รหัสโครงการ SUT3-302-62-12-26

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เชื้อไมคอร์ไรซาส่งเสริมสุขภาพพืชชักนำความต้านทานต่อโรคเน่าเละกล้วยไม้ ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora*

(Mycorrhizal symbiosis enhances plant health and induces orchid resistance to bacterial soft rot caused by *Erwinia carotovora*)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-302-62-12-26

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เชื้อไมคอร์ไรซาส่งเสริมสุขภาพพืชชักนำความต้านทานต่อโรคเน่าเละกล้วยไม้ ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* (Mycorrhizal symbiosis enhances plant health and induces orchid resistance to bacterial soft rot caused by *Erwinia carotovora*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ วัฒฐานะ
2. ดร. สุพัชรี ศิริวงศ์
3. นางสาวคณิตา อินทะเล
4. นางสาวกชพร ต้นโพธิ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2565

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อันได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ วัฒฐานะ ผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำ ติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ดร.สุพัชรี ศิริวงศ์ ผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำ ตรวจสอบ ติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

นางสาวคณิตา อินทะเล และนางสาวกชพร ต้นโพธิ์ ผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่คอยดูแลและติดตามงาน และช่วยตรวจแก้ไข โครงการวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์และช่วยให้งานสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาชิน และคุณณัฐพล ประเสริฐ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ

ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ
หัวหน้าโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

เชื้อราไมคอร์ไรซาเป็นเชื้อราที่เจริญอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ และสามารถชักนำความต้านทานต่อโรคได้ เพื่อให้ทราบชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาที่อยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราไมคอร์ไรซาในการส่งเสริมสุขภาพและชักนำความต้านทานกล้วยไม้ต่อโรคเน่าเละ โดยเก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้ป่าชนิดต่างๆ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ กล้วยไม้ว่านจูงนาง, กล้วยไม้ดินนางกราย, กล้วยไม้เอื้องมัจฉาเหลือง, กล้วยไม้เอื้องครั่งสั้น, กล้วยไม้โอโน่เผือก X โอโน่ เซมิ, กล้วยไม้รองเท้านารีฝาหอย และเอื้องหนวดฤาษี จากจังหวัดนครราชสีมา ทำการแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ด้วยวิธี tissue transplanting จากการทดลองพบว่าสามารถจำแนกเชื้อไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ได้ทั้งสิ้น 60 ไอโซเลต จำแนกออกเป็น 4 สกุล ได้แก่เชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium* spp. มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราสายพันธุ์ *Rhizoctonia* sp. 29 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราสายพันธุ์ *Alternaria* sp. 7 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อราสายพันธุ์ *Arbuscular mycorrhizal* 4 เปอร์เซ็นต์ โดยได้คัดเลือกสายพันธุ์ *A. mycorrhizal* จำนวน 2 ไอโซเลตคือ AMF1 และ AMF2 มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้พบว่า *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 สามารถยับยั้งเชื้อ *E. carotovora* ได้ดีที่สุด ($p<0.05$) โดยแสดงค่าการยับยั้ง (clear zone) อยู่ระหว่าง 13.9 มิลลิเมตร และเมื่อทำการฉีดพ่น *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ก่อนที่กล้วยไม้สกุลหวายจะออกดอก มีผลทำให้เชื้อรา *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 มีเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ได้ดีเท่ากับ 43.6 % รวมทั้งเชื้อรา *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 ยังสามารถสร้างสาร Indole-3-acetic acid (IAA, 3-IAA) ที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอย่างมีประสิทธิภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Mycorrhiza lives in symbiotic relationships with Orchid roots which enhance the growth of orchids and induce disease resistance. The purpose of this research was to study the efficacy of mycorrhizal symbiosis in promoting orchid plant health and inducing resistance against soft rot disease and to determine the type of mycorrhizal in the orchid roots. Seven species of orchid roots samples were collected including Wan Jung Nang Orchid (*Geodorum attenuatum* Griff.), Nang Klai Orchid (*Habenaria lindleyana* Steud.), Yellow Macha Orchid (*Dendrobium guibertii*), Saynum khrang san Orchid (*Dendrobium parishii*), Honohono Orchid (*Dendrobium superbum* var. *anosmum*) Egg-in-a-nest Orchid (*Paphiopedilum bellatulum*) and Medusa Orchid (*Seidenfadenia mitrata*) from Nakhon Ratchasima province. Mycorrhizal fungi were isolated from the fungal mycelium inside root cortical cells by tissue transplanting. The result showed that the Mycorrhiza could be isolated from the wild orchid roots by 60 isolates which could be classified into 4 genera as follows: The most 50 % has consisted of *Fusarium* spp., followed by *Rhizoctonia* sp. 29 %, *Alternaria* sp. 7 %and *Arbuscular mycorrhizal* 4 % respectively, then *Arbuscular mycorrhizal* from 2 isolates, AMF1 and AMF2 was selected to test the efficacy of mycorrhiza for inhibiting plant soft rot disease caused by *Erwinia carotovora*. The result found that mycorrhizal isolate AMF2 has the highest inhibition of *E. carotovora* ($p<0.05$) at 13.9 mm. The orchids were sprayed with mycorrhizal isolate AMF2 every 7 days for 5 weeks before the orchid blooms. As a result, Mycorrhizal isolate AMF2 has the highest percentage disease reduction of *E. carotovora* at 43.6% and also can improve plant growth via Indole-3-acetic acid (IAA, 3-IAA).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญภาพ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 5
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 5
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 ประโยชน์ของเชื้อรา Mycorrhiza ต่อกล้วยไม้ 7
2.2 ความหลากหลายของเชื้อรา Mycorrhiza 8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 การรวบรวมและยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าในกล้วยไม้ป่า..... 13
3.2 การคัดเลือกเชื้อราไมคอร์ไรซามีประโยชน์ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ป่า..... 13
3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารชีวโมเลกุลในกล้วยไม้โดยใช้เทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy..... 14
3.4 การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช..... 15
บทที่ 4 ผลการวิจัย
4.1 การรวบรวมและยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าในกล้วยไม้ป่า..... 16
4.2 การคัดเลือกเชื้อราไมคอร์ไรซามีประโยชน์ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ป่า..... 18

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารชีวโมเลกุลในกล้วยไม้โดยใช้เทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy..... 22
4.4 การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช..... 24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ
5.1 การรวบรวมและยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าในกล้วยไม้ป่า..... 25
5.2 การคัดเลือกเชื้อราไมคอร์ไรซามีประโยชน์ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ป่า..... 25
5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารชีวโมเลกุลในกล้วยไม้โดยใช้เทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy..... 26
5.4 การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช..... 27
บรรณานุกรม..... 28
ภาคผนวก 34
ประวัติผู้วิจัย 37

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อราไมคอร์ไรซา..... 12

4.1 ลักษณะอาการเน่าเละของพืชแต่ละชนิดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* (A) ผักคะน้า (B) ต้นเปปเปอร์โรเนีย (C) ต้นหอม..... 16

4.2 ลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ที่แยกได้จากพืช (A) ผักคะน้า (B) ต้นเปปเปอร์โรเนีย (C) ต้นหอม..... 17

4.3 ลักษณะอาการความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ที่เข้าทำลาย (A) เชื้อจากผักคะน้าพื้นที่ใบเป็นแผลระหว่าง 51-75% (B) เชื้อจากต้นเปปเปอร์โรเนีย พื้นที่ใบเป็นแผลระหว่าง 26-50% (C) เชื้อจากต้นหอมพื้นที่ใบเป็นแผลน้อยกว่า 25%..... 17

4.4 ลักษณะของโคโลนีและสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. Carotovora* ที่แยกได้จากผักคะน้าซึ่งมีความรุนแรงในการเข้าทำลายกล้วยไม้มากที่สุด 18

4.5 ลักษณะกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้ป่า (A) กล้วยไม้ว่านจูงนาง (B) กล้วยไม้ดินนางกราย (C) เอื้องมัจฉาเหลือง X (เอื้องมัจฉา X ม่อนไข่) (D) เอื้องครั่งสายสั้น (E) โอโน่เผือก X โอโน่ เซมิ (F) กล้วยไม้รองเท้านารีฝาหอย (G) เอื้องหนวดฤาษี..... 19

4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (โคโลนี) ของเชื้อราที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ป่า (A-D) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. mycorrhizal* (E) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria* sp. (F-G) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา*Rhizoctonia* sp. (H) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Phytophthora* spp..... 19

4.7 แสดงลักษณะสปอร์หรือ conidia ของเชื้อราที่แยกได้จากรากของกล้วยไม้ป่าที่นำมาแยกเชื้อ (A-D) oospore ของ *A. mycorrhizal* (E) spore ของ *Alternaria* sp. (F) ไม่สามารถระบุได้ (G) hyphae ของ *Rhizoctonia* sp. (H) spore ของ *Fusarium* spp. (I) zoosporangium ของ *Phytophthora* spp..... 20

4.8 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* โรคเน่าเละในกล้วยไม้ โดย *A. mycorrhizal ไอโซเลต* AMF1 และ AMF2 (A: Control (non-inoculated), B: *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF1 ร่วมกับ *E. carotovora และ C: A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 ร่วมกับ *E. carotovora*) 21

4.9 แสดงลักษณะการลดโรคของใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคเน่าเละ (T2= ฉีดพ่นด้วย *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 (A) มีเปอร์เซ็นการลดโรค 43.6%, T3= ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ออกซิคลอไรด์ (B) มีเปอร์เซ็นการลดโรค 71.1% และ T4= ฉีดพ่น

ด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) (C) มีเปอร์เซ็นการลดโรค 0.0%,) 22

4.10 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (average secondary derivative FTIR spectrum) ของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อชั้น mesophyll ของใบกล้วยไม้ ที่ได้ทำการสเปรย์เชื้อรา *A. mycorrhizal* สารเคมี และกรรมวิธีควบคุม (Water) ณ ช่วงความถี่ 3000-2800 cm^{-1} และ 1800-800 cm^{-1} โดยใช้โปรแกรม UnscramblerX 10.5..... 23

4.11 การวิเคราะห์ principal component analysis (PCA) แสดงการแยกกลุ่มของ score ในเนื้อเยื่อชั้น mesophyll ของใบกล้วยไม้ที่ได้ทำการสเปรย์เชื้อรา *A. mycorrhizal* สารเคมี และกรรมวิธีควบคุม (Water) โดยใช้โปรแกรม UnscramblerX 10.5..... 24

4.12 ปริมาณการผลิตสาร Indole-3-acetic acid (IAA, 3-IAA) ของเชื้อรา *A. mycorrhizal* (AMF2)..... 25

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 การศึกษาเชื้อราไมคอร์ไรซาที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ก่อโรคเน่าเละกล้วยไม้..... 21

4.2 เปอร์เซ็นต์การลดโรคของใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคเน่าเละในแต่ละกรรมวิธี..... 22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย

กล้วยไม้ดิน (*Terrestrial orchid*) เป็นกล้วยไม้ที่พบขึ้นอยู่ตามพื้นดินหรือซอกหินที่ซากพืช ซากสัตว์สลายตัวผุพังแทรกอยู่ ส่วนมากเป็นพวกที่มีหัวอยู่ใต้ดินหรือกิ่งใต้ดิน และมีการพักตัวตลอดฤดูแล้งจนกระทั่งเริ่มเข้าฤดูฝนจะผลิใบและสร้างช่อดอกพร้อมกับการสร้างหัวใหม่ขึ้นมาโดยมีลักษณะของหัวที่ฝังอยู่ใต้ดิน เช่น หัวเทียม (pseudobulb) หรือเหง้า (rhizome) หรือส่วนที่สะสมอาหารอยู่ใต้ดิน ซึ่งอาจเป็นส่วนของลำต้น (tuber) หรือส่วนของราก (tuberous root) (จิตราพรรณ, 2554)

กล้วยไม้ดินมีหลายสกุล เช่น ลิ้นมังกร (*Habenaria erichmichelii* Christenson) หรือสังหินปัดแดง จัดอยู่ใน วงศ์ Orchidaceae พบได้ในภาคอีสานและภาคใต้ของประเทศไทย ดอกบานในช่วงเดือนกันยายนตุลาคม ลักษณะดอก มีกลีบเลี้ยงด้านบน และด้านล่าง มีขนาดเล็กและมีสีเขียว กลีบดอกมีสีชมพูอ่อน หรือแดงอ่อน ในขณะที่ปาก มีรอยหยักแบ่งเป็น 4 แฉก ขนาดยาวประมาณ 3 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2.5 เซนติเมตร มีสีชมพูอ่อน และชมพูเข้ม หลังจากมีดอกออกผลแล้วส่วนเหนือดินเหี่ยวแห้งตายไป คงยังเหลือส่วนหัวใต้ดิน, เอื้องน้ำต้น (*Calanthe cardioglossa* Schltr.) เป็นกล้วยไม้ดินที่มีการเจริญเติบโตทางด้านข้าง ได้แก่กล้วยไม้ที่มีเหง้า ส่วนทอดเลื้อยหรือไหลเมื่อต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว สามารถแตกต้นใหม่หรือหน่อใหม่จากโคนกอหรือตามข้อลำต้นได้ ลำต้นเป็นรูปทรงน้ำเต้า สูงประมาณ 7-15 ซม.ใบแบนแผ่เป็นรูปรี กว้าง 7-10 ซม. ยาว 18-25 ซม. จะทิ้งใบจนหมดต้นเมื่อถึงฤดูกาลที่ผลิดอกทำให้เหลือเพียงดอก, กล้วยไม้ดินนางกราย (*Pecteilis susannae* (L.) Rafin.) เป็นกล้วยไม้ดินดอกหอม มีเหลือในธรรมชาติน้อย เนื่องจากถูกเก็บจากป่าเพื่อการค้ามาก ชื่ออื่น นางกราย (นางอั้ว) ดอกสีเขียวอมขาวหรืออมเหลือง กลีบเลี้ยงบนรูปไข่กว้าง ยาว 2-3 เซนติเมตร กลีบคู่ข้างแคบและยาวกว่าเล็กน้อย กลีบดอกรูปใบหอก ยาว 0.7-1.3 เซนติเมตร กลีบปากแยก 3 พู พูข้างกางออกรูปพัด ยาว 2-3.5 เซนติเมตร ขอบจักชายครุยลึก พูกลางรูปใบหอกถึงรูปแถบ ยาว 3-4.5 เซนติเมตร เดือยโค้ง ยาว 7-15.5 เซนติเมตร เส้าเกสรยาว 1-1.3 เซนติเมตร รังไข่รวมก้านดอกยาว 2.5-6 เซนติเมตร, เอื้องมัจฉาเหลือง X (เอื้องมัจฉา X ม่อนไข่) เป็นกล้วยไม้ไทยลูกผสมที่ให้ดอกสวยงามเป็นสีเหลือง เป็นช่อห้อยลงมา เลี้ยงง่ายออกดอกได้ทุกภาคของประเทศ ออกดอกได้เฉลี่ยปีละ 3-4 ครั้งต่อปี, เอื้องครั่งสายสั้น (*Dendrobium parishii* Rchb.f.) วงศ์: Orchidaceae ออกตามข้อเป็นช่อสั้น ช่อละ 1-3 ดอก กลีบดอกสีม่วง โคนกลีบปากกระดกห่อขึ้น ขอบฉีกเป็นริ้วละเอียด สีม่วง มีปื้นกว้างสีม่วงเข้ม 2 ปื้นที่กลางกลีบ ดอกขนาด 3.5-5 เซนติเมตร มีกลิ่นหอม ออกดอกเดือนมีนาคม-พฤษภาคม, โอโน่เผือก X โอโน่เซมิ เป็นกล้วยไม้สกุลหวาย เป็นเอื้องสาย เมื่อโตเต็มที่มีลำต้นยาว ออกดอกตามลำต้น ออกดอกปีละ 1 ครั้ง ช่วงเดือนเมษายน - พฤษภาคมดอกมีสีขาวสะอาด มีกลิ่นหอม, กล้วยไม้รองเท้านารีฝาหอย (*Paphiopedilum bellatulum* (Rchb. f.) Stein) ขึ้นตามซอกหินหรือโคนต้นไม้ในป่าดิบ

ทางภาคเหนือซึ่งสูงจากระดับทะเล 700 เมตรขึ้นไป ถิ่นกำเนิด การกระจายพันธุ์ พม่า จีน และลาว, เอื้องหนวดฤาษี หรือ เคราฤาษี (*Tillandsia usneoides* L.) ลำต้นทอดยาวได้ถึง 30 เมตรและยืดยาว เรียวเล็กคล้ายเส้นด้าย ใบบาง รูปแถบ ยาว 2.5-5 เซนติเมตร ทุกส่วนมีขนเส้นเล็กละเอียดสีเทาเงินที่เรียกว่า ไทรโคม (trichome) ช่วยสะท้อนแสงและเก็บรักษาความชื้น ดอกสีม่วงขนาดเล็ก มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ มักออกดอกดกในช่วงฤดูหนาว, เอื้องอั่วพวงมณี (*Calanthe rubens* Ridl.) เป็นหัวรูปกลมรี เป็นสันตามยาว สีเขียวอมเทา ใบคล้ายเอื้องชมพูไพร ทิ้งใบก่อนออกดอก ช่อดอกยาวได้ถึง 50 เซนติเมตร ก้านช่อผอมยาว ปลายโค้งเล็กน้อย กลีบดอกสีชมพู กลีบปากเว้าตื้น 3 แฉก กลางกลีบปากมีสีชมพูเข้มอมม่วง ขนาดดอก 2 x 3 เซนติเมตร ออกดอกเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2556) และว่านจูงนาง เป็นกล้วยไม้ดินชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae วงศ์ย่อย Vandoideda มีชื่อสกุลว่า *Geodorum* spp. มีชื่อสามัญไทยว่า ว่านจูงนาง หรือ กบ (อบฉันท์ และ ชุมพล, 2543) มีชื่ออื่นๆตามท้องถิ่นว่า ว่านถอนพิษ อิ่งเปราะ กำปองดิน (สลิล, 2549) กล้วยไม้สกุลนี้มีการสำรวจพบในประเทศไทย 7 ชนิด กระจายพันธุ์อยู่ในป่าทั่วทุกภาคของประเทศไทย (อบฉันท์ และ ชุมพล, 2543) ว่านจูงนางมีใบที่สวยงามและมีขนาดของต้นที่กะทัดรัด ก้านช่อดอกตั้งตรงมีใบประดับคลุมเป็นระยะ ส่วนปลายโค้งงอลง ผนวกกับดอกที่มีขนาดเล็ก ออกดอกเป็นกลุ่มที่ปลายช่อ ทำให้เป็นที่ชื่นชอบของผู้พบเห็น และมีแนวโน้มที่จะผลิตเป็นกล้วยไม้กระถางทางการค้า พบได้ในป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าดิบชื้นทั่วไปของประเทศ (สลิล, 2549; อบฉันท์ และ ชุมพล, 2543) หัวเป็นแบบคอร์ม รูปร่างกลม หรือกลมแป้นเรียวไปทางปลาย มีข้อปล้องชัดเจน 8-10 ปล้องต่อหัว หัวมีการเจริญเติบโตไปทางด้านข้าง เรียงชิดติดกันเป็นแถวยาว ขนานไปกับผิวดินหรือใต้ดิน ส่วนใหญ่ในสภาพธรรมชาติว่านจูงนางหนึ่งกอมีการสร้างหัวใหม่ เพียงปีละหนึ่งหัวเท่านั้น เพราะมีตาเพียงตาเดียวที่เจริญเป็นต้นใหม่ (ศลิษา และคณะ, 2551 อมรรัตน์ และคณะ, 2551) นอกจากนี้ว่านจูงนางยังมีวงจรชีวิตการเจริญเติบโต สลับกับการพักตัว โดยในธรรมชาติจะเริ่มมีการแทงหน่อ ประมาณเดือนเมษายน ออกดอกเดือนเมษายน ถึง เดือนพฤษภาคม และเข้าสู่ระยะพักตัวประมาณเดือนตุลาคม ยาวนาน 4 - 5 เดือน (ศลิษา และคณะ, 2551 อมรรัตน์ และคณะ, 2551) ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการขยายพันธุ์และมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากไม่สามารถผลิตต้นได้ตลอดทั้งปี จากการสำรวจซ้ำหลายครั้งในพื้นที่กระจายพันธุ์ที่เดิม พบว่ามีการลดลงของประชากร ว่านจูงนางอย่างเห็นได้ชัดเจน จากร่องรอยของภัยธรรมชาติ ได้แก่ น้ำหลาก และไฟป่า โดยเฉพาะในเขตพื้นที่เกิดไฟป่าเป็นประจำ ส่วนการสูญหายที่เกิดจากการรุกรานของมนุษย์นั้นเห็นได้ชัดเจนเช่นกัน จากร่องรอยของการนำต้นพืชเป็นจำนวนมากออกไปจากแหล่งกระจายพันธุ์ โดยเฉพาะบริเวณที่ง่ายต่อการเข้าถึง (ฉันทนา, 2552; ฉันทนา และรณรงค์, 2550) ว่านจูงนางกระจายพันธุ์ได้ในธรรมชาติจากเมล็ดและหัว การขยายพันธุ์พืชชนิดนี้นอกถิ่นอาศัยสามารถทำได้เช่นเดียวกับในสภาพธรรมชาติ แต่การขยายพันธุ์จากเมล็ดใช้เวลานาน การติดฝักจนกระทั่งฝักแก่ใช้เวลา 4 – 8 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของว่านจูงนาง (ฉันทนา, 2552; นฤมล และคณะ, 2554; Bhadar และ Hossain, 2003; Sheelavantmath et al., 2000) การเพาะเมล็ดจากฝักอ่อนใช้เวลายาวนาน

เช่นกันไม่ว่าจะเป็นช่วงที่เมล็ดงอก และช่วงที่ต้นกล้าเจริญเติบโตจนกระทั่งย้ายปลูกและต้นพืชเจริญเติบโตข้ามฤดู (ฉันทนา, 2552) ดังเช่นงานวิจัยของสัจจพร (2545) ซึ่งพบว่า การเพาะเมล็ดว่านจูงนาง ชนิด *G. siamense* Rolfe ex *Downie* ในสภาพปลอดเชื้อต้องใช้เวลาในการเพาะนานถึง 4 เดือน เมล็ดจึงจะงอกและพัฒนาเป็นโปรโตรโคอร์ม ของ *G. densifiorum* (Lam.) Schltr. ซึ่งเกิดจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาชักนำให้เกิดการสร้างหัวที่ต่อมาสามารถนำไปปลูกและเจริญเป็นต้นพืชได้ แต่มีอัตราการรอดอยู่เพียง 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการขยายพันธุ์จากหัวนั้นนับได้ว่าช้ามากเช่นกัน การสร้างหัวของพืชมีทั้งที่ถูกกระตุ้นโดยปัจจัยสภาพแวดล้อม (Le Guen-le Saos et al., 2002) และปัจจัยภายในตามระยะการเจริญเติบโต ปัจจัยสภาพ แวดล้อมที่ส่งผลต่อการสร้างหัวของพืช ได้แก่ สภาพวันยาวกระตุ้นการสร้างหัวกระเทียม หอม และฟรีเซีย (Mansour, 1968) ฟรีเซียและพืชในสกุล Allium ต้องการผ่านอุณหภูมิต่ำเป็น ระยะเวลาหนึ่งในการสร้างหัว แต่อย่างไรก็ตามในปี 2551 อมรรัตน์ และคณะ รายงานว่า ว่านจูงนางมีลักษณะของหัวและพฤติกรรมการเจริญเติบโตของหัว แตกต่างไปจากกล้วยไม้ดินชนิดอื่นๆ จึงน่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราที่อาศัยอยู่บริเวณรากเพื่อคัดเลือกเชื้อราที่จะสามารถส่งเสริมการเจริญให้กับกล้วยไม้และชักนำความต้านทานต่อโรคได้

ไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช มีความสัมพันธ์กันแบบ mutualism คือได้รับประโยชน์ทั้งสองฝ่าย ซึ่งเชื้อราไมคอร์ไรซาจะได้รับอาหารจากพืชที่หลั่งออกมาทางระบบรากคือแหล่งคาร์บอน เช่นน้ำตาลกลูโคส และซูโครส และเป็นที่อยู่อาศัย ส่วนพืชจะได้รับประโยชน์คือ มีความสามารถในการทนแล้งได้ดีขึ้น เนื่องจากมีเส้นใยของเชื้อราปกคลุมที่รากทำให้รากมีความชุ่มชื้น ทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างได้ดี ทนต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชและสามารถดูดซับธาตุอาหารได้ดี ช่วยให้ต้นไม้เหี่ยวช้าลงเมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ และสามารถป้องกันโรคที่เกิดขึ้นกับพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย ไมคอร์ไรซา แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ 1) เอกโตไมคอร์ไรซา เชื้อราจะรวมตัวเป็น pseudoparenchymatous sheath อยู่ด้านนอกเหนือในส่วนอีพิเดอร์มิส แต่ไม่แทรกตัวเข้าในชั้นคอร์เท็กซ์ การรวมตัวกับเชื้อราทำให้โครงสร้างของรากพืชเปลี่ยนไปโดยสั้นลงหรือเกิด dichotomously branching cluster และมีเนื้อเยื่อเจริญน้อยลง เชื้อราจะได้ประโยชน์ในด้านได้สารอาหารจากพืช หลีกเลี่ยงการแย่งสารอาหารจากจุลินทรีย์อื่นๆในดิน ส่วนพืชจะมีจะมีอัตราการดูดซึมสารอาหารจากดินเพิ่มขึ้นเพราะเชื้อราช่วยเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึม เพิ่มความทนทานต่อเชื้อก่อโรคและสภาพแวดล้อม เอนไซม์จากเชื้อราช่วยย่อยสารอาหารให้ดูดซึมง่ายขึ้น 2) เอนโดไมคอร์ไรซาหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza (VAM) เชื้อราจะแทรกตัวเข้าไปในชั้นคอร์เท็กซ์และส่วนที่มีชีวิตของรากพืช กลายเป็นกลุ่มของไมซีเลียม ข้อดีของเอนโดไมคอไรซาต่อพืชคือป้องกันการเกิดโรคในบริเวณคอร์เท็กซ์ เพิ่มการดูดซับไนโตรเจนให้แก่พืช และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเตส ในกล้วยไม้พบความสัมพันธ์แบบนี้กับเชื้อรา เช่น Rhizoctonia โดยเชื้อราจะม้วนตัวเป็นขดเข้าไปในชั้นคอร์เท็กซ์ และถูกดูดกลืนเข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของพืชจนแยกออกมาเป็นอิสระไม่ได้ เชื้อรายังช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ดีขึ้น ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *orchid mycorrhizal* และกล้วยไม้ ถือ

เป็นความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างมีความจำเพาะ แตกต่างกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อราไมคอร์ไรซาเข้าชนิดอื่นๆ ซึ่งไมคอร์ไรซาเข้าที่อยู่ในกล้วยไม้นั้นจะอยู่ในออเดอร์ ericales ซึ่งไม่ใช่รูปแบบ endomycorrhizal เหมือนกับเชื้อราอื่นๆในจีนัส zygomycota เชื้อราที่เข้าอาศัยในรากกล้วยไม้จะอยู่ในกลุ่ม basidiomycetes เป็นส่วนใหญ่ และยังพบว่าเชื้อราในกลุ่ม ascomycetes ก็เข้าอาศัยในรากกล้วยไม้เช่นเดียวกันแต่เป็นส่วนน้อย (Currah et al., 1997) เชื้อราในกลุ่ม basidiomycetes ที่เข้าอาศัยในรากกล้วยไม้บางชนิดพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคในพืชอื่นๆ เช่น *Rhizoctonia solani* Kahn (Hadley, 1982) หรือแม้กระทั่งภายในสกุลกล้วยไม้เอง เชื้อบางชนิดอาจจะอยู่อาศัยแบบให้ประโยชน์ร่วมกัน (symbiotic fungi) กับกล้วยไม้บางชนิด (species) แต่อาจจะเป็นเชื้อก่อโรคในกล้วยไม้ species อื่นๆ อย่างไรก็ตาม โดยส่วนใหญ่แล้วกล้วยไม้จะควบคุมการเข้าอยู่อาศัยและการเจริญของเชื้อรา endomycorrhizal เชื้อรา *orchid mycorrhizal* ถูกพบบริเวณเซลล์ cortex ชั้นในและถูกจำกัดให้อยู่เฉพาะบริเวณราก (Hadley, 1982) การเข้าสู่เซลล์รากพืช (infection) ถูกจำกัดด้วยเซลล์ embryo และ epidermal ของขนราก ซึ่งมีความจำเพาะสูงมากในการเปรียบเทียบจดจำเชื้อราที่ไม่ใช่ *orchid mycorrhizal* ซึ่งนำไปสู่การควบคุมกระบวนการให้เชื้อเข้าสู่เซลล์ของกล้วยไม้ ซึ่งเชื้อราอาศัยจะต้องปรับตัวเข้ากับกระบวนการควบคุมการเข้าสู่เซลล์นี้ (Hadley, 1982) โดยเชื้อราอาศัยจะมีการปรับเปลี่ยนเส้นใย (mycelium) ที่กระจุกขดตัวกันหนาแน่น เรียกว่า pelotons เพื่อให้สามารถเข้าสู่เซลล์รากพืชอาศัยได้ (Hadley, 1982) ภายในเซลล์เชื้อรา *orchid mycorrhizal* นั้น กลุ่มเส้นใย pelotons ถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มและ interfacial matrix material (Larry Peterson and Hugues , 2004) เยื่อหุ้มนี้ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ adenylate cyclase คล้ายกับ plasma membrane และจะต้องมีการปรับเปลี่ยนรูปร่างของ microtubules และ cell wall microfibrils ซึ่งจะถูกปรับเปลี่ยนในขณะที่เชื้อราเข้าสู่เซลล์รากพืช บางครั้งอาจจำเป็นที่จะต้องมีการปรับเปลี่ยนภายใน cytoplasm และมีการสร้างเยื่อหุ้มล้อมรอบ pelotons (Larry Peterson and Hugues , 2004)

