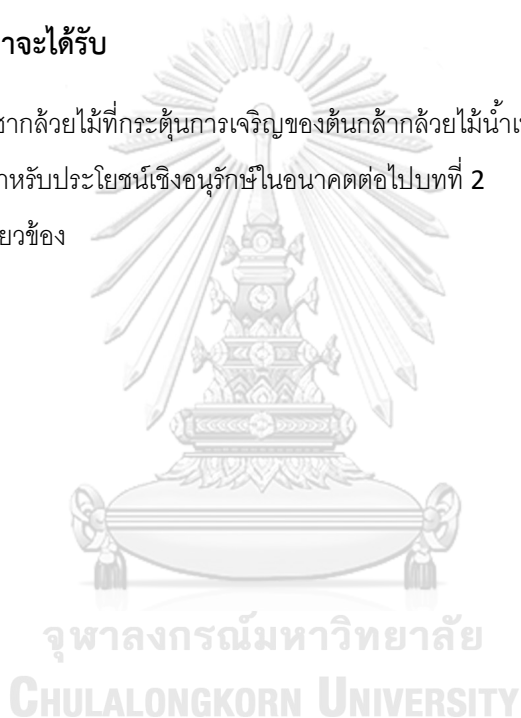
1. เพื่อแยกราไมคอร์ไรซาจากรากและโปรโตคอมของกล้วยไม้
2. เพื่อคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่สามารถกระตุ้นการเจริญของต้นกล้ากล้วยไม้

1.3 แผนการดำเนินการวิจัย

1. แยกกราเอนโตไฟต์จากรากและโปรโตคอร์มของกล้วยไม้
2. ทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาในหลอดทดลอง
3. จำแนกและระบุชนิดของราที่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้จามาโครไรซากกล้วยไม้ที่กระตุ้นการเจริญของต้นกล้ากล้วยไม้ นำไปใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวน สำหรับประโยชน์เชิงอนุรักษ์ในอนาคตต่อไปบทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

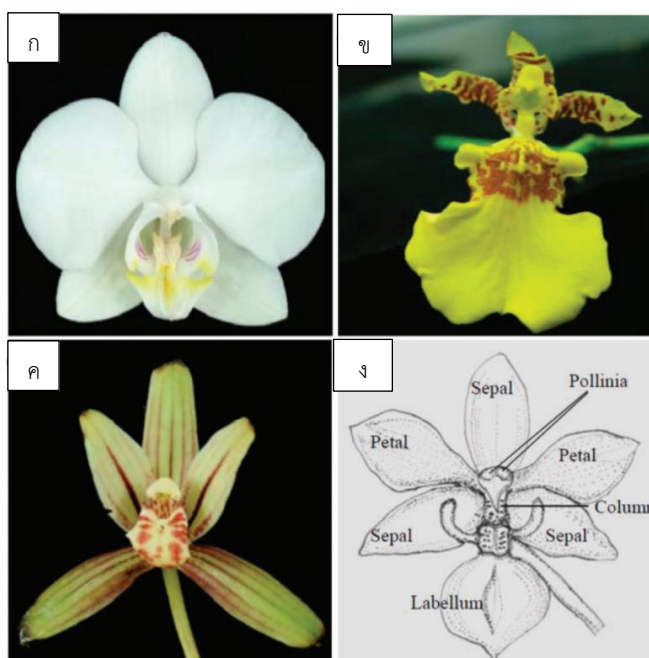


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีวิตวิทยาของกล้วยไม้และสถานภาพปัจจุบันของกล้วยไม้ในประเทศไทย

กล้วยไม้เป็นพืชดอกในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plant) วงศ์ Orchidaceae ซึ่งมีความหลากหลายมากที่สุดในพืชดอก ปัจจุบันพบกล้วยไม้ประมาณ 800 สกุล 27,000 ชนิดทั่วโลก (Govaerts, 2017) จัดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchid) มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ และอีก 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตในพื้นที่เฉพาะ เช่น กล้วยไม้ที่เจริญเติบโตบนหิน (lithophytic orchid) หรือกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตในกระแสน้ำ (rheophytic orchid) (Dressler, 1993) มีการกระจายพันธุ์ในถิ่นอาศัยแบบต่าง ๆ ทั่วโลก ตั้งแต่บริเวณที่มีน้ำแข็งปกคลุม ไปจนถึงเขตอบอุ่นและเขตร้อน กล้วยไม้เป็นกลุ่มพืชที่มีลักษณะของดอก ใบ ลำต้น และรากที่หลากหลาย รวมถึงขนาดที่พบได้ตั้งแต่ขนาดเล็กไปจนถึงเป็นเถาวัลยาวหลายเมตร ดอกกล้วยไม้มีรูปร่างที่สวยงามแปลกตาต่างจากพืชดอกชนิดอื่น ๆ และมีลักษณะสำคัญดังรูปที่ 1 ได้แก่ กลีบเลี้ยงจำนวน 3 กลีบซึ่งมีลักษณะคล้ายกลีบดอก กลีบดอก 3 กลีบ โดยกลีบตรงกลางมีลักษณะแตกต่างจากกลีบอื่น ๆ เรียกว่า กลีบปาก (labellum) ตรงกลางดอกเป็นเส้าเกสร ซึ่งเป็นที่รวมชั้นเกสรเพศผู้และส่วนของเกสรเพศเมียไว้ด้วยกัน อับเรณูเป็นกลุ่ม มี 2 หรือ 8 กลุ่ม ฝังอยู่ในใต้วงกลีบ ผลหรือฝักมีรูปร่างแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด เมื่อแก่เต็มที่จะแตกตามแนวยาว (อบฉันท ไทยทอง, 2549) เมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก มีลักษณะคล้ายผงฝุ่น ทำให้ภายในหนึ่งฝักมีเมล็ดเป็นจำนวนมาก โดยการวิวัฒนาการให้เมล็ดของกล้วยไม้มีขนาดเล็กและน้ำหนักเบา นั้น เอื้อต่อการกระจายพันธุ์ให้ไปได้ไกล และเมล็ดกล้วยไม้สามารถตรึงอาหารสะสมให้มีเพียงเล็กน้อยได้นั้น เนื่องจากในช่วงหนึ่งของชีวิตโดยเฉพาะในระยะการงอกของเมล็ดมีการดำรงเป็นแบบปรสิตกับรา โดยการได้รับคาร์บอนและธาตุอาหารต่าง ๆ เพื่อช่วยให้เมล็ดงอกและพัฒนาต่อไปเป็นต้นอ่อน เมื่อเมล็ดกล้วยไม้ปลิวตกในบริเวณที่สภาพแวดล้อมเหมาะสมและมีความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซากับรา บางส่วนของเมล็ดเหล่านี้จะสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นกล้าได้ (Rasmussen and Rasmussen, 2014) จากความสามารถดังกล่าวทำให้กล้วยไม้เป็นพืชที่มีความหลากหลายและนับได้ว่าเป็นพืชที่มีวิวัฒนาการขั้นสูงในอาณาจักรพืช



รูปที่ 1 ลักษณะดอกกล้วยไม้ในสกุล (ก) *Phalaenopsis*; (ข) *Oncidium*; (ค) *Cymbidium* และ (ง) ลักษณะเฉพาะของดอกกล้วยไม้ ดัดแปลงภาพจาก (Hsiao et al., 2011)

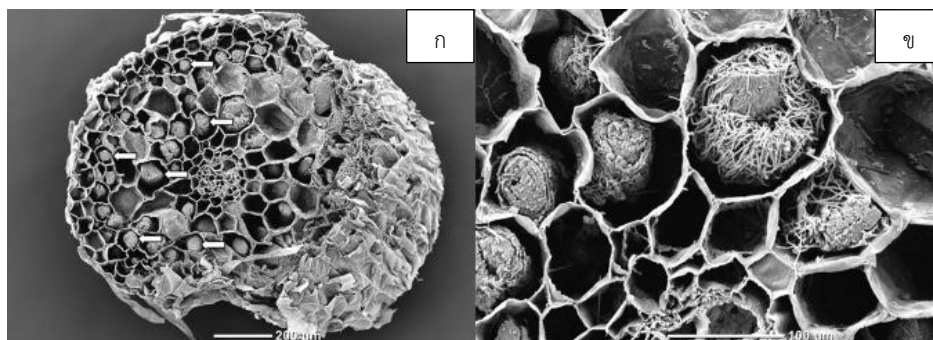
ด้วยรูปลักษณ์ที่สวยงามสะดุดตา อีกทั้งสีสันที่หลากหลาย และบางชนิดผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางยาเพื่อการรักษาโรคได้ ทำให้กล้วยไม้เป็นไม้ดอกไม้ได้รับความนิยมไปทั่วโลก เมื่อความต้องการเพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกิดการเก็บกล้วยไม้จากธรรมชาติที่มากเกินไป อีกทั้งบางชนิดยากที่จะเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ ส่งผลให้ปัจจุบันประชากรกล้วยไม้บางชนิดลดจำนวนลงอย่างมาก ในประเทศไทยพบกล้วยไม้ประมาณ 1,200 ชนิด (Pedersen et al., 2014) หลายชนิดถูกจัดเป็นกล้วยไม้หายากและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Santisuk et al., 2006) เช่น กล้วยไม้ในสกุลรองเท้านารี (Rankou and Averyanov, 2015) โดยสาเหตุหลักของการใกล้สูญพันธุ์มาจากการกระทำของมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม ได้แก่ การบุกรุกทำลายถิ่นอาศัย และการลักลอบเก็บกล้วยไม้ป่าเพื่อประโยชน์ทางการค้า (Gale et al., 2018) อีกทั้งการเพิ่มจำนวนของกล้วยไม้ในธรรมชาตินั้นถูกจำกัดด้วยลักษณะชีววิทยาของเมล็ดกล้วยไม้เอง นอกจากนี้ความรุนแรงของการลดลงของจำนวนประชากรกล้วยไม้ยังขึ้นอยู่กับ การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ ความเฉพาะเจาะจงต่อพื้นที่ และขนาดประชากรของกล้วยไม้แต่ละชนิด (Rabinowitz, Cairns and Dillon, 1986) ดังนั้นการอนุรักษ์และการช่วยเพิ่มปริมาณประชากรกล้วยไม้ในธรรมชาติ จึงเป็นเรื่องสำคัญที่ควรได้รับการพัฒนาบนพื้นฐานความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้อง เพื่อลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของกล้วยไม้อย่างยิ่งยั้ง

2.2 ไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (orchid mycorrhiza)

ไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) คือความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยที่ต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ระหว่างรากกับรากพืช โดยรากดังกล่าวต้องไม่ใช่รากที่ก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย (Brundrett et al., 2003) สำหรับไมคอร์ไรซากล้วยไม้เป็นความสัมพันธ์ระหว่างพืชวงศ์กล้วยไม้กับรา โดยความสัมพันธ์นี้แตกต่างจากไมคอร์ไรซาประเภทอื่น คือ สามารถพบราได้ทั้งในเซลล์ราก เหง้า และลำต้นของพืช ขณะที่ราไมคอร์ไรซาประเภทอื่นพบได้เฉพาะบริเวณรากเท่านั้น (Smith and Read, 2010) ตามธรรมชาติช่วงระยะเวลาหนึ่งของวงชีวิตกล้วยไม้จะมีการดำรงชีวิตโดยพึ่งพาสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการงอกและการพัฒนาจากราก ทั้งนี้เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก อาหารสะสมไม่เพียงพอเพื่อการงอกจากเมล็ดไปเป็นต้นกล้าได้เอง นอกจากนี้ พบว่าในกล้วยไม้ที่โตเต็มวัย ราไมคอร์ไรซายังคงทำหน้าที่หาน้ำและธาตุอาหารให้กับกล้วยไม้ ขณะเดียวกันราก็ได้รับสารอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นการตอบแทน (Cameron, Leake and Read, 2006)

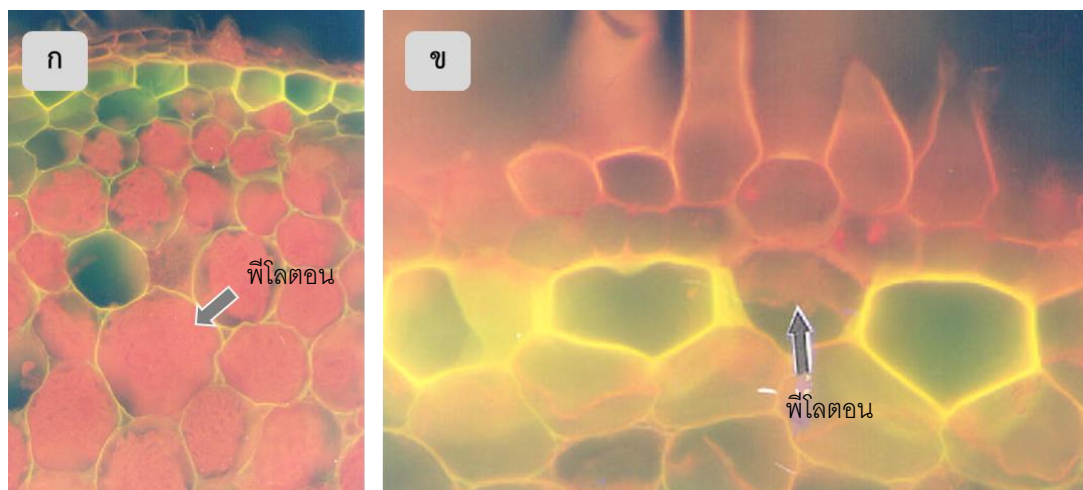
2.3 กลไกการเข้าสู่กล้วยไม้ของราไมคอร์ไรซา

เส้นใยราสามารถเข้าสู่เซลล์พืชผ่านทางเซลล์ซิสเพนเซอร์ (Suspensor) ที่ฐานของเอ็มบริโอหรือเซลล์ขนราก โดยจะเจริญผ่านช่องว่างระหว่างผนังเซลล์กับเยื่อหุ้มเซลล์แล้วเจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ โดยราสรางโครงสร้างพิเศษลักษณะเป็นขด ที่เรียกว่าฟิโลตอน (รูปที่ 2) ภายในเซลล์ของโปรโตคอร์รัมที่กำลังพัฒนา ในโรโซม หรือในรากของกล้วยไม้ที่โตเต็มที่ ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญของไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (Peterson and Farquhar, 1994; Smith and Read, 2010) ราไมคอร์ไรซาจะเข้าสู่กล้วยไม้หรือมีรูปแบบการเข้าติดเชื่อได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ ชนิดของรา และโครงสร้างของกล้วยไม้ เช่น ราก ลำต้น โคนต้น และเหง้า (Ramsay, 1986) ซึ่งเซลล์ของกล้วยไม้มีกลไกควบคุมการเข้าติดเชื่อของรา โดยการสร้างสาร phytoalexins ที่เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก เทอร์ปีนอยด์ และออลิฟาติกส์ มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจึงมีผลในทางยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคที่เข้าทำลายพืช สร้างขึ้นจากลำต้นสะสมอาหาร ราก และโปรโตคอร์รัมของกล้วยไม้ เมื่อเส้นใยราเจริญเข้าสู่เซลล์ เซลล์กล้วยไม้สร้างและปล่อยสารนี้ออกมา (Gehlert and Kindl, 1991) แต่จะปล่อยออกมาในระดับที่ส่งผลแค่ควบคุมไม่ใช่เพื่อยับยั้งการเจริญของรา เพื่อให้รากดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดโรคต่อเซลล์กล้วยไม้ (Beyrle et al., 1995)



รูปที่ 2 โครงสร้างภายในของรากกล้วยไม้ *Microtis media* เมื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ (ก) ภาคตัดขวางของราก พบฟีโลตอนอยู่ภายในเซลล์คอร์เทกซ์ (ลูกศรชี้) และ (ข) ภาพขยายฟีโลตอนที่มีเส้นใยราภายในเซลล์ราก (ดัดแปลงจาก Ong et al., 2016)

จากการศึกษาโครงสร้างของราไมคอร์ไรซา *Euphlorhiza repens* ในรากกล้วยไม้ *Spathoglottis plicata* ในรายงาน ของ (Senthilkumar and Krishnamurthy, 1998) พบว่าในเนื้อเยื่อชั้นเอ็กโซเดอร์มิส (exodermis) ซึ่งเป็นชั้นที่อยู่ถัดจากเนื้อเยื่อผิวราก จะพบเส้นใยของราไมคอร์ไรซาเฉพาะที่เซลล์แพสเสจ (passage cell) (รูปที่ 3 ข) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีผนังบางเนื่องจากไม่มีการสะสมของซูเบอรินที่ผนังเซลล์ (Peterson, 1988) แต่จะไม่พบเส้นใยราในเซลล์ที่มีแถบแคสพาเรียน (Casparian strip) รวมถึงการไม่พบขดฟีโลตอนในเนื้อเยื่อชั้นนี้ แต่จะพบเฉพาะในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์เท่านั้น (รูปที่ 3 ก) แสดงให้เห็นว่าในรากกล้วยไม้ชนิดนี้ เซลล์แพสเสจเป็นช่องทางผ่านเข้าออกของเส้นใยไปสู่เนื้อเยื่อชั้นคอร์เทกซ์เพียงช่องทางเดียว ในกล้วยไม้ชนิดนี้มีเซลล์แพสเสจอยู่ที่ขนราก เส้นใยราจึงผ่านเข้าไปบริเวณนี้เสมอ ในขณะที่กล้วยไม้ชนิดอื่นเส้นใยราอาจผ่านเข้าทางเซลล์เนื้อเยื่อผิวราก หรือเป็นไปได้ทั้งสองทาง โดยเส้นใยราต้องผ่านชั้นวิลลาเมน (velamen) ก่อนจะผ่านเซลล์แพสเสจในชั้นเอ็กโซเดอร์มิส ในกล้วยไม้บางชนิดพบว่าเมื่อราเข้าไปเจริญจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของขนราก เช่น ขนรากบิดงอ โดยตำแหน่งที่เกิดการบิดงอส่วนใหญ่คือตำแหน่งที่เส้นใยราผ่านเข้าไปภายในเซลล์เนื้อเยื่อผิวรากหรือขนราก แล้วเกิดการขดตัวอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ โดยเส้นใยราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ เส้นใยฟีโลตอน (pelotonic hyphae) ซึ่งจะขดตัวเป็นฟีโลตอนภายในเซลล์พีชอาศัย และถูกย่อยสลายกลายเป็นแหล่งสารอาหารให้กล้วยไม้ต่อไป อีกหนึ่งประเภทคือเส้นใยที่ไม่สร้างฟีโลตอน (non-pelotonic hyphae) เป็นเส้นใยที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์ของพีชอาศัย และเป็นแหล่งสร้างเส้นใยที่จะเข้าไปขดตัวเป็นฟีโลตอนรุ่นใหม่เมื่ออันติมถูกย่อยสลาย โดยในหนึ่งเซลล์ของพีชอาศัยสามารถสร้างฟีโลตอนได้ถึง 4 รุ่น (Senthilkumar and Krishnamurthy, 1998)



รูปที่ 3 ภาคตัดขวางของรากกล้วยไม้ (ก) แสดงคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ (ลูกศรชี้) และ (ข) เส้นใยราในเซลล์แพสเซนจ (ลูกศรชี้) (Senthilkumar and Krishnamurthy, 1998)

2.4 สรีรวิทยาของไมคอร์ไรซากล้วยไม้

โดยทั่วไปความสัมพันธ์ระหว่างราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้มักถูกระบุว่าเป็นภาวะพึ่งพาอาศัยอย่างแท้จริง (true mutualism) (Deamaley, 2007) ขณะที่บางรายงานกล่าวว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นได้ตั้งแต่ภาวะปรสิตจนถึงภาวะพึ่งพาอาศัย (Buscot et al., 2000) ภาวะการอยู่ร่วมกันของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ถูกอธิบายในเชิงของการแลกเปลี่ยนสารอาหารว่าราเป็นผู้ส่งแร่ธาตุและสารอาหารให้แก่กล้วยไม้ ในขณะที่สารอาหารที่ส่งกลับมามีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Smith and Read, 2010) นอกจากนี้ราไมคอร์ไรซายังเป็นมีบทบาทสำคัญในการดูดซึมน้ำให้แก่กล้วยไม้ พบว่าปริมาณน้ำของต้นกล้วยไม้ดิน *Platanthera integrilabia* และกล้วยไม้อิงอาศัย *Epidendrum conopseum* ที่เจริญร่วมกับราไมคอร์ไรซาสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีราอยู่ (Yoder, Zettler and Stewart, 2000) การส่งธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และน้ำจากราไปยังกล้วยไม้ยังคงเกิดขึ้นต่อเนื่องแม้ว่ากล้วยไม้จะเจริญเป็นต้นสมบูรณ์และสังเคราะห์ด้วยแสงได้แล้วก็ตาม และมีการส่งคาร์บอนที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสงนี้กลับคืนสู่รา ซึ่งเป็นการยืนยันถึงภาวะพึ่งพาอาศัยแบบได้ประโยชน์ร่วมกัน

ผลการศึกษาการส่งคาร์โบไฮเดรตจากราให้กล้วยไม้โดยการติดฉลากสารเรืองแสงที่ไม่เลกุลน้ำตาลกลูโคสที่รา *Mycena osmundicola* ส่งให้แก่ต้นกล้าของ *Gastrodia elata* พบการเรืองแสงที่เนื้อเยื่อเจริญของพืช ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีราไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ (Lan, Xu and Li, 2000) ขณะที่

ต้นกล้าของกล้วยไม้บางชนิดสามารถส่งสารอาหารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงให้แก่ราไมคอร์ไรซาได้ (Cameron, Leake and Read, 2006; Wang et al., 2013)

Zhou et al. (2009) รายงานว่าต้นกล้าที่เจริญร่วมกับรา จะมีจำนวนปากใบและปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่าต้นกล้าของกล้วยไม้ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับรา ส่งผลให้ต้นกล้าดังกล่าวมีอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงเพิ่มขึ้น สามารถอธิบายได้ว่าราไมคอร์ไรซาทำหน้าที่เป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญต่าง ๆ นั่นเอง การที่กล้วยไม้ที่เจริญเต็มวัยแล้วยังคงรับคาร์บอนและธาตุอาหารจากราไมคอร์ไรซาอยู่ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการสำหรับการเจริญเติบโตและพัฒนาของกล้วยไม้ (Zhang et al., 2012)

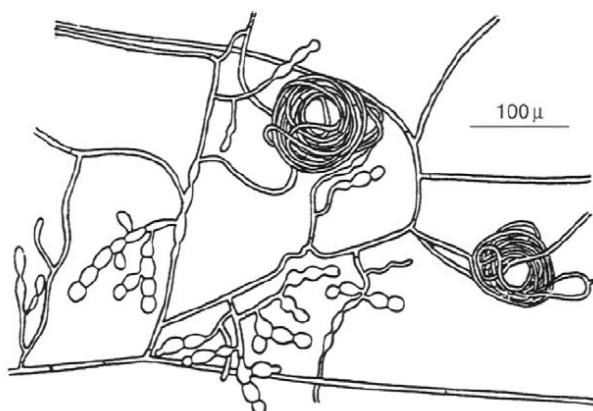
กระบวนการแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างราและกล้วยไม้นั้น จะเกิดขึ้นบริเวณที่มีฟีโลตอนสมบูรณ์ โดยจะพบฟีโลตอนมากในบริเวณส่วนของรากที่มีสีน้ำตาล (brown zone) แต่ไม่พบในส่วนรากที่มีสีขาว (white zone) และพบว่ามีการไหลเวียนของธาตุคาร์บอนเกิดขึ้นขณะที่มีการย่อยสลายของขดเส้นใยฟีโลตอน (Cameron et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า การย่อยสลายของฟีโลตอนในกล้วยไม้ต่างชนิดกันจะใช้เวลาแตกต่างกัน เช่น ฟีโลตอนในกล้วยไม้ *Dactylorhiza incarnate* จะถูกย่อยสลายหลังจากที่เส้นใยเข้าติดเชื้อเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน (Burgeff, 1936 cited in Huynh et al., 2004) ส่วนในกล้วยไม้ *S. plicata* ฟีโลตอนจะเริ่มถูกย่อยในวันที่ 10 หลังจากการเริ่มสร้างฟีโลตอน (Senthilkumar and Krishnamurthy, 1998) ในกล้วยไม้บางชนิด การเข้าติดเชื้อของราในโปรโตคอร์มกล้วยไม้เกิดขึ้นโดยใช้เวลา 14 ชั่วโมง สร้างฟีโลตอนในเวลา 29 ชั่วโมง และย่อยสลายภายในเวลา 40 ชั่วโมง (Hadley and Williamson, 1971) ผนังเส้นใยของฟีโลตอนมี 2 ชั้น ผนังชั้นนอกเป็นชั้นที่ผสมระหว่างราและพืช ประกอบด้วยไคติน โปรตีน และพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งก็คือเพกทินทั้งในรูปแบบที่ถูก esterified และ ไม่ถูก esterified ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุของเส้นใยที่ขดตัวเป็นฟีโลตอน (Peterson and Currah, 1990)

Peterson and Currah (1990) ศึกษาพบชั้นเมือกเซลลูโลสในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ ในการศึกษาต่อมาพบว่า ชั้นดังกล่าวไม่ใช่เซลลูโลสแต่เป็นแคลโลส (callose) (Senthilkumar and Krishnamurthy, 1998) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคส ที่มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารซึมผ่านเป็นสารที่พืชหลั่งออกมาเพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายเมื่อเกิดบาดแผล พบสารแคลโลสสะสมมากบริเวณที่มีการเสื่อมสลายของฟีโลตอนของรา *Rhizoctonia cerealis* ในกล้วยไม้ *P. hyperborean* (Richardson, Peterson and Currah, 1992) แสดงให้เห็นว่าเซลล์พืชสร้างสารแคลโลสขึ้นมาเพื่อแยกฟีโลตอนที่กำลังถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ออกจากไซโทพลาสซึมของเซลล์กล้วยไม้

กระบวนการย่อยสลายและเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายฟีโลตอนถูกควบคุมโดยเซลล์ของกล้วยไม้ นิวเคลียสของเซลล์กล้วยไม้ที่มีฟีโลตอนอยู่จะขยายใหญ่ขึ้นและมีรูปร่างเปลี่ยนไปเนื่องมาจากปริมาณ ดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังถูกล้อมรอบด้วยสารแคลโลส ในภาวะปกติเส้นใยเราจะเรียงตัวกันอย่าง หลวม ๆ แต่จะเริ่มขดตัวแน่นขึ้น และคลายตัวออกอีกครั้งเมื่อฟีโลตอนมีอายุมากขึ้นและถูกย่อยสลาย เป็นผลมาจากความหนาแน่นของไซโทพลาสซึมของเซลล์พืชที่มีความหนาแน่นต่างจากไซโทพลาสซึม ของเส้นใยรา (Senthilkumar and Krishnamurthy, 1998) เมื่อเส้นใยฟีโลตอนเสื่อมสภาพจะมี ขนาดเล็กลง เส้นใยจะเรียวยาวแหลมขึ้น สูญเสียลักษณะเฉพาะของเส้นใย ฟีโลตอนจะเคลื่อนที่ไปใกล้ผนังของเซลล์พืช ปริมาณฟอสโฟลิพิด เพกทินที่ไม่ถูก esterified โปรตีน โพลีแซกคาไรด์ที่ไม่ละลาย น้ำ และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้น ตรงข้ามกับปริมาณของไคติน และเซลลูโลสในผนังเซลล์ที่ ค่อย ๆ ลดลง และในขณะที่ฟีโลตอนถูกย่อยนั้น เส้นใยรากติยังคงอาศัยอยู่ในเซลล์พืช เพื่อเป็น แหล่งสร้างฟีโลตอนใหม่ในเซลล์เดิมหลังจากกระบวนการย่อยฟีโลตอนเดิมเสร็จสิ้นลง (Peterson and Currah, 1990) เซลล์ของพืชที่มีราเข้าไปเจริญและสร้างขดฟีโลตอนยังคงสภาพที่สมบูรณ์และมี กิจกรรมต่าง ๆ ในเซลล์อย่างต่อเนื่อง เซลล์ขยายขนาดเพิ่มขึ้นประมาณ 3-5% เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ ปริมาณดีเอ็นเอและฮิสโตนเพิ่มขึ้น นิวเคลียสขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นที่ไม่มีราอาศัยอยู่ เซลล์มีรูปร่าง เป็นทรงกลมหรือมีรูปร่างเปลี่ยนไป เมื่อตรวจสอบด้วยการย้อมด้วยสีย้อม toluidine blue O, azurae B และ methyl green จะพบความแตกต่างของรอยหยักหรือพูของนิวเคลียส (Krishnamurthy, 1988)

2.5 ความหลากหลายของราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้และการระบุชนิด

ราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ส่วนมากถูกระบุเป็นราที่มีลักษณะคล้ายราในสกุล *Rhizoctonia* ราใน สกุลนี้จะไม่มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ และชักนำให้สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศบนอาหาร เพาะเลี้ยงได้ยาก (Rasmussen, 2002) การระบุชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้จาก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใย โครงสร้าง และโคโลนีของรา พิจารณาจากการมีหรือไม่มีของรูที่ ผนังกันตามขวาง (septal pore) (Currah and Sherburne, 1992) ลักษณะการเจริญของเส้นใย รูปร่างของเซลล์โมนิลอยด์ (monilioid cell) (รูปที่ 4) จำนวนนิวเคลียสภายในเซลล์ หรือการสร้างส เคลอโรเทีย เป็นต้น (Otero, Bayman and Ackerman, 2005) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ดังกล่าวกับราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ที่เคยมีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ ราที่แยกได้มักเจริญอยู่ในระยะไม่ อาศัยเพศ และเมื่อชักนำให้สร้างระยะอาศัยเพศ พบว่าเป็นราในไฟลัม Basidiomycota โดยแบ่งราที่มี ลักษณะของราสกุล *Rhizoctonia* ออกเป็น 4 สกุล (Smith and Read, 2010) ตามตารางที่ 1



รูปที่ 4 ภาพวาดโครงสร้างของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ *Rhizoctonia repens* (*Tulasnella calospora*) แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยและรูปร่างของเซลล์โมนิลอยด์ (monilioid cell) (Smith and Read, 2010)

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มและสกุลของรากกลุ่ม *Rhizoctonia* (Smith and Read, 2010)

Teleomorph			Anamorph
Order	Family	Genus	
Cantharellales	Ceratobasidaceae	<i>Ceratobasidium</i>	<i>Certorhiza</i> (Moore, 1987)
		<i>Thanatephorus</i>	<i>Moniliopsis</i> (Moore, 1987)
	Tulasnellaceae	<i>Tulasnella</i>	<i>Epulorhiza</i> (Moore, 1987)
	Sebacinaceae	<i>Sebacina</i>	<i>Rhizoctonia</i> (Warcup and Talbot, 1967)

ไม่เพียงแต่ราในกลุ่ม *Rhizoctonia* เท่านั้นที่ได้รับความสนใจ แต่ยังมีการศึกษาเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ทั้งที่เมื่อโตสมบูรณ์ได้รับคาร์บอนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (fully autotrophic species) กล้วยไม้ที่พึ่งพาสารอาหารจากราตลอดทั้งชีวิต (fully mycoheterotrophic species) และกล้วยไม้ที่ได้รับสารอาหารจากทั้งสองแบบ (mixotrophic species) (Dearnaley, Martos and

Selosse, 2012) ครอบคลุมในแหล่งอาศัยทุกแบบ ได้แก่ กล้วยไม้ดิน (terrestrial), กล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic) และกล้วยไม้ที่เจริญบนหิน (lithophytic) นิยามของราเอนโดไฟต์ คือ ราทั้งหมดที่อาศัยอยู่ในอวัยวะต่าง ๆ ของพืชในช่วงหนึ่งของชีวิต โดยการเข้าไปอยู่นั้นไม่เป็นอันตรายและไม่ก่อโรคแก่เซลล์พืชอาศัย โดยพบว่าราเอนโดไฟต์หลายชนิดสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ ตัวอย่างเช่น (Hou and Guo, 2009) พบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาก *Dendrobium* และ *Leptodontidium* spp. ทำหน้าที่เป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้เมื่ออยู่ร่วมกับเมล็ดของ *D. nobile* ราดังกล่าวมีการสร้างขดเส้นใยฟีลิตอนภายในเซลล์กล้วยไม้และส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่ต้นกล้า กล้วยไม้ ราในสกุล *Fusarium* ส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Cypripedium* และ *Platanthera* แม้ว่าจะให้ประสิทธิภาพน้อยกว่าราในกลุ่มที่คล้าย *Rhizoctonia* นอกจากนี้ รา *Umbelopsis nana* ที่แยกได้จากกล้วยไม้ *Cymbidium* spp. ส่งผลต่อการพัฒนาของกล้วยไม้ *C. hybridum* โดยช่วยเพิ่มปริมาณของธาตุโพแทสเซียม แคลเซียม ทองแดง และแมงกานีส ให้แก่ต้นกล้า (Gebauer and Meyer, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าราเอนโดไฟต์ในสกุล *Chaetomium* *Colletotrichum* *Helicomyces* *Humicola* *Trichoderma* และ *Verticillium* สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ (Ma et al., 2015) กรณีศึกษาดังกล่าวเป็นเพียงส่วนหนึ่งของการศึกษาราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ ยังมีราเอนโดไฟต์อีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้รับการทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้

นอกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว อีกหนึ่งวิธีที่นิยมนำมาใช้ในงานวิจัยปัจจุบันเพื่อระบุชนิดของรา ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ผลแม่นยำและน่าเชื่อถือ ได้แก่ การศึกษาทางชีววิทยาโมเลกุล เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลในระดับดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) (Otero, Ackerman and Bayman, 2002; Bougoure et al., 2005; Bonnardeaux et al., 2007) ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์และมีความแปรผันของลำดับเบสที่สามารถใช้สำหรับเปรียบเทียบราแต่ละชนิดได้ ข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ถือเป็นแหล่งข้อมูลสำคัญที่ทำให้แยกความแตกต่างและระบุชนิดของราในกลุ่มที่มีลักษณะคล้าย *Rhizoctonia* ได้ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) เช่น การศึกษาของ (Ma, Tan and Wong, 2003) ที่แยกจากรากและโปรโตคอร์มของกล้วยไม้และแบ่งกลุ่มขึ้นต้นโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เป็นราในกลุ่ม *Epulorhiza* และเมื่อระบุชนิดโดยอาศัยลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS จำแนกราคาได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ *E. repens* และ *E. calendulina* นอกจากนี้เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น อาจต้องใช้

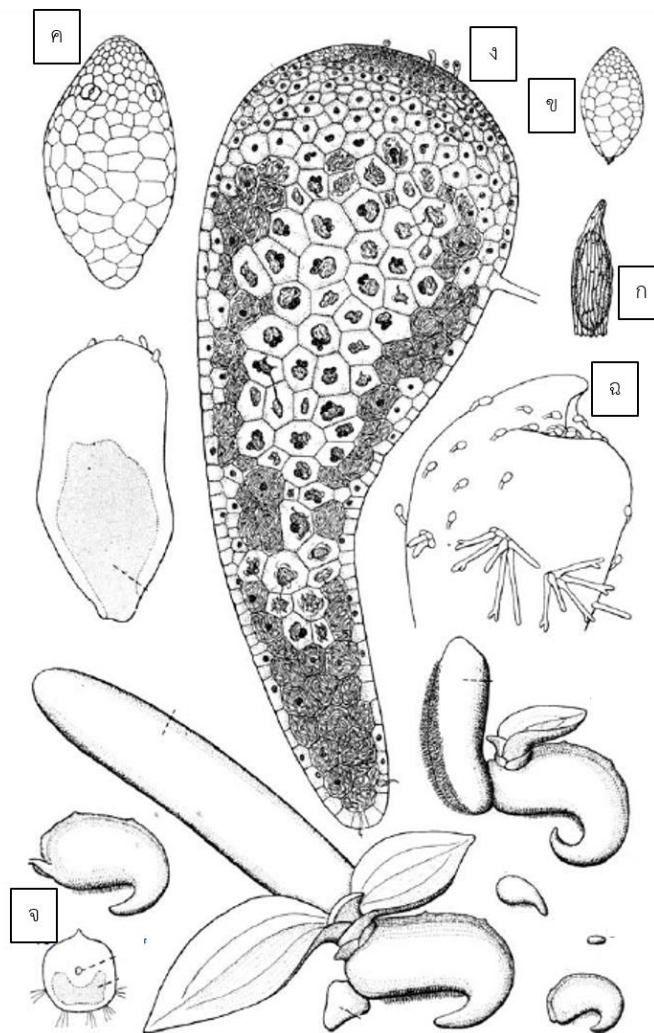
ลำดับเบสบริเวณอนุรักษ์อื่น ๆ มาวิเคราะห์ร่วมด้วย ตัวอย่างเช่นตำแหน่งดีเอ็นเอของ mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mt- LsDNA) เป็นต้น (Parras-Alfaro and Bayman, 2007) แยกและระบุสกุลของราที่เพาะเลี้ยงได้และเพาะเลี้ยงไม่ได้บนอาหารเพาะเลี้ยง โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS และ mt- LsDNA รวมทั้งนับจำนวนนิวเคลียสภายในเซลล์ พบราหลายสกุลได้แก่ *Ceratobasidium*, *Thanetophorus* และ *Tulasnella*

2.6 การพัฒนาของเมล็ดและโปรโตคอร์มกล้วยไม้

ธรรมชาติของเมล็ดกล้วยไม้คือมีลักษณะเป็นผง มีขนาดเล็ก มีอาหารสะสมอยู่ภายในน้อยมาก โอกาสในการงอกและพัฒนาเป็นต้นใหม่จึงไม่มีหากไม่ได้รับสารอาหารจากภายนอก แม้ว่าเมล็ดจะพัฒนาเต็มที่แต่เอ็มบริโอที่อยู่ภายในยังคงไม่พัฒนา ประกอบด้วยเซลล์ที่ไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่างประมาณ 100-200 เซลล์ ไม่มีใบเลี้ยงและรากแรกเกิด การงอกของเมล็ดไปเป็นโปรโตคอร์มและการพัฒนาต่อไปนั้นจำเป็นต้องอาศัยสารอาหารจากราไมคอร์ไรซา ดังนั้นกลไกการเข้าสู่เซลล์ของราไมคอร์ไรซาจึงมีความสำคัญต่อการงอกและพัฒนาของกล้วยไม้จนกระทั่งได้เป็นต้นที่สมบูรณ์ เอ็มบริโอของเมล็ดกล้วยไม้ที่บวมขึ้นแสดงให้เห็นว่าเส้นใยราที่เหมาะสมกำลังเข้าติดเชื้อโดยผ่านทางเซลล์ซัสเพนเซอร์ (suspensor cell) ที่อยู่บริเวณฐานของเอ็มบริโอ และกระจายตัวไปยังเซลล์อื่น ๆ ยกเว้นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด การเข้าสู่เซลล์พีชของราไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์พีชให้อาศัยทั้งในแง่ของรูปร่างและการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่น โดยปกติจะไม่พบเส้นใยราในเซลล์ชั้นเนื้อเยื่อผิว อาจเนื่องมาจากเซลล์บริเวณดังกล่าวไม่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเส้นใย ซึ่งถือเป็นกระบวนการสำคัญที่ให้ได้มาซึ่งธาตุอาหารของพีช ในกล้วยไม้บางชนิดพบว่าเส้นใยราจะเข้าสู่เซลล์ผ่านทางเซลล์ชั้นนอกที่คล้ายราก (epidermal hairs) (Peterson and Currah, 1990) ยังไม่มีรายงานที่แสดงถึงกลไกการเข้าหากันระหว่างราและพีชอาศัยอย่างแน่ชัด ทราบแต่เพียงว่าเมื่อราผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปด้านในแล้วจะถูกล้อมรอบด้วยชั้นบาง ๆ ของไซโทพลาสซึม โดยเซลล์ยังคงสภาพอยู่และเกิดการไหลเวียนของโปรโตพลาสต์ (protoplasmic streaming) (Williamson and Hadley, 1970) เมื่อเส้นใยเข้าสู่เซลล์พีชจะเจริญและขดตัวกลายเป็นฟิโลตอน เพิ่มพื้นที่ในการแลกเปลี่ยนสารกันระหว่างรากับเซลล์กล้วยไม้ เมื่อฟิโลตอนสร้างเสร็จสมบูรณ์เซลล์กล้วยไม้จะมีการเปลี่ยนแปลงคือ ไซโทพลาสซึมจะเปลี่ยนเป็นแวคิวโอล มีนิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย ไรโบโซม ก้อนไขมันและไกลโคเจน และเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม อีเล็กนอย (Hadley, 1975; Peterson and Currah, 1990) พบการสร้างชั้นของเหลว (Interfacial matrix) ระหว่างไซโทพลาสซึมของเซลล์กล้วยไม้กับเส้นใยราภายในเซลล์กล้วยไม้ พบเอนไซม์ ATPases ทั้งในเซลล์พีชและเส้นใยรา โดยเอนไซม์อยู่ในภาวะพร้อมทำงานขณะที่เกิดการย่อยสลายของเส้นใย และพบแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase

activity) ในชั้นของเหลวและเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช แสดงให้เห็นว่าเซลล์พืชเป็นแหล่งสร้างของเหลวตั้งกล่าว (Serrigny and Dexheimer, 1985) โดยระยะเวลาในการเข้าติดเชื้อ การสร้างและย่อยสลายฟีโลตอนแตกต่างกันในแต่ละชนิดของกล้วยไม้ จากการศึกษาของ (Mollison, 1943) พบว่าโปรโตคอร์มจะมีการพัฒนาก่อนที่ฟีโลตอนจะถูกย่อยสลาย ถ้าโปรโตคอร์มเกิดการบวมแล้ว ขดเส้นใยฟีโลตอนจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว

เมื่อราที่เข้าสู่เซลล์พืชมีบทบาทในการเป็นราไมคอร์ไรซา นั่นคือช่วยส่งเสริมการงอกและการเจริญและพัฒนาของโปรโตคอร์มจะดำเนินไปอย่างรวดเร็วอย่างมีขั้นตอนที่แน่นอน เซลล์ของโปรโตคอร์มจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะ สร้างเป็นเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้แก่เนื้อเยื่อท่อลำเลียง เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ใบอ่อน สำหรับเซลล์ที่บริเวณฐานของโปรโตคอร์มซึ่งมีฟีโลตอนเจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ นั้นจะพัฒนาไปเป็นรากต่อไปในสภาวะแวดล้อมที่เหมือนกัน (รูปที่ 5) โปรโตคอร์มที่เจริญร่วมกับราไมคอร์ไรซาจะมีการเติบโตและพัฒนาที่รวดเร็วกว่าโปรโตคอร์มที่ไม่มีราช่วยด้วย เช่นกรณีของ *Goodyera repens* ที่เจริญร่วมกับ *Ceratobasidium cornigerum* ในอาหารเพาะเลี้ยงพบว่าต้นกล้าพัฒนาสูง 5-10 เซนติเมตร ภายในเวลา 12 เดือน แตกต่างจากต้นกล้าในชุดควบคุมที่สูงเพียง 2-3 เซนติเมตร (Alexander and Hadley, 1984)



รูปที่ 5 ระยะเวลาต่าง ๆ ของการพัฒนาของโปรโตคอร์ัมของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis*; (ก) เมล็ด ; (ข,ค) เอ็มบริโอที่ยังไม่เปลี่ยนแปลง ; (ง) โปรโตคอร์ัมที่มีราไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ และ (จ,ฉ) โปรโตคอร์ัมที่สร้างไรซอยด์ ดัดแปลงจาก Smith and Read (2010)

2.7 ความเฉพาะเจาะจงของราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นวงศ์พืชที่มีความหลากหลายมากจนแสดงให้เห็นถึงระดับของความเฉพาะเจาะจงระหว่างชนิดกล้วยไม้และรา ระดับของความเฉพาะเจาะจงระหว่างกล้วยไม้และราไมคอร์ไรซาที่ศึกษาในห้องทดลองกับในแหล่งอาศัยจริงมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ Perkins, Masuhara และ Mcgee (1995) แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ *Microtis parviflora* มีความเฉพาะเจาะจงของราและกล้วยไม้ในแหล่งอาศัยจริงสูงกว่าการศึกษาในห้องทดลอง โดยพบราในสกุล *Epulorhiza* เพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้นที่แยกได้จากต้นกล้วยไม้ในแหล่งอาศัยจริง แต่การศึกษาในกล้วยไม้ *Pterostylis acuminat* พบว่าราที่สามารถกระตุ้นการงอกและการพัฒนาของเมล็ดเมื่อเพาะเลี้ยงใน

หลอดทดลองได้มีเพียง 1 ไอโซเลตและเป็นราในสกุล *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากต้นกล้วยไม้โตสมบูรณ์ในแหล่งอาศัยจริง แสดงให้เห็นถึงความเฉพาะเจาะจงที่มีอยู่สูงทั้งในห้องทดลองและในแหล่งอาศัยจริง (Perkins and McGee, 1995) จากงานวิจัยทั้งสองชี้ให้เห็นว่าระดับความเฉพาะเจาะจงนั้น นอกจากจะแปรผันตามชนิดของกล้วยไม้แล้วยังขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่ศึกษาทดลอง การแสดงความเฉพาะเจาะจง นอกจากการประเมินโดยการงอกของเมล็ดแล้วยังต้องตรวจสอบการพัฒนาหลังการงอกด้วย เช่น รา 5 ไอโซเลตที่แยกจากรากของกล้วยไม้ *Aa achalensis* สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตคอร์มได้ถึงระยะที่ 2 และมี 1 ไอโซเลตที่ช่วยให้โปรโตคอร์มพัฒนาถึงระยะที่ 5 (Sebastián et al., 2014) ขณะเดียวกันราที่แยกจากรากของต้นโตสมบูรณ์ของกล้วยไม้ชนิดหนึ่ง สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของทั้งพืชอาศัย (*Habenaria macroceratitis*) และกล้วยไม้ชนิดอื่น (*H. repens* และ *H. quinquiseta*) (Stewart and Zettler, 2002)

2.8 การแยกราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้

วิธีการแยกราไมคอร์ไรซาเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์นั้นมีด้วยกันหลายวิธี เช่น

- plating fragments of surface-sterilized roots (PFSSR) ซึ่งเป็นการวางชิ้นรากที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงบนอาหารเพาะเลี้ยง (Zettler, 1997; Stewart and Kane, 2007; Zhu et al., 2008)
- plating individual carefully separated fungal pelotons (PICSFP) หรือการแยกให้ได้ฟิโลตอนเดี่ยวโดยการแยกจากรากที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วและตัดตามขวาง จากนั้นวางบนอาหารเพาะเลี้ยง (Rasmussen, 1995; Warcup and Talbot, 1967)
- *in situ* seed baiting technique เป็นวิธีการดักจับราโดยการวางเมล็ดกล้วยไม้ในพื้นที่ (Wang et al., 2011) คิดค้นโดย (Rasmussen and Whigham, 1993) และได้รับการพัฒนาโดย (Brundrett et al., 2003) ข้อดีของวิธีนี้คือ จะช่วยให้ได้รามีความเฉพาะเจาะจงต่อระยะการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้มากยิ่งขึ้น

หลังจากได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว อาจจะนำมาจำแนกและระบุชนิดของราเหล่านั้น หรือทดสอบประสิทธิภาพของราต่อการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ที่เป็นพืชอาศัยหรือกล้วยไม้ชนิดอื่น ซึ่งช่วยให้เข้าใจถึงความเฉพาะเจาะจงระหว่างราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้มากยิ่งขึ้น โดยการเทียบราที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้

2.9 การงอกของเมล็ดแบบพึ่งพา (symbiotic seed germination)

การศึกษาไมคอร์ไรซากกล้วยไม้เริ่มต้นจากในอดีตมีผู้สังเกตพบว่าเมล็ดกล้วยไม้ที่มีขนาดเล็กมากนั้นจะงอกได้เมื่อปลูกลงดินและคลุมบาง ๆ ด้วยมอส แต่ยังไม่ทราบถึงเหตุผล ขณะเดียวกันนัก

พฤกษศาสตร์บางกลุ่มที่สนใจกล้วยไม้เริ่มสังเกตพบว่ามีขดเส้นใยอยู่ภายในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ของรากกล้วยไม้ แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าขดเส้นใยดังกล่าวใช้ราหรือไม่ว่าสำคัญอย่างไร จนกระทั่ง (Bernard, 1904) สังเกตพบว่าเมล็ดกล้วยไม้จะงอกได้ดีเมื่อมีราไมคอร์ไรซาอยู่ร่วมด้วย และประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ดินที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ *Neottia nidus-avis* ร่วมกับราไมคอร์ไรซา และเรียกเทคนิคนี้ว่า การงอกของเมล็ดแบบพึ่งพา (Bernard, 1904 cited in Selosse, Minasiewicz and Boullard, 2017)

การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในธรรมชาติจำเป็นต้องพึ่งพาราไมคอร์ไรซาเพื่อจัดหาสารอาหารที่จำเป็นต่อการงอกของเมล็ด รวมถึงการพัฒนาของโปรโตคอร์มและต้นกล้า (Clements, 1988; Rasmussen, 1995) ดังนั้นการศึกษาและการพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนกล้วยไม้โดยอาศัยราไมคอร์ไรซาจึงสำคัญต่อการอนุรักษ์และขยายพันธุ์กล้วยไม้ที่ใกล้สูญพันธุ์หรือมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ แม้ว่าเมล็ดกล้วยไม้บางชนิดจะสามารถงอกได้บนอาหารสังเคราะห์โดยไม้อาศัยราไมคอร์ไรซา แต่เมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับการงอกโดยอาศัยราไมคอร์ไรซา พบว่าเราสามารถส่งเสริมเปอร์เซ็นต์การงอกของกล้วยไม้เหล่านั้นได้สูงกว่า (Johnson et al., 2007; Khamchatra et al., 2016b; Nikabadi et al., 2014; Nontachaiyapoom, Sasirat and Manoch, 2011) นอกจากนี้ต้นกล้าที่ได้จากวิธีการงอกแบบพึ่งพารภายในหลอดทดลอง (*In vitro* symbiotic seed germination) มีความสามารถในการปรับตัวเมื่ออยู่นอกหลอดทดลอง (*Ex vitro*) ได้ดีกว่าต้นกล้าที่เจริญโดยไม่มีราไมคอร์ไรซา (Smith and Read, 2010; Stewart and Zettler, 2002; Yoder, Zettler and Stewart, 2000)

กล้วยไม้หลายชนิดมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ทั้งจากการลักลอบเก็บมากเกินไป ถิ่นอาศัยถูกทำลาย หรือจากการเปลี่ยนแปลงทางสภาพแวดล้อม (Gale et al., 2018; Leadley and al., 2010; Pereira and al., 2010) จึงได้มีการวิจัยและพัฒนาวิธีการเพื่อการอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนของกล้วยไม้ โดยอาศัยราไมคอร์ไรซาเข้าช่วย เช่น การใช้ราที่แยกจากกล้วยไม้ *E. magnoliae* และราที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ *Spiranthes brevilabris* ช่วยในการงอกของกล้วยไม้ *S. brevilabris* Lindley พบว่าราทั้งสองไอโซเลตสามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้มากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับรา เมื่อย้ายต้นกล้าที่เลี้ยงแบบพึ่งพาคืนสู่ธรรมชาติ พบว่ามีอัตราการรอดตายสูง (Stewart, Zettler and Minso, 2003) Aewsakul et al. (2013) ศึกษาการงอกแบบพึ่งพาของเมล็ดกล้วยไม้ *S. plicata* ด้วยวัสดุเพาะกล้วยไม้ โดยเพาะเลี้ยงร่วมกับรา *Tulasnella* sp. และพบว่า ชุดการทดลองที่ใส่ราดังกล่าว มีเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มที่สูงกว่าชุดที่ไม่ได้ใส่รา และภายหลังการเพาะเมล็ด 9 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มที่ได้จากการเลี้ยงร่วมกับรา

การสร้างใบและราก แต่ไม่พบในชุดควบคุม (Tan et al., 2014) ได้ศึกษาผลของราสกุล *Tulasnella* 2 ไอโซเลต ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ *Dendrobium nobile* ต่อการงอกของเมล็ดและพัฒนาการของต้นกล้ากล้วยไม้ *D. officinale* ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ พบว่า 11 สัปดาห์หลังการเลี้ยงร่วมกับรา เมล็ดกล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าชุดควบคุม และโปรโตคอร์มพัฒนาได้ถึงระยะที่ 5 ขณะที่โปรโตคอร์มที่ได้จากชุดควบคุมพัฒนาแค่ระยะที่ 2 เท่านั้น และพบว่าเมื่อผ่านไป 7 สัปดาห์ ต้นกล้าที่เลี้ยงร่วมกับรา มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงกว่าชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซานั้น ส่งเสริมให้ต้นกล้าเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

นอกจากการศึกษาผลของราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ต่อการงอกและพัฒนาการของกล้วยไม้ภายในหลอดทดลอง ยังได้มีการศึกษาในพื้นที่อาศัยของกล้วยไม้ โดยอาศัยความรู้เกี่ยวกับราไมคอร์ไรซาเพื่อเพิ่มโอกาสรอดของกล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติ เช่น การศึกษาของ (Shao et al., 2017) ได้นำเมล็ดกล้วยไม้อิงอาศัย *D. devonianum* เลี้ยงร่วมกับราไมคอร์ไรซา *Tulasnella* sp. ภายหลังจากใส่เชื้อ เมล็ดกล้วยไม้ถูกนำไปเพาะเลี้ยงบนพีทอาศัยของกล้วยไม้ดังกล่าว พบว่าเมล็ดกล้วยไม้ที่เลี้ยงร่วมกับราไมคอร์ไรซามีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงกว่าเมล็ดกล้วยไม้ในชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับรา โดยมีปัจจัยอื่นๆ มาเกี่ยวข้อง เช่น สภาพภูมิอากาศ ฤดูกาลที่หว่านเมล็ด และวิธีการหว่านเมล็ดกล้วยไม้

2.10 กล้วยไม้สกุล *Epipactis*

กล้วยไม้ในสกุล *Epipactis* มีเขตการกระจายพันธุ์ทั้งในยูเรเชีย แอฟริกา และอเมริกาเหนือ รายงานการค้นพบกล้วยไม้สกุลนี้ในปัจจุบันพบแล้วทั้งสิ้น 58 ชนิด (Govaerts, 2017) กล้วยไม้สกุลนี้มีรูปแบบการเจริญที่หลากหลาย โดยส่วนใหญ่เจริญเติบโตบนพื้นดิน และบางชนิดเจริญเติบโตในน้ำ เช่น *Epipactis gigantea* ที่มีการกระจายพันธุ์อย่างหนาแน่นในทวีปอเมริกา (Rocchio, March and Anderson, 2006) นอกจากนี้บางชนิดถูกจัดเป็นพืชกินซาก (Holomycotrophic) ซึ่งพบน้อยในธรรมชาติ (Chen, Gale and Cribb, 2009)

กล้วยไม้หน้า (*Epipactis flava* Seidenf.)

การจัดจำแนกกล้วยไม้หน้า *E. flava* ตามหลักอนุกรมวิธาน

Kingdom: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Class: Liliopsida

Order: Orchidales

Family: Orchidaceae

Subfamily: Epidendroideae

Tribe: Neottieae

Genus: *Epipactis*

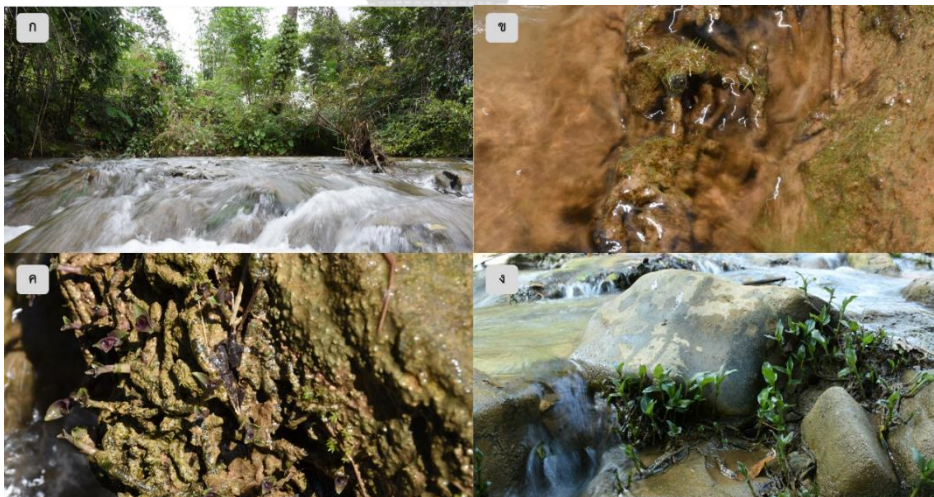
Species: *E. flava*

ลักษณะทั่วไป ลำต้นแตกออกจากตาเหง้าที่เกาะอยู่ตามโขดหินหรือโคนต้นไม้ใหญ่บริเวณลำธารที่มีกระแสน้ำไหล ลำต้นยืดยาวเจริญอยู่เป็นกลุ่ม สูงประมาณ 30-80 เซนติเมตร ใบรูปหอกค่อนข้างรี (รูปที่ 6 ก) ช่อดอกออกที่ปลายยอดตั้งตรง ช่อดอกแบบกระจะ (Raceme) (รูปที่ 6 ง) ดอกขนาด 1.5 เซนติเมตร ที่ก้านช่อดอก ก้านดอกและรังไข่ พบขนสีขาวลักษณะหยิก (Tomentose) ขึ้นบาง ๆ กลีบเลี้ยงสีเขียวแกมเหลือง กลีบดอกรูปรีแกมขอบขนาน กลีบปากมี 3 แฉก ปลายกลีบมน ที่โคนกลีบด้านในโค้งเป็นรูปถ้วย (Bowl-shaped) ที่โคนกลีบมีสัน 2 สัน (รูปที่ 6 ข) ออกดอกในช่วงเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ ในฤดูน้ำหลากต้นและใบจะเน่าเปื่อยและยุบตายไปเหลือเพียงเหง้าเกาะติดอยู่กับโขดหิน (รูปที่ 7 ก และ ข) จนถึงฤดูหนาวปริมาณน้ำลดลงต้นกล้วยไม้จะเจริญขึ้นอีกครั้งโดยหน่ออ่อนจะพัฒนาขึ้นจากปลายยอดของเหง้า (รูปที่ 7 ค และ ง) เจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์และสร้างดอก เมื่อดอกได้รับการผสมจนติดฝัก (รูปที่ 6 ค) ฝักที่แก่จะแตกออกตามยาวปล่อยเมล็ดปลิวออกไปเพื่อกระจายพันธุ์ต่อไป กล้วยไม้น้ำพบครั้งแรกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2469 ที่จังหวัดกาญจนบุรี และนับเป็นการค้นพบกล้วยไม้ชนิดนี้ครั้งแรกของโลก ก่อนจะได้รับการบันทึกให้เป็นกล้วยไม้ชนิดใหม่ของโลกเมื่อปี พ.ศ. 2521 กล้วยไม้น้ำพบกระจายพันธุ์ในพื้นที่ประเทศไทย ลาว เวียดนาม และพม่า ในประเทศไทยพบพบที่จังหวัดกาญจนบุรี ตาก และน่าน (สลิล สิทธิสังจธรรม, 2549; บวร คุณาภรณ์รักษ์, 2557) ปัจจุบันกล้วยไม้น้ำถูกจัดให้เป็นพืชที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Endangered species) ตามรายงานการแสดงสถานภาพของพืชในประเทศไทย (Santisuk et al., 2006) จากความจำเพาะเจาะจงต่อถิ่นที่อยู่อาศัย รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้น อีก

ทั้งการถูกบุกรุกและทำลายจากมนุษย์ ยิ่งส่งผลให้สถานภาพของกล้วยไม้ น้ำเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์มากยิ่งขึ้น



รูปที่ 6 ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* แสดง (ก) ลำต้นและใบ; (ข) ดอก; (ค) ฝัก และ (ง) ช่อดอก



รูปที่ 7 (ก) ลักษณะพื้นที่ศึกษาช่วงฤดูน้ำหลาก; (ข) ไรโซมที่เกาะกับโขดหิน; (ค) หนองอ่อนที่เริ่มพัฒนา และ (ง) ต้นกล้วยกล้วยไม้ น้ำ

บทที่ 3

อุปกรณ์เครื่องมือและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์เครื่องมือ

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
1. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหักเหแสง รุ่น BX 51 (Light microscope)	Olympus Optical Co., Ltd., Japan
2. กล้องจุลทรรศน์สามมิติ รุ่น SZ-60 (Stereo microscope)	Olympus Optical Co., Ltd., Japan
3. กล้องบันทึกภาพ รุ่น DP71	Olympus Optical Co., Ltd., Japan
4. ซอฟต์แวร์บันทึกภาพ DP Controller	Olympus Optical Co., Ltd., Japan
5. เครื่องอุ่นสารด้วยความร้อนแห้ง (AccuBLOCK™ Digital Dry Bath)	Labnet International, Inc.
6. เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รุ่น ES-315 (Autoclave)	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
7. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น TP600 (DNA thermo cycle)	Takara Bio Inc., Japan
8. อุปกรณ์บันทึกภาพในงานชีววิทยาโมเลกุล Gel Doc™ XR (Gel documentation system)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
9. แหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์	Olympus Optical Co., Ltd., Japan
10. ตู้ปลอดเชื้อ Clean Model.V6 (Laminar flow)	Lab Service, Thailand
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก CM-610T (Micro centrifuge)	Hsiangtai Machinery Industry Co., Ltd., Taiwan
12. ไมโครปิเปตขนาด 2, 20, 100, และ 1000 ไมโครลิตร และทิวป์ (Micropipette and replacement tip)	Gilson Inc., USA
13. อุปกรณ์แยกขนาดโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้ารุ่น Mupid® -ex	Advance Co., Ltd., Japan
14. เครื่องบดและผสมรุ่น MN400 (Mixer Mill)	Retsch GmbH, Germany
15. เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo, Switzerland
16. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์รุ่น ELGASTAT MAXIMA UF (Ultra-Pure water)	ELGA, England

17. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมความเย็น รุ่น 3700 (Refrigerated centrifuge)	Kubota Corporation, Japan
18. เครื่องผสมสาร รุ่น VX100 (Vortex mixer)	Labnet International Inc., USA
19. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น 2002-S	Mettler Toledo, Switzerland
20. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sharp, Thailand
21. อุปกรณ์ตัดเนื้อเยื่อพืช	-
22. เครื่องแก้วสำหรับการทดลอง	-
23. ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น Clean Model. V6 (Laminar flow)	Lab Service, Thailand
24. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 500 (oven)	Memmert GmbH + Co.KG, Germany
25. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส	Sharp, Thailand
26. หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ (micro centrifuge tube) ขนาด 2 และ 1.5 มิลลิลิตร	TPP, Switzerland

3.2 สารเคมี

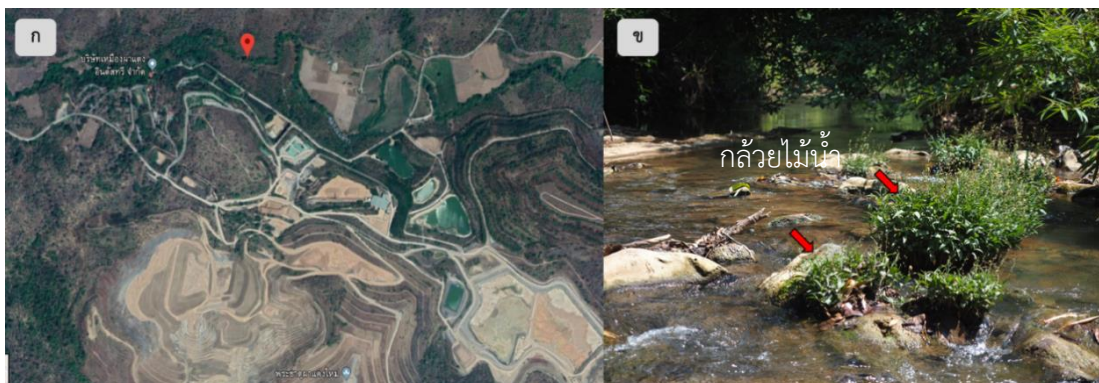
สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. Agar	-
2. Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Ajax Finechem, Australia
3. Ampicillin	T.P. Drug Laboratories Co., Ltd
4. Boric acid (H ₃ BO ₃)	Merck, Germany
5. Calcium phosphate (Ca ₃ (PO ₄) ₂)	Ajax Finechem, Australia
6. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	Serva
7. Chloroform	-
8. Ethanol	Merck, Germany
9. Ferric Ethylenediaminetetraacetic acid (FeEDTA)	May and Baker, England
10. Glucose	Reckitt Benckiser, Thailand
11. Iron (III) tartrate (Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃)	Ajax Finechem, Australia
12. Isoamyl alcohol	Carbo Erba

13. Manganese (II) sulfate ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	Ajax Finechem, Australia
14. Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	May and Baker, England
15. Polyethylene glycol	Serva
16. Potato dextrose agar	HiMedia Laboratories, India
17. Potassium nitrate (KNO_3)	Ajax Finechem, Australia
18. Potassium phosphate (KH_2PO_4)	May and Baker, England
19. Sodium chloride (NaCl)	Fluka, Switzerland
20. Sodium hypochlorite	-
21. Streptomycin	General Drugs House Co., Ltd
22. Sucrose	Ajax Finechem, Australia
23. 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)	Fluka, Switzerland
24. 10X Tris boric acid disodium ethylenediamine tetraacetic acid (10X TBE buffer)	-
25. Washing buffer	-

3.3 ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

3.3.1. การเก็บตัวอย่างกล้วยไม้

สำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้บริเวณลำธารห้วยแม่ตาว หมู่บ้านถ้ำเสือ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ตั้งอยู่ที่พิกัด $16^{\circ}40'01.8''N$ $98^{\circ}39'40.3''E$ ดังรูปที่ 8 ที่ระดับความสูงจากน้ำทะเล 366 เมตร ซึ่งต้นกล้วยไม้จะเจริญอยู่บนโขดหินที่มีน้ำไหลผ่านตลอดเวลา สภาพแวดล้อมทั่วไปมีความชื้นในอากาศประมาณ 26-90 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25 องศาเซลเซียส หินที่พบในลำธารส่วนใหญ่เป็นหินปูน สภาพน้ำในลำธารจึงมีความเป็นด่างเล็กน้อย (pH 8-8.5) (บวรคุณากรนุรักษ์, 2557) สุ่มเก็บรากกล้วยไม้ที่เจริญอยู่บนโขดหินในลำธาร ทั้งหมด 10 กอ กอละประมาณ 3-4 ต้น และสุ่มเก็บฝักแก่ของกล้วยไม้อย่างน้อย 20 ฝัก ในช่วงเดือนเมษายน เพื่อใช้ในการศึกษาการแยกราด้วยวิธี *in situ* seed baiting (Khamchatra et al., 2016a)



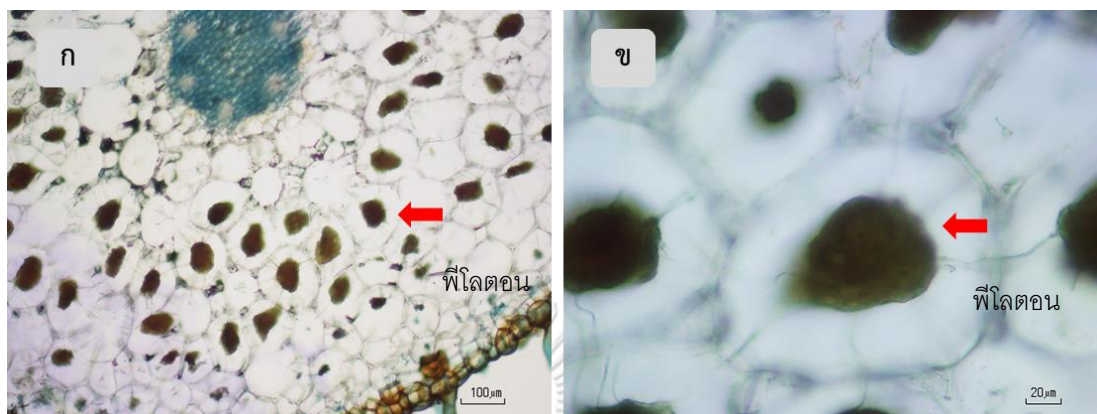
รูปที่ 8 (ก) พื้นที่เก็บตัวอย่างที่ลำธารห้วยแม่ตาว และ (ข) ลักษณะทางกายภาพของลำธารห้วยแม่ตาว และกอกกล้วยไม้ป่า (ลูกศรชี้)

3.3.2. การแยกราไมคอร์ไรซากล้วยไม้

3.3.2.1 การแยกราจากรากกล้วยไม้ด้วยวิธี single peloton

สุ่มเลือกตัดรากกล้วยไม้ที่มีลักษณะสมบูรณ์จากรากที่เก็บได้ในข้อ 3.3.1 จำนวน 3-5 รากต่อกอ นำมาทำความสะอาดโดยใช้แปรงขัดเศษหินปูนที่เกาะที่ผิวรากด้วยน้ำยาล้างจาน ตามด้วยน้ำประปา ตัดรากเป็นส่วน ๆ ขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นส่วนรากที่ตัดไว้มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง (Khamchatra et al., 2016b) ชับน้ำที่ติดอยู่ด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตัดชิ้นส่วนของรากให้เป็นแผ่นบางด้วยใบมีดปราศจากเชื้อ วางบนแผ่นสไลด์ที่มีหยดน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาฟิโลตอนภายในเซลล์ราก ดังรูปที่ 9 ทำการแยกฟิโลตอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเข็มเขี่ยและมีดผ่าตัดที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยการทำลายผนังเซลล์รากให้แยกออก ฟิโลตอนจะลอยอยู่ในหยดน้ำกลั่น จึงใช้ไมโครปิเปตปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดูดน้ำกลั่นที่มีฟิโลตอนอยู่หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ที่เติม streptomycin และ ampicillin อย่างละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตการเจริญของเส้นใยบนอาหาร จากนั้นย้ายเส้นใยไปยังอาหารเลี้ยง

เชื้อ PDA ใหม่ จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) แล้วย้ายไปเลี้ยงใน 1/5 PDA slants ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับรักษาเส้นใยเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 9 (ก) ภาพตัดขวางของรากกล้วยไม้ น้ำ และ (ข) ฟีโลตอนอยู่ในเซลล์คอร์เทกซ์ (ลูกศรชี้)

3.3.2.2 การแยกรากจากโปรโตคอร์ัมที่ได้จากวิธี *in situ* seed baiting

นำเมล็ดกล้วยไม้ที่เก็บได้ใส่ลงในตาข่ายแพลงก์ตอนขนาดรูตาข่าย 45 ไมครอน ประมาณ 300-400 เมล็ด พบตาข่ายแพลงก์ตอนใส่ลงในกรอบสไลด์ ผูกกรอบสไลด์ด้วยลวดให้แนบกับรากกล้วยไม้ น้ำบโนชดหินในลำธารอย่างสม่ำเสมอ เก็บกรอบสไลด์ทุกเดือน เป็นเวลา 4 เดือน นำกรอบสไลด์มาล้างผิวด้านนอกด้วยน้ำประปา ใช้แปรงขัดเศษดินและหินปูนที่เกาะอยู่ให้สะอาด แกะกรอบสไลด์และใช้ฟู่กันเชยโปรโตคอร์ัมออกจากตาข่ายแพลงก์ตอน เชยลงในจานเพาะเชื้อแก้วขนาดเล็ก นำมาตรวจสอบการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ัมในระยะต่าง ๆ ภายใต้กล้องสเตอริโอ และหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ัมในระยะต่าง ๆ ตามเกณฑ์ของ (S. L. Stewart and Kane, 2006) ดังตารางที่ 2 นำโปรโตคอร์ัมที่แยกตามการพัฒนาแต่ละระยะมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮโปคลอไรต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง (Zettler and Piskin, 2011) ย้ายโปรโตคอร์ัมไปยังจานเพาะเชื้อแก้วขนาดเล็กอันใหม่ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อลงไปเล็กน้อย ใช้เข็มเขี่ยปลายอเล็กน้อยที่ฆ่าเชื้อแล้ว เชยโปรโตคอร์ัมไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม streptomycin และ ampicillin อย่างละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตการเจริญของเส้นใยบนอาหาร จากนั้นย้ายเส้นใยไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่ จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture)

แล้วย้ายไปเลี้ยงใน 1/5 PDA slants ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับรักษาเส้นใยเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2 ระยะเวลาการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ (ปรับปรุงจาก (Stewart and Kane, 2006)

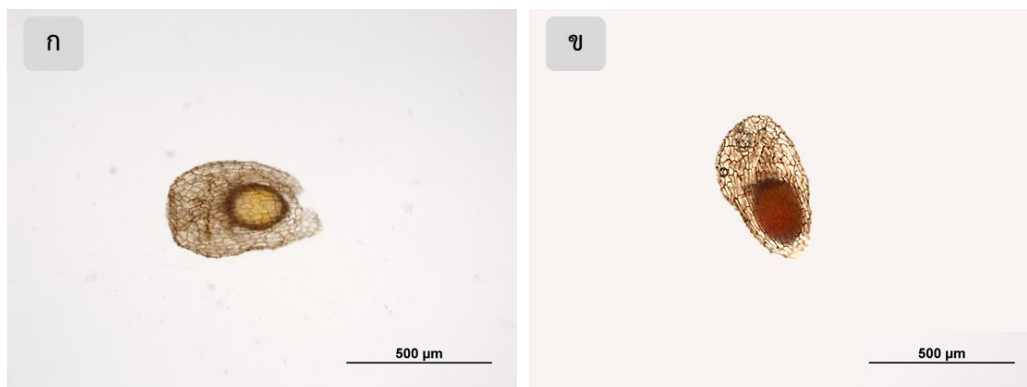
Stage	Description
0	เมล็ดยังไม่งอก มีเปลือกหุ้มเมล็ดอยู่
1	เอ็มบริโอขยายขนาด เปลือกหุ้มเมล็ดปริและหลุดออก (เมล็ดงอก)
2	เอ็มบริโอขยายขนาด และมีไรซอยด์ปรากฏ
3	ปรากฏเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด
4	เริ่มสร้างใบที่แท้จริง
5	ใบขยายขนาดและเริ่มสร้างราก

3.3.3 การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ด้วยวิธีการใช้สารละลาย Tetrazolium (Van Waes and Debergh, 1986)

นำฝักกล้วยไม้น้ำที่แก่เต็มที่แต่ยังไม่แตกที่เก็บได้ในข้อ 3.3.1 นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวในตู้ปลอดเชื้อโดยนำฝักกล้วยไม้จุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วผ่านไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ทันที ฝักกล้วยไม้ด้วยใบมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว แบ่งเมล็ดกล้วยไม้ส่วนหนึ่งมาตรวจสอบความมีชีวิตทางชีวเคมี โดยนำเมล็ดกล้วยไม้มาแช่ในสารละลาย tetrazolium (TTC) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่ไม่มีแสง อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบได้กล้องจุลทรรศน์ แล้วให้คะแนนความมีชีวิตตามตารางที่ 3 ส่วนที่เหลือนำมาทดสอบการงอกของเมล็ดดังรูปที่ 10

ตารางที่ 3 เกณฑ์การให้คะแนนความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้

คะแนน	ลักษณะของเมล็ดกล้วยไม้
1	เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีน้ำตาล และเอ็มบริโอมีสีขาวหรือเหลือง
2	เปลือกหุ้มเมล็ดไม่มีสี และเอ็มบริโอมีสีขาวหรือเหลือง
3	เปลือกหุ้มเมล็ดไม่มีสี และเอ็มบริโอมีสีแดง ชมพู หรือแดงอมชมพู



รูปที่ 10 ผลทดสอบตรวจสอบความมีชีวิตทางชีวเคมี (ก) เมล็ดไม่มีชีวิต และ (ข) เมล็ดมีชีวิต

3.3.4 การคัดเลือกกราฟที่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ด

ทำการทดสอบความสามารถของราที่แยกได้จากข้อ 3.3.2 ในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำ โดยเลี้ยงราแต่ละไอโซเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นเส้นใยรา ย้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat Meal Agar (OMA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-7 วัน วางกระดาษกรองหมายเลข 1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบนอาหาร OMA ดังกล่าวใส่เมล็ดกล้วยไม้ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นปิดฝาจานเพาะเลี้ยงให้สนิทด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหาร OMA ที่ไม่มีราเป็นชุดการทดลองควบคุม ทำการทดลองไอโซเลตละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้เมล็ดประมาณ 100 เมล็ด วางแผนการทดลองแบบ Completed Randomized Design (CRD) เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ โดยตรวจสอบการงอกและการพัฒนาของเมล็ดที่เพาะเลี้ยง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอค่านวนหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดจากนั้นคัดเลือกกราฟไอโซเลตที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมมาทำการทดสอบการงอกและการพัฒนาขึ้นต่อไป

3.3.5 การเปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นการงอก และพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ของราที่คัดเลือกได้

เลี้ยงราแต่ละไอโซเลตที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นเส้นใยรา ย้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat Meal Agar (OMA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-7 วัน วางกระดาษกรองหมายเลข 1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบนอาหาร OMA ดังกล่าวใส่เมล็ดกล้วยไม้ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นปิดฝาจานเพาะเลี้ยงให้สนิทด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 °C โดยมีชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหาร OMA ที่ไม่มีราเป็นชุดการทดลอง

ควบคุม ทำการทดลองไอโซเลตละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้เมล็ดประมาณ 100 เมล็ด วางแผนการทดลองแบบ Completed Randomized Design (CRD) ตรวจสอบการงอกและการพัฒนาของเมล็ดที่เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยให้คะแนนตามเกณฑ์ของ Stewart and Kane (2006) ดังตารางที่ 2 ทุกๆ 4 สัปดาห์เป็นเวลา 16 สัปดาห์ คำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์ัมพิจารณาจากอัตราส่วนของจำนวนเมล็ดในแต่ละระยะของการพัฒนาต่อจำนวนเมล็ดที่มีชีวิตและรายงานผลในรูปแบบของค่า Germination rate index (GRI) และ developmental rate index (DRI) (Papenfus et al., 2015) โดย

G1 คือ ร้อยละของเมล็ดที่งอกเมื่อนับเป็นครั้งแรกหลังเพาะเมล็ด $\times 100$

G2 คือ ร้อยละของเมล็ดที่งอกเมื่อนับเป็นครั้งที่สองหลังเพาะเมล็ด $\times 100$

D1 คือ ร้อยละของโปรโตคอร์ัมในแต่ละระยะของการพัฒนา (ระยะที่ 2-5) ที่นับครั้งแรกหลังเพาะเมล็ด $\times 100$

D2 คือ ร้อยละของโปรโตคอร์ัมในแต่ละระยะของการพัฒนา (ระยะที่ 2-5) ที่นับครั้งที่สองหลังเพาะเมล็ด $\times 100$

$$GRI = G1/1+G2/2+\dots Gx/x \qquad DRI = D1/1+D2/2+\dots Dx/x$$

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วย one-way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS V16.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, USA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.3.6 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.4 ได้แก่ ลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สีโคโลนี และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย สปอร์ และโครงสร้างพิเศษ เช่น เซลล์โมนิลอยด์ โดยการใช้เทคนิค slide culture ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้เทียบกับรูปวิธานตามรายงานของ (Barnett and Hunter, 1998)

3.3.7 การระบุชนิดของราที่คัดเลือกได้ด้วยวิธีทางอนุชีวโมเลกุล

ทำการระบุชนิดของราที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) โดยมีวิธีการดังนี้

3.3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยราที่แยกได้ โดยเลี้ยงในอาหารสูตร PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ชูดเส้นใยประมาณ 50-100 มิลลิกรัม ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตรที่นิ่งมาเชื้อแล้ว ใส่เม็ดบีดช่วยบดลงไป 5 เม็ด บดตัวอย่างด้วยเครื่องบดที่ความถี่ 30 เฮิร์ต นาน 1 นาที จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ตามวิธีของ (Zhou et al., 2009) โดยนำตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างโดยใช้ความถี่ 20 เฮิร์ตซ์ 1 นาที เติมสารละลาย 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ดูดน้ำส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.3.7.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ที่ตำแหน่ง internal transcript spacer (ITS) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1F (5' CTTGGTCAT TTAGAGGAAGTAA 3') (Gardes and Bruns, 1993) และ ITS4 (5'-TCCTCCG

CTTATTGATATGC) (White et al., 1990) ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ที่ใช้
ทำปฏิกริยา ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

สาร	ปริมาตร (ปริมาตรรวม 30 ml)
Emeral	15
20 μ M. ITS1 F	0.3
20 μ M. ITS4	0.3
Template	3
Sterilized distilled water	11.4

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ โดยกำหนดสภาวะ ดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	51 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Holding	4 องศาเซลเซียส		

3.3.7.3 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

แยกขนาดโมเลกุลผ่านรูพรุนในแผ่นเจลภายใต้สนามไฟฟ้า(electrophoresis) บน
เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (ภาคผนวก ข) เข้มข้น 0.5 เท่า ที่เติมสีย้อม
Gel star ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 100 มิลลิลิตร หยอดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่ม
ปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอลงในช่องบนแผ่นเจลอะกาโรส ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับอุปกรณ์แยกขนาด

โมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้า ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จนกระทั่งสติดและเคลื่อนที่ถึงตำแหน่งที่ต้องการ เปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานที่ความยาวลำดับเบสต่าง ๆ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transilluminator) และบันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายภาพเจล (Gel documentation system)

3.3.7.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ที่ผ่านการตรวจสอบและให้ผลชัดเจน ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Bioneer corporation (South Korea)

3.3.8 การจัดกลุ่มราและทำแผนภาพต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

จัดกลุ่มราตามลักษณะสัณฐานวิทยาที่ได้จากข้อ 3.3.6 ร่วมกับผลทางชีววิทยาโมเลกุลจากข้อ 3.3.7.3 โดยเลือกตัวแทนจากแต่ละกลุ่มประมาณกลุ่มละ 3 ไอโซเลต นำไปส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่ตำแหน่ง ITS จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI Advanced Blast Search) นำข้อมูลลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและจัดทำแผนภาพต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ด้วย maximum likelihood (LM) โดยโปรแกรม RAxML v.8 (Stamatakis, 2006; Stamatakis, 2014) และ Bayesian inference (BI) โดยโปรแกรม MrBayes v.3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้

รากและฝักกล้วยไม้น้ำที่เก็บได้จากบริเวณลำธารห้วยแม่ตาว หมู่บ้านถ้ำเสือ อำเภอแม่สอด จังหวัดตากแสดงดังรูปที่ 11 ก และ ข

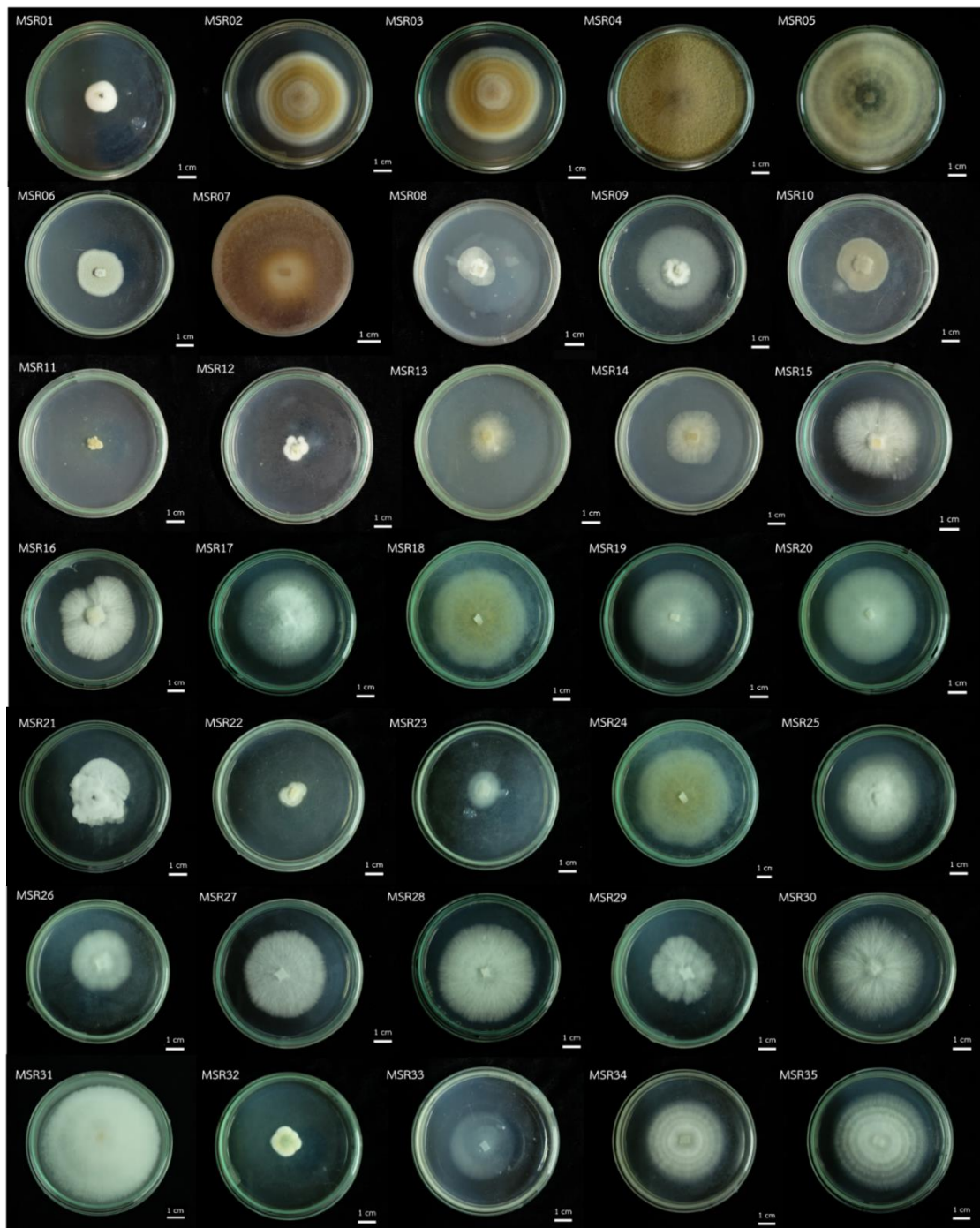


รูปที่ 11 (ก) ลักษณะราก และ (ข) ฝักกล้วยไม้น้ำที่เก็บได้จากลำธารห้วยแม่ตาว อ.แม่สอด จ.ตาก

4.2 ผลการแยกราไมคอร์ไรซากล้วยไม้

4.2.1. ผลการแยกจากรากกล้วยไม้ด้วยวิธี single peloton

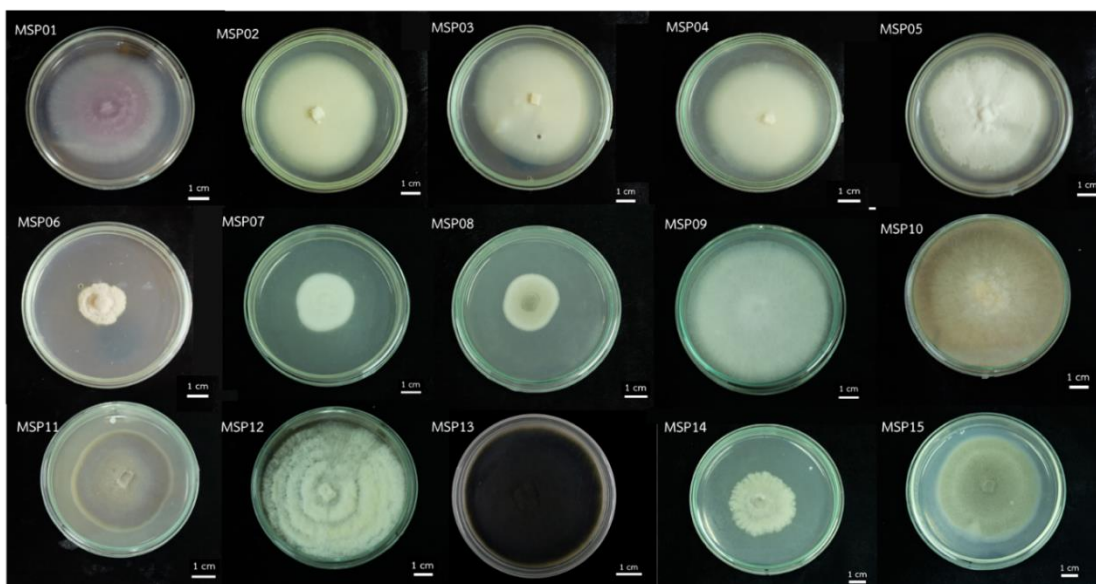
สามารถแยกฟิโลตอนจากรากกล้วยไม้น้ำ *E. flava* ได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลต โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีบนอาหารเพาะเลี้ยง PDA ที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 โคลนีสราที่แยกจากรากกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

4.2.2 ผลการแยกจากโปรโตคอร์มที่ได้จากวิธี *in situ* seed baiting

สามารถแยกฟีโลตอนจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* ได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลต โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีบนอาหารเพาะเลี้ยง PDA ที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 โคโลนีราที่แยกจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

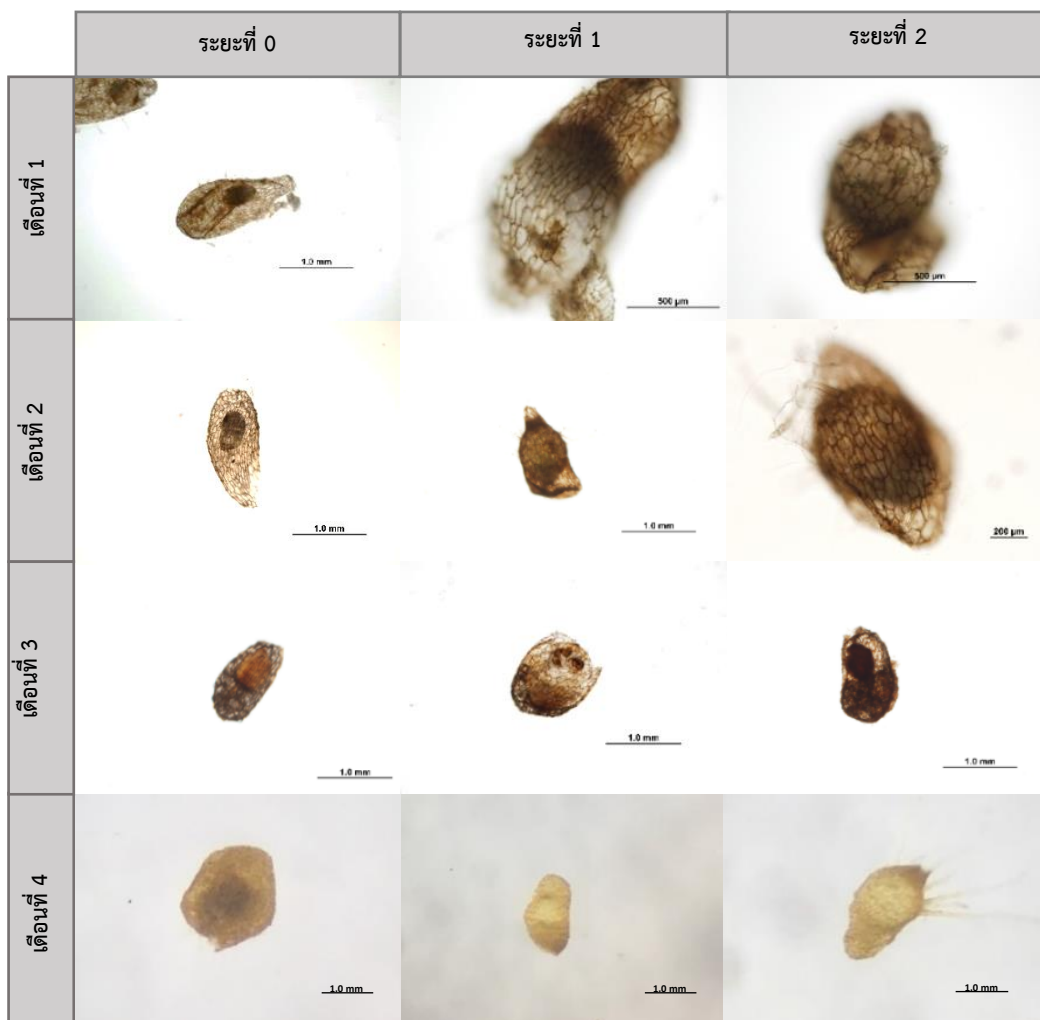
ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การงอก (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ น้ำ (ระยะที่ 2-5)

ระยะเวลา (เดือน)	เปอร์เซ็นต์การพัฒนา					
	ระยะที่ 0	ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3	ระยะที่ 4	ระยะที่ 5
1	12.69±1.39 ^a	40.73±3.14 ^a	46.58±4.53 ^a	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	14.67±4.25 ^{ab}	44.47±1.18 ^{ab}	40.78±4.64 ^b	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	14.68±2.22 ^b	45.30±3.0 ^{ab}	40.02±5.26 ^b	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
4	10.22±3.13 ^b	30.45±5.49 ^b	29.63±6.88 ^b	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเก็บตาข่ายแพลงก์ตอนมาตรวจสอบการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มในระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าเมล็ดกล้วยไม้สามารถพัฒนาไปสู่ระยะที่ 2 ได้ภายในเวลา 1 เดือน โดยเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดในระยะที่ 2 มีค่าสูงที่สุดในเดือนที่ 1 (ตารางที่ 5) แตกต่างจากเดือนอื่น ๆ อย่าง

มีนัยสำคัญ และในเดือนที่ 4 พบเปลือกหุ้มเมล็ดที่ภายในไม่มีเอ็มบริโอ (รูปที่ 14) คิดเป็น 29.7 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 14 ลักษณะเมล็ดและโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ได้อายุ 1-4 เดือน พบเมล็ดกล้วยไม้บางส่วนไม่พัฒนา (ระยะที่ 0) บางส่วนเอ็มบริโอขยายใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และบางส่วนเอ็มบริโอขยายใหญ่ เปลือกหุ้มเมล็ดปริแตก และพบมีการสร้างไรซอยด์ (ระยะที่ 2)

4.3 การคัดเลือกกราฟที่มีความสามารถในการกระตุ้นการงอกของเมล็ด

ผลการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้ด้วยวิธี Tetrazolium test พบว่า เมล็ดมีชีวิตประมาณ 30% จากนั้นจึงนำเมล็ดเพาะเลี้ยงร่วมกับรากทั้งหมดที่แยกได้เป็นการตรวจสอบใน

ขั้นต้นเพื่อหาหาที่มีความสามารถในการกระตุ้นการงอกพบว่าจากราทั้งหมด 50 ไอโซเลต มีราทั้งสิ้น 7 ไอโซเลต ที่สามารถกระตุ้นการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 6) ในจำนวนดังกล่าวเป็นราที่แยกได้จากราก 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต MSR07, MSR24 และ MSR34 และราที่แยกจากโปรโตคอร์ม 4 ไอโซเลต ประกอบไปด้วย MSP01, MSP02, MSP04 และ MSP13 จากนั้นจึงนำราทั้ง 7 ไอโซเลตไปทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพา สำหรับไอโซเลตอื่นไม่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ โดยมีอาการปรากฏให้เห็นชัดเจนคือ เส้นใยราเจริญปกคลุมเมล็ด เมล็ดไม่บวม (รูปที่ 15 ก) บางไอโซเลตเส้นใยราไม่เจริญปกคลุมแต่เอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีดำ (รูปที่ 15 ข) และบางไอโซเลตเส้นใยราเจริญคลุมเมล็ดรวมทั้งเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีดำร่วมด้วย (รูปที่ 15 ค)



รูปที่ 15 (ก) ลักษณะเมล็ดกล้วยไม้ที่ถูกรากเข้าทำลาย; (ข) เส้นใยราไม่เจริญปกคลุม แต่เอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีดำ; (ค) เส้นใยราเจริญคลุมเมล็ดและเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีดำ

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

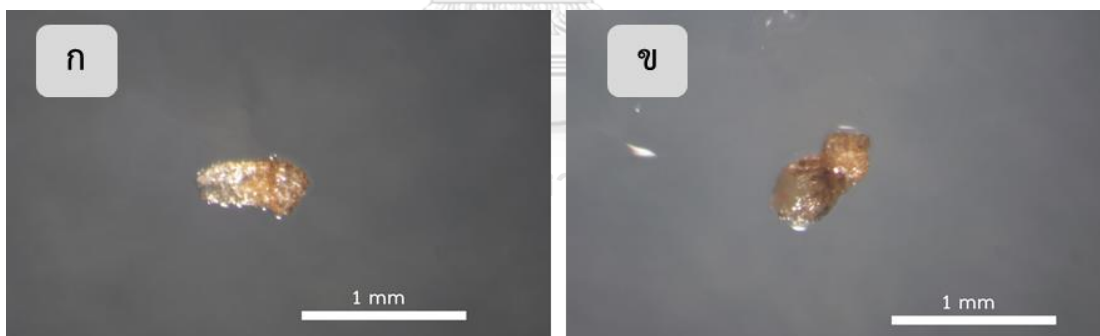
ชุดทดลอง	เปอร์เซ็นต์การงอก (ระยะที่ 1)
ชุดควบคุม (asymbiotic)	2.10 ± 1.84^f
MSR07	36.65 ± 7.04^d
MSR24	53.32 ± 0.47^b
MSR34	39.24 ± 5.65^{cd}
MSP01	48.57 ± 1.67^{bc}
MSP02	45.78 ± 5.41^{bcd}
MSP04	22.31 ± 5.58^e
MSP13	79.26 ± 8.96^a

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

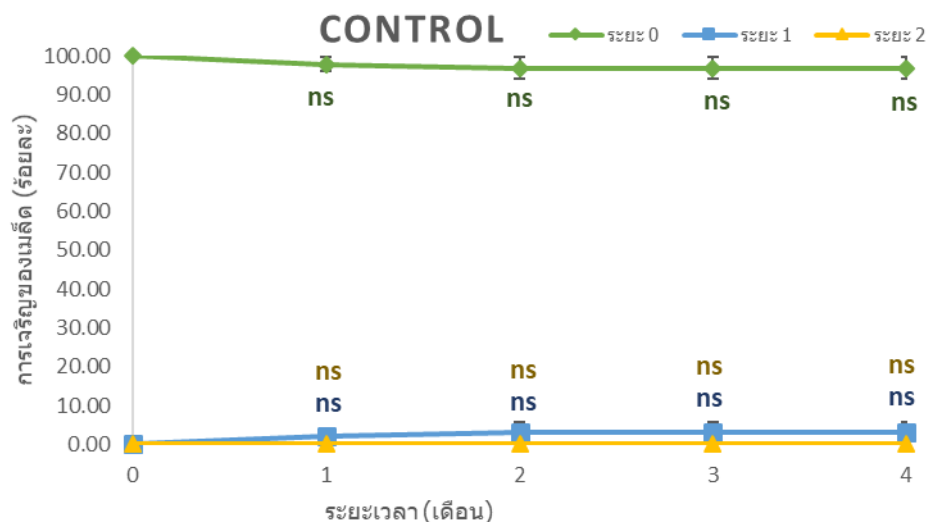
4.4 การทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพา

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ทั้ง 7 ไอโซเลตบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทุก 1 เดือน พบว่าราทั้ง 7 ไอโซเลตสามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้น้ำงอกได้ (ระยะที่ 1) ภายใน 1 เดือน หลังจากการเพาะเลี้ยง และทุกไอโซเลตสามารถกระตุ้นการพัฒนาของโปรโตคอร์มได้ถึงระยะที่ 2 ยกเว้น MSP04 โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกเรียงตามลำดับจากมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับราไอโซเลตที่คัดเลือกได้ดังต่อไปนี้ MSP13 (81.79), MSP01 (63.06), MSR24 (53.32), MSP02 (46.67), MSR34 (41.66), MSR07 (36.65) และ MSP04 (22.31) (ภาคผนวก ค ตารางที่ 9-11)

รูปที่ 16 แสดงให้เห็นว่าเมล็ดกล้วยไม้น้ำที่เจริญบนอาหารสูตร OMA โดยไม่มีราร่วมอยู่ (control) เมล็ดส่วนใหญ่ไม่มีการพัฒนา (ระยะที่ 0) (รูปที่ 16 ก) และบางส่วนงอกได้ สังเกตพบมีการบวมของเอ็มบริโอ (ระยะที่ 1) (รูปที่ 16 ข) จากรูปที่ 17 แสดงให้เห็นว่าตลอดทั้ง 4 เดือน เมล็ดส่วนมากไม่งอกและไม่พัฒนา ยังคงอยู่ในระยะที่ 0 พบเมล็ดระยะที่ 1 บางส่วน (2.10 เปอร์เซ็นต์) ในเดือนที่ 1 และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในเดือนที่ 2 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบโปรโตคอร์มในระยะที่ 2 ตลอดเวลา 4 เดือนที่สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลง

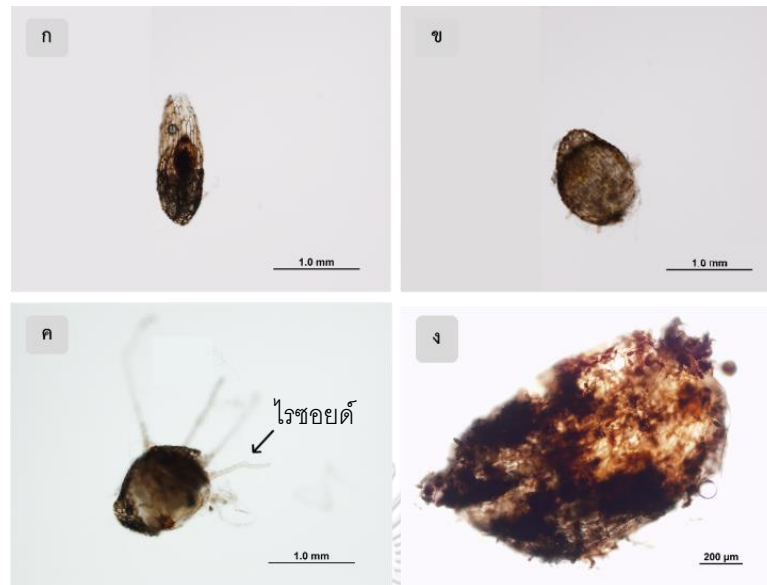


รูปที่ 16 เมล็ดกล้วยไม้น้ำ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA (asymbiotic) บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวมเล็กน้อย (ระยะที่ 1)

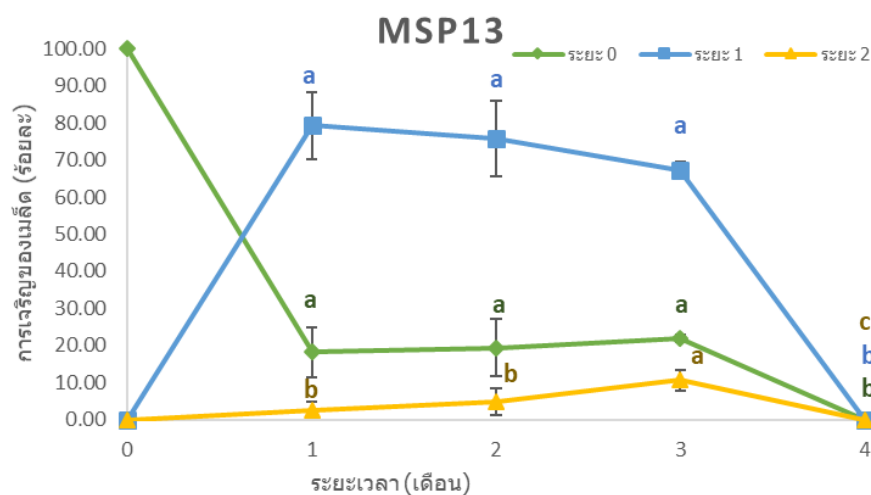


รูปที่ 17 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบอาหารเพาะเลี้ยง OMA โดยไม่มีรา (control) ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ราไอโซเลต MSP13 ส่งเสริมการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะที่ 2 โดยเอ็มบริโอขยายขนาดเปลือกหุ้มเมล็ดปริแตก และมีการสร้างไรซอยด์ (รูปที่ 18 ค) จากรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่าเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เจริญร่วมกับราไอโซเลต MSP13 พัฒนาได้ในระยะที่ 1 นั่นคือ เอ็มบริโอขยายขนาดบวมขึ้น แต่ยังไม่ปรากฏไรซอยด์ (รูปที่ 18 ข) พบเป็นจำนวนมาก (79.26 เปอร์เซ็นต์) อีกทั้งพบการพัฒนาของเมล็ดในระยะที่ 2 ภายในเวลา 1 เดือน เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 2 และเดือนที่ 3 จำนวนเมล็ดที่พัฒนาถึงระยะที่สองเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 4 พบว่าเมล็ดทั้งหมดถูกเส้นใยราเจริญปกคลุม และไม่พบการพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 3-5 (รูปที่ 18 ง)



รูปที่ 18 เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSP13 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1); (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรชอยด์ (ลูกครี) (ระยะที่ 2) และ (ง) เมล็ดเปลี่ยนเป็นสีคล้ำมีเส้นใยปรากฏ

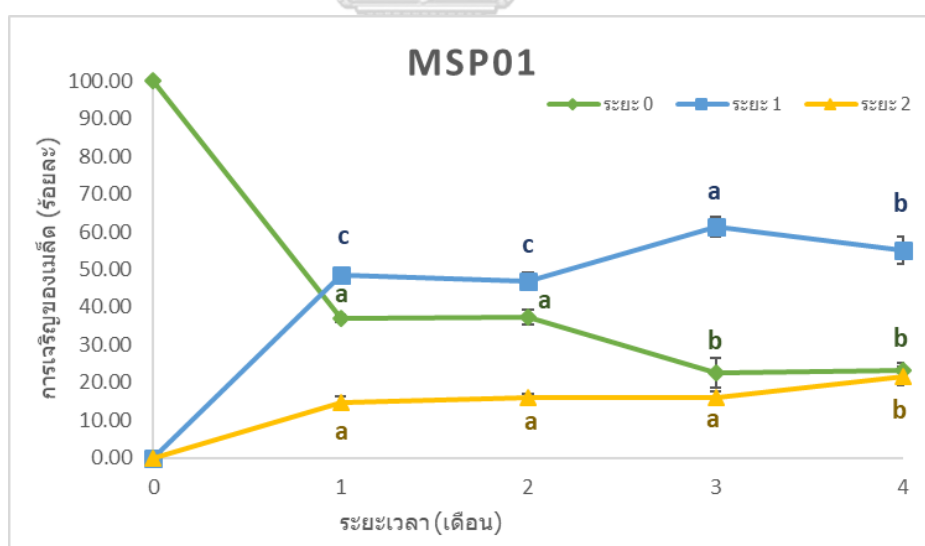


รูปที่ 19 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้บนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSP13 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ราไอโซเลต MSP01 ส่งเสริมการงอกและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะที่ 2 โดยเอ็มบริโอขยายขนาด เปลือกหุ้มเมล็ดปริแตก และมีการสร้างไรซอยด์ (รูปที่ 20 ค) จากรูปที่ 21 แสดงให้เห็นว่า เมล็ดกล้วยไม้ที่เจริญร่วมกับราไอโซเลต MSP01 พัฒนาได้ในระยะที่ 1 และ 2 ภายในเวลา 1 เดือน โดยเมล็ดพัฒนาสู่โปรโตคอร์มระยะที่ 2 จำนวน 14.49 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเดือนที่ 2 ไม่พบ การเปลี่ยนแปลงของระยะต่าง ๆ กระทั่งเดือนที่ 3 พบว่าระยะ 0 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งระยะที่ 1 (รูปที่ 10 ข) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังคงไม่พบการพัฒนาของโปรโตคอร์มระยะที่ 3



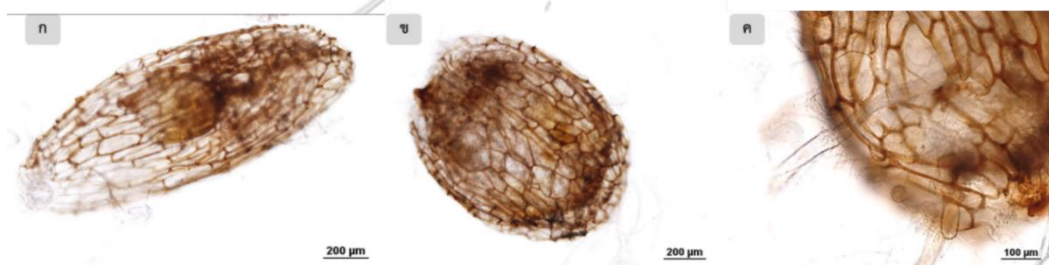
รูปที่ 20 เมล็ดกล้วยไม้ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับรา MSP01 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2)



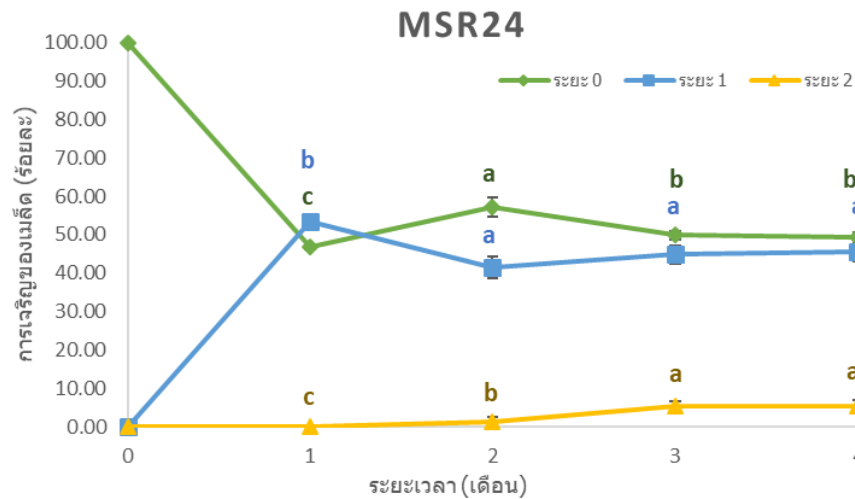
รูปที่ 21 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้บนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSP01 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ราไอโซเลต MSR24 ส่งเสริมการงอกและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะที่ 2 โดยเอ็มบริโอขยายขนาด เปลือกหุ้มเมล็ดปริแตก และมีการสร้างไรซอยด์ (รูปที่ 22 ค) จากรูปที่ 23 แสดงให้เห็นว่า เมล็ดกล้วยไม้ที่เจริญร่วมกับราไอโซเลต MSP24 พัฒนาได้ในระยะที่ 1 นั่นคือ เอ็มบริโอขยายขนาด บวมขึ้น แต่ยังไม่ปรากฏไรซอยด์ (53.32 เปอร์เซ็นต์) ภายในเวลา 1 เดือน ยังไม่พบการพัฒนาของ เมล็ดระยะที่ 2 ในเดือนแรก สำหรับเดือนที่ 2 พบว่าเมล็ดบางส่วนพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 2 (1.26 เปอร์เซ็นต์) โดยเมล็ดระยะที่ 1 จะลดลง อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเดือนที่ 1 พบการพัฒนาของโปรโตคอร์มเพิ่มมากขึ้นในเดือนที่ 3 และคงความเป็นระยะที่ 2 อยู่จนถึงเดือนที่ 4 โดยยังคงไม่พบการพัฒนาของโปรโตคอร์มในระยะที่ 3

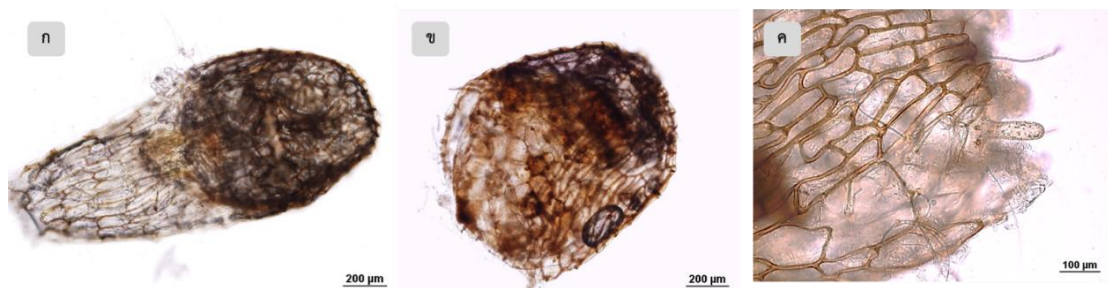


รูปที่ 22 เมล็ดกล้วยไม้หน้า *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSR24 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2)

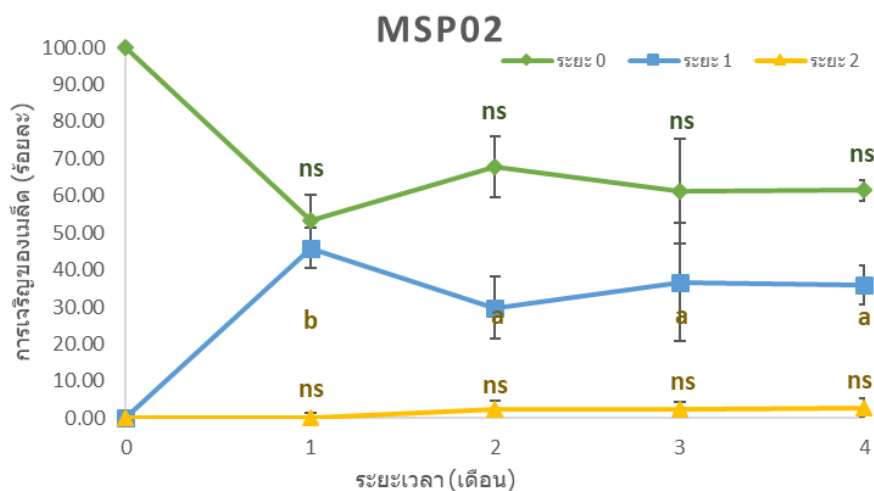


รูปที่ 23 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSP24 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ราไอโซเลต MSP02 สามารถกระตุ้นการงอกและส่งเสริมการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะที่ 2 โดยเอ็มบริโอขยายขนาด เปลือกหุ้มเมล็ดปริแตก และมีการสร้างไรซอยด์ (รูปที่ 24 ค) จากรูปที่ 25 พบเมล็ดกล้วยไม้ น้ำบางส่วนพัฒนาถึงระยะที่ 2 (2.44 เปอร์เซ็นต์) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน จำนวนของเมล็ดระยะที่ 0 และ 1 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตลอดทั้ง 4 เดือนที่เพาะเลี้ยง

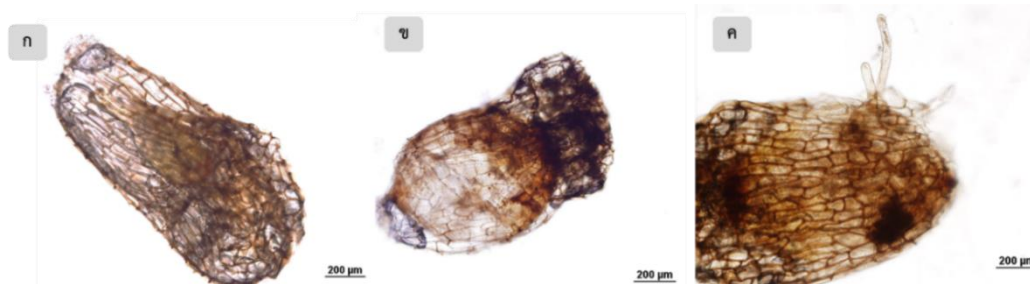


รูปที่ 24 เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSP02 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข). เอ็มบริโอขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2)

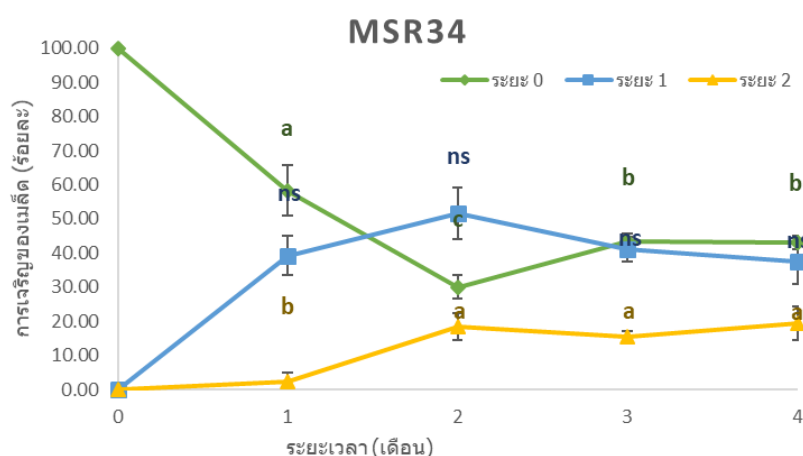


รูปที่ 25 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้หน้าอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSP02 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ราไอโซเลต MSR34 กระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้หน้า และส่งเสริมการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะที่ 2 โดยเอ็มบริโอขยายขนาด เปลือกหุ้มเมล็ดปริแตก และมีการสร้างไรซอยด์ ได้ภายใน 1 เดือนหลังเพาะเลี้ยง (รูปที่ 26 ค) จากรูปที่ 27 แสดงให้เห็นว่าเมล็ดกล้วยไม้หน้าที่เจริญร่วมกับราไอโซเลต MSP34 พบการพัฒนาของเมล็ดระยะที่ 2 (2.42 เปอร์เซ็นต์) สำหรับเดือนที่ 2 พบว่าเมล็ดระยะที่ 0 ลดลงและพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 1 และ 2 ซึ่งมีความแตกต่างจากเดือนแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การพัฒนายังคงเป็นโปรโตคอร์มระยะที่ 2 ต่อไปและมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในเดือนที่ 4 ขณะที่เมล็ดระยะที่ 1 บางส่วนก็ยังคงความเป็นระยะที่ 1 อยู่ และยังไม่พบการพัฒนาของโปรโตคอร์มระยะที่ 3 แม้จะเพาะเลี้ยงจนถึงเดือนที่ 4 ก็ตาม



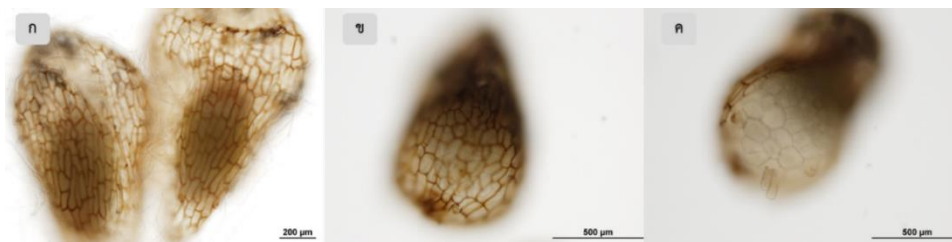
รูปที่ 26 เมล็ดกล้วยไม้ น้ำ *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับรา ไอโซเลต MSR34 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2)



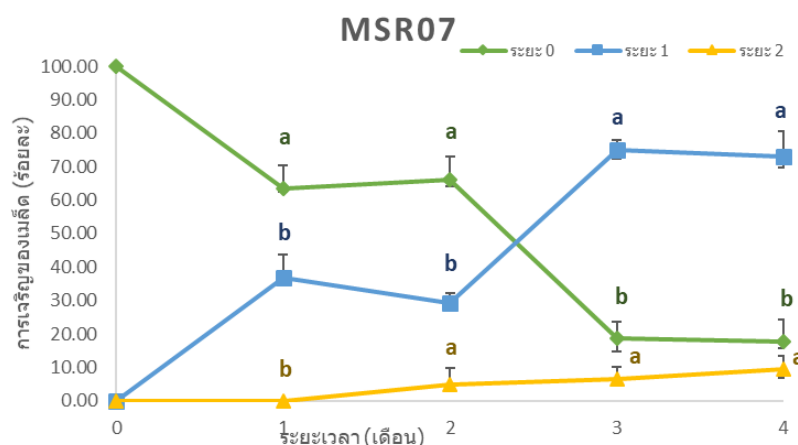
รูปที่ 27 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้ น้ำบนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSR34 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ราไอโซเลต MSR07 กระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำ และส่งเสริมการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มระยะที่ 2 โดยเอ็มบริโอขยายขนาด เปลือกหุ้มเมล็ดปริแตก และมีการสร้างไรซอยด์ ได้ภายใน 2 เดือนหลังเพาะเลี้ยง (รูปที่ 28) จากรูปที่ 29 แสดงให้เห็นว่าเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เจริญร่วมกับราไอโซเลต MSP07 พัฒนาได้ในระยะที่ 1 โดยเอ็มบริโอขยายขนาดบวมขึ้น แต่ยังไม่ปรากฏไรซอยด์ ภายในเวลา 1 เดือน ยังไม่พบการพัฒนาของเมล็ดระยะที่สองในเดือนนี้ สำหรับเดือนที่ 2 พบว่าเมล็ดบางส่วนพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 2 (4.77 เปอร์เซ็นต์) โดยเมล็ดระยะที่ 0 จะลดลง และลดลงอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเข้าสู่เดือนที่ 3 ในเดือนนี้พบว่าเมล็ดระยะที่ 1 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเดือนที่ 1 และ 2 ขณะที่เมล็ดระยะที่ 2 บางส่วนก็ยังคงความเป็นระยะที่ 2 อยู่ และยังไม่พบการพัฒนาของโปรโตคอร์มีระยะที่ 3 แม้จะเพาะเลี้ยงจนถึงเดือนที่ 4



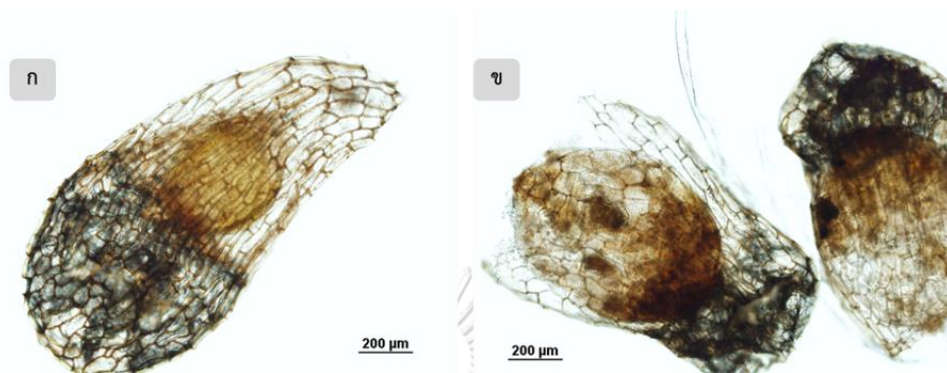
รูปที่ 28 เมล็ดกล้วยไม้หน้า *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSR07 ป่มในที่มีด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (ระยะที่ 1) และ (ค) เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก มีไรซอยด์ (ระยะที่ 2)



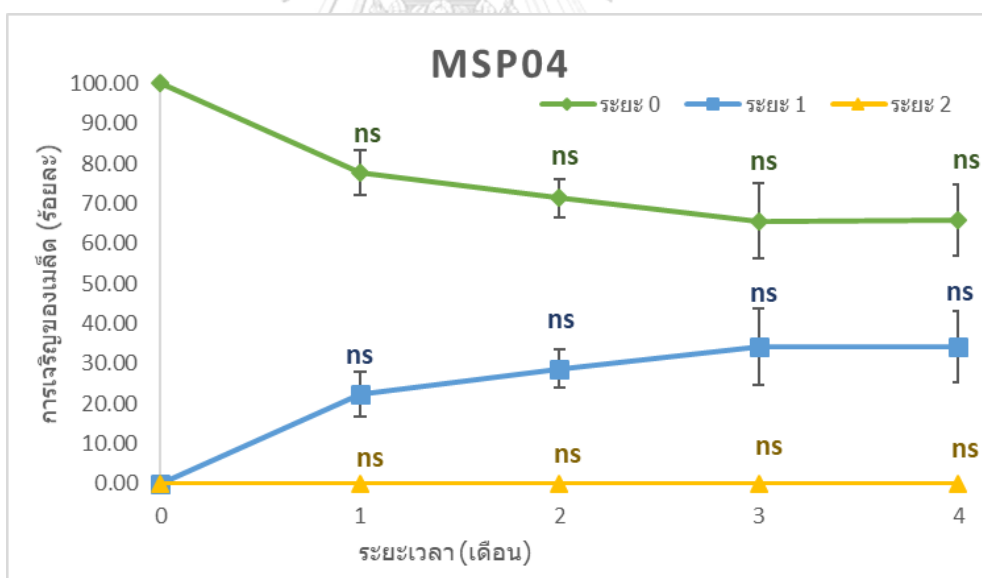
รูปที่ 29 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) และการพัฒนาของโปรโตคอร์มี (ระยะที่ 2) ของกล้วยไม้บนอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับรา MSR07 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ราไอโซเลต MSP04 กระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้หน้า และส่งเสริมการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มีระยะที่ 2 โดยเอ็มบริโอขยายขนาด เปลือกหุ้มเมล็ดปริแตก และมีการสร้างไรซอยด์ (รูปที่ 30) จากรูปที่ 31 แสดงให้เห็นว่าเมล็ดกล้วยไม้หน้าที่เจริญร่วมกับราไอโซเลต MSP04 พัฒนาได้ในระยะที่ 1

โดยเอ็มบริโอขยายขนาดบวมขึ้น แต่ยังไม่ปรากฏไรซอยด์ ภายในเวลา 1 เดือน เปอร์เซ็นต์ของเมล็ด
ในระยะเวลาที่ 0 และ 1 ในแต่ละเดือนไม่แตกต่างกันทางสถิติ และไม่พบการพัฒนาของโปรโตคอร์มระยะ
ที่ 2 ตลอดทั้ง 4 เดือนที่ทดลอง



รูปที่ 30 เมล็ดกล้วยไม้หน้า *E. flava* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ร่วมกับราไอโซเลต MSP04 บ่ม
ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) เมล็ดไม่เจริญ (ระยะที่ 0); (ข) เอ็มบริโอบวม ขยายขนาดใหญ่
ขึ้น (ระยะที่ 1)



รูปที่ 31 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ระยะที่ 1) ของกล้วยไม้หน้าอาหารเพาะเลี้ยง OMA ร่วมกับ
รา MSP04 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน โดยตัวอักษรต่างกันบนเส้นกราฟเมื่อเปรียบเทียบการ
เจริญที่ระยะเดียวกันในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ns (non-
significant) หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

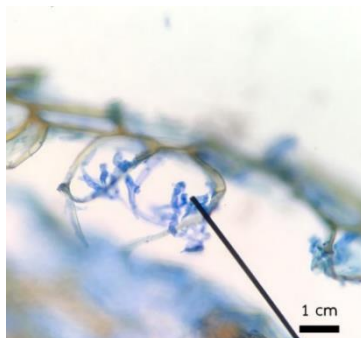
ตารางที่ 7 แสดงค่า GRI และ DRI หลังเพาะเลี้ยงเมล็ดแบบพึ่งพาเป็นเวลา 4 เดือน พบว่าไอโซเลต MSP13 และ MSP01 กระตุ้นการงอกได้สูงสุดที่ค่า GRI เท่ากับ 148.14 ± 6.12^a และ 139.41 ± 1.30^a แตกต่างจากไอโซเลตอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไอโซเลตที่กระตุ้นการงอกได้น้อยที่สุดคือ MSP04 GRI เท่ากับ 56.62 ผลการทดลองพบว่าราทุกไอโซเลตที่นำมา ทดสอบนั้นช่วยกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้ น้ำพัฒนาได้ถึงระยะที่ 2 ยกเว้น MSP04 ที่สามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้ แต่ไม่พัฒนาต่อถึงระยะที่ 2 เมื่อพิจารณาการพัฒนาของโปรโตคอร์มจากค่า GRI พบว่า ไอโซเลต MSP01 ส่งเสริมให้เมล็ดกล้วยไม้ น้ำพัฒนาถึงระยะที่ 2 ได้ดีที่สุด ที่ค่า DRI เท่ากับ 33.2

ตารางที่ 7 ผลของการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพากับราทั้ง 7 ไอโซเลต แสดงด้วยค่า GRI และ DRI เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (asymbiotic) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร OMA เป็นเวลา 4 เดือน

ระยะการพัฒนา	ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3	ระยะที่ 4	ระยะที่ 5
กลุ่มทดลอง	GRI	DRI	DRI	DRI	DRI
MSR07	101.37 ± 5.41^b	6.85 ± 1.85^c	0	0	0
MSR24	104.13 ± 0.90^b	3.74 ± 0.63^c	0	0	0
MSR34	109.77 ± 3.26^b	21.68 ± 2.52^b	0	0	0
MSPO1	139.41 ± 1.30^a	33.2 ± 1.59^a	0	0	0
MSP02	85.38 ± 4.17^c	3.58 ± 1.58^c	0	0	0
MSP04	56.62 ± 7.36^d	0 ^d	0	0	0
MSP13	148.14 ± 6.12^a	8.49 ± 2.08^c	0	0	0
asymbiotic	6.76 ± 3.42^e	0 ^d	0	0	0

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

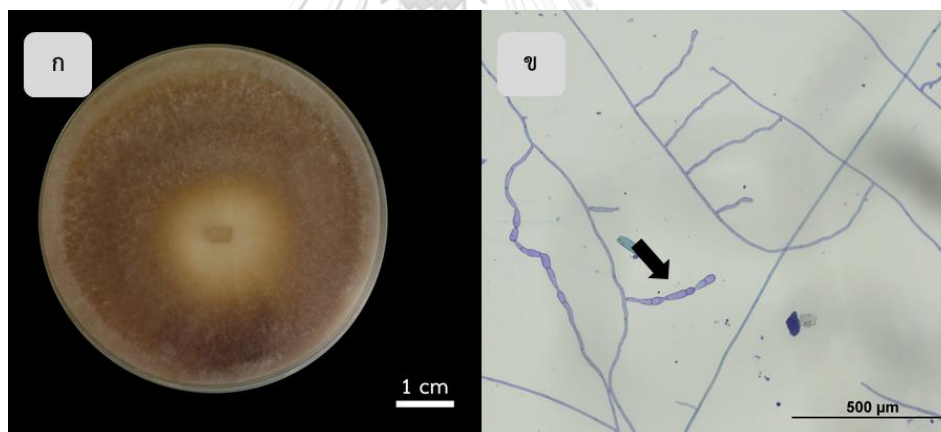
จากการทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาพบว่า ราไอโซเลต MSR07, MSR24, MSR34, MSPO1, MSP02 และ MSP13 สามารถกระตุ้นการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำได้ ถึงระยะที่ 2 ภายในเวลา 4 เดือน และไม่พบการพัฒนาในระยะถัดไป แต่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ น้ำ ยังคงรักษาสภาพของโปรโตคอร์มในระยะที่ 2 ได้อย่างสมบูรณ์ ไม่พบการย่อยสลายของเซลล์โปรโตคอร์ม แต่พบการย่อยของฟีโลตอนภายในเซลล์ (รูปที่ 32)



รูปที่ 32 การย่อยสลายไปบางส่วนของขดเส้นใยฟิโลตอนภายในเซลล์โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ น้ำ ที่ 4 เดือนหลังการเพาะเลี้ยง

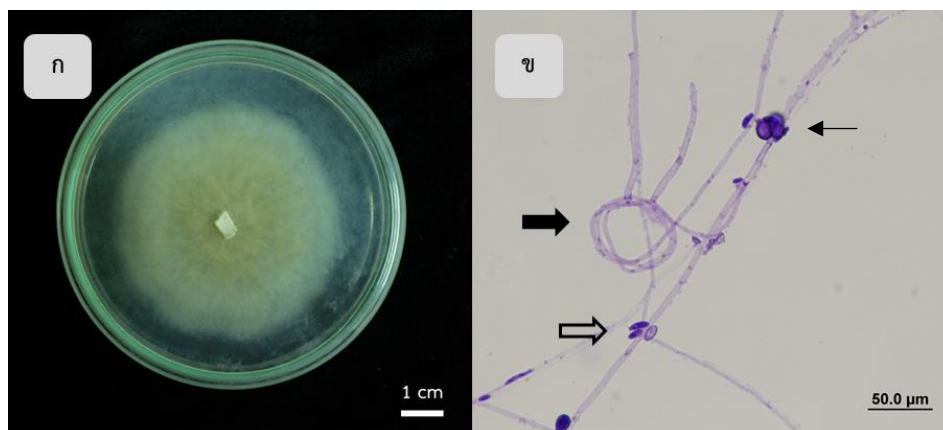
4.5 การระบุเอกลักษณ์ของรา

4.5.1 การระบุเอกลักษณ์ของราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา



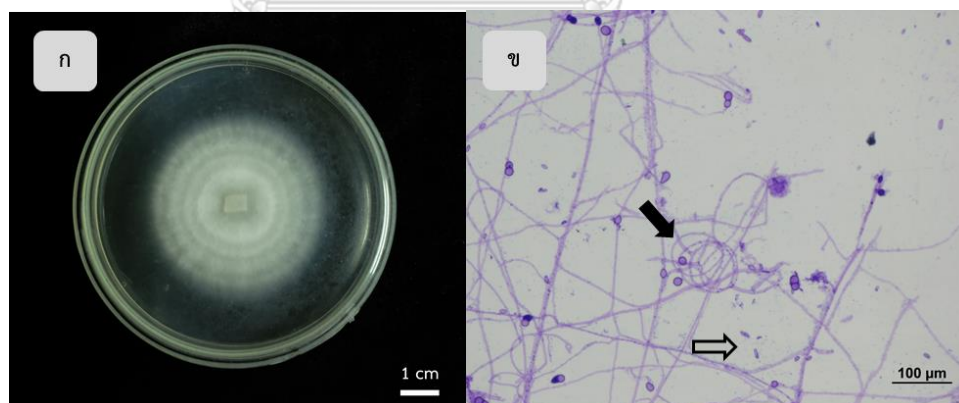
รูปที่ 33 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSR07 แสดงลักษณะเส้นใย และเซลล์โมโนลอยด์ (ลูกศรทึบ)

MSR07 มีลักษณะเส้นใยละเอียดสีน้ำตาล พู สร้างเส้นใยอากาศ มีผนังกัน เส้นใยใหม่สร้างตั้งฉากกับเส้นใยเดิม และสร้างเซลล์โมโนลอยด์รูปทรงกระบอก (ลูกศรทึบ) และยังไม่พบสปอร์ ดังรูปที่ 33 ก และ ข



รูปที่ 34 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSR24 แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรทึบ) และไมโครสปอร์ (ลูกศรโปร่ง)

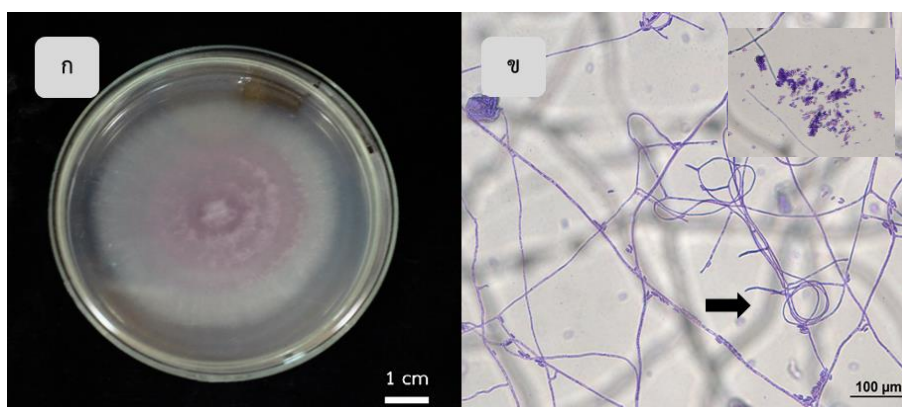
MSR24 มีลักษณะเส้นใยฟู มีสีขาว ตรงกลางมีสีเหลืองอ่อนถึงสีน้ำตาลอ่อน เส้นใยมีผนังกันสร้างขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรทึบ) ไมโครสปอร์ค่อนข้างรี และพบ Clamydospore (ลูกศรเล็ก) ซึ่งมีลักษณะกลม ดังรูปที่ 34 ก และ ข จากลักษณะโครงสร้างของสปอร์และเส้นใย สามารถระบุสกุลของราไอโซเลต MSR24 จากรูปร่างได้เป็นสกุล *Fusarium*



รูปที่ 35 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSR34) แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรทึบ) และไมโครสปอร์ (ลูกศรโปร่ง)

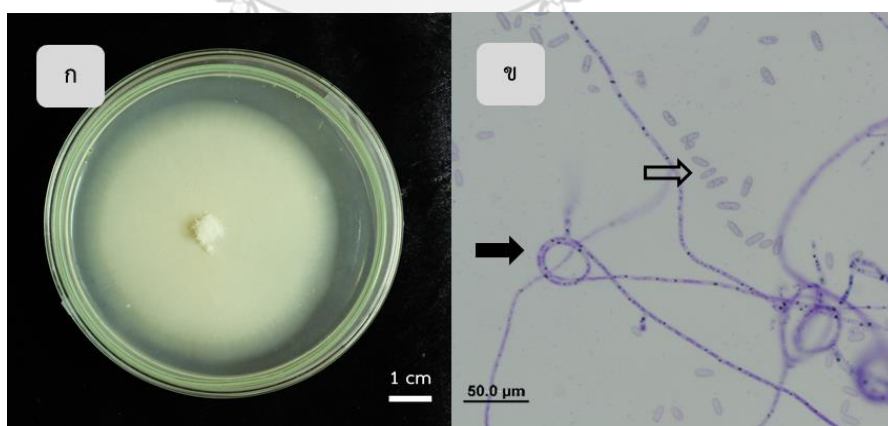
MSR34 เส้นใยสีขาว มีความหนาบางของเส้นใยสลับกันเป็นชั้น มองเห็นขอบโคโลนีไม่ชัดเจน และพบขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรทึบ) ดังรูปที่ 4.25 ก ตรวจพบโคนิไดโอสปอร์ (ลูกศรโปร่ง) ดัง

รูปที่ 35 ข จากลักษณะโครงสร้างของสปอร์และเส้นใย สามารถระบุสกุลของราไอโซเลต MSR34 จากรูปวิธานได้เป็นสกุล *Fusarium*



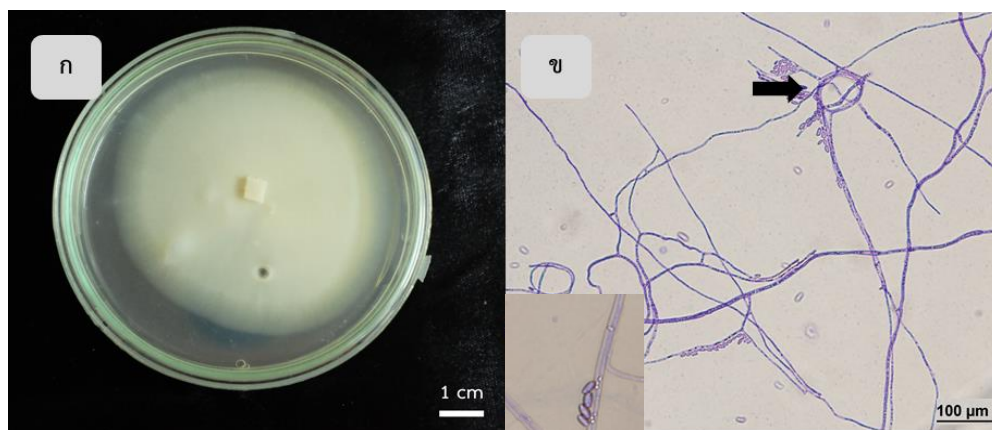
รูปที่ 36 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSP01 แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรชี้) และไมโครสปอร์ (มุมบนขวา)

MSP01 มีเส้นใยขาวฟู บริเวณตรงกลางมีสีม่วง รูปที่ 36 ก เส้นใยมีผนังกัน สร้างขดเส้นใย ลักษณะคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรชี้) และพบไมโครสปอร์รูปร่างรี (มุมบนขวา) ดังรูปที่ 36 ข จากลักษณะโครงสร้างของสปอร์และเส้นใยสามารถระบุสกุลของราไอโซเลต MSR01 จากรูปวิธานได้เป็นสกุล *Fusarium*



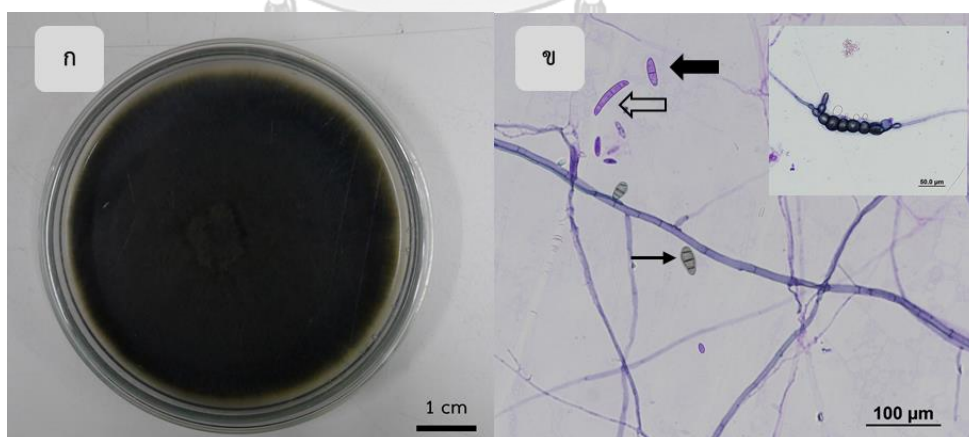
รูปที่ 37 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSP02 แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายฟิโลตอน (ลูกศรชี้) และโคนิเดีย (conidia) (ลูกศรป่อง)

MSP02 มีลักษณะเส้นใยละเอียดสีขาว เส้นใยค่อนข้างหนาแน่น บริเวณขอบโคโลนีมีความหนาของเส้นใยน้อยกว่าตรงกลาง ดังรูปที่ 37 ก เส้นใยมีผนังกัน พบขดเส้นใยคล้ายพิโลตอน (ลูกศรทึบ) พบโคนิเดีย (conidia) (ลูกศรโปร่ง) รูปที่ 37 ข



รูปที่ 38 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSP04 แสดงลักษณะขดเส้นใยคล้ายพิโลตอน (ลูกศรทึบ) และโคนิเดีย (conidia) (มุมล่างซ้าย)

MSP04 ลักษณะเส้นใยละเอียดสีขาว เส้นใยค่อนข้างหนาแน่น บริเวณขอบโคโลนีจะมีความหนาของเส้นใยน้อยกว่าตรงกลาง ดังรูปที่ 38 ก เส้นใยมีผนังกัน พบขดเส้นใยคล้ายพิโลตอน พบโคนิเดีย (conidia) รูปทรงรี (มุมล่างขวา) รูปที่ 38 ข



รูปที่ 39 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต MSP13 แสดงลักษณะเส้นใย ไมโครสปอร์ (ลูกศรทึบ) แมคโครสปอร์ (ลูกศรโปร่ง) โคนิเดียรูปร่าง boat shape (ลูกศรเล็ก) และพบ Clamydospore

MSP13 เส้นใยค่อนข้างหนา มีสีดำ ดังรูปที่ 39 ก เส้นใยมีผนังกัน ตรวจสอบไมโครสปอร์ (ลูกศรทึบ) แมคโครสปอร์ (ลูกศรโปร่ง) โคนิเดียรูปร่าง boat shape (ลูกศรเล็ก) และพบ Clamydospore (มุมบนขวา) ดังรูปที่ 39 ข จากลักษณะโครงสร้างของสปอร์และเส้นใย สามารถระบุสกุลของราไอโซเลต MSR31 จากรูปวิธานได้เป็นสกุล *Curvularia*

4.5.2 การระบุเอกลักษณ์ของราด้วยข้อมูลทางชีววิทยาโมเลกุล

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของราทั้ง 7 ไอโซเลต ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสจากนั้นเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank ให้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 8 แบ่งราออกได้เป็น 4 ชนิด ประกอบด้วย

ชนิดที่ 1 *Fusarium solani* ประกอบด้วยราที่แยกได้และกระตุ้นการงอกของเมล็ดจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ MSR07 และ MSR24 โดย MSR07 มีตำแหน่งเบสที่ตำแหน่ง ITS ใกล้เคียงที่สุดกับ *Fusarium solani* ไอโซเลต F174 (MF401578) ที่ค่าความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับ MSR24 มีตำแหน่งเบสที่ตำแหน่ง ITS ใกล้เคียงที่สุดกับ *Fusarium solani* ไอโซเลต 33514bDRJ (MF782768) ที่ค่าความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์

ชนิดที่ 2 *Fusarium oxysporum* ประกอบด้วยราที่แยกได้และกระตุ้นการงอกของเมล็ดจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ MSR34 และ MSP01 โดย MSR34 ทั้งสองไอโซเลตมีตำแหน่งเบสที่ตำแหน่ง ITS ใกล้เคียงที่สุดกับ *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์ EEC-643 (MH575293) ที่ค่าความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์

ชนิดที่ 3 *Plectosphaerella cucumerina* ประกอบด้วยราที่แยกได้และกระตุ้นการงอกของเมล็ดจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ MSP02 และ MSP04 โดย MSP02 มีตำแหน่งเบสที่ตำแหน่ง ITS ใกล้เคียงที่สุดกับ *Plectosphaerella cucumerina* voucher CEQCA-M1268 (KC771491) ที่ค่าความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับ MSP04 มีตำแหน่งเบสที่ตำแหน่ง ITS ใกล้เคียงที่สุดกับ *Plectosphaerella cucumerina* ยีน 18S rRNA (AJ492873) ที่ค่าความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์

ชนิดที่ 4 *Curvularia lunata* คือราที่แยกได้และกระตุ้นการงอกของเมล็ดไอโซเลต MSP13 มีตำแหน่งเบสที่ตำแหน่ง ITS ใกล้เคียงที่สุดกับ *Curvularia lunata* ไอโซเลต E16 (MH183194) ที่ค่าความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 การระบุชนิดของราโดยอาศัยลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS

รหัสรา	ราที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันใกล้เคียงที่สุด	Assession number	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%)
MSR07	<i>Fusarium solani</i>	MF401578	99%
MSR24	<i>Fusarium solani</i>	MF782768	99%
MSR34	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH575293	100%
MSP01	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH575293	100%
MSP02	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	KC771491	100%
MSP04	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	AJ492873	99%
MSP13	<i>Curvularia lunata</i>	MH183194	100%

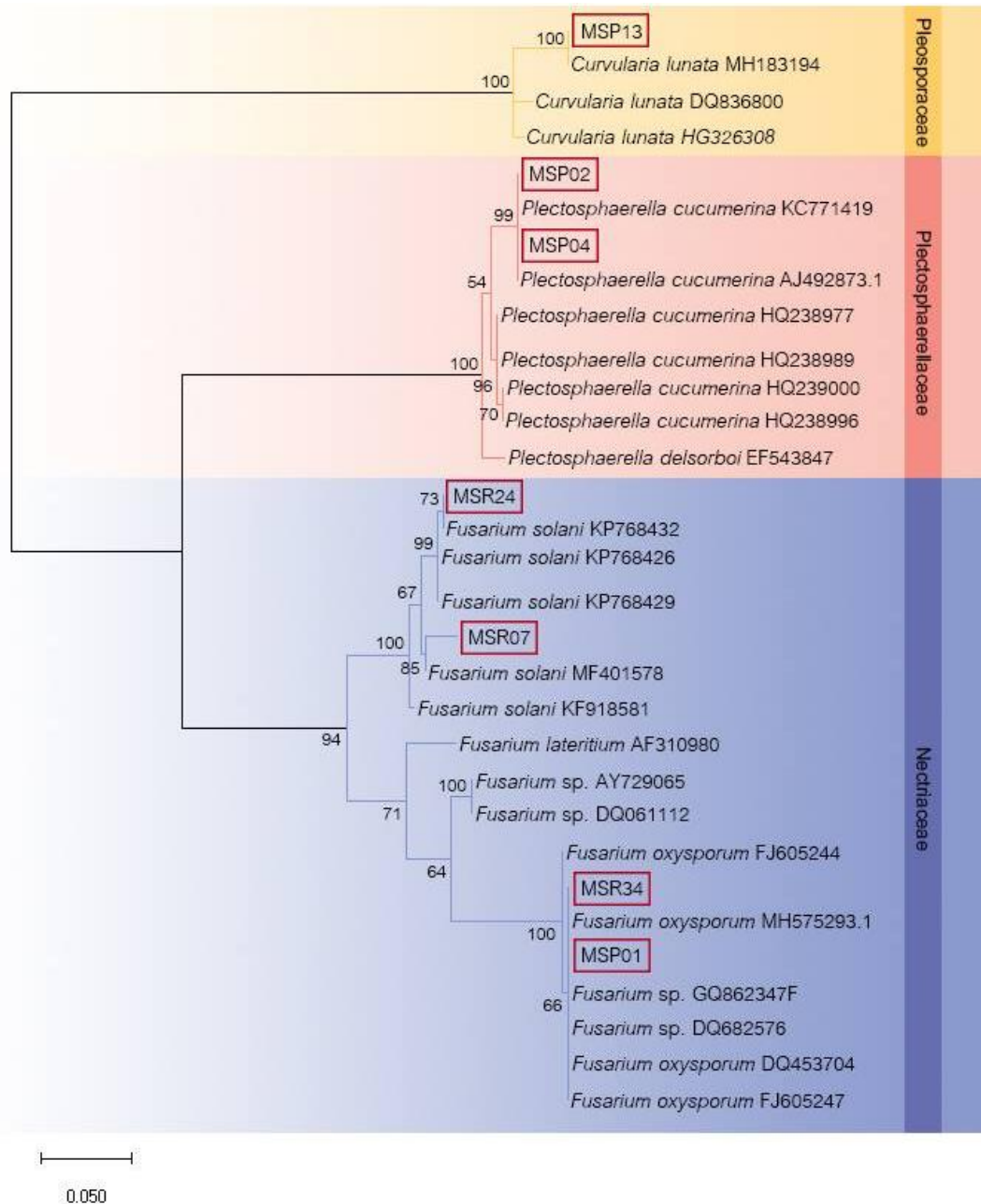
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของราที่นำมาทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้แบบพึ่งพาและราในสกุลเดียวกันที่นำมาอ้างอิง ด้วยแบบจำลอง Maximum Likelihood โมเดล kimura 2 parameter +I ดังรูปที่ 4.30 แบ่งราออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ประกอบด้วย *Curvularia*, *Plectosphaerella* และ *Fusarium* จำนวน 2 กลุ่มย่อย แสดงให้เห็นว่าราสกุล *Plectosphaerella* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับราสกุล *Fusarium* มากกว่าสกุล *Curvularia*

ในสกุล *Curvularia* พบว่าราที่แยกได้จากโปรโตคอร์ม ไอโซเลต MSP13 มีความสัมพันธ์กับ *Curvularia lunata* (MH183194.1 และ HG326308) ที่ค่า bootstrap สนับสนุน 100 เปอร์เซ็นต์

ในสกุล *Plectosphaerella* พบว่าไอโซเลต MSP02 และ MSP04 ที่แยกได้จากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ น้ำ สัมพันธ์กันที่ค่า bootstrap สนับสนุน 100 เปอร์เซ็นต์ โดยสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรา *Plectosphaerella cucumerina* (KC771491 และ AJ492873) ที่มีรายงานว่ามียาบพาทเป็นแอนโดไฟต์มากกว่า *Plectosphaerella cucumerina* ที่ถูกรายงานว่าเป็นราก่อโรค (HQ238977, HQ238989, HQ238900, HQ238996)

สกุล *Fusarium* แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยได้แก่ *F. solani* กับ *F. oxysporum* ไอโซเลต MSR24 ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ น้ำ และไอโซเลต MSR07 ที่แยกได้จากราก สัมพันธ์กับกลุ่มแรกของสกุล

Fusarium คือ *F. solani* ขณะที่ไอโซเลต MSR13 และ MSP01 สัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่ม *F. oxysporum* มากกว่า



รูปที่ 40 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราที่กระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่ตำแหน่ง ITS (ขีดเส้นใต้) ด้วยแบบจำลอง Maximum-likelihood แสดงเปอร์เซ็นต์ bootstrap จากการทดสอบ 100 ครั้ง

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการแยกพีโลตอนของราที่อาศัยอยู่ในเซลล์ของรากกล้วยไม้ *E. flava* ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถแยกราได้ไอโซเลตที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำนวนมากกว่าที่แยกได้จากโปรโตคอร์มที่ได้จากวิธี *in situ* seed baiting แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ในรากที่สูงกว่าในโปรโตคอร์ม ทั้งนี้เนื่องจากราเอนโดไฟต์สามารถเข้าสู่เซลล์ของรากกล้วยไม้ได้ทุกระยะตั้งแต่ระยะที่เป็นเมล็ดจนถึงระยะที่พัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ ซึ่งในช่วงแรกของการเข้าสู่เมล็ดกล้วยไม้ ราเอนโดไฟต์ที่สามารถกระตุ้นการงอกและการเจริญของโปรโตคอร์มซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดและการพัฒนาเป็นต้นกล้าของกล้วยไม้จะเข้าไปเจริญอยู่ก่อน โดยทำหน้าที่ในการส่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการงอกและการพัฒนาให้กับเอ็มบริโอของกล้วยไม้ เมื่อกล้ากล้วยไม้เจริญเป็นต้นสมบูรณ์ ราเอนโดไฟต์ชนิดอื่น ๆ จะมีโอกาสเข้าสู่เซลล์ของรากกล้วยไม้ได้มากขึ้น แต่ราเอนโดไฟต์เหล่านี้อาจไม่ได้เข้าไปทำหน้าที่เป็นราไมคอร์ไรซาที่ช่วยเหลือกล้วยไม้ในแง่ของการแลกเปลี่ยนอาหาร แต่อาจจะ มีบทบาทในด้านอื่น ๆ (Pant et al., 2017) เช่น การทนต่อสภาวะเครียด การป้องกันรากกล้วยไม้จากการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค ตัวอย่างเช่น ราสกุล *Fusarium* สามารถกระตุ้นความต้านทานต่อโรคให้แก่พืชอาศัย อีกทั้ง *Fusarium* ที่มีบทบาทเป็นเอนโดไฟต์ และไม่ก่อโรคนั้นยังสามารถควบคุม *Fusarium* ชนิดที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้ (Athman et al., 2007; Vu, Hauschild and Sikora, 2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการทดสอบความสามารถของราที่แยกได้ทั้ง 50 ไอโซเลตในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ พบว่ามีราที่แยกได้เพียง 7 ไอโซเลตที่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ แสดงให้เห็นถึงความเฉพาะเจาะจงระหว่างรากกล้วยไม้ในการกระตุ้นการงอกและการพัฒนาเป็นต้นกล้า โดยมีรายงานการศึกษาพบว่าความจำเพาะเจาะจงระหว่างรากกล้วยไม้ในระยะที่กระตุ้นการงอกนั้นจะต่ำกว่าความจำเพาะเจาะจงระหว่างรากกล้วยไม้ในระยะการพัฒนาของโปรโตคอร์ม ซึ่งความจำเพาะเจาะจงระหว่างรากกล้วยไม้ในระยะที่กระตุ้นการงอกที่ต่ำนี้นับว่าเป็นผลดีกับกล้วยไม้ ทั้งนี้เนื่องจากเมล็ดของกล้วยไม้ได้พัฒนาโดยการลดขนาดให้เล็กลงมากจนเป็นผงและมีอาหารสะสมอยู่น้อย ทำให้เอื้ออำนวยต่อการแพร่กระจายไปในที่ต่าง ๆ ได้ไกล เมื่อเมล็ดตกอยู่บริเวณใดก็จะยอมให้ราที่มีอยู่บริเวณนั้นช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราหลายชนิดสามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ แต่ราดังกล่าวอาจไม่มี

บทบาทในการกระตุ้นการพัฒนาในระยะถัดไป จำเป็นต้องอาศัยราชชนิดอื่นช่วยส่งเสริมต่อไป สอดคล้องกับในสภาพธรรมชาติมีราหลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับกล้วยไม้ในรูปแบบที่แตกต่างกันไป การพัฒนาจนครบวงจรชีวิตของกล้วยไม้อาจจำเป็นต้องอาศัยรามากกว่า 1 ชนิด ระดับความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาแบบเฉพาะเจาะจงนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและระยะการพัฒนาของพืช (Otero, Ackerman and Bayman, 2002; Xu and Mu, 1990) Chen, Wang and Guo (2012) พบว่าชนิดของราที่แยกได้จากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium nobile* แตกต่างจากราที่แยกได้จากราก แต่ชนิดของราเหล่านี้คล้ายกับราที่แยกได้จากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *D. chrysanthum* การแยกราจากโปรโตคอร์มด้วยวิธี *in situ* seed baiting จะทำให้ได้ราที่มีความเฉพาะเจาะจงและมีบทบาทต่อการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มในระยะแรกมากกว่าวิธีการแยกรากรากของต้นที่สมบูรณ์แล้ว สอดคล้องกับการศึกษาของ (Khamchatra et al., 2016a) ที่พบว่าราที่แยกได้จากโปรโตคอร์มโดยวิธี *in situ* seed baiting สามารถกระตุ้นการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ดินได้ดีกว่าราที่แยกจากราก นอกจากนี้ (Zettler, Sunley and Delaney, 2000) พบว่าราที่แยกจากโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้ *Platanthera integrilabia* สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *P. integra* ได้ดีกว่าราที่แยกจากรากกล้วยไม้ชนิดนี้

เมื่อทำการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางชีววิทยาโมเลกุลของราทั้ง 7 ไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วยไม้ น้ำที่ส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของการศึกษานี้ พบว่า เป็นราในสกุล *Fusarium* *Plectosphaerella* และ *Curvularia* โดยทั้งหมดนี้เป็นราในไฟลัม Ascomycota จากการศึกษที่ผ่านมาระบุว่าราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ดินหรือกล้วยไม้อิงอาศัย ส่วนใหญ่เป็นราในไฟลัม Basidiomycota ในกลุ่ม *Rhizoctonia* และราที่มีลักษณะคล้ายกับรา *Rhizoctonia* ได้แก่ *Ceratobasidium*, *Tulasnella* และ *Sebasina* ซึ่งเป็นราในไฟลัม Basidiomycota (Rasmussen, 2002) แต่ก็มีรายงานถึงราเอนโดไฟต์หลายสกุลที่อยู่ในไฟลัม Ascomycota สามารถส่งเสริมการงอกและการพัฒนาของกล้วยไม้ เช่น *Fusarium* สามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Cypripedium* และ *Platanthera* ได้ (Vujanovic et al., 2000) Rasmussen and Rasmussen (2014) ศึกษาต้นกำเนิดและวิวัฒนาการของกล้วยไม้ พบว่าราที่มีวิวัฒนาการร่วมกับกล้วยไม้ในวงศ์ย่อย Orchidoideae คือรากลุ่ม *Rhizoctonia* แต่กล้วยไม้สกุล *Epipactis* จัดอยู่ในวงศ์ย่อย Epidendroideae เผ่า Neottieae มีวิวัฒนาการร่วมกับราเอนโดไฟต์ในกลุ่มอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากกลุ่ม *Rhizoctonia* ทั้งที่เป็นสมาชิกในไฟลัม Ascomycota และ

Basidiomycota เช่น ราในสกุล *Coprinus*, *Erythromyces*, *Mycena*, *Thelephora*, *Tomentella*, *Tricharina* และราในอันดับ Pezizales

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราที่คัดเลือกแต่ละไอโซเลตพบว่า ไม่พบการพัฒนาในระยะที่ 3 และระยะถัดไป แต่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ยังคงรักษาสภาพของโปรโตคอร์มในระยะที่ 2 ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการพัฒนาของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้จำเป็นต้องใช้เวลามากกว่า 4 เดือน ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากวงชีวิตของกล้วยไม้ที่เจริญในธรรมชาติ การผสมเกสรและติดฝักเกิดขึ้นในช่วงเดือนมีนาคม จากนั้นในช่วงเดือนพฤษภาคมที่เป็นฤดูน้ำหลาก ฝักจะแตกและปล่อยเมล็ดกระจายพันธุ์ไปตามธรรมชาติ สภาพแวดล้อมในช่วงเวลาดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ไปเป็นต้นกล้าในทันที ดังนั้นกล้วยไม้จึงอาจมีการปรับวงชีวิตให้เมล็ดคงสภาพเป็นโปรโตคอร์มในระยะแรกไว้ก่อน รอจนกระทั่งสภาพแวดล้อมเหมาะสมแล้ว จึงจะพัฒนาเป็นต้นกล้าอีกครั้ง เมื่อระดับน้ำลดลงในช่วงฤดูแล้ง เมล็ดกล้วยไม้จะพัฒนาต่อเป็นต้นกล้าและต้นสมบูรณ์ต่อไป (คุณากรนุรักษ์, 2557) ซึ่งจะสังเกตพบว่าเป็นการเจริญเติบโตของกล้วยไม้มีการเว้นระยะเวลาประมาณ 5-6 เดือน เหตุการณ์ดังกล่าวนี้อาจมีส่วนในการช่วยให้กล้วยไม้ปรับตัวเองให้มีวงชีวิตที่เหมาะสมที่สุดกับสภาพแวดล้อมและถิ่นอาศัยของตัวเอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในกล้วยไม้ *P. integrum* ที่เจริญเติบโตในพื้นที่ชุ่มน้ำ พบว่าใช้เวลาถึง 14 เดือนในการพัฒนาถึงระยะที่ 5 และพบว่าระยะเวลาการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ชนิดนี้จะคงอยู่ที่ระยะที่ 2 เป็นส่วนใหญ่ (Zettler, Sunley and Delaney, 2000) แต่ขณะที่กล้วยไม้ดินหรือกล้วยไม้อิงอาศัยชนิดอื่นที่มี การทดลองเพาะเลี้ยงร่วมกับราแล้ว พบว่าสามารถพัฒนาถึงระยะที่ 5 โดยใช้เวลาไม่นาน เช่น กล้วยไม้อิงอาศัย *D. nobile* ใช้เวลา 11 สัปดาห์ในการพัฒนาจนถึงระยะที่ 5 (Tan and al., 2014) จะเห็นได้ว่าระยะเวลาการพัฒนาจากโปรโตคอร์มไปเป็นต้นสมบูรณ์นั้น ขึ้นกับชนิดของกล้วยไม้และชนิดของรา นอกจากนี้ ปัจจัยจากสภาพแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ และความชื้นยังมีผลต่อการมีชีวิตของเมล็ด รวมทั้งการเจริญและการมีชีวิตรอดของรา ล้วนส่งผลต่ออัตราการงอกของเมล็ดและพัฒนาของโปรโตคอร์ม (Shao et al., 2017) สาเหตุอีกประการหนึ่งที่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ยังไม่พัฒนาต่อในระยะถัดไป อาจเป็นไปได้ว่าสภาวะบางอย่างในงานเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม เช่น ความชื้นต่ำเกินไป หรือปริมาณสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงราเริ่มลดลงและไม่เพียงพอต่อการส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มในระยะถัดไป ดังนั้นการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราในงานเพาะเลี้ยงเป็นสิ่งสำคัญที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ไม่ว่าจะเป็นการปรับปริมาณความชื้นในงานเพาะเลี้ยงให้สอดคล้องกับสภาพธรรมชาติที่

กล้วยไม้น้ำเจริญเติบโตอยู่ อีกทั้งหากต้องมีการเพาะเลี้ยงในระยะเวลาที่นานขึ้น ควรมีการเปลี่ยนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นระยะ ๆ ทั้งนี้ เพื่อให้เอื้อต่อการเจริญของราที่จะช่วยส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ไปเป็นต้นสมบูรณ์ได้

จากการศึกษานี้พบว่าราไอโซเลต MSR07 MSR24 MSR34 และ MSP01 เป็นราในสกุล *Fusarium* ซึ่งราทั้ง 4 ไอโซเลตนี้สามารถกระตุ้นการงอกและการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ได้ แม้จะทราบกันดีว่า ราสกุล *Fusarium* เป็นราก่อโรคและราเอนโดไฟต์ในพืชหลายชนิดรวมทั้งในกล้วยไม้ (Latiffah et al., 2009) แต่ก็มีรายงานว่า ราในสกุลนี้สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้บางชนิด เช่น รา *F. oxysporum* ซึ่งพบว่าเป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ *Epidendrum stangeanum* (Richardson, Peterson and Currah, 1992) อ้างใน (Arditti and Pridgeon, 1997) และในกล้วยไม้ *Cypripedium* และกล้วยไม้ *Plantanthera* (X. Ma et al., 2015) จากการศึกษาของ (Redman, Dunigan and Rodriguez, 2001) ได้กล่าวถึงบทบาทของราชนิดหนึ่งหนึ่งในพืชอาศัยแต่ละชนิด จะขึ้นอยู่กับสรีรวิทยาของพืชอาศัยชนิดนั้น สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่า *F. oxysporum* เป็นราไมคอร์ไรซาที่สามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้พัฒนาจนถึงระยะที่ 2 ได้ เช่นเดียวกับรายงานที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานของ (Sufaati, Agustini and Suharno, 2016) ที่ศึกษาพบว่า รา *F. solani* เป็นราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ดิน *Phaius tankervilleae* และ *Dendrobium lancifolium* ของประเทศอินโดนีเซีย สอดคล้องกับผลการศึกษานี้ที่ รา *F. solani* ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ น้ำ สามารถกระตุ้นการงอกและการพัฒนาของเมล็ดได้ถึงระยะที่ 2 ภายในระยะเวลา 4 เดือน แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์หนึ่งชนิดนี้ได้หลายบทบาทขึ้นกับพืชอาศัยและช่วงเวลาที่เราสัมพันธ์กันทางนิเวศวิทยา

นอกจากนี้ จากผลการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า รา *C. lunata* สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ได้ถึงระยะที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Salifah et al., 2011) ได้รายงานว่า ราสกุล *Cucularia* ส่งเสริมการงอกของกล้วยไม้ *Grammatophyllum speciosum* ซึ่ง *C. lunata* แม้โดยทั่วไปจะเป็นราก่อโรคในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น ก่อให้เกิดโรคไหม้ที่กลีบดอกในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* (Daly, Condé and Duff, 2013; Kamjaipai, 1983) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาสังเกตพบเส้นใยของรา *C. lunata* เจริญปกคลุมเมล็ดและโปรโตคอร์มหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือนแสดงให้เห็นถึงโอกาสที่ราดังกล่าวจะเปลี่ยนบทบาทไปเป็นเชื้อก่อโรคได้ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการที่เส้นใยของราดังกล่าวเจริญปกคลุมนั้นมาจากปริมาณของสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ OMA ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่อาจลดต่ำลงเมื่อ

เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Beyrle et al., 1995) ที่พบว่าการเกิดสภาวะความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้เป็นผลมาจากปริมาณสารอาหารที่เราได้รับ โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Anacamptis morio* จะเกิดไมคอร์ไรซาอย่างสมบูรณ์ก็ต่อเมื่อสารอาหารนั้นมีปริมาณไนโตรเจนต่ำและคาร์โบไฮเดรตสูง ถ้าในสภาวะที่ธาตุคาร์บอนและไนโตรเจนสูง โปรโตคอร์มของกล้วยไม้จะสร้างสารประกอบฟีนอลิกป้องกันไม่ให้รา *Rhizoctonia* เข้ามาอาศัยอยู่ในเซลล์ ในภาวะที่คาร์โบไฮเดรตมีปริมาณต่ำไม่ว่าปริมาณของธาตุไนโตรเจนจะสูงหรือต่ำก็ตามเราจะเปลี่ยนแปลงบทบาทไปเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคกับพืชได้ทันที และโปรโตคอร์มจะถูกทำลาย นอกจากนี้ (Dijk and Eck, 1995) สังเกตพบว่าปริมาณไนโตรเจนที่สูงจะส่งผลในเชิงลบต่อโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา *Ceratohiza* ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง อีกทั้งยังสอดคล้องกับผลที่ศึกษาในแหล่งอาศัยตามธรรมชาติที่พบว่า เมื่อปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมสูงเกินไป จะส่งผลเชิงลบต่อกล้วยไม้ *Dactylorhiza majalis* (Dijk and Olff, 1994) เป็นที่ทราบกันดีว่า *Plectosphaerella cucumerina* เป็นราสาเหตุก่อโรคในพืชหลายชนิด ก่อให้เกิดโรคผลเน่า รากเน่าและโคนเน่า โดยพบมากในองุ่นและเมลอน (Watanabe, 1979; Gennari, Mirotti and Sportelli, 1999) แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่า ราดังกล่าวสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ น้ำได้ถึงระยะที่ 2 แม้ว่าจะมีอัตราของดัชนีการงอกและการพัฒนาที่ไม่สูงมากก็ตาม นับเป็นครั้งแรกที่พบว่ารา *P. cucumerina* เป็นราเอนโดไฟต์ที่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ น้ำได้

ราที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้แม้ยังไม่อาจกล่าวได้ชัดเจนว่าเป็นไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ได้ สมบูรณ์ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่พบการพัฒนาของโปรโตคอร์มในระยะที่ 3-5 แต่ราทั้ง 7 ไอโซเลตก็มีลักษณะและคุณสมบัติบางประการที่บ่งชี้ถึงลักษณะของราไมคอร์ไรซา ได้แก่ ลักษณะขดของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะคล้ายฟิโลตอน์ที่พบในเซลล์พืช ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ (Peterson and Farquhar, 1994; Smith and Read, 2010) รวมถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เมล็ดงอกและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มในระยะที่ 2 ดังนั้นอาจต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราให้นานขึ้น ร่วมกับการหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองแยกและคัดเลือกรากเอนโดไฟต์จากรากและโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Epipactis flava* Seidenf. ซึ่งเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของประเทศไทยสามารถแยกได้ทั้งสิ้น 50 ไอโซเลต เป็นรากลากกล้วยไม้ (MSR) 35 ไอโซเลต และโปรโตคอร์ม (MSP) 15 ไอโซเลต โดยรา 7 ไอโซเลต ได้แก่ MSR07 MSR24 MSR34 MSP01 MSP02 MSP04 และ MSP13 สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat Meal Agar ได้มากกว่าชุดควบคุมในระยะเวลา 30 วัน หลังจากใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดและพัฒนาของโปรโตคอร์มแบบพึ่งพาอาศัยในหลอดทดลองพบว่า ดัชนีของอัตราการงอก (Germination rate index (GRI)) มีค่าสูงสุดที่ไอโซเลต MSP13 และ MSP01 (148.14 ± 6.12 และ 139.41 ± 1.30) รองลงมาคือไอโซเลต MSR34, MSR24 และ MSR07 (109.77 ± 3.26 , 104.13 ± 0.90 และ 101.37 ± 5.41) ถัดจากนั้นคือ MSP02 (85.38 ± 4.17) และน้อยที่สุดที่ไอโซเลต MSP04 (56.62 ± 7.36) และดัชนีของอัตราการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (developmental rate index (DRI)) พบว่าไอโซเลต MSP01 ให้ค่า DRI สูงที่สุด (33.2 ± 1.59) รองลงมาคือไอโซเลต MSR34 (21.68 ± 2.52) และ MSP13, MSR07, MSR24 และ MSP02 ที่มีค่า DRI เท่ากับ 8.49 ± 2.08 , 6.85 ± 1.85 , 3.74 ± 0.63 และ 3.58 ± 1.58 ตามลำดับ จากการทดสอบดังกล่าวพบว่าราทุกไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วยไม้สามารถส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มได้ถึงระยะที่ 2 ยกเว้นไอโซเลต MSP04

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการระบุชนิดด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS พบว่า ราไอโซเลต MSR34 และ MSP01 คือ *Fusarium oxysporum* ไอโซเลต MSR07 และ MSR24 คือ *F. solani* ราไอโซเลต MSP02 และ MSP04 คือ *Plectosphaerella cucumerina* และไอโซเลต MSP13 คือ *Curvularia lunata* จากการศึกษาในครั้งนี้ แม้ว่าจะยังไม่พบการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ถึงระยะที่ 5 ภายในเวลาการเพาะเลี้ยง 4 เดือน แต่จากความสามารถของราที่กระตุ้นให้เมล็ดงอกและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม รวมทั้งการตรวจพบลักษณะของขดเส้นใยที่คล้ายพิโลตอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ จึงเป็นไปได้ว่าราที่แยกได้นั้นมีแนวโน้มที่จะเป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ ข้อมูลที่ได้ครั้งนี้จะเป็นความรู้พื้นฐานสำคัญที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนกล้วยไม้ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

- อบฉันท ไทยทอง. 2549. กล้วยไม้เมืองไทย. กรุงเทพมหานคร: บ้านและสวน.
- บวร คุณากรนุรักษ์. 2557. ชีววิทยาและการขยายพันธุ์กล้วยไม้หน้า *Epipactis flava* Seidenf. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยรัตนนคร.
- สลิล สิริธิดัจฉธรรม. 2549. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. กรุงเทพมหานคร บ้านและสวน.
- Aewsakul, N., Maneesorn, D., Serivichyaswat, P., Taluengjit, A. and Nontachaiyapoom, S. 2013. *Ex vitro* symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. Scientia Horticulturae 160: 238-242.
- Alexander, C. and Hadley, G. 1984. The effect of mycorrhizal infection of *Goodyera repens* and its control by fungicide. New Phytologist 97: 391-400.
- Alghamdi, S. A. 2017. Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. Saudi Journal of Biological Sciences (in press).
- Arditti, J. and Pridgeon, A. M. 1997. Orchid Biology : Reviews and Perspectives. Netherland: Kluwer Academic Press.
- Athman, S. Y., Dubois, T., Coyne, D., Gold, C. S., Labuschagne, N. and Viljoen, A. 2007. Effect of endophytic *Fusarium oxysporum* on root penetration and reproduction of *Radopholus similis* in tissue culture-derived banana (*Musa* spp.) plants. Nematology 9(5): 599-607.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Saint Paul, Minnesota: APS Press.
- 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 Phytologist 152: 511-520.
- Bernard, N. 1904. Le champignon endophyte des orchidées. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences 138: 828-830.
- Beyrle, H. F., Smith, S. E., Peterson, R. L. and Franco, C. M. M. 1995. Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. Canadian Journal of Botany 73: 1128-1140.

- 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. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 271: 1799-1806.
- Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K. and Sivasithamparam, K. 2007. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. Mycological Research 111: 51-61.
- Bougoure, J. J., Bougoure, D. S., Cairney, J. W. and Dearnaley, J. D. 2005. ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. Mycological Research 109: 452-460.
- Brundrett, A. S., Batty, A. L., Dixon, K. W. and Sivasithamparam, K. 2003. Development of *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. Mycological Research 107: 1210-1220.
- Burgeff, H. 1936. Samenkeimung der Orchideen. Germany: Gustav Fischer, Jena.
- Buscot, F., Munch, J. C., Charcosset, J. Y., Gardes, M., Nehls, U. and Hampp, R. 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. FEMS Microbiology Reviews 24: 601-614.
- Cameron, D. D., Johnson, I., Leake, J. R. and Read, D. J. 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. New Phytologist 180: 176-184.
- 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 171: 405-416.
- Chen, J., Wang, H. and Guo, S. X. 2012. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). Mycorrhiza 22: 297-307.
- Chen, X., Gale, S. W. and Cribb, P. J. 2009. Apostasioideae. In Z. Y. Wu, P. H. Raven, & D. Y. Hong (Eds.), Flora of China (Vol. 25, pp. 20-21). Beijing and St. Louis: Science Press.

- Chugh, S., Guha, S. and Rao, I. U. 2009. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae 122: 507-520.
- Clements, M. A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. Lindleyana 3: 73-86.
- Currah, R. S. and Sherburne, R. 1992. Septal ultrastructure of some endophytes from boreal orchid mycorrhizas. Mycological Research 96: 583-587.
- Daly, A., Condé, B. and Duff, J. 2013. Orchid disease in the Northern territory. Australia: Northern Territory Government.
- Dearnaley, J. D. W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. Mycorrhiza 17: 475-486.
- Dearnaley, J. D. W., Martos, F. and Selosse, M. A. 2012. Fungal Associations. In B. Hock (Ed.), The Mycota IX. Heidelberg: Springer.
- Dijk, E. and Eck, N. D. 1995. Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species. Canadian Journal of Botany 73: 1203-1211.
- Dijk, E. and Olff, H. 1994. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on field performance of *Dactylorhiza majalis*. Acta Botanica Neerlandica 43: 383-392.
- Dressler, R. L. 1993. Phylogenetic and Classification of the Orchid Family. United State: Cambridge University.
- Gale, S. W., Fischer, G., Cribb, P. J. and Fay, F. F. 2018. Orchid conservation : bridging the gap between science and practice. Botanical Journal of the Linnean Society 186: 425-434.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113-118.
- Gebauer, G. and Meyer, M. 2003. ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. New Phytologist 160: 209-223.
- Gehlert, R. and Kindl, H. 1991. Induced formation of dihydrophenanthrenes and bibenzyl synthase upon destruction of orchid mycorrhiza. Phytochemistry 30: 457-460.

- Gennari, S., Mirotti, A. and Sportelli, M. 1999. Assessment of *Monosporascus cannonballus* from watermelon plants. Informatore Fitopatologico 49: 38-40.
- Govaerts, et al. 2017. World checklist of Orchidaceae.
- Hadley, G. 1975. Organization and fine structure of orchid mycorrhiza. In F. E. Sanders, B. Mosse, & P. B. Tinker (Eds.), Endomycorrhizas (pp. 335-351). New York: Academic Press.
- Hadley, G. and Williamson, B. 1971. Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. New Phytologist 70: 445-455.
- Harvais, G. and Hadley, G. 1967. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. New Phytologist 66: 217-230.
- Hou, X. Q. and Guo, S. X. 2009. Interaction between a dark septate endophytic isolate from *Dendrobium* sp. and roots of *D. nobile* seedlings. Journal of Integrative Plant Biology 51: 374-381.
- Hsiao, Y.-Y. and al., e. 2011. Research on orchid biology and biotechnology. Plant and Cell Physiology 52: 1467-1486.
- Huynh, T. T., McLean, C. B., Coates, F. and Lawrie, A. C. 2004. Effect of developmental stage and peloton morphology on success in isolation of mycorrhizal fungi in *Caladenia formosa* (Orchidaceae). Australian Journal of Botany 52: 231-241.
- Johnson, T. R., Stewart, S. L., Dutra, 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, Tissue and Organ Culture 90: 313-323.
- Kamjaipai, K. 1983. Diseases and pest of orchids. Bangkok: Bangkok Flower Center Co. Ltd.
- Khamchatra, N. M., Dixon, K., Chayamarit, K., Apisitwanich, S. and Tantiwivat, S. 2016a. Using *in situ* seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedericksianum* Rchb. f.(Orchidaceae). Agriculture and Natural Resources 50: 8-

- Khamchatra, N., Dixon, K. W., Tantiwivat, S. and Piapukiew, J. 2016b. Symbiotic seed germination of an endangered epiphytic slipper orchid, *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein. from Thailand. South African Journal of Botany 104: 76-81.
- Krishnamurthy, K. V. 1988. Methods in plant histochemistry. Tamil Nadu, India: S Viswanathan Printers and Publishers.
- Kuga, Y., Sakamoto, N. and Yurimoto, H. 2014. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. New Phytologist 202: 594-605.
- Lan, J., Xu, J. and Li, J. 2000. Study on the infecting process of *Mycena osmundicola* on *Gastrodia elata* by autoradiography. Acta Mycologica Sinica 15: 197-200.
- Latiffah, Z., Nur-Hayati, M. Z., Baharuddin, S. and Maziah, Z. 2009. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with root rot and stem rot of *Dendrobium*. Asian Journal of Plant Pathology 3: 14-21.
- Leadley, P. et al. 2010. Biodiversity scenarios : Projections of 2nd century change in biodiversity and associated ecosystem services. In The Secretariat of the Convention on Biological Diversity (pp. 1-132). Montreal: Technical Series.
- Ma, M., Tan, T. K. and Wong, S. M. 2003. Identification and molecular phylogeny of Epulorhiza isolates from tropical orchids. Mycological Research 107: 1041-1049.
- Ma, X., Kang, J., Nonachaiyapoom, S., Wen, T. and Hyde, K. D. 2015. Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. Current Science 109: 36-51.
- Mollison, J. E. 1943. *Goodyera repens* and its endophyte. Transactions of the Botanical Society of Edinburgh 33: 391-403.
- Moore, R. T. 1987. The genera of Rhizoctonia-like fungi : Ascorhizoctonia, Ceratorhiza Gen-Nov, Epulorhiza Gen-Nov, Moniliopsis, and Rhizoctonia. Mycotaxon 29: 91-99.
- Nikabadi, S., Bunn, E., Stevens, J., Newman, B., Turner, S. R. and Dixon, K. W. 2014. Germination responses of four native terrestrial orchids from south-west Western Australia to temperature and light treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 118: 559-569.
- Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S. and Manoch, L. 2011. Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume. and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. Scientia Horticulturae 130: 303-308.

- Otero, J. T., Ackerman, J. D. and Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. American Journal of Botany 89: 1852-1858.
- 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. Evolutionary Ecology 19: 29-43.
- Pant, B., Shah, S., Shrestha, R., Pandey, S. and Joshi, P. R. 2017. An Overview on Orchid Endophytes. In Mycorrhiza-Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration (pp. 503-524). Cham: Springer.
- Papenfus, H. B., Naidoo, D., Posta, M., Finnie, J. F. and Van Staden, J. 2015. The effects of smoke derivatives on in vitro seed germination and development of the leopard orchid *Ansellia africana*. Plant Biology 18: 289-294.
- Parras-Alfaro, A. and Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of Vanilla: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. Journal Mycologia 99: 510-525.
- Pedersen, H., Watthana, S. and Srimuang, K. O. 2013. Orchids in the torrent: on the circumscription, conservation and rheophytic habit of *Epipactis flava*. Botanical Journal of the Linnean Society 172: 358-370.
- Pedersen, H. A. et al. 2014. . Orchidaceae 2 (Epidendroideae p.p. Neottieae, Tropidieae, Nervilieae, Gastrodieae, Thaieae, Calypsoeae, Arethuseae, Collabieae, Cymbidieae). In T. Santisuk & H. Balslev (Eds.), Flora of Thailand (Vol. 12, pp. 303-670). Bangkok: The Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation.
- Pereira, H. M. et al. 2010. Scenarios for global biodiversity in the 21st century. Science 330: 1496-1501.
- 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*. Canadian Journal of Botany 68: 1117-1125.
- Peterson, R. L. and Farquhar, M. L. 1994. Mycorrhizas—integrated development between roots and fungi. Mycologia 86: 311-326.
- Rabinowitz, D., Cairns, S. and Dillon, T. 1986. Seven forms of rarity and their frequency in the flora of the British Isles. In E. Soule (Ed.), Conservation biology: The Science of Scarcity and Diversity. United States: Sinauer Associates.
- Ramsay, R. R. 1986. Patterns of infection and endophytes associated with Western Australian orchids. Lindleyana 1: 203-214.
- Rankou, H. and Averyanov, L. 2015. *Paphiopedilum parishii*. The IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T1935.12A2240580.en>.
- Rasmussen, H., Andersen, T. F. and Johansen, B. 1990. Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. Plant, Cell & Environment 13: 171-177.
- Rasmussen, H. N. 1995. Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Rasmussen, H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. Plant and Soil 244: 149-163.
- Rasmussen, H. N. and Rasmussen, F. N. 2014. Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 175: 313-327.
- Rasmussen, H. N. and Whigham, D. F. 1993. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. American Journal of Botany 80: 1374-1378.
- Redman, R., Dunigan, D. D. and Rodriguez, R. J. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? New Phytologist 151: 705-716.

- Richardson, K. A., Peterson, R. L. and Currah, R. S. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). Canadian Journal of Botany 70: 291-300.
- Rocchio, J., March, M. and Anderson, D. G. 2006. *Epipactis gigantea* Dougl. ex Hook. (stream orchid): a technical conservation assessment. Retrieved from <http://www.fs.fed.us/r2/projects/scp/assessments/epipactisgigantea.pdf>
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- Salifah, H. A. B., Muskhazli, M., Rusea, G. and Nithiyaa, P. 2011. Variation in mycorrhizal specificity for *in vitro* symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume. Sains Malaysiana 40: 451-455.
- Santisuk, T., Chayamarit, K., Pooma, R. and Suddee, S. 2006. Thailand red data: Plants. Bangkok: Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (ONEP).
- Sebastián, F., Vanesa, S., Eduardo, F., Graciela, T. and Silvana, S. 2014. Symbiotic seed germination and protocorm development of *Aa achalensis* Schltr., a terrestrial orchid endemic from Argentina. Mycorrhiza 24: 35-43.
- Selosse, M. A., Minasiewicz, J. and Boullard, B. 2017. An annotated translation of Noël Bernard's 1899 article 'On the germination of *Neottia nidus-avis*'. Mycorrhiza 27: 611-618.
- Senthilkumar, S. and Krishnamurthy, K. V. 1998. A cytochemical study on the mycorrhizae of *Spathoglottis plicata*. Biologia Plantarum 41: 111-119.
- Serrigny, J. and Dexheimer, J. 1985. Etude ultrastructurale des endomycorhizes d'une orchidee tropicale: *Epidendrum ibaguense* II. Localisation des ATPases et des nucleosides dephosphatases. Cytologia 50: 779-788.
- Shao, S. C., Burgess, K. S., Cruse-Sanders, J. M., Liu, Q., Fan, X. L., Huang, H., 2017. Using *in situ* symbiotic seed germination to restore over-collected medicinal orchids in Southwest China. Frontiers in Plant Science 8: 1-10.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 2010. Mycorrhizal Symbiosis. In. Retrieved from <https://books.google.co.th/books?hl=th&lr=&id=qLciOJaG0C4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=mycorrhizal+symbiosis+smith+read&ots=zqsUjXVGoJ&sig=uEIV4RbmAczZG>

DUelyoFNw0tUs&redir_esc=y#v=onepage&q=mycorrhizal%20symbiosis%20smith%20read&f=false

- Stamatakis, A. 2006. Phylogenetic Models of Rate Heterogeneity: A High Performance Computing Perspective. Paper presented at the Proceedings 20th IEEE International Parallel & Distributed Processing Symposium.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30: 1312-1313.
- Stewart, S. and Kane, M. E. 2007. Symbiotic seed germination and evidence for in vitro mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 43: 178-186.
- Stewart, S. L. and Kane, M. E. 2006. Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell 86: 159-167.
- Stewart, S. L. and Zettler, L. W. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. Aquatic Botany 72: 25-35.
- Stewart, S. L., Zettler, L. W. and Minso, J. 2003. Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. Selbynan 24: 64-70.
- Sufaati, S., Agustini, V. and Suharno, S. 2016. *Fusarium* as endophyte of some terrestrial orchid from Papua, Indonesia. Biodiversitas Journal of Biological Diversity 17: 366-371.
- Tan, X. M. and al., e. 2014. *In vitro* seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.). Scientia Horticulturae 165: 62-68.
- Van Waes, J. and Debergh, P. C. 1986. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. Physiologia Plantarum 66: 435-442.

- Vu, T., Hauschild, R. and Sikora, R. A. 2006. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. Nematology 86: 847-852.
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabé, D. and Thibeault, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. Annals of Botany 86: 79-86.
- Wang, H., Fang, H., Wang, Y., Duan., L. and Guo, S. 2011. *In situ* seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl. : the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae). World Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 2051-2059.
- Wang, Q. X., Yan, N., Ji, D. G., Li, S. Y. and Hu, H. 2013. *In vitro* growth and carbon utilization of the green-leaved orchid *Dendrobium officinale* are promoted by mycorrhizal associations. Botanical Studies 54: 23-33.
- Warcup, J. H. and Talbot, P. H. B. 1967. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. New Phytologist 66: 631-641.
- Watanabe, T. 1979. *Monosporascus cannonballus*, an ascomycete from wilt-ed melon roots undescribed in Japan. Annual Phytopathology Society of Japan 51: 272-275.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. and Taylor, J. L. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18(1): 315-322.
- Williamson, B. and Hadley, G. 1970. Penetration and infection of orchid protocorms by *Thanatephorus cucumeris* and other *Rhizoctonia* isolates. Phytopathology 60: 1092-1096.
- Withner, C. L., Nelson, P. K. and Wejksnora, P. J. 1974. The anatomy of orchids. In C. L. Withner (Ed.), The Orchids: Scientific Studies (pp. 267-347). New York: Wiley.
- Xu, J. T. and Mu, C. 1990. The relation between growth of *Gastrodia elata* protocorms and fungi. Acta Botanica Sinica 32: 26-31.
- Yam, T. W. and Arditti, J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. Plant Biotechnology Reports 3: 1-56.

- Yoder, J. A., Zettler, L. W. and Stewart, S. L. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. Plant Science 156: 145-150.
- Zettler, L. W. 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: Techniques and perspectives. Selbyana 18: 188-194.
- Zettler, L. W. and Piskin, K. A. 2011. Mycorrhizal fungi from protocorms, seedlings and mature plants of the eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley: A comprehensive list to augment conservation. The American Midland Naturalist 166: 29-39.
- Zettler, L. W., Sunley, J. A. and Delaney, T. W. 2000. Symbiotic Seed Germination of an Orchid in Decline (*Platanthera integra*) from the Green Swamp, North Carolina. Southern Appalachian Botanical Society 65: 207-212.
- Zhang, L. C., Chen, J., Lu, Y. L., Gao, C. and Guo, S. X. 2012. *Mycena* sp., a mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale*. Mycological Progress 11: 397-401.
- Zhou, Y. J., Yang, F. S., Song, X. Q., Zhu, G. P. and Hu, M. J. 2009. Effects of mycorrhizal fungi on seedling's growth and photosynthetic capability of *Dendrobium sinense*, endemic to Hainan. North Horticulture 12: 11-15.
- Zhu, G. S., Yu, Z. N., Gui, Y. and Liu, Z. Y. 2008. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. Fungal Diversity 33: 123-137.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร Oat Meal Agar (OMA)

ข้าวโอ๊ตบดหยาบ	5.0	กรัม
วุ้น	7.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.0 ± 0.2

ต้มข้าวโอ๊ตในน้ำกลั่นโดยต้มให้เดือดประมาณ 10-15 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงไปให้อาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเพาะเลี้ยง Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200.0	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นโดยต้มให้เดือดประมาณ 10-15 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงไปให้อาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1. ทรಿಸบัฟเฟอร์ (Tris buffer) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

ทริส เบส (Tris base)	121.0 กรัม
น้ำกลั่น	800.0 มิลลิลิตร

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

2. EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA	186.10 กรัม
น้ำกลั่น	800.00 มิลลิลิตร

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

3. Washing buffer

โพลีไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone (PVP))	2.00 กรัม
กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)	1.76 กรัม
ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1โมลาร์ 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
เอทิลีนไดอะมีนเทตระเอซิดิกเอซิด (Ethylene Diamine Tetra-acetic-Acid (EDTA)) ความเข้มข้น 1M pH 8.0	8.00	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	16.36	กรัม
2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol)	4.00	มิลลิลิตร
เติมน้ำปราศจากประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง		

5. 1% Agarose gel

อะกาโรส (Agarose)	1.00	กรัม
0.5X TBE	100.00	มิลลิลิตร

6. 10X Tris-boric acid EDTA (10X TBE)

Tris (Hydroxymethyl) amino methane	54.00	กรัม
EDTA	4.64	กรัม
กรดบอริก (Boric Acid)	27.50	กรัม
เติมน้ำปราศจากประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง		

ภาคผนวก ค

ผลเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์ัม

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ัมกล้วยไม้ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับรากัดเลือกและชุดควบคุมบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 1 เดือน

ไอโซเลต	ระยะการพัฒนาของโปรโตคอร์ัม (%)				เปอร์เซ็นต์การงอก (%)
	0	1	2	3	
MSR07	63.35 ± 7.04 ^c	36.65 ± 7.04 ^d	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00	36.65 ± 7.04 ^d
MSR24	46.68 ± 0.47 ^e	53.32 ± 0.47 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00	53.32 ± 0.47 ^c
MSR34	58.34 ± 7.38 ^{cd}	39.24 ± 5.65 ^{cd}	2.42 ± 2.50 ^b	0.00 ± 0.00	41.66 ± 7.38 ^d
MSP01	36.94 ± 1.08 ^f	48.57 ± 1.67 ^{bc}	14.49 ± 1.95 ^a	0.00 ± 0.00	63.06 ± 1.08 ^b
MSP02	53.33 ± 6.94 ^{de}	45.78 ± 5.41 ^{bcd}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00	46.67 ± 6.94 ^{cd}
MSP04	77.69 ± 5.58 ^b	22.31 ± 5.58 ^e	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00	22.31 ± 5.58 ^e
MSP13	18.21 ± 6.68 ^g	79.26 ± 8.96 ^a	2.53 ± 2.30 ^b	0.00 ± 0.00	81.79 ± 6.68 ^a
ชุดควบคุม (Asymbiotic)	97.90 ± 1.84 ^a	2.10 ± 1.84 ^f	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00	2.10 ± 1.84 ^f

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับรากคัดเลือกและชุดควบคุมบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 2 เดือน

ไอโซเลต	ระยะการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (%)				เปอร์เซ็นต์การงอก (%)
	0	1	2	3	
MSR07	66.02 ± 6.93 ^{bc}	29.21 ± 3.05 ^c	4.76 ± 4.84 ^b	0.00 ± 0.00	33.98 ± 6.33 ^{cd}
MSR24	57.21 ± 2.14 ^c	41.53 ± 2.78 ^b	1.26 ± 1.25 ^b	0.00 ± 0.00	42.79 ± 2.41 ^c
MSR34	29.98 ± 3.49 ^d	51.54 ± 7.48 ^b	18.48 ± 4.00 ^b	0.00 ± 0.00	70.02 ± 3.49 ^b
MSP01	37.29 ± 1.85 ^d	46.82 ± 2.29 ^b	15.90 ± 1.11 ^a	0.00 ± 0.00	62.71 ± 1.85 ^b
MSP02	67.83 ± 8.19 ^b	29.73 ± 8.45 ^c	2.44 ± 2.21 ^b	0.00 ± 0.00	32.17 ± 8.19 ^d
MSP04	71.30 ± 4.85 ^b	28.70 ± 4.85 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00	28.70 ± 4.85 ^d
MSP13	19.36 ± 7.79 ^e	75.85 ± 10.28 ^a	4.80 ± 3.59 ^b	0.00 ± 0.00	80.64 ± 7.79 ^a
ชุดควบคุม (Asymbiotic)	96.90 ± 2.72 ^a	3.10 ± 2.72 ^d	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00	3.10 ± 2.72 ^e

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับรากคัดเลือกและชุดควบคุมบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน

ไอโซเลต	ระยะการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (%)				เปอร์เซ็นต์การงอก (%)
	0	1	2	3	
MSR07	18.62 ± 4.95 ^d	74.93 ± 3.12 ^{ac}	6.45 ± 3.62 ^c	0.00 ± 0.00	81.38 ± 4.95 ^b
MSR24	49.84 ± 0.99 ^c	44.86 ± 2.35 ^{bc}	5.29 ± 1.42 ^c	0.00 ± 0.00	50.16 ± 0.99 ^c
MSR34	43.42 ± 2.23 ^c	41.02 ± 3.67 ^{bc}	15.57 ± 1.46 ^a	0.00 ± 0.00	56.58 ± 2.23 ^c
MSP01	22.59 ± 3.99 ^d	61.39 ± 2.67 ^{ac}	16.02 ± 1.42 ^a	0.00 ± 0.00	77.41 ± 3.99 ^b
MSP02	61.08 ± 14.14 ^{abc}	36.61 ± 15.92 ^{abcd}	2.30 ± 2.03 ^c	0.00 ± 0.00	38.92 ± 14.14 ^{cd}
MSP04	65.67 ± 9.52 ^{abc}	34.33 ± 9.52 ^{abcd}	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00	34.33 ± 9.52 ^{bc}
MSP13	21.92 ± 0.95 ^{abc}	67.41 ± 2.06 ^{ac}	10.67 ± 2.74 ^b	0.00 ± 0.00	78.08 ± 0.95 ^b
ชุดควบคุม (Asymbiotic)	96.90 ± 2.72 ^a	3.10 ± 2.72 ^{cd}	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00	3.10 ± 2.72 ^e

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับรากคัดเลือกและชุดควบคุมบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน

ไอโซเลต	ระยะการพัฒนาของโปรโตคอร์ม (%)				เปอร์เซ็นต์การงอก (%)
	0	1	2	3	
MSR07	17.54 ± 6.81 ^{cd}	73.18 ± 7.59 ^a	9.28 ± 4.03 ^b	0.00 ± 0.00	82.46 ± 6.81 ^{cd}
MSR24	49.19 ± 1.38 ^{cd}	45.42 ± 2.45 ^{bc}	5.39 ± 1.40 ^{bc}	0.00 ± 0.00	50.81 ± 1.38 ^{cd}
MSR34	43.04 ± 1.91 ^c	37.62 ± 6.86 ^{cd}	19.34 ± 4.98 ^a	0.00 ± 0.00	56.96 ± 1.91 ^c
MSP01	23.24 ± 1.85 ^{bc}	55.07 ± 3.50 ^b	21.70 ± 2.61 ^a	0.00 ± 0.00	76.76 ± 1.85 ^{bc}
MSP02	61.39 ± 2.81 ^b	35.82 ± 5.29 ^{cd}	2.79 ± 2.55 ^c	0.00 ± 0.00	38.61 ± 2.81 ^b
MSP04	65.88 ± 8.84 ^b	34.12 ± 8.84 ^d	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	34.12 ± 8.84 ^b
MSP13	-	-	-	-	-
ชุดควบคุม (Asymbiotic)	96.90 ± 2.72 ^a	3.10 ± 2.72 ^e	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.10 ± 2.72 ^a

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดย Oneway- ANOVA ของเปอร์เซ็นต์ การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ได้ออกจากเทคนิค *in situ* seed baiting ในระยะที่ 0, 1 และ 2 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ระยะที่ 0	Between Groups	1684.250	3	561.417	4.083	0.050
	Within Groups	1100.000	8	137.500		
	Total	2784.250	11			
ระยะที่ 1	Between Groups	17180.333	3	5726.778	2.966	0.097
	Within Groups	15447.333	8	1930.917		
	Total	32627.667	11			
ระยะที่ 2	Between Groups	33124.250	3	11041.417	9.345	0.005
	Within Groups	9452.667	8	1181.583		
	Total	42576.917	11			

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระยะที่ 0

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	3	33.00	
3	3	33.67	
2	3	48.67	48.67
1	3		61.67
Sig.		0.155	.212

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดย Oneway- ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ น้ำที่ได้จากเทคนิค *in situ* seed baiting ในระยะที่ 0, 1 และ 2 เมื่อที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน (ต่อ)

ระยะที่ 1

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	3	102.33	
4	3	110.00	
2	3	151.00	151.00
1	3		197.33
Sig.		0.229	0.233

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000
b.

ระยะที่ 2

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	3	88.00	
4	3	101.00	
2	3	140.00	
1	3		222.67
Sig.		0.113	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 0 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 1 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12510.036	7	1787.148	62.288	0.000
Within Groups	459.066	16	28.692		
Total	12969.102	23			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.390	7	16	0.071

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
MSP13	3	18.2131						
MSP01	3		36.9433					
MSR24	3			46.6833				
MSP02	3			53.3267	53.3267			
MSR34	3				58.3400	58.3400		
MSR07	3					63.5033		
MSP04	3						77.6933	
ชุดควบคุม	3							97.8967
Sig.		1.000	1.000	.148	.269	.255	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 1 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10739.782	7	1534.255	53.707	0.000
Within Groups	457.074	16	28.567		
Total	11196.856	23			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.878	7	16	0.140

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
ชุดควบคุม	3	2.1033					
MSP04	3		22.3067				
MSR07	3			36.6433			
MSR34	3			39.2433	39.2433		
MSP02	3			45.7833	45.7833	45.7833	
MSP01	3				48.5700	48.5700	
MSR24	3					53.3167	
MSP13	3						79.2578
Sig.		1.000	1.000	0.063	0.059	0.120	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 1 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	288.739	2	144.369	28.213	0.001
Within Groups	30.703	6	5.117		
Total	319.442	8			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0.044	2	6	0.957

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
MSR34	3	2.4167	
MSP13	3	2.5267	
MSP01	3		14.4867
Sig.		0.954	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 1 เดือน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
เดือนที่ 1	Between Groups	12488.784	7	1784.112	66.710	.000
	Within Groups	427.912	16	26.744		
	Total	12916.696	23			

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
เดือนที่ 1	2.274	7	16	0.082

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
ชุดควบคุม	3	2.1033					
MSP04	3		22.3067				
MSR07	3			36.6433			
MSR34	3			41.6600			
MSP02	3			45.7833	45.7833		
MSR24	3				53.3167		
MSP01	3					63.0567	
MSP13	3						81.7867
Sig.		1.000	1.000	0.056	0.093	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 0 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 2 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13554.712	7	1936.387	67.890	0.000
Within Groups	456.359	16	28.522		
Total	14011.071	23			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.554	7	16	0.057

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
MSP13	3	19.3568				
MSR34	3		29.9767			
MSP01	3		37.2833			
MSR24	3			57.2133		
MSR07	3			66.0200	66.0200	
MSP02	3				67.8300	
MSP04	3				71.3033	
ชุดควบคุม	3					96.8967
Sig.		1.000	0.113	0.061	0.268	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 2 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9465.374	7	1352.196	37.810	0.000
Within Groups	572.208	16	35.763		
Total	10037.583	23			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.469	7	16	.064

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
ชุดควบคุม	3	3.1033			
MSP04	3		28.6967		
MSR07	3		29.2133		
MSP02	3		29.7267		
MSR04	3			41.5300	
MSP01	3			46.8167	
MSR34	3			51.5400	
MSP13	3				75.8468
Sig.		1.000	0844	0.069	1.000

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 2 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	808.274	5	161.655	16.163	0.000
Within Groups	120.017	12	10.001		
Total	928.291	17			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.475	5	12	0.268

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
MSR24	3	1.2567	
MSP02	3	2.4433	
MSR07	3	4.7667	
MSP13	3	4.7967	
MSP01	3		15.9000
MSR34	3		18.4867
Sig.		0.228	0.336

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 2 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13555.266	7	1936.467	67.906	.000
Within Groups	456.268	16	28.517		
Total	14011.534	23			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.552	7	16	0.057

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
ชุดควบคุม	3	3.1033				
MSP04	3		28.6967			
MSP02	3		32.1700			
MSR07	3		33.9800	33.9800		
MSR24	3			42.7867		
MSP01	3				62.7167	
MSR34	3				70.0267	
MSP13	3					80.6433
Sig.		1.000	0.268	0.060	0.113	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้หน้าทีเพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 0 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15256.952	7	2179.565	50.486	0.000
Within Groups	690.752	16	43.172		
Total	15947.704	23			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.616	7	16	0.005

Dunnnett T3

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSR07	MSR24	-31.22667*	2.91553	0.038	-58.7049	-3.7484
	MSR34	-24.79667*	3.13392	0.042	-47.9016	-1.6918
	MSP01	-3.97667	3.67200	0.988	-25.4134	17.4600
	MSP02	-42.46667	8.64886	0.157	-113.0287	28.0954
	MSP04	-47.05333*	6.19922	0.038	-89.8658	-4.2409
	MSP13	-3.30633	2.91079	0.967	-30.9329	24.3202
	ชุดควบคุม	-78.28000*	3.26169	0.001	-100.2404	-56.3196

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 24 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 0 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Dunnett T3 (ต่อ)

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSR24	MSR07	31.22667*	2.91553	0.038	3.7484	58.7049
	MSR34	6.43000	1.40722	0.163	-3.9719	16.8319
	MSP01	27.25000*	2.37537	0.030	5.7999	48.7001
	MSP02	-11.24000	8.18301	0.912	-94.6567	72.1767
	MSP04	-15.82667	5.53075	0.467	-71.4231	39.7697
	MSP13	27.92034*	0.79465	0.000	23.3968	32.4438
	ชุดควบคุม	-47.05333*	1.67255	0.002	-60.4845	-33.6221
MSR34	MSR07	24.79667*	3.13392	0.042	1.6918	47.9016
	MSR24	-6.43000	1.40722	0.163	-16.8319	3.9719
	MSP01	20.82000*	2.63885	0.031	3.1657	38.4743
	MSP02	-17.67000	8.26334	0.665	-98.1702	62.8302
	MSP04	-22.25667	5.64892	0.270	-74.0032	29.4899
	MSP13	21.49034*	1.39737	0.008	10.9629	32.0178
	ชุดควบคุม	-53.48333*	2.02943	0.000	-65.2923	-41.6743
MSP01	MSR07	3.97667	3.67200	0.988	-17.4600	25.4134
	MSR24	-27.25000*	2.37537	0.030	-48.7001	-5.7999
	MSR34	-20.82000*	2.63885	0.031	-38.4743	-3.1657
	MSP02	-38.49000	8.48204	0.199	-112.6552	35.6752
	MSP04	-43.07667	5.96427	0.057	-88.4040	2.2507
	MSP13	.67034	2.36955	1.000	-20.9403	22.2810
	ชุดควบคุม	-74.30333*	2.78939	0.000	-91.4589	-57.1478

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 0 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Dunnett T3 (ต่อ)

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSP02	MSR07	42.46667	8.64886	0.157	-28.0954	113.0287
	MSR24	11.24000	8.18301	0.912	-72.1767	94.6567
	MSR34	17.67000	8.26334	0.665	-62.8302	98.1702
	MSP01	38.49000	8.48204	0.199	-35.6752	112.6552
	MSP04	-4.58667	9.84336	1.000	-65.3837	56.2103
	MSP13	39.16034	8.18132	0.207	-44.3216	122.6423
	ชุดควบคุม	-35.81333	8.31264	0.236	-114.6954	43.0687
MSP04	MSR07	47.05333*	6.19922	0.038	4.2409	89.8658
	MSR24	15.82667	5.53075	0.467	-39.7697	71.4231
	MSR34	22.25667	5.64892	0.270	-29.4899	74.0032
	MSP01	43.07667	5.96427	0.057	-2.2507	88.4040
	MSP02	4.58667	9.84336	1.000	-56.2103	65.3837
	MSP13	43.74701	5.52825	0.080	-11.9426	99.4366
	ชุดควบคุม	-31.22667	5.72080	0.137	-81.0888	18.6355
MSP13	MSR07	3.30633	2.91079	0.967	-24.3202	30.9329
	MSR24	-27.92034*	.79465	0.000	-32.4438	-23.3968
	MSR34	-21.49034*	1.39737	0.008	-32.0178	-10.9629
	MSP01	-.67034	2.36955	1.000	-22.2810	20.9403
	MSP02	-39.16034	8.18132	0.207	-122.6423	44.3216
	MSP04	-43.74701	5.52825	0.080	-99.4366	11.9426
	ชุดควบคุม	-74.97367*	1.66427	0.001	-88.5574	-61.3900

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 26 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 0 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Dunnnett T3 (ต่อ)

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ชุดควบคุม	MSR07	78.28000*	3.26169	0.001	56.3196	100.2404
	MSR24	47.05333*	1.67255	0.002	33.6221	60.4845
	MSR34	53.48333*	2.02943	0.000	41.6743	65.2923
	MSP01	74.30333*	2.78939	0.000	57.1478	91.4589
	MSP02	35.81333	8.31264	0.236	-43.0687	114.6954
	MSP04	31.22667	5.72080	0.137	-18.6355	81.0888
	MSP13	74.97367*	1.66427	0.001	61.3900	88.5574

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 27 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2
5.238	7	16

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10861.634	7	1551.662	31.686	0.000
Within Groups	783.516	16	48.970		
Total	11645.150	23			

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เน่าที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Dunnett T3

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSR07	MSR24	30.07000*	2.25496	0.003	16.6548	43.4852
	MSR34	33.92000*	2.78023	0.003	17.8739	49.9661
	MSP01	13.54667	2.36914	0.052	-.1218	27.2151
	MSP02	38.32000	9.36828	0.258	-50.3212	126.9612
	MSP04	40.60333	5.78861	0.074	-7.7383	88.9450
	MSP13	7.52220	2.15874	0.254	-5.9246	20.9690
	ชุดควบคุม	71.83000*	2.39088	0.000	58.0859	85.5741
MSR24	MSR07	-30.07000*	2.25496	0.003	-43.4852	-16.6548
	MSR34	3.85000	2.51349	0.886	-11.9912	19.6912
	MSP01	-16.52333*	2.04959	0.015	-28.2859	-4.7608
	MSP02	8.25000	9.29261	0.993	-82.8881	99.3881
	MSP04	10.53333	5.66534	0.758	-40.7557	61.8224
	MSP13	-22.54780*	1.80227	0.003	-32.8988	-12.1968
	ชุดควบคุม	41.76000*	2.07468	0.000	29.8134	53.7066
MSR34	MSR07	-33.92000*	2.78023	0.003	-49.9661	-17.8739
	MSR24	-3.85000	2.51349	0.886	-19.6912	11.9912
	MSP01	-20.37333*	2.61642	0.021	-36.1091	-4.6376
	MSP02	4.40000	9.43385	1.000	-82.2761	91.0761
	MSP04	6.68333	5.89414	0.972	-39.7066	53.0733
	MSP13	-26.39780*	2.42755	0.012	-42.5880	-10.2076
	ชุดควบคุม	37.91000*	2.63612	0.002	22.1641	53.6559

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 29 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เน่าที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Dunnett T3 (ต่อ)

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSP01	MSR07	-13.54667	2.36914	0.052	-27.2151	.1218
	MSR24	16.52333*	2.04959	0.015	4.7608	28.2859
	MSR34	20.37333*	2.61642	0.021	4.6376	36.1091
	MSP02	24.77333	9.32098	0.512	-65.3983	114.9450
	MSP04	27.05667	5.71175	0.184	-23.0264	77.1397
	MSP13	-6.02447	1.94324	0.319	-17.4942	5.4452
	ชุดควบคุม	58.28333*	2.19825	0.000	45.7806	70.7860
MSP02	MSR07	-38.32000	9.36828	0.258	-126.9612	50.3212
	MSR24	-8.25000	9.29261	0.993	-99.3881	82.8881
	MSR34	-4.40000	9.43385	1.000	-91.0761	82.2761
	MSP01	-24.77333	9.32098	0.512	-114.9450	65.3983
	MSP04	2.28333	10.71335	1.000	-67.1807	71.7474
	MSP13	-30.79780	9.26973	0.374	-122.7434	61.1478
	ชุดควบคุม	33.51000	9.32653	0.326	-56.4769	123.4969
MSP04	MSR07	-40.60333	5.78861	0.074	-88.9450	7.7383
	MSR24	-10.53333	5.66534	0.758	-61.8224	40.7557
	MSR34	-6.68333	5.89414	0.972	-53.0733	39.7066
	MSP01	-27.05667	5.71175	0.184	-77.1397	23.0264
	MSP02	-2.28333	10.71335	1.000	-71.7474	67.1807
	MSP13	-33.08113	5.62773	0.128	-85.4440	19.2817
	ชุดควบคุม	31.22667	5.72080	0.137	-18.6355	81.0888

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 30 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Dunnnett T3 (ต่อ)

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSP13	MSR07	-7.52220	2.15874	0.254	-20.9690	5.9246
	MSR24	22.54780*	1.80227	0.003	12.1968	32.8988
	MSR34	26.39780*	2.42755	0.012	10.2076	42.5880
	MSP01	6.02447	1.94324	0.319	-5.4452	17.4942
	MSP02	30.79780	9.26973	0.374	-61.1478	122.7434
	MSP04	33.08113	5.62773	0.128	-19.2817	85.4440
	ชุดควบคุม	64.30780*	1.96968	0.000	52.6104	76.0052
ชุดควบคุม	MSR07	-71.83000*	2.39088	0.000	-85.5741	-58.0859
	MSR24	-41.76000*	2.07468	0.000	-53.7066	-29.8134
	MSR34	-37.91000*	2.63612	0.002	-53.6559	-22.1641
	MSP01	-58.28333*	2.19825	0.000	-70.7860	-45.7806
	MSP02	-33.51000	9.32653	0.326	-123.4969	56.4769
	MSP04	-31.22667	5.72080	0.137	-81.0888	18.6355
	MSP13	-64.30780*	1.96968	0.000	-76.0052	-52.6104

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 31 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	478.287	5	95.657	18.548	0.000
Within Groups	61.886	12	5.157		
Total	540.173	17			

ตารางที่ 32 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เน่าที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0.984	5	12	0.466

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MSP02	3	2.3033	10.6667	15.5667
MSR24	3	5.2933		
MSR07	3	6.4500		
MSP13	3			
MSR34	3			15.5667
MSP01	3			16.0233
Sig.		0.054	1.000	0.810

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 33 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เน่าที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15257.746	7	2179.678	50.490	0.000
Within Groups	690.721	16	43.170		
Total	15948.468	23			

ตารางที่ 34 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.617	7	16	0.005

Dunnnett T3

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSR07	MSR24	31.22667*	2.91553	0.038	3.7484	58.7049
	MSR34	24.80333*	3.13528	0.042	1.7146	47.8920
	MSP01	3.97333	3.67031	0.988	-17.4595	25.4061
	MSP02	42.46667	8.64886	0.157	-28.0954	113.0287
	MSP04	47.05333*	6.19922	0.038	4.2409	89.8658
	MSP13	3.30333	2.91057	0.967	-24.3299	30.9366
	ชุดควบคุม	78.28000*	3.26169	0.001	56.3196	100.2404
MSR24	MSR07	-31.22667*	2.91553	0.038	-58.7049	-3.7484
	MSR34	-6.42333	1.41024	0.164	-16.8594	4.0127
	MSP01	-27.25333*	2.37276	0.030	-48.6740	-5.8327
	MSP02	11.24000	8.18301	0.912	-72.1767	94.6567
	MSP04	15.82667	5.53075	0.467	-39.7697	71.4231
	MSP13	-27.92333*	.79388	0.000	-32.4429	-23.4037
	ชุดควบคุม	47.05333*	1.67255	0.002	33.6221	60.4845

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 35 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Dunnett T3 (ต่อ)

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSR34	MSR07	-24.80333*	3.13528	0.042	-47.8920	-1.7146
	MSR24	6.42333	1.41024	0.164	-4.0127	16.8594
	MSP01	-20.83000*	2.63812	0.031	-38.4497	-3.2103
	MSP02	17.66333	8.26386	0.665	-62.8193	98.1459
	MSP04	22.25000	5.64968	0.270	-29.4751	73.9751
	MSP13	-21.50000*	1.39998	0.008	-32.0680	-10.9320
	ชุดควบคุม	53.47667*	2.03153	0.000	41.6622	65.2911
MSP01	MSR07	-3.97333	3.67031	0.988	-25.4061	17.4595
	MSR24	27.25333*	2.37276	0.030	5.8327	48.6740
	MSR34	20.83000*	2.63812	0.031	3.2103	38.4497
	MSP02	38.49333	8.48130	0.199	-35.6897	112.6764
	MSP04	43.08000	5.96323	0.057	-2.2619	88.4219
	MSP13	-.67000	2.36667	1.000	-22.2585	20.9185
	ชุดควบคุม	74.30667*	2.78717	.000	57.1723	91.4411
MSP02	MSR07	-42.46667	8.64886	.157	-113.0287	28.0954
	MSR24	-11.24000	8.18301	.912	-94.6567	72.1767
	MSR34	-17.66333	8.26386	.665	-98.1459	62.8193
	MSP01	-38.49333	8.48130	.199	-112.6764	35.6897
	MSP04	4.58667	9.84336	1.000	-56.2103	65.3837
	MSP13	-39.16333	8.18125	.207	-122.6482	44.3215
	ชุดควบคุม	35.81333	8.31264	.236	-43.0687	114.6954

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 36 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 3 เดือน (ต่อ)

Dunnett T3 (ต่อ)

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSP04	MSR07	-47.05333*	6.19922	.038	-89.8658	-4.2409
	MSR24	-15.82667	5.53075	.467	-71.4231	39.7697
	MSR34	-22.25000	5.64968	.270	-73.9751	29.4751
	MSP01	-43.08000	5.96323	.057	-88.4219	2.2619
	MSP02	-4.58667	9.84336	1.000	-65.3837	56.2103
	MSP13	-43.75000	5.52814	.080	-99.4437	11.9437
	ชุดควบคุม	31.22667	5.72080	.137	-18.6355	81.0888
MSP13	MSR07	-3.30333	2.91057	.967	-30.9366	24.3299
	MSR24	27.92333*	.79388	.000	23.4037	32.4429
	MSR34	21.50000*	1.39998	.008	10.9320	32.0680
	MSP01	.67000	2.36667	1.000	-20.9185	22.2585
	MSP02	39.16333	8.18125	.207	-44.3215	122.6482
	MSP04	43.75000	5.52814	.080	-11.9437	99.4437
	ชุดควบคุม	74.97667*	1.66390	.001	61.3859	88.5674
ชุดควบคุม	MSR07	-78.28000*	3.26169	.001	-100.2404	-56.3196
	MSR24	-47.05333*	1.67255	.002	-60.4845	-33.6221
	MSR34	-53.47667*	2.03153	.000	-65.2911	-41.6622
	MSP01	-74.30667*	2.78717	0.000	-91.4411	-57.1723
	MSP02	-35.81333	8.31264	0.236	-114.6954	43.0687
	MSP04	-31.22667	5.72080	0.137	-81.0888	18.6355
	MSP13	-74.97667*	1.66390	0.001	-88.5674	-61.3859

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 37 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 0 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13177.668	6	2196.278	103.305	0.000
Within Groups	297.642	14	21.260		
Total	13475.310	20			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.084	6	14	0.003

Dunnnett T3

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSR07	MSR24	-31.64667	4.01237	0.065	-67.6752	4.3819
	MSR34	-25.49667	4.08397	0.094	-59.6558	8.6625
	MSP01	-5.69333	4.07398	0.884	-40.0887	28.7021
	MSP02	-43.84667*	4.25434	0.021	-74.9356	-12.7577
	MSP04	-48.33333*	6.44199	0.019	-84.7882	-11.8785
	ชุดควบคุม	-79.35333*	4.23398	0.005	-110.7283	-47.9784
MSR24	MSR07	31.64667	4.01237	0.065	-4.3819	67.6752
	MSR34	6.15000	1.36403	0.107	-1.7142	14.0142
	MSP01	25.95333*	1.33381	0.001	18.3464	33.5603
	MSP02	-12.20000	1.81139	0.051	-24.4613	.0613
	MSP04	-16.68667	5.16536	0.359	-64.7476	31.3743
	ชุดควบคุม	-47.70667*	1.76304	0.001	-59.4599	-35.9535

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 38 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 0 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน (ต่อ)

Dunnnett T3 (ต่อ)

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSP04	MSR07	48.33333*	6.44199	0.019	11.8785	84.7882
	MSR24	16.68667	5.16536	0.359	-31.3743	64.7476
	MSR34	22.83667	5.22118	0.207	-23.5357	69.2090
	MSP01	42.64000	5.21336	0.060	-3.9550	89.2350
	MSP02	4.48667	5.35549	0.994	-38.6510	47.6244
	ชุดควบคุม	-31.02000	5.33933	0.105	-74.4936	12.4536
ชุดควบคุม	MSR07	79.35333*	4.23398	0.005	47.9784	110.7283
	MSR24	47.70667*	1.76304	0.001	35.9535	59.4599
	MSR34	53.85667*	1.92042	0.000	42.6721	65.0412
	MSP01	73.66000*	1.89908	0.000	62.4612	84.8588
	MSP02	35.50667*	2.26022	0.001	23.1819	47.8315
	MSP04	31.02000	5.33933	0.105	-12.4536	74.4936

*. The mean difference is significant at the 0.05 level

ตารางที่ 39 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8321.051	6	1386.842	41.075	0.000
Within Groups	472.692	14	33.764		
Total	8793.743	20			

ตารางที่ 40 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน (ต่อ)

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2
1.646	6	14

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
ชุดควบคุม	3	3.1033				
MSP04	3		34.1233			
MSP02	3		35.8233	35.8233		
MSR34	3		37.6233	37.6233		
MSR24	3			45.4167	45.4167	
MSP01	3				55.0633	
MSR07	3					73.1833
Sig.		1.000	0.496	0.074	0.061	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 41 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	849.790	4	212.447	18.863	0.000
Within Groups	112.626	10	11.263		
Total	962.416	14			

ตารางที่ 42 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ในระยะที่ 2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน (ต่อ)

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.088	4	10	0.413

Duncan^a

strain	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MSP02	3	2.7867		
MSR24	3	5.3933	5.3933	
MSR07	3		9.2800	
MSR34	3			19.3367
MSP01	3			21.6933
Sig.		0.364	0.186	0.410

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 43 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13177.896	6	2196.316	103.294	0.000
Within Groups	297.679	14	21.263		
Total	13475.575	20			

ตารางที่ 44 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน (ต่อ)

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.088	6	14	0.003

Dunnnett T3

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSR07	MSR04	31.65333	4.01402	0.065	-4.3927	67.6994
	MSR34	25.50333	4.08559	0.094	-8.6735	59.6801
	MSP01	5.70667	4.07473	0.883	-28.7273	40.1407
	MSP02	43.85333*	4.25590	0.021	12.7475	74.9592
	MSP04	48.34000*	6.44302	0.019	11.8836	84.7964
	ชุดควบคุม	79.36000*	4.23554	0.005	47.9680	110.7520
MSR04	MSR07	-31.65333	4.01402	0.065	-67.6994	4.3927
	MSR34	-6.15000	1.36403	0.107	-14.0142	1.7142
	MSP01	-25.94667*	1.33114	0.001	-33.5313	-18.3620
	MSP02	12.20000	1.81139	0.051	-.0613	24.4613
	MSP04	16.68667	5.16536	0.359	-31.3743	64.7476
	ชุดควบคุม	47.70667*	1.76304	0.001	35.9535	59.4599
MSR34	MSR07	-25.50333	4.08559	0.094	-59.6801	8.6735
	MSR04	6.15000	1.36403	0.107	-1.7142	14.0142
	MSP01	-19.79667*	1.53351	0.002	-28.1601	-11.4332
	MSP02	18.35000*	1.96490	0.011	6.7662	29.9338
	MSP04	22.83667	5.22118	0.207	-23.5357	69.2090
	ชุดควบคุม	53.85667*	1.92042	0.000	42.6721	65.0412
MSP01	MSR07	-5.70667	4.07473	0.883	-40.1407	28.7273
	MSR04	25.94667*	1.33114	0.001	18.3620	33.5313
	MSR34	19.79667*	1.53351	0.002	11.4332	28.1601
	MSP02	38.14667*	1.94222	0.001	26.5307	49.7626
	MSP04	42.63333	5.21268	0.060	-3.9813	89.2479
	ชุดควบคุม	73.65333*	1.89721	0.000	62.4525	84.8541

ตารางที่ 45 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับราที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ที่ระยะเวลา 4 เดือน (ต่อ)

Dunnett T3 (ต่อ)

(I) strain	(J) strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MSP02	MSR07	-43.85333*	4.25590	0.021	-74.9592	-12.7475
	MSR04	-12.20000	1.81139	0.051	-24.4613	.0613
	MSR34	-18.35000*	1.96490	0.011	-29.9338	-6.7662
	MSP01	-38.14667*	1.94222	0.001	-49.7626	-26.5307
	MSP04	4.48667	5.35549	0.994	-38.6510	47.6244
	ชุดควบคุม	35.50667*	2.26022	0.001	23.1819	47.8315
MSP04	MSR07	-48.34000*	6.44302	0.019	-84.7964	-11.8836
	MSR04	-16.68667	5.16536	0.359	-64.7476	31.3743
	MSR34	-22.83667	5.22118	0.207	-69.2090	23.5357
	MSP01	-42.63333	5.21268	0.060	-89.2479	3.9813
	MSP02	-4.48667	5.35549	0.994	-47.6244	38.6510
	ชุดควบคุม	31.02000	5.33933	0.105	-12.4536	74.4936
ชุดควบคุม	MSR07	-79.36000*	4.23554	0.005	-110.7520	-47.9680
	MSR04	-47.70667*	1.76304	0.001	-59.4599	-35.9535
	MSR34	-53.85667*	1.92042	0.000	-65.0412	-42.6721
	MSP01	-73.65333*	1.89721	0.000	-84.8541	-62.4525
	MSP02	-35.50667*	2.26022	0.001	-47.8315	-23.1819
	MSP04	-31.02000	5.33933	0.105	-74.4936	12.4536

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 46 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSR07 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ

ระยะที่ 0

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6548.762	3	2182.921	52.878	0.000
Within Groups	330.256	8	41.282		
Total	6879.018	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0.262	3	8	.851

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	3	17.5433	
3	3	18.6167	
1	3		63.5033
2	3		66.0200
Sig.		0.843	0.644

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 47 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อน้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSR07 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5162.432	3	1720.811	54.566	0.000
Within Groups	252.289	8	31.536		
Total	5414.720	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.127	3	8	.394

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2	3	29.2133	
1	3	36.6433	
4	3		73.1833
3	3		74.9333
Sig.		.144	.713

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 48 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อน้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSR07 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะ 2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31.213	2	15.606	0.886	0.460
Within Groups	105.720	6	17.620		
Total	136.932	8			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.071	2	6	0.932



ตารางที่ 49 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSR24 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ

ระยะที่ 0

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	184.701	3	61.567	27.465	0.000
Within Groups	17.933	8	2.242		
Total	202.634	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.991	3	8	0.052

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	3	46.6833		
4	3	49.1900	49.1900	
3	3		49.8433	
2	3			57.2133
Sig.		0.074	0.608	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 50 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSR24 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	224.488	3	74.829	15.375	0.001
Within Groups	38.935	8	4.867		
Total	263.424	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.426	3	8	0.305

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	3	37.6233	
1	3	39.2433	
3	3	41.0133	41.0133
2	3		51.5400
Sig.		0.531	0.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 51 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เน่าที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSR24 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะ 2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33.417	2	16.708	9.055	0.015
Within Groups	11.071	6	1.845		
Total	44.488	8			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.169	2	6	0.848

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2	3	1.2567	
3	3		5.2933
4	3		5.3933
Sig.		1.000	0.931

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 52 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSR34 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ

ระยะที่ 0

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1209.531	3	403.177	21.417	0.000
Within Groups	150.600	8	18.825		
Total	1360.131	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.919	3	8	.054

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2	3	29.9767		
4	3		43.0400	
3	3		43.4133	
1	3			58.3400
Sig.		1.000	0.919	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 53 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSR34 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	354.706	3	118.235	3.187	0.084
Within Groups	296.798	8	37.100		
Total	651.504	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0.669	3	8	0.595

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	3	37.6233	
1	3	39.2433	
3	3	41.0133	41.0133
2	3		51.5400
Sig.		.531	0.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 54 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อน้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSR34 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	555.687	3	185.229	15.071	0.001
Within Groups	98.321	8	12.290		
Total	654.008	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.513	3	8	0.284

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	2.4167	
3	3		15.5667
2	3		18.4867
4	3		19.3367
Sig.		1.000	0.242

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 55 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อน้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP01 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ

ระยะที่ 0

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	605.572	3	201.857	33.704	0.000
Within Groups	47.913	8	5.989		
Total	653.485	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.601	3	8	0.264

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	3	22.5933	
4	3	23.2367	
1	3		36.9433
2	3		37.2833
Sig.		0.756	0.869

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 56 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP01 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	397.336	3	132.445	19.363	0.001
Within Groups	54.720	8	6.840		
Total	452.056	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0.718	3	8	0.568

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2	3	46.8167		
1	3	48.5700		
4	3		55.0633	
3	3			61.3867
Sig.		0.435	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 57 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP01 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	91.516	3	30.505	8.790	0.007
Within Groups	27.765	8	3.471		
Total	119.281	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.268	3	8	0.349

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	14.4867	
2	3	15.9000	
3	3	16.0233	
4	3		21.6933
Sig.		0.361	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 58 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP02 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ

ระยะที่ 0

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	316.961	3	105.654	1.308	0.337
Within Groups	646.188	8	80.774		
Total	963.150	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.290	3	8	0.155

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
1	3		53.3267
3	3		61.0833
4	3		61.3900
2	3		67.8300
Sig.			0.100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 59 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP02 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	394.745	3	131.582	1.378	0.318
Within Groups	764.120	8	95.515		
Total	1158.865	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.208	3	8	.165

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
2	3		29.7267
4	3		35.8233
3	3		36.6133
1	3		45.7833
Sig.			0.095

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 60 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP02 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.371	2	.186	.036	.965
Within Groups	31.024	6	5.171		
Total	31.395	8			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0.088	2	6	0.917

ตารางที่ 61 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP04 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ

ระยะที่ 0

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	289.689	3	96.563	1.727	0.238
Within Groups	447.212	8	55.901		
Total	736.901	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.406	3	8	.310

ตารางที่ 62 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อน้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP04 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 0 (ต่อ)

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
3	3		65.6700
4	3		65.8767
2	3		71.3033
1	3		77.6933
Sig.			0.101

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 63 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อน้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP04 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	289.689	3	96.563	1.727	0.238
Within Groups	447.212	8	55.902		
Total	736.901	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.406	3	8	.310

ตารางที่ 64 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อน้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP04 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 1 (ต่อ)

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
1	3		22.3067
2	3		28.6967
4	3		34.1233
3	3		34.3300
Sig.			0.101

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ 65 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อน้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP13 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ

ระยะที่ 0

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	906.510	3	302.170	11.377	0.003
Within Groups	212.485	8	26.561		
Total	1118.995	11			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.094	3	8	.049

ตารางที่ 66 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เนื้อน้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP13 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 0 (ต่อ)

Duncan^a

เดือนที่	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	3	0.0000	
1	3		18.2131
2	3		19.3568
3	3		21.9230
Sig.		1.000	0.422

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ระยะที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	223.139	2	111.569	1.761	0.250
Within Groups	380.185	6	63.364		
Total	603.324	8			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.875	2	6	0.133

ตารางที่ 67 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ น้ำที่เพาะเลี้ยงร่วมกับรา MSP13 ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA ในระยะต่าง ๆ (ต่อ)

ระยะที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	105.869	2	52.935	6.188	0.035
Within Groups	51.330	6	8.555		
Total	157.200	8			

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.352	2	6	0.717

Duncan^a

month	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	2.5267	
2	3	4.7967	
3	3		10.6667
Sig.		.379	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ภาคผนวก จ

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของราทดสอบ

ไอโซเลต MSR07

ACCGAGTTATACAACCTCATCAACCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGGAACAGAC
GGCCCCGTAACACGGGCCGCCCGCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATAATGTTTCTTC
TGAGTAAACAAGCGAATAAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAA
GAACGCAACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCGTTACTACCTCAGG
CCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGCGGGCACAACGCCGTCCCCAAAT
ACGGTGGCGGTCCCGCCGAGCTTCCATTGCGTACTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGCGG
CGCGGCCACGCCGTAAACACCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGC
TGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAATCTATTAAGTTAGACAATTAATTTTAAGATCTGAT
CTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGC

ไอโซเลต MSR24

GTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATACAAC
TCATCAACCCTGTGAACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGGCCCCGTAACACGG
GCCGCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTTATAATGTTTTTCTGAGTAAACAAGCAAAT
AAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC
AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAGGCCCCGGGCTGGCGTT
GGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGCGGGCACACGCCGTCCCTCAAACACAGTGGCGGTCCCGCCG
CAGCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGCGGCGCGGCCACGCCGTAAAC
ACCCAACTTCTGA

ไอโซเลต MSR34

TTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG
 TTTACAAC TCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGG
 TAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAA
 CCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
 AAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG
 CGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTG
 GTGTTGGGACTCGCGTAAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTTCGAGCTTCCATAG
 CGTAGTAGTAAAACCCTCGT TACTGGTAATCGTCGCGGC

ไอโซเลต MSP01

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTAC
 AACTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAA
 CGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATA
 AATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAT
 GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
 GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGT
 GGGACTCGCGTAAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTTCGAGCTTCCATAGCGTAG
 TAGTAAAACCCTCGT TACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTT
 GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGC

ไอโซเลต MSP02

ACTGAGTACTATACTCTCTACCCTTTGTGAACTATTATACCTGTTGCTTCGGCGGCGCCCGCTA
 GGGTGCCCGCCGGTCTCATCAGAATCTCTGTTTTCGAACCCGACGATACTTCTGAGTGTTCTTA
 GCGAACTGTCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
 ACGCGATATGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATGGCGC
 CTTCCAGTATCCTGGGAGGCATGCCTGTCCGAGCGTCGTTTCAACCCTCGAGCCCCTGTGGCCC
 GCGGTTGGGGATCTGCCACGGCAGGCCCTAAAACCAGTGCGGACCCGATGGGCCCTCTCCT
 TTACGTAGTAGCATTTCGCTCGTATTGGGAGTCCTCGGCGTCCTGCCTCTAAACCCCCACAAG
 CCCGCTTCGGCG

ไอโซเลต MSP04

AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTACT
 ATACTCTCTACCCTTTGTGAACTATTATACCTGTTGCTTCGGCGGCGCCCGCTAGGGTGCCCGC
 CGGTCTCATCAGAATCTCTGTTTTCGAACCCGACGATACTTCTGAGTGTTCTTAGCGAACTGTC
 AAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATG
 TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATGGCGCCTTCCAGTAT
 CCTGGGAGGCATGCCTGTCCGAGCGTCGTTTCAACCCTCGAGCCCCTGTGGCCCCGGCGTTGGG
 GATCTGCCACGGCAGGCCCTAAAACCAGTGCGGACCCGATGGGCCCTCTCCTTTACGTAGTA
 GCATTTCGCTCGTATTGGGAGTCCTCGGCGTCCTGCCTCTAAACCCCCACAAGCCCGCTTCGG
 CGGCACCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

ไอโซเลต MSR07

ACCGAGTTATACAACCTCATCAACCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGGAACAGAC
 GGCCCCGTAACACGGGCCGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATAATGTTTCTTC
 TGAGTAAACAAGCGAATAAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAA
 GAACGCAACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
 CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCGTTACTACCCTCAGG
 CCCCCGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGCGGGCACAACGCCGTCCCCCAAAT
 ACGGTGGCGGTCCCGCCGAGCTTCCATTGCGTACTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGCGG
 CGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGC
 TGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAATCTATTAAGTTAGACAATTAATTTTAAGATCTGAT
 CTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGC

ไอโซเลต MSP13

GAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATACAATATGAAGGCTGTCCGCAGCTGGAGTATTTTATT
 ACCCTTGTCTTTTGCCTACTTGTGTTTCTGGGCGGGTTTCGCTCGCCACCAGGACCACCAAAT
 AAACCTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTACAAACAATGTAAATCATTTACAACCTTTCAA
 CAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATT
 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCA
 TGCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTTGTCTTTGGTC
 GCCCAAAGACTCGCCTTAAAGTGATTGGCAGCCGGCTTTCTGGTTTCGAGCGCAGCACATTT
 TTGCGCTTGCCATCAGCAAAACGGCAATCCATCAAGC

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ญาณิศา พันธุ์สังข์
วัน เดือน ปี เกิด	12 สิงหาคม 2536
สถานที่เกิด	เพชรบุรี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	9 หมู่ 4 ต.โรงเข้ อ.บ้านลาด เพชรบุรี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY