วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.2) May – August 2022 บทความวิจัย

ผลของราเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantean* (Lindl.) Ridl.) ต่อการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 (*Oryza sativa* L.) คะน้า (*Brassica oleracea* L.) และกล้วยไม้ช้างกระ

Effect of Endophytic Fungi from *Rhynchostylis gigantean* (Lindl.) Ridl. on Seed Germination and Seedling Development of *Oryza sativa* L., *Brassica oleracea* L. and *R. gigantean*

ธีระ ธรรมวงศา[1*] และ สายใจ ปอสูงเนิน[2]

Theera Thummavongsa[1*], Saijai posoongnoen [2]

[1] *สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา*

[2]*สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา*

[1] *Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University*

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

Received : 13 July 2021

Revised : 6 October 2021

Accepted : 25 October 2021

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantean* (Lindl.) Ridl.) ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 คะน้า และกล้วยไม้ช้างกระ ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกราได้จำนวน 8 ไอโซเลท รามีการสร้างกรดอินโดอะซิติก (IAA) อยู่ระหว่าง 0.52-2.54 µg/mL โดยไอโซเลทที่ 2 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด (2.54 µg/mL) รองลงมาคือไอโซเลทที่ 1 (1.84 µg/mL) และ 7 (0.82 µg/mL) ตามลำดับ ทำการทดสอบประสิทธิภาพของราในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าในข้าวหอมมะลิ 105 และคะน้า พบว่าการเจริญของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 ที่แช่น้ำเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยไอโซเลทที่ 2 และ 4 ให้ค่าความยาวราก (5.19 cm) และความยาวยอดสูงสุด (6.88 cm) ตามลำดับ การเจริญของต้นกล้าคะน้าพบว่า น้ำเลี้ยงราไอโซเลท 7 ให้ค่าความยาวรากสูงสุด (1.86 cm) ผลของน้ำเลี้ยงราต่อการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระพบว่าน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 1, 2, 4 และ 5 ทำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยโปรโตคอร์มมีการเกิดยอดสูงสุดในอาหารที่เติมน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 2 (45.71%) และน้ำเลี้ยงราไอโซเลท 1 ส่งผลต่อความกว้าง (0.158 cm) และความยาว (0.209 cm) ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สูงที่สุด จะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ช้างกระมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 คะน้า และกล้วยไม้ช้างกระ ซึ่งสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นสารส่งเสริมการเจริญพืชอื่นในอนาคต

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟต์ ; กล้วยไม้ ; สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ; กรดอินโดอะซิติก

Abstract

The effect of endophytic fungi from *Rhynchostylis gigantean* (Lindl.) Ridl. that has the ability to promote the seed germination and seedling development of *Oryza sativa*, *Brassica oleracea*, and *R. gigantean* was investigated and isolated. The results revealed that 8 fungal isolates were isolated from the orchid and produce indole acetic acid (IAA) content in a range of 0.52-2.54 µg/mL. The isolate 2 produced maximum levels of IAA content (2.54 µg/mL), followed by isolate 1 (1.84 µg/mL) and 7 (0.82 µg/mL), respectively. The efficiency of seed germination and seedling development of fungal isolates on *O. sativa* and *B. oleracea* seeds revealed that the growth in *O. sativa* seedlings were significantly different ($p<0.05$) between fungal isolates. Fungal isolates 2 and isolate 4 exhibited the maximum root length (5.19 cm) and shoot length (6.88 cm), respectively. The growth of *B. oleracea* seedlings showed that isolate 7 had the highest root length (1.86 cm). The effect of culture broth of fungal isolates on the development of *R. gigantean* protocorms showed that fungal isolates 1, 2, 4, and 5 showed shoot significant difference ($p<0.05$) with control. The highest percentage of shoot development (45.71%) is medium supplemented with fungal isolate 2 and isolates 1 showed the highest of width (0.158 cm) and length (0.209 cm) of protocorms. The results implied that endophytic fungi from *R. gigantean* has the efficiency to promote the seed germination and seedling development of *O. sativa*, *B. oleracea*, *R. gigantean* that could be further developed for plant growth regulator in the future.

Keywords : endophytic fungi, orchid, plant growth regulator, indole acetic acid

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

บทนำ

ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) เป็นราที่อาศัยอยู่บริเวณเนื้อเยื่อพืชแบบพึ่งพาอาศัย (mutualism) เป็นการอยู่ร่วมกันที่ทำให้รากับพืชได้ประโยชน์ร่วมกัน (Rodriguez *et al*., 2008) โดยราเอนโดไฟต์สามารถพบได้ทั่วไปในพืชทุกชนิด (Strobel, 2006) มีการศึกษาวิจัยการนำราเอนโดไฟต์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะในการจัดการควบคุมโรคพืชและแมลงทางการเกษตร (Mei *et al*., 2010) บางชนิดมีคุณสมบัติช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชและยังช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ (Rodriguez *et al*. 2009; Singh *et al*. 2011, Kaewkrajay *et al*., 2014; Wongcharoen, 2014) มีรายงานความสามารถของราเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิตสารควบคุมการเจริญของพืช (plant growth regulators) ได้ เช่น กรดอินโดอะซิติก (indole acetic acid; IAA) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน ที่มีความสำคัญต่อการเกษตรเป็นอย่างมาก โดย IAA มีคุณสมบัติในการเร่งการเจริญเติบโต กระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ และช่วยการยืดตัวของเซลