

บทที่ 4 ผลการวิจัย



4.1 รากรากตัวอย่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากที่แยกได้

พบว่า รากของกล้วยไม้ดินที่ศึกษา (ได้แก่ รองเท้านารี กระแจะร้อนนิล และกล้วยไม้ลูกผสม สกุลซิมบิเดียม) มีขดเส้นใยของราหรือ peloton ใน cortical cells เกือบทุกราก ในขณะที่กล้วยไม้ อิงอาศัยจะมีราเฉพาะรากที่สัมผัสกับวัสดุปลูกโดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Goh et al. (1992) และ Porras-Alfano and Bayman (2007) สำหรับกล้วยไม้ชนิดเดียวกันที่เก็บ จากบริเวณเดียวกัน เฉพาะรา *Rhizoctonia*-like ที่มีลักษณะของโคโลนีหรือเส้นใยที่แตกต่างกันจะ ได้รับรหัสไอโซเลตที่แตกต่างกัน (ดูรหัสไอโซเลตในตารางที่ 4-1) ราเหล่านี้จะถูกเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อเก็บเส้นใยสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ รา *Rhizoctonia*-like ที่แยกได้จากงานวิจัยนี้มีจำนวน ทั้งสิ้น 27 ไอโซเลต รากตัวอย่างของกล้วยไม้ชนิดเดียวกันอาจให้ รา *Rhizoctonia*-like จำนวน 1-3 ไอโซเลต เนื่องจากราไอโซเลต CI-QS-0-1 และ CI-QS-0-2 เจริญเติบโตช้ามากบนอาหาร PDA (อัตราการเจริญของโคโลนี 0.6 มิลลิเมตร/วัน) จึงมีการเติมวิตามินผสมที่ใช้สำหรับอาหาร MS มี รายงานว่า กรดอะมิโนและวิตามิน โดยเฉพาะ thiamine จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเอนโด ไฟต์กล้วยไม้และรา *Rhizoctonia* (Hadley and Ong 1978; Hijner and Arditti 1973) โคโลนีของ ราไอโซเลต CI-QS-0-1 และ CI-QS-0-2 ที่เลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมวิตามิน มีอัตราการเจริญของ โคโลนีที่ 1.1 และ 1.2 มิลลิเมตร/วัน ตามลำดับ

ผู้วิจัยสามารถจัดกลุ่ม รา *Rhizoctonia*-like บางไอโซเลตตามลักษณะของโคโลนีและเส้นใย (ดูภาพที่ 4-1) ได้แก่

(1) Pca-QS-0-1, Pch-QS-0-3, และ Pe-QS-0-1 มีสีโคโลนีตั้งแต่เหลืองอ่อน (light buff) ถึงสีส้ม มี monilioid cells รูป obovoid, fusiform หรือ irregular ขนาด 5-11 x 12-27 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสายสั้น ๆ อาจมีการแตกแขนงหรือไม่มี เส้นใยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4.5 ไมโครเมตร เนื่องจากมีลักษณะคล้ายคลึงกับไอโซเลต *Epulorhiza calendulina*-like ที่รายงานโดย Ma et al. (2003) รากลุ่มนี้จึงอาจเป็น *Epulorhiza calendulina*-like *Rhizotonia*

(2) D1-KT-TC-1 and C3-DT-TC-2 เจริญเติบโตช้าคือตั้งแต่ 2-3 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีอายุ 3 สัปดาห์มีสีขาวถึงสีเทาอ่อน (light beige) ขอบโคโลนีไม่สม่ำเสมอ (irregular) เส้นใย มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 ไมโครเมตร monilioid cells รูปรี (ellipsoidal) ขนาด 6-10 x 8-12 ไมโครเมตรอาจมีการแตกแขนงหรือไม่มี

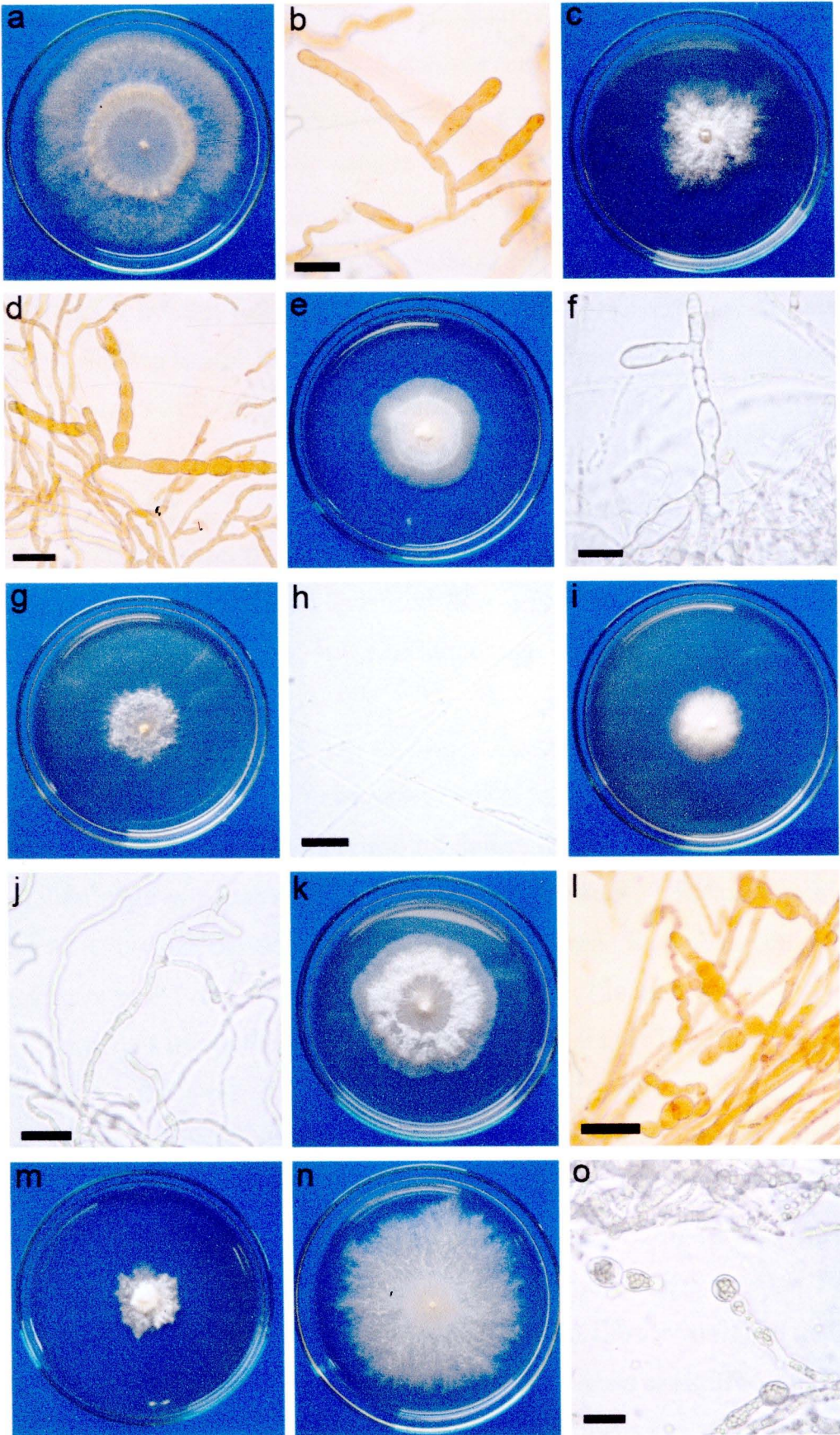
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่.....
เลขทะเบียน..... 246853
เลขเรียกหนังสือ.....

