

## การศึกษาชนิดราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์และการใช้ประโยชน์

Study on orchid mycorrhizae of endangered orchid species and utilization

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณิรัตน์ สีมะเต็อ ชนินทร ดวงสอาด  
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

### บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บรวบรวมกล้วยไม้จากจังหวัดกระบี่ ตาก อุบลราชธานี และกรุงเทพฯ ระหว่างเดือนตุลาคม 2552 – เดือนกันยายน 2553 จากกล้วยไม้ดิน 11 ชนิด และกล้วยไม้เกาะอาศัย ได้แก่ เอื้องปากนกแก้ว (*Dendrobium cruentum*) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีรายงานว่าเป็นกล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์ แยกราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ บนอาหารวุ้นสังเคราะห์สูตร NDY (1/6) ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin และ tetracycline บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ได้ราไมคอร์ไรซา จำนวน 51 isolates นอกนั้นเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ จำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซาจำนวน โดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยศึกษาลักษณะและวัดขนาดของเส้นใย ลักษณะเส้นใยตั้งฉาก ลักษณะรูปร่าง ขนาดของ monilioid cell และจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ พบว่าราทั้ง 51 isolates เป็น Bi nucleate ทั้งหมด และจำแนกได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Rhizoctonia repens* และ *Rhizoctonia goodyerae-repentis*

## คำนำ

ไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (orchid mycorrhizae) เป็นราชนิดหนึ่งที่เกิดอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ โดยมีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน (symbiosis) โดยราสร้างเส้นใยเข้าไปในรากกล้วยไม้ เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ สร้างโครงสร้างภายในเซลล์เรียกว่า peloton ราชนิดนี้ไม่ได้เข้าทำลายรากพืช แต่จะให้ธาตุอาหารแก่พืช เช่นธาตุคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญกับพืชและช่วยส่งเสริมให้เมล็ดกล้วยไม้งอก (Hadley, 1982; Harley and Smith, 1983) ในทางตรงกันข้ามรากกล้วยไม้เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิดได้แก่ โรคใบติดของทุเรียนสาเหตุเกิดจาก *Rhizoctonia solani* โรคกาบใบแห้งของข้าว สาเหตุเกิดจาก *R. solani* เป็นต้น (Sneh et al., 1991) แต่สำหรับความสัมพันธ์กับพืชตระกูลกล้วยไม้แล้ว ราชนิดนี้มีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันระหว่างกล้วยไม้กับรา ในด้านช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก มีอาหารสะสมในเมล็ดน้อยมากทำให้ไม่มีอาหารไปเลี้ยงในขณะที่กล้วยไม้งอก ดังนั้นเมล็ดกล้วยไม้บางชนิดจึงงอกยากหรือไม่งอกเลย แต่อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติพบว่ามิราไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ในรากกล้วยไม้แบบ เกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน และส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Rhizoctonia* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ โดยให้ธาตุอาหารและกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Clements, 1988)

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากในแต่ละปีเรามีการส่งออกกล้วยไม้เป็นจำนวนมาก และในธรรมชาติมีจำนวนกล้วยไม้ทั้งหมดมากกว่า 25,000 ชนิด นอกจากนั้นยังมีสายพันธุ์ที่ถูกสร้างโดยมนุษย์อีกไม่น้อยกว่า 30,000 ชนิด มีผู้ผลิตกล้วยไม้เป็นการค้าทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ทำให้ผู้ประกอบการสามารถผลิตกล้วยไม้ได้เป็นจำนวนมาก และสามารถผสมพันธุ์กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่มีความสวยงามมากขึ้น อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติได้มีการลักลอบนำกล้วยไม้ออกจากป่าเพื่อนำมาขายโดยไม่คำนึงถึงสมดุลทางธรรมชาติ ซึ่งทำให้กล้วยไม้ในป่าลดลงเป็นจำนวนมาก บางพันธุ์ใกล้สูญพันธุ์ บางพันธุ์สูญพันธุ์ไป และบางพันธุ์ขยายพันธุ์ยาก และเนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เมล็ดกล้วยไม้งอกยาก ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้ แต่โดยธรรมชาติมีเชื้อราชนิดหนึ่งเจริญอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้เรียกว่า ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ ซึ่งราจะช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้งอกโดยให้ ธาตุอาหาร น้ำตาล และคาร์โบไฮเดรตแก่เมล็ดกล้วยไม้เพื่อการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อน

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างราก ได้แก่ พลั่ว กรรไกรตัดแต่งกิ่ง และภาชนะเก็บราก
2. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายคลอรีน 75%

3. อาหารวันสังเคราะห์
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ในการแยกเชื้อ
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

## วิธีการ

### 1. เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

เก็บรากกล้วยไม้ดินที่ปลูกในกระถาง และปลูกในดิน จากแหล่งต่าง ๆ ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ โดยตัดรากห่อกระดาด ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียดชนิดกล้วยไม้ แหล่งที่เก็บ และวันที่เก็บ เก็บบรรจุรากกล้วยไม้ห่อตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

### 2. การแยกรากจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้

แยกรากไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ โดยทำความสะอาดรากกล้วยไม้ แช่ชิ้นส่วนรากในสารละลายคลอโรกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และนำชิ้นส่วนรากมาตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo ในตู้ปลอดเชื้อ แยกเส้นใยที่เจริญอยู่รวมกันในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ มาวางบนอาหารวันสังเคราะห์สูตร NDY (1/6) ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin และ tetracycline บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 3-10 วัน ใช้เข็มปลายแหลมตัดปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

### 3. การจำแนกรากไมคอร์ไรซา

3.1 ลักษณะของรบบอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ด sclerotium

3.2 ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ light microscope โดยศึกษาลักษณะและวัดขนาดของเส้นใย ลักษณะเส้นใยตั้งฉาก ลักษณะรูปร่างและขนาดของ monilioid cell ของราที่เจริญบนอาหาร และการสร้าง sclerotium ถ่ายภาพรากจากกล้องจุลทรรศน์แบบ compound เปรียบเทียบลักษณะของราดังกล่าวกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดรา (Moore, 1987; Sneh *et al.*, 1991; Roberts, 1999)

3.3 ศึกษาจำนวนนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์โดยการย้อมสีด้วย Safranin O (Bandoni, 1979)

## เวลาและสถานที่

เวลา: ตุลาคม 2552 – กันยายน 2553

สถานที่: - แหล่งพืชธรรมชาติ

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

จากสำรวจและเก็บรวบรวมกล้วยไม้ในจังหวัดกระบี่ ตาก อุบลราชธานี และกรุงเทพฯ ระหว่างเดือนตุลาคม 2552 – เดือนกันยายน 2553 จากกล้วยไม้ดิน 11 ชนิด และกล้วยไม้เกาะอาศัย ได้แก่ เอื้องปากนกแก้ว (*Dendrobium cruentum*) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีรายงานว่าเป็นกล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์

### 2. การแยกรากจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้

แยกรากไมคอร์ไรซาจากราก บนอาหารวุ้นสังเคราะห์สูตร NDY (1/6) ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin และ tetracycline บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 3-10 วัน ใช้เข็มปลายแหลมตัดปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA ได้ราไมคอร์ไรซา จำนวน 51 isolates นอกนั้นเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์

### 2. การจำแนกรากไมคอร์ไรซา

จำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซาจำนวน 51 isolates โดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ light microscope โดยศึกษาลักษณะและวัดขนาดของเส้นใย ลักษณะเส้นใยตั้งฉาก ลักษณะรูปร่างและขนาดของ monilioid cell เปรียบเทียบลักษณะของรากดังกล่าวกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดรา (Moore, 1987; Sneh *et al.*, 1991; Roberts, 1999) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าทั้ง 51 isolates เป็น Bi nucleate ทั้งหมด และจำแนกรากได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Rhizoctonia repens* และ *Rhizoctonia goodyerae-repentis*

## สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมกล้วยไม้ในจังหวัดกระบี่ ตาก อุบลราชธานี และกรุงเทพฯ ระหว่างเดือนตุลาคม 2552 – เดือนกันยายน 2553 จากกล้วยไม้ดิน 11 ชนิด และกล้วยไม้เกาะอาศัย ได้แก่ เอื้องปากนกแก้ว (*Dendrobium cruentum*) ได้ราไมคอร์ไรซา จำนวน 51 isolates นอกนั้นเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ จำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซาได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Rhizoctonia repens* และ *Rhizoctonia goodyerae-repentis*

## เอกสารอ้างอิง

- Bandoni, R.J. 1979. Safranin as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* 71: 873-847.
- Clements, M.A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3 : 73-86.
- Hadley, G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytol.* 69 ; 1015
- Hadley, G. 1982. Orchid mycorrhiza, (pp. 81-118) *In* J. Arditti, ed. *Orchid Biology : Reviews and Perspectives*, II. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Harley, J.L. and S.E. Smith. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. London. Academic Press. 483 pp..
- Moore, R. T. 1987. The genera of *Rhizoctonia* – like fungi : *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. Nov., *Epulorhiza* gen. Nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon* 29 : 91-99.
- Sneh, B.,L. Burpee and A. Ogoshi. 1991. *Identification of Rhizoctonia Species*. APS Press. 133 pp.