



246853



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแยกและตรวจสอบชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาในราก
กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี หวายและเข็มปีเดียม

โดย ดร. สุรีย์พร นนทชัยภูมิ และคณะ

พฤษภาคม 2554



สัญญาเลขที่ MRG5180068

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแยกและตรวจสอบชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาในราก
กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี หวายและชิมบิเดียม



คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|------------------------------|------------------------|
| 1. ดร. สุริย์พร นนทชัยภูมิ | มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง |
| 2. นางสาวสาวิตรี สระศรีรัตน์ | องค์การสวนพฤกษศาสตร์ |
| 3. รศ. ดร. เลขา มาโนช | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และ
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการแยกและตรวจสอบชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาในรากกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี หวายและเข็มปีเดียม ได้รับทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณคุณกัลยา ก้อนแก้ว หน่วยจัดการต้นน้ำแม่กลาง คุณทศพร ธนามีและคุณณัฐ วุฒิ มณีรัตนชัยยง โครงการอนุรักษ์พันธุกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ตามพระราชดำริในพื้นที่ ภาคเหนือ คุณอรรถพล ตีลังจิตร์และคุณกิตติชัย ภู่เล็ก ที่สนับสนุนรากกล้วยไม้ และขอขอบคุณ ดร. สันติ วัฒนฐานะ และดร.จรัญ มากน้อย องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่สนับสนุนฝักกล้วยไม้ สำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ Dr. Kevin Hyde สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง และดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับคำแนะนำ เกี่ยวกับการแยกและเก็บรักษาเชื้อรา ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Mr. Sitthisack Phoulivong สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง สำหรับคำแนะนำด้านการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

คณะผู้วิจัย

รหัสโครงการ: MRG5180068

ชื่อโครงการ: การแยกและตรวจสอบชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาในรากกล้วยไม้ สกุล
รองเท้านารี หวายและเข็มปีเดียม

หัวหน้าโครงการวิจัย: ดร. สุรีย์พร นนทชัยภูมิ
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
333 หมู่ 1 ตำบลท่าสูด อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 57100
E-mail nontachaiyapoom@yahoo.com

ผู้ร่วมวิจัย: นางสาวสาวิตรี สระศรีรัตน์
สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

นักวิจัยที่ปรึกษา: รศ. ดร. เลขา มาโนช
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาดำเนินการ: 15 พฤษภาคม พ.ศ.2551 – 14 พฤษภาคม พ.ศ.2554

บทคัดย่อ

246853

ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้มีประโยชน์ต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้แยกรา *Rhizoctonia*-like จำนวน 27 ไอโซเลตจากรากของกล้วยไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจ 3 สกุลคือ รองเท้านารี หวายและเข็มปีเดียม โดยรากตัวอย่างเก็บจากกล้วยไม้ที่โตเต็มที่แล้วในแหล่งปลูกเลี้ยงต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย การจำแนกชนิดราทำโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ 5.8S ribosomal DNA (rDNA) และการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบว่า *Epulorhiza repens* เป็นราที่พบบ่อยที่สุด พบในรากของกล้วยไม้หลายชนิดในทั้งสามสกุลที่ศึกษา ในขณะที่ราที่คล้าย *Epulorhiza calendulina* พบเฉพาะในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเท่านั้น ราไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบได้แก่ anamorph ของ *Tulasnella irregularis* ราที่อาจเป็น anamorphic species ใหม่ในสกุล *Tulasnella* 4 ชนิด และราที่อาจเป็น anamorphic species ใหม่ในวงศ์ Tulasnellaceae 1 ชนิด ราตัวแทนจำนวน 8 ไอโซเลตถูกนำมาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้พื้นเมืองของไทย 2 ชนิด ได้แก่ วานเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum*) และเอื้องเงิน (*Dendrobium draconis*) โดยทำการบันทึกระยะการเจริญของเมล็ดและโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (MS), oat meal agar (OMA) หรือบน OMA ที่ปลูกเชื้อราทุกสัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า รา *E. repens* 2 ไอโซเลต ได้แก่ Da-KP-0-1 และ Pv-PC-1-1 สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มของวานเพชรหึงพัฒนาได้รวดเร็วมากที่สุด ในสัปดาห์ที่ 13 โปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารที่มีเชื้อรา Da-KP-

0-1 หรือ Pv-PC-1-1 จะพัฒนาได้รวดเร็วกว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบน OMA ที่ไม่มีการปลูกเชื้อ และโปรโตคอร์มที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อราไอโซเลต Pv-PC-1-1 ยังสามารถพัฒนาได้รวดเร็วกว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหาร MS สำหรับเชื้อเงิน anamorphic species ที่แตกต่างกัน 3 ชนิดในสกุล *Tulasnella* ได้แก่ ราไอโซเลต C1-DT-TC-1, Pv-PC-1-1 และ C3-DT-TC-1 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามไม่มีราไอโซเลตใดที่ส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเชื้อเงินได้ดีกว่าอาหาร MS งานวิจัยนี้ได้สร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายทางชนิดและพันธุกรรมของเชื้อราในรากของกล้วยไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจ ในแหล่งปลูกเลี้ยงซึ่งแทบไม่พบว่ามีรายงานในการศึกษาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังรายงานแนวทางการใช้ประโยชน์จากเชื้อราเหล่านี้เพื่อการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้

คำสำคัญ: ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไมคอร์ไรซา กล้วยไม้ การงอกของเมล็ด

Project Code: MRG5180068

Project Title: Isolation and identification of mycorrhizal fungi from roots of three commercial orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* and *Cymbidium*

Chief Investigator: Dr. Sureeporn Nontachaiyapoom
School of Science, Mae Fah Luang University
333 Moo 1, Thasud, Muang District, Chiang Rai 57100
E-mail nontachaiyapoom@yahoo.com

Investigator: Miss Sawitree Sasirat
Queen Sirikit Botanic Garden

Mentor: Associate Professor Leka Manoch
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture
Kasetsart University

Project Period: 15 May 2008 – 14 May 2011

Abstract

246853

Orchid mycorrhiza is known to be beneficial to seed germination and growth of orchid. In this study, twenty seven isolates of *Rhizoctonia*-like fungi were isolated from roots of three economically important orchid genera *Paphiopedilum*, *Cymbidium* and *Dendrobium*. The roots were obtained from mature orchids collected from diverse horticultural settings in Chiang Mai and Chiang Rai provinces. Fungal identification was done by the morphological characterization, the comparison of the internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S ribosomal DNA (rDNA) sequences, and the phylogenetic analysis. *Epulorhiza repens* was the most common species found in the roots of various species of all three orchid genera, whereas, *Epulorhiza calendulina*-like isolates were strictly found in the roots of *Paphiopedilum* species. Other fungal isolates obtained were identified as an anamorph of *Tulasnella irregularis*, four new anamorphic species in the genus *Tulasnella*, and a new anamorphic species in the family Tulasnellaceae. Eight of the 27 fungal isolates were tested for their effectiveness in promoting *in vitro* seed germination and protocorm development of *Grammatophyllum speciosum* and *Dendrobium draconis*, native Thai orchids. The developmental stages of the seeds and protocorms cultured on

Murashige and Skoog medium (MS), oat meal agar (OMA), or the OMA inoculated with one of the eight fungal isolates were evaluated weekly. Two isolates of *E. repens*, Da-KP-0-1 and Pv-PC-1-1, were found to be the most effective fungi in promoting the protocorm development of the *G. speciosum*. At week 13, the protocorms co-cultured with either one of these two fungal isolates, on the average, were significantly more advanced than those sown on the OMA. The protocorms co-cultured with the isolate Pv-PC-1-1 was also significantly more advanced than those cultured on the MS medium. For the *D. draconis* seed germination, three fungal isolates of different anamorphic species of *Tulasnella*, C1-DT-TC-1, Pv-PC-1-1, and C3-DT-TC-2, were found to be the most effective fungi in promoting the protocorm development. However, none of these fungal isolates outperformed the MS medium. Our study provides information on diversity of root-associated fungi of the highly traded orchid genera at the sampling sites that were rarely addressed in the previous studies and the potential use of these fungi for the cultivation of orchids.

Keywords: DNA sequence, Mycorrhiza, Orchid, Seed germination

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

งานวิจัยด้านราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (orchid mycorrhiza) กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในต่างประเทศ เนื่องจากราไมคอร์ไรซาได้ถูกนำมาใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้เศรษฐกิจบางชนิด และมีรายงานว่า ราไมคอร์ไรซาชนิดและสายพันธุ์ที่เหมาะสมสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารที่ปราศจากน้ำตาล และยังสามารถช่วยให้ต้นอ่อนหรือโปรโตคอร์ม (protocorm) ของกล้วยไม้พัฒนาได้เร็วขึ้น ราไมคอร์ไรซายังถูกนำมาใช้เพื่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้หายากและใกล้สูญพันธุ์บางชนิด ในประเทศไทย พบว่า มีงานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้จำนวนจำกัดและไม่ได้มีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง

โครงการวิจัยนี้มีแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ระยะที่ 1 ทำการศึกษาวิธีการแยก เลี้ยงและระบุชนิดของราที่คาดว่าจะเป็ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ ได้แก่ ราที่มีลักษณะของรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากรากของกล้วยไม้เศรษฐกิจ 3 สกุล คือ รองเท้านารี ชิมิเดียม และหวาย และระยะที่ 2 ศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จากราไมคอร์ไรซาที่แยกและเลี้ยงได้ โดยการศึกษาระยะเวลาเจริญของเมล็ดและโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ที่เลี้ยงบนอาหารที่มีการปลูกเชื้อราและอาหารสังเคราะห์

โครงการวิจัยระยะที่ 1 คณะผู้วิจัยสามารถแยกรา *Rhizoctonia*-like จำนวน 27 ไอโซเลต โดยรากตัวอย่างเก็บจากกล้วยไม้ที่โตเต็มที่แล้วในแหล่งปลูกเลี้ยงต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย การจำแนกชนิดราทำโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ 5.8S ribosomal DNA (rDNA) และการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบว่า *Epulorhiza repens* เป็นราที่พบบ่อยที่สุดพบในรากของกล้วยไม้หลายชนิดในทั้งสามสกุลที่ศึกษา ในขณะที่ราที่คล้าย *Epulorhiza calendulina* พบเฉพาะในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเท่านั้น ราไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบได้แก่ anamorph ของ *Tulasnella irregularis* ราที่อาจเป็น anamorphic species ใหม่ในสกุล *Tulasnella* 4 ชนิด และราที่อาจเป็น anamorphic species ใหม่ในวงศ์ Tulasnellaceae 1 ชนิด

โครงการวิจัยระยะที่ 2 ราตัวแทนจำนวน 8 ไอโซเลตถูกนำมาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้พื้นเมืองของไทย 2 ชนิด ได้แก่ วานเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum*) และเอื้องเงิน (*Dendrobium draconis*) โดยทำการบันทึกระยะเวลาเจริญของเมล็ดและโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (MS), oat meal agar (OMA) หรือบน OMA ที่ปลูกเชื้อราทุกสัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า รา *E. repens* 2 ไอโซเลต ได้แก่ Da-KP-0-1 และ Pv-PC-1-1 สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มของวานเพชรหึงพัฒนาได้รวดเร็วมากที่สุด ในสัปดาห์ที่ 13 โปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารที่มีเชื้อรา Da-KP-0-1 หรือ Pv-PC-1-1 จะพัฒนาได้รวดเร็วกว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบน OMA ที่ไม่มีการปลูกเชื้อ และโปรโตคอร์มที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อราไอ

ไฮเลต Pv-PC-1-1 ยังสามารถพัฒนาได้รวดเร็วกว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหาร MS สำหรับเชื้อเงิน anamorphic species ที่แตกต่างกัน 3 ชนิดในสกุล *Tulasnella* ได้แก่ ราไฮเลต C1-DT-TC-1, Pv-PC-1-1 และ C3-DT-TC-1 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามไม่มีราไฮเลตใดที่ส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตคอร์มของเชื้อเงินได้ดีกว่าอาหาร MS

งานวิจัยนี้ได้สร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายทางชนิดและพันธุกรรมของเชื้อราในรากของกล้วยไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจ ในแหล่งปลูกเลี้ยงซึ่งแทบไม่พบว่ามีรายงานในการศึกษาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังรายงานแนวทางการใช้ประโยชน์จากเชื้อราเหล่านี้เพื่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ง
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)	จ
สารบัญ	ช
สารบัญภาพ	ณ
สารบัญตาราง	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
2.1 ลักษณะของร้วไมคอร์ไรซากล้วยไม้	3
2.2 การแยก การเลี้ยงและการเก็บเชื้อพันธุ์ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้	4
2.3 เทคนิคทางชีวโมเลกุลสำหรับการจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซากล้วยไม้	5
2.4 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับราไมคอร์ไรซา	6
บทที่ 3 วิจัย	
3.1 ชนิดของกล้วยไม้และบริเวณที่เก็บตัวอย่าง	8
3.2 การแยกรากจากรากตัวอย่างและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา	9
3.3 การสกัดดีเอ็นเอ เทคนิคพีซีอาร์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	9
3.4 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับรา	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 รากจากรากตัวอย่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่แยกได้	13
4.2 การสกัดดีเอ็นเอ เทคนิคพีซีอาร์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	17
4.3 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับรา	25
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	
5.1 รากจากรากตัวอย่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่แยกได้	30
5.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่แยกได้	30
5.3 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยการเลี้ยงร่วมกับรา	31
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	
การเผยแพร่ผลงานวิจัย	
Reprint ของ บทความที่ได้รับการเผยแพร่	

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 4-1 ตัวอย่างโคโลนีและลักษณะทางจุลทรรศน์ของรา <i>Rhizoctonia</i> -like	15
ภาพที่ 4-2 Strict consensus maximum parsimony tree ของราทั้งหมด	22
ภาพที่ 4-3 Fifty percent majority-rule consensus tree ของสมาชิกใน Clade I	24
ภาพที่ 4-4 Fifty percent majority-rule consensus tree ของสมาชิกใน Clade II	24
ภาพที่ 4-5 Strict consensus maximum parsimony tree ของสมาชิกใน Clade V	25
ภาพที่ 4-6 เมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึงและเอื้องเงิน	27
ภาพที่ 4-7 Peloton ในโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึงและเอื้องเงิน	29

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3-1 ชนิดกล้วยไม้ บริเวณที่เก็บตัวอย่าง และที่มาของต้นกล้วยไม้ที่ใช้	8
ตารางที่ 3-2 ระยะเวลาเจริญของเมล็ดและโปรโตคอร์ม	12
ตารางที่ 4-1 รหัสไอซีเลตของรากจากงานวิจัยนี้	14
ตารางที่ 4-2 ผลของ BLAST Searches	18
ตารางที่ 4-3 ผลของอาหารและไอซีเลตของรากต่อการพัฒนาการของเมล็ดและโปรโตคอร์มของว่านเพชรหิิง	26
ตารางที่ 4-4 ผลของอาหารและไอซีเลตของรากต่อการพัฒนาการของเมล็ดและโปรโตคอร์มของไอ้ทองเงิน	28