ตารางที่ 4-1 รหัสของไอโซเลตของราจากงานวิจัยนี้และชนิด/ลูกผสมกล้วยไม้ บริเวณที่เก็บตัวอย่างและที่มาดั้งเดิมของต้นกล้วยไม้

รหัสของไอโซเลต ^a	ชนิด/ลูกผสมกล้วยไม้ ^b	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง ^b	ที่มาของต้นกล้วยไม้ ^b
CI-QS-0-1 [*] , CI-QS-0-2 [*]	CI	QS	0
Cs-QS-0-1	Cs	QS	0
Ct-PC-1-1	Ct	PC	1
C1-DT-TC-1	C1	DT	TC
C2-DT-TC-1	C2	DT	TC
C3-DT-TC-1, C3-DT-TC-2	C3	DT	TC
Da-KP-0-1	Da	KP	0
Dcr-QS-0-1, Dcr-QS-0-2	Dcr	QS	0
Df-QS-3-1	Df	QS	3
D1-KT-TC-1	D1	KT	TC
Pca-QS-0-1	Pca	QS	0
Pch-SM-TC-1	Pch	SM	TC
Pch-QS-0-1 [*] , Pch-QS-0-2 [*] , Pch-QS-0-3	Pch	QS	0
Pe-QS-0-1	Pe	QS	0
Ps-KT-0-1	Ps	KT	0
Ps-AT-0-1 [*] , Ps-AT-0-2 [*]	Ps	AT	0
Pv-PC-2-1, Pv-PC-2-2	Pv	PC	2
Pv-PC-1-1	Pv	PC	1
Pv-QS-0-1 [*] , Pv-QS-0-2 [*]	Pv	QS	0

^aรหัสของไอโซเลตของรามาจาก รหัสของชนิด/ลูกผสมกล้วยไม้-รหัสของบริเวณที่เก็บตัวอย่าง-รหัสของที่มาของต้นกล้วยไม้-ลำดับของราที่แยกได้จากกล้วยไม้ชนิด/ลูกผสมนั้น ๆ ไอโซเลตของราที่มีเครื่องหมาย “*” ในแถวเดียวกันหมายถึงถูกแยกมาจากรากเดียวกัน

^bรหัสของชนิด/ลูกผสมกล้วยไม้ รหัสของบริเวณที่เก็บตัวอย่าง และ รหัสของที่มาของต้นกล้วยไม้ ดูตารางที่ 3-1



(ภาพที่ 4-1 ดูคำบรรยายภาพในหน้าถัดไป)

ภาพที่ 4-1 ตัวอย่างโคโลนีและลักษณะทางจุลทรรศน์ของรา *Rhizoctonia*-like จากงานวิจัยนี้. a โคโลนีของไอโซเลต Pe-QS-0-1 อายุ 14 วัน. b Monilioid cells ของไอโซเลต Pe-QS-0-1 ย้อมด้วย alkaline safranin O. c โคโลนีของไอโซเลต D1-KT-TC-1 อายุ 12 วัน. d Monilioid cells ของไอโซเลต C3-DT-TC-2 ย้อมด้วย alkaline safranin O. e โคโลนีของ Df-QS-3-1 อายุ 22 วัน. f Monilioid cells ของ Df-QS-3-1. g โคโลนีของ CI-QS-0-1 อายุ 18 วัน. h การแตกแขนงของเส้นใยของไอโซเลต CI-QS-0-1. i โคโลนีของไอโซเลต CI-QS-0-2 อายุ 18 วัน. j Monilioid cells ของไอโซเลต CI-QS-0-2. k โคโลนีของไอโซเลต C1-DT-TC-1 อายุ 13 วัน. l Monilioid cells ของไอโซเลต C1-DTTC-1 ย้อมด้วย alkaline safranin O. m โคโลนีของไอโซเลต C2-DTTC-1 อายุ 29 วัน. n โคโลนีของไอโซเลต Pv-QS-0-1 อายุ 14 วัน. o Monilioid cells ของไอโซเลต Pv-QS-0-1 Bars มีขนาด 20 ไมโครเมตร

(3) Pv-QS-0-2 และ Df-QS-3-1 มีโคโลนีแบน (appressed colony) และขอบจมในวุ้นอาหาร (submerged margin) โคโลนี สีขาวถึงเทา (beige) อัตราการเจริญ 1.8-1.9 มิลลิเมตรต่อวัน เส้นใยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 ไมโครเมตรและมักมี oil globule มี monilioid cells รูป irregular

(4) Cs-QS-0-1, Da-KP-0-1, Dcr-QS-0-1, DCr-QS-0-2, Pch-SM-TC-1, Pch-QS-0-1, Pch-QS-0-2, Ps-KT-0-1, Ps-AT-0-1, Ps-AT-0-2, Pv-PC-2-1, Pv-PC-2-2 และ Pv-PC-1-1 มีลักษณะของ *Epulorhiza repens* คือ เจริญที่ 3-9 มิลลิเมตรต่อวัน สีของโคโลนีตั้งแต่ขาวถึงเทา (beige) มีเส้นใยชนิด aerial และ submerged เส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 2-9 มิลลิเมตร โคโลนีของไอโซเลต Ps-KT-0-1 และ Dcr-QS-0-2 แสดง concentric zonation มี monilioid cells รูปรีหรือกลม (globose) ขนาด 6-14 x 10-25 ไมโครเมตร พบ sclerotia ใน 7 ไอโซเลต

จำนวน 8 ไอโซเลตไม่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถใช้จัดกลุ่มหรือระบุชนิดได้แก่ CI-QS-0-1, CI-QS-0-2, C1-DT-TC-1, C2-DT-TC-1, C3-DT-TC-1, Ct-PC-1-1, และ Pv-QS-0-1 ไอโซเลต CI-QS-0-1 ไม่พบ monilioid cell มีเส้นใยขนาด 1.2-4 ไมโครเมตร ราไอโซเลต CI-QS-0-2 มีเส้นใยขนาดเล็กมากคือ 1.7-2.4 ไมโครเมตร และมี monilioid cells รูป irregular ที่ปลายของเส้นใยหลัก ราไอโซเลต C1-DT-TC-1, C2-DT-TC-1 และ C3-DT-TC-1 มีเส้นใยขนาด 3-4 ไมโครเมตร เฉพาะ C3-DT-TC-1 พบ monilioid cells รูป obovate หรือรูปรี สายสั้น ๆ ราไอโซเลต Ct-PC-1-1 ไม่พบ monilioid cell และราไอโซเลต Pv-QS-0-2 มีอัตราการเจริญที่ 6 มิลลิเมตรต่อวัน เส้นใยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-4 ไมโครเมตร มี monilioid cells รูปรีถึงกลมขนาด 9-13 x 9-18 ไมโครเมตร ราทุกไอโซเลตที่แยกได้จากงานวิจัยนี้มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียสในเซลล์บริเวณปลายของเส้นใย

4.2 การสกัดดีเอ็นเอ เทคนิคพีซีอาร์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เนื่องจากรา *Rhizoctonia*-like ที่แยกได้ไม่เจริญเติบโตในอาหารเหลว จึงแก้ปัญหาด้วยการเลี้ยงรบนบน PDA และเก็บเส้นใยจากโคโลนีบน PDA โดยตรง (ดูหัวข้อ 3.3) พบว่าเส้นใยที่ได้จากวิธีนี้เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ แม้ว่า Taylor and McCormick (2008) ได้รายงานว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ ITS1-OF (ได้จากการผสมไพรเมอร์ ITS1-OF-1 และ ITS1-OF-2) และ ITS4-OF เพิ่มปริมาณราในกลุ่ม Basidiomycota ที่ศึกษาทุกชนิด ผู้วิจัยพบว่าสำหรับรบบางไอโซเลต 1) การใช้ไพรเมอร์ ITS1-OF-1 หรือ ITS1-OF-2 เพียงไพรเมอร์เดียวและ ITS4-OF และ 2) การใช้ไพรเมอร์ ITS1-OF-1 และไพรเมอร์ ITS4 สามารถเพิ่มความเฉพาะเจาะจงและประสิทธิภาพของพีซีอาร์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ ถูกเก็บใน GenBank Database ภายใต้ accession number GU166403-GU166429 ผลของ BLAST Searches แสดงไว้ในตารางที่ 4-2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ยืนยันว่าราไอโซเลต Pca-QS-0-1, Pch-QS-0-3 และ Pe-QS-0-1 คือ *E. calendulina*-like สำหรับราไอโซเลต Pv-QS-0-1 แม้ว่าจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S rDNA ใกล้เคียงกับ ราชชนิด *E. calendulina*-like แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA มีความคล้ายคลึงกับราชชนิดนี้เพียง 65% ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของราไอโซเลต D1-KT-TC-1 และ C3-DT-TC-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Tulasnella irregularis* 99% และ 100% ตามลำดับ แต่เนื่องจากราทั้งสองไอโซเลตนี้ไม่สร้าง sexual spore จึงน่าจะเป็น anamorph ของ *T. irregularis* ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของราไอโซเลต Pv-QS-0-2 และ Df-QS-3-1 คล้ายคลึงกับราชชนิด *Tulasnella violea* ใน GenBank (accession numbers DQ457643 และ AY373303) มากที่สุด แต่มี sequence identity เพียง 88% สำหรับราไอโซเลต C1-DT-TC-1, C2-DT-TC-1 และ C3-DT-TC-1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของ *T. violea* ที่ 85%, 87% และ 84% ตามลำดับ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของราชชนิด *T. violea* สองไอโซเลตใน GenBank ที่รายงานโดยผู้เขียนต่างคนละกันมี sequence identity 100% ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ยืนยันว่า ราไอโซเลต Cs-QS-0-1, Da-KP-0-1, Dcr-QS-0-1, DCr-QS-0-2, Pch-SM-TC-1, Pch-QS-0-1, Pch-QS-0-2, Ps-KT-0-1, Ps-AT-0-1, Ps-AT-0-2, Pv-PC-2-1, Pv-PC-2-2 และ Pv-PC-1-1 ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับ *E. repens* และราไอโซเลต Ct-PC-1-1 เป็นราชชนิด *E. repens* นอกจากนี้ ไม่พบว่ามีราชชนิดใดใน GenBank Database ซึ่งมี ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA คล้ายคลึงกับราไอโซเลต Cl-QS-0-1 และ Cl-QS-0-2

Fungal isolate	Query ^a	Close relative	Percentage identity, Gaps	Reference
CI-QS-0-1	(1)	DQ925494 Uncultured Tulasnellaceae	81% (516/633), Gaps 7% (48/633)	Shefferson et al. 2007
	(2)	AY373316 <i>Tulasnella</i> sp.	98% (158/160), Gaps 0% (0/160)	McCormick et al. 2004
CI-QS-0-2	(1)	DQ178072 Uncultured <i>Tulasnella</i>	83% (504/605), Gaps 6% (39/605)	Suarez et al. 2006
	(2)	DQ178081 Uncultured <i>Tulasnella</i>	99% (168/169), Gaps 0% (0/169)	Suarez et al. 2006
	(2)	DQ457642 <i>Tulasnella pruinosa</i>	98% (167/169), Gaps 0% (0/169)	Matheny et al. 2006
Cs-QS-0-1	(1)	AJ313446 <i>Epulorhiza</i> sp. Nq	96% (604/628), Gaps 0% (6/628)	Ma et al. 2003
	(2)	EU218888 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (160/162), Gaps 0% (0/160)	Taylor and McCormick 2008
Ct-PC-1-1	(1)	DQ388045 <i>Tulasnella calospora</i>	95% (587/615), Gaps 2% (16/615)	Suarez et al. 2006
	(2)	EU218888 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (160/160), Gaps 0% (0/160)	Taylor and McCormick 2008
C1-DT-TC-1	(1)	DQ457642 <i>Tulasnella pruinosa</i>	85% (516/607), Gaps 8% (52/607)	Matheny et al. 2006
	(2)	DQ457642 <i>Tulasnella pruinosa</i>	98% (166/168), Gaps 0% (0/168)	Matheny et al. 2006
C2-DT-TC-1	(1)	DQ388047 <i>Tulasnella asymmetrica</i>	87% (482/552), Gaps 5% (29/552)	Suarez et al. 2006
	(2)	DQ457642 <i>Tulasnella pruinosa</i>	98% (166/168), Gaps 0% (0/168)	Matheny et al. 2006
C3-DT-TC-1	(1)	DQ457642 <i>Tulasnella pruinosa</i>	84% (511/603), Gaps 8% (52/603)	Matheny et al. 2006
	(2)	DQ457642 <i>Tulasnella pruinosa</i>	98% (165/167), Gaps 0% (0/167)	Matheny et al. 2006
C3-DT-TC-2	(1)	EU218889 <i>Tulasnella irregularis</i>	99% (470/471), Gaps 0% (0/471)	Taylor and McCormick 2008
	(2)	EU218889 <i>Tulasnella irregularis</i>	100% (156/156), Gaps 0% (0/156)	Taylor and McCormick 2008

^a Query type: (1) ITS-5.8S rDNA; (2) 5.8S rDNA

ตารางที่ 4-2 ผลของ BLAST Searches (ต่อ)

Fungal isolate	Query ^a	Close relative	Percentage identity, Gaps	Reference
Da-KP-0-1	(1)	AJ313446 <i>Epulorhiza</i> sp. Nq	96% (621/642), Gaps 0% (6/642)	Ma et al. 2003
	(2)	EU218888 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (159/159), Gaps 0% (0/159)	Taylor and McCormick 2008
Dcr-QS-0-1	(1)	AB369940 <i>Tulasnella calospora</i>	87% (590/675), Gaps 5% (40/675)	Shimura et al. 2009
	(2)	AB369940 <i>Tulasnella calospora</i>	99% (159/160), Gaps 0% (0/160)	Shimura et al. 2009
Dcr-QS-0-2	(1)	DQ388041 <i>Tulasnella calospora</i>	96% (552/574), Gaps 1% (11/574)	Suarez et al. 2006
	(2)	DQ388041 <i>Tulasnella calospora</i>	99% (159/160), Gaps 0% (0/160)	Suarez et al. 2006
Df-QS-3-1	(1)	AY373303 <i>Tulasnella violea</i>	88% (438/496), Gaps 6% (31/496)	McCormick et al. 2004
	(2)	DQ457642 <i>Tulasnella pruinosa</i>	98% (167/169), Gaps 0% (0/169)	Matheny et al. 2006
D1-KT-TC-1	(1)	EU218889 <i>Tulasnella irregularis</i>	99% (509/512), Gaps 0% (2/512)	Taylor and McCormick 2008
	(2)	EU218889 <i>Tulasnella irregularis</i>	100% (156/156), Gaps 0% (0/156)	Taylor and McCormick 2008
Pca-QS-0-1	(1)	AJ313446 <i>Epulorhiza</i> sp. Nq	96% (604/628), Gaps 0% (6/628)	Ma et al. 2003
	(2)	AJ313459 <i>Epulorhiza</i> sp. H21	99% (169/170), Gaps 0% (0/170)	Ma et al. 2003
Pch-SM-TC-1	(1)	AJ313446 <i>Epulorhiza</i> sp. Nq	97% (573/586), Gaps 0% (4/586)	Ma et al. 2003
	(2)	DQ388041 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (159/159), Gaps 0% (0/159)	Suarez et al. 2006
Pch-QS-0-1	(1)	AJ313445 <i>Epulorhiza</i> sp. B1	98% (629/637), Gaps 0% (0/637)	Ma et al. 2003
	(2)	EU218888 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (160/160), Gaps 0% (0/160)	Taylor and McCormick 2008

^a Query type: (1) ITS-5.8S rDNA; (2) 5.8S rDNA

ตารางที่ 4-2 ผลของ BLAST Searches (ต่อ)

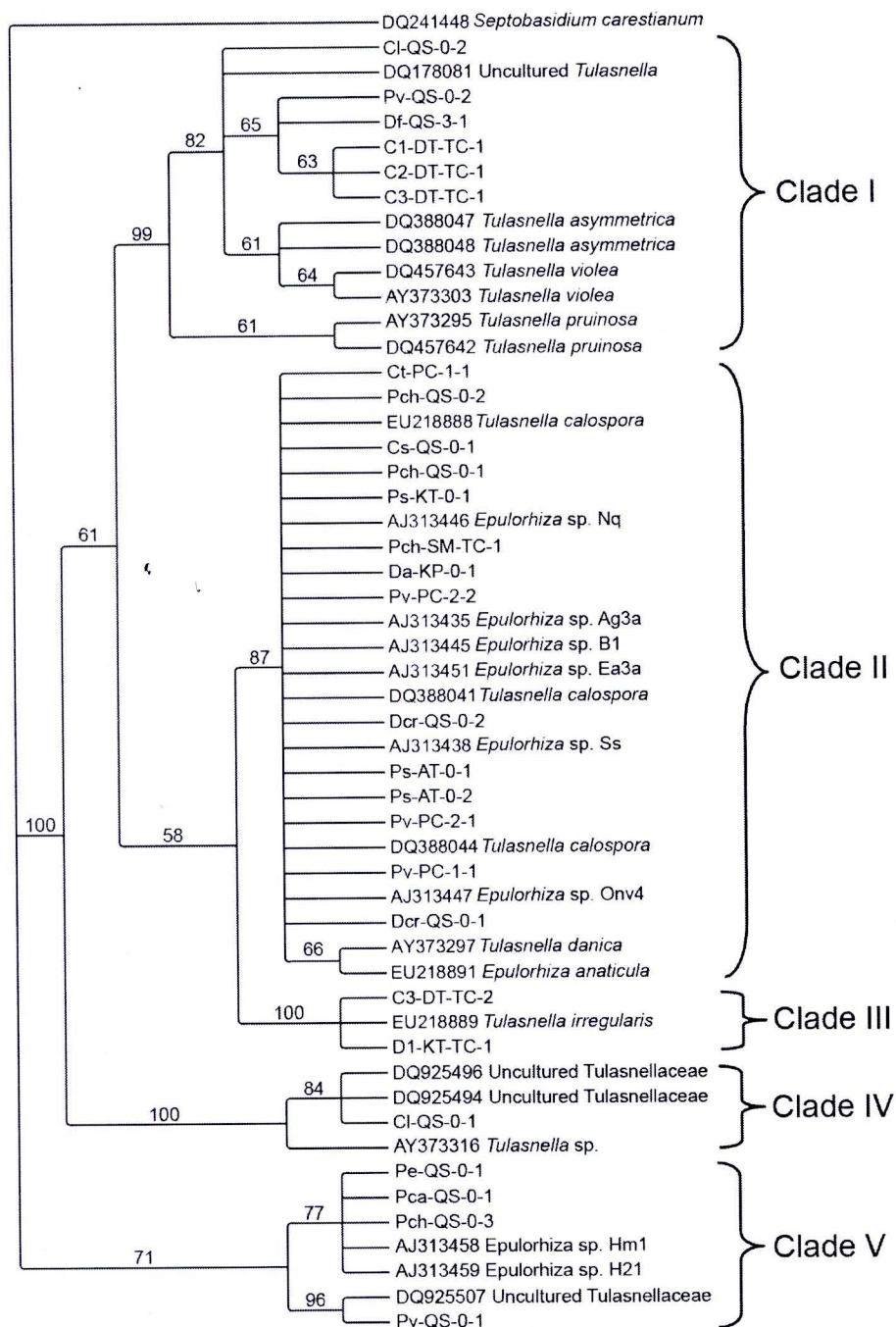
Fungal isolate	Query ^a	Close relative	Percentage identity, Gaps	Reference
Pch-QS-0-2	(1)	AJ313446 <i>Epulorhiza</i> sp. Nq	98% (607/614), Gaps 0% (1/614)	Ma et al. 2003
	(2)	EU218888 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (159/159), Gaps 0% (0/159)	Taylor and McCormick 2008
Pch-QS-0-3	(1)	AJ313458 <i>Epulorhiza</i> sp. Hm1	94% (544/573), Gaps 1% (11/573)	Ma et al. 2003
	(2)	AJ313459 <i>Epulorhiza</i> sp. H21	100% (170/170), Gaps 0% (0/170)	Ma et al. 2003
Pe-QS-0-1	(1)	AJ313459 <i>Epulorhiza</i> sp. H21	95% (407/427), Gaps 1% (8/427)	Ma et al. 2003
	(2)	AJ313459 <i>Epulorhiza</i> sp. H21	100% (170/170), Gaps 0% (0/170)	Ma et al. 2003
Ps-KT-0-1	(1)	AJ313446 <i>Epulorhiza</i> sp. Nq	97% (628/642), Gaps 0% (4/642)	Ma et al. 2003
	(2)	EU218888 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (159/159), Gaps 0% (0/153)	Taylor and McCormick 2008
Ps-AT-0-1	(1)	AY643804.3 <i>Tulasnella calospora</i>	96% (566/586), Gaps 1% (7/586)	Bougoure et al. 2005
	(2)	AB369939 <i>Tulasnella calospora</i>	98% (158/160), Gaps 0% (0/160)	Shimura et al. 2009
Ps-AT-0-2	(1)	AY643804.3 <i>Tulasnella calospora</i>	96% (511/527), Gaps 0% (2/527)	Bougoure et al. 2005
	(2)	AB369939 <i>Tulasnella calospora</i>	98% (157/160), Gaps 0% (0/160)	Shimura et al. 2009
Pv-PC-2-1	(1)	AB369939 <i>Tulasnella calospora</i>	98% (634/646), Gaps 1% (8/646)	Shimura et al. 2009
	(2)	AB369939 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (160/160), Gaps 0% (0/160)	Shimura et al. 2009

^a Query type: (1) ITS-5.8S rDNA; (2) 5.8S rDNA

ตารางที่ 4-2 ผลของ BLAST Searches (ต่อ)

Fungal isolate	Query ^a	Close relative	Percentage identity, Gaps	Reference
Pv-PC-2-2	(1)	AJ313445 <i>Epulorhiza</i> sp. B1	98% (628/638), Gaps 0% (1/638)	Ma et al. 2003
	(2)	DQ388041 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (160/160), Gaps 0% (0/160)	Suarez et al. 2006
Pv-PC-1-1	(1)	AB369939 <i>Tulasnella calospora</i>	97% (629/645), Gaps 1% (8/645)	Shimura et al. 2009
	(2)	AB369939 <i>Tulasnella calospora</i>	100% (160/160), Gaps 0% (0/160)	Shimura et al. 2009
Pv-QS-0-1	(1)	DQ925507 Uncultured <i>Tulasnellaceae</i>	94% (552/584), Gaps 2% (14/584)	Shefferson et al. 2007
	(2)	DQ925507 Uncultured <i>Tulasnellaceae</i>	100% (169/169), Gaps 0% (0/169)	Shefferson et al. 2007
	(2)	AJ313459 <i>Epulorhiza</i> sp. H21	94% (148/157), Gaps 0% (0/157)	Ma et al. 2003
Pv-QS-0-2	(1)	AY373303 <i>Tulasnella violea</i>	88% (438/497), Gaps 6% (33/497)	McCormick et al. 2004
	(2)	DQ457642 <i>Tulasnella pruinosa</i>	98% (167/169), Gaps 0% (0/169)	Matheny et al. 2006

^a Query type: (1) ITS-5.8S rDNA; (2) 5.8S rDNA



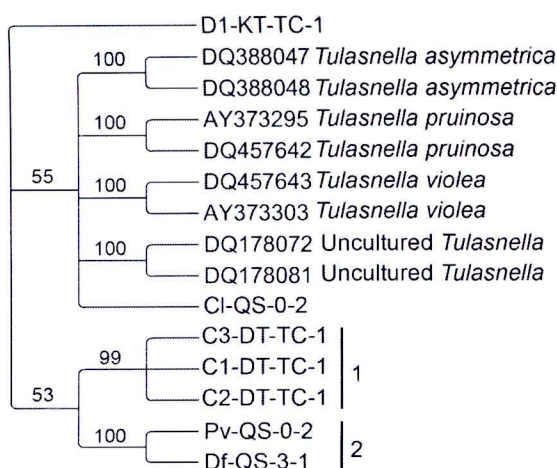
ภาพที่ 4-2 Strict consensus maximum parsimony tree จาก 541 trees (length = 154, CI=0.708, RI=0.943) ของราทั้งหมดที่ได้จากงานวิจัยนี้ การวิเคราะห์ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S rDNA และใช้ *Septobasidium carestianum* (GenBank accession number DQ241448) เป็น outgroup taxon ตัวเลขบน branch บ่งบอกถึง nodes ที่มี bootstrap replicates สนับสนุนมากกว่า 50% จาก 1,000 bootstrap replicates ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก GenBank แสดงพร้อมกับ accession number

การวิเคราะห์ maximum parsimony (MP) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S rDNA แบ่งไอโซเลตของราที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ออกเป็น 2 กลุ่มหลักและ 5 subclades โดยมีค่า bootstrap สนับสนุนมากกว่า 70% (ภาพที่ 4-2) กลุ่มหลักที่ 1 ประกอบด้วย 4 subclades: Clade I ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่แยกได้จากงานวิจัยนี้จำนวน 6 ไอโซเลต และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. asymmerica*, *T. violea*, *T. pruinosa* และ *Tulasnella* sp. ที่ได้จาก GenBank, Clade II ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของรา *E. repens* ที่แยกได้งานวิจัยนี้จำนวน 14 ไอโซเลต ราชนิด *E. repens* และ *Tulasnella calospora* ซึ่งเป็น teleomorph ของ *E. repens* ที่ได้จาก GenBank, Clade III ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไอโซเลต C3-DT-TC-2, D1-KT-TC-1 และของ *T. irregularis*, Clade IV ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไอโซเลต C1-QS-0-1 ราในวงศ์ Tulasnellaceae และ *Tulasnella* sp. กลุ่มหลักที่ 2 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต *E. calendulina*-like ที่ได้จากงานวิจัยนี้และที่รายงานโดย Ma et al. (2003) และราไอโซเลต Pv-QS-0-1 ราใน Clade V ทั้งหมดที่ได้จากงานวิจัยนี้แยกออกมาจากรากของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่เก็บบริเวณสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

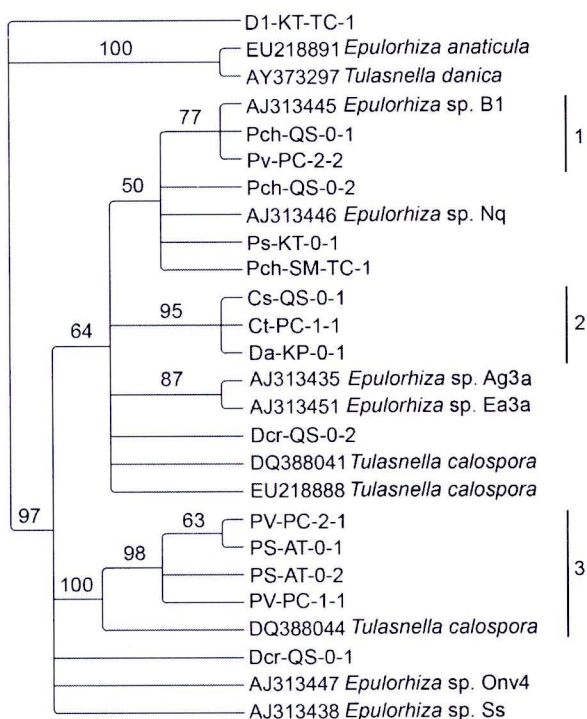
การวิเคราะห์ MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของสมาชิกของ Clade I ได้ most parsimonious tree 1 tree ที่มี topology เหมือนผลจากการวิเคราะห์ MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S rDNA (ข้อมูลไม่แสดง) การวิเคราะห์ bootstrap โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA แบ่งสมาชิกของ subclade นี้ออกเป็น 2 subgroups โดย subgroup ที่ 1 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต C1-QS-0-2 และของ *T. asymmerica*, *T. violea* และ *T. pruinosa* และ subgroup ที่ 2 ประกอบด้วยราไอโซเลตอื่นๆ จาก Clade I ที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ภาพที่ 4-3)

การวิเคราะห์ MP และ bootstrap โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของสมาชิกของ Clade II แบ่งสมาชิกของ subclade นี้ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Epulorhiza anaticula* และ *Tulasnella danica* และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *E. repens* และ *T. calospora* อยู่อีกกลุ่มหนึ่ง (ภาพที่ 4-4)

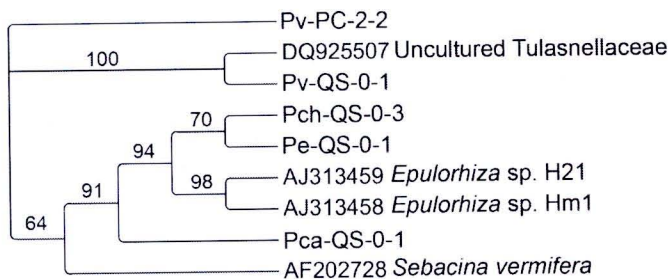
การวิเคราะห์ MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของสมาชิกของ Clade V ได้ most parsimonious tree 1 tree ซึ่งมี topology สอดคล้องกับการวิเคราะห์ MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S rDNA และการวิเคราะห์ bootstrap ไอโซเลต กล่าวคือรวมไอโซเลต Pch-QS-0-3, Pe-QS-0-1 และ Pca-QS-0-1 และไอโซเลต *E. calendulina*-like ของ Ma et al. (2003) อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และแยกไอโซเลต Pv-QS-0-1 ออกไปรวมกับราที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงในวงศ์ Tulasnellaceae (accession number DQ925507) (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-3 Fifty percent majority-rule consensus tree ของสมาชิกใน Clade I การวิเคราะห์ที่ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต D1-KT-TC-1 เป็น outgroup taxon ตัวเลขบน branch บ่งบอกถึง nodes ที่มี bootstrap replicates สนับสนุนมากกว่า 50% จาก 1,000 bootstrap replicates ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก GenBank แสดงพร้อมกับ accession number



ภาพที่ 4-4 Fifty percent majority-rule consensus tree ของสมาชิกใน Clade II การวิเคราะห์ที่ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต D1-KT-TC-1 เป็น outgroup taxon ตัวเลขบน branch บ่งบอกถึง nodes ที่มี bootstrap replicates สนับสนุนมากกว่า 50% จาก 1,000 bootstrap replicates ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก GenBank แสดงพร้อมกับ accession number



ภาพที่ 4-5 Strict consensus maximum parsimony tree (length=455, CI=0.878, RI=0.751) ของสมาชิกใน Clade V การวิเคราะห์นี้ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต Pv-PC-2-2 เป็น outgroup taxon ตัวเลขบน branch บ่งบอกถึง nodes ที่มี bootstrap replicates สนับสนุนมากกว่า 50% จาก 1,000 bootstrap replicates ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก GenBank แสดงพร้อมกับ accession number

4.3 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับรา

เมล็ดของกะเหรี่ยงร้อนนิลและเอื้องสายน้ำเขียวไม่งอกในทุก treatment รวมทั้งบนอาหาร MS ซึ่งอาจเนื่องมาจากการพักตัวของเมล็ด ผลการทดลองจึงแสดงเฉพาะการเพาะเมล็ดของว่านเพชรหึงและเอื้องเงิน

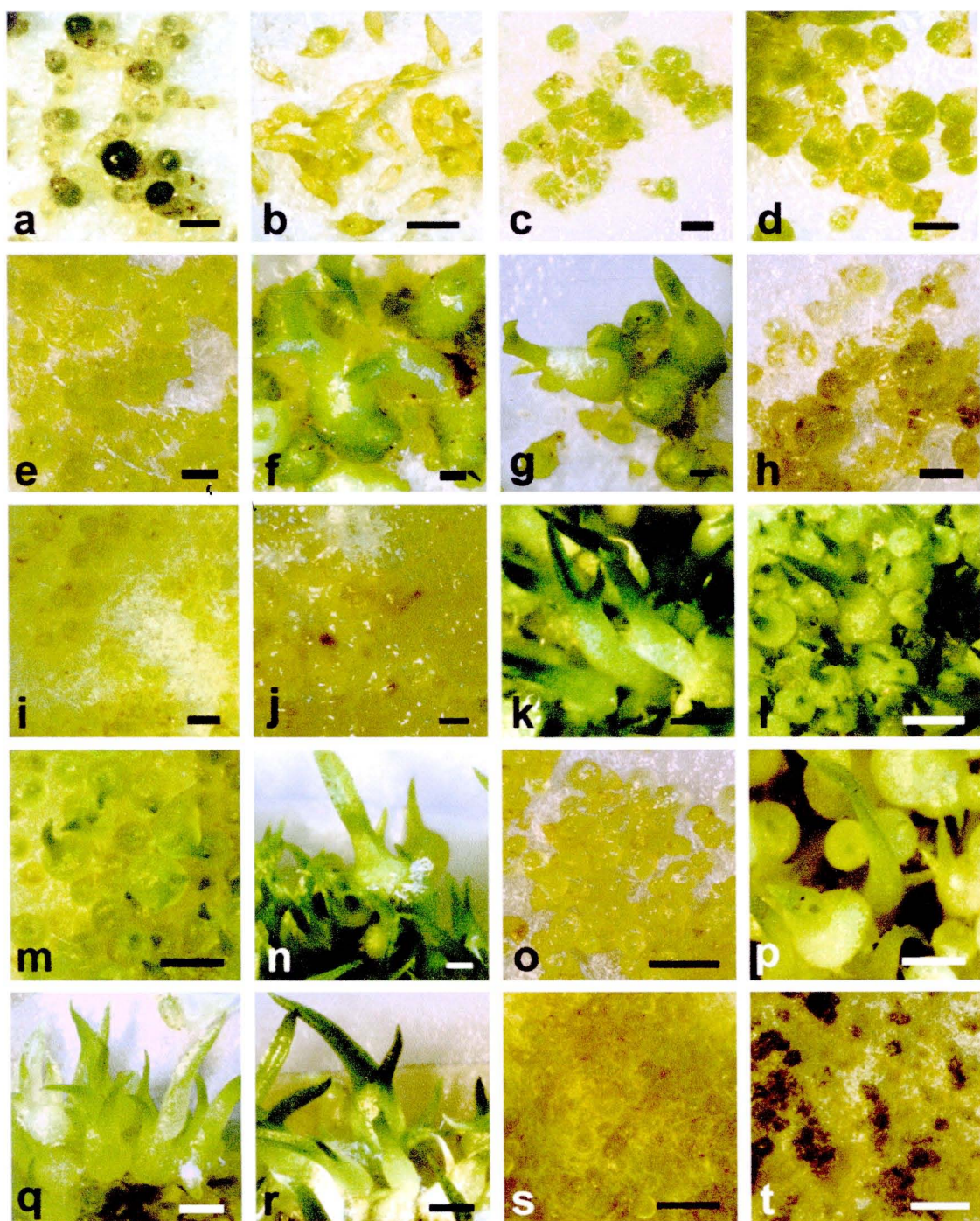
เมล็ดของว่านเพชรหึงที่เลี้ยงบนอาหาร MS และบน OMA ที่มีการปลูกรา ยกเว้นที่เลี้ยงร่วมกับราไอโซเลต Pv-QS-0-1 เริ่มงอกในสัปดาห์ที่ 4-5 ในขณะที่เมล็ดที่เลี้ยงบน OMA ที่ไม่มีการปลูกเชื้อรากงอกช้ากว่ามากคือ 10 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด ที่สัปดาห์ที่ 13 เปอร์เซ็นต์การงอกของ treatment ต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เพราะเมล็ดในเกือบทุก treatment มีอัตราการงอกเกือบ 100% อย่างไรก็ตาม พบว่า ระยะการเจริญของเมล็ดและ/หรือโปรโตคอร์มใน treatment ต่าง ๆ แตกต่างกัน (ดู ตารางที่ 4-3 และภาพที่ 4-6) โดย จากการทดลองนี้พบว่าราไอโซเลต Pv-QS-0-1 ไม่ส่งเสริมการงอกของเมล็ดว่านเพชรหึง ในสัปดาห์ที่ 3 ราเจริญปกคลุมเมล็ดทั้งหมดและพบเห็นการย่อยสลายของเมล็ด (ภาพที่ 4-6j)

เมล็ดของเอื้องเงินเกือบ 100% ในทุก treatment งอกในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากการเพาะเมล็ด แต่พัฒนาการของเมล็ดและโปรโตคอร์มแตกต่างกันไปในแต่ละ treatment ระยะการเจริญของเมล็ดและ/หรือโปรโตคอร์มของเอื้องเงินแสดงในตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-6 สำหรับเมล็ดบน OMA ที่ปลูกราไอโซเลต Pv-QS-0-1 แม้ว่าเมล็ดสามารถงอก แต่เราได้เจริญปกคลุมเมล็ดและฆ่าเมล็ดในที่สุด (ภาพที่ 4-6t)

ตารางที่ 4-3 ผลของอาหารและไอโซเลตของราต่อพัฒนาการของเมล็ดและโปรโตคอร์มของวุ้น เพชรหึงที่สัปดาห์ที่ 13 หลังการเพาะเมล็ด

Treatment		เปอร์เซ็นต์ของเมล็ดและ/หรือโปรโตคอร์มที่ระยะ						ค่าเฉลี่ยของ ระยะการเจริญ	
		0	1	2	3	4	5		
MS medium	Mean	0.0	58.7	36.1	5.2	0.0	0.0	1.5	ab
	SD	0.0	8.3	10.5	3.4	0.0	0.0	0.1	
OMA	Mean	0.0	92.9	7.1	0.0	0.0	0.0	1.1	a
	SD	0.0	10.1	10.1	0.0	0.0	0.0	0.1	
Pv-QS-0-2	Mean	0.0	2.7	96.7	0.7	0.0	0.0	2.0	abc
	SD	0.0	4.6	5.8	1.2	0.0	0.0	0.0	
C1-DT-TC-1	Mean	0.0	14.7	61.4	23.9	0.0	0.0	2.1	bc
	SD	0.0	15.7	25.7	17.0	0.0	0.0	0.2	
Cs-QS-0-1	Mean	11.3	47.4	33.5	7.8	0.0	0.0	1.4	ab
	SD	14.6	41.2	38.2	13.4	0.0	0.0	0.8	
Da-KP-0-1	Mean	0.0	46.8	7.9	39.0	3.8	2.5	2.1	bc
	SD	0.0	40.3	6.8	29.8	3.3	4.3	0.8	
Pv-PC-1-1	Mean	8.9	4.7	22.6	55.2	2.8	5.7	2.6	c
	SD	15.5	4.5	17.7	13.4	3.1	7.9	0.7	
C3-DT-TC-2	Mean	5.0	56.9	37.0	1.1	0.0	0.0	1.3	ab
	SD	8.7	27.6	34.7	1.3	0.0	0.0	0.4	
Pch-QS-0-3	Mean	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	2.0	bc
	SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

Mean และ standard deviation (SD) ของเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดและหรือโปรโตคอร์มที่แต่ละระยะ การเจริญคำนวณจากภาพถ่าย 3 ภาพ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้วิธี Duncan's new multiple range test โดยค่าเฉลี่ยของระยะการเจริญที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.05)



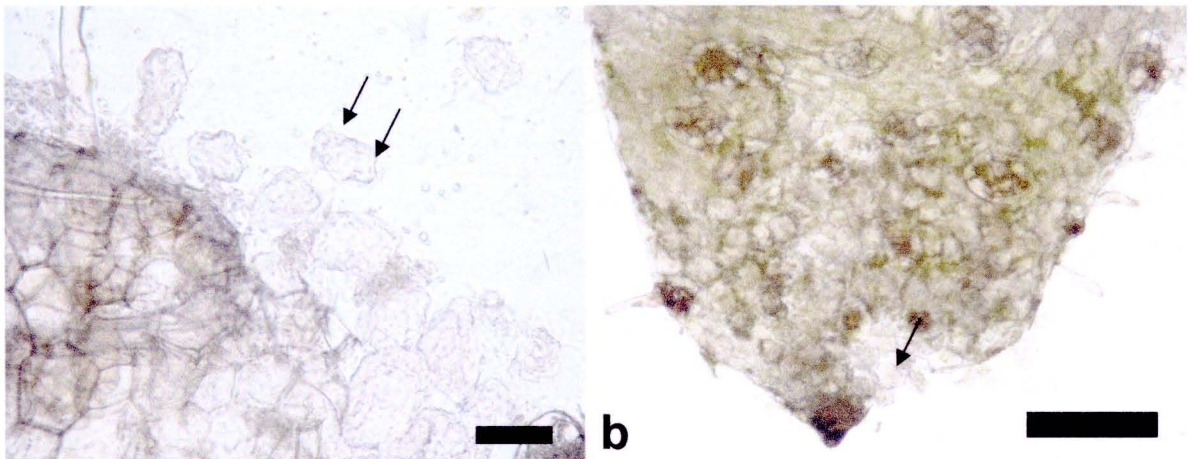
ภาพที่ 4-6 เมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึง (a-j) และเอื้องเงิน (k-t) ในสัปดาห์ที่ 15 บนอาหาร MS (a, k), OMA ที่ไม่มีการปลูกเชื้อ (b, l) หรือ OMA ที่ปลูกราไฮโซเลต Pv-QS-0-2 (c, m), C1-DT-TC-1 (d, n), Cs-QS-0-1 (e, o), Da-KP-0-1 (f, p), Pv-PC-1-1 (g, q), C3-DT-TC-2 (h, r), Pch-QS-0-3 (i, s), or Pv-QS-0-1 (j, t). Bars ใน A-J มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร Bars ใน K-T มีขนาด 1 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4-4 ผลของอาหารและไอโซเลตของราต่อพัฒนาการของเมล็ดและโปรโตคอร์มของเชื้องเงินที่สัปดาห์ที่ 13 หลังการเพาะเมล็ด

		เปอร์เซ็นต์ของเมล็ดและ/หรือโปรโตคอร์มที่ระยะ						ค่าเฉลี่ยของ
Treatment		0	1	2	3	4	5	ระยะการเจริญ
MS medium	Mean	0.0	0.0	0.0	1.3	4.4	94.4	4.9 d
	SD	0.0	0.0	0.0	2.2	4.3	4.9	0.1
OMA	Mean	0.0	0.0	0.0	54.1	43.9	2.0	3.5 c
	SD	0.0	0.0	0.0	13.9	14.8	1.8	0.1
Pv-QS-0-2	Mean	0.4	0.2	12.8	86.4	0.2	0.0	2.9 b
	SD	0.6	0.3	15.9	16.7	0.4	0.0	0.2
C1-DT-TC-1	Mean	0.0	0.0	0.0	6.1	24.9	69.0	4.6 d
	SD ^a	0.0	0.0	0.0	8.8	17.6	24.5	0.3
Cs-QS-0-1	Mean	0.6	16.8	82.6	0.0	0.0	0.0	1.8 a
	SD	1.1	29.1	30.2	0.0	0.0	0.0	0.3
Da-KP-0-1	Mean	0.0	0.0	32.1	57.5	9.6	0.8	2.8 b
	SD	0.0	0.0	28.1	36.3	8.6	0.9	0.2
Pv-PC-1-1	Mean	0.0	0.0	0.0	2.5	5.6	91.9	4.9 d
	SD	0.0	0.0	0.0	4.3	9.8	14.0	0.2
C3-DT-TC-2	Mean	0.0	0.0	0.0	0.3	4.5	95.2	4.9 d
	SD	0.0	0.0	0.0	0.5	7.8	8.4	0.1
Pch-QS-0-3	Mean	0.0	37.6	62.4	0.0	0.0	0.0	1.6 a
	SD	0.0	37.1	37.1	0.0	0.0	0.0	0.4

Mean และ standard deviation (SD) ของเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดและหรือโปรโตคอร์มที่แต่ละระยะการเจริญคำนวณจากภาพถ่าย 3 ภาพ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้วิธี Duncan's new multiple range test โดยค่าเฉลี่ยของระยะการเจริญที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.05)

การตรวจสอบโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบ peloton ในโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหาร MS อาหาร OMA ที่ไม่มีการปลูกเชื้อ หรืออาหาร OMA ที่มีการปลูกเชื้อราไอโซเลต Pv-QS-0-1 และพบ peloton จำนวนมากในเมล็ดและ/หรือโปรโตคอร์มที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อราไอโซเลต Pv-QS-0-2, C1-DT-TC-1, Cs-QS-0-1, Da-KP-0-1, Pv-PC-1-1, หรือ C3-DT-TC-2 (แสดงตัวอย่างของโปรโตคอร์มที่มี peloton ในภาพที่ 4-7a) โปรโตคอร์มที่เลี้ยงร่วมกับราไอโซเลต Pch-QS-0-3 ส่วนมากไม่พบ peloton มีเพียงโปรโตคอร์มจำนวน 2 โปรโตคอร์มที่พบ peloton จำนวน 1-2 peloton การตรวจสอบโปรโตคอร์มของเอื้องเงินไม่พบ peloton ใน โปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหาร MS อาหาร OMA ที่ไม่มีการปลูกเชื้อ หรืออาหาร OMA ที่มีการปลูกเชื้อราไอโซเลต Pv-QS-0-1 หรือไอโซเลต Pch-QS-0-1 และพบ peloton จำนวนมากในเมล็ดและ/หรือโปรโตคอร์มที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อราไอโซเลต Pv-QS-0-2, C1-DT-TC-1, Cs-QS-0-1, Da-KP-0-1, Pv-PC-1-1 หรือ C3-DT-TC-2 (แสดงตัวอย่างของโปรโตคอร์มที่มี peloton ในภาพที่ 4-7b)



ภาพที่ 4-7 Peloton (ลูกศร) ในโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึง (a) และเอื้องเงิน (b) ที่เลี้ยงร่วมกับราไอโซเลต C1-DT-TC-1. Bar ใน a มีขนาด 50 ไมโครเมตร และใน b มีขนาด 0.2 มิลลิเมตร