ปัจจัยอื่น ๆของปฏิสัมพันธ์ระหว่างกล้วยไม้และ orchid-mycorrhizal ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน Hadley (1982) รายงานว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญของพืช มีการศึกษาหลายงานที่พบว่าพืชที่มีการเข้าอาศัยของเชื้อจุลินทรีย์ที่พึ่งพาอาศัยได้ประโยชน์ร่วมกัน (symbiont) มีการเจริญเติบโตดีกว่าพืชที่ไม่มี symbiont ในปี 1991 Anderson พบว่าเมื่อปลูก *Spiranthes magnicamporum* ร่วมกับเชื้อรา symbiont มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าการปลูกที่ไม่มีเชื้อรา symbiont รวมถึง Hadley (1982) ก็ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการแลกเปลี่ยนธาตุอาหารระหว่างพืชและเชื้อราอาศัย (Arditti, 1990) พบว่ามีการขนส่งวิตามิน, กรดอะมิโน, และน้ำตาลจากเชื้อราอาศัยไปยังกล้วยไม้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบว่าสารเหล่านี้ถูกขนส่งไปยังกล้วยไม้ในขณะที่เชื้อรายังมีชีวิต หรือถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อเชื้อราตายและถูกย่อยสลายแล้ว (Hadley, 1982) การที่กล้วยไม้ควบคุมปริมาณ *orchid mycorrhizal* เข้าสู่รากพบว่ามีการเกี่ยวข้องกับสาร phytoalexins เนื่องจากมีการพบสารนี้ระหว่างการเกิดกลไกควบคุม (Hadley, 1982) โดยระดับของกลไกควบคุมนี้จะรุนแรง

มากน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดและความสามารถในการก่อโรคของ orchid-fungus แต่ละชนิดและกล้วยไม้แต่ละชนิด ซึ่งกลไกนี้เป็นกลไกการปกป้องตนเองโดยทั่วไปของพืช ในปี 1995 Beyrle et al. ค้นพบสาร orhcinol ภายใน protocorms ของกล้วยไม้ ซึ่งพบว่าสาร orchinol นั้นคือสาร phytoalexin (ในการค้นพบครั้งแรก) และเชื่อว่าสาร orchinol นี้ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เข้าสู่รากกล้วยไม้ และในปี 1976 Blakeman et al. ตั้งสมมติฐานว่าการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ oxidative ระหว่างที่ไมคอร์ไรซาเข้าสู่เซลล์รากกล้วยไม้นั้นคล้ายคลึงกับกลไกการปกป้องตนเองของพืชต่อเชื้อก่อโรค

สำหรับไมคอร์ไรซาที่เข้าอาศัยเซลล์รากพืช (endomycorrhiza) พืชจะมีการสร้างสาร flavonoids และ phenolic compounds เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณไปกระตุ้นการงอกของสปอร์ (spore germination) ก่อนจะมีการเจริญและแตกแขนงกิ่งก้านของเส้นใยของเชื้อราไมคอร์ไรซาเข้าซึ่งเป็นสารประเภท glomulin (Hirsch และ Kapulnik, 1998) ซึ่งสารเหล่านี้จะส่งผลโดยตรงให้เชื้อรามีการเจริญและเข้าสู่รากพืชอาศัย เมื่อเส้นใยเชื้อราสัมผัสกับรากพืชอาศัย เกิดการจดจำความจำเพาะต่อกัน (specific cell-cell interactions) นำไปสู่การสร้างและฟอร์มตัวเป็น mycorrhiza (Hirsch และ Kapulnik, 1998; Martin et al., 1999)

งานวิจัยครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นในการศึกษาความสำคัญของเชื้อราไมคอร์ไรซาที่ช่วยส่งเสริมการเจริญให้กับกล้วยไม้และชักนำความต้านทานต่อโรคเน่าเละ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
2. เพื่อแยก และจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ป่า
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราไมคอร์ไรซาในการส่งเสริมสุขภาพและชักนำความต้านทานกล้วยไม้ต่อโรคเน่าเละ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกและศึกษาเชื้อราไมคอร์ไรซาที่มีความสามารถในการชักนำความต้านทานต่อโรคเน่าเละในกล้วยไม้

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. สามารถแยกและจัดจำแนกชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้ป่า
2. ทราบถึงประสิทธิภาพของเชื้อราไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของกล้วยไม้ป่า
3. ทราบถึงกลไกของไมคอร์ไรซาต่อการเจริญและต้านทานต่อโรคของกล้วยไม้ป่า

การนำไปใช้ประโยชน์ในด้าน

ด้านวิชาการ

ผู้ที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผู้ใช้	การใช้ประโยชน์
อุทยานแห่งชาติ	ทราบถึงกลไกและจัดจำแนกชนิดของเชื้อไมคอร์ไรซาในการชักนำความต้านทานโรคเน่าเละ
เกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้	ได้เชื้อไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ
นักธุรกิจผู้ผลิตสารชีวภัณฑ์	ได้เชื้อไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประโยชน์ของเชื้อรา Mycorrhiza ต่อกล้วยไม้

จากการตรวจเอกสารการศึกษาราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ในประเทศไทยนั้น ราไมคอร์ไรซาเป็นราที่เจริญอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ โดยที่ราสามารถสร้างเส้นใยเข้าไปในรากกล้วยไม้ที่เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ โดยสร้างโครงสร้างภายในเซลล์เรียกว่า “peloton” ราชนิดนี้ ไม่ได้เข้าทำลายรากพืช แต่จะให้ธาตุอาหารแก่พืชเช่น ธาตุคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญกับพืช ซึ่งถือว่าเป็นความสัมพันธ์แบบเอื้อประโยชนซึ่งกันและกัน (symbiosis) ระหว่างกล้วยไม้กับราไมคอร์ไรซา โดยในสภาพธรรมชาติพบว่าราไมคอร์ไรซาที่เจริญอยู่ในรากกล้วยไม้มีความสัมพันธ์กับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ช่วยให้เมล็ดสามารถงอกได้ดีขึ้น โดยให้ธาตุอาหาร และกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้า ดังนั้นการศึกษาเชื้อราไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากกล้วยไม้นั้น เพื่อที่จะนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในการนำมาปลูกเชื้อในเมล็ดกล้วยไม้ เพื่อช่วยในการงอกและการเจริญเติบโตต่อไป (symbiotic seed germination) ซึ่งวิธีการดังกล่าวได้มีการทดลองอย่างกว้างขวางกับกล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchids) และกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchids) ในประเทศแถบเอเชีย เช่น สิงคโปร์ ไต้หวัน และเกาหลี (Athipunyakom et al., 2004)

พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ (2555) ศึกษาชนิดราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์ และการใช้ประโยชน์ของราในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ โดยรวบรวมและจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์ จากนั้นนำราไมคอร์ไรซาทั้งหมดมาทำการคัดเลือกการเจริญเติบโตบนอาหาร oat meal agar (OMA) พบว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร OMA 4 isolates คือ Ceratorhiza goodyerae-repentis (RZ 0067), *Epulorhiza calendulina* (RZ 0050), *Epulorhiza repens* (RZ 0066) และ *Tulasnella* sp. (RZ 0059) และเมื่อนำทั้ง 4 isolates มาทดสอบการมีประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่แบบเกื้อกูล เอื้อประโยชนซึ่งกันและกัน พบว่า รา *E. calendulina* มีศักยภาพในการกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่งอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 58 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน ซึ่งแตกต่างกับ *E. repens* และ *Tulasnella* sp. ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ 85.3 และ 75.8 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนในเวลา 120 วัน ได้เพียง 18.5 และ 17.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่รา *C. goodyerae-repentis* และกรรมวิธีเพาะเมล็ดที่ไม่ได้ใส่ราไมคอร์ไรซา สามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 9.5 และ 17 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น และยังไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้และตายในที่สุด เช่นเดียวกับปวริศ ใจคำ และคณะ (2557) ที่ทำการศึกษาผลของไมคอร์ไรซากล้วยไม้ และหินฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโต ของกล้วยไม้สกุลฮาเบนาเรีย ซึ่งเป็นกล้วยไม้ดินที่มีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่ออยู่ร่วมกับราไมคอร์ไรซา โดยใช้ไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากกล้วยไม้ดิน 3 ชนิดได้แก่

1) ไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่แยกได้จากกล้วยไม้ดินนางกราย (A) 2) ไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่แยกได้จากกล้วยไม้ดินหูยาว (B) และ 3) *Oidioden* sp. ที่แยกได้จากกล้วยไม้ดินว่านจูงนาง (C) ร่วมกับการใช้หินฟอสเฟตที่ระดับ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าการเติมเชื้อราไมคอร์ไรซา และหินฟอสเฟตไม่ส่งผลต่อเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น, ความกว้างใบ, ความยาวใบ จำนวนใบต่อต้น และอัตราการออกดอกของลิ้นมังกรสีเหลืองที่ได้รับกรรมวิธีต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบว่าความกว้าง และความยาวดอกของลิ้นมังกรสีเหลืองที่ได้รับกรรมวิธีต่างๆ มีความแตกต่างกัน โดยการเติมหินฟอสเฟตร่วมกับไมคอร์ไรซากล้วยไม้ ชนิด A, ชนิด B, ชนิด C, ชนิด A และ B, ชนิด A และ C และชนิด B และ C ช่วยเพิ่มคุณภาพดอก ทั้งในด้านความกว้าง และความยาวดอก เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

2.2 ความหลากหลายของเชื้อรา Mycorrhiza

เห็ดราไมคอร์ไรซาที่พบอยู่ทั่วโลกมีมากกว่า 5,000 ชนิด พืชหรือต้นไม้ที่สัมพันธ์กับรากลุ่มนี้มีอย่างน้อย 2,000 ชนิด หรือประมาณ 10-20% ของพืชชั้นสูง ต้นไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจชนิดที่สำคัญในทางป่าไม้ส่วนใหญ่ต้องการราเอคโตไมคอร์ไรซา ได้แก่ ไม้ในวงศ์สนเขา (Pinaceae) วงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) วงศ์ไม้ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) วงศ์ไม้มะค่าโมง (Caesalpinaceae) วงศ์ไม้ก่อ (Fagaceae) วงศ์ไม้กำลังเสือโคร่ง (Betulaceae) วงศ์ไม้สนทะเล (Casuarinaceae) วงศ์ไม้ถั่ว (Leguminosae) เป็นต้น และมีงานวิจัยเกี่ยวกับไมคอร์ไรซามากกว่า 14,000 เรื่อง สำหรับเอคโตไมคอร์ไรซาทั่วโลกพบ 167 ชนิด มีรายงานว่าพบในระบบนิเวศป่าไม้ของไทยแล้ว 47 ชนิด โดยพบชนิดของเห็ดราไมคอร์ไรซาที่มีศักยภาพ ได้แก่ เห็ดราในวงศ์ Russulaceae (เห็ดไคลหลังเขียว เห็ดน้ำแป้ง เห็ดไคลหลังขาว เห็ดน้ำหมาก และเห็ดหาด) วงศ์ Boletaceae (เห็ดน้ำผึ้ง) วงศ์ Cortinariaceae (เห็ดขี้เถ้า) และวงศ์ Sclerodermataceae (เห็ดเผาะ) โดยพบอาศัยอยู่ร่วมกับพันธุ์ไม้ป่าหลายชนิด เช่น มะค่าโมง ยางขาว ยางปาย ตะเคียนหิน ตะเคียนทอง เคี่ยมคะนอง และก่อขี้หมูเป็นต้น สำหรับไม้ยูคาลิปตัสที่มีเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซา (*Pisolithus tinctorius*) และไม้สักที่มีเอ็นโดไมคอร์ไรซาชนิด *Glomus* sp. อาศัยร่วมอยู่ด้วยจะมีอัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต และดูดซับธาตุอาหารได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีไมคอร์ไรซา

Harley และ Smith (1983) ได้จัดแบ่งเชื้อราไมคอร์ไรซาออกเป็น 7 กลุ่มย่อย ได้แก่ ectomycorrhiza, endomycorrhiza (vesicular-arbuscular mycorrhiza), ectendomycorrhiza, ericoid mycorrhiza, arbutoid mycorrhiza, monotropoid mycorrhiza และ orchid mycorrhiza ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมีความแตกต่างกัน ดังนี้

1. Ectomycorrhiza เป็นไมคอร์ไรซาที่มีเส้นใยของราเจริญสานตัวกันเป็นแผ่น (fungal sheath) หรือเป็นเยื่อหุ้ม (mantle) อยู่รอบ ๆ ราก มีความหนาประมาณ 20-100 ไมครอน และมีน้ำหนักแห้งคิดเป็น 25-40 % ของน้ำหนักแห้งของรากทั้งหมด เส้นใยบางส่วนจะเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้น epidermis กับเซลล์ชั้น cortex แล้วเส้นใยจะเจริญสานกันเป็นตาข่ายอยู่รอบ cortical cell เรียกว่า Hartig net (Warcup, 1980) ราเอคโตไมคอร์ไรซามีมากกว่า 5,000 ชนิด และ

เจริญร่วมกับพืชหลายชนิด ในเขตภูมิอากาศต่างๆทั่วโลก ส่วนใหญ่ราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นราชั้นสูง จัดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes, Gasteromycetes, Ascomycetes และ Phycomycetes (Harley และ Smith, 1983)

2. Endomycorrhiza เป็นไมคอร์ไรซาที่มีเส้นใยเจริญอยู่รอบๆ รากพืชและบางส่วนของเส้นใยเจริญเข้าไปใน เซลล์ของรากพืช (intracellular) และอาจเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ (intercellular) ของรากพืชในชั้น cortex เส้นใยที่เจริญอยู่รอบๆ รากพืชอยู่กันอย่างหลวม ๆ หรือยื่นออกจากรากพืชสู่ดินประมาณ 1 เซนติเมตร ส่วนของเส้นใยราที่เจริญเข้าไปในรากพืชจะเจริญอยู่ในชั้น primary cortex เท่านั้น และนิยมเรียกชื่อกันในปัจจุบันว่า ราเวสสิคูล่าร์-อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา (vesicular-arbuscular mycorrhiza : VAM) นอกจากเส้นใยในรากแล้ว รา vesicular-arbuscular mycorrhiza ยังสร้างโครงสร้างที่ในเนื้อเยื่อราก 2 โครงสร้าง คือ โครงสร้างเวสสิเคิล (vesicle) และ อาร์บัสคูล (arbuscule) โดยเส้นใยจะเจริญเข้าไปอยู่ในเซลล์ชั้น cortex หรืออยู่ระหว่างเซลล์ชั้น cortex ไม่เข้าไปในชั้น meristematic cells หรือชั้น endodermis เส้นใยอาจขดเป็นวง ในเซลล์ราก หรืออาจจะมีการแตกแขนงแบบ dichotomous จนเกือบเต็มเซลล์ ทำให้มีลักษณะคล้ายกะหล่ำดอก หรือคล้ายต้นไม้ (tree-like) อยู่ในเซลล์พืชเราเรียกโครงสร้างนั้นว่า อาร์บัสคูล (arbuscule) ซึ่งจะเจริญอยู่ระยะหนึ่งและสลายไป อาจเกิดจากการย่อยสลายของเซลล์พืชก็เป็นได้ โครงสร้าง arbuscule นั้นเป็นโครงสร้างซึ่งราใช้สะสมแร่ธาตุอาหาร โดยเฉพาะฟอสฟอรัส ซึ่งเมื่อพืชย่อยสลายโครงสร้างนี้ สารอาหารสามารถถ่ายเทไปให้กับพืชได้ การถ่ายเทสารอาหารนั้นอาจเกิดจากการแลกเปลี่ยนสารอาหาร ที่บริเวณผิวหน้าของ arbuscule ที่สัมผัสกับเซลล์ได้ ราจะได้รับสารคาร์โบไฮเดรตจากพืช โครงสร้าง arbuscule นี้จะมีอายุประมาณ 2-14 วันก็จะสลายไป เมื่อโครงสร้าง arbuscule สลายไป ราก็จะมีการสร้างโครงสร้างซึ่งมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ลักษณะคล้ายถุง ผนังหนา เกิดที่ปลายของเส้นใย (terminal) หรือตรงกลางเส้นใย (intercalary) ซึ่งโป่งบวมออกมา ภายในมีหยดไขมันสีเหลืองบรรจุอยู่ เป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเก็บสะสม อาหารของรา และเป็นโครงสร้าง ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ได้ดี เรียกโครงสร้างนี้ว่า เวสสิเคิล (vesicle) เนื่องจากโครงสร้างทั้งสองนี้ เป็นโครงสร้างที่ไม่พบในราชนิดใด ๆ จึงทำให้นักวิจัยใช้โครงสร้างนี้ในการบ่งชี้ว่า มีราชนิดนี้เข้าอยู่อาศัย ในพืชอาศัยหรือไม่ รากของพืชที่มีราอาศัยร่วมอยู่ด้วย สามารถเจริญ เติบโตได้ตามปกติ และไม่มีการเปลี่ยนแปลง ลักษณะทางกายภาพ แต่รากพืชบางชนิดอาจพบ การเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอ่อน และไม่มีรากขน ซึ่งสีเหลืองนี้ จะจางหายไปเมื่อถูกแสงสว่างและความเข้มของสี ขึ้นอยู่กับปริมาณการเข้าสู่รากของรา (Harley และ Smith, 1983)

3. Ectendomycorrhiza หรือ Pseudomycorrhiza เป็นไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะอยู่ระหว่าง ectomycorrhiza และ endomycorrhiza อาจพบเส้นใยของราเจริญเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ รอบรากพืชหรือไม่พบเลย มีเส้นใยบางส่วนเจริญเข้าสู่เซลล์พืชแล้วขดเป็นวง (coil) อยู่ภายในเซลล์ บางครั้งพบเส้นใย เจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้น cortex และสร้าง Hartig net ราที่มีการดำรงชีวิตแบบนี้เส้นใย จะมีผนังกั้น มีสีเข้ม จัดอยู่ใน class Basidiomycetes และ Ascomycetes

บางครั้งพบการสร้าง chlamydospore อยู่ภายในเส้นใยที่โป่งบวม ไม่พบ conidia และโครงสร้างสืบพันธุ์อื่น ๆ ตัวอย่างราได้แก่ *Rhizoctonia sylvestris, Phiolocephala dimorphospora* พืชอาศัยของราไม้แก่ สน (pine), spruce, beech ซึ่งเป็นพืชในกลุ่ม Gymnospermae และ Angiospermae (Harley และ Smith, 1983) ectendomycorrhiza มักจะพบ ectomycorrhiza เจริญขึ้นแทน (Wilcox, 1971; Thomas และ Jackson, 1979)

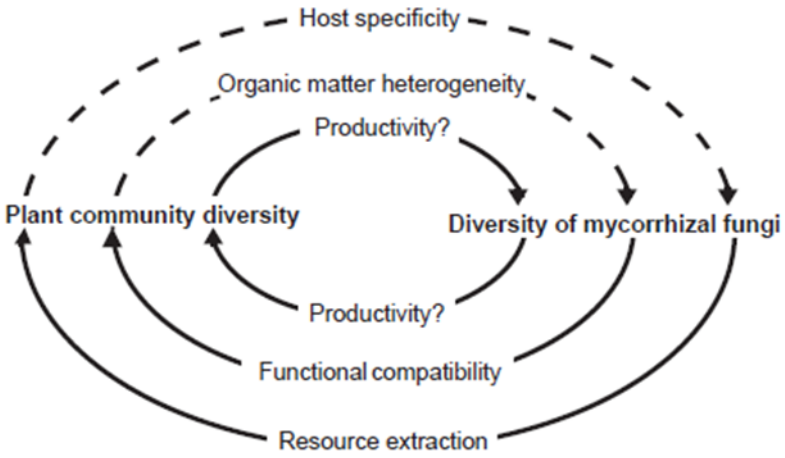
4. Ericoid mycorrhiza เป็นไมคอร์ไรซาของพืชใน order Ericales ลักษณะสำคัญของ ericoid mycorrhiza คือ เส้นใยของรา ชนิดนี้จะมีผนังกั้น บางชนิดเป็นราใน class Ascomycetes เช่น Pezizella ericae บางชนิดเป็นราใน class Basidiomycetes เช่น Clavaria ราจะเจริญเข้าสู่เซลล์พืชแล้วม้วนขดเป็นวง (coil) อยู่ในเซลล์ของ cortex ไม่สร้าง sheath หรือ Hartig net พืชอาศัยเป็น ไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็กใน order Ericales family Ericaceae (sub-family Ericoideae, Vaccinioideae และ Rhododendroideae) family Epacridaceae และ family Empetraceae (Hartey และ Smith, 1983) เป็นไมคอร์ไรซาที่มีความสำคัญต่อพืชและระบบนิเวศน์ เช่นเดียวกับไมคอร์ไรซาชนิดอื่น แต่ที่สำคัญ คือ ericoid mycorrhiza มีบทบาทสำคัญมากสำหรับ พืชที่ปลูกในดินที่มีความเป็นกรดสูง Read (1978) ได้ศึกษาผลของ ericoid mycorrhiza ต่อการเจริญของ *Erica baurea* พืชประจำถิ่นแอฟริกาใต้ที่ออกดอกในฤดูแล้ง พบว่า *E. baurea* ที่มี ericoid mycorrhiza อยู่ด้วย มีความสามารถในการดูดธาตุไนโตรเจน และสะสมไว้ในฤดูสืบพันธุ์ได้สูงกว่าพืชที่ไม่มีไมคอร์ไรซา

5. Arbutoid mycorrhiza เป็นไมคอร์ไรซาของพืชใน order Ericales อีกชนิดหนึ่งโดยราที่อยู่ร่วมกับ รากจะสร้างเส้นใยสานกัน เป็นแผ่น (sheath) ล้อมรอบราก แล้วเส้นใยบางส่วนเจริญเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ในชั้น cortex สร้าง Hartig net และมีเส้นใยเล็ก ๆ งอกแทงเข้าสู่เซลล์แล้วเจริญขดม้วนเป็นวง (coil) อยู่ภายในเซลล์ มักพบในต้นไม้และไม้พุ่ม (shrub) ที่โตเต็มที่แล้ว ราที่มีความสัมพันธ์กับพืชแบบนี้เป็นราใน class Basidiomycetes ซึ่งบางครั้งอาจจะมีความสัมพันธ์แบบ ectomycorrhiza หรือ ectendomycorrhiza กับพืชอาศัยชนิดอื่น เช่น *Cortinarius zakii* ซึ่งเป็น arbutoid mycorrhiza กับพืช *Arbutus menziesii* และเป็น ectomycorrhiza กับพืช *Pseudotsuga douglasii* และกับพืช *Abies grandis* เป็นต้น (Zak, 1973, 1974; Duddridge, 1980)

6. Montropoid mycorrhiza เป็นไมคอร์ไรซาที่พบในพืช family Monotropaceae ซึ่งเป็นพืชที่ไม่มีคลอโรฟิล มีระบบรากเป็น รากแก้ว รากแขนงและรากฝอย บริเวณรากแขนงจะพบเส้นใยของราสานกัน หนา 2-3 ชั้น เป็นแผ่น (sheath) และมีเส้นใยสานกัน เป็นตาข่าย (Hartig net) ล้อมรอบเซลล์ชั้นนอกสุด (epidermis) และชั้น cortex ของพืช นอกเหนือไปจากนี้ เส้นใยของราบางส่วนแทงเข้าไปในเซลล์ของ epidermis แล้วเจริญเป็น haustoria ที่ไม่แตกแขนง พืชอาศัยที่มีการศึกษากันมาก คือ *Monotropa hypopytis* มักพบไมคอร์ไรซาชนิดนี้ เจริญอยู่ร่วมกับไม้ป่าหลายชนิด เช่น บีช (beech), สน (pine) และ conifers ชนิดอื่น ๆ ราที่เป็นไมคอร์ไรซา ชนิดนี้เป็นราใน class Basidiomycetes ตัวอย่างเช่น Boletus (Harley และ Smith, 1983)

7. Orchid mycorrhiza เป็นไมคอร์ไรซาที่พบในพืช family Orchidaceae หรือกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ มีความสัมพันธ์กับราใน class Basidiomycetes บางชนิด ที่สามารถย่อยเซลลูโลส (cellulose) และลิกนิน (lignin) ได้ ไมคอร์ไรซาชนิดนี้มีความสำคัญในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืช และให้สารอาหารที่ต้นกล้าพืช ต้องการในการเจริญเติบโต (Warcup, 1975)

ไมคอร์ไรซา ไม่เพียงแต่จะช่วยพืชในเรื่องของการรอดชีวิตและการขยายพันธุ์ แต่ยังสามารถช่วยในเรื่องของการกระตุ้นภูมิต้านทานต่อโรคในกล้วยไม้ได้ Wu และคณะ(2011) ได้ทำการทดลองการกระตุ้นความต้านทานต่อโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* ในกล้วยไม้ *Phalaenopsis* พบว่ากลุ่มที่มีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อราไมคอร์ไรซาสามารถระตุ้นให้เกิดการเจริญได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อราไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังสามารถลดการเกิดโรคเน่าเละในกล้วยไม้ได้อีกด้วย นอกจากนี้เชื้อราไมคอร์ไรซายังช่วยในด้านอื่นๆด้วย เช่น ทางด้านคุณภาพของใบ และทางสัณฐานวิทยาและความแข็งแรงของพืชและกระตุ้นการเกิดราก ปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายต่อโครงสร้างของเชื้อราไมคอร์ไรซามีหลายอย่าง ทั้งปัจจัยที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ที่เห็นชัดเจนคือลักษณะและโครงสร้างของพืช เนื่องจากความจำเพาะของการอยู่ร่วมกันระหว่างพืชกับเชื้อราไมคอร์ไรซา เช่น รากพืชมีการหลั่งสารออกมาหลายชนิดไม่เพียงแต่คาร์โบไฮเดรต เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับเชื้อราไมคอร์ไรซาแล้ว พืชยังสามารถหลั่งสาร organic compound อื่นๆ เช่น กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ ฟีนอล อัลดีไฮด์ คีโตน เอสเทอ และเทอพีนอยด์ สารเหล่านี้บางชนิดมีการสะสมอยู่รอบๆ รากพืชและถูกใช้โดยจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณนั้น อย่างไรก็ตามยังมีสารอินทรีย์อื่นๆ ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถแทรกผ่านดินไปสู่เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่อยู่ห่างออกไปได้ มีรายงานว่าสารที่พืชหลั่งออกมาจากบริเวณรากสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยของเอ็นโดไมคอร์ไรซาและเอคโตไมคอร์ ไรซาได้ ถึงแม้ว่ากลไกในการกระตุ้นนั้นจะยังไม่ทราบแน่ชัดแต่คาดว่าน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับสาร secondary compound จากพืช เช่น สารฟลาโวนอยด์ที่พืชสร้างขึ้นและออกซินที่ถูกสร้างจากเชื้อรา ซึ่งสารเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณระหว่างพืชกับเชื้อราไมคอร์ไรซาการเริ่มฟอร์มตัวที่รากพืช (Koske และ Gemma, 1992, Gianinazzi-Pearson et al, 1989)



ภาพที่ 2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อราไมคอร์ไรซา ที่มา : Kernaghan, 2005

ไมคอร์ไรซาทำให้พืชเกิดความหลากหลาย ซึ่งความหลากหลายของพืชอาจส่งผลให้เกิดความหลากหลายเชื้อราไมคอร์ไรซาด้วยเรียกว่า feedback เช่นกัน ดังรูปที่ 2.1 ด้านบน (positive feedback) แสดงให้เห็นถึงการเจริญของพืชจากธาตุอาหารในดินธรรมชาติ ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะใช้สารอาหารที่อยู่ในดินตามธรรมชาติเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ในทางกลับกัน ด้านลบ (negative feedback) เมื่อธาตุอาหารในดินลดลงทำให้ความหลากหลายของพืชลดลงเหลือเพียงแต่สายพันธุ์ที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เท่านั้น ซึ่งด้าน negative feedback เชื้อราไมคอร์ไรซาสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้โดยการอาศัยอยู่ร่วมกันและแลกเปลี่ยนสารระหว่างกันระหว่างพืชและไมคอร์ไรซาซึ่งจะทำให้เกิดความจำเพาะและความหลากหลายของพืชและไมคอร์ไรซา (Kernaghan, 2005)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การรวบรวมและยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละในกล้วยไม้ป่า

ทำการรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละจากผักคะน้า เปปเปอร์โรเนีย และต้นหอม เนื่องจากผู้ศึกษาไม่พบการระบาดของโรคเน่าเละในกล้วยไม้ในช่วงฤดูที่ทำการทดลอง จึงทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ ผักคะน้า เปปเปอร์โรเนีย และต้นหอม ซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* และทำการทดสอบการเข้าทำลายในกล้วยไม้ เพื่อคัดเลือกหาเชื้อสาเหตุโรคที่มีความรุนแรงมาใช้ในกล้วยไม้ จากนั้นนำมายืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรค โดยนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ $1x10^8$ cfu/ml โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 จากนั้นปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลตเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมคือน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ลงบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย จากนั้นเก็บตัวอย่างทดสอบในกล่องชื้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ และทำการประเมินความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน โดยวัดระดับความรุนแรงของโรคจากระดับ 0 ถึง 4 โดยระดับคะแนน 0 คือไม่ปรากฏอาการ, คะแนน 1 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลน้อยกว่า 25%, คะแนน 2 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 26-50%, คะแนน 3 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 51-75% และคะแนน 4 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลมากกว่า 75% เปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมดของกล้วยไม้ (วิลาวรรณ์ และคณะ, 2549) เมื่อสังเกตเห็นกล้วยไม้แสดงอาการของโรค ทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง จากกล้วยไม้ (re-isolation) ที่แสดงอาการของโรครุนแรงที่สุด แล้วทำการ cross streak บนอาหาร nutrient agar (NA) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) แล้วนำมาปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่แยกได้ลงบนใบกล้วยไม้ชุดใหม่ (re-inoculation) อีกครั้งตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มา streak บนอาหาร NA เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ไอโซเลตรุนแรงที่สุด (aggressive strain) เพื่อทำการเก็บเชื้อและศึกษาในขั้นตอนต่อไป (วิลาวรรณ์ และคณะ, 2549)

3.2 การคัดเลือกเชื้อราไมคอร์ไรซามีประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ป่า

คัดแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ป่า 7 ตัวอย่าง คือ (1) กล้วยไม้ว่านจูงนาง (2) กล้วยไม้ดินนางกราย (3) เอื้องมัจฉาเหลือง X (เอื้องมัจฉา X ม่อนไข่) (4) เอื้องครั่งสายสั้น (5) โอโน่

เผือก X โอโน่ เซมิ (6) กล้วยไม้รองเท้านารีฝาหอย (7) เอื้องหนวดฤาษี มาเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar (PDA) จากนั้นบ่มเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนเชื้อเจริญเต็ม plate

นำ cork borer เจาะอาหารวุ้นที่มีเชื้อราไมคอร์ไรซามาวางบนอาหาร และ streak เชื้อ *Erwinia carotovora* เป็นเส้นตรงห่างจากชิ้นวุ้นของเชื้อราประมาณ 2 เซ็นติเมตร จากนั้นบ่มเชื้อที่เลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 7 วัน ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจวัดผลโดยวัดขนาด clear zone (มิลลิเมตร) ที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีของเชื้อราซึ่งเกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* ต่อมาคัดเลือกเชื้อไมคอร์ไรซาไอโซเลตที่รุนแรงที่สุดในการควบคุมโรคเน่าเละมาฉีดพ่นบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย ก่อนระยะออกดอก ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการปลูกเชื้อ *E. carotovora* เพื่อทดสอบความสามารถในการลดโรคของเชื้อไมคอร์ไรซา

3.3 ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบสารชีวโมเลกุลในกล้วยไม้โดยใช้เทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy

3.3.1 นำตัวอย่างใบกล้วยไม้สกุลหวายที่ทำการฉีดพ่นด้วย *Arbuscular mycorrhizal* ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ก่อนกล้วยไม้ออกดอก จากนั้นทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละมาตัดตามแนวยาวของใบให้มีขนาดประมาณ 0.5x1 เซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างใบกล้วยไม้ไปวางในกระดาษฟรอยด์ที่พับเป็นกระทง แล้วนำไป fix ด้วยสาร optimal cutting temperature หรือ OCT ให้ท่วมตัวอย่าง จากนั้นนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวทันทีเพื่อให้ตัวอย่างแข็งอย่างรวดเร็ว นำตัวอย่างแช่ในตู้ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาตัด section เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

3.3.2 การตัด section ตัวอย่างใบกล้วยไม้ โดยนำตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แช่แข็งไว้มาตัดด้วยเครื่อง cryosection อุณหภูมิที่ใช้ในการตัดที่เหมาะสมคือ -20 ถึง -30 องศาเซลเซียส ตัดที่ขนาดความหนาขนาดพอเหมาะที่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ นำชิ้นตัวอย่างที่ได้มาวางบน BaF2 Window จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum desiccator และเก็บตัวอย่างไว้ใน desiccator จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy

3.3.3 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy: FTIR (tensor 27, bruker optic) โดย condition ที่ใช้ในการวัดคือช่วงความยาวคลื่น 4000-800 cm^{-1}, scan time 64 scan, resolution 4 cm^{-1}, และวัด background ทุกๆ 5 spectrum และวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำ spectrum ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม OPUS 7.2, Unscrambler X 10.5 และ Cytospec เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในตัวอย่างกล้วยไม้ในกลุ่มที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคและกลุ่มควบคุมต่อไป

3.4 การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

วิเคราะห์ความสามารถในการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA, 3-IAA) ตามวิธีของ Bharucha และคณะ (Bharucha et al., 2013) เลี้ยงไมคอร์ไรซาในอาหาร International Streptomyces Project Medium 3 (ISP-3) ปริมาตร 100 ml ใน ฟลาสก์ขนาด 250 ml เป็นเวลา 7 วัน ทำการเจาะเชื้อไมคอร์ไรซาที่ต้องการ (โดยเลือกบริเวณที่มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน) ลงในอาหาร ISP-3 ที่เติม tryptophan 1 g/L นำเชื้อที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาแยกส่วนสารละลายใสโดยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนสารละลายใสไปวิเคราะห์หา IAA โดย ปิเปตน้ำเลี้ยงเชื้อ จำนวน 2 ml เติม Ortho-phosphoric acid ปริมาตร 20 μl และ Salkowski's reagent (เตรียมสาร 50 ml ประกอบด้วย 35% (w/v) $HClO_4$ และ $FeCl_3$ 0.5 โมลาร์ปริมาตร 1 ml) ปริมาตร 4 ml บ่มในที่มืด 1 ชั่วโมง นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณปริมาณ IAA ที่เชื้อราไมคอร์ไรซาสร้างขึ้นกับกราฟมาตรฐานของสาร IAA บริสุทธิ์ (MW = 175.19) ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100, 150 μmol

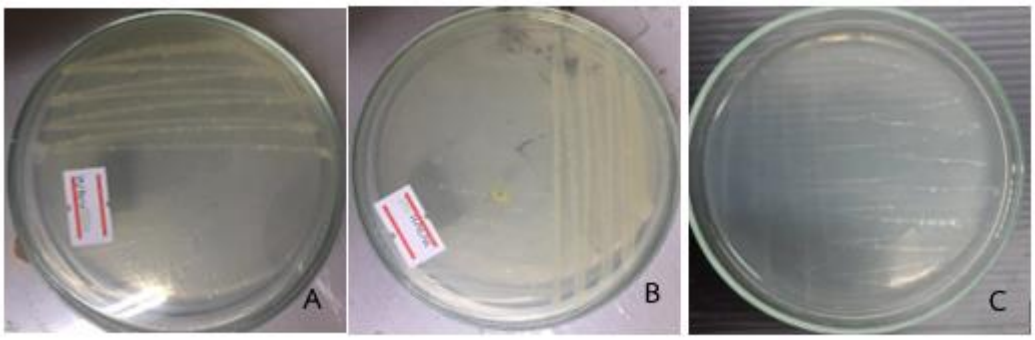
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การรวบรวมและยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละในกล้วยไม้ป่า

ทำการรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละจากผักคะน้า เปปเปอร์โรเนีย และต้นหอม เนื่องจากผู้ศึกษาไม่พบการระบาดของโรคเน่าเละในกล้วยไม้ในช่วงฤดูที่ทำการทดลอง จึงทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ ผักคะน้า เปปเปอร์โรเนีย และต้นหอม ซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* (ดังภาพที่ 4.1) และทำการทดสอบการเข้าทำลายในกล้วยไม้ เพื่อคัดเลือกหาเชื้อสาเหตุโรคที่มีความรุนแรงมาใช้ในกล้วยไม้ พบว่าสามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละจากผักคะน้า เปปเปอร์โรเนีย และต้นหอม ได้ 6 ไอโซเลต (ดังภาพที่ 4.2) และนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อใช้เป็นตัวแทนของกล้วยไม้ป่าเนื่องจากกล้วยไม้ป่ามีวงจรชีวิตการเจริญเติบโต สลับกับการพักตัว โดยในธรรมชาติจะเริ่มมีการแทงหน่อ ประมาณเดือนเมษายน ออกดอกเดือนเมษายน ถึง เดือนพฤษภาคม และเข้าสู่ระยะพักตัวประมาณเดือนตุลาคม ยาวนาน 4 - 5 เดือนซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการต่อการทดลอง ผู้วิจัยจึงได้ใช้กล้วยไม้สกุลหวายเป็นพืชโมเดลในการทดลอง

ภาพที่ 4.1 ลักษณะอาการเน่าเละของพืชแต่ละชนิดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* (A) ผักคะน้า (B) ต้นเปปเปอร์โรเนีย (C) ต้นหอม



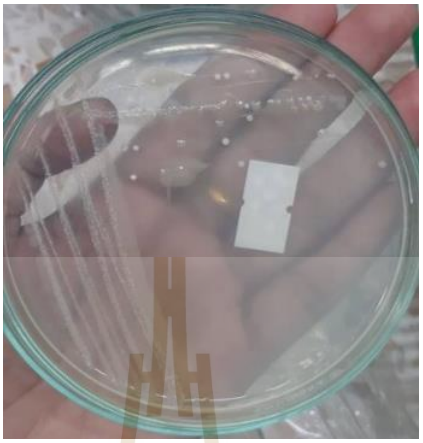
ภาพที่ 4.2 ลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ที่แยกได้จากพืช (A) ผักคะน้า (B) ต้นเปปเปอร์โรเนีย (C) ต้นหอม

จากนั้นทำการประเมินความรุนแรงของโรคเน่าเละกล้วยไม้หลังปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ที่ 4 วันหลังจากปลูกเชื้อ โดยวัดระดับความรุนแรงของโรคจากระดับ 0 ถึง 4 พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ที่เข้าทำลาย จากผักคะน้าพื้นที่ใบเป็นแผลระหว่าง 51-75% รุนแรงที่สุด รองลงมาคือ เชื้อจากต้นเปปเปอร์โรเนีย พื้นที่ใบเป็นแผลระหว่าง 26-50% และเชื้อจากต้นหอม พื้นที่ใบเป็นแผลน้อยกว่า 25% มีความรุนแรงน้อยที่สุด (ดังภาพที่ 4.3)

ภาพที่ 4.3 ลักษณะอาการความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ที่เข้าทำลาย (A) เชื้อจากผักคะน้าพื้นที่ใบเป็นแผลระหว่าง 51-75% (B) เชื้อจากต้นเปปเปอร์โรเนีย พื้นที่ใบเป็นแผลระหว่าง 26-50% (C) เชื้อจากต้นหอมพื้นที่ใบเป็นแผลน้อยกว่า 25%

เมื่อสังเกตเห็นกล้วยไม้แสดงอาการของโรคจากการประเมินความรุนแรงพบว่าแบคทีเรีย *E. carotovora* จากผักคะน้ามีความรุนแรงในการเข้าทำลายกล้วยไม้มากที่สุดอยู่ระหว่าง 51-75% ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* อีกครั้งจากกล้วยไม้ (re-isolation) ที่แสดงอาการของโรครุนแรงที่สุด แล้วทำการ cross streak บนอาหาร nutrient agar (NA) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) แล้วนำมาปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่แยกได้ลงบนกล้วยไม้ชุดใหม่ (re-inoculation) อีกครั้งตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย

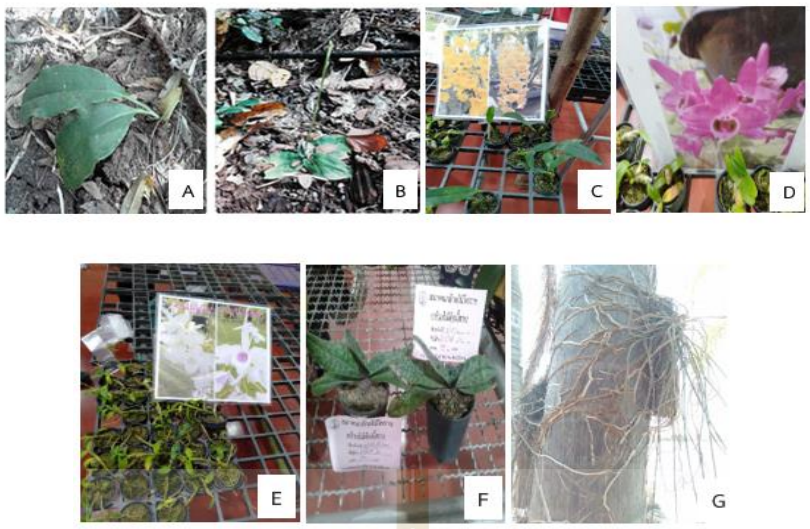
E. carotovora ที่แยกได้มาจากผักคะน้ามีความรุนแรงในการเข้าทำลายกล้วยไม้มากที่สุด มาเลี้ยงบนอาหาร NA เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ไอโซเลตรุนแรงที่สุด (aggressive strain) เพื่อทำการเก็บเชื้อและศึกษาในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 4.4) (วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และคณะ, 2549)



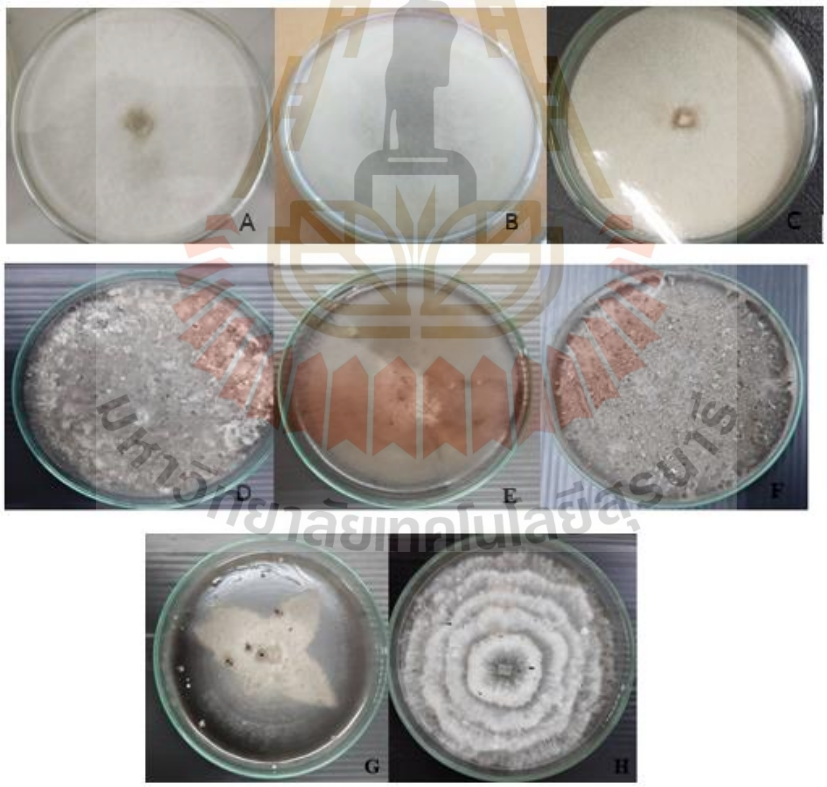
ภาพที่ 4.4 ลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ที่แยกได้จากผักคะน้าซึ่งมีความรุนแรงในการเข้าทำลายกล้วยไม้มากที่สุด

4.2 การคัดเลือกเชื้อราไมคอร์ไรซามีประโยชน์ และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ป่าในระดับห้องปฏิบัติการ

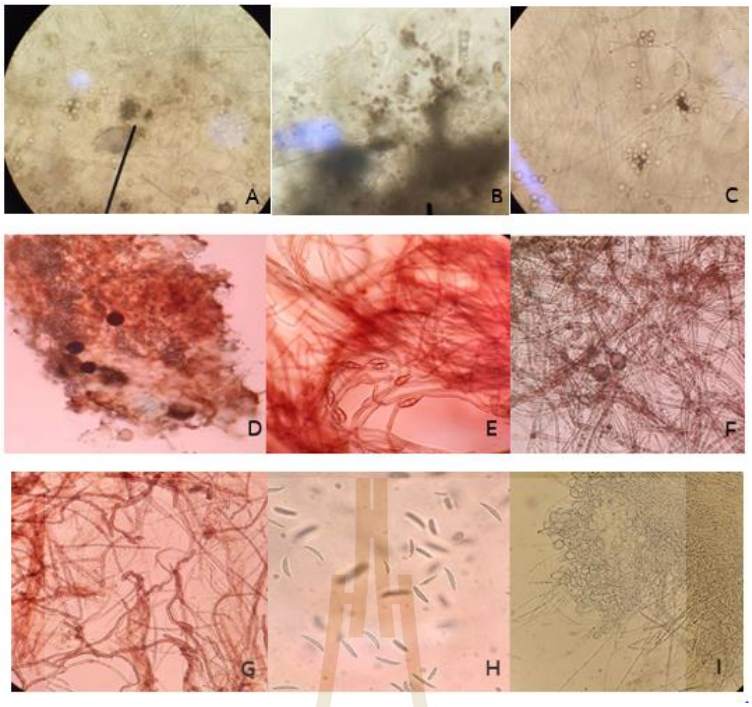
คัดแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ป่า 7 ตัวอย่าง คือ 1) กล้วยไม้ว่านจูงนาง 2) กล้วยไม้ดินนางกราย 3) เอื้องมัจฉาเหลือง X (เอื้องมัจฉา X ม่อนไข่) 4) เอื้องครั่งสายสั้น 5) โอโน่เผือก X โอโน่ เซมิ 6) กล้วยไม้รองเท้านารีฝาหอย 7) เอื้องหนวดฤาษี พบว่าสามารถแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ป่าได้ทั้งสิ้น 60 ไอโซเลต พบเชื้อราจำนวน 4 สกุล (ภาพที่ 4.6) มาเลี้ยงในอาหาร PDA จากนั้นบ่มเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 4.7) โดยพบว่าสามารถแยกเชื้อรา *Fusarium* spp. มากที่สุด 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Rhizoctonia* sp. 29 เปอร์เซ็นต์ *Alternaria* sp., 7 เปอร์เซ็นต์ *Arbuscular mycorrhizal* 4 เปอร์เซ็นต์ และอื่น ๆ อีก 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่สามารถระบุสกุลของเชื้อราได้ ซึ่งได้เลือกเชื้อรา *Arbuscular mycorrhizal* ที่คัดแยกได้จากรากกล้วยไม้ว่านนางจูง นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐาณวิทยา



ภาพที่ 4.5 ลักษณะกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้ป่า (A) กล้วยไม้ว่านจูงนาง (B) กล้วยไม้ดินนางกราย (C) เอื้องมัจฉาเหลือง X (เอื้องมัจฉา X ม่อนไข่) (D) เอื้องครั่งสายสั้น (E) โอโน่เผือก X โอโน่เซมิ (F) กล้วยไม้รองเท้านารีฝาหอย (G) เอื้องหนวดฤาษี



ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (โคโลนี) ของเชื้อราที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ป่า (A-D) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. mycorrhizal* (E) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria* sp. (F-G) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. (H) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Phytophthora* spp.



ภาพที่ 4.7 แสดงลักษณะสปอร์หรือ conidia ของเชื้อราที่แยกได้จากรากของกล้วยไม้ป่าที่นำมาแยกเชื้อ (A-D) oospore ของ *A. mycorrhizal* (E) spore ของ *Alternaria* sp. (F) ไม่สามารถระบุได้ (G) hyphae ของ *Rhizoctonia* sp. (H) spore ของ *Fusarium* spp. (I) zoosporangium ของ *Phytophthora* spp.

ลักษณะสปอร์หรือ conidia ของเชื้อราที่แยกได้จากรากของกล้วยไม้ป่าที่นำมาแยกเชื้อ (A-D) oospore ของเชื้อรา *Arbuscular mycorrhizal* มีเวสิเคิล (vesicle) ที่บริเวณปลายหรือกลางเส้นใย ซึ่งจะมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ผนังหนา ภายในเวสิเคิลมีหยดไขมันสีเหลือง (E) spore ของเชื้อรา *Alternaria* sp. มีลักษณะสปอร์มีสีอ่อนถึงสีน้ำตาลปนเหลืองผนังเรียบที่มีสปอร์มีรอยต่อการติดของสปอร์ สปอร์มีรูปร่างยาวเกิดเป็นลูกโซ่ที่แตกแขนง สปอร์มีรูปร่างหลายแบบคือ obclavate, obpyriform, ovoid หรือ ellipsoidal บางครั้งพบ beak รูปทรงกระบอกหรือรูปกรวยสั้น (F) ไม่สามารถระบุได้ (G) hyphae ของเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. เส้นใยมีลักษณะสีน้ำตาล มีผนังกั้น สปอร์มีลักษณะคล้ายลูกโซ่ (H) spore ของเชื้อรา *Fusarium* spp. มีลักษณะสปอร์คล้ายพระจันทร์เสี้ยวหัวท้ายแหลม (I) zoosporangium ของเชื้อรา *Phytophthora* spp. มีการสร้างถุงบรรจุสปอร์เรียกว่าสปอร์แรนเจียม ภายในถุงนี้สร้างสปอร์ชนิดที่ว่ายน้ำได้เรียกว่า ซูสปอร์ เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 4.7)

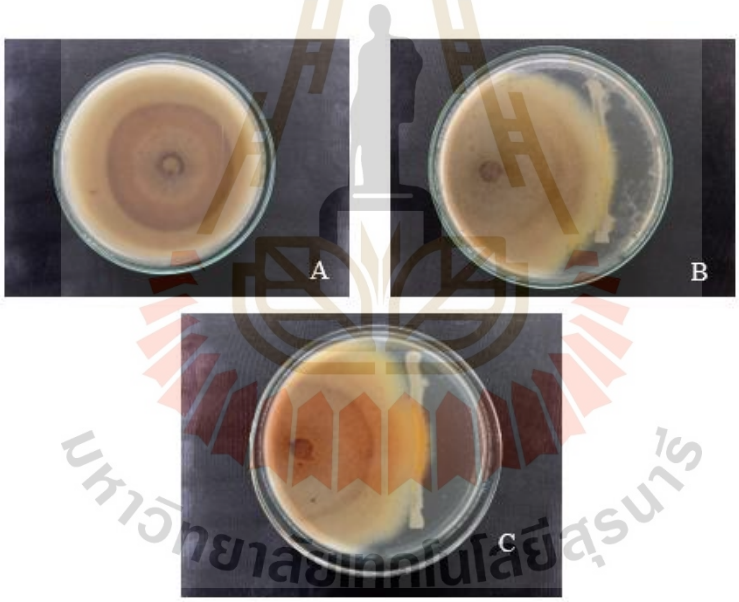
จากนั้นได้การศึกษาเชื้อราไมคอร์ไรซาที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ก่อโรคเน่าเละกล้วยไม้ โดยนำ cork borer เจาะอาหารวุ้นที่มีเชื้อราไมคอร์ไรซาเจริญมาวางบนอาหารโดยเลี้ยงเชื้อไมคอร์ไรซาก่อน 7 วัน หลังจากนั้นจึงใช้ลูปเขี่ยเชื้อ *E. carotovora* เลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 7 วัน และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจวัดผลการยับยั้งเชื้อ (inhibition

zone; มิลลิเมตร) พบว่าเชื้อรา *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 สามารถยับยั้งเชื้อ *E. carotovora* ได้ดีที่สุด ($p<0.05$) โดยแสดงค่าการยับยั้งอยู่ระหว่าง 13.9 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.8)

ตารางที่ 4.1 การศึกษาเชื้อราไมคอร์ไรซาที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ก่อโรคเน่าเละกล้วยไม้

กรรมวิธี	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mean ± SD) (มิลลิเมตร)**
Control (*non-inoculated*)	0.00±0.0c
A. mycorrhizal AMF1ร่วมกับ *E. carotovora*	9.23±0.64b
A. mycorrhizal AMF2 ร่วมกับ *E. carotovora*	13.90±0.03ab
E. carotovora ร่วมกับ คอปเปอร์ออกซิคลอไรด์	14.50±0.02a

[a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 4.8 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* โรคเน่าเละในกล้วยไม้โดย *A. mycorrhizal ไอโซเลต* AMF1 และ AMF2 (A: Control (non-inoculated), B: *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF1 ร่วมกับ *E. carotovora* และ C: *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 ร่วมกับ *E. carotovora*)

จากนั้นได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา *A. mycorrhizal* จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ AMF1 และ AMF 2 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* โดยฉีดพ่นด้วย *A. mycorrhizal* ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ก่อนปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* สาเหตุโรค

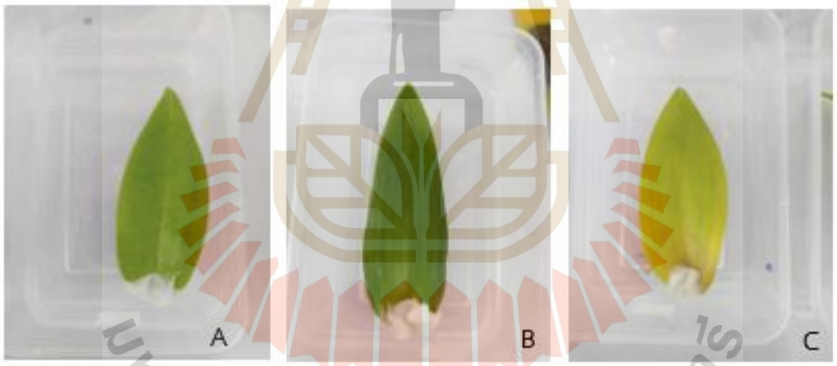
เน่าเละในกล้วยไม้สกุลหวายก่อนระยะออกดอก (ภาพที่ 4.9) พบว่า เชื้อรา *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 สามารถลดเชื้อ *E. carotovora* ได้สูงที่ 43.6 % รองลงมาคือ *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF1 สามารถลดเชื้อ *E. carotovora* ได้ 20.3 % (ตารางที่ 4.2) จึงได้ทำการคัดเลือก เชื้อรา *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การลดโรคของใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคเน่าเละในแต่ละกรรมวิธี

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การลดโรค (%)
T1= ฉีดพ่นด้วย *A. mycorrhizal* AMF1	20.3c
T2= ฉีดพ่นด้วย *A. mycorrhizal* AMF2	43.6b
T3= ฉีดพ่นด้วยสารเคมี (คอปเปอร์ออกซิคลอไรด์)	71.1a
T4= ฉีดพ่นด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม)	0.0d
F-Test	**
C.V. (%)	29.3

** = significantly different at P< 0.05 and 0.01, respectively.

a,b,c ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะการลดโรคของใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคเน่าเละ (T2= ฉีดพ่นด้วย *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 (A) มีเปอร์เซ็นการลดโรค 43.6%, T3= ฉีดพ่นด้วยสารเคมี คอปเปอร์ออกซิคลอไรด์ (B)) มีเปอร์เซ็นการลดโรค 71.1% และ T4= ฉีดพ่นด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) (C) มีเปอร์เซ็นการลดโรค 0.0%,)

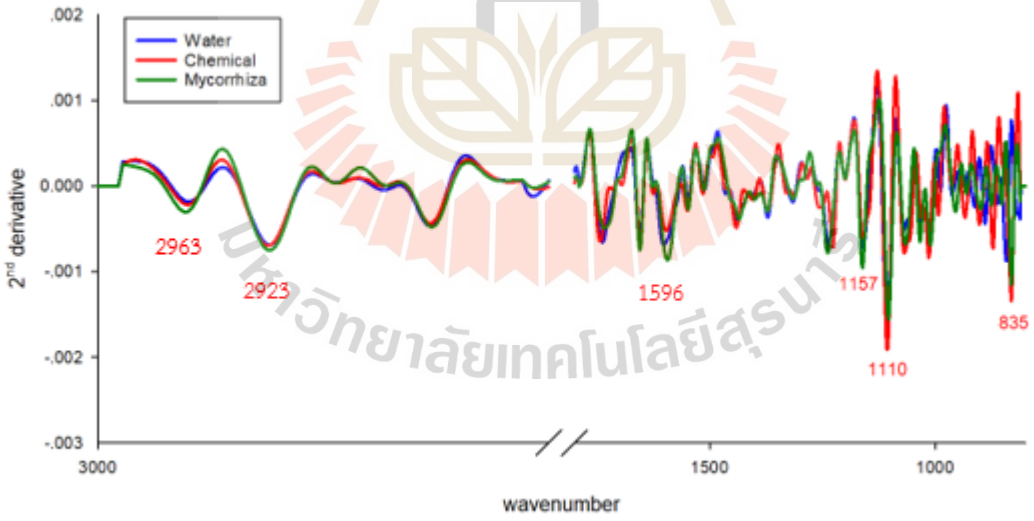
4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารชีวโมเลกุลในกล้วยไม้โดยใช้เทคนิค Synchotron FTIR microspectroscopy

เชื้อรา *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 ที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และช่วยชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค และลดการเกิดโรคเน่าเละในกล้วยไม้มาศึกษา ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลในกล้วยไม้ ด้วยเทคนิค Synchrotron FTIR

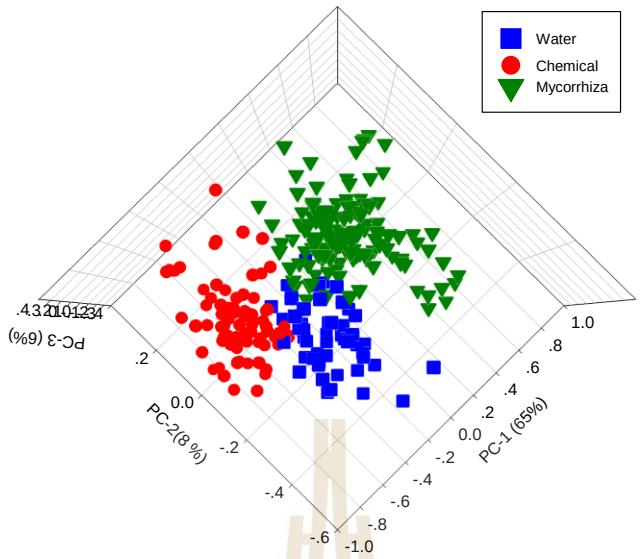
microspectroscopy โดยจะแสดงผลในรูปของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (average secondary derivative FTIR spectrum) ของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อชั้น mesophyll ของใบกล้วยไม้ ใบกล้วยไม้ที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *A. mycorrhizal* ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ก่อนกล้วยไม้ออกดอก เปรียบเทียบกับใบกล้วยไม้ที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมี และกรรมวิธีควบคุม (น้ำ) ที่ช่วงความถี่ 3000-2800 cm^{-1} และ 1800-800 cm^{-1}

จากกราฟ (ภาพที่ 4.10) แสดง average secondary derivative FTIR spectrum ของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อชั้น epidermis ของใบกล้วยไม้ หลังจากได้ทำการสเปรย์เชื้อรา *A. mycorrhizal* สารเคมี และกรรมวิธีควบคุม (น้ำ) ที่ช่วงความถี่ช่วง 3000-2800 cm^{-1} และ 1800-800 cm^{-1} พบว่ากรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *A. mycorrhizal* มีการเปลี่ยนแปลงของไขมัน C-H stretching vibration ในช่วง 2963 และ 2923 cm^{-1} และมีการเปลี่ยนแปลงของของโปรตีน Amide II ในช่วง 1596 cm^{-1} สูงที่สุด รองลงมาเป็นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมี และกรรมวิธีควบคุม (น้ำ) ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ PCA (ภาพที่ 4.11) สามารถแยกกลุ่มของใบกล้วยไม้ หลังจากฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *A. mycorrhizal* (สีเขียว), สารเคมี (สีแดง) และกรรมวิธีควบคุม (สีน้ำเงิน) แยกกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ที่การฉีดพ่นด้วย *A. mycorrhizal* ส่งผลให้ใบกล้วยไม้มีความแข็งแรงของผนังเซลล์ในชั้น mesophyll เพิ่มมากขึ้นยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค



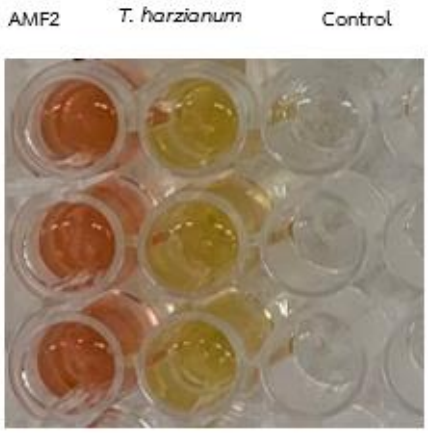
ภาพที่ 4.10 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (average secondary derivative FTIR spectrum) ของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อชั้น mesophyll ของใบกล้วยไม้ ที่ได้ทำการสเปรย์เชื้อรา *A. mycorrhizal* สารเคมี และกรรมวิธีควบคุม (Water) ณ ช่วงความถี่ 3000-2800 cm^{-1} และ 1800-800 cm^{-1} โดยใช้โปรแกรม UnscramblerX 10.5



ภาพที่ 4.11 การวิเคราะห์ principal component analysis (PCA) แสดงการแยกกลุ่มของ score ในเนื้อเยื่อชั้น mesophyll ของใบกล้วยไม้ที่ได้ทำการสเปรย์เชื้อรา *A. mycorrhizal* สารเคมี และกรรมวิธีควบคุม (Water) โดยใช้โปรแกรม UnscramblerX 10.5

4.4 การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อรา *A. mycorrhizal* ซึ่งวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อราไตรโคเดอร์มาเนื่องจากเชื้อราไตรโคเดอร์มามีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืชและเป็นเชื้อราที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นเดียวกันกับเชื้อราไมคอร์ไรซา จากการวิเคราะห์พบว่า เชื้อรา *A. mycorrhizal* มีคุณสมบัติในการสร้าง IAA ได้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน ชนิด Indole-3-acetic acid (IAA, 3-IAA) พบ *A. mycorrhizal* ไอโซเลต AMF2 ให้ปริมาณ IAA 0.239 µg/ml ซึ่ง *A. mycorrhizal* สามารถผลิตสารที่ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าเชื้อราไตรโคเดอร์ม่า



กรรมวิธี	IAA production (µg/ml)
Control	0.00
A. mycorrhizal (AMF2)	0.239
T. harzianum	0.186

ภาพที่ 4.12 ปริมาณการผลิตสาร Indole-3-acetic acid (IAA, 3-IAA) ของเชื้อรา *A. mycorrhizal* (AMF2)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 การรวบรวม และยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละในกล้วยไม้ป่า

จากการรวบรวม และยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละในกล้วยไม้ป่า โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ที่แยกได้จากไอโซเลตผักคะน้าซึ่งมีความรุนแรงที่สุด โดยการทำ artificial inoculation เพื่อให้ใบกล้วยไม้เกิดโรคเน่าเละนั้นจะต้องปรับและควบคุมปัจจัยต่าง ๆ 3 ปัจจัย ได้แก่ เชื้อโรค (pathogen) พืชอาศัย (host plant) และสภาพแวดล้อม (environment) ให้เหมาะสมต่อการเกิดโรคและเกิดขึ้น ณ เวลาเดียวกัน โดยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคต้องใช้เชื้อสายพันธุ์รุนแรง (virulent strain) ที่มีความจำเพาะเจาะจง และมีปริมาณที่พอเพียงในการทดสอบ มีการใช้พันธุ์พืชที่อ่อนแอและพร้อมจะติดเชื้อง่าย (susceptible host) นอกจากนี้สภาพการปลูกเชื้อจะต้องอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ดังนั้น จากการทดลองนี้ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคเน่าเละกล้วยไม้ คือ การใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* สายพันธุ์รุนแรงที่แยกได้จากไอโซเลตผักคะน้า และใช้ในปริมาณที่เหมาะสม คือ $1x10^8$ cfu/ml ปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลงบนใบกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ในสภาพที่มีความชื้นสูงจึงใช้ข้อมูลดังกล่าวนี้สำหรับการทดลองที่เกี่ยวข้อกับการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละต่อไป ทั้งนี้การที่เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* สายพันธุ์รุนแรงที่แยกได้จากไอโซเลตผักคะน้าก่อให้เกิด อาการเน่าเละได้นั้น เนื่องจากเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในการย่อยผนังเซลล์เช่น pectinase, cellulase และ chitinase เป็นต้น (Yin et. al., 2010) โดยจะเห็นลักษณะอาการของโรคเป็นจุดฉ่ำน้ำ เกิดการเน่าอย่างรวดเร็วในระยะเวลาเพียง 6-12 ชั่วโมง ทำให้เนื้อเยื่อเน่าเปื่อยเป็นน้ำเยิ้ม และส่งกลิ่นเหม็นภายในเวลา 2-3 วัน จากนั้นใบกล้วยไม้จะเน่ายุบหายไปหมดทั้งใบหรือแห้งเป็นสีน้ำตาลเกิดความเสียหาย 80-100% ของผลผลิต ทำให้พืชเกิดกระบวนการหายใจเพิ่มขึ้น และทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงลดต่ำลงส่งผลให้การเคลื่อนย้ายน้ำ และธาตุอาหารในพืชลดลง

5.2 การคัดเลือกเชื้อราไมคอร์ไรซามีประโยชน์ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ป่า

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกเชื้อรา *A. mycorrhizal* มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ พบว่าเชื้อรา *A. mycorrhizal* ที่คัดแยกได้จากรากกล้วยไม้ว่านนางจูง ไอโซเลต AMF2 สามารถลดโรคได้ 13.90% สอดคล้องกับ งานวิจัยของ NguyeN HoNg Duc และ Katalin Posta (2017) ได้ทดสอบมะเขือเทศที่เป็นโรคจากเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) เมื่อได้รับการกระตุ้นจาก Mycorrhiza แสดงให้เห็นถึงความต้านทานโรคโดยมีเปอร์เซ็นการควบคุมโรคเท่ากับ 60% ต่อมา Qiang Zhang และคณะ

(2018) พบว่าเชื้อรา *Arbuscular mycorrhizal* fungi (AMF) มีความสามารถในการต้านทานความโรคเหี่ยวของฝ้าย(Verticillium wilt disease) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizophagus irregularis* CD1 ในการประเมินผลการควบคุมโรค พบว่า *Arbuscular mycorrhizal* fungi (AMF) สามารถควบคุมโรคเหี่ยวในฝ้ายได้ถึง 64% โดยทดสอบในฝ้ายทั้งหมด 17 พันธุ์ และยังมีรายงานว่า พบว่าการใส่เชื้อรา *A. mycorrhizal* สามารถเพิ่มปริมาณสาร secondary metabolites ได้แก่ phenols, flavonoids, lignin, กิจกรรมDPPH และสารประกอบ phenolics ได้ เนื่องจากสารเหล่านี้ทำให้ผนังเซลล์ของพืชแข็งแรง และสร้างสามารถกระตุ้นให้พืชเกิดการสร้างภูมิคุ้มกันตัวเองได้ จึงสามารถยับยั้งความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคได้ (Chen et al. 2013) จึงได้ทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืชของกล้วยไม้โดยใช้เทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy ในการทดลองต่อไป

5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารชีวโมเลกุลในกล้วยไม้โดยใช้เทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy

จากการศึกษาพบว่า กล้วยไม้ที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *A. mycorrhizal* มีการเปลี่ยนแปลงของไขมัน และโปรตีน ในชั้น mesophyll ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการพัฒนาของเซลล์ ซึ่งอาจมีผลต่อการสร้างผลผลิตและยับยั้งการเกิดโรคเน่าเละของกล้วยไม้เพิ่มสูงขึ้น โดย ลิพิด และโปรตีน สามารถพบได้ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ใบกล้วยไม้ ทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน และสามารถพบโปรตีนในรูปของเอนไซม์ต่างๆ ในเซลล์ได้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น หรือสังเคราะห์สารต่างๆ ที่จำเป็นในการพัฒนาและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ได้ ในส่วนของเพคติน และโพลีแซคคาไรด์ในเนื้อเยื่อใบกล้วยไม้สามารถพบได้ในผนังเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย cellulose, hemicellulose, lignin และ pectin (Wilson et al., 2000) ที่ช่วยให้เซลล์ใบกล้วยไม้แข็งแรง ทนทานต่อโรคพืชได้ดี ทำให้ผนังเซลล์ยืดหยุ่นและแข็งแรงคงรูปอยู่ได้ โดยสารชีวโมเลกุลดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณสูงขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรามีประโยชน์ *A. mycorrhizal* ชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืช อาจมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและอาจไปกระตุ้นให้พืชเกิดความแข็งแรงและสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ พืชมีความทนทานต่อการแพร่กระจายของเชื้อไปยังส่วน อื่น ๆ ซึ่งปริมาณ hemicellulose (secondary cell wall) ที่เพิ่มขึ้นสามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ (Nafisi et al., 2014) และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ cellulose และ hemicellulose มีความสัมพันธ์กับการเกิด ROS และ phytohormones ในพืชด้วย ขณะที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณ สารในกลุ่ม C-H bending เพิ่มขึ้น หลังจากถูกปลูกเชื้อสาเหตุโรคซึ่งสารในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วย ethylene ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช จากการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในใบกล้วยไม้ สามารถช่วยให้เราเห็นความแตกต่างและการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อพืชได้อย่างแม่นยำ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ ชานนทร์ (2557) มีการใช้เทคนิค Fourier

transformed infrared spectroscopy ศึกษาการสะสมของสารใน กระบวนการชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus*ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก พบกลุ่มไขมัน ชนิด C-H stretching กลุ่มไขมนั ชนิดC=Oester และกลุ่ม amide II มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แต่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ชนิด C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide มีปริมาณลดต่ำลง ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืช มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้พืชเกิดความแข็งแรงและสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละในผักกาดเขียวปลีได้

5.4 การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA, 3-IAA) ของเชื้อรา *A. mycorrhizal* พบว่า มีคุณสมบัติในการสร้าง IAA ได้ดีกว่าเชื้อราไตรโคเดอร์ม่า ชี้ให้เห็นว่าเชื้อรา *A. mycorrhizal* มีคุณสมบัติเด่นทั้งในด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละในกล้วยไม้ และการสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบของพืชจึงถูกคัดเลือกมาใช้เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* ซึ่งได้มีรายงานการศึกษามาก่อนหน้านี้ในสายพันธุ์ของ *A. mycorrhizal* ที่สามารถผลิตสารกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น phytohormone, antibiotics, siderophores, phosphate solubility และ systemic disease resistance (Loqman et al., 2009) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ นพเดช (2558) พบว่าเชื้อรา *A. mycorrhizal* สามารถสร้าง IAA ได้ ซึ่งมีผลต่อการปลดปล่อยธาตุอาหารพืชในดินและส่งเสริมการดูดใช้ธาตุอาหารพืชต่อการเจริญเติบโตของพริกตลอดช่วงระยะการทดลอง จึงตอบสนองต่อความเป็นประโยชน์ของเชื้อรา *A. mycorrhizal* กับรากพืชที่มีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลประโยชน์ซึ่งกันและกัน (Symbiosis association) (Megan H. Ryan และ James H. Graham, 2002)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

จิตราพรรณ พิลึก. 2554. การผสมพันธุ์กล้วยไม้กระถางดอกหอมเพื่อการส่งออก. สำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย สำนักมาตรฐานอุดมศึกษา ส่วนวิจัยและพัฒนา. กรุงเทพฯ. 868 หน้า.

ฉันทนา สุวรรณธาดา และ รณณรงค์ อินทุภูติ. 2550. กล้วยไม้ดินในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ. การประชุมวิชาการ อพ.สธ. ทรัพยากรไทย: ประโยชน์แก่มหาชน ณ อาคารประชุมวิชาการ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย จังหวัดชลบุรี, 31 ตุลาคม- 2 พฤศจิกายน 2550.

ฉันทนา สุวรรณธาดา. 2552. ศักยภาพของการใช้ประโยชน์กล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนาง. การประชุมวิชาการ อพ.สธ. ทรัพยากรไทย: ผันสู่วิถีใหม่ในฐานไทย, จังหวัดชลบุรี, 19-25 ตุลาคม 2552. หน้า 12.

ชานนทร์ แสงจันทร์. การควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* PV. *carotovora* ในผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

นพเดช แหวนเพ็ชร. 2558. อิทธิพลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและจุลินทรีย์ผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (PGPR) ต่อการผลิตพริกขี้หนู อำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปฐพีศาสตร์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

นฤมล โสตะ, โสระยา ร่วมรังสี และ ฉันทนา สุวรรณธาดา. 2554. การสังเกตพฤติกรรมการเติบโตของหัวว่านจูงนางชนิด *Geodorum recurvum* (Roxb.) Alston ในสภาพธรรมชาติและสภาพปลูกเลี้ยงเพื่องานขยายพันธุ์. วารสารเกษตร. 27(2): 187-196.

ปวริศ ใจคำ, อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง และ ณัฐา โพธาภรณ์. 2557. ผลของไมคอร์ไรซากล้วยไม้และหินฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลฮาเบนาเรีย. แก่นเกษตร. 484-489

พรพิมล อธิปัญญาคม, ชนินทร ดวงสะอาด, สุภาภรณ์ สาชาติ และ จงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2555. การศึกษาชนิดราไมโคไรซากล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์ และการใช้ประโยชน์ ราในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร

รายงานการประชุมความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ และสัตว์ป่า “ความก้าวหน้าของผลงานวิจัยและกิจกรรมปี 2548”ณ โรงแรมรีเจ้นท์ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี วันที่ 21-24 สิงหาคม 2548.

ลมรัก จิรวัฒน์จรรยา, ฉันทลักษณ์ ดิยายน และ ศิวาพร ธรรมดี. 2010. ผลของอุณหภูมิและภาวะแล้วต่อการพ้นระยะพักตัวของว่านจูงนาง. Agricultural Sciences Journal. 41. 209-212.

วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ, ศศิธร วุฒิวณิชย์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเซ็ม, ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2549. การส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำภูมิต้านทานโรคของกะหล่ำดอกและผักคะน้าด้วยเชื้อจุลินทรีย์และสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ. การประชุมทางวิชาการของ

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: สาขาพืช. 30 ม.ค.-2 ก.พ. 2549. 828 หน้า.

วาริษา รอดน้อย, ศิวาพร ธรรมดี และ ฉันทลักษณ์ ดิยายน. 2010. ผลของความชื้นต่อการพ้นระยะพักตัวของว่านจูงนาง. Agricultural Sciences Journal. 41. 161-164.

ศลิษา รุจิวณิชย์กุล, ฉันทนา สุวรรณธาดา และ รณณรงค์ อินทุภูติ. 2551. วงจรการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ว่านจูงนาง. วารสารแก่นเกษตร. 24(1): 13-17.

สัจจพร จันทะวงษ์. 2545. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการงอกและการพัฒนาของกล้วยไม้ดิน *Geodorum siamense* Rolfe ex Downie และ *Habenaria dentate* (Sw.) Schltr. ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชสวน. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น 84 หน้า.

สลิล สิทธิสัจธรรม. 2549. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง. 118 หน้า

สาวิตรี สระศรีรัตน์, อัญฑิกา สวัสดิ์วนิช. การศึกษาราไมคอร์ไรซาเพื่อการอนุรักษ์กล้วยไม้. [ออนไลน์]. ได้จากhttp://www.qsbg.org/Database/Article/image/OM%20conservation_QSBG.pdf. 16 มีนาคม 2563.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=1980. 1 กรกฎาคม 2563.

อบฉันท์ ไทยทอง และ ชุมพล คุณวาสี. 2543. สกุลกล้วยไม้ไทย ลาว กัมพูชา และเวียดนาม. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาสาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 118 หน้า.

อมรรัตน์ ทองแสน, ฉันทนา สุวรรณธาดา และ พรรัตน์ ศิริคำ. 2551. การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ดินว่านจูงนาง. วารสารเกษตร. 24(2): 87-91.

Anderson, A.B. 1991. Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae). Lindleyana 6:183–186.

Arditti, J. 1990. Lewis Knudson, his science, his times and his legacy. Lindleyana 5: 1-79

Athipunyakom, P., Manoch, L. and Piluek, C. 2004. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from eleven terrestrial orchids. Nat Sci 38 (2): 216-228.

Beyrle, H.F., Smith, S.E., Peterson, R.L., Franco, C.M.M. 1995. Colonization of Orchis morioprotocorms by a mycorrhizal fungus: effects ofnitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. CanJ Bot 73: 1128–1140.

Bhadra, S. K. and Hossain, M. M. 2003. *In vitro* Germination and Micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an Endangered Orchid Species. Plant Tissue Cult. 13(2): 165-171.

Bharucha, U., Patel, K. and Ujjval B. Trivedi. 2013. Optimization of Indole Acetic Acid Production by Pseudomonas putida UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). Agricultural Research volume 2, pages215–221.

Blakeman, J.P., Mokahel, M.A, et al. 1976. Effect of mycorrhizal infection on respiration and activity of some oxidase enzymes of orchid protocorms. New Phytologist 77, 697–704.

Chen, J.V., Rungruengsamrit, D., Rajkumar, T.M. and Yen, D.C. 2013. Success of Electronic Commerce Web Sites: A Comparative Study in Two Countries. Information & Management, 50(6), pp. 344-355.

Duddridge, J.A. 1980. A comparative ultrastructural analysis of a range of mycorrhizal associations. Ph. D Thesis, University of Sheffield, UK.

Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B. and Gianinazzi, S. 1989. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. Symbiosis 7, 243–255.

Hadley, G. 1982. Orchid mycorrhiza. In 'Orchid biology: reviews and perspectives, II.' (Ed. J Arditti) pp. 83–181. (Cornell University Press: Ithaca, New York)

Harley, J.L. and Smith, S.E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London UK. Mikola, P. Studies on the ectendotrophic mycorrhiza of pine. 1967. Acta Forestalia Fennica 79 (2).

Harrach Bhadar and Hossain, A. (2013). Community participation in disaster management: Role of social work to enhance participation. Journal of Anthropology, 9(1), 159-171.

Hirsch, A.M. and Kapulnik, Y. 1998. Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: Comparisons with the Rhizobium-legume symbiosis. Fungal Genetics and Biology 23: 205 –212.

Duddridge, J. A., Malibari, A. and Read, D. J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. Nature volume 287, pages 834–836.

Kernaghan, G. 2005. Mycorrhizal diversity: Cause and effect. Pedobiologia. 49. 511-520

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Koske, R.E. and Gemma, J.N., 1992. Fungal reactions to plants prior to mycorrhizal formation. In: Allen, M.F. (Ed.), Mycorrhizal Functioning: An Integrated Plant–Fungal Process. Chapman & Hall, New York, pp. 3–36.

Le Guen-Le Saos, F., Florence Esnault, Jean-Eric Chauvin and Hourmant, A. 2002. *In vitro* Bulb Development in Shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group): Effects of Anti-gibberellins, Sucrose and Light. Annals of Botany 89: 419±425.

Loqman S., Ait Barka E., Cle ment C. and Ouhdouch, Y. 2009. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. World J Microbiol Biotechnol 25, 81–91.

Mansour, B.M.M. 1968. Effect of temperature and light on growth, flowering and corm formation in freesia. Agricultural University, Wageningen.

Martin F., Laurent P., de Carvalho D., Voiblet C., Balestrini R. and Bonfante P. et al. 1999. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete Pisolithus tinctorius: Identification, function, and expression in symbiosis. Fungal Genet. Biol. 27 161–174 10.1006/fgbi.1999.1138.

Megan, H. Ryan and James H. Graham. 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture. Plant and Soil. Volume 244, pages263–271.

Moore, R.T. 1987. The genera of Rhizoctonialike fungi: Ascorhizoctonia, Ceratorhiza gen. nov., Epulorhiza gen. nov., Moniliopsis, and Rhizoctonia. Mycotaxon 29: 91-99.

Nafisi, M., Fimognari, L. and Sakuragi, Y. 2014. Interplays between the cell wall and phyto hormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. Phytochemistry. 112: 63-71.

Nguyen Hong, D.U.C. and Katalin Posta. 2017. Inoculation with *Septoglomus constrictum* improves tolerance to heat shock in tomato plants. Journal of Agricultural and Environmental Sciences Vol. 5, No. 2.

Qiang Zhang, Xinpeng Gao, Yanyun Ren, Xinhua Ding, Jiajia Qiu, Ning Li, Fanchang Zeng and Zhaohui Chu. 2018. Improvement of *Verticillium* Wilt Resistance by Applying Arbuscular Mycorrhizal Fungi to a Cotton Variety with High Symbiotic Efficiency under Field Conditions. Int J Mol Sci: 13;19(1):241.

Larry Peterson, R. and Hugues Massicotte, B. 2004. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. Can. J. Bot. Vol. 82.

Currah, R. S., Lawrence Zettle, W. and Thomas McInnis, M. 1997. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from Platanthera (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. Mycotaxon -Ithaca Ny. Volume LXI, pp. 335-342.

Read, D.J. 1978. The biology of mycorrhizas in heathland ecosystems with special reference to the nitrogen nutrition of the Ericaceae. In: Loutit MW, Miles JAR, eds. Microbial ecology. New York: Springer-Verlag, 324±328.

Sheelavantmath, S.S., Murthy, H.N., Pyati, A.N., Kumar H.G.A. and Ravishankar, B.V. 2000 *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.). Schltr. through rhizome section culture. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 60(2): 151-154.

Suman Sheelavantmath, Niranjana Murthy Hosakatte, Ashok Pyati and Ashok Kumar Hg. 2000. In vitro propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 151–154.

Thomas, G.W. and Jackson, R.M. 1979. Sheathing mycorrhizae of nursery-grown Pices sitchensis. Transactions of the British Mycological Society 73, 117-125.

Warcup, J.H. 1975. Factors affecting symbiotic germination of orchid seed. In: Endomycorrhizas (Ed. By F. E. Sanders, B. Mosse & P.B. Tinker). Academic Press, London and New York. pp. 87.

Warcup, J.H. 1980. Ectomycorrhizal associations of Australian indigenous plants. New Phytologist. 85. 531-535.

Watkinson, J. I. 2002. Characterization of two genes, trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase and nucleotide binding protein, shown to be differentially regulated in roots of Cypripedium parviflorum var. pubescens grown with a mycorrhizal fungus Thanatephorus pennatus. [Online]. Available: https://theses.lib.vt.edu/theses/available/etd-05012002-091107/unrestricted/Chpt1.pdf. 20 june 2021.

Wilcox, H.E. 1971. Morphology of ectendomycorrhizae in Pinus resinosa. In: Mycorrhizae (Ed. By E. Hacskylo), pp. 54-68. United States Department of Agriculture Miscellaneous Publications 1189.

Wilson, J.O., Valiela, I. and Swain, T. 2000 Sources and concentrations of vascular plant material in sediments of Buzzards Bay. Massachusetts, USA. Mar Biol90:129-137.

Wu, P.H., Huang, D.D. and Chang, D.C.N. 2011. Mycorrhizal symbiosis enhances Phalaenopsis orchid's growth and resistance to Erwinia chrysanthemi. African Journal of Biotechnology. 10 (50). Pp. 10095-10100.

Yin, L.J., Huang, P.S., Lin, H.H. 2010. Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* Sp. YJ5. J Agric Food Chem 58:9833-9837.

Zak, B. 1973. Classification of Ectomycorrhizae. In Ectomycorrhizae. Eds GC Marks and TT Kozlowski pp. 43-78. Academic Press, New York, USA.

Zak, B. 1974. Ectendomycorrhiza of Pacific Madrone Arbutus menziessi. Transactions of the British Mycological Society. 62. 202-204.

Zettler, E.R., Mincer, T.J. and Amaral-Zettler, L.A. 2013. Life in the"Plastisphere": microbial communities on plastic marine debris.Environ Sci Technol47: 7137–46.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

1.1 Nutrient Agar (NA)

Peptone	5	กรัม
Beef extract powder	3	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

นำ Peptone, Beef extract และ ผงวุ้น มาเทรวมกันในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำไปต้ม คนเป็นระยะ จนผงวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ แล้วแบ่งใส่ชวดแก้วใสเพื่อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

1.2 Nutrient Broth (NB)

Peptone	5	กรัม
Beef extract powder	3	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

นำ Peptone และ Beef extract มาเทรวมกันในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ชวดแก้วใสเพื่อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

2.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose หรือ Glucose	20	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	18	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม. นำมาต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตร จนสุกนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำ แล้วเติม dextrose ลงไป ต้มผงวุ้นให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยน้ำส่วนที่เหลือ หลังจากนั้นนำทั้งสองส่วนเทรวมกัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ชวดแก้วใสเพื่อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

2.2 Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose หรือ Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม. นำมาต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตร จนสุก นิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำ แล้วเติม dextrose ลงไป ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ขวดแก้วใสเพื่อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวณัฐธิญา เบือนสันเทียะ เกิดวันที่ 7 กรกฎาคม พ.ศ. 2523 ที่ อำเภอเสิงสาง จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับ มัธยมศึกษาตอนต้น และมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนครบุรี อ. ครบุรี จ. นครราชสีมา เริ่มเข้าศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2542 ขณะที่ศึกษาในระดับปริญญาตรี ได้ศึกษาการตรวจสอบโปรตีนโดยศึกษาและตรวจหาการสะสมโพลีฟีนอลออกซิเดซในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศ และจากนั้นจึงมีความสนใจนำเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืช ภายหลังสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีในปีการศึกษา 2/2545 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปีการศึกษา 3/2545 และสำเร็จการศึกษาระดับมหาบัณฑิตศึกษา ในปีการศึกษา 2547 ภายหลังสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิตศึกษา ได้เข้าศึกษาต่อในระดับดุษฎีบัณฑิต ในหลักสูตร ปร.ด. (โรคพืช), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550 และเข้าทำงานในปี พ.ศ. 2553 เป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จนถึงปัจจุบัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี