บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 ลักษณะของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้

ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (orchid mycorrhiza) ส่วนมากเป็นราในกลุ่ม Basidiomycetes โดยมีราไมคอร์ไรซาที่เป็น ascomycete อยู่บ้างเช่น *Tuber* spp. ที่อาศัยอยู่ร่วมกับกล้วยไม้สกุล *Epipactis* (Bidartondo et al. 2004; Selosse et al. 2004) ลักษณะพิเศษของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ ได้แก่ การสร้างเส้นใยขดเป็นวงที่เรียกว่า hyphal coil หรือ peloton ในเซลล์บริเวณ cortex ของราก ลำต้น หรือโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ (Brundrett 2007) ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ส่วนใหญ่มีลักษณะร่วมกันคือ 1) มีการแตกแขนงของเส้นใย (hyphal branching) เป็นมุมฉาก 2) มีรอยคอดในบริเวณที่เส้นใยแตกแขนง 3) แขนงเส้นใยมีผนังกั้น (septum) ใกล้จุดกำเนิด 4) มักมีการสร้างเซลล์สั้น ๆ กลม ๆ ที่เรียกว่า monilioid cells ต่อกันเป็นลูกโซ่ และ 5) มักพบเฉพาะระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) เท่านั้น จึงถูกจำแนกให้อยู่ร่วมกันในสกุลจัดตั้ง (form-genus) *Rhizoctonia* (Otero et al. 2002)

ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกชนิดรา *Rhizoctonia* ได้แก่

1) จำนวนนิวเคลียส (nucleus) ในเซลล์บริเวณปลายของเส้นใย โดย *Rhizoctonia* ที่เซลล์มีจำนวนนิวเคลียสมากกว่า 2 นิวเคลียส (multinucleate) ได้แก่ *Rhizoctonia solani* [ชื่อราที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) คือ *Thanatephorus cucumeris* วงศ์ Ceratobasidiaceae], *Rhizoctonia zeae* และ *Rhizoctonia oryzae* ราในสกุล *Ceratobasidium* (วงศ์ Ceratobasidiaceae) ส่วนใหญ่ และราในสกุล *Tulasnella* (วงศ์ Tulasnellaceae) มี 2 นิวเคลียส (binucleate) *Rhizoctonia* ที่มี 1 นิวเคลียสพบในสกุล *Ceratobasidium* แต่มีรายงานน้อยมาก (Hietala et al. 1994)

2) การรวมตัวกันของเส้นใย (hyphal anastomosis) *R. solani* สามารถแยกเป็นกลุ่มที่เส้นใยไม่สามารถรวมตัวกัน (incompatibility anastomosis group, AG) ได้ 12 กลุ่ม (Carling et al. 1999; Sneh et al. 1991), *R. zeae* จัดเป็น AG 1 กลุ่ม, และ *R. oryzae* จัดเป็น AG 1 กลุ่ม; *R. repens* (ชื่อ anamorph คือ *Epulorhiza repens* ชื่อ teleomorph คือ *Tulasnella calospora* วงศ์ Tulasnellaceae) จัดเป็น AG 2 กลุ่ม, *Ceratorhiza* spp. (ชื่อ teleomorph ของบางชนิด คือ *Ceratobasidium* spp. วงศ์ Ceratobasidiaceae และบางชนิดไม่ทราบชื่อ teleomorph) แบ่งเป็น 21 กลุ่ม; *Rhizoctonia* ที่มี 1 นิวเคลียส (uninucleate) มีรายงาน AG 1 กลุ่ม (Hietala et al. 1994; Sneh et al. 1991)

3) ลักษณะอื่น ๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดราได้แก่ ลักษณะพื้นผิว สี แบบแผนและอัตราการเจริญของกลุ่มเส้นใย (mycelium) และโคโลนี (colony) และโครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของผนังกั้นเส้นใย เป็นต้น (Andersen 1996; Athipunyakom 2004; Athipunyakom et al. 2004a, b; Currah et al. 1990; Currah and Zelmer 1992, Moore 1987; Zelmer and Currah 1995)

การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดคือ ราไมคอร์ไรซามีลักษณะที่สามารถใช้จำแนกชนิดจำกัด การชักนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมักไม่ประสบความสำเร็จ และการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถจำแนกเชื้อราบางกลุ่มในระดับที่ต่ำกว่าสกุล (Athipunyakom 2004; Ma et al. 2003; Otero et al. 2002; Rasmussen 2002)

2.2 การแยก การเลี้ยงและการเก็บเชื้อพันธุ์ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้

การแยกราไมคอร์ไรซากล้วยไม้สามารถทำได้ 2 วิธี คือ 1) แยก peloton จากโปรโตคอ์ม (protocorm) หรือเนื้อเยื่อชั้น cortex ของรากออกมาเลี้ยง (Warcup and Talbot 1967) ข้อดีของวิธีนี้คือ ราที่เจริญออกมาจาก peloton จะเป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้แน่นอน แต่กล้วยไม้อิงอาศัยหลายชนิดมี peloton ข้างน้อย วิธีนี้จึงไม่เหมาะสม (Bayman et al. 2002; Otero et al. 2002, 2007); 2) การแยกราไมคอร์ไรซากล้วยไม้อาจทำได้โดยการวางรากที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ บนอาหารเลี้ยง จากนั้นจึงสังเกตเส้นใยที่เจริญออกมาจากชิ้นราก บริเวณปลายของเส้นใยของราที่มีลักษณะของ *Rhizoctonia* จะถูกตัดไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ (Otero et al. 2002, 2007)

ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ส่วนมากสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) อย่างไรก็ดี มีรายงานว่าราเอนโดไฟต์ (endophyte) และไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้บางชนิดจะเจริญบนอาหารเลี้ยงที่มีการเติม กรดอะมิโนและวิตามิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง thiamine เท่านั้น (Hadley and Ong 1978; Hijner and Arditti 1973)

การเก็บเชื้อพันธุ์ราไมคอร์ไรซาสามารถทำได้หลายวิธีเช่น 1) การเลี้ยงบน PDA ที่อุณหภูมิหรือการเลี้ยงบน PDA slant ที่ปิดทับด้วยพาราฟินเหลว ที่อุณหภูมิ 15°C (Athipunyakom 2004) วิธีนี้จะต้องมีการตัดแยกเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุก 6 เดือน 2) การใช้อุณหภูมิต่ำแบบยิ่งยวด เช่น การเก็บโดยการแช่แข็งกลุ่มของเส้นใยใน 10% กลีเซอรอลแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C หรือในไนโตรเจนเหลว (Sneh et al. 1991) วิธีนี้ต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะ และ 3) การเก็บในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วิธีนี้ไม่ยุ่งยาก อาจเก็บเชื้อพันธุ์ราได้นานถึง 2 ปี (Dr. Kevin Hyde และ Mr. Sittisack Phoulivong, การติดต่อส่วนตัว)

2.3 เทคนิคทางชีวโมเลกุลสำหรับการจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซากล้วยไม้

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้จัดกลุ่มและจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ เทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงสุดเทคนิคหนึ่ง ได้แก่ การใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อดีเอ็นเอของเชื้อรา (fungal primers) และเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณที่สนใจจากดีเอ็นเอที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ที่มีราไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ควบคู่กับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) และการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ยีน (gene) ที่นิยมใช้ ได้แก่ ยีนที่ถอดรหัสให้อาร์เอ็นเอชนิดที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซมในนิวเคลียส (nuclear ribosomal DNA, rDNA) นิยมใช้เพื่อการจำแนกเชื้อราในระดับคลาส (class) และออร์เดอร์ (order) (ตัวอย่างเช่น Swann and Taylor 1993; Wilmotte et al. 1993) ยีนที่ถอดรหัสให้อาร์เอ็นเอชนิดที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซมในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial rDNA, mt rDNA) นิยมใช้เพื่อการจำแนกราในระดับตั้งแต่วงศ์ (family) ลงมา (ตัวอย่างเช่น Hong and Jeong 2002; Kristiansen 2001, 2004) และบริเวณ ITS-5.8S rDNA (internal transcribed spacer และ 5.8S ribosomal DNA) นิยมใช้เพื่อการจำแนกเชื้อราในระดับสกุลและชนิด (ตัวอย่างเช่น Taylor and McCormick 2008) การใช้ ITS-5.8S rDNA ยังมีข้อได้เปรียบคือ ฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อราค่อนข้างจะสมบูรณ์กว่ากว่าฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่น ๆ

การเลี้ยงราเพื่อเก็บเส้นใยเพื่อการสกัดดีเอ็นเอส่วนมากจะใช้วิธีของ Cenis 1992 โดยเลี้ยงราในอาหารเหลว (ตัวอย่างเช่น Bonnardeaux et al. 2007; Ma et al. 2003; Shimura et al. 2009) ข้อเสียของวิธีนี้คือไม่สามารถยืนยันได้ว่าราในอาหารเหลวเป็นราที่ต้องการศึกษาหรือราชนิดอื่นที่ปนเปื้อน เนื่องจากราที่เจริญบนอาหารกึ่งแข็งกับราที่เจริญในอาหารเหลวอาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน อีกวิธีหนึ่งคือการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากรากพืช (Shefferson et al. 2005; Shefferson et al. 2007) วิธีนี้มีข้อเสียคือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะมีดีเอ็นเอของรากพืชปะปนในปริมาณมากและ/หรืออาจมีดีเอ็นเอของราที่เป็นโรคพืชปะปน ทำให้ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากเทคนิคพีซีอาร์อาจไม่ใช่ส่วนของดีเอ็นเอของราที่ต้องการศึกษา วิธีที่สามคือการเก็บเส้นใยที่เจริญบนอาหารหรือชูขึ้นมาในอากาศ (aerial hypha) อย่างไรก็ตามราไมคอร์ไรซากล้วยไม้หลายชนิดเจริญติดอาหารทำให้ไม่สามารถจะเก็บด้วยวิธีนี้ หากตัดเส้นใยที่ติดอาหาร วุ้นในอาหารจะเป็นอุปสรรคต่อการสกัดดีเอ็นเอ

เทคนิคพีซีอาร์ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ และการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการได้ถูกนำมาใช้เพื่อการจำแนกชนิดของรา บริเวณหนึ่งที่นิยมใช้เพื่อวัตถุประสงค์นี้คือ ITS-5.8S rDNA ไพร์เมอร์สำหรับเทคนิคพีซีอาร์ที่นิยมใช้ได้แก่ ITS1 และ ITS4 (White et al. 1990) แต่ไพรเมอร์คู่นี้ไม่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของรา ไพรเมอร์ ITS1-F และ ITS4B (Gardes and Bruns 1993) ซึ่ง

ลดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืช แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของราในกลุ่ม Tulasnellaceae ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไพร์เมอร์ของ Taylor and McCormick 2007 เป็นไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อราและสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของราในกลุ่ม Tulasnellaceae ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การค้นหาชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาสามารถทำได้โดยใช้ BLAST Searches (Atschul et al. 1997) ค้นหาจากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) การสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการสามารถใช้เพื่อตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิตและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ แต่เนื่องจากลำดับดีเอ็นเอในบริเวณ ITS-5.8S rDNA ของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้กลุ่มต่าง ๆ มีความแตกต่าง (diverse) กันมาก ผู้ศึกษาจึงมักใช้ข้อมูลจากลำดับดีเอ็นเอเฉพาะ 5.8S rDNA เพื่อคำนวณหา maximum parsimony tree ของราทั้งหมดที่ต้องการศึกษาก่อน จากนั้นจึงใช้ข้อมูลจากลำดับดีเอ็นเอบริเวณ ITS-5.8S rDNA เพื่อคำนวณหาความสัมพันธ์ของสมาชิกในแต่ละ clade หลัก (Shefferson et al. 2007; Suarez et al. 2006; Taylor and McCormick 2008)

2.4 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับราไมคอร์ไรซา

เมล็ดกล้วยไม้ส่วนมากมีขนาดเล็กและมีอาหารสะสมน้อยมาก ในธรรมชาติเมล็ดและโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ต้องได้รับคาร์บอน ไนโตรเจน และธาตุอาหารอื่น ๆ จากราไมคอร์ไรซาเพื่อการงอกและการเจริญเติบโต (Cameron et al. 2006; Gebauer and Meyer 2003; Rasmussen 2002) การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในห้องปฏิบัติการอาจทำได้โดยการเลี้ยงร่วมกับรา (symbiotic seed germination) หรือการใช้อาหารสังเคราะห์ (asymbiotic seed germination) (Rasmussen 1995; Yam and Arditti 2009) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับราไมคอร์ไรซาและการใช้อาหารสังเคราะห์พบว่า การเลี้ยงร่วมกับราเป็นวิธีที่ดีกว่า เพราะโปรโตคอร์มที่มีราสามารถเจริญและพัฒนาได้รวดเร็วกว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (Johnson et al. 2007; Muir 1989; Rasmussen et al. 1990) นอกจากนี้ต้นอ่อนของกล้วยไม้ที่มีราเจริญอยู่ยังสามารถทำหน้าที่เพาะราที่มีประโยชน์ในดินและวัสดุปลูก (Johnson et al. 2007; Stewart and Zettler 2002)

อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้แต่ละชนิดมีความจำเพาะเจาะจงต่อราแตกต่างกัน Warcup (1973) รายงานว่าการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสกุล *Pterostylis* และ *Diuris* ถูกกระตุ้นโดยราชนิด *Ceratobasidium cornigerum* และ *Tulasnella calospora* ตามลำดับ แต่การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสกุล *Thelymitra* สามารถถูกกระตุ้นโดยราในสกุล *Tulasnella* หลายชนิดแต่ไม่ถูกกระตุ้นโดยรา *C. cornigerum* Bonnardeaux et al. (2007) ทดสอบความเข้ากันได้

(compatibility) ระหว่างกล้วยไม้ดิน 6 ชนิดและรา 12 ชนิด (ได้แก่ รา *Ceratobasidium* 1 ไอโซเลต , รา *Sebacina* 2 ไอโซเลต, รา *Epulorhiza* 8 ไอโซเลต และราในกลุ่ม ascomycete 1 ไอโซเลต) พบว่า *Disa bracteata* และกล้วยไม้พื้นเมืองของออสเตรเลีย *Microtis media* เข้ากันได้อย่างสมบูรณ์หรือบางส่วนกับราทั้งหมดที่ศึกษา แต่กล้วยไม้ชนิด *Pterostylis sanguinea* และ *Caladenia falcata* งอกเฉพาะในชุดทดลองที่มีการปลูกราในกลุ่ม *Ceratobasidium* และ *Sebacina* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าราชนิดเดียวกันแต่ต่างไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เมล็ดงอกแตกต่างกัน (Stewart and Kane 2006; Warcup 1973) และไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เมล็ดงอกสูงสุดไม่จำเป็นต้องเป็นไอโซเลตที่แยกจากกล้วยไม้ชนิดเดียวกัน (Warcup 1973) ดังนั้นความสำเร็จของการเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อราขึ้นอยู่กับการใช้ไอโซเลตของราที่เหมาะสม