

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

5.1 ราจากรากตัวอย่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่แยกได้

แม้ว่าการแยกราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้โดยวิธี single peloton isolation หรือการแยก peloton เดี่ยว ๆ จากโปรโตคัมหรือรากของกล้วยไม้ (Warcup and Talbot 1967) จะมีข้อดีคือ ราที่แยกได้จะเป็นราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้แน่นอน อย่างไรก็ตาม การแยก peloton จากเนื้อเยื่อของกล้วยไม้จำเป็นจะต้องตัดรากเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นจึงฉีกหรือบดเนื้อเยื่อ cortex ของราก ทำให้เกิดการสูญเสีย peloton ไปจำนวนหนึ่ง และภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตรียอ ซึ่งมีการขยายต่ำ เศษวัสดุพืชหรือเชื้อราปนเปื้อนอื่น ๆ อาจถูกเข้าใจผิดว่าเป็น peloton ได้ นอกจากนี้กล้วยไม้ยังอาศัยหลายชนิดมี peloton ข้างน้อย (Bayman et al. 2002; Otero et al. 2002, 2007) ผู้วิจัยจึงแยกราเอนโดไฟต์ของกล้วยไม้จากรากที่ถูกตัดตามขวางและลอกเนื้อเยื่อชั้น epidermis ออกเพื่อลดการปนเปื้อน

การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดคือ ราไมคอร์ไรซามีลักษณะที่สามารถใช้จำแนกชนิดจำกัด การชักนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมักไม่ประสบความสำเร็จ และการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถจำแนกเชื้อราบางกลุ่มในระดับที่ต่ำกว่าสกุล (Athipunyakom 2004; Ma et al. 2003; Otero et al. 2002; Rasmussen 2002) จากผลการวิจัยพบว่ามีราเพียง 2 กลุ่ม (ดูหัวข้อ 4.1) ที่สามารถระบุชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ราเอนโดไฟต์มากกว่า 10 ไอโซเลตแม้ว่าจะมีลักษณะ *Rhizoctonia*-like แต่ไม่สามารถระบุชนิดได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงจำเป็นสำหรับการระบุชนิดของราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้

5.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่แยกได้

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ยืนยันว่าราจำนวน 14 ไอโซเลตจากงานวิจัยนี้คือ *E. repens* ราชนิดนี้เป็น *Rhizoctonia*-like ที่พบมากที่สุด ได้จากรากของกล้วยไม้ในทุกสกุล ผลการวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่มีก่อนหน้านี้ว่า *E. repens* เป็นราไมคอร์ไรซาทั้งของกล้วยไม้อิงอาศัยและกล้วยไม้ดิน (Dearnaley 2007; Rasmussen 2002) ซึ่งแตกต่างจากราชนิด *E. calandulina*-like ซึ่งพบเฉพาะในรากของกล้วยไม้ในสกุลรองเท้านารีในงานวิจัยนี้ ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าเป็นราไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้ดิน (Athipunyakom et al. 2004; Ma et al. 2003; Zelmer and Currah 1995)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุชนิดของไอโซเลต D1-KT-TC-1 และ C3-DT-TC-2 ซึ่งได้จากรากของลูกผสมซิมบิเดียมซึ่งเป็นกล้วยไม้ดินและรากของกล้วยไม้ในสกุลหวายซึ่งเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย แต่การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA และการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการยืนยันว่า ราทั้ง 2 ไอโซเลตนี้คือ anamorphic species ของ *T. irregularis* และเนื่องจากกล้วยไม้ทั้งสองชนิดนี้มีที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ราชนิดนี้จึงน่าจะเข้าสู่รากของกล้วยไม้ในระยะที่กล้วยไม้โตเต็มที่แล้ว

งานวิจัยนี้ ได้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของราเอนโดไฟต์ของกล้วยไม้ที่ไม่เคยมีในการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้แก่ (1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไอโซเลต CI-QS-0-1; (2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไอโซเลต CI-QS-0-2; (3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราใน Clade I, subgroup 1; (4) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราใน Clade I, subgroup 2; (5) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไอโซเลต Pv-QS-0-1, จาก BLAST Search และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ราไอโซเลต CI-QS-0-1 น่าจะเป็น anamorph species ใหม่ในสกุล *Tulasnella* ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการห่างไกลจากรา *Tulasnella* ชนิดอื่น ๆ ที่เคยพบในกล้วยไม้ ราไอโซเลต CI-QS-0-2 น่าจะเป็น anamorph species ใหม่ในสกุล *Tulasnella* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับราชนิด *T. asymmetrica*, *T. violea* และ *T. pruinosa* มากที่สุดอย่างไรก็ตาม ตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของรากลุ่มนี้ยังไม่ชัดเจน เช่นเดียวกับราใน subgroup 1 และ 2 ใน Clade I ที่น่าจะเป็น anamorph species ใหม่ในสกุล *Tulasnella* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับราชนิด *T. asymmetrica*, *T. violea* และ *T. pruinosa* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไอโซเลต Pv-QS-0-1 ไม่ใกล้เคียงกับราไมคอร์ไรซาที่เคยพบว่ามีในรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ราชนิดนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับราชนิด *E. calendulina*-like และ *Sebacina vermifera* มากกว่าราในกลุ่มหลักที่ 1 หรือ *Tulasnella* clades ราที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับราชนิดนี้มากที่สุดคือราในวงศ์ Tulasnellaceae ที่รายงานโดย Shefferson et al. (2007) ราชนิดนี้จึงอาจจะเป็นราสกุลอื่นในวงศ์นี้

5.3 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับรา

ว่านเพชรหึงและเอื้องเงินเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองของไทย (Nanakorn and Indharamusika 1998) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่นเดียวกับกล้วยไม้ในธรรมชาติอื่น ๆ กล้วยไม้ทั้งสองชนิดนี้ถูกคุกคามจากการเก็บต้นมาขาย แม้ว่าจะมีผู้รายงานวิธีการขยายพันธุ์กล้วยไม้สองชนิดนี้ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Rangsayatorn 2009; Sopalum et al. 2010) แต่ต้นกล้วยไม้ที่ได้

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่เหมาะสมสำหรับการฟื้นฟูประชากรตามธรรมชาติเนื่องจากขาดความหลากหลายทางพันธุกรรม

อาหาร MS นิยมใช้สำหรับเพาะเมล็ดกล้วยไม้หลายชนิดหลายสกุลรวมทั้งสกุลหวาย (Rangsayatorn 2009; Vendrame et al., 2007) อาหาร MS เป็นอาหารที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามินและน้ำตาลค่อนข้างสูง ในขณะที่ OMA ไม่มีคาร์โบไฮเดรตขนาดเล็กที่พืชสามารถใช้ได้โดยตรง งานวิจัยนี้ใช้อาหาร MS และ OMA เป็นชุดควบคุมแบบ positive และ negative ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าโปรโตคอร์มของวุ้นเพชรหึงและเอื้องเงินตอบสนองต่อสารอาหารจากอาหารเลี้ยงแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-3 และ 4-4) กล่าวคือเมล็ดของวุ้นเพชรหึงออกพัฒนาดังและระยะการเจริญที่ 2 บน OMA ในขณะที่เมล็ดของเอื้องเงินสามารถพัฒนาดังระยะที่ 5 บน OMA นอกจากนี้อาหาร MS มีอิทธิพลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเอื้องเงิน (เพิ่มจากค่าเฉลี่ย 3.5 เป็น 5.0) มากกว่าที่มีต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์มของวุ้นเพชรหึง (เพิ่มจากค่าเฉลี่ย 1.1 เป็น 1.5) ความแตกต่างดังกล่าวอาจเป็นผลจากความแตกต่างของปริมาณของอาหารสะสมและความสามารถในการใช้อาหารสะสมของกล้วยไม้ต่างชนิดกัน (Rasmussen 1995) และมีความเป็นไปได้ว่าอาหาร MS เหมาะสมสำหรับการเพาะเมล็ดของเอื้องเงินแต่ไม่เหมาะสำหรับการเพาะเมล็ดของวุ้นเพชรหึง

การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ในหลอดทดลองร่วมกับราไมคอร์ไรซาเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการผลิตต้นกล้วยไม้สำหรับการฟื้นฟูประชากรในธรรมชาติและการศึกษาเกี่ยวกับความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อราของกล้วยไม้ (Massey and Zettler 2007; Stewart and Kane 2006) งานวิจัยนี้รายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดวุ้นเพชรหึงและเอื้องเงินในหลอดทดลองร่วมกับราไมคอร์ไรซาเป็นครั้งแรก ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าวุ้นเพชรหึงและเอื้องเงินมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อราที่แตกต่างกัน สำหรับวุ้นเพชรหึง ราที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามความสามารถในการส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มได้แก่ (1) ราที่ไม่ส่งเสริมการงอกและฆ่าเมล็ด ได้แก่ ไอโซเลต Pv-QS-0-1, (2) ราที่ไม่ฆ่าเมล็ดแต่ไม่ส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มเมื่อเทียบกับ OMA ได้แก่ ไอโซเลต Pv-QS-0-2, Cs-QS-0-1 และ C3-DT-TC-2, (3) ราที่ส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มในระยะแรกเทียบกับ OMA แต่ไม่ส่งเสริมให้โปรโตคอร์มพัฒนาจนกระทั่งเป็นต้นที่มีใบสมบูรณ์ ได้แก่ ไอโซเลต C1-DT-TC และ Pch-QS-0-3 และ (4) ราที่เข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ (fully compatible) กับวุ้นเพชรหึง ได้แก่ ไอโซเลต Da-KP-0-1 และ Pv-PC-1-1 โปรโตคอร์มที่เลี้ยงร่วมกับราในกลุ่มสุดท้ายสามารถสร้างใบที่มีขนาดใหญ่กว่าโปรโตคอร์ม ต้นอ่อนกล้วยไม้ในระยะนี้สามารถมีชีวิตรอดหลังการย้ายปลูก Bonnardeaux et al. (2007) นอกจากนี้ ราไอโซเลต Pv-PC-1-1 ยังส่งเสริมให้โปรโตคอร์มพัฒนาได้รวดเร็วกว่าอาหาร MS อีกด้วย สำหรับเอื้องเงิน ราที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ (1) ราที่ไม่ส่งเสริมการงอกและ

ฆ่าเมล็ด ได้แก่ ไอโซเลต Pv-QS-0-1, (2) ราที่ไม่ฆ่าเมล็ดแต่ทำให้เมล็ดและ/หรือโปรโตคอร์มที่การเจริญและพัฒนาช้าลง ได้แก่ ราไอโซเลต Pv-QS-0-2, Cs-QS-0-1, Da-KP-0-1 และ Pch-QS-0-3, (3) ราที่ส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มเมื่อเทียบกับ OMA ได้แก่ ราไอโซเลต C1-DT-TC-1, Pv-PC-1-1 และ C3-DT-TC-2 อย่างไรก็ตามการพัฒนาของโปรโตคอร์มที่เลี้ยงร่วมกับราในกลุ่มสุดท้ายไม่แตกต่างจากการพัฒนาของโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหาร MS อย่างมีนัยสำคัญ

แม้ว่าราไอโซเลต Pv-QS-0-1 จะได้จากรากจากต้นรองเท้านารีอินทนนท์ที่แข็งแรงสมบูรณ์และมีลักษณะของรา *Rhizoctonia*-like จึงอาจจะเป็นราไมคอร์ไรซา อย่างไรก็ตาม จากการทดลองเพาะเมล็ดว่านเพชรหึงและเลี้ยงร่วมกับราไอโซเลตนี้ พบว่า ราไอโซเลตนี้น่าจะเป็นราประเภท saprotrophic หรือราที่ดำรงชีวิตโดยการย่อยสลายอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว ราไอโซเลต Pch-QS-0-3 ได้จากรากของรองเท้านารีโดยตุ่ง และถูกระบุว่าเป็นราชนิด *E. calendulina*-like ซึ่งเป็นราไมคอร์ไรซาที่พบในกล้วยไม้ดิน แต่เมื่อเลี้ยงราชนิดนี้ร่วมกับว่านเพชรหึง พบว่า ราชนิดนี้สามารถสร้าง peloton จำนวนหนึ่งในโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากสภาพในหลอดทดลองควบคุมให้มีราเพียงชนิดเดียวซึ่งแตกต่างจากสภาพในธรรมชาติ การทดลองการเพาะเมล็ดโดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา ยืนยันว่า ราทุกไอโซเลตที่ศึกษา ยกเว้นราไอโซเลต Pv-QS-0-1 และ Pch-QS-0-3 เป็น orchid mycobiont ของว่านเพชรหึงและเอื้องเงิน (อย่างน้อยในสภาพ *in vitro*) ทั้งนี้เนื่องจากราเหล่านี้สามารถสร้าง peloton ในโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สองชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม ราที่สร้าง peloton อาจไม่ส่งเสริมหรืออาจยับยั้งการเจริญและการพัฒนาของโปรโตคอร์ม ผู้วิจัยเห็นด้วยกับ Bonnardeaux et al. (2007) ที่กำหนดให้ราไมคอร์ไรซาที่เข้ากันได้อย่างแท้จริงกับกล้วยไม้ คือราที่สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นอ่อนจนกระทั่งถึงระยะที่ต้นอ่อนสามารถสังเคราะห์แสงได้เอง ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Stewart and Kane (2006) และ Warcup (1973) ที่รายงานว่า ราที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน (ได้แก่ราชนิดเดียวกันหรือราจาก clade เดียวกัน) อาจมีความสามารถในการส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ชนิดเดียวกันแตกต่างกัน และราที่ส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ได้ดีไม่จำเป็นต้องมาจากกล้วยไม้ชนิดนั้น ดังนั้นการคัดเลือกไอโซเลตของราที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อความสำเร็จของการเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา