

การศึกษาชนิดราไมโครไรซากล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์และการใช้ประโยชน์รา  
ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

Study on Identification of Endangered Orchid Species and Using  
Symbiotic Germination

พรพิมล อธิปัญญาคม<sup>1/</sup> ชนินทร ดวงสอด<sup>1/</sup>

สุภาภรณ์ สาชาติ<sup>2/</sup> จงวัฒนา พุ่มหิรัญ<sup>2/</sup>

<sup>1/</sup>กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

<sup>2/</sup>สถาบันวิจัยพืชสวน

**บทคัดย่อ**

ผลจากการแยกราจากรากกล้วยไม้ 5 ชนิด โดยแยกราจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เทกซ์ของรากกล้วยไม้ ได้ราทั้งหมด 13 สายพันธุ์ ดังนี้ กล้วยไม้รองเท้านารีฟลาหอย จากจังหวัดกระบี่ แยกได้รา 4 ไอโซเลท โคโลนีบนอาหาร PDA สีขาว เจริญโตอาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือฐานอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน (concentric zonation) กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ จากจังหวัดกระบี่ แยกได้รา 4 ไอโซเลท โคโลนีบนอาหาร PDA สีขาว โตอาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือฐานอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน กล้วยไม้ cymbidium จาก จังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 3 ชนิด ได้ราไมคอร์ไรซาได้ 5 ไอโซเลท ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ และเลี้ยงราไมคอร์ไรซาให้บริสุทธิ์ เก็บรักษา ราไมคอร์ไรซา บน slant PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ใน glycerol ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

รหัสการทดลอง 01-29-54-03-02-00-03-54

## คำนำ

ราไมคอร์ไรซาเป็นราชนิดหนึ่งที่เจริญอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ โดยที่ราสร้างเส้นใยเข้าไปในรากกล้วยไม้ เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ สร้างโครงสร้างภายในเซลล์เรียกว่า peloton ราชนิดนี้ไม่ได้เข้าทำลายรากพืช แต่จะให้ธาตุอาหารแก่พืช เช่นธาตุคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญกับพืช เป็นความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันระหว่างกล้วยไม้กับราไมคอร์ไรซา เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก มีอาหารสะสมในเมล็ดน้อยมาก ทำให้เมล็ดกล้วยไม้งอกยาก แต่ในสภาพธรรมชาติพบว่ามีราไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ในรากกล้วยไม้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ โดยให้ธาตุอาหาร และกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้า ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ราไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้ โดยการจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ดินและรากกล้วยไม้เกาะอาศัยที่เพาะเมล็ดยาก และนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบเกื้อกูลซึ่งกันและกัน (symbiotic germination) ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อกลุ่มผู้เลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการค้าโดยเฉพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ หรือการผลิตโดยใช้เนื้อเยื่อ

ในต่างประเทศมีงานวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ของราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้เป็นจำนวนมาก Bernard (1909) เป็นบุคคลแรกที่ศึกษาไมคอร์ไรซากกล้วยไม้และพบความสัมพันธ์ที่ specific ของราและกล้วยไม้ โดยราช่วยกระตุ้นการเจริญของต้นกล้า Bernard แยกรากล้วยไม้อากาศ *Cattleya* พบว่ารานี้ช่วยกระตุ้นการเจริญของกล้า *Cattleya* แต่เมื่อนำราชนิดนั้นมาเลี้ยงร่วมกับกล้วยไม้ *Phalenopsis* และ *Odontoglossum* ปรากฏว่าราไม่ได้ช่วยกระตุ้นการเจริญของต้นกล้า แต่ทำให้กล้าของกล้วยไม้ดังกล่าวตาย

Hadley (1970) ศึกษา symbiosis ระหว่างรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากที่ต่าง ๆ รวม 32 isolate พบว่ารานี้ไม่มีความสัมพันธ์ specific กับกล้วยไม้ Warcup (1971, 1973) แยกรากล้วยไม้ *Caladenia* ในประเทศออสเตรเลีย และพบว่ากล้วยไม้ไม่มีความสัมพันธ์ที่ specific กับรา *Sebecinia vermifera* และพบว่ารา *Tulasnella calospora* ช่วยกระตุ้นการงอกของต้นกล้า *Diuris* และ *Thelymitra* ในวุ้นอาหารที่มี cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามความ specific ของกล้วยไม้และราก็ยังไม่มีความชัดเจนเพราะรา *Rhizoctonia* ที่อยู่ร่วมกับกล้วยไม้บางชนิดก่อให้เกิดโรคกับพืช ได้แก่ *Thanatephorus cucumeris* *Ceratobasidium cornigerum* แต่พบว่าทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นราไมคอร์ไรซาให้ประโยชน์ต่อกล้วยไม้

Currah *et al.* (1990) ศึกษาแยกราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ *Platanthera* และ *Coeloglossum* สำหรับในประเทศไทย งานวิจัยทางด้านราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้เริ่มมีการศึกษาโดย Manoch และคณะ (2000) ศึกษารา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากกล้วยไม้ดิน 5 ชนิด *Goodyera procera* , *Paphiopedilum concolor*. *P. concolor* var. *striatum*, *Paphiopedilum* sp. และ *Spathoglottis plicata* โดยมีวิธีการแยกรา 3 วิธี (1) โดยแยกจาก peloton (2) วิธี direct

inoculation โดยวางดินรอบรากกล้วยไม้บนอาหาร corn meal agar (3) Rice baiting technique จากการแยกภาพรา *Rhizoctonia* 75 isolates และ 70 isolates แยกได้จาก peloton Athipunyakom และคณะ (2001) ศึกษาแยกราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ *Goodyera procera*, *Spathoglottis plicata*, *Calanthe rubens* และ *Ludisia discolor* ในจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน จันทบุรี และลพบุรี ใช้วิธี modification of Masuhara & Katsuya แยกโดยใช้ peloton ซึ่งอยู่ในส่วนของเซลล์คอร์เท็กซ์ของราก พบราไมคอร์ไรซา 40 isolates 2 genera 4 species ได้แก่ *Rhizoctonia cerealis*, *R. ramicola*, *Ceratorhiza goodyerae-repentis* *Ceratorhiza goodyerae-repentis* และ unidentified *Rhizoctonia* sp. 1 ซึ่งมีลักษณะรูปร่างและขนาดของ monilioid cell คล้ายกับ รา *Rhizoctonia* strain D145-4 ของ Andersen (1990) รา ส่วนใหญ่มี colony ขาว และเป็น binucleate (2 nuclei / 1 cell) นอกจากนี้ยังพบรา unidentified sp.1 สร้างสปอร์และ hypha coil แยกได้จาก *Spathoglottis plicata* ประเทศไทยนั้นยังไม่แพร่หลายเมื่อเทียบกับประเทศอื่น ๆ ในประเทศออสเตรเลีย มีการผลิตไมคอร์ไรซากกล้วยไม้เป็นชุด Kit เพื่อการค้าสำหรับนำไปปลูกเองได้ และงานทางด้านการศึกษาการเพาะเมล็ดแบบ symbiosis ยังไม่ค่อยมีงานวิจัยแพร่หลายออกมา เพราะฉะนั้นการศึกษารามิคอร์ไรซากกล้วยไม้จึงมีความสำคัญไม่ว่าจะเป็นทางด้านความหลากหลายของเชื้อในสภาพกล้วยไม้ธรรมชาติ การจัดจำแนกชนิดของรา และการเก็บรักษาสายพันธุ์ราเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ตลอดจนการศึกษารูปแบบ symbiosis เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตในอนาคต

## วิธีดำเนินการ

### วิธีการ

#### 1. การศึกษารามิคอร์ไรซากกล้วยไม้

##### ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.1 เก็บรากกล้วยไม้ดิน และกล้วยไม้อิงอาศัย จากแหล่งปลูกกล้วยไม้ และในสภาพธรรมชาติ โดยตัดรากห่อกระดาด ใส่ถุงพลาสติกและบันทึกรายละเอียด ชนิดกล้วยไม้ แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ

1.2 แยกรามิคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ โดยวิธีดัดแปลงของ Athipunyakom *et al.* (2004)

1.3 การจำแนกรามิคอร์ไรซา โดยบันทึกลักษณะการเจริญของโคโลนี ขนาด สี บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเส้นใย ขนาดของเส้นใย ทำสไลด์เพื่อศึกษาการสร้าง monilioid และ sclerotium ทำการย้อมสีด้วย safranin-o เพื่อศึกษาจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ ถ่ายภาพเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo 4 การชักนำให้ราสร้างระยะ teleomorph เพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิดของรา

1.4 เก็บรักษาสายพันธุ์รามิคอร์ไรซาไว้ในอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษา culture (culture preservation)

## 2. การนำราไมคอร์ไรซามาใช้ประโยชน์ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

### ขั้นตอนการดำเนินงาน

2.1 นำฝักเมล็ดกล้วยไม้ดิน (รองเท้านารี และกล้วยไม้เกาะอาศัยที่โตเต็มที่แล้วมาในห้องปฏิบัติการ ฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอก โดยล้างผ่านน้ำที่สะอาด แช่ในแอลกอฮอล์ 70% ผ่านเปลวไฟ และผ้าครึ่งฝักกล้วยไม้ด้วยมีดผ่าตัดที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่เมล็ดกล้วยไม้ลงไปใต้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเมล็ดกล้วยไม้วางบนกระดาษกรองที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 ซม. X 4 ซม. แล้ววางกระดาษกรองลงบนอาหาร oat meal agar pH 5.0 ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 เลี้ยงราไมคอร์ไรซา ที่ได้จากการทดลองที่ 1 บนอาหาร PDA นาน 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะเส้นใยเชื้อราวางลงบนอาหาร oat meal agar ด้านนอกกระดาษกรอง และวางไว้ในที่มีดจนกระทั่งเมล็ดกล้วยไม้งอก บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดกล้วยไม้

2.3 สำหรับ control ให้เพาะเมล็ดกล้วยไม้วางบนกระดาษกรองเช่นเดียวกัน แต่ไม่ต้องใส่ราไมคอร์ไรซา

ศึกษาการพัฒนาการเจริญเติบโตของเมล็ดกล้วยไม้ในระยะต่างที่พัฒนาการจากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบ symbiosis

2.4 ย้ายต้นกล้าที่มีรากและใบจริง ออกปลูกในสภาพภายนอก ในเรือนทดลอง และตรวจสอบ เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

### เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มต้น – สิ้นสุด  
ตุลาคม 2552 – กันยายน 2555

### สถานที่

แปลงปลูกกล้วยไม้และแหล่งธรรมชาติ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลจากการแยกรารากรากกล้วยไม้ 5 ชนิด โดยแยกรารากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ ได้ราทั้งหมด 13 สายพันธุ์ ดังนี้

รองเท้านารีฝ้ายหอย จากจังหวัดกระบี่ แยกได้รา 4 ไอโซเลท โคลนินบนอาหาร PDA สีขาวเจริญได้อาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือวุ้นอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน (concentric zonation)

รองเท้านารีเหลืองกระบี่ จากจังหวัดกระบี่ แยกได้รา 4 ไอโซเลท โคลนินบนอาหาร PDA สีขาว ได้อาหาร มีบางส่วนเจริญเหนือวุ้นอาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน

cymbidium จาก จังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 3 ชนิด ได้ราไมคอร์ไรซาได้ 5 ไอโซเลท

เลี้ยงราบนอาหาร V8-juice, PDA และ CMA เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ และเลี้ยงราไมคอร์ไรซาให้บริสุทธิ์ เก็บรักษาราไมคอร์ไรซา จำนวน 13 isolates 2 วิธี

- บน slant PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
- เก็บไว้ในใน glycerol ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลจากการแยกรากจากรากกล้วยไม้ 5 ชนิด โดยแยกรากจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ ได้ราทั้งหมด 13 สายพันธุ์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ และเก็บรักษารากไมคอร์ไรซา บน slant PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ในใน glycerol ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

### เอกสารอ้างอิง

- Athipunyakom, P., L. Manoch, M. Tanticharoen. 2001. Diversity of orchid mycorrhiza in Thailand, pp. 41. *In* Program and Extended Abstract of the First International Orchid Conservation Congress, Perth, Australia, September 2002.
- Bernard, N. 1909. L' evolution dans la symbiose des orchide'es et leur champignons commensaux. Ann. Sci. Nat. Paris 9. Se'r. 9 : 1-196.
- Currah, R.S., Smreciu, A , and Hambleton, S. 1990. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). Can. J. Bot. 68 : 1171-1181.
- Hadley, G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. New Phytol., 69 ; 1015
- Manoch, L., P. Athipunyakom and M. Tanticharoen. 2000. *Rhizoctonia* – like fungi associated terrestrial orchid in Thailand, pp. 63 *In* the 3<sup>rd</sup> International Symposium on *Rhizoctonia* (ISR 2000), National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan (ROC), 17-20 August 2000.
- Warcup, J.H. 1971. Specificity of mycorrhizal association in Australian terrestrial orchids. New Phytol. 70 : 41.
- Warcup, J.H. 1973. Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. New Phytol. 72 : 387-392.