

สัญญาเลขที่ 22/2552

รหัสโครงการวิจัย 52 1 01 02 00 22

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยก และตรวจสอบชนิดราไมคอร์ไรซาจากรากของ
กล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบและเอื้องจิว⁺
ในจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่

Isolation and identification of orchid mycorrhizal fungi from
roots of *Chiloschista* and *Schoenorchis* (Orchidaceae)
collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces

โดย

ดร.สุรีย์พร นนทชัยภูมิ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ดร.สันติ วัฒนฐานะ องค์การสวนพฤกษศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ประจำปี พ.ศ.2552

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การแยก และตรวจสอบชนิดราไมคอร์ไรซาจากรากของกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ และเอื้องจิวในจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่” ไม่สามารถเกิดขึ้นได้หากไม่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ดร. สันติ วัฒนฐานะ สำนักวิชาการ-วิจัย องค์การสวนพฤกษศาสตร์และสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ.เชียงใหม่ ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านการจำแนกชนิดกล้วยไม้และให้รากตัวอย่างสำหรับการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณจรรยาพร ถาวรสถิตย์สกุล สวนกล้วยไม้พร้าว อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ที่กรุณาให้รากตัวอย่าง

ขอขอบคุณนายณัฐดนัย เอี้ยวสกุล ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการเก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้เป็น โครงการงานในวิชา 1105491 Special Problem ของนายอรรถพล ตลิ่งจิตร นักศึกษาชั้นปีที่ 4 สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง นายอรรถพล ตลิ่งจิตร มีส่วนช่วยเก็บตัวอย่างราก จำแนกชนิดกล้วยไม้ แยกและเลี้ยงรา ตลอดจนถึงทำงานทางด้านเทคนิคชีวโมเลกุล จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

มีนาคม 2554

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกต้นและดอกกล้วยไม้ที่สำคัญของโลก มูลค่าการส่งออกอยู่ที่ประมาณ 3,000 ล้านบาทต่อปี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์มีนโยบายที่จะส่งเสริมให้กล้วยไม้เป็น product champion และให้มีการเพิ่มมูลค่าการส่งออกให้ได้ไม่ต่ำกว่า 10,000 ล้านบาท

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้เชิงพาณิชย์ต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอาหารสังเคราะห์ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้ส่วนมากมีขนาดเล็กและไม่มีอาหารสะสม ในธรรมชาติเมล็ดและต้นอ่อนของกล้วยไม้ต้องได้รับคาร์บอน ในโตรเจน และธาตุอาหารอื่น ๆ จากราไมคอร์ไรซาเพื่อการงอกและการเจริญเติบโต การศึกษาวิจัยทางด้านราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในต่างประเทศในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา เนื่องจากมีรายงานว่า ราไมคอร์ไรซาได้ถูกนำมาใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้เศรษฐกิจและกล้วยไม้หายากหรือใกล้สูญพันธุ์บางชนิด

ในประเทศไทย พบว่า มีงานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้จำนวนจำกัดและไม่ได้มีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง อุปสรรคสำคัญของการศึกษาเกี่ยวกับราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้คือการจำแนกชนิด เนื่องจากราไมคอร์ไรซามีลักษณะที่สามารถใช้จำแนกชนิดจำกัด ประกอบกับราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับราไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ และการชักนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมักไม่ประสบความสำเร็จ โครงการวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบชนิดของราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ (*Chiloschista*) และสกุลเอื้องจิว (*Schoenorchis*) ซึ่งกล้วยไม้หลายชนิดใน 2 สกุลนี้เป็นกล้วยไม้ที่สามารถพบตามธรรมชาติในภาคเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาชนิดของราไมคอร์ไรซาที่อยู่ร่วมกับกล้วยไม้ 2 สกุลนี้

คณะผู้วิจัยได้สำรวจกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ และสกุลเอื้องจิวในจังหวัดเชียงราย พบว่ามีกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบที่ขึ้นตามธรรมชาติในจังหวัดเชียงราย 2 แหล่ง คือที่โป่งน้ำร้อนห้วยหินฝน อำเภอแม่จัน และป่าช้าฝั่งศพติดกับกำแพงเก่าของเมืองเชียงแสน อ.เชียงแสน และได้จำแนกชนิดของกล้วยไม้ที่พบว่าเป็นเอื้องพญาไร้ใบดอกประ (*Chiloschista parishii*) ทั้งหมด สำหรับกล้วยไม้สกุลเอื้องจิวที่เคยมีผู้พบในอำเภอเชียงแสน ปรากฏว่าได้สูญหายไปเป็นการถาวร คณะผู้วิจัยจึงได้เก็บรากตัวอย่างจากกล้วยไม้ 2 สกุลนี้จากสวนพฤกษศาสตร์ สวนกล้วยไม้ ตลาดต้นไม้ และแหล่งอื่น ๆ เพิ่มเติม

คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเชื้อพันธุ์บริสุทธิ์ของรา *Rhizoctonia* ทั้งหมด 8 ไอโซเลต (isolate) โดยได้มาจากรากของกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ 6 ไอโซเลตและจากรากของกล้วยไม้สกุลเอื้องจิว 2 ไอโซเลต เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) สามารถ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS-5.8SrDNA (internal transcribed spacer and 5.8S ribosomal DNA) ของราทุกไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงได้ การสืบค้นโดยใช้ BLAST searches ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS-5.8S rDNA และการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยใช้ข้อมูล จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S rDNA ยืนยันว่า ราทั้ง 6 ไอโซเลต ที่ได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้อง พญาไร้ใบเป็นราชนิด *Epulorhiza repens* ในวงศ์ Tulasnellaceae ส่วนราที่ได้จากกล้วยไม้สกุล เอื้องจิวเป็น anamorph ของราสกุล *Ceratobasidium* ในวงศ์ Ceratobasidiaceae

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA แบ่งราที่ได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบออกเป็น 2 กลุ่ม โดยรา *E. repens* 4 ไอโซเลตที่ได้จากรากของเอื้องพญาไร้ใบดอกประที่เก็บตัวอย่างในจังหวัดเชียงรายทั้งหมดและรา *E. repens* 1 ไอโซเลตที่ได้จากเอื้องพญาไร้ใบดอกเขียว (*Chiloschista viridiflora*) ที่เก็บตัวอย่างจาก สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน ส่วนรา *E. repens* 1 ไอโซเลตที่ได้จากเอื้องพญาไร้ใบดอกสีขาว สวนกล้วยไม้พร้าว อำเภอพร้าว จังหวัด เชียงใหม่ อยู่ในอีกกลุ่มย่อยหนึ่ง คณะผู้วิจัยคาดว่า การที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA ของ *E. repens* ไอโซเลตนี้ แตกต่างจาก *E. repens* ไอโซเลตอื่น ๆ ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเดียวกัน น่าจะเป็นเพราะเอื้องพญาไร้ใบดอกสีขาวต้นนี้มาจากด้านสังขร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จึงมีวิวัฒนาการแยกจากรา *E. repens* ที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย การวิเคราะห์ ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ไม่ สามารถบ่งบอกถึงตำแหน่งเชิงอนุกรมวิธานของรา *Ceratobasidium* 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากราก ของกล้วยไม้สกุลเอื้องจิว ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของราไมคอร์ไรซาในสกุล *Ceratobasidium* ในฐานะข้อมูลสาธารณะมีค่อนข้างจำกัด การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ITS1 และ ITS2 บ่งชี้ว่า anamorph ของรา *Ceratobasidium* 2 ไอโซเลตนี้ อาจจะเป็นราชนิดใหม่ในสกุล *Ceratobasidium*

โครงการวิจัยนี้นอกจากจะสร้างองค์ความรู้ใหม่ ส่งเสริมความร่วมมือระหว่างมหาวิทยาลัย แม่ฟ้าหลวงกับองค์การสวนพฤกษศาสตร์ ยังมีผลกระทบในแง่ของการส่งเสริมคุณภาพทางวิชาการ และกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ให้นักศึกษาของมหาวิทยาลัย เนื่องจากคณะผู้วิจัยได้ออกแบบ ให้ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้เป็นโครงการในวิชา 1105491 Special Problem ของนายอรรถพล ตีลัง จิตร นักศึกษาชั้นปีที่ 4 สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

ภาคเหนือของประเทศไทยเป็นถิ่นอาศัยของกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพญาไร้ใบ (*Chiloschista*) และสกุลเอื้องจิว (*Schoenorchis*) หลายชนิด งานวิจัยนี้ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ใน รากกล้วยไม้ 2 สกุลนี้ โดยรากตัวอย่างเก็บจากกล้วยไม้ที่โตเต็มที่แล้วในแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ หรือโรงเรือนปลูกเลี้ยงในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย การตรวจสอบชนิดของราทำโดยใช้ ลักษณะสัณฐานวิทยาควบคู่กับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ 5.8S ribosomal DNA พบว่า รากทั้ง 6 ไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ 3 ชนิด ได้แก่ เอื้องพญาไร้ใบดอกประ (C. parishii) เอื้องพญาไร้ใบดอกเขียว (C. viridiflora) และ เอื้องพญาไร้ใบดอกขาว (*Chiloschista* sp.) เป็นรา *Epulorhiza repens* และราจำนวน 2 ไอโซเลตที่ แยกได้จากเอื้องมณีน้อย (*S. seidenfadenii*) และเอื้องจิวหอม (*S. fragrans*) เป็น anamorph ของรา สกุล *Ceratobasidium* การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ยังบ่งชี้ว่ารา 2 ไอโซเลตนี้ อาจจะเป็นราชนิดใหม่ในสกุล *Ceratobasidium*



Abstract

The northern region of Thailand is habitat to several species of *Chiloschista* and *Schoenorchis* (Orchidaceae). This project investigated the diversity of endophytic fungi associated with roots of two orchid genera collected in Chiang Mai and Chiang Rai Provinces. Fungal isolation was carried out using roots of adult plants collected from several ecologically diverse sites. Fungal identification was performed by morphological characterization and the analysis of the internal transcribed spacer and 5.8S ribosomal DNA sequences. The six fungal isolates obtained from *C. parishii*, *C. viridiflora*, and an unidentified species of *Chiloschista* were *Epulorhiza repens*, whereas, the two fungal isolates obtained from *S. seidenfadenii* and *S. fragrans* were identified to be anamorphs of *Ceratobasidium*. According to the analysis of ITS sequences, the two fungal isolates obtained from the *Schoenorchis* orchids are potentially a new species in the genus *Ceratobasidium*.

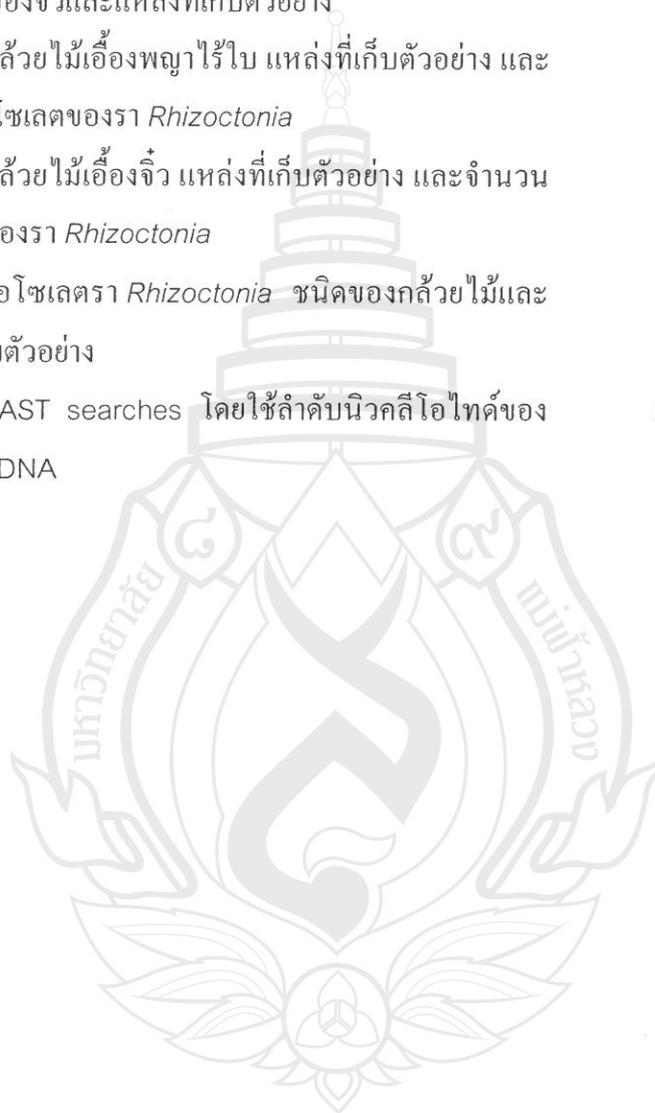


สารบัญ

		หน้า
บทที่ 1	บทนำ	
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
	1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
	1.4 คำถามหลักของงานวิจัย	3
	1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	3
	1.6 ขอบเขตการวิจัย	4
	1.7 ระยะเวลาในการดำเนินงาน	4
บทที่ 2	แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	
	2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและครอบคลุมงานวิจัย	5
	2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	
	3.1 ชนิดของกล้วยไม้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง	10
	3.2 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	12
บทที่ 4	ผลการศึกษาวิจัยและอภิปรายผลการศึกษาวิจัย	
	4.1 การแยกและเลี้ยงรา <i>Rhizoctonia</i>	15
	4.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา	18
	4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA	19
บทที่ 5	สรุปและข้อเสนอแนะ	
	5.1 สรุปผลการวิจัย	27
	5.2 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจากงานวิจัย	28
บรรณานุกรม		
ภาคผนวก		
ประวัตินักวิจัยและคณะ		

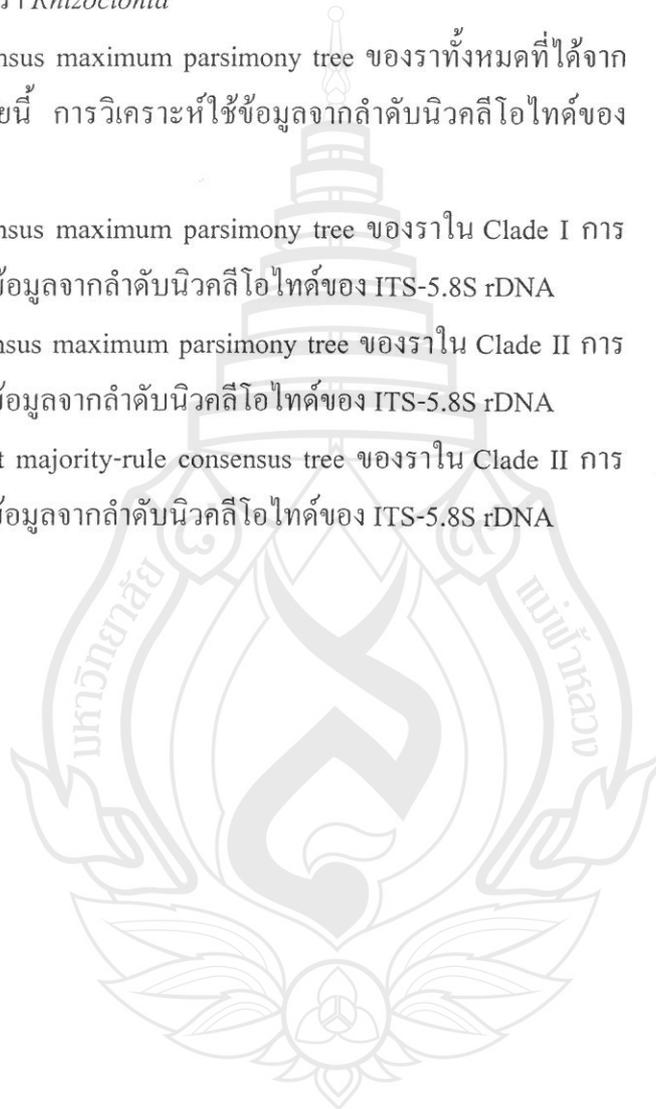
สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	ชนิดของเชื้องาไรโบและแหล่งที่เก็บตัวอย่าง	12
ตารางที่ 3-2	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง	12
ตารางที่ 4-1	ชนิดของกล้วยไม้เชื้องาไรโบ แหล่งที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนไอโซเลตของรา <i>Rhizoctonia</i>	17
ตารางที่ 4-2	ชนิดของกล้วยไม้เชื้อจุลินทรีย์ แหล่งที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนไอโซเลตของรา <i>Rhizoctonia</i>	18
ตารางที่ 4-3	รหัสของไอโซเลตรา <i>Rhizoctonia</i> ชนิดของกล้วยไม้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง	18
ตารางที่ 4-4	ผลของ BLAST searches โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA	21



สารบัญภาพ

	หน้า	
ภาพที่ 3-1	เอื้องพญาไร้ใบดอกประ พบที่โป่งน้ำร้อนห้วยหินฝน	11
ภาพที่ 4-1	ลักษณะของรา <i>Rhizoctonia</i>	19
ภาพที่ 4-2	Strict consensus maximum parsimony tree ของราทั้งหมดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ การวิเคราะห์ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5.8S rDNA	22
ภาพที่ 4-3	Strict consensus maximum parsimony tree ของราใน Clade I การวิเคราะห์ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA	23
ภาพที่ 4-3	Strict consensus maximum parsimony tree ของราใน Clade II การวิเคราะห์ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA	24
ภาพที่ 4-4	Fifty percent majority-rule consensus tree ของราใน Clade II การวิเคราะห์ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA	24



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกต้นและดอกกล้วยไม้อันดับ 2 ของโลก มูลค่าการส่งออกอยู่ที่ประมาณ 3,000 ล้านบาทต่อปี (กระทรวงพาณิชย์, www2.ops3.moc.go.th) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงกำหนดให้กล้วยไม้เป็น product champion และมีนโยบายผลักดันให้มีการเพิ่มการส่งออกให้ได้มูลค่าไม่ต่ำกว่า 10,000 ล้านบาท ภายในปี พ.ศ. 2553 (สุรวิช วรรณไกรโรจน์ 2550) นอกจากนี้ กล้วยไม้ยังมีความสำคัญในฐานะที่เป็นพืชที่ถูกคุกคาม (endangered species; CITES CoP8; CoP14 <http://www.cites.org/>)

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้เชิงพาณิชย์ต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอาหารสังเคราะห์ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้ส่วนมากมีขนาดเล็กและไม่มีอาหารสะสม ในธรรมชาติเมล็ดและต้นอ่อนของกล้วยไม้ต้องได้รับคาร์บอน ในโตรเจน และธาตุอาหารอื่นๆ จากราไมคอร์ไรซาเพื่อการงอกและการเจริญเติบโต (Cameron, Leake, and Read 2006; Gebauer and Meyer 2003; Rasmussen 2002) กล้วยไม้ที่ไม่มีคลอโรฟิลล์หรือกล้วยไม้ที่ไม่สามารถสังเคราะห์อาหารได้เองต้องพึ่งพาราไมคอร์ไรซาตลอดชีวิต (Leake 2004) จากการใช้ไอโซโทปของคาร์บอน ในโตรเจน และฟอสฟอรัสติดตามการแลกเปลี่ยนธาตุอาหารระหว่างราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้ที่มีคลอโรฟิลล์ พบการลำเลียงไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจากราไปยังกล้วยไม้ และมีการลำเลียงคาร์บอนจากกล้วยไม้ไปสู่รา (Cameron et al. 2006; Cameron et al., 2007) การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ที่สามารถสังเคราะห์อาหารได้เองก็มีการแลกเปลี่ยนอาหารและธาตุอาหารกับรา

การศึกษาวิจัยทางด้านราไมคอร์ไรซากับกล้วยไม้ในต่างประเทศได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในช่วงสามสิบปีที่ผ่านมา เนื่องจากราไมคอร์ไรซาได้ถูกนำมาใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้เศรษฐกิจบางชนิด เช่น *Dendrobium sonia* (Lekshmi, Tan, and Loh 2000) *Oncidium flexuosum* (Pereira et al. 2005) *Spathoglottis plicata* (Athipunyakom et al. 2004b) และ *Oncidium Goldiana* X *Oncidium Guiana* Gold (Wang et al. 2000) มีรายงานว่า ราไมคอร์ไรซาชนิดและสายพันธุ์ที่เหมาะสมสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารที่ปราศจากน้ำตาล และยังสามารถช่วยให้ต้นอ่อนของกล้วยไม้พัฒนาได้เร็วขึ้น (Fang et al., 2008; Johnson et al., 2007) ราไมคอร์ไร

ชายังถูกนำมาใช้เพื่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้หายากและใกล้สูญพันธุ์บางชนิด (Stewart and Kane 2006; Stewart and Zettler 2002; Zettler and McInnis, 1992; Zettler et al. 2007)

ในประเทศไทย พบว่า มีงานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้จำนวนจำกัดและไม่ได้มีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง แม้ว่ามีความพยายามที่จะแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้หลายสกุล (Athipunyakom et al. 2004a; Athipunyakom et al. 2004b; Kummuang et al. 2000; Manoch et al. 2000) การเพาะเลี้ยงและการจำแนกชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาประสบความสำเร็จในกล้วยไม้เพียง 5 สกุล และสกุลละ 1-2 ชนิด (species) เท่านั้น และมีเพียงกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี ที่ชนิดของกล้วยไม้ที่ศึกษามีมากถึง 7 ชนิด (Athipunyakom et al. 2004a) การจำแนกชนิดของเชื้อราในงานวิจัยเหล่านี้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเท่านั้น แต่เนื่องจากราไมคอร์ไรซามีลักษณะที่สามารถใช้จำแนกชนิดจำกัด (Rasmussen 2002) ประกอบกับราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ไม่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศบนอาหารเลี้ยง และการชักนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมักไม่ประสบความสำเร็จ (Athipunyakom et al. 2004a, b; Ma et al. 2003; Otero et al. 2002)

โครงการวิจัยนี้จะใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลควบคู่กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจสอบชนิดของราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ (*Chiloschista*) และสกุลเอื้องจิว (*Schoenorchis*) ซึ่งกล้วยไม้หลายชนิดใน 2 สกุลนี้เป็นกล้วยไม้ที่สามารถพบตามธรรมชาติในภาคเหนือของประเทศไทย (วิระชัย ณ นคร 2543) และจากการสอบถามและการสำรวจเบื้องต้นพบกล้วยไม้ 2 สกุลนี้ในจังหวัดเชียงราย นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษารามิคอร์ไรซาที่อยู่ร่วมกับกล้วยไม้ 2 สกุลนี้ โครงการนี้นอกจากจะช่วยเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายและความจำเพาะเจาะจงของเชื้อราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ไทย เชื้อราที่แยกและเพาะเลี้ยงได้ยังสามารถนำมาใช้ในการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาอิทธิพลของเชื้อราที่มีต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้เศรษฐกิจต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1) ศึกษาความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบและเอื้องจิวจากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่

1.2.2) พัฒนาเทคนิคการแยก เพาะเลี้ยง เก็บรักษา และจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้ เพื่อใช้ในงานวิจัยขั้นสูงต่อไป

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1) เทคนิคสำหรับการแยก เพาะเลี้ยง เก็บรักษา และจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซากล้วยไม้
- 1.3.2) เชื้อพันธุ์ราไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้ในงานวิจัยอื่น ๆ ต่อไป
- 1.3.3) ทราบชนิดกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบที่พบในแหล่งธรรมชาติในจังหวัดเชียงราย
- 1.3.4) ความร่วมมือระหว่างหัวหน้าโครงการวิจัยฯ กับสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

1.4 คำถามหลักของงานวิจัย

- 1.4.1) ราไมคอร์ไรซาชนิดใดบ้างที่อยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบและเอื้องจิว
- 1.4.2) เทคนิคการแยก เพาะเลี้ยง เก็บรักษา และจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซา ที่กำลังใช้แยก เพาะเลี้ยง เก็บรักษา และจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้ 3 สกุล อันได้ หวาย กะระกะร้อน และรองเท้านารี (ภายหลังตีพิมพ์ใน Nontachaiyapoom et al. 2010) เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบและเอื้องจิวหรือไม่

1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

ราไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่ในกล้วยไม้ (orchid mycorrhiza) ส่วนมากเป็นราในกลุ่ม Basidiomycetes ลักษณะพิเศษของเชื้อราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ ได้แก่ การสร้างเส้นใยชนิดเป็นวงที่เรียกว่า hyphal coil หรือ peloton ในเซลล์บริเวณ cortex ของราก ลำต้น หรือ protocorm ของกล้วยไม้ (Brundrett 2007) ราไมคอร์ไรซาหลายชนิดในกล้วยไม้ที่พบส่วนมากมีลักษณะร่วมกัน คือ 1) มีการแตกแขนงของเส้นใยเป็นมุมฉาก 2) มีรอยคอดในบริเวณที่เส้นใยแตกแขนง 3) แขนงเส้นใยมีผนังกัน (septum) ใกล้จุดกำเนิด 4) มักมีการสร้างเซลล์สั้น ๆ กลม ๆ ที่เรียกว่า monilioid cells ต่อกันเป็นลูกโซ่ และ 5) มักพบเฉพาะระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) เท่านั้น จึงถูกจำแนกให้อยู่ร่วมกันในสกุลจัดตั้ง (form-genus) *Rhizoctonia* (Otero et al. 2002)

ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกราก *Rhizoctonia* ได้แก่ 1) จำนวนนิวเคลียส (nucleus) ในเซลล์บริเวณปลายของเส้นใย 2) การรวมตัวกันของเส้นใย (hyphal anastomosis) 3) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่น ๆ เช่น ลักษณะพื้นผิว สี แบบแผนและอัตราการเจริญของกลุ่มเส้นใย (mycelium) และ โคลินี (colony) และ โครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของผนังกันเส้นใย (Andersen 1996; Athipunyakom 2004; Currah et al. 1990; Currah and Zelmer 1992, Moore 1987; Zelmer and Currah 1995) แต่การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดคือ ราไม

คอร์ไรซามีลักษณะที่สามารถใช้จำแนกชนิดจำกัด การชักนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมักไม่ประสบความสำเร็จ และการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถจำแนกเชื้อราบางกลุ่มหรือไม่สามารถระบุหมวดหมู่ในการจำแนกทางอนุกรมวิธาน (taxon) ในระดับที่ต่ำกว่าสกุล (Athipunyakom 2004; Ma et al. 2003; Otero et al. 2002; Rasmussen 2002)

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้จัดกลุ่มและจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (Hong and Jeong 2002; Kristiansen 2001, 2004; Swann and Taylor 1993; Taylor and McCormick 2008; Wilmotte et al. 1993) เทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงสุดเทคนิคหนึ่ง ได้แก่ การใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อรา (fungal primers) และเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ของยีน (gene) ที่ต้องการจะศึกษาจากดีเอ็นเอของราที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ จากนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) เปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอกับข้อมูลในฐานข้อมูลสาธารณะเช่น National Center for Biotechnology Informatio (NCBI) และ/หรือ สร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ข้อดีของเทคนิคนี้คือรวดเร็ว สามารถจำแนกชนิด และอาจระบุหมวดหมู่ที่ต่ำกว่าชนิดได้ โครงการวิจัยนี้จึงจำแนกชนิดราไมคอร์ไรซากล้วยไม้โดยใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลเป็นหลัก และใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นข้อมูลประกอบ

1.6 ขอบเขตการวิจัย

กล้วยไม้ที่จะนำมาแยกและจำแนกชนิดเชื้อราไมคอร์ไรซา ได้แก่ กล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบและเอื้องจิว เก็บจากแหล่งธรรมชาติ กิ่งธรรมชาติ หรือ โรงเรือนเลี้ยงกล้วยไม้ ในจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่ อย่างน้อย 3 แหล่ง

1.7 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

ตั้งแต่ 1 เมษายน พ.ศ. 2552 ถึง 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2553

บทที่ 2

แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและกรอบกลุ่มงานวิจัย

ราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ (orchid mycorrhiza) ส่วนมากเป็นราในกลุ่ม Basidiomycetes โดยมีราไมคอร์ไรซาที่เป็น ascomycete อยู่บ้างเช่น *Tuber* spp. ที่อาศัยอยู่ร่วมกับกล้วยไม้สกุล *Epipactis* (Bidartondo et al. 2004; Selosse et al. 2004) ลักษณะพิเศษของราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ ได้แก่ การสร้างเส้นใยชนิดเป็นวงที่เรียกว่า hyphal coil หรือ peloton ในเซลล์บริเวณ cortex ของราก ลำต้น หรือต้นอ่อน (protocorm) ของกล้วยไม้ (Brundrett 2007) ราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ส่วนใหญ่ มีลักษณะร่วมกันคือ 1) มีการแตกแขนงของเส้นใยเป็นมุมฉาก 2) มีรอยคอดในบริเวณที่เส้นใยแตกแขนง 3) แขนงเส้นใยมีผนังกัน (septum) โกลัสดำเนิน 4) มักมีการสร้างเซลล์สั้น ๆ กลม ๆ ที่เรียกว่า monilioid cells ต่อกันเป็นลูกโซ่ และ 5) มักพบเฉพาะระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) เท่านั้น จึงถูกจำแนกให้อยู่ร่วมกันในสกุลจัดตั้ง (form-genus) *Rhizoctonia* (Otero et al. 2002)

ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกรา *Rhizoctonia* ได้แก่

1) จำนวนนิวเคลียส (nucleus) ในเซลล์บริเวณปลายของเส้นใย โดย *Rhizoctonia* ที่เซลล์มีจำนวนนิวเคลียสมากกว่า 2 นิวเคลียส (multinucleate) ได้แก่ *Rhizoctonia solani* [ชื่อราที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) คือ *Thanatephorus cucumeris* วงศ์ Ceratobasidiaceae], *R. zeae*, และ *R. oryzae* ราในสกุล *Ceratobasidium* (วงศ์ Ceratobasidiaceae) ส่วนใหญ่ และในสกุล *Tulasnella* (วงศ์ Tulasnellaceae) มี 2 นิวเคลียส (binucleate) *Rhizoctonia* ที่มี 1 นิวเคลียสพบในสกุล *Ceratobasidium* แต่มีรายงานน้อยมาก (Hietala et al. 1994)

2) การรวมตัวกันของเส้นใย (hyphal anastomosis) *R. solani* สามารถแยกเป็นกลุ่มที่เส้นใยไม่สามารถรวมตัวกัน (incompatibility anastomosis group, AG) ได้ 12 กลุ่ม (Carling et al. 1999; Sneh et al. 1991), *R. zeae* จัดเป็น AG 1 กลุ่ม, และ *R. oryzae* จัดเป็น AG 1 กลุ่ม; *R. repens* (ชื่อ anamorph คือ *Epulorhiza repens* ชื่อ teleomorph คือ *Tulasnella calospora* วงศ์ Tulasnellaceae) จัดเป็น AG 2 กลุ่ม, *Ceratorhiza* spp. (ชื่อ teleomorph ของบางชนิด คือ *Ceratobasidium* spp. วงศ์

Ceratobasidiaceae และบางชนิดไม่ทราบชื่อ teleomorph) แบ่งเป็น 21 กลุ่ม; *Rhizoctonia* ที่มี 1 นิวเคลียส (uninucleate) มีรายงาน AG 1 กลุ่ม (Hietala et al. 1994; Sneh et al. 1991)

3) ลักษณะอื่น ๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อราได้แก่ ลักษณะพื้นผิว สี แบบแผนและอัตราการเจริญของกลุ่มเส้นใย (mycelium) และโคโลนี (colony) และโครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของผนังเส้นใย เป็นต้น (Andersen 1996; Athipunyakom 2004; Athipunyakom et al. 2004a, b; Currah et al. 1990; Currah and Zelmer 1992, Moore 1987; Zelmer and Currah 1995)

การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดคือ ราไมคอร์ไรซามีลักษณะที่สามารถใช้จำแนกชนิดจำกัด การชักนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมักไม่ประสบความสำเร็จ และการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถจำแนกเชื้อราบางกลุ่มในระดับที่ต่ำกว่าสกุล (Athipunyakom 2004; Ma et al. 2003; Otero et al. 2002; Rasmussen 2002) ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้จัดกลุ่มและจำแนกชนิดเชื้อราไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ เทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงสุดเทคนิคหนึ่ง ได้แก่ การใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อรา (fungal primers) และเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อราจากดีเอ็นเอที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ที่มีเชื้อราไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ ควบคู่กับการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) และการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ยีน (gene) ที่ใช้สำหรับเทคนิคนี้ ได้แก่ ยีนที่ถอดรหัสให้อาร์เอ็นเอชนิดที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซมในนิวเคลียส (nuclear ribosomal DNA, rDNA) นิยมใช้เพื่อการจำแนกเชื้อราในระดับคลาส (class) และออร์เดอร์ (order) (ตัวอย่างเช่น Swann and Taylor 1993; Wilmotte et al. 1993) ยีนที่ถอดรหัสให้อาร์เอ็นเอชนิดที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซมในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial rDNA, mt rDNA) นิยมใช้เพื่อการจำแนกราดในระดับตั้งแต่วงศ์ (family) ลงมา (ตัวอย่างเช่น Hong and Jeong 2002; Kristiansen 2001, 2004) และบริเวณ ITS-5.8S rDNA (internal transcribed spacer and 5.8S ribosomal DNA) นิยมใช้เพื่อการจำแนกเชื้อราในระดับสกุลและชนิด (ตัวอย่างเช่น Taylor and McCormick 2008) การใช้ ITS-5.8S rDNA ยังมีข้อได้เปรียบคือ ข้อมูลลำดับเบสของ ITS rDNA ของเชื้อราค่อนข้างที่จะสมบูรณ์กว่ากว่าฐานข้อมูลชนิดอื่น ๆ

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจำแนกชนิดของกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลพญาไร้ใบ (*Chiloschista*) เรียกกันทั่ว ๆ ไปว่า พญาไร้ใบ เป็นกล้วยไม้ที่มีต้นสั้นมาก ปกติใบลดรูปเป็นเกล็ดเล็ก ๆ มีแต่รากสีเขียวอมเทาจำนวนมากแผ่ขยายไปตามต้นไม้ที่ขึ้นอยู่ ช่อดอกห้อยลง บางต้นมีหลายช่อ ขนาดช่อยาว 5-25 ซม. ดอกในช่อเรียงเป็นระยะค่อนข้างโปร่ง ดอกเกือบกลม มีเส้าเกสร (column) สั้น แต่โคนเส้าเกสรยืดตัวออกไปเป็นแถบ ซึ่งกลีบเลี้ยงคู่ข้างและกลีบดอกติดอยู่ตรงส่วนที่ยืดตัวออกไปนี้ กลุ่มเรณูรูปกลมคล้ายฝาประกบกัน และขนาดไม่เท่ากัน มี 2 คู่ ยึดติดกับแถบเยื่อบางใสและแถบ พญาไร้ใบชอบขึ้นตามต้นไม้ กิ่งไม้ ที่มีผิวค่อนข้างเกลี้ยง และพบตามป่าดิบแล้งหรือป่าเบญจพรรณ ในประเทศไทยพบ 8 ชนิด (อบฉันทน์ ไทยทอง 2543) ลักษณะที่ใช้จำแนกชนิดของกล้วยไม้ในสกุลนี้ เช่น การแตกกิ่งของช่อดอก เส้นคล้ายด้ายที่ยื่นออกมาจากฝาครอบกลุ่มเรณู (operculum) ลักษณะและสีของกลีบเลี้ยงและกลีบดอก แต้มจุดบนกลีบดอกและกลีบเลี้ยง ขนบนกลีบดอกและกลีบเลี้ยง (Seidenfaden 1988)

กล้วยไม้สกุลเอื้องจิว (*Schoenorchis*) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย เจริญทางยอด ขนาดเล็กหรือค่อนข้างเล็ก ใบมักจะอวบน้ำ บางชนิดใบสั้นและซ้อนถี่ บางชนิดใบบางเรียงตัวห่างกันเล็กน้อย ช่อดอกค่อนข้างดก ดอกเล็กกลีบไม่กางออกจากกัน หรือกางเล็กน้อย กลีบปากอวบน้ำ มีเดือย ช่วงปลายกลีบปากด้านในมักจะม้วนเป็นปุ่มหรือเป็นสัน เส้าเกสรสั้น อับเรณูอยู่เกือบชิดโคนเส้าเกสร กลุ่มเรณูมี 2 คู่ ยึดติดอยู่บนแผ่นเยื่อใสคล้ายคันไถ กล้วยไม้ชนิดนี้พบขึ้นตามป่าดิบชื้นหรือป่าดิบ ในประเทศไทยพบ 8 ชนิด (อบฉันทน์ ไทยทอง 2543) ลักษณะที่ใช้จำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลนี้ได้แก่ ขนาดของใบ การแตกกิ่งของช่อดอก กลีบปากมีหรือไม่มีตุ่มเนื้อเยื่อที่ epichile ลักษณะใบ ลักษณะของเดือย (spur) บนกลีบดอก ลักษณะของฝาครอบกลุ่มเรณู สีของดอก (Seidenfaden 1988)

การแยก การเลี้ยงและการเก็บเชื้อพันธุราไมคอร์ไรซากล้วยไม้

การแยกราไมคอร์ไรซากล้วยไม้สามารถทำได้ 2 วิธี คือ 1) การแยก peloton จากต้นอ่อนหรือเนื้อเยื่อชั้น cortex ของราก (Warcup and Talbot 1967) ข้อดีของวิธีนี้คือ ราที่เจริญออกมาจาก peloton จะเป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้แน่นอน อย่างไรก็ตาม การแยกราไมคอร์ไรซากล้วยไม้โดยใช้ peloton จำเป็นจะต้องตัดรากเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นจึงฉีกหรือบดเนื้อเยื่อ cortex ของราก ทำให้เกิดการสูญเสีย peloton ไปส่วนหนึ่ง และภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ซึ่งมีกำลังขยายต่ำ เศษวัสดุพืชหรือเชื้อราปนเปื้อนอื่น ๆ อาจถูกเข้าใจผิดว่าเป็น peloton ได้ (Nontachaiyapoom et al.

2010) นอกจากนี้กล้วยไม้อิงอาศัยหลายชนิดมี peloton ช้างน้อย (Bayman et al. 2002; Otero et al. 2002, 2007) 2) การแยกราไมคอร์ไรซากล้วยไม้อาจทำได้โดยการวางรากที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ บนอาหารเลี้ยง จากนั้นจึงสังเกตเส้นใยที่เจริญออกมาจากราก บริเวณปลายของเส้นใยของราที่มีลักษณะของ *Rhizoctonia* จะถูกตัดไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ (ตัวอย่างเช่น Nontachaiyapoom et al. 2010; Otero et al. 2002, 2007) การลอกเนื้อเยื่อ epidermis ของรากกล้วยไม้ หรือ velamen ออกจากชิ้นของรากจะทำให้การปนเปื้อนโดยราชนิดอื่นและแบคทีเรียลดน้อยลง (Nontachaiyapoom et al. 2010)

ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ส่วนมากสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าราเอนโดไฟต์และไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้บางชนิด จะเจริญบนอาหารเลี้ยงที่มีการเติม กรดอะมิโนและวิตามิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง thiamine เท่านั้น (Hadley and Ong 1978; Hijner and Arditti 1973) และพบว่า การเติม Murashige and Skoog (MS) vitamins ลงในอาหาร PDA สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์จากรากกล้วยไม้กระถางร้อนปากนกแก้ว (*Cymbidium lowianum*) บางไอโซเลต (Nontachaiyapoom et al. 2010)

การเก็บเชื้อพันธุ์ราไมคอร์ไรซาสามารถทำได้หลายวิธีเช่น 1) การเลี้ยงบน PDA ที่อุณหภูมิหรือการเลี้ยงบน PDA slant ที่ปิดทับด้วยพาราฟินเหลว ที่อุณหภูมิ 15°C (Athipunyakom 2004) วิธีนี้จะต้องมีการตัดแยกเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุก 6 เดือน 2) การใช้อุณหภูมิต่ำแบบยิ่งยวด เช่น การเก็บโดยการแช่แข็งกลุ่มของเส้นใยใน 10% กลีเซอรอลแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C หรือในไนโตรเจนเหลว (Sneh et al. 1991) วิธีนี้ต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะ และ 3) การเก็บในน้ำที่นิ่งมาเชื้อแล้ว วิธีนี้ไม่ยุ่งยาก อาจเก็บเชื้อพันธุ์ได้นานถึง 2 ปี (Dr. Kevin Hyde และ Mr. Sittisack Phoulivong, การติดต่อส่วนตัว)

การสกัดดีเอ็นเอและเทคนิคพีซีอาร์

การเลี้ยงราเพื่อเก็บเส้นใยสำหรับการสกัดดีเอ็นเอส่วนมากจะใช้วิธีของ Cenis 1992 โดยเลี้ยงราในอาหารเหลว (ตัวอย่างเช่น Bonnardeaux et al. 2007; Ma et al. 2003; Shimura et al. 2009) ข้อเสียของวิธีนี้คือไม่สามารถยืนยันได้ว่าราในอาหารเหลวเป็นราที่ต้องการศึกษาหรือราชนิดอื่นที่ปนเปื้อน เนื่องจากราที่เจริญบนอาหารกึ่งแข็งกับราที่เจริญในอาหารเหลวอาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน อีกวิธีหนึ่งคือการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากรากพืช (Shefferson et al. 2005; Shefferson et al. 2007) วิธีนี้มีข้อเสียคือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะมีดีเอ็นเอของรากพืชปะปนในปริมาณมากและ/หรือมีดีเอ็นเอของราที่เป็นโรคพืชปะปน ทำให้ไม่อาจแน่ใจว่า ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากเทคนิคพีซีอาร์ เป็นดีเอ็นเอของราที่ต้องการศึกษาจริง วิธีเก็บเส้นใยอีกวิธีหนึ่งคือ

การเก็บเส้นใยที่เจริญบนอาหารหรือชูขึ้นมาในอากาศ (aerial hypha) อย่างไรก็ตามราไมคอร์ไรซากล้วยไม้หลายชนิดเจริญติดอาหารทำให้ไม่สามารถจะเก็บด้วยวิธีนี้ หากตัดเส้นใยที่ติดอาหาร ฐานในอาหารจะเป็นอุปสรรคต่อการสกัดดีเอ็นเอ Nontachaiyapoom et al. 2010 แก้ปัญหานี้โดยการเลี้ยงรบนอาหารกึ่งแข็ง เมื่อยืนยันโดยลักษณะของโคโลนี (colony) และลักษณะการแตกแขนงของเส้นใยได้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอว่าเป็นราชนิดที่ต้องการ จะทำการตัดรากเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ซม. x 1 ซม. ละลายอาหารกึ่งแข็งบนเตาไฟฟ้า (hot plate) แล้วจึงเก็บเฉพาะเส้นใยสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

เทคนิคพีซีอาร์ การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ และการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการได้ถูกนำมาใช้จำแนกชนิดของร่าอย่างกว้างขวาง บริเวณหนึ่งที่น่าสนใจเพื่อวัตถุประสงค์นี้คือ ITS-5.8S rDNA ไพร์เมอร์สำหรับเทคนิคพีซีอาร์ที่นิยมใช้ได้แก่ ITS1 และ ITS4 (White et al. 1990) ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ที่ไม่เฉพาะเจาะจงสำหรับรา, ITS1-F และ ITS4B (Gardes and Bruns 1993) ซึ่งลดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืช แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของราในกลุ่ม Tulasnellaceae ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไพร์เมอร์ของ Taylor and McCormick 2007 เป็นไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อราและสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของราในกลุ่ม Tulasnellaceae ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การค้นหานชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาสามารถทำได้โดยใช้ BLAST Searches (Atschul et al. 1997) ค้นหาในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) การสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการสามารถใช้เพื่อตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิตและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ แต่เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS-5.8S rDNA ของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้กลุ่มต่าง ๆ มีความแตกต่าง (diverse) กันมาก ผู้ศึกษาจึงมักใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะ 5.8S rDNA เพื่อคำนวณหา maximum parsimony tree ของราทั้งหมดที่ต้องการศึกษาก่อน จากนั้นจึงใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA เพื่อคำนวณหาความสัมพันธ์ของสมาชิกในแต่ละ clade หลัก (Nontachaiyapoom et al. 2010; Shefferson et al. 2007; Suarez et al. 2006; Taylor and McCormick 2008)

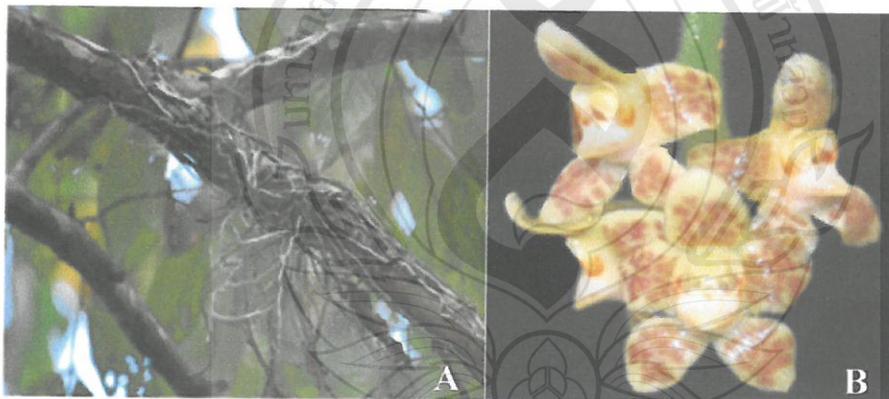
บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ชนิดของกล้วยไม้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

การจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลพญาไร้ใบ (*Chiloschista*) และเอื้องจิว (*Schoenorchis*) ใช้วิธีของ Seidenfaden 1988 ชื่อไทยของกล้วยไม้อ้างอิงจาก เต็ม สมิตินันท์ 2544

การจำแนกชนิดของเอื้องพญาไร้ใบที่ขึ้นตามธรรมชาติในจังหวัดเชียงราย (ได้แก่ อ.เชียงแสน และโป่งน้ำร้อนห้วยหินฝน อ.แม่จัน) ทำให้ทราบว่าเอื้องพญาไร้เหล่านี้เป็นเอื้องพญาไร้ใบดอกประทั้งหมด (*Chiloschista parishii* Seidenf.; ภาพที่ 3-1) กล้วยไม้ชนิดนี้มีช่อดอกค่อนข้างโปร่ง ยาว 10-25 เซนติเมตร ขนาดดอกประมาณ 1.5 เซนติเมตร ดอกบานใหม่มีสีเขี้ยวอ่อนอมเหลือง ต่อมาสีเหลืองมากขึ้นและอาจมีแต้มจุดประในบางพันธุ์ ผิวกลีบด้านนอกมีขนสั้นนุ่มกระจาย ขอบกลีบเรียบ (อบฉันท์ ไทยทอง 2543) คณะผู้วิจัยไม่พบข้อมูลว่ามีเอื้องพญาไร้ใบที่ขึ้นตามธรรมชาติในจังหวัดเชียงใหม่ จึงเห็นสมควรที่จะเก็บรากตัวอย่างจากเอื้องพญาไร้ใบชนิดอื่น ๆ ด้วยแม้ว่าจะไม่ใช่เอื้องพญาไร้ใบที่ขึ้นตามธรรมชาติ ชนิดของเอื้องพญาไร้ใบและแหล่งที่เก็บตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 3-1



ภาพที่ 3-1 เอื้องพญาไร้ใบดอกประ พบที่โป่งน้ำร้อนห้วยหินฝน (A) รากสีเขี้ยวบนกิ่งไม้ (B) ดอก

คณะผู้วิจัยยังพบว่า เอื้องจิวซึ่งมีผู้พบเห็นเป็นจำนวนมากในอำเภอเชียงแสนเมื่อหลายปีก่อน ได้สูญหายไปจากแหล่งธรรมชาติแล้ว ทางคณะผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องซื้อหรือขอเก็บรากตัวอย่างของเอื้องจิวจากแหล่งอื่น ๆ ในจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่เพื่อใช้ในการงานวิจัย ชนิดของเอื้องจิวและแหล่งที่เก็บตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-1 ชนิดของเอื้องพญาไร้ใบและแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง ^๑
<i>Chiloschista lunifera</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกแฉ่ำ	ตลาดคำเที่ยง อ.เมือง จ.เชียงใหม่
<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกประ	อ.เชียงแสน จ.เชียงราย
<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกประ	โป่งน้ำร้อนห้วยหินฝน อ.แม่จัน จ.เชียงราย
<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกประ	ตลาดคำเที่ยง อ.เมือง จ.เชียงใหม่
<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกประ	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่
<i>Chiloschista</i> sp	เอื้องพญาไร้ใบ	ตลาดคำเที่ยง อ.เมือง จ.เชียงใหม่
<i>Chiloschista</i> sp.	เอื้องพญาไร้ใบ (ดอกขาว)	ภาคไม้ค้ำยเมืองราย อ.เมือง จ.เชียงราย
<i>Chiloschista</i> sp.	เอื้องพญาไร้ใบ (ดอกแดง)	ภาคไม้ค้ำยเมืองราย อ.เมือง จ.เชียงราย
<i>Chiloschista</i> sp.	เอื้องพญาไร้ใบ	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่
<i>Chiloschista</i> sp.	เอื้องพญาไร้ใบ (ดอกขาว)	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่
<i>Chiloschista usneoides</i>	เอื้องพญาไร้ใบ	สวนพฤกษศาสตร์ฯ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
<i>Chiloschista viridiflora</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกเขียว	ตลาดคำเที่ยง อ.เมือง จ.เชียงใหม่
<i>Chiloschista viridiflora</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกเขียว	สวนพฤกษศาสตร์ฯ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
<i>Chiloschista viridiflora</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกเขียว	สวนพฤกษศาสตร์ฯ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

หมายเหตุ ^๑สวนพฤกษศาสตร์ฯ ย่อมาจาก สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

ตารางที่ 3-2 ชนิดของเอื้องจิวและแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
<i>Schoenorchis fragrans</i>	เอื้องจิวหอม	ตลาดคำเที่ยง อ.เมือง จ.เชียงใหม่
<i>Schoenorchis fragrans</i>	เอื้องจิวหอม	ภาคไม้ค้ำยเมืองราย อ.เมือง จ.เชียงราย
<i>Schoenorchis fragrans</i>	เอื้องจิวหอม	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่
<i>Schoenorchis seidenfadenii</i>	เอื้องมณีน้อย	งานเชียงรายดอกไม้บาน พ.ศ.2551 อ.เมือง จ.เชียงราย
<i>Schoenorchis seidenfadenii</i>	เอื้องมณีน้อย	ตลาดคำเที่ยง อ.เมือง จ.เชียงใหม่
<i>Schoenorchis seidenfadenii</i>	เอื้องมณีน้อย	อ.แม่สาย จ.เชียงราย
<i>Schoenorchis seidenfadenii</i>	เอื้องมณีน้อย	ภาคไม้ค้ำยเมืองราย อ.เมือง จ.เชียงราย

หมายเหตุ ^๑สวนพฤกษศาสตร์ฯ ย่อมาจาก สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

3.2 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.2.1) การแยกราจากตัวอย่าง

การแยกราจากตัวอย่างใช้วิธีของ Nontachaiyapoom et al. 2010 มีขั้นตอนคือ เก็บรากกล้วยไม้ที่แข็งแรงสมบูรณ์และไม่พบการเข้าทำลายของโรคและแมลงลงในถุงพลาสติก วางในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง ลำเลียงรากมายังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง การแยกรากจะทำภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บราก จากนั้นจึงนำรากมาตัดตามขวางเพื่อคัดเลือกเฉพาะรากที่มี peloton อย่างน้อย 2 ราก ต่อกกล้วยไม้แต่ละต้น รากที่มี peloton จะถูกนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดย 3% (v/v) H₂O₂ และ 70% เอธิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที ใช้เทคนิคปลอดเชื้อตัดรากตามขวางเป็นชิ้นหนา 1-2 มิลลิเมตร โดยใบมีดโกนได้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ใช้ forceps และมีดดึงส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อชั้น epidermis ของรากหรือ velamen ออก จากนั้นจึงวางชิ้นรากบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่มี 50 µg/ml oxytetracycline, 50 µg/ml streptomycin, และ 50 µg/ml penicillin (Otero et al. 2002) ประมาณ 3 ชิ้นรากต่อ 1 petri dish อย่างน้อย 3 petri dish ต่อ 1 รากตัวอย่าง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำมาส่องได้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) ทุก ๆ 2 วันเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ หากพบราที่เจริญออกมามีลักษณะของรา *Rhizoctonia* คือ 1) มีการแตกแขนงของเส้นใยเป็นมุ่มมลก 2) มีรอยคอดในบริเวณที่เส้นใยแตกแขนง 3) แขนงเส้นใยมีผนังกัน (septum) ใกล้จุดกำเนิด (Otero et al. 2002) ก็จะตัดส่วนปลายของเส้นใย (hyphal tip) มาเลี้ยงบนอาหารใหม่

3.2.2) การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่แยกได้

เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ของราจะถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์หรือมากกว่านี้ หากเป็นราที่โตช้า เพื่อถ่ายรูปโคโลนี (colony) การศึกษาลักษณะทางจุลทรรศน์ เตรียมสไลด์โดยการใช้น้ำหรือสารละลาย 0.5% (W/V) Safranin O 1 หยดและสารละลาย 3% KOH 1 หยด สังเกตลักษณะของราและถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์เชิงประกอบ (Axiotech, Carl Zeiss, Jena, Germany) ที่ต่อกับกล้องถ่ายรูป (DSC-S85, Sory, Tokyo, Japan)

3.2.3) การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีของ Nontachaiyapoom et al. 2010 โดยการเลี้ยงรบบนอาหาร PDA เมื่อเย็นย่นโดยลักษณะของโคโลนีและลักษณะจุลทรรศน์ว่าเป็นเชื้อพันธุ์บริสุทธิ์ของราชนิดที่ต้องการ จะทำการตัดรากเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ซม. x 1 ซม. ละลายอาหารเตาไฟฟ้า (hot plate) เก็บเส้นใยไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C จนกระทั่งมีการสกัดดี

เอ็นเอ การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีของ Nontachaiyapoom et al. 2010 โดยการบดเส้นใยของราใน Buffer PL โดยใช้ tube pestle จากนั้นจึงดำเนินการสกัดดีเอ็นเอตามคู่มือ GF-1 Plant Extraction Kit (Vivantis Technologies, Selangor DE, Malaysia)

3.2.4) เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR)

ใช้วิธีของ Nontachaiyapoom et al. 2010 เริ่มจากการหาคู่ไพรเมอร์ (primer) และอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมใน amplification reaction ปริมาตร 15 μ l ซึ่งประกอบด้วย Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1X PCR Buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 400 nM forward และ reverse primers คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ได้แก่ 1) ITS1-OF-1 (5'-AACTCGGCCATTTAGAGGAAGT-3')/ITS4-OF, 2) ITS1-OF-2 (5'-AACTGGTCATTTAGAGGAAGT-3')/ITS4-OF, และ 3) ITS1-OF-1/ITS4 (Taylor and McCormick 2008; White et al. 1990) การตั้งอุณหภูมิและเวลาของโปรแกรมพีซีอาร์เป็นดังนี้ 1 รอบ ที่ 95°C เป็นเวลา 2 นาที 35 รอบ ของ 1) 94°C 1 นาที, 2) 55°C-58°C 30 วินาที ขึ้นอยู่กับชนิดของรา, 3) 72°C 1 นาที และ 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 72°C 10 นาที คงไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งเย็น สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับการ PCR purification ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วแต่เพิ่มปริมาตรเป็น 100 μ l PCR purification ใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) ตัวอย่างพีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วถูกส่งไปที่ Fist Base Pte Ltd (Singapore) สำหรับการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยใช้ sequencing primers ITS1 และ ITS4 (White et al. 1990)

3.2.5) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence analysis)

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากสอง sequencing primers จะถูกรวมให้เป็น contig เดียวกัน โดยใช้โปรแกรม CAP3 (Huang and Madan 1999) การค้นหาชนิดของราที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของราจากโครงการวิจัยนี้ ใช้ BLAST Searches (Atschul et al. 1997) ค้นหาจากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) การปรับแต่งและการจัดการลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้โปรแกรม BIOEDT (Hall 1999) การเปรียบเทียบเพื่อหา sequence identity ใช้โปรแกรม CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างวงศัวนวิวัฒนาการใช้โปรแกรม CLUSTALX version 2.0 (Larkin et al. 2007) การสร้างวงศัวนวิวัฒนาการด้วยการวิเคราะห์ maximum parsimony (MP) เพื่อยืนยันชนิดของราและเพื่อจำแนกไอโซเลตของราออกเป็นกลุ่มหลัก (major clade) ใช้ข้อมูลจาก

ลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะบริเวณ 5.8S rDNA สำหรับการหาความสัมพันธ์ของสมาชิกในแต่ละ clade หลักใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA การวิเคราะห์ MP ใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0 beta 10 (Swofford 2002) และใช้ heuristic search ซึ่งประกอบด้วย random stepwise addition 1000 ซ้ำ โดยใช้อัลกอริทึม (algorithm) แบบ tree bisection and reconnection (TBR) branch swapping, MulTrees option in effect, และ zero length branches collapsed การวิเคราะห์ bootstrap ทำโดยใช้ 1000 replicates แต่ละ replicate ประกอบด้วย random addition heuristic search 100 รอบ, TBR branch swapping, และ MulTrees option in effect โดยที่ tree arrangement ถูกจำกัดไว้ที่ 5000 ครั้งต่อ 1 bootstrap replicate



บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัยและอภิปรายผลการศึกษาวิจัย

4.1 การแยกและเลี้ยงรา *Rhizoctonia*

รา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ (*Chiloschista*) มีทั้งสิ้น 6 ไอโซเลต แยกได้จากเอื้องพญาไร้ใบดอกประ (*Chiloschista parishii*) จากอำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย 3 ไอโซเลต แยกได้จากเอื้องพญาไร้ใบดอกประที่เก็บจากโป่งน้ำร้อนห้วยหินฝน อำเภอแม่จัน จังหวัดเชียงราย 1 ไอโซเลต แยกได้จากเอื้องพญาไร้ใบมีดอกสีขาว (*Chiloschista* sp.) จากสวนกล้วยไม้พร้าว อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ 1 ไอโซเลต และแยกได้จากเอื้องพญาไร้ใบดอกเขียว (*Chiloschista viridiflora*) จากสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ 1 ไอโซเลต คูสรูปจำนวนไอโซเลตรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากเอื้องพญาไร้ใบ ในตารางที่ 4-1 นอกจากนี้รา *Rhizoctonia* พบราในกลุ่ม ascomycete 1 ไอโซเลต (ไม่แสดงผลการทดลอง) รหัสไอโซเลตของราที่จะใช้อ้างอิงต่อไป คูตารางที่ 4-3

รา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องจิว (*Schoenorchis*) มีทั้งสิ้น 2 ไอโซเลต แยกได้จากเอื้องจิวหอม (*Schoenorchis fragrans*) ที่ได้จากสวนกล้วยไม้พร้าว จำนวน 1 ไอโซเลต และแยกได้จากเอื้องมณีน้อย (*Schoenorchis sedenfadenii*) จากอำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย 1 ไอโซเลต เนื่องจากรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องจิวโตขึ้นในอาหาร potato dextrose agar คณะผู้วิจัยจึงทดลองเติม Murashige and Skoog (MS) vitamins พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของราทั้ง 2 ไอโซเลตนี้ ราเอนโคไฟด์และไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้บางชนิดจะเจริญบนอาหารที่มีการเติมกรดอะมิโนและวิตามิน (Hadley and Ong 1978; Hijner and Arditti 1973; Nontachaiyapoom et al. 2010) คูสรูปจำนวนไอโซเลตรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากเอื้องจิว ในตารางที่ 4-2 รหัสไอโซเลตของราที่จะใช้อ้างอิงต่อไป คูตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-1 ชนิดของกล้วยไม้เอื้องพญาไร่ ใบ แหล่งที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนไอโซเลตของรา *Rhizoctonia*

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตของราที่แยกได้
<i>Chiloschista lunifera</i>	เอื้องพญาไร่ใบดอกแฉ่ม	ตลาดค้าเหียง อ.เมือง จ.เชียงใหม่	0
<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร่ใบดอกประ	อ.เชียงแสน จ.เชียงราย	3
<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร่ใบดอกประ	ปองน้ำร้อนห้วยหินฝน อ.แม่อิง จ.เชียงราย	1
<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร่ใบดอกประ	ตลาดค้าเหียง อ.เมือง จ.เชียงใหม่	0
<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร่ใบดอกประ	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	0
<i>Chiloschista</i> sp	เอื้องพญาไร่ใบ	ตลาดค้าเหียง อ.เมือง จ.เชียงใหม่	0
<i>Chiloschista</i> sp.	เอื้องพญาไร่ใบ (ดอกขาว)	กาดไม้ค้ายเม้งราย อ.เมือง จ.เชียงราย	0
<i>Chiloschista</i> sp.	เอื้องพญาไร่ใบ (ดอกแดง)	กาดไม้ค้ายเม้งราย อ.เมือง จ.เชียงราย	0
<i>Chiloschista</i> sp.	เอื้องพญาไร่ใบ	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	0
<i>Chiloschista</i> sp.	เอื้องพญาไร่ใบ (ดอกขาว)	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	1
<i>Chiloschista usneoides</i>	เอื้องพญาไร่ใบ	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ.เชียงใหม่	0
<i>Chiloschista viridiflora</i>	เอื้องพญาไร่ใบดอกเขียว	ตลาดค้าเหียง อ.เมือง จ.เชียงใหม่	0
<i>Chiloschista viridiflora</i>	เอื้องพญาไร่ใบดอกเขียว	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ.เชียงใหม่	0
<i>Chiloschista viridiflora</i>	เอื้องพญาไร่ใบดอกเขียว	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ.เชียงใหม่	1

ตารางที่ 4-2 ชนิดของกล้วยไม้เลี้ยงเนื้ออ่อน และจำนวนไอโซเลตของรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตของราที่แยกได้
<i>Schoenorchis fragrans</i>	ชื่อไทย เอื้องจิตหอม	ตลาดค้าพืช อ.เมือง จ.เชียงใหม่		0
<i>Schoenorchis seidenfadenii</i>	เอื้องมณีน้อย	งานเชียงรายดอกไม้บ้าน พ.ศ.2551 อ.เมือง จ.เชียงราย		0
<i>Schoenorchis seidenfadenii</i>	เอื้องมณีน้อย	ตลาดค้าพืช อ.เมือง จ.เชียงใหม่		0
<i>Schoenorchis seidenfadenii</i>	เอื้องมณีน้อย	อ.แม่สาย จ.เชียงราย		1
<i>Schoenorchis seidenfadenii</i>	เอื้องมณีน้อย	ภาคไม้ค้ายเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย		0
<i>Schoenorchis fragrans</i>	เอื้องจิตหอม	ภาคไม้ค้ายเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย		0
<i>Schoenorchis fragrans</i>	เอื้องจิตหอม	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่		1

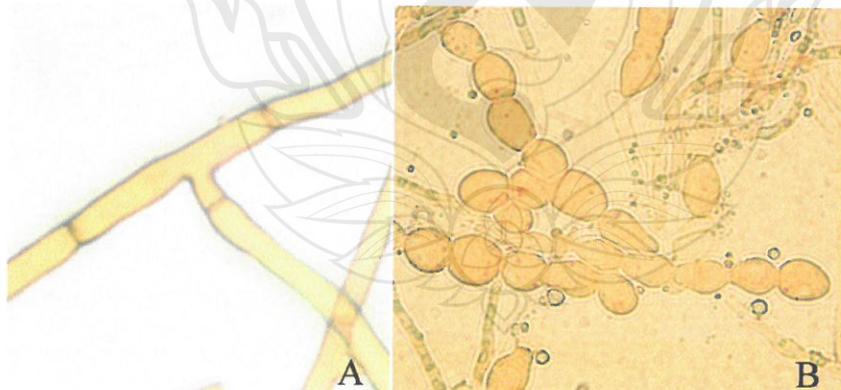
ตารางที่ 4-3 รหัสของไอโซเลตรา *Rhizoctonia* ชนิดของกล้วยไม้ และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

รหัสของไอโซเลต	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
Chip-CS-1	<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกประ	อ.เชียงแสน จ.เชียงราย
Chip-CS-2	<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกประ	อ.เชียงแสน จ.เชียงราย
Chip-CS-3	<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกประ	อ.เชียงแสน จ.เชียงราย
Chip-HH-1	<i>Chiloschista parishii</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกประ	โป่งน้ำร้อนห้วยหินฝน อ.แม่จัน จ.เชียงราย
Chil-PN-1	<i>Chiloschista</i> sp.	เอื้องพญาไร้ใบ (ดอกสีขาว)	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่
Chiv-QS-1	<i>Chiloschista viridiflora</i>	เอื้องพญาไร้ใบดอกเขียว	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ.เชียงใหม่
Schf-PN-1	<i>Schoenorchis fragrans</i>	เอื้องจิตหอม	สวนกล้วยไม้พร้าว อ.พร้าว จ.เชียงใหม่
Schs-MS-1	<i>Schoenorchis seidenfadenii</i>	เอื้องมณีน้อย	อ.แม่สาย จ.เชียงราย

จำนวนไฮโซเลตของราที่แยกได้ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนรากตัวอย่าง พบว่าคณะผู้วิจัยไม่สามารถแยกรา *Rhizoctonia* จากรากกล้วยไม้ที่เก็บจากสวนกล้วยไม้หรือตลาดต้นไม้ส่วนใหญ่ (ตารางที่ 4-1 และ 4-2) เอื้องพญาไร้ใบคอกที่ให้รา *Rhizoctonia* จำนวน 4 ไฮโซเลต และเอื้องมณีน้อยที่ให้รา *Rhizoctonia* จำนวน 1 ไฮโซเลตเป็นกล้วยไม้ที่ขึ้นตามธรรมชาติ Kummuang 1997 รายงานว่ายาฆ่าราหลายชนิดมีผลยับยั้งการเจริญของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ และจากการสอบถามผู้ประกอบการและผู้ดูแลสวนกล้วยไม้ที่ไปเก็บตัวอย่าง พบว่าการปลูกกล้วยไม้เชิงพาณิชย์ต้องใช้ยาฆ่าราในปริมาณมากเพื่อควบคุมโรคต่างๆ ที่เกิดจากเชื้อรา คณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่า การใช้ยาฆ่าราอาจเป็นสาเหตุทำให้ peloton ที่เห็นในรากกล้วยไม้ที่เก็บมาจากสวนกล้วยไม้ส่วนใหญ่นั้น เป็น peloton ของราที่ตายแล้ว

4.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

รากกล้วยไม้ไฮโซเลตที่รายงานในตารางที่ 4-3 มีลักษณะของ *Rhizoctonia* ชัดเจน (ภาพที่ 4-1) คือ 1) มีการแตกแขนงของเส้นใยเป็นมุมฉาก 2) มีรอยคอดในบริเวณที่เส้นใยแตกแขนง 3) แขนงเส้นใยมีผนังกัน (septum) ใกล้จุดกำเนิด 4) มักมีการสร้างเซลล์สั้น ๆ กลม ๆ ที่เรียกว่า moniloid cells ต่อกันเป็นลูกโซ่ และ 5) ไม่พบการการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของรากกล้วยไม้ไฮโซเลตที่เลี้ยง รากกล้วยไม้ไฮโซเลตที่พบมีผนังกันเส้นใยตามขวาง (septate hypha) และมีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส (binucleate) ในเซลล์บริเวณปลายของเส้นใย



ภาพที่ 4-1 ลักษณะของรา *Rhizoctonia* (A) การแตกแขนงของเส้นใย (B) moniloid cells

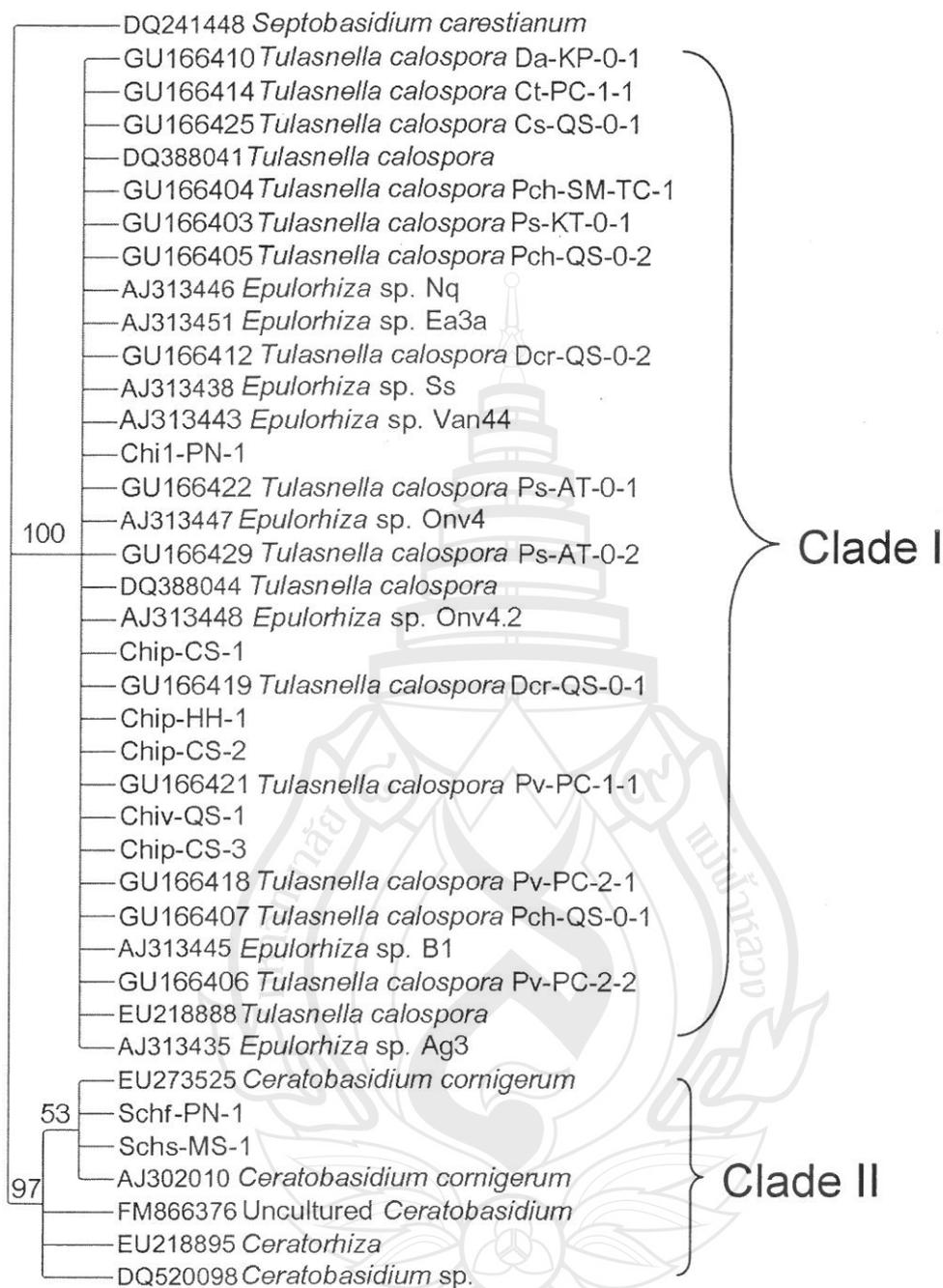
4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8SrDNA (internal transcribed spacer and 5.8S ribosomal DNA) ของราที่แยกได้จากโครงการวิจัยนี้ แสดงไว้ในภาคผนวก ก การใช้ BLAST searches เพื่อค้นหาชนิดหรือไอโซเลตของราที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ใกล้เคียงกับราที่พบจากฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของราทั้ง 6 ไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ (Chip-CS-1, Chip-CS-2, Chip-CS-3, Chip-HH-1, Chi1-PN-1) คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของ *Epulorhiza repens* หรือชื่อ teleomorph คือ *Tulasnella calospora* มากที่สุด โดยมี sequence identity อยู่ระหว่าง 88% ถึง 98% (ดูตารางที่ 4-4) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของรา 2 ไอโซเลต (Schf-PN-1 และ Schs-MS-1) ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องจิว มีความคล้ายคลึงกับราสกุล *Ceratobasidium* มากที่สุด โดยมี sequence identity 85% หรือ 87% (ดูตารางที่ 4-4)

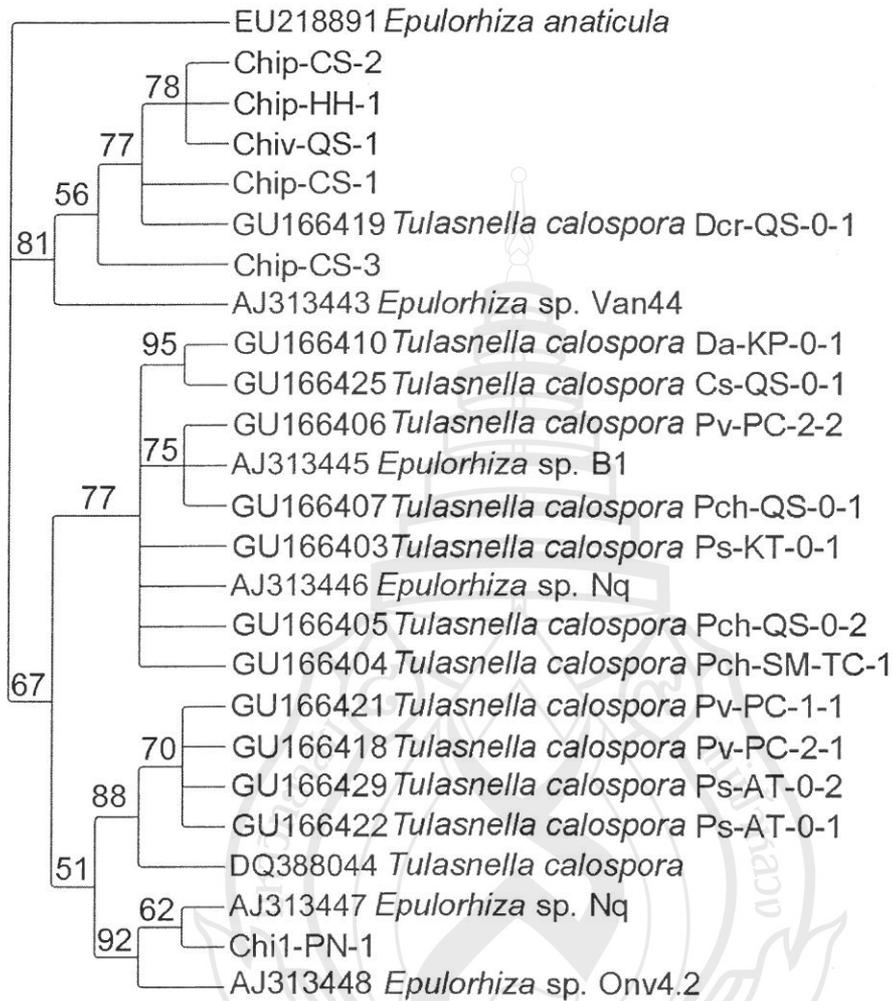
การวิเคราะห์ maximum parsimony (MP) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5.8S rDNA (ภาพที่ 4-1) แบ่งไอโซเลตของราที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ออกเป็น 2 clade หลัก (Clade I และ II) โดยมีค่า bootstrap สนับสนุนมากกว่า 70% Clade I ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราทั้ง 6 ไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *E. repens* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. calospora* ส่วน clade ที่ 2 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของรา 2 ไอโซเลต ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องจิวและลำดับนิวคลีโอไทด์ของรา *Ceratorhiza* sp. และ *Ceratobasidium* spp. ข้อมูลจากการวิเคราะห์ MP จึงสอดคล้องกับข้อมูลจาก BLAST searches และยืนยันว่าราทั้ง 6 ไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบคือราชนิด *E. repens* หรือ anamorph ของ *T. calospora* ในขณะที่รา 2 ไอโซเลต ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องจิวเป็น anamorph ของราในสกุล *Ceratobasidium* ที่ยังไม่สามารถระบุชนิด

ตารางที่ 4-4 ผลของ BLAST searches โดยใส่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA (ค้นหาววันที่ 21/5/2553)

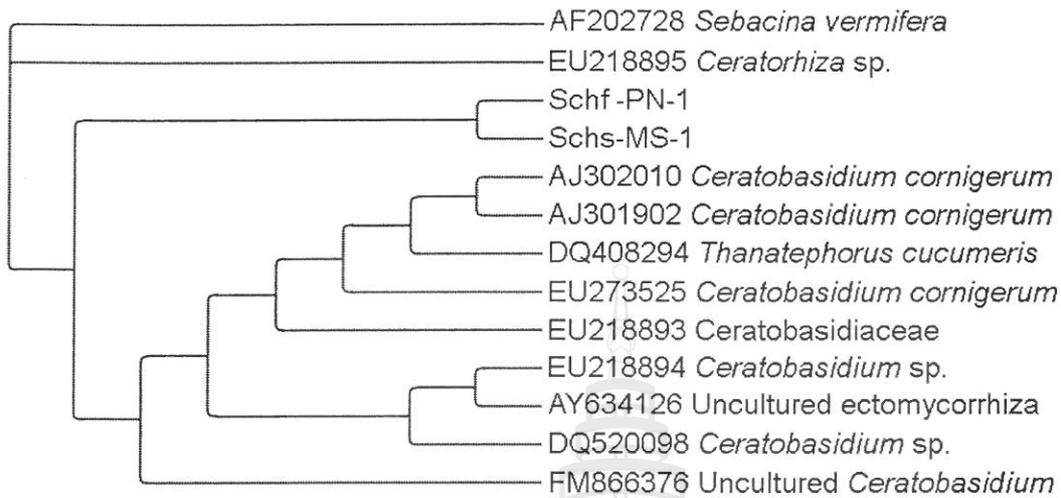
Isolate	Close relative	Percentage identity, Gaps	Reference
Chip-CS-1	GU166419 <i>Tulasnella calospora</i> isolate DCr-QS-0-1	98% (345/350), 0% (3/350)	Nontachaiyapoom et al. 2010
Chip-CS-2	GU166419 <i>Tulasnella calospora</i> isolate DCr-QS-0-1	96% (650/671), 1% (12/671)	Nontachaiyapoom et al. 2010
Chip-CS-3	GU166407 <i>Tulasnella calospora</i> isolate Pch-QS-0-1	88% (596/672), 5% (36/672)	Nontachaiyapoom et al. 2010
Chip-HH-1	GU166419 <i>Tulasnella calospora</i> isolate DCr-QS-0-1	96% (651/672), 1% (12/672)	Nontachaiyapoom et al. 2010
Chi1-PN-1	AY373281 <i>Tulasnella</i> sp. 140	97% (622/639), 0% (2/639)	McCormick et al. 2004
	AJ313448 <i>Epulorhiza</i> sp. Onv4.2	94% (593/627), 1% (12/627)	Ma et al. 2003
Chiv-QS-1	GU166419 <i>Tulasnella calospora</i> isolate DCr-QS-0-1	96% (650/672), 1% (12/672)	Nontachaiyapoom et al. 2010
Schf-PN-1	FM866376 Uncultured <i>Ceratobasidium</i>	87% (604/693), 7% (49/693)	Karpouzas et al. 2009
Schs-MS-1	DQ520098 <i>Ceratobasidium</i> sp.	85% (625/733), 5% (45/733)	Nakatani et al. (Unpublished)
	EF433959 Uncultured fungus	85% (625/734), 5% (44/734)	Taylor et al. 2007



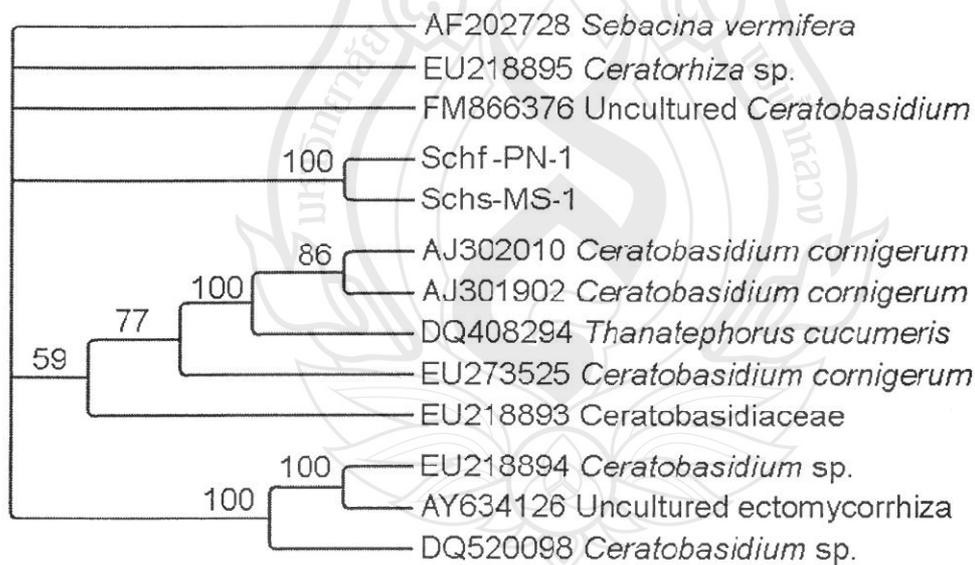
ภาพที่ 4-2 Strict consensus maximum parsimony tree จาก 1000 trees (length = 81, CI=0.864, RI=0.971) ของราทั้งหมดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ การวิเคราะห์ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5.8S rDNA ใช้ *Septobasidium carestianum* (GenBank accession number DQ241448) เป็น outgroup taxon ตัวเลขบน branch บ่งบอกถึง nodes ที่สนับสนุนโดยมากกว่า 50% ของ 1,000 bootstrap replicates ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก GenBank แสดงพร้อมกับ accession number



ภาพที่ 4-3 Strict consensus maximum parsimony tree จาก 14 trees (length = 145, CI=0.717, RI=0.835) ของราใน Clade I การวิเคราะห์ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA ใช้ *Epulorhiza anaticula* (GenBank accession number EU218891) เป็น outgroup taxon ตัวเลขบน branch บ่งบอกถึง nodes ที่สนับสนุนโดยมากกว่า 50% ของ 1,000 bootstrap replicates ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก GenBank แสดงพร้อมกับ accession



ภาพที่ 4-3 Strict consensus maximum parsimony tree จาก 1 tree (length = 606, CI=0.764, RI=0.673) ของราใน Clade II การวิเคราะห์ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA ใช้ *Sebacina vermifera* (GenBank accession number AF202728) เป็น outgroup taxon



ภาพที่ 4-4 Fifty percent majority-rule consensus tree ของ Clade II การวิเคราะห์ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA ใช้ *Sebacina vermifera* (GenBank accession number AF202728) เป็น outgroup taxon ตัวเลขบน branch บ่งบอกถึง nodes ที่สนับสนุนโดยมากกว่า 50% ของ 1,000 bootstrap replicates ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก GenBank แสดงพร้อมกับ accession numbers

รา *E. repens* หรือ *T. calospora* เป็นรา *Rhizoctonia* ที่พบมากที่สุดชนิดหนึ่ง พบทั้งในกล้วยไม้อิงอาศัยและกล้วยไม้ดินหลายชนิด (Nontachaiyapoom et al. 2010; Ma et al. 2003; Rasmussen 2002) โครงการวิจัยนี้รายงานเป็นครั้งแรกว่า พบ *E. repens* ในรากของกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ ส่วนราในสกุล *Ceratobasidium* ที่พบว่าเป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้มี 5 ชนิด พบทั้งในกล้วยไม้อิงอาศัยและกล้วยไม้ดิน โครงการวิจัยนี้รายงานเป็นครั้งแรกว่า พบ anamorph ของราสกุล *Ceratobasidium* ในรากของกล้วยไม้สกุลเอื้องจิว

การคำนวณหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสมาชิกใน Clade I โดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (reference sequence) ของราเฉพาะที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลตของราที่พบในโครงการวิจัยนี้ (ภาพที่ 4-2) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA ของรา *E. repens* จากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 มีค่า bootstrap สนับสนุน 81% ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต Chip-CS-3, Chip-CS-1, Chip-CS-2, Chip-HH-1, Chiv-QS-1, *E. repens* ไอโซเลต Van44 (Ma et al. 2002) และ *E. repens* ไอโซเลต Dcr-QS-0-1 (Nontachaiyapoom et al. 2010) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA ไอโซเลต Chip-CS-2, Chip-HH-1 และ Chiv-QS-1 น่าจะมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากกว่าทั้งสามไอโซเลตนี้กับ Chip-CS-3 และ Chip-CS-1 กลุ่มย่อยที่ 2 มีค่า bootstrap สนับสนุน 67% ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS-5.8S rDNA ของ *E. repens* ไอโซเลต Nq, B1, Onv4, และ Onv4.2 (Ma et al. 2002), *E. repens* ไอโซเลตใน Clade II subgroup 2 และ subgroup 3 ของ Nontachaiyapoom et al. 2010 และราจำนวน 1 ไอโซเลตที่แยกได้จากเอื้องพญาไร้ใบดอกสีขาว (ได้แก่ Chi1-PN-1) โดยราไอโซเลตนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *E. repens* ไอโซเลต Onv4 และ Onv4.2 โดยมี bootstrap replicates สนับสนุนสูงถึง 92% การที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA ของ *E. repens* ไอโซเลต Chi1-PN-1 แตกต่างจาก *E. repens* ไอโซเลตอื่น ๆ จากกล้วยไม้สกุลเดียวกัน น่าจะเป็นเพราะเอื้องพญาไร้ใบดอกสีขาวต้นนี้มาจากค่านสิงขร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (คุณจรรยาพร ถาวรสถิตย์สกุล, การติดต่อส่วนตัว) จึงมีวิวัฒนาการแยกจากรา *E. repens* ที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย

การคำนวณหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสมาชิกใน Clade II โดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA และเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากข้อมูลที่ Taylor and McCormick 2008 ใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของราในวงศ์ *Ceratobasidiaceae* พบว่า topology ของ strict consensus maximum parsimony tree (ภาพที่ 4-3) แตกต่างจาก 50% majority-rule consensus tree (ภาพที่ 4-4) คือ ใน strict consensus maximum parsimony tree ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรา

Ceratobasidium ชนิดหนึ่งซึ่งพบในดินบริเวณ rhizosphere (GenBank accession number FM866376; Karpouzas et al. 2009) เป็น sister taxon กับ subclade ที่ประกอบด้วยรา *Ceratobasidium cornigerum*, *Thanatephorus cucumeris*, และราในวงศ์ Ceratobasidiaceae ที่มีผู้รายงานว่าเป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ (Taylor and McCormick 2008) และ subclade ซึ่งประกอบด้วยราเหล่านี้ทั้งหมดเป็น sister taxon กับ anamorph ของรา *Ceratobasidium* ทั้ง 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องจิวจากโครงการวิจัยนี้ แต่ใน 50% majority-rule consensus tree รา *Ceratobasidium* ชนิดดังกล่าวไม่ได้เป็น sister taxon กับรา *Ceratobasidium* ที่เป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ และ anamorph ของรา *Ceratobasidium* จากโครงการวิจัยนี้ไม่ได้เป็น sister taxon กับรา *C. cornigeru*, *T. cucumeris*, และราในวงศ์ Ceratobasidiaceae ที่มีผู้รายงานว่าเป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ ดังนั้นการคำนวณความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-5.8S rDNA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถระบุตำแหน่งเชิงอนุกรมวิธาน (taxonomic placement) ของ anamorph ของรา *Ceratobasidium* ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องจิวในโครงการวิจัยนี้ แต่ข้อมูลจาก strict consensus maximum parsimony tree สอดคล้องกับข้อมูลจาก 50% majority-rule consensus tree ในแง่ที่ว่า รา *Ceratobasidium* 2 ไอโซเลตจากโครงการวิจัยนี้ มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากที่สุด และราทั้ง 2 ไอโซเลตนี้ไม่ได้มีบรรพบุรุษร่วมกับรา *Ceratorhiza goodyerae-repentis* (GenBank accession number EU218895) ที่แยกได้จากกล้วยไม้ดิน *Platanthera obtusata* (Taylor and McCormick 2008) แม้ว่า anamorph ของรา *Ceratobasidium* 2 ไอโซเลตจากโครงการวิจัยนี้ จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน of 5.8S rDNA คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนเดียวกันของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ในสกุล *Ceratobasidium* คือ 97-100% แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน of ITS1 และ ITS2 มีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างต่ำคือ มี sequence identity เพียง 68-74% ในขณะที่ *Ceratobasidium* ชนิดเดียวกัน เช่น *C. conigerum* ทั้ง 3 ไอโซเลตที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในภาพ 4-3 และ 4-4 จะมีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ ITS2 อยู่ที่ 80-83% คณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่า anamorph ของรา *Ceratobasidium* 2 ไอโซเลตจากโครงการวิจัยนี้ อาจจะเป็นราชนิดใหม่ในสกุล *Ceratobasidium* เป็นที่น่าสังเกตว่า ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ *Ceratobasidium* หลายชนิดที่มีผู้รายงานไว้เป็นราที่ไม่ได้มาจากเชื้อพันธุ์บริสุทธิ์ (ดู Figure S4; Taylor and McCormick 2008) และการที่โครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยง *Ceratobasidium* 2 ไอโซเลต น่าจะเกี่ยวข้องกับการเติม Murashige and Skoog vitamins ลงในอาหารเลี้ยง

อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการและอนุกรมวิธานของราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ในวงศ์ Ceratobasidiaceae ยังไม่ชัดเจนนัก และข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลสาธารณะเอง

ค่อนข้างจำกัด การศึกษาในอนาคตจึงควรรวมถึงการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่น ๆ และการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของราในวงศ์ Ceratobasidiaceae ที่จะใช้วิเคราะห์



บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ราที่อยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบ (*Chiloschista*) ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่คือ *Epulorhiza repens* ส่วนราที่อยู่ร่วมกับรากของกล้วยไม้สกุลเอื้องจิวในจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่ (*Schoenorchis*) คือ anamorph ของราในสกุล *Ceratobasidium* จากผลการวิจัยนี้ยังไม่สามารถบ่งบอกถึงความเฉพาะเจาะจงระหว่างชนิดของกล้วยไม้และชนิดของรา(orchid-fungus specificity) เพราะการยืนยันถึงความเฉพาะเจาะจงดังกล่าวต้องใช้รากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งที่เก็บตัวอย่างที่หลากหลายจำนวนมากกว่านี้

5.1.2 เทคนิคที่ Nontachaiyapoom et al. 2010 ใช้แยกและจำแนกชนิดของราในกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) กระระร่อน (*Cymbidium*) และรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) เหมาะสมสำหรับใช้แยกและจำแนกชนิดของราที่พบในรากกล้วยไม้สกุลเอื้องพญาไร้ใบและเอื้องจิว อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของราในสกุล *Ceratobasidium* ที่เป็นราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ค่อนข้างจำกัด จึงไม่สามารถบอกชนิดของรา *Ceratobasidium* ที่พบในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยยังพบว่าหลังจากเก็บเชื้อพันธุกรรมของ anamorph ของรา *Ceratobasidium* 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลเอื้องจิวในน้ำ ราไม่สามารถกลับมาเจริญเติบโตได้อีก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องทำการแยกรากออกมาจากกล้วยไม้สกุลนี้และยืนยันว่าเป็นชนิดเดียวกันอีกครั้ง เมื่อได้เชื้อพันธุกรรมแล้ว จะส่งเชื้อพันธุกรรมของราที่แยกได้จากโครงการวิจัยนี้ทั้งหมดไปเก็บที่ BIOTEC Culture Collection, BIOTEC Central Research Unit จังหวัดปทุมธานีต่อไป

5.1.3 เชื้อพันธุกรรมราที่แยกออกมาได้จะนำมาใช้งานวิจัยอื่น ๆ เช่น การงอกของเมล็ดกล้วยไม้โดยใช้ราไมคอร์ไรซาแทนอาหารสังเคราะห์ (symbiotic seed germination) และการศึกษาผลของราไมคอร์ไรซากกล้วยไม้ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ต่อไป

5.1.4 การจำแนกชนิดของเอื้องพญาไร้ใบที่ขึ้นตามธรรมชาติในจังหวัดเชียงราย (ได้แก่ อ. เชียงแสน และโป่งน้ำร้อนห้วยหินฝน อ.แม่จัน) ทำให้ทราบว่าเอื้องพญาไร้ใบเหล่านี้เป็นเอื้องพญาไร้ใบดอกประทั้งหมด (*Chiloschista parishii* Seidenf.) คณะผู้วิจัยยังพบว่า เอื้องจิวซึ่งมีผู้พบเห็นเป็นจำนวนมากในอำเภอเชียงแสนเมื่อหลายปีก่อนได้สูญหายไปจากบริเวณนี้แล้ว

5.1.5 โครงการวิจัยนี้ได้ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหัวหน้าโครงการวิจัยและ ดร.สันติ วัฒนฐานะ นักวิชาการของสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ องค์การสวนพฤกษศาสตร์

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะผู้วิจัยได้ร่วมกันเผยแพร่ผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 24-26 มีนาคม พ.ศ.2553 ณ โรงแรมโลตัส ปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ และคณะผู้วิจัยกำลังเตรียมบทความสำหรับตีพิมพ์ต่อไป

5.2 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจากงานวิจัย

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจากงานวิจัยนี้เป็นผลกระทบทางด้านวิชาการเป็นหลัก โครงการวิจัยนี้สร้างองค์ความรู้ใหม่และขยายฐานความรู้เดิม โดยการรายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับชนิดของราที่อาศัยร่วมกับรากกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพญาไร้ใบและสกุลเอื้องจิว และหากมีการนำเชื้อพันธุราที่แยกได้ไปศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างกล้วยไม้และราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ต่อไป ก็จะช่วยให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างกล้วยไม้และราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ได้ดียิ่งขึ้น

การสร้างผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ อาจทำได้โดยการนำเชื้อพันธุราที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เพื่อลดต้นทุนจากการใช้อาหารสังเคราะห์หรือนำไปใช้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและทำให้ต้นกล้วยไม้แข็งแรง

บรรณานุกรม

วีระชัย ฌ นคร 2543. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 6. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พรีนติ้ง เฮ้าส์.

เต็ม สมิตินันท์ 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน.

สุรวิห วรรณไกรโรจน์ 2550. ข้อเสนอชุดโครงการวิจัย การพัฒนาอุตสาหกรรมส่งออกสินค้ากล้วยไม้ไทย, การประชุมระดมสมอง เรื่องแนวทางการวิจัยและพัฒนากล้วยไม้ไทยสู่ตลาดโลก, 21 กันยายน, โรงแรมโซฟิเทล เซ็นทรัล พลาซ่า, กรุงเทพฯ.

อบฉันท์ ไทยทอง 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.

Andersen, T. F. 1996. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensu lato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods. *Mycol Res* 100: 1117-1128.

Athipunyakom, P 2004. Mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: Isolation, identification and symbiotic germination. PhD thesis, Kasetsart University, Bangkok.

Athipunyakom, P., Manoch, L., and Piluek, C. 2004a. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from eleven terrestrial orchids. *Kasetsart J Nat Sci* 38: 216-228.

Athipunyakom, P., Manoch, L., Piluek, C., Artjariyasripong, S., and Tragulrung, S. 2004b. Mycorrhizal fungi from *Spathoglottis plicata* and the use of these fungi to germinate seeds of *S. plicata in vitro*. *Kasetsart J Nat Sci* 37: 83-93.

Bayman, P., Gonzalez, E. J., Fumero, J. J., Tremblay, R. L. 2002. Are fungi necessary? How fungicides effect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. *J Ecol* 90: 1002-1008.

Bidartondo, M. I., Burghardt, B., Gebauer, G., Bruns, T. D., and Read, D. J. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc R Soc Lond B* 271:1799-1806.

Brundrett, M. C. 2007. Scientific approaches to Australian temperate terrestrial orchid conservation. *Aust. J. Bot.* 55: 293-307.

Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J., and Sivasithamparam, K. 2007. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycol Res* 111: 51-61.

Cameron, D. D., Leake, J. R., and Read, D. J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol* 171: 405-416.

Cameron, D. D., Johnson, I., Leake, J. R., and Read, D. J. 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Ann Bot (Lond.)* 99: 831-834.

Cameron, D. D., Leake, J. R., and Read, D. J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol* 171: 405-416.

Carling, D. E., Pope, E. J., Brainard, K. A., and Carter, D. A. 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopathology* 89: 942-946.

Cenis, J. L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res* 84: 2380.

Currah, R. S., Smreciu, e. A., Hambleton, S. 1990. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of *Plantanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). *Can J Bot* 68: 1171-1181.

Currah, R. S., and Zelmer, C. D. 1992. A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids, and a new species in the genus *Epulorhiza*. *Rep Tottori Mycol Inst* 30: 43-59.

Fang, D., Hong-xia, L., Hui, J., and Yi-bo, L. 2008. Symbiosis between fungi and the hybrid *Cymbidium* and its mycorrhiza microstructures. *For Stud China* 10: 41-44.

Gardes, M., and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113-118.

Gebauer, G., and Meyer, M. 2003. N-15 and C-13 natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytol* 160: 209-223.

Hadley, G., and Ong, S. H. 1978. Nutritional requirements of orchid endophytes. *New Phytol* 81: 561-569.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98.

Hietala, A. M., Sen, R., and Lilja, A. 1994. Anamorphic and teleomorphic characteristics of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. isolated from the roots of nursery grown conifer seedlings. *Mycol Res* 98: 1044-1050.

Hijner, J., and Arditti, J. 1973. Orchid mycorrhizae: vitamins production by the symbionts. *Am J Bot* 60: 829.

Hong, S. G. and Jeong, W. 2002. Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis. *Mycologia* 94: 823-833.

Huang, X., and Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9: 868-877.

Johnson, T. R., Stewart, S. L., Dutra, D., Kane, M. E., and Richardson, L. 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)-preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tissue Culture* 90: 313-323.

Karpouzas, D. G., Rousidou, C., Papadopoulou, K. K., Bekris, F., Zervakis, G. I., Singh, B. K., and Ehaliotis, C. 2009. Effect of continuous olive mill wastewater applications, in the presence and absence of nitrogen fertilization, on the structure of rhizosphere-soil fungal communities. *FEMS Microbiol. Ecol* 70: 388-401.

Kristiansen, K. A., Freudenstein, J. V., Rasmussen, F. N., and Rasmussen, H. N. 2004. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Mol Phylogenet Evol* 33: 251-258.

Kummuang, N. 1997. Effect of some fungicides on mycorrhizae in ground orchids. *Khon Kaen Agriculture Journal* 25: 139-145.

Kummuang, N., Manoch, L., Piluek, C., and Athipunyakom, P. 2000. Isolation and identification of orchid mycorrhizae. *Proceedings of the 38th Kasetsart University Annual Conference*, 1-4 February, Kasetsart University, Bangkok, pp. 428-435.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

Leake, J. R. 2004. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ecto-mycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr Opin Plant Biol* 7: 422-428.

Lekshmi, S. N., Tan, T. K., and Loh, C. S. 2000. Effects of mycorrhizal infection on different stages of tissue-cultured *Dendrobium sonia*. Proceedings of the International Symposium on *Rhizoctonia*, 17-20 August 2000, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.

Ma, M., Tan, T. K., and Wong, S. M. 2003. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. *Mycol Res* 107: 1041-1049.

Manoch, L., Athipunyakom, P., and Tanticharoen, M. 2000. *Rhizoctonia*-like fungi associated with terrestrial orchid in Thailand. Proceedings of the 3rd International Symposium on *Rhizoctonia*, 17-20 August, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.

McCormick, M. K., Whigham, D. F., and O'Neill, J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytol* 163: 425-438.

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

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., and Manoch, L. 2010. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. *Mycorrhiza*. DOI 10.1007/s00572-010-0297-3.

Otero, J. T., Ackerman, J. D., and Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *Am J Bot* 89: 1852-1858.

Otero, J. T., Flanagan, N. S., Herre, E. A., Ackerman, J. D., Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Am J Bot* 94: 1944-1950.

Pereira, O. L., Kasuya, M. C. M., de Lima Rollemberg, C., and Borges, A. C. 2005. *In vitro* symbiotic seed germination of *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) by *Rhizoctonia*-like mycorrhizal fungi. *Rev Bras Cienc Solo*, 29: 199-206.

Rasmussen, H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 244: 149-163.

Sangthong, S., and Smitamana, P. 2002. Screening of effective mycorrhizal fungi for *in vitro* grown *Dendrobium scabrilingue* Lindl. plantlets. Proceedings of the 1st International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease, 5-8 November, Chiang Mai Thailand, p. 111.

Seidenfaden, G. 1988. Orchid Genera in Thailand XIV. Fifty-nine vandoid Genera. *Opera Botanica* 95: 168-181.

Selosse, M-A., Faccio, A., Scappaticci, G., and Bonfante, P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microb Ecol* 47: 416-426.

Shefferson, R. P., Taylor, D. L., Welß, M., Garnica, S., McCormick, M. K., Adams, S., et al. 2007. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution* 61: 1380-1390 DOI:10.1111/j.1558-5646.1007.00112.x.

Shefferson, R. P., Welß, M., Kull, T., and Taylor, L. 2005. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Mol Ecol* 14: 613-626.

Shimura, H., Sadamoto, M., Matsuura, M., Kawahara, T., Naito, S., and Koda, Y. 2009. Characterization of mycorrhizal fungi isolated from the threatened *Cypripedium macranthos* in a northern island of Japan: two phylogenetically distinct fungi associated with the orchid. *Mycorrhiza*. DOI: 10.1007/s00572-009-0251-4.

Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. *Identification of Rhizotonia species*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.

Stewart, S. L., and Kane, M. E. 2006. Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86: 159-167.

Stewart, S. L., and Zettler, L. W. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany* 72: 25-35.

Swann, E. C., and Taylor, J. W. 1993. Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* 85: 923-936.

Swofford, D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland.

Suarez, J. P., Weiss, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., and Kottke, I. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol Res* 110: 1257-1270.

Taylor, D. L., Herriott, I. C., Long, J., and O'Neill, K. 2007. TOPO TA is A-OK: a test of phylogenetic bias in fungal environmental clone library construction. *Environ. Microbiol.* 9: 1329-1334.

Taylor, D. L., and McCormick, M. K. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytol* 177: 1020-1033.

Warcup, J. H. and Talbot, P. H. 1967. Perfect state of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytol* 66: 631-641.

Wang, C. L., Chu, J. N., Chen, C. Y., and Chao, Y. C. 2000. Influence of orchid mycorrhizal fungi *Rhizoctonia* spp. on the growth of *Oncidium* Goldiana X *Oncidium* Guiana Gold seedlings. Proceedings of the International Symposium on *Rhizotonia*, 17-20 August, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic, San Diego, pp. 315-322.

Wilmotte, A., van de Peer, Y., Goris, A., Chapelle, S., de Baere, R., Nelissen, B., Neefs, J. M., Hennebert, G. L., and de Wachter, R. 1993. Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal subunit RNA sequence analysis. *System Appl Microbiol* 16: 436-444.

Zelmer, C. D., and Currah, R. H. 1995. *Ceratorhiza penacatena* and *Epulorhiza calendulina* spp. Nov.: mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. *Can J Bot* 73: 1981-1985.

Zettler, L. W., and McInnis, T. M. J. 1992. Propagation of *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer, and endangered terrestrial orchid, through symbiotic seed germination. *Lindleyana* 7, 154-161.

Zettler, L. W., Poulter, S. B., and McDonald, K. I. 2007. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *HortScience* 42: 135-139.



ภาคผนวก

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S rDNA ของราที่แยกได้

>Chip-CS-1 (347 bp)

GTCTCCGTCGTCCGCCGGACGTTAAGCTGCTCTGGTCGAGGATAAACGACCCCTCTG
ACCGAGGCTAATCCGTCGTCCCGTGTTACCGTCCGGCACACGTTAAAGAGCGTTCC
GCGTTGTGAGTCTCGATCCAATCGGTGATAACAAATCGTTTACAACCGGTAGCGATG
GATCCCTTGGCACGTCATTTCGATGAAGACCGTTGCAAATTGCGATAAAGTGATGTGA
TGCGCAAGTCCACCACTTATACGTGAATCATCGAGTTGTTGAACGCATTGCACCGCG
CCCTAAACCGGCTGCGGTATGCCCCCTTGAGCGTCATTGCATACCTTCGGGAGTCTTT
TTTT

>Chip-CS-2 (695 bp)

CCATTTAGAGGAAGTACAAGTCGTAACAAGGTTCCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGA
TCATAGTAATCGTCTTTGACGTTTCGCTAGTCTCCGTCGTCCGCCGGACGTTAAGCTGC
TCTGGTCGAGGATAAACGACCCCTCTGACCGAGGCTAATCCGTCGTTCCGTGTTACC
GCTCCGGCACACGTTAAAGAGCGTTCCGCGTTGTGAGTCTCGATCCAATCGGTGATA
ACAAATCGTTTACAACCGGTAGCGATGGATCCCTTGGCACGTCATTTCGATGAAGACC
GTTGCAAATTGCGATAAAGTGATGTGATGCGCAAGTCCACCACTTATACGTGAATCA
TCGAGTTGTTGAACGCATTGCACCGCGCCCTAAACCGGCTGCGGTATGCCCCCTTGA
GCGTCATTGCATACCTTCGGGAGTCTTTCTTCACTGATCGACCCGAGTTCGGAGTCCT
CGGTCCCTCGGGATCGTGTTCTCTTAGATGCATCGCGCCGATCGCCTGATGGGTACTC
TAATGCCTGAGCGTGGAGTCCCTCGGAGTCGAGATGCGCTGGACCGGGTGTCTGAAGC
CCGCGTCTCCAAGTCCAAGACGGCGTCTGCCTCTCGGTACTACAACCACATGACCTC
ATTGGGGTAGGACAACCCGCTAGACTTAAGCATATTAATCAGCGGAGGAAAAGAAA
CTAACAAGG

>Chip-CS-3 (654 bp)

TTAGAGGAAGTACAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
AGTAATCGTCTTTGACGCACGCTAGTCTCCGTCGTCTCGGGGACGTTAAGGCGCTCT
GGTCGAGGATAAACGACCCCTCTGACTGAGGCTAATCCGTCTGTCCTTCCGTGTTACCT
CTTGGCACACGTTAAAGAGCGTTCCGCGTTGTGAGTCTCTCTCGGTTGTCAAACGATC
GTTTACAACCGGTAGCGATGGATCCCTTGGCACGTCATTCGATGAAGACCGTTGCAA
ATTGCGATAAAGTGATGTGATGCGCAAGTCCACCACTTATACGTGAATCATCGAGTT
GTTGAACGCACTGCACCGCGCCCTAAACCGGCTGCGGTATGCCCTTTGAGCGTCAT
TGTCATCCTTCGGGAGTCTTTGCTTGCAAAGACCCGAGTTCGGAGTCCTCGGTCCCA
CCGTGTTCTCTCAGATGCATCGCGCCGATCGCCTTTGACGGGTTCTCTAATGCCTGAG
CGTGGAGTCTGCAAGCCGAGACGCGTCCGACCGGGCTTTGGCCTGTGTCAGCAAGT
CCGGGACGCAAGTCCGCGGTACTACAACACATGACCTCATTGGGGTAGGACAACCCG
CTAGACTTAAGCATATCAATAG

>Chip-HH-1 (666 bp)

TAGAGGAAGTACAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATA
GTAATCGTCTTTGACGTTTCGCTAGTCTCCGTCGTCCGCGGACGTTAAGCTGCTCTGG
TCGAGGATAAACGACCCCTCTGACCGAGGCTAATCCGTCTGTTCCGTGTTACCGCTCC
GGCACACGTTAAAGAGCGTTCCGCGTTGTGAGTCTCGATCCAATCGGTGATAACAAA
TCGTTTACAACCGGTAGCGATGGATCCCTTGGCACGTCATTCGATGAAGACCGTTGC
AAATTGCGATAAAGTGATGTGATGCGCAAGTCCACCACTTATACGTGAATCATCGAG
TTGTTGAACGCATTGCACCGCGCCCTAAACCGGCTGCGGTATGCCCTTTGAGCGTCA
TTGCATACCTTCGGGAGTCTTTCTTCACTGATCGACCCGAGTTCGGAGTCCTCGGTCC
CTCGGGATCGTGTTCTCTTAGATGCATCGCGCCGATCGCCTGATGGGTAATCTAATGC
CTGAGCGTGGAGTCCCTCGGAGTCGAGATGCGCTGGACCGGGTGTGCAAGCCCGCGT
CTCCAAGTCCAAGACGGCGTCTGCCTCTCGGTAATACAACCACATGACCTCATTGGG
GTAGGACAACCCGCTAGACTTAAGCATATCAATAG

>Chi1-PN-1 (651 bp)

TTAGAGGAAGTACAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
AGTAATTGTCTTTGACGTTATGTTTCCGTTCGTCCTTGGGACGTTAAGGCGCTCTGGT
CGAGGATAAACGACCCCTCTGACCGAGGTAAAGTCGTCTCTCTGTGTTACCTCTTCAC
CGAGGCACACGTAAAGATCGTTCCGCGTTGCGAGTCTACACCAGTTGTAACACTTTT
ACAACCGGTAGCGCTGGATCCCTTGGCACGTCATTTCGATGAAGACCGTTGCAAATTG
CGATAAAGTGATGTGATGCGCAAGTCCACCACTTATACGTGAATCATCGAGTTGTTG
AACGCACCGCACCGCGCCCTAACCCGGCTGCGGTATGCCCTTTGAGCGTCATTGTA
TCCCTTCGGGAGTCTTTGTCAAGGCCCGAGTTCGGAGTCCTCGGTCTTTGGATCGTGT
TCTCTCAGATGCGTCGCGCCGATCGCCTGATGGGTCACTCTAATGCCTAAGCGTGGA
GTCCCTCGGAGCCCGAAACGCGCTTGACCGGGTGATGAGCCCGCGTCGCCAAGTCCG
CACGTCCGACGTGGCGGTACTACAACGCATGACCTCATTGGGGTAGGACAACCCGCT
AGACTTAAGCATATCAATAA

>Chiv-QS-1 (666 bp)

TTAGAGGAAGTACAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
AGTAATCGTCTTTGACGTTTCGCTAGTCTCCGTTCGTCGCCCGGACGTTAAGCTGCTCTG
GTCGAGGATAAACGACCCCTCTGACTGAGGCTAATCCGTCGTTCCGTGTTACCGCTCC
GGCACACGTAAAGAGCGTTCCGCGTTGTGAGTCTCGATCCAATCGGTGATAACAAA
TCGTTTACAACCGGTAGCGATGGATCCCTTGGCACGTCATTTCGATGAAGACCGTTGC
AAATTGCGATAAAGTGATGTGATGCGCAAGTCCACCACTTATACGTGAATCATCGAG
TTGTTGAACGCATTGCACCGCGCCCTAACCCGGCTGCGGTATGCCCTTTGAGCGTCA
TTGCATACCTTCGGGAGTCTTTCTTCACTGATCGACCCGAGTTCGGAGTCCTCGGTCC
CTCGGGATCGTGTCTCTTAGATGCATCGCGCCGATCGCCTGATGGGTACTCTAATGC
CTGAGCGTGGAGTCCCTCGGAGTCGAGATGCGCTGGACCGGGTGTCGAAGCCCGCGT
CTCCAAGTCCAAGACGGCGTCTGCCTCTCGGTACTACAACCACATGACCTCATTGGG
GTAGGACAACCCGCTAGACTTAAGCATATCAATA

>Schs-PN-1 (720 bp)

AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT
AACGAATGAACGTAGAGCTGGTTGTCGCTGGCCCGCGAGGGCATGTGCACGCCTCCT
CTTTCATCCACACACACCCATGTGCACCTGTCCGACAGAGGTCCTCGCGCACTCTCTC
TCTCGGGGAGAGGAGGAGGGCTTTCGTCTGCCGTACACACACTTTATATCTCAAC
CTGAATGTCCCTGATGTGAATGCATCCAAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGG
CTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCTTGGAGCATG
CCTGTTTGAGTATCATGAAATTATCAAAGCGAGTCTTTCGTTTGCTCGATCGACTGTG
TTTTGGACTTGGAGGTCTTGAGATTACGTCTGCTCCTCCTGAATGCATTAGCTGGA
TCTCCGTAAGCTTGGTTCCACTCGGCGTGATAAGTATCCACCGCCGAGGACACTTCCG
AAAGGAGGTGGCCACGACTGCAGATGAGCCGCTTCCAATGGTCCATCGACTTGGACG
ACTACTTTATGATCTGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGA

>Schs-MS-1 (716 bp)

AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGAATGAACGTAGAGCTGGT
TGTCGCTGGCCCGCGAGGGGCATGTGCACGCCCTCCTCTTTCATCCACACACACCCAT
GTGCACCTGTCCGACAGAGGTCCTCGCGCACTCTCTCTCGGGGAGAGGAGGAGGG
CTTTCGTCTGCCATCACACACACTTTATATCTCAACCTGAATGTCCCTGATGTGAAC
GCATCCAAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCTTGGAGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAAA
TTATCAAAGCGAGTCTTTCGTTTGCTCGATTGACTGTGTTTTGGACTTGGAGGTCTTG
CAGATTCACGTCTGCTCCTCCTGAATGCATTAGCTGGATCTCCGTAAGCTTGGTTCCA
CTCGGCGTGATAAGTATCCACCGCCGAGGACACTTCCGAAAGGAGGTGGCCACGACT
GCAGATGAGCCGCTTCCAATGGTCCATCGACTTGGACGACTACTTTATGATCTGATCT
CAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGA
AACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACAA

ประวัตินักวิจัยและที่ปรึกษางานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล ดร. สุรีย์พร นนทชัยภูมิ
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
333 ตำบลท่าสุค อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 57100
- โทรศัพท์ 053 926786
- โทรสาร 053 916776
- E-mail nontachaiyapoom@yahoo.com

3. ประวัติการศึกษา

- 1991 – 1995 Bachelor of Science (First Class Honours)
Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand
Senior project: Aseptic techniques for *in vitro* culture of three species of
Lycopodium
- 1996 Master Course at Botany Department (major in Plant Physiology), Faculty of
Science, Kasetsart University, Bangkok
- 1997 – 2000 Master of Science
Department of Gene Science, Graduate School of Science, Hiroshima
University, Japan
Thesis: Scanning electron microscopic observation on the diffused centromeric
chromosome of *Drosera*
- 2003 – 2007 Doctor of Philosophy
Department of Botany/School of Integrative Biology
University of Queensland (UQ), Australia
Thesis: Expression and promoter analysis of *Glycine max* nodule autoregulation
receptor kinase gene

4. ประวัติการทำงาน

2000 – present Lecturer, School of Science, Mae Fah Luang University

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Regulation of gene expression
- Plant-microbe interaction

6. ประวัติการนำเสนอผลงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรดระบุชื่อเรื่องของผลงาน ชื่อการประชุม สถานที่ วัน เวลา ตามระบบสากล

Sasirat, S., **Nontachaiyapoom, S.**, Sawasdwanich, A. and Manoch, L. 2010. Mycorrhizal symbionts of some terrestrial orchids in Queen Sirikit Botanic Garden. Book of abstracts of the 4th Thailand Botany Conference, March 24-26, 2010, Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand, p. 148.

Taluengjit, A., Watthana, S., Hyde, K. D., and **Nontachaiyapoom, S.** 2010. Isolation and identification of endophytic fungi from roots of *Chiloschista* and *Schoenorchis* (Orchidaceae). Book of abstracts of the 4th Thailand Botany Conference, March 24-26, 2010, Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand, p.165.

Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., and Manoch, L. 2009. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from roots of three commercial orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* and *Cymbidium*. Book of abstracts of International Conference on Fungal Evolution and Charles Darwin: From Morphology to Molecules, July 9-11, 2009, Sirindhorn Science Home, Thailand Science Park, Thailand, p.61.

Gresshoff, P. M., Indrasumunar, A., **Nontachaiyapoom, S.**, Kinkema, M., Lin, Y., Jiang, Q., Li, D. X., Miyahara, A., Nguyen, C., Buzas, D., Biswas, B., Chan, P. K., Scott, P., Hirani, T., Miyagi, M., Djordjevic, M., Carroll, B. J., Men, A., and Kereszt, A. 2007. Nodulation control in legumes. Proceedings of the 15th International Conference on Nitrogen Fixation, January 21-26, 2007, Cape Town, South Africa.

Nontachaiyapoom, S., Men, A. E., Schenk, P. M., Scott, P., and Gresshoff, P. M. 2006. Expression analysis of *Glycine max* nodule autoregulation receptor kinase promoter through *GUS* and *GFP* reporter gene fusion. Proceedings of the 3rd International Conference on Legume Genomics and Genetics, April 9-13, 2006, Brisbane Convention and Exhibition Centre, Brisbane, Australia, p. 95.

Nontachaiyapoom, S., Men, A. E., Schenk, P. M., Scott, P., and Gresshoff, P. M. 2006. Analysis of *Glycine max* nodule autoregulation receptor kinase promoter through *GUS* reporter gene expression in *Lotus japonicus*. Proceedings of the Plant and Animal Genome XIV Conference, January 14-18, 2006, Town and Country Hotel, San Diego, CA, USA, p. 300.

Gresshoff, P. M., **Nontachaiyapoom, S.**, Kereszt, A., Meksem, K., and Indrasumunar, A. 2005. Functional genomics and induction and regulation of cell divisions during nodulation in legumes. Proceedings of the 10th International Congress of the Society for the Advancement of Breeding Researches in Asia and Oceania (SABRAO), Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan.

Sharp, A. and **Nontachaiyapoom, S.** 2002. The use of scientific method to enhance environmental education in Chiangrai Province, Thailand. Proceedings of the International Conference on Environmental Management: Ten Years after Rio, 22-23 October 2002, Bangi, Selangor, Malaysia. pp. 563-569.

7. ประวัติการเผยแพร่ผลงานวิจัย ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรครระบุชื่อเรื่องผลงาน ชื่อวารสาร ตามระบบสากล

Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., and Manoch, L. 2010. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* and *Cymbidium* collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. Mycorrhiza (in press), doi:10.1007/s00572-010-0297-3. (impact factor 2.205)

Kondo, K., and **Nontachaiyapoom, S.** 2008. An evidence on diffused centromeres in *Drosera* chromosomes provided by scanning electron microscopy. Chromosome Botany 3: 79-81.

Turakulov, R., **Nontachaiyapoom, S., Mitchelson, K. R., Gresshoff, P. M., and Men, A. E.** 2007. Ultra-sensitive determination of absolute mRNA amounts at attomole levels of nearly identical plant genes with high-throughput mass spectrometry (MassARRAY). Plant Cell Physiol. 48: 1379-1384. (impact factor 3.654)

Nontachaiyapoom, S., Scott, P. T., Men, A. E., Kinkema, M., Schenk, P. M., and Gresshoff, P. M. 2007. Promoters of orthologous *Glycine max* and *Lotus japonicus* nodulation autoregulation genes interchangeably drive phloem-specific expression in transgenic plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 20: 769-780. (impact factor 4.275)

Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C. D. T., **Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., and Gresshoff, P. M.** 2007. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. Nat. Protoc. 2: 948-952. (impact factor 1.671)

Nontachaiyapoom, S., Inaga, S., Iino, A., and Kondo, K. 2000. Ultrastructure of chromatin organization in diffused-centromeric chromosomes of *Drosera* as compared with localized-centromeric chromosomes of *Drosophyllum* (Droseraceae) detected by scanning electron microscopy. Chromosome Sci. 4: 75-85.

8. ผลงานวิจัยที่ได้รับการจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา หรือผลงานวิจัยที่อยู่ระหว่างการยื่นขอจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา

9. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและต่างประเทศ โดยระบุตำแหน่งหน้าที่ในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย และระบุสถานภาพของงานวิจัยด้วย

ชื่อโครงการ การแยกและตรวจสอบชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาในรากกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี หวายและชิมบิเดียม

ตำแหน่ง หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้ให้ทุน สกว. และสกอ.

ผู้ร่วมวิจัย นางสาวสาวิตรี สระศรีรัตน์ สังกัดสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

สถานภาพ กำลังอยู่ระหว่างดำเนินการ (พ.ศ. 2551-2553)

ชื่อโครงการ โครงการวิจัยการฟื้นฟูแหล่งอาหารและความหลากหลายทางชีวภาพของชุมชน จ. เชียงราย ปีงบประมาณ พ.ศ.2553

ตำแหน่ง หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้ให้ทุน สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)

ผู้ร่วมวิจัย ดร.ปรัชญา ศรีสง่า และนางสาววาสนา คำกวน

สถานภาพ กำลังอยู่ระหว่างดำเนินการ

6. ประวัติการนำเสนอผลงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรราระบุชื่อเรื่องของผลงาน ชื่อการประชุม สถานที่ วัน เวลา ตามระบบสากล

Taluengjit, A., Watthana, S., Hyde, K. D., and **Nontachaiyapoom**, S. 2010. Isolation and identification of endophytic fungi from roots of *Chiloschista* and *Schoenorchis* (Orchidaceae). Book of abstracts of the 4th Thailand Botany Conference, March 24-26, 2010, Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand, p.165.

Watthana, S. 1997. A Study on Herbal Medicinal Plant Used for Making Spiritual Liquor in Northern Thailand. A presentation given at the Biodiversity Research and Training Programme Conference, during 13-15 October, 1997, at Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Watthana, S. 2002. *Pomatocalpa naevata* J.J.Sm.-Ecology and Population Structure in Southeastern Thailand. A poster presentation given at International Seidenfaden Orchid Symposium: Orchid biology and conservation 1-4 December 2002. Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai. Thailand.

Watthana, S. 2004. Conservation Biology of *Pomatocalpa* (Orchidaceae) : Biogeographic and ecological factors. A poster presentation given at Flora Malesiana symposium 20-24 September 2004. Los Banos. Philippines.

Watthana, S. 2008. Ericaceae of Thailand (oral presentation). 14th Flora of Thailand Meeting. 17-21 August 2008. Copenhagen.

7. ประวัติการเผยแพร่ผลงานวิจัย ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรตระบุชื่อเรื่องผลงาน ชื่อวารสาร ตามระบบสากล

Roy, M., Watthana, S., Stier, A., Richard, F., Vessabutr, S., and Selosse, M-A. 2009. Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biology* 7:51, doi10.1186/1741-7007-7-51.

Watthana, S. 1998. A Study on Herbal Medicinal Plant Used for Making Spiritual Liquor in Northern Thailand, The Botanical Garden Organization, Prime Minister's Office, 182 p. (in Thai).

Watthana, S. 1999. A Study on Trees in Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai Province. An independent study as part of M.Sc. Study, Chiang Mai University, 137 p. (in Thai).

Watthana, S. and Trisonthi, C. 1999. *Agapetes inopinata* Airy Shaw, a New Record for Thailand *Thai For. Bull. (Bot)* 27: 19-23.

Watthana, S. 2000. Taxonomy of the Genera *Agapetes* and *Vaccinium* (Ericaceae) in Thailand, M.Sc. Thesis, Faculty of Science, Chiang Mai University, 137 p. (in Thai).

Watthana, S. 2001. New species of *Agapetes* (Ericaceae) from Thailand. *Edin. Jour. Bot.* 58 (3): 423-427.

Rundel, P. W., Patterson, M, Boonpragob and Watthana, S. 2001. Photosynthesis capacity in Thai Conifers. *Nat. Hist. Bull. Siam. Soc.* 49 (2). 125-128.

Pedersen H.Æ., Watthana, S., Suddee, S. and Sarirat, S. 2004. Breeding system, post-pollination growth, and seed dispersal in *Gastrodia exilis* (Orchidaceae). *52 (1):* 9-26.

Watthana, S. 2004. Ecology and conservation biology of *Pomatocalpa naevata* J.J.Sm. (Orchidaceae). *Nat. Hist. Bull. Siam Soc.* 52(2): 201-215.

Watthana, S. 2006. The *Pomatocalpa maculosa* Complex (Orchidaceae) resolved by multivariate morphometric analysis. *Taiwania* 51(1): 44-53: (2006).

Watthana, S., Pedersen, H.A., and Suddee, S. 2006. Substrate preference, demography, and fruit set in two populations of the epiphyte *Pomatocalpa spicatum* (Orchidaceae). *Selbyana* 27(2): 165-174.

Watthana, S. Topik, H., Yukawa, T and Ito, M. 2006. Phylogeny of the genus *Pomatocalpa* Breda (Orchidaceae).-*Gard. Bull. Singapore* 58: 55-80.

Watthana, S. 2007. The genus *Pomatocalpa* (Orchidaceae) – a taxonomic monograph. –*Harvard Pap. Bot.* 11(2): 207-256.

Watthana, S. and H. A. Pedersen. 2008. Phorophyte diversity, substrate requirements and fruit set in *Dendrobium scabrilingue* (Orchidaceae): basic observations for re-introduction experiments. *Nat. Hist. J. Chulalongkorn Univ.* 8(2): 135-142.

Damapong, S., C. Tapyai and S. Watthana. 2008. *Ornithochilus yingjiangensis* Z.H. Tsi (Orchidaceae), A new record for Thailand. *Nat. Hist. J. Chulalongkorn Univ.* 8(2): 213-215.

Nanakorn, W. and S. Watthana. 2008. Thai native orchid vol. 1-2. Vanida Press. Chiang Mai.

8. ผลงานวิจัยที่ได้รับการจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา หรือผลงานวิจัยที่อยู่ระหว่างการยื่นขอจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา

9. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและต่างประเทศ โดยระบุตำแหน่งหน้าที่ในการทำการวิจัย ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย และระบุสถานภาพของงานวิจัยด้วย

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย และหัวหน้าโครงการย่อย 2 โครงการในแผนนี้

ชื่อโครงการ การอนุรักษ์กล้วยไม้แบบบูรณาการ – กรณีศึกษาฟ้ามุ่ย [Multi-disciplinary Conservation of Orchid- Case Study: Blue Vanda (*Vanda coerulea* Griff. ex Lindl.)]

โครงการย่อย 2 โครงการ ได้แก่

1. นิเวศวิทยาและชีววิทยาเพื่อการอนุรักษ์ฟ้ามุ่ย (Ecology and Biological Conservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. in Thailand)
2. การศึกษาอัตราการอยู่รอดหลังปล่อยฟ้ามุ่ยในสภาพกึ่งธรรมชาติ (Study of survival of Blue Vanda (*Vanda coerulea* Griff. ex Lindl.) after release to semi-natural condition)

ผู้ให้ทุน ศภาวิจัยแห่งชาติ งบประมาณปี 2553-2555

สถานภาพ กำลังอยู่ระหว่างดำเนินการ

