

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ เพื่อผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซาอย่างง่าย

OPTIMUM GROWTH CONDITIONS OF ORCHID MYCORRHIZAL FUNGI FOR SIMPLE MYCORRHIZAL INOCULUM PRODUCTION

เรืองวุฒิ ชุตินา* หทัยชนก ทูเรียน และอรพินธ์ รุ่งเรือง

Ruangwut Chutima*, Hathaichanoke Thurian, and Orapin Roongruang

Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

*corresponding author e-mail: ruangwut@psru.ac.th

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซากล้วยไม้เพื่อผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซาอย่างง่าย จากตัวอย่างรากกล้วยไม้ 2 ชนิด คือ เอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi* Steud.) และรองเท้านารี कांगบ (*Paphiopedilum callosum* (Rchb.f.) Stein) ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า ภายในชั้นคอร์เทกซ์ของรากกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด มีโครงสร้างขดของเส้นใย (peloton) ของเชื้อราไมคอร์ไรซาอยู่ โดยสามารถแยกเชื้อราออกเป็น 9 ไอโซเลท และจำแนกได้ 3 สกุล ได้แก่ *Rhizoctonia*, *Xylaria* และ *Fusarium* เมื่อนำเชื้อราที่แยกได้มาทดสอบผลของอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่า เชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 จำนวน 1 ไอโซเลท และที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 จำนวน 8 ไอโซเลท ทั้งนี้เมื่อทำการทดสอบการเจริญของเชื้อราบนเมล็ดธัญพืช และวัสดุปลูกกล้วยไม้ พบว่าเมล็ดธัญพืชที่เชื้อราเจริญได้ดี ได้แก่ ถั่วดำ และข้าวโพด ขณะที่วัสดุปลูกที่เชื้อราเจริญได้ดี คือ กาบมะพร้าวสับที่ผ่านการแช่ด้วย Potato Dextrose Broth (PDB) นาน 12 ชั่วโมง ผลการวิจัยนี้จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อพัฒนาการผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซาอย่างง่ายจากการเลือกใช้ปัจจัยที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การเพิ่มจำนวนเชื้อราด้วยเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม และการคัดเลือกวัสดุปลูกกล้วยไม้ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซา

คำสำคัญ: กล้วยไม้ ไมคอร์ไรซา หัวเชื้อ

Abstract

The aim of this research was to investigate the optimum growth conditions of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of 2 orchid species; *Dendrobium lindleyi* Steud. and *Paphiopedilum callosum* (Rchb.f.) Stein. The results revealed that the hyphal coils (peloton) of mycorrhizal fungi were found in the cortical root cells of these 2 orchid species. The totals of 9 fungal isolates were identified belonging to

3 genera including of *Rhizoctonia*, *Xylaria* and *Fusarium*. Then, the optimum temperature and pH of these fungal growth on Potato Dextrose Agar (PDA) were studied and the maximum fungal growth conditions were found after cultured at 30°C and adjusted pH of agar media to pH 5 (1 isolate) and pH 7 (8 isolates). For the study on effect of grain media and potting media on growth of fungal isolates, revealed that the suitable grain media for fungal growth was black bean and corn seed. While, the suitable of potting media was chopped coconut husk soaked for 12 hours with Potato Dextrose Broth (PDB). These results can be used for development of simple mycorrhizal inoculum production using suitable fungal growth conditions such as optimum temperature and pH for fungal cultivation on agar media, fungal mass production with suitable grain media and selection of suitable orchid potting materials for mycorrhizal inoculum production.

Keywords: orchid, mycorrhiza, inoculum

บทนำ

กล้วยไม้มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยระหว่างราไมคอร์ไรซากับรากของกล้วยไม้ (Chutima et al., 2011; Sathiyadash et al., 2012; Suarez & Kottke, 2016) เชื้อราในกลุ่มนี้เรียกว่า “ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (orchid mycorrhiza)” ซึ่งจากการศึกษาเชื้อราในกลุ่มนี้ชี้ให้เห็นว่าการออกของเมล็ดกล้วยไม้หลายชนิด จะเกิดขึ้นได้ดีเฉพาะเมื่อมีราไมคอร์ไรซามาเจริญรวม และกล้วยไม้หลายชนิดต้องการราเข้าอยู่ร่วมตั้งแต่เริ่มงอกจากเมล็ดและเจริญไปเป็น protocorm จนถึงระยะการออกดอก (Swarts & Dixon 2009; Chutima et al., 2011; Suarez & Kottke, 2016) นอกจากนี้พบว่าเชื้อราที่พบและแยกได้จากพืชหลายชนิดรวมถึงราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) และราไมคอร์ไรซากล้วยไม้บางชนิดสามารถต้านเชื้อก่อโรคพืช ทำลายแมลงศัตรูพืช และยังสามารถผลิตฮอร์โมนในกลุ่มของ Indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนในการเร่งการเจริญในพืชได้อีกด้วย (Chutima & Lumyong, 2012; Kodsueb & Lumyoung, 2017) ทั้งนี้ในการนำเชื้อราไมคอร์ไรซาไปใช้นั้นจำเป็นต้องผลิตในรูปของหัวเชื้อสำหรับการผสมในวัสดุปลูกเพื่อเพิ่มจำนวนกล้วยไม้ทั้งจากการเพาะจากเมล็ด และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบกับการผลิตหัวเชื้อในกลุ่มของเชื้อราไมคอร์ไรซากล้วยไม้นั้นยังขาดการพัฒนาเพื่อใช้ในการเกษตรซึ่งต่างจากหัวเชื้อราไมคอร์ไรซาในกลุ่มของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhiza) ที่มีการผลิตหัวเชื้อเพื่อใช้ในการเกษตรอย่างแพร่หลายในท้องตลาด และกลุ่มของเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) ที่ประสบความสำเร็จในการผลิตหัวเชื้อในรูปแบบการผสมกับวัสดุปลูก ตัวอย่างเช่น การใช้หินเวอร์มิคูโลท์ (vermiculite) และพีทมอส (peat moss) ที่ผ่านการแช่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราในวัสดุปลูกดังกล่าวสำหรับการผลิตเป็นหัวเชื้อไมคอร์ไรซา (Douds et al., 2007; Lee et al., 2008)

ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญสำหรับการผลิตหัวเชื้อนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบถึงปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซา ได้แก่ อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง (pH) รวมถึงความเหมาะสมของชนิดอาหารธาตุพืชที่จะใช้เพิ่มปริมาณเชื้อราไมคอร์ไรซา (Dasa et al., 2006; Mei-ling et al., 2008; Kumla et al., 2011) และการผลิตหัวเชื้อผสมในวัสดุปลูกที่เหมาะสม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษา

และพัฒนาความเป็นไปได้ในการผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซากล้วยไม้จากวัสดุปลูกพื้นฐานในการปลูกกล้วยไม้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการส่งเสริมการเจริญกล้วยไม้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสำรวจและการแยกเชื้อไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้

1.1 ตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารี कांगบ (*Paphiopedilum callosum* (Rchb.f.) Stein) และเอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi* Steud.) ได้รับความอนุเคราะห์จากเกษตรกรในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก โดยเก็บทั้งต้นพืชรวมดินรอบรากพืช และวัสดุอิงอาศัย แล้วทำการสำรวจและแยกเชื้อหลังจากได้ตัวอย่างมาแล้วภายใน 48 ชั่วโมง

1.2 การย้อมรากเพื่อตรวจหาเชื้อราไมคอร์ไรซา ทำการคัดเลือกรากกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ โดยสุ่มตัวอย่างรากกล้วยไม้ชนิดละ 3 ราก ล้างให้สะอาด ตัดรากขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ย้อมด้วย 0.05% W/V trypan blue นำรากที่ได้ไปตรวจดูโครงสร้างเพโลตอน (peloton) ของเชื้อราไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Nikon E400

1.3 การแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์จากตัวอย่างกล้วยไม้ โดยสุ่มคัดเลือกรากกล้วยไม้ที่สมบูรณ์มาตัวอย่างละ 5 ราก ล้างให้สะอาด ตัดรากขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย 95% เอทานอล: 5.25% NaOCl: น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว (1:1:1 V/V/V) นาน 2 นาที นำรากกล้วยไม้ที่ได้แต่ละชิ้นไปวางใน Petri dish ที่เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนสารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบดรากกล้วยไม้ จากนั้นนำสารละลายของเซลล์รากกล้วยไม้ที่ได้หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ $\frac{1}{4}$ Potato Dextrose Agar ($\frac{1}{4}$ PDA) นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจดูเส้นใยเชื้อราที่งอกจากเซลล์รากกล้วยไม้ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน หยิบเส้นใยเชื้อราที่เจริญออกจากเซลล์รากกล้วยไม้ นำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) จนได้เชื้อบริสุทธิ์

1.4 จำแนกชนิดเชื้อราไมคอร์ไรซาโดยตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งที่มองเห็นด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับรูปวิธาน และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ Robert (1999), Watanabe (2001), Athipunyakom et al., (2004) และ Chutima et al., (2011)

2. ทดสอบการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซาที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดัดแปลงจาก Kumla et al., 2011)

2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซา เพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยนำแผ่นเซลล์โพลีเอทิลีนที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาดเท่ากับผิวหน้าอาหาร และทราบน้ำหนักแห้งที่แน่นอนวางลงบนผิวหน้าอาหารในจาน Petri dish หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนเชื้อราไมคอร์ไรซาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 เซนติเมตร วางลงที่จุดศูนย์กลางจานอาหารด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อเชื้อราแต่ละไอโซเลท และแต่ละอุณหภูมิ จากนั้นทำการวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง และหาค่าน้ำหนักแห้งของโคโลนีเชื้อราแต่ละไอโซเลทโดยนำค่าน้ำหนักแห้งทั้งหมดที่ชั่งได้ หักออกด้วยน้ำหนักแห้งของแผ่นเซลล์โพลีเอทิลีนก่อนการเลี้ยงเชื้อรา

2.2 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซา เพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกันคือ pH 3, 5, 7, 9 และ 11 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนแผ่นเซลโลเฟนที่ฆ่าเชื้อแล้ว และทราบน้ำหนักแห้งที่แน่นอนที่วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เช่นเดียวกับการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อเชื้อราแต่ละไอโซเลท และแต่ละค่า pH จากนั้นทำการวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง และหาค่าน้ำหนักแห้งของโคโลนีเชื้อราแต่ละไอโซเลทเช่นเดียวกับการทดสอบผลของอุณหภูมิ

3. ทดสอบการเจริญของเชื้อราที่แยกได้บนเมล็ดธัญพืช

เพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้แต่ละไอโซเลทลงบนเมล็ดธัญพืชแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด (corn seed, *Zea mays*) ถั่วดำ (black bean, *Phaseolus mungo*) และถั่วแดง (kidney bean, *Phaseolus vulgaris*) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราลงบริเวณส่วนบนสุดในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร ที่บรรจุเมล็ดธัญพืชแต่ละชนิดในสภาพปลอดเชื้ออยู่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน บันทึกความยาว และลักษณะของเส้นใยที่เจริญลงในอาหารเมล็ดธัญพืชทุก ๆ 3 วัน และทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อเชื้อราแต่ละไอโซเลท และแต่ละชนิดของเมล็ดธัญพืช

4. ทดสอบการเจริญของเชื้อราที่แยกได้บนวัสดุปลูก

เพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้แต่ละไอโซเลทลงบนส่วนบนสุดของวัสดุปลูก 4 ชนิด ได้แก่ กาบมะพร้าวสับ กาบมะพร้าวสับผ่านการแช่ด้วย Potato Dextrose Broth (PDB) มาแล้ว 12 ชั่วโมง ขุยมะพร้าว และขุยมะพร้าวผ่านการแช่ด้วย PDB มาแล้ว 12 ชั่วโมง ซึ่งแต่ละชนิดบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร ในสภาพปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน บันทึกความยาว และลักษณะของเส้นใยที่เจริญลงในวัสดุปลูกแต่ละชนิดทุก ๆ 3 วันและทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อเชื้อราแต่ละไอโซเลท และแต่ละชนิดของวัสดุปลูก

ผลการวิจัย

1. การสำรวจและการแยกเชื้อไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้

จากการสำรวจโดยการย้อมรากกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ เอื้องผึ้ง และรองเท้านารี कांगภ พบว่า รากกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด มีโครงสร้างขดของเส้นใยราไมคอร์ไรซาที่เรียกว่า peloton อยู่ภายในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ ดังภาพที่ 1 (Figure 1) และสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากเอื้องผึ้ง 5 ไอโซเลท และรองเท้านารี कांगภ 4 ไอโซเลท โดยจำแนกชนิดเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดเป็น 3 สกุล ได้แก่ *Xylaria*, *Rhizoctonia* และ *Fusarium* ดังตารางที่ 1 (Table 1)

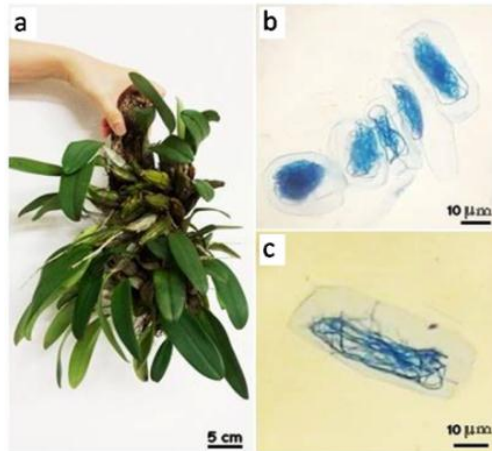


Figure 1 *Dendrobium lindleyi* Steud.: orchid plant (a) and peloton structures, coiled hyphae, in cortical cells of roots stained with 0.05% (w/v) trypan blue in lactoglycerol (b and c).

Table 1 Fungal isolates from roots of *Paphiopedilum callosum* (Rchb.f.) Stein and *Dendrobium lindleyi* Steud. and the optimum condition of fungal growth.

Orchid	Isolate	Taxa	Optimum condition			
			Temperature (°C)	pH	Grain media	Potting media
<i>D. lindleyi</i>	AP 001	<i>Rhizoctonia</i> sp.	30	7	black bean	coconut husk with PDB
	AP 002	<i>Rhizoctonia</i> sp.	30	7	black bean	coconut husk with PDB
	AP 003	<i>Fusarium</i> sp.	30	7	corn seed	coconut husk with PDB
	AP 004	<i>Fusarium</i> sp.	30	7	corn seed	coconut husk with PDB
	AP 005	<i>Fusarium</i> sp.	30	7	black bean	coconut husk with PDB
<i>P. callosum</i>	LK 001	<i>Xylaria</i> sp.	30	5	black bean	coconut husk with PDB
	LK 002	<i>Fusarium</i> sp.	30	7	black bean	coconut husk with PDB
	LK 003	<i>Fusarium</i> sp.	30	7	black bean	coconut husk with PDB
	LK 004	<i>Fusarium</i> sp.	30	7	black bean	coconut husk with PDB

Remark Coconut husk with PDB = chopped coconut husk soaked with Potato dextrose broth for 12 hours.

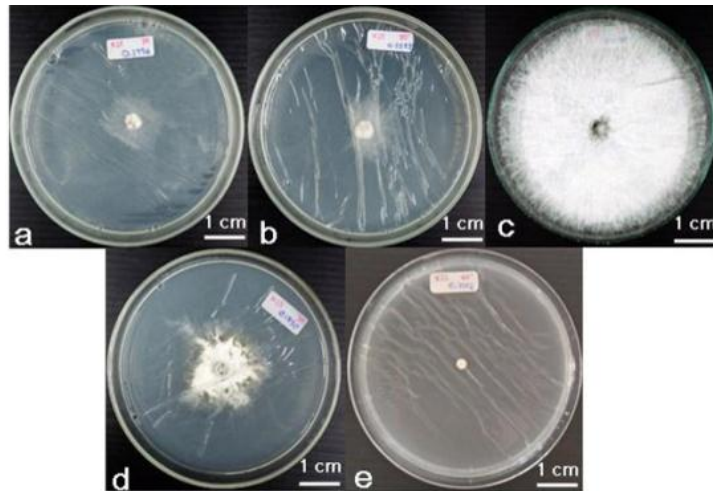
2. ผลของอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อราพบว่าเชื้อราที่แยกได้ทุกไอโซเลทเจริญได้ดีที่สุดโดยมีค่าน้ำหนักแห้ง และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญของเชื้อรา พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลทเจริญได้ดีที่สุดโดยมีค่าน้ำหนักแห้ง และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน ที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ยกเว้นเชื้อรา *Xylaria* sp. (LK001) เจริญได้ดีที่สุดที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 ดังตารางที่ 1-2 และภาพที่ 2 (Table 1-2, Figure 2)

Table 2 Length of mycelium growth of *Fusarium* sp. (AP 003) in grain and potting media after incubation at 30 °C for 15 days.

Time (day)	Length of mycelium growth (cm)			
	Coconut coir	Coconut coir soaked with PDB	Chopped coconut husk	Chopped coconut husk soaked with PDB
3	0.23±0.11 ^b	1.13±0.50 ^a	0.43±0.06 ^b	1.53±0.15 ^a
6	0.43±0.21 ^c	2.07±0.32 ^b	0.9±0.30 ^c	2.83±0.25 ^a
9	0.83±0.40 ^b	3.07±0.71 ^a	1.31±0.30 ^b	3.73±0.45 ^a
12	1.10±0.26 ^c	5.27±0.85 ^b	1.87±0.76 ^c	6.63±0.45 ^a
15	2.10±0.36 ^c	7.47±1.10 ^b	2.30±0.64 ^c	8.80±0.20 ^a

Remark The results are mean (n = 3) ±S.D. Mean with the same letter in line are not significantly different of ANOVA test ($p \leq 0.05$).

**Figure 2** Effects of temperature on growth of *Fusarium* sp. (LK002) after culturing on PDA and incubation at 20°C (a), 25°C (b), 30°C (c), 35 °C (d) and 40 °C (e) for 10 days.

3. ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซาด้วยเมล็ดธัญพืช และวัสดุปลูกกล้วยไม้

การเพาะเลี้ยงด้วยเมล็ดธัญพืช พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากเอื้องผึ้งเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเมล็ดถั่วดำ และเชื้อราที่แยกได้จากรวงแตงนารีคางกบเจริญได้ดีที่สุดบนเมล็ดถั่วดำ และข้าวโพด การเพาะเลี้ยงด้วยวัสดุปลูกกล้วยไม้ พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลตที่แยกได้จากเอื้องผึ้ง และรวงแตงนารีคางกบเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยข้าวโพด และกาบมะพร้าวสับที่ผ่านการแช่ด้วย PDB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังตารางที่ 1-2 และภาพที่ 3 (Table 1-2, Figure 3)

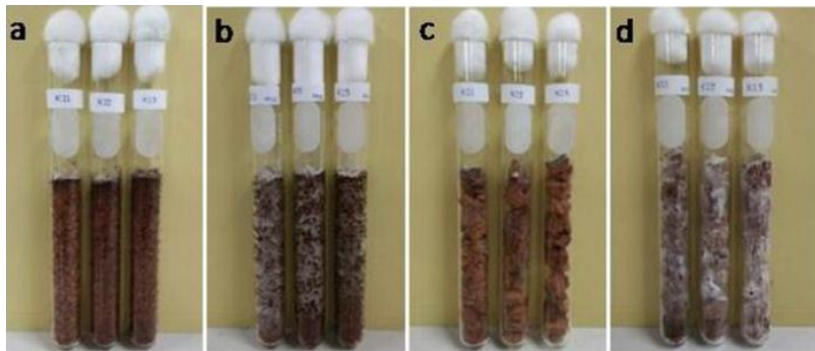


Figure 3 Growth of mycelium of isolated fungi, *Fusarium* sp. (AP003) in potting media: coconut coir (a), coconut coir soaked with PDB for 12 hours (b), chopped coconut husk (c), and chopped coconut husk soaked with PDB for 12 hours (d) after incubation at 30 °C for 15 days.

อภิปรายผล

จากการย้อมรากกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ เอื้องผึ้ง และรองเท้านารี कांगภูนัน สามารถตรวจพบโครงสร้าง peloton ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเชื้อราไมคอร์ไรซาในรากกล้วยไม้ที่ใช้สำหรับการแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างรากกับเซลล์รากพืช จึงยืนยันได้ว่ากล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด มีเชื้อราไมคอร์ไรซาอาศัยร่วมอยู่ด้วย ทั้งนี้งานวิจัยนี้จำแนกชนิดเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท ออกเป็น 3 สกุล คือ *Rhizoctonia* จำนวน 2 ไอโซเลท *Fusarium* จำนวน 6 ไอโซเลท และ *Xylaria* จำนวน 1 ไอโซเลท ซึ่งเชื้อที่พบนี้ได้มีรายงานการตรวจพบในกล้วยไม้ และรายงานการใช้ทดสอบการส่งเสริมการงอกและการเจริญของกล้วยไม้จากการศึกษาก่อนหน้านี้เช่นกัน ทั้งนี้เชื้อที่รายงานนั้นมักอยู่ในกลุ่มของ *Rhizoctonia* และในกลุ่มของ *Fusarium* อยู่บ้าง (Athipunyakom et al., 2004; Chutima et al., 2011) จึงมีความเป็นไปได้ และมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นเชื้อต้นแบบสำหรับการศึกษาไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้

สำหรับการทดสอบผลของอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซาที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งถือเป็นปัจจัยหลักสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งเชื้อราด้วยนั้น พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลทเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ถือได้ว่าเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของสภาพภูมิอากาศในท้องถิ่น และประเทศไทย ดังนั้นจึงสามารถประยุกต์เพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิห้องทั่วไปทั้งนี้พบว่าเชื้อราจำนวน 8 ไอโซเลท เจริญได้ดีที่สุดที่ค่า pH เท่ากับ 7 และมีเพียงไอโซเลทเดียวเจริญได้ดีที่สุดที่ค่า pH เท่ากับ 5 อย่างไรก็ตามเชื้อทั้งหมด 9 ไอโซเลท ที่แยกได้นั้น พบว่าสามารถเจริญได้ดีทั้งค่า pH 5 และ 7 จึงสามารถระบุโดยรวมได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วงค่า pH ที่เป็นกลางถึงกรดเล็กน้อย และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองที่ได้ตรงกับกับข้อมูลของอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Phlebotomus portentosus* ที่แยกได้ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย เพื่อใช้ผลิตหัวเชื้อสำหรับการส่งเสริมการเจริญของพืช (Kumla et al., 2011) ดังนั้นผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงสภาพและปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรานั้นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อราอาศัยอยู่ในแหล่งธรรมชาติ ด้วยเหตุนี้เชื้อราที่แยกได้จึงสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย

ที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ 30 องศาเซลเซียส ในส่วนของการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนเมล็ดธัญพืช และวัสดุปลูกกล้วยไม้ นั้น เมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนเชื้อราสำหรับทำเป็นหัวเชื้อนั้น ได้แก่ ถั่วดำ และข้าวโพด ซึ่งเป็นการปรับเอาเมล็ดธัญพืชที่หาได้ง่ายมีอยู่ทั่วไปมาใช้ประโยชน์ และสามารถประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อผสมในวัสดุปลูกได้ สำหรับการทดสอบการใช้วัสดุปลูกในการเพาะเลี้ยงเชื้อนั้น งานวิจัยนี้ได้เลือกวัสดุปลูกอย่างง่ายสำหรับกล้วยไม้ คือ ขุยมะพร้าว และกาบมะพร้าว สับ ซึ่งเป็นวัสดุที่มีความพรุน หรือช่องว่างภายในเหมาะสำหรับการเข้าอาศัยของเชื้อรา ซึ่งพบว่าวัสดุปลูกที่เหมาะสมและมีการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด คือ กาบมะพร้าวสับที่ผ่านการแช่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เช่นเดียวกับการประยุกต์ใช้หินเวอร์มิคูไลท์ และการใช้พีทมอสผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เพื่อใช้ผลิตหัวเชื้อเอกโตไมคอร์ไรซา (Douds et al., 2007; Lee et al., 2008; Kumla et al., 2011) เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ใช้จะเป็นแหล่งอาหารช่วยส่งเสริมให้เชื้อราเจริญได้ดีในช่วงแรก ก่อนที่เชื้อราจะปรับตัวให้เข้ากับวัสดุปลูกที่ใช้ ได้แก่ ขุยมะพร้าว และกาบมะพร้าวสับ และยังส่งผลให้เชื้อราเจริญเข้าอยู่อาศัยภายในโครงสร้างของวัสดุปลูกได้รวดเร็วยิ่งขึ้นอีกด้วยเมื่อเทียบกับการใช้วัสดุปลูกดังกล่าวที่ไม่ผ่านการแช่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB อีกด้วย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้วัสดุปลูกดังกล่าวสำหรับการผลิตหัวเชื้อราไมคอร์ไรซาทดแทนการใช้หินเวอร์มิคูไลท์ และพีทมอสซึ่งมีราคาที่สูง เพื่อใช้ในการปลูกกล้วยไม้ และส่งเสริมการเจริญกล้วยไม้ รวมถึงการนำไปปรับใช้ให้เกิดประโยชน์กับเกษตรกรผู้เพาะปลูกกล้วยไม้ทั้งในแง่ของการใช้ปุ๋ยชีวภาพแทนสารเคมี และการลดต้นทุนการผลิตของผู้เพาะปลูกกล้วยไม้ ทั้งนี้ในการผลิตหัวเชื้อนั้นยังคงต้องทดสอบทดสอบความคงทน และการอยู่รอดของเชื้อราในวัสดุปลูกดังกล่าว รวมถึงการนำไปใช้จริงในแปลงปลูกเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการผลิต และการพัฒนาหัวเชื้อไมคอร์ไรซาในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่ากล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด คือ เอื้องผึ้ง และรองเท้านารี कांगบ มีเชื้อราไมคอร์ไรซาอาศัยร่วมอยู่ด้วย ซึ่งเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง คือ 30 องศาเซลเซียส และที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5-7 ทั้งนี้พบว่าเชื้อราที่แยกได้นั้นสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในเมล็ดถั่วดำ และข้าวโพด ในส่วนของวัสดุปลูกที่เชื้อราสามารถเจริญได้ดี และเหมาะสมสำหรับการใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อราไมคอร์ไรซานั้น คือ กาบมะพร้าวสับผ่านการแช่ด้วย PDB ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อพัฒนาการผลิตหัวเชื้ออย่างง่ายจากการเลือกใช้ปัจจัยที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงการเพิ่มจำนวนเชื้อราด้วยการใช้เมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม และการคัดเลือกวัสดุปลูกกล้วยไม้เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซาอย่างง่ายต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2559 (รหัสโครงการ 182798) และขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Athipunyakom P, Manoch L, Piluek C. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from eleven terrestrial orchids. *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 2004; 38: 216-228.
- Chutima R, Dell B, Vessabutr S. et al. Endophytic fungi from *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. *Mycorrhiza*. 2011; 21: 221-229.
- Chutima R, Lumyong S. Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. *Symbiosis*. 2012; 56: 35-44.
- Dasa A, Majo'n JL, Camacho M. Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on *in vitro* culture of several isolates of *Amanita caesarea* (Scop.:Fr.) Pers. *Mycorrhiza*. 2006; 16: 133-136.
- Douds DD, Nagahashi G, Reider C. et al. Inoculation with arbuscularmycorrhizal fungi increases the yield of potatoes in a high P soil. *Biological Agriculture and Horticulture*. 2007; 25: 67-78.
- Kodsueb R, Lumyong S. The first report of *Aschersonia placenta* Berk. on mulberry field in Thailand and effect of plant extracts to the growth of the fungus. *Rajabhat Journal of Sciences, Humanities and Social Sciences*. 2017; 18: 187-200.
- Kumla J, Danell E, Bussaban B. et al. Suitable growth conditions and nutrition factors on *in vitro* culture of *Phlebopus portentosus* (Boletales). *Chiang Mai Journal of Science*. 38: 2011; 156-159.
- Lee SS, Patahayah M, Chong W. et al. Successful ectomycorrhizal inoculation of twodipterocarp species with a locally isolated fungus in peninsular Malaysia. *Journal of Tropical Forest Science*. 2008; 20: 237-247.
- Mei-ling XU, Jiao-jun ZHU, Hong-zhang K. et al. Optimum conditions for pure culture of major ectomycorrhizal fungi obtained from *Pinussylvestris* var. *mogolica* plantations in southeastern Keerqin sandy, China. *Journal of Forest Research*. 2008; 19: 113-118.
- Robert P. *Rhizoctonia-Forming Fungi a Taxonomic Guide*. Great Britain: The Trustees, Royal Botanic Gardens, Kew, 1999.
- Sathiyadash K, Muthukumar T, Uma E. et al. Mycorrhizal association and morphology in orchids. *Journal of Plant Interactions*. 2012; 7: 238-247.
- Suarez PJ, Kottke I. Main fungal partners and different levels of specificity of orchid mycorrhizae in the tropical mountain forests of Ecuador. *Lankesteriana*. 2016; 16: 299-305.
- Swarts ND, Dixon KW. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction, *Annals of Botany*. 2009; 104: 543-556.
- Watanabe T. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* 2nd ed. New York: CRC Press, 2001.