วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.1) January – April 2022 บทความวิจัย

ผลของสารสกัดราเอนโดไฟต์ต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราชในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Endophytic Fungal Extract on Seed Germination and Seedling Growth of *Aerides houlletiana* Rchb.f. (Orchidaceae) *In Vitro*

ณัฏฐา สุวัฒนชาติ[1], สายใจ ปอสูงเนิน[2] และ ธีระ ธรรมวงศา[3*]

Natta Suwattanachat, Saijai Posoongnoen[2] and Theera Thummavongsa[3*]

[1] *สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา*

[2] *สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา*

[3] *สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา*

[1]*Science Education Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University*

[2] *Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University*

[3] *Biology Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University*

Received : 2 May 2021

Revised : 30 June 2021

Accepted : 12 July 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกราเอนโดไฟต์ที่สามารถเพิ่มการงอกและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ จากกล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช ผลการศึกษาสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลท โดยสามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) ได้ตั้งแต่ 0.78-41.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำราที่สามารถผลิต IAA ปริมาณสูงที่สุดจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 10, 14 และ 03 ตามลำดับ มาสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำเลี้ยงเซลล์ และทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ พบว่าสารสกัดไอโซเลท 14 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง และมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การทดสอบการเจริญเติบโตของต้นอ่อน พบว่าอาหารที่เติมสารสกัดราไอโซเลท 10 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ต้นอ่อนมีความยาวใบสูงสุดและแตกต่างจากทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การระบุเอกลักษณ์ของราด้วยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ด้วย ITS1 และ ITS4 พบว่าราไอโซเลท 10 คือ *Colletotrichum gloeosporioides* (100% identity) และไอโซเลท 03 และ 14 คือ *Lasiodiplodia theobromae* (100% identity)

คำสำคัญ : เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช ; กรดอินโดลอะซิติก ; การแยก ; การจำแนก

Abstract

This research was purposed to isolate endophytic fungi from *Aerides houlletiana* Rchb.f. and to increase seed germination and seedling growth of this orchid by fungal. The results revealed that 19 fungal isolates were isolated and found ability to produce indoleacetic acid (IAA) content in range of 0.78-41.04 µg/mL. Three highest levels of IAA content were isolates 10, 14 and 03 respectively, and were further extracted secondary metabolites from culture broth and analyzed for the effect on seed germination and growth of the orchid. Fungal isolate 14 at 10 mg/L showed high percentages of seed germination and significant different ($p < 0.05$) compared with control. Growth of seedling exhibited that medium supplemented with 10 mg/L of fungal isolate 10 presented the highest leaf length and significant different compared with all treatments. Each fungal isolates were identified by sequencing the internal transcribed spacer (ITS): ITS1 and ITS4 regions. It indicated that the fungal isolate 10 was *Colletotrichum gloeosporioides* (100% identity). Whilst, fungal isolate 03 and 14 were *Lasiodiplodia theobromae* (100% identity).

Keywords : *Aerides houlletiana* Rchb.f. ; indoleacetic acid ; isolation, identification

***Corresponding author. E-mail :** theera.t@nrru.ac.th

บทนำ

กล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช (*Aerides houlletiana* Rchb.f.) เป็นกล้วยไม้ท้องถิ่น มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae เป็นกล้วยไม้รากอากาศอิงอาศัย ใบรูปขอบขนาน ปลายมน ช่อดอก 1-3 ช่อ มีดอก 12-20 ดอกต่อช่อ กลีบดอกสีเหลืองถึงสีส้ม ปลายกลีบแต้มสีม่วงแดง ดอกมีกลิ่นหอมแรงมากในตอนกลางวัน (Songprasert, 2016) ในสกุลนี้มีเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชเพียงชนิดเดียวที่ดอกมีสีเหลือง มีการกระจายพันธุ์ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบในป่าผลัดใบหรือป่าดิบแล้ง บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยและพบมากในจังหวัดนครราชสีมา (Sitthisatchatham, 2015) ในป่าธรรมชาติเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชมีจำนวนน้อยลงมาก สถานภาพเป็นพืชอนุรักษ์บัญชีที่ 2 ของอนุสัญญาไซเตส เป็นกล้วยไม้หายากและถูกคุกคาม (Udomsilp, 2015) เนื่องจากเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชมีความโดดเด่นคือ ดอกมีกลิ่นหอม ดอกเป็นช่อใหญ่และสีสันของดอกสวยงาม จึงเป็นที่ต้องการของผู้นิยมปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ ประกอบกับพืชวงศ์กล้วยไม้เป็นพืชที่มีเมล็ดขนาดเล็กเป็นผงคล้ายฝุ่นภายในไม่มีอาหารสะสมและใบเลี้ยงไม่เจริญ ในฝักมีเมล็ดจำนวนมาก และต้องอาศัยปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่เหมาะสมจึงทำให้เพิ่มจำนวนในธรรมชาติได้ยาก (Rasmussen, 1995; Arditti & Ghani, 2000; Zettler *et al*., 2003) จากปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นที่จะต้องมีการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ในธรรมชาติ และในเชิงพาณิชย์ให้เพียงพอกับความต้องการเพื่อช่วยลดการนำกล้วยไม้ออกมาจากธรรมชาติ ซึ่งทางเลือกหนึ่งของการขยายพันธุ์กล้วยไม้คือการเพาะเมล็ด ซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อการอนุรักษ์ เนื่องจากทำให้ได้ต้นที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและได้ปริมาณมาก (Yam & Arditti, 2009)

จากการศึกษาการเจริญของกล้วยไม้พบว่ามีราที่สามารถช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้งอกและเจริญเติบโตได้ ซึ่งราจะให้สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการงอกและเจริญเติบโตของเมล็ดกล้วยไม้ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน (amino acid) แร่ธาตุ (mineral nutrient) และวิตามิน (Rasmussen, 2002; Gebauer & Meyer, 2003; Dearnaley, 2006) โดยเฉพาะรากลุ่มเอนโดไฟต์ที่อยู่ในกล้วยไม้สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยสามารถสร้างฮอร์โมนพืช เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของพืช เช่น ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ *Vanda cristata* จำนวน 12 ไอโซเลท สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ทุกไอโซเลท และทุกไอโซเลทส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (Chand *et al,* 2020) จะเห็นได้ว่า IAA ที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์เป็นแหล่งที่น่าสนใจในการใช้ส่งเสริมการเจริญของกล้วยไม้ได้อีกทางหนึ่ง การวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาผลของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราชในสภาวะปลอดเชื้อ และเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกและเพิ่มการเจริญของเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช เพื่อเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์เอื้องกุหลาบเหลืองโคราชและกล้วยไม้ชนิดใกล้เคียงที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และคัดแยกราเอนโดไฟต์จากเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราชจากสมาคมกล้วยไม้จังหวัดนครราชสีมา ที่ต้นมีสภาพสมบูรณ์ ไม่มีการทำลายของโรคและแมลง ตัดชิ้นส่วนราก ลำต้น และใบของกล้วยไม้ แล้วล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้านนอก (surface sterile) ดัดแปลงวิธีจาก Chomchoei (2016) โดยตัดแต่ละส่วนให้มีขนาดยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำมา

ล้างน้ำกลั่นที่ผสมสารลดแรงตึงผิว 2 หยด เขย่า 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และ 5% v/v โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เขย่า 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง 70% v/v แอลกอฮอล์ เขย่า 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เขย่า 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ซับด้วยกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อให้ตัวอย่างแห้ง วางชิ้นตัวอย่างบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แยกปลายเส้นใยของราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA จานใหม่ และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งราที่แยกได้เจริญเต็มที่ สังเกตความบริสุทธิ์ของราจากสีและการเจริญของเส้นใยราที่มีความสม่ำเสมอ ไม่มีเส้นใยราอื่นหรือโคโลนีของแบคทีเรียเจือปน

2. การทดสอบการสร้าง IAA ของราเอนโดไฟต์

2.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเซลล์โดยเลี้ยงราที่แยกได้ในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นรามาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) ที่เติม L-tryptophan ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แยกน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 (เส้นใยราที่ได้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแล้วถ่ายเส้นใยราลงในขวดปราศจากเชื้อ นำไปแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องซาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์ฮอร์โมน IAA โดยปิเปตสารละลายน้ำเลี้ยงราตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Salkovski's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA แล้วคำนวณปริมาณ IAA ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Chomchoei, 2016)

2.3 การเตรียมสารสกัดน้ำเลี้ยงรา โดยนำน้ำเลี้ยงราที่มีปริมาณ IAA สูงสุด จำนวน 3 ไอโซเลท มาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท โดยผสมเอทิลอะซีเตทกับน้ำเลี้ยงราในกรวยแยกสารในอัตราส่วน 1: 2 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกเอทิลอะซีเตท ออกนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศจนได้สารสกัดน้ำเลี้ยงราเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

3 การทดสอบผลของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช

3.1 การทดสอบการงอกของเมล็ดเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช ดัดแปลงวิธีของ Houngtongkam (2017) โดยนำฝักกล้วยไม้อายุ 10 เดือน มาล้างทำความสะอาด จุ่มฝักใน 95 % v/v แอลกอฮอล์ ผ่านไฟให้ลุกท่วมทั้งฝักเพื่อทำการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นใช้มีดกรีดตามแนวยาวของฝักแล้วเขี่ยเมล็ดลงใส่จานแก้วปราศจากเชื้อ เพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารสูตร Vacin and Went (VW) ที่เติมสารสกัดจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ โรยเมล็ดลงบนอาหารสังเคราะห์ 100-200 เมล็ดต่อชุดการทดลอง เพาะเลี้ยงกล้วยไม้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อครบเวลา 3 สัปดาห์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ตามสูตรของ Chomchoei (2016)

3.2 การทดสอบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช ดัดแปลงวิธีจาก Jansang *et al.* (2017) โดยนำต้นอ่อนเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช อายุ 5 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW มาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารสกัดจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท ในปริมาณความเข้มข้น 5, 10, และ 100

มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 3 ต้นต่อขวด จำนวน 10 ซ้ำ นำไปวางไว้ในชั้นเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 24 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นอ่อน บันทึกจำนวนต้นที่รอดชีวิตต่อขวด วัดความสูงต้น ความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวราก จำนวนใบและจำนวนราก

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์โดยใช้เครื่องหมาย ITS1 และ ITS4

4.1 ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยนำเส้นใยราที่เก็บมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB method ดัดแปลงจากวิธีของ O'Donnell & Cigelnik (1997) โดยบดเส้นใยราในไนโตรเจนเหลว นำตัวอย่างที่บดได้ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมสารละลาย CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติม chloroform: isoamyl alcohol อัตราส่วน (24: 1,v/v) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แยกส่วน supernatant ออกมาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปวางในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ทิ้งส่วน supernatant จากนั้นเติม 70% v/v เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วน supernatant ทิ้ง ปล่อยให้ pellet แห้ง นาน 10 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ 0.8 % w/v gel agarose ในสารละลาย TBE buffer

4.2 การเพิ่มปริมาณส่วน ITS โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) เพิ่มปริมาณของ ribosomal DNA ส่วนของ ITS ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) และ ITS4 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (White *et al*., 1990) การทำปฏิกิริยา มีการกำหนด PCR condition ดังนี้ ชุดปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร; nanopure water 35.8 ไมโครลิตร, PCR buffer (10X) 5 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ (2.5 mM) 5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs mix (0.2 mM) 1 ไมโครลิตร 10 µM ITS1 (0.2 µM) 1 ไมโครลิตร, 10 µM ITS4 (0.2 µM) 1 ไมโครลิตร, 2 U/µl Taq DNA polymerase (0.2 units) 0.2 ไมโครลิตร, DNA template (10 ng/µl) 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาภายในเครื่อง PCR โดยใช้ PCR profile ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้นที่ 5 ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 ทั้งหมด 34 รอบ ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ใน 0.8 % w/v gel agarose ใน TBE buffer กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 40 นาที จากนั้นส่ง PCR product ที่ได้ไปอ่านลำดับเบสของ DNA โดยบริษัท Macrogen™ สาธารณะรัฐเกาหลี

4.3 ทำการตรวจสอบลักษณะและคุณภาพของลำดับเบส DNA ส่วน ITS ของราเอนโดไฟต์ โดยใช้โปรแกรม BioEdit V.7.0.9 จากนั้นนำลำดับเบสของ DNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้การค้นหาด้วยโปรแกรม BLAST (http://blast. ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

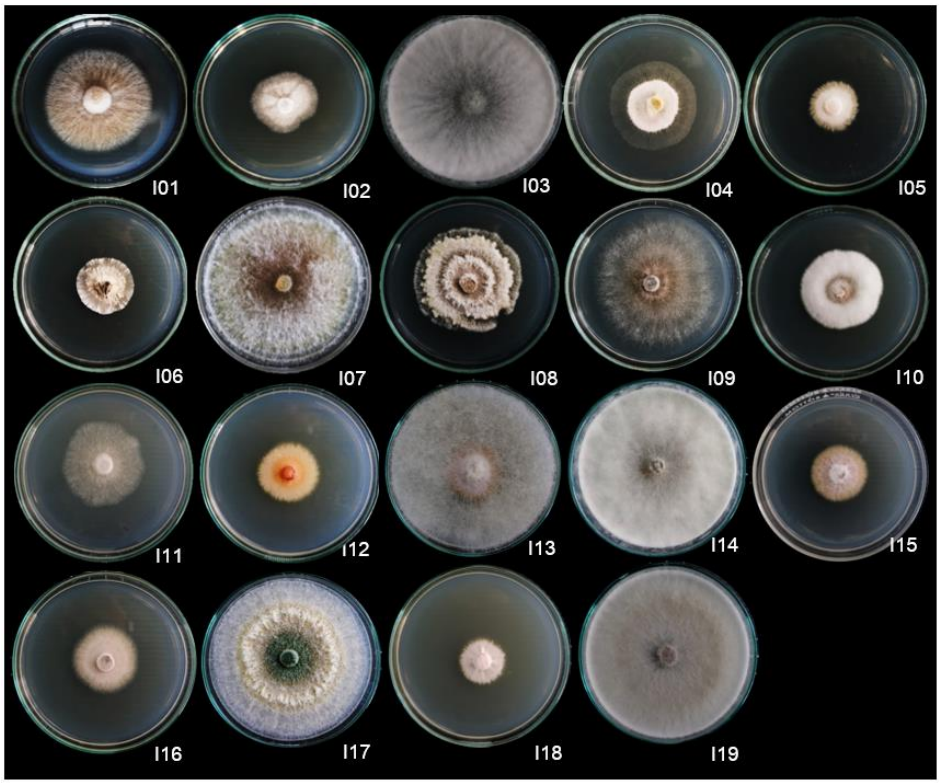
5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ศึกษา โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 26.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. การแยกราเอนโดไฟต์จากเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช

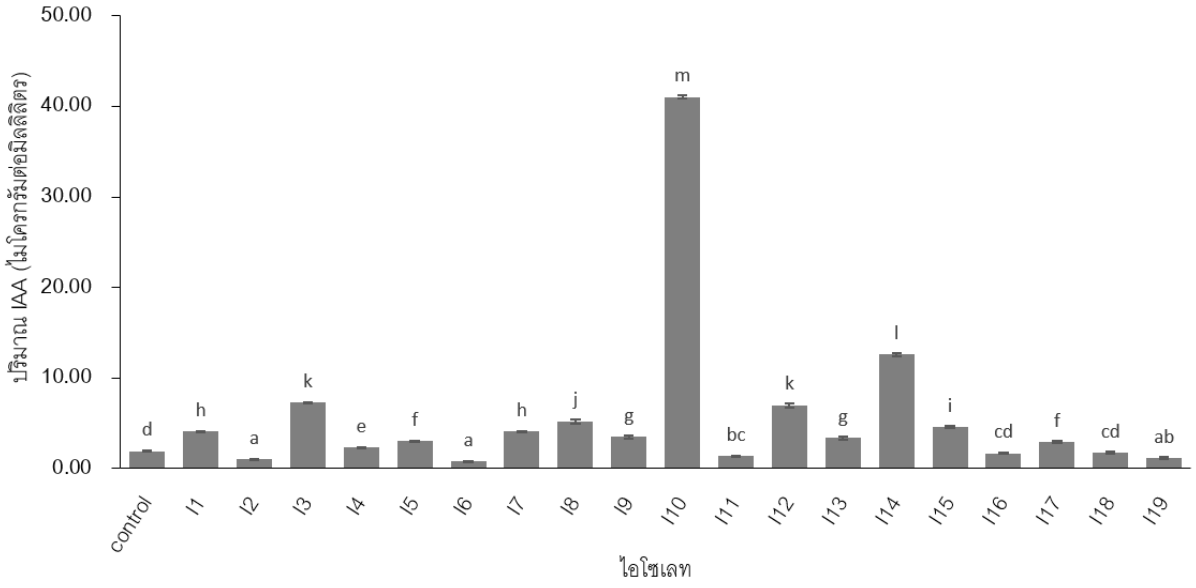
ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชจำนวน 19 ไอโซเลท มีลักษณะการเจริญเติบโตและมีสีของโคโลนีที่แตกต่างกันโดยมีเส้นใยสีขาว สีส้มถึงน้ำตาล และมีการเจริญของเส้นใยที่แตกต่างกัน สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 3 เซนติเมตร (ไอโซเลท 02, 05, 06, 12, 15 และ 18) กลุ่มที่ 2 โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 เซนติเมตร (ไอโซเลท 04, 08, 10, 11, และ 16) และกลุ่มที่ 3 โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 เซนติเมตร (ไอโซเลท 01, 03, 07, 09, 13, 14, 17 และ 19) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โคโลนีราที่แยกจากกล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราชบนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

2. การทดสอบการผลิตฮอร์โมนกลุ่ม IAA

ราเอนโดไฟต์ทั้ง 19 ไอโซเลท สามารถผลิต IAA ได้ระหว่าง 0.71-41.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ราที่สามารถสร้าง IAA ได้สูงสุด 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท 10, 14 และ 03 ซึ่งมีปริมาณ IAA ที่สร้างได้เท่ากับ 41.04, 12.56 และ 7.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปริมาณฮอร์โมน IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟต์จำนวน 19 ไอโซเลท ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งหมายถึงผลการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธี Duncan Multiple Rank Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์โดยใช้เครื่องหมาย ITS1 และ ITS4

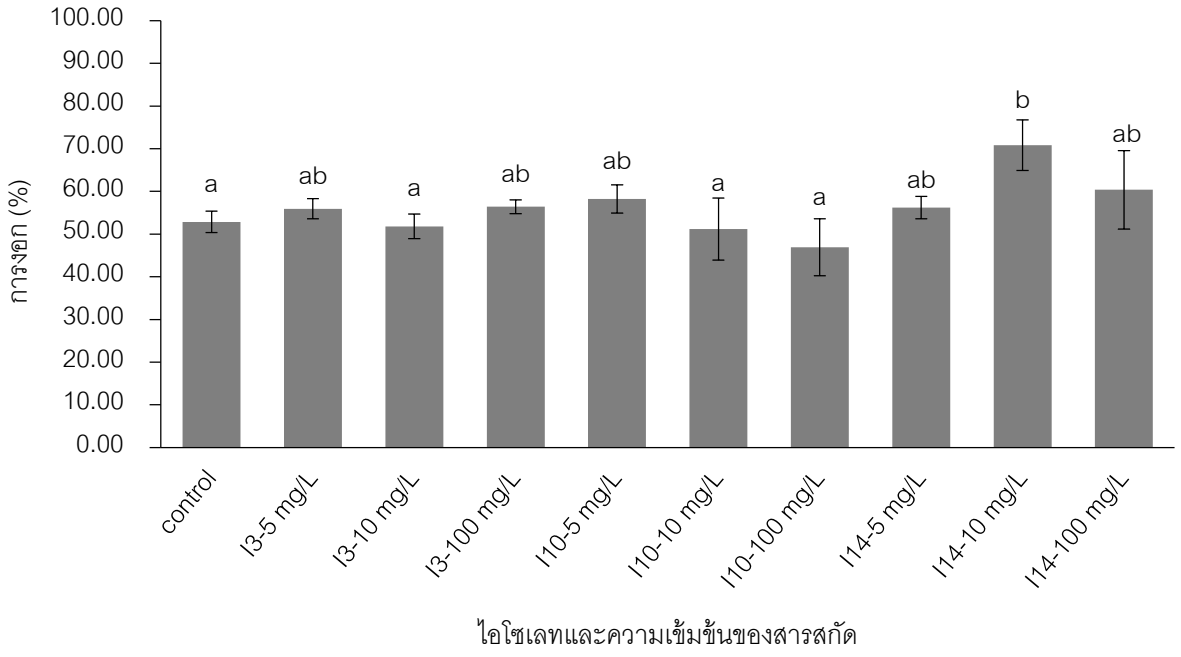
การจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของราเอนโดไฟต์ไอโซเลท 03, 10 และ 14 ลำดับเบสบริเวณ ITS (Internal Transcribe Spacer) ของ ribosomal RNA ที่ประกอบด้วยส่วนของ ITS1 และ ITS4 มีความยาว 480-520 คู่เบส จากการพิสูจน์ทางชีวโมเลกุลและนำข้อมูลลำดับเบสไปเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ของ National Center for Biotechnology information (NCBI) พบว่าไอโซเลท 03 และ 14 มีความคล้ายคลึงกับรา *Lasiodiplodia theobromae* 100 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท 10 มีความคล้ายคลึงกับรา *Colletotrichum gloeosporioides* 100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การระบุชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชโดยใช้เครื่องหมาย ITS1 และ ITS4

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity)	ผลการค้นหาในฐานข้อมูลของ NCBI (Accession no./ taxonomic affiliation)
03	100	*Lasiodiplodia theobromae* (MK036377.1)/Botryosphaeriaceae
10	100	*Colletotrichum gloeosporioides* (KX098316.1)/Glomerellaceae
14	100	*Lasiodiplodia theobromae* (MT644474.1)/Botryosphaeriaceae

4. การทดสอบผลของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ของราเอนโดไฟต์ที่ต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช

การทดสอบสารสกัดจากน้ำเลี้ยงราทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าการงอกของเมล็ดที่เติมสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มีการงอกอยู่ระหว่าง 46.89-70.82 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท 14 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังภาพที่ 3 และ ภาพที่ 4 A ถึง J)



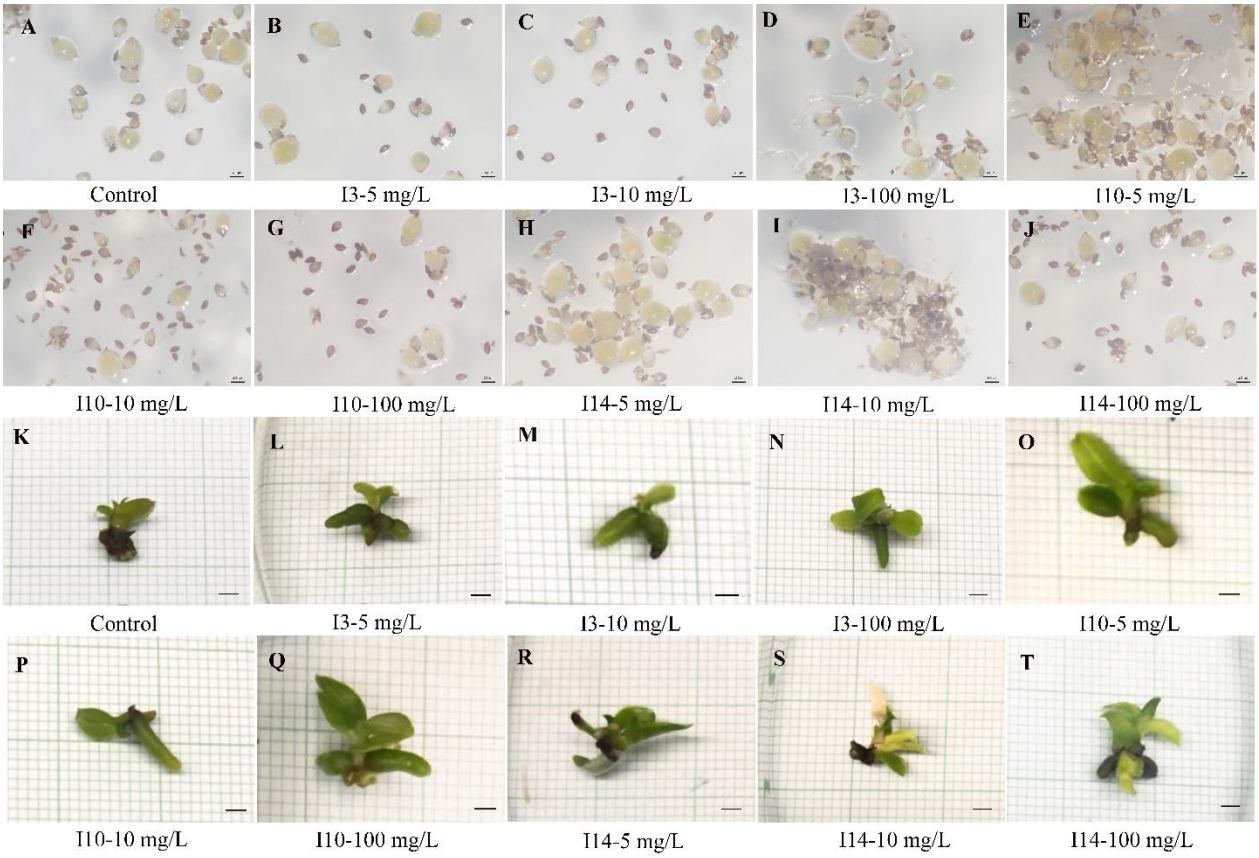
ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช บนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่เติมสารสกัดราเอนโดไฟต์ ไอโซเลท 03, 10 และ 14 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ตัวอักษรที่ ต่างกันในแนวตั้งหมายถึงผลการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

ผลของการเจริญเติบโตของเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชในอาหารสูตร VW ที่เติมสารสกัดจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าสารสกัดจากราไอโซเลท 10 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลต่อความยาวใบสูงสุดและแตกต่างจากทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าจำนวนต้นที่รอดชีวิต ความสูง จำนวนใบ ความกว้างใบ ไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง แต่จำนวนรากและความยาวราก มีแนวโน้มที่สูงเมื่อได้รับสารสกัดจากราไอโซเลท 10 ที่ความเข้มข้น 100 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 4 K ถึง T)

ตารางที่ 2 การเจริญของต้นอ่อนเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชที่เลี้ยงในอาหาร VW ที่เติมสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลท 03, 10 และ 14 เป็นเวลา 24 สัปดาห์

Treatments	จำนวนต้นที่รอดชีวิต/ขวด	ความสูง (เซนติเมตร)	จำนวนใบ	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	จำนวนราก	ความยาวราก (เซนติเมตร)
Control	1.00±0.00^{a}	0.74±0.06^{a}	2.80±0.49^{a}	0.46±0.06^{a}	0.25±0.03^{a}	1.25±0.25^{ab}	0.40±0.11^{ab}
I03-5	1.83±0.31^{a}	0.86±0.13^{a}	2.72±0.27^{a}	0.51±0.11^{a}	0.23±0.03^{a}	1.18±0.12^{a}	0.34±0.10^{ab}
I03-10	1.67±0.21^{a}	0.73±0.06^{a}	2.30±0.34^{a}	0.48±0.04^{a}	0.26±0.02^{a}	1.60±0.16^{ab}	0.35±0.06^{ab}
I03-100	1.40±0.24^{a}	0.82±0.04^{a}	1.85±0.34^{a}	0.44±0.06^{a}	0.27±0.03^{a}	1.43±0.20^{ab}	0.28±0.06^{ab}
I10-5	1.67±0.33^{a}	0.82±0.04^{a}	2.00±0.15^{a}	1.35±0.44^{b}	0.40±0.18^{a}	1.13±0.12^{a}	0.24±0.04^{a}
I10-10	1.83±0.31^{a}	0.76±0.08^{a}	2.20±0.29^{a}	0.46±0.04^{a}	0.27±0.02^{a}	1.20±0.15^{ab}	0.84±0.36^{b}
I10-100	1.75±0.48^{a}	0.75±0.08^{a}	2.86±0.40^{a}	0.42±0.07^{a}	0.24±0.04^{a}	1.80±0.37^{b}	0.31±0.09^{ab}
I14-5	1.50±0.50^{a}	0.97±0.15^{a}	2.67±0.61^{a}	0.60±0.12^{a}	0.30±0.04^{a}	1.20±0.20^{a}	0.44±0.15^{ab}
I14-10	1.67±0.33^{a}	0.99±0.20^{a}	2.40±0.68^{a}	0.67±0.14^{a}	0.27±0.05^{a}	1.00±0.00^{a}	0.19±0.05^{a}
I14-100	1.80±0.37^{a}	0.93±0.07^{a}	2.44±0.34^{a}	0.51±0.03^{a}	0.30±0.03^{a}	1.12±0.12^{a}	0.26±0.03^{ab}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งหมายถึงผลการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)



ภาพที่ 4 A ถึง J ภาพการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช ในอาหาร VW ที่เติมสารสกัดราเอนโดไฟต์ ไอโซเลท 03, 10 และ 14 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (Scale bars เท่ากับ 200 ไมโครเมตร) K ถึง T การเจริญของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่เติมสารสกัดราเอนโดไฟต์ ไอโซเลท 03, 10 และ 14 เป็นเวลา 24 สัปดาห์ (Scale bars เท่ากับ 2 มิลลิเมตร)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชจำนวน 19 ไอโซเลท มีความสามารถในการสร้าง IAA ได้แตกต่างกัน โดยสามารถผลิตได้ในความเข้มข้น 5.21-41.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งราเอนโดไฟต์ ที่มีความสามารถในการสร้าง IAA ได้ปริมาณสูงสุด 3 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลได้ดังนี้ ไอโซเลท 10 มีความคล้ายคลึงกับรา *C. gloeosporioides* 100 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นราในกลุ่ม Glomerellales วงศ์ Glomerellaceae (Ma *et al.*, 2018) ซึ่ง *C. gloeosporioides* สามารถสร้าง IAA ในปริมาณที่สูง (Chutima & Lumyong, 2012) และมีรายงานว่าราชนิด *C. gloeosporioides* สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้อย่างน้อย 109 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น sterols, terpenes, pyrones, phenolics และ fatty acids (Kim & Shim, 2019) ราไอโซเลท 03 และ 14

มีความคล้ายคลึงกับรา *L. theobromae* 100 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นราในกลุ่ม Dothideomycetes วงศ์ Botryosphaeriaceae นอกจากนี้ *L. theobromae* ยังมีความสามารถในการสร้างสารได้หลายชนิด เช่น diketopiperazines, indoles, jasmonates, melleins, lactones และ phenols (Salvatore *et al*., 2020) อย่างไรก็ตามความสามารถในการผลิต IAA นั้น ยังขึ้นอยู่กับปริมาณของ L-tryptophan ค่า pH ของอาหาร รวมไปถึงแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของเชื้อรา (Maor *et al,* 2004; Nieto-Jacobo *et al*., 2017)

จากการทดสอบสกัดสารจากน้ำเลี้ยงราต่อการงอกและการเจริญของเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช พบว่าการงอกของเมล็ดที่เติมสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลท 14 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าชุดควบคุม อาหารที่เติมสารสกัดราไอโซเลท 03 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารที่เติมสารสกัดราไอโซเลท 10 ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในสัปดาห์ที่ 2 พบว่าทุกชุดการทดลองเมล็ดมีการขยายขนาด มีสีเหลือง และโปรโตคอร์มเกิดยอดแหลมในสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nongdam & Tikendra (2014) ซึ่งพบว่าเมล็ดกล้วยไม้จะเริ่มงอกใน 2 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับฮอร์โมน นอกจากนี้เมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป๋าปิด (*Aerides ringens* Fischer) ในอาหารสูตร KC (1946) ที่เพาะเลี้ยงนาน 7 สัปดาห์ มีอัตราการงอกแตกต่างกันตามความเข้มข้นของ IAA ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยง (Pyati, 2019) การเจริญของต้นอ่อนเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชที่ 24 สัปดาห์ อาหารที่เติมสารสกัดราไอโซเลท 10 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลต่อความยาวใบต้นอ่อนเอื้องกุหลาบเหลืองโคราชสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการแยกราเอนโดไฟต์จาก ราก ลำต้น และใบของกล้วยไม้ *Vanda cristata* พบว่าราทุกไอโซเลทสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Cymbidium aloifolium* ได้ (Chand *et al.,* 2020) และราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกล้วยไม้ *Dendrobium moniliforme* จำนวน 3 ไอโซเลทสามารถผลิต IAA ได้สูง และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Rhynchostylis retusa* ได้ (Shah *et al.,* 2018) นอกจากนี้มีรายงานราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากกล้วยไม้ *Acampe praemorsa* จำนวน 5 ไอโซเลท สามารถผลิต IAA ได้ สามารถส่งเสริมการเจริญของกล้วยไม้ *Dendrobium sp.* และช่วยให้กล้วยไม้ดูดซึมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมได้ดีกว่าชุดควบคุม ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ น้ำหนักสดของต้นและน้ำหนักแห้งของใบเพิ่มขึ้น (Deepthi & Ray, 2019) ซึ่ง IAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ที่มีผลต่อการควบคุมและตอบสนองลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช เมื่อพืชได้รับในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจะมีผลกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชมีการแบ่งเซลล์มากขึ้น ช่วยให้มีการเจริญเติบโตที่ดี

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกราเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช เพื่อนำสารสกัดมาใช้ในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช สามารถคัดแยกราได้ จำนวน 19 ไอโซเลท ทดสอบและนำน้ำเลี้ยงราที่สามารถสร้าง IAA ได้ปริมาณสูงสุด 3 ไอโซเลท คือ 03, 10, 14 มาสกัดสารทุติยภูมิ และทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช พบว่าราไอโซเลท 14 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการใช้ส่งเสริมการงอกของเมล็ด และราไอโซเลท 10 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมความยาวใบของต้นอ่อนได้สูงสุด ข้อมูลการระบุชนิดด้วยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS พบว่าราไอโซเลท 10 คือ *C. gloeosporioides* และไอโซเลท 03 และ 14 คือ *L. theobromae*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยโดยบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

เอกสารอ้างอิง

Arditti, J. & Ghani, A.K.A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Physiologist, 145*, 367-421.

Chand, K., Shah, S., Sharma, J., Paudel, M.R., & Pant, B. (2020). Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid *Vanda cristata*. *Plant Signaling & Behavior, 15*(5),1-8.

Chomchoei, A. (2016). Effects of Endophytic Fungal on Seed Germination and Growth Promoting of Jasmine Rice. *The 7 th NEU National and International Conference*. (2904-2917). Bangkok: SuanSunandha University. (in Thai)

Chutima, R. & Lumyong, S. (2012). Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. *Symbiosis, 56*, 35-44.

Dearnaley, J.D.W., (2006). The fungal endophytes of Erythrorchis cassythoides - is this orchid saprophytic or parasitic. *Australas Mycol*, *25*, 51-57.

Deepthi A. S. & Ray J. G. (2019). Applications of endophytic-fungal-isolates from velamen root of wild orchids in floriculture. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, *6*(14), 577-589.

Gebauer, G., & 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.

Houngtongkam, J., Ratanasuk, S., & Promwong, R. (2017). In Vitro Seed Germination and Regeneration of *Rhynchostylis coelestis* Rchb.f. *Koch Cha Sarn Journal of Science*, *39*(1), 1-12. (in Thai)

Jansang, P., Palasarn, W., Plodsomboon, S., Sutthikhampa, S., & Pimmongkol, A. (2017). Influence of sucrose and supplement no in vitro seedling growth of Bulbophyllum putidum. *North Eastern Science and Technology Conference*. (pp 1-7). Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani University. (in Thai)

Kim, J.W. & Shim, S.H. (2019). The fungus *Colletotrichum* as a source for bioactive secondary metabolites. *Archives of Pharmacal Research*, *42*, 735-753.

Ma, X., Nontachaiyapoom, S., Jayawardena, R.S., Hyde K. D., Gentekaki, E., Zhou, S., Qian, Y., Wen, T., & Kang, J. (2018). Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and Northern Thailand. *MycoKeys*. *43*, 23-57.

Maor R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H. & Sharon, A. (2004). In Planta Production of Indole-3-Acetic Acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(3), 1852-1854.

Nieto-Jacobo, F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite M., De Souza, J.T., Juan F. Bremont J., Ohkura, M., Stewart, A. & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Frontiers in Plant science*, *8*, 1-18.

Nongdam, P. and Tikendra L. (2014). Establishment of an Efficient In Vitro Regeneration Protocol for Rapid and Mass Propagation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. Using Seed Culture. *The Scientific World Journal, 2014*, 1-8.

O'Donnell, K. & Cigelnik, E. (1997). Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 7*(1), 103-116

Pyati, A.N. (2019). *In vitro* Seed Germination, Protocorm Formation and Plantlet Regeneration in *Aerides ringens* Fisher. *Plant Tissue Cult. & Biotech, 29*(1), 49-62.

Rasmussen, H.N. (1995). Terrestrial orchids: From seed to mycotrophic plant. *Cambridge University Press*: Cambridge, 433.

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

Salvatore, M. M., Andolfi, A. & Nicoletti, R. (2020). The Thin Line between Pathogenicity and Endophytism: The Case of Lasiodiplodia theobromae. *Agriculture 2020*, *10*(488), 1-22.

Shah S., Shrestha R., Maharjan S., Selosse M.A. and Pant B. (2018). Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Endophytic Fungi from the Roots of *Dendrobium moniliforme*. *Plants 8*(5), 1-11.

Sitthisatchatham, S. (2015). *Orchid guide*. Bangkok: Sarakadee press. (in Thai)

Songprasert, J. (2016). *Beautiful life and Thai Orchids*. Chiangmai: Sangsilp. (in Thai)

Udomsilp, A., (2015). *Conservation Plants in CITES List: Orchids in the eastern forest part 2*. Bangkok: Printing Agricultural Cooperative Federation of Thailand. (in Thai)

Yam, T. & Arditti J. (2009). History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnol. 3*, 1-56.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press.

Zettler, L.W., Sharma, J. & Rasmussen, F.N. (2003). Mycorrhizal Diversity. *In Orchid conservation*, 205-226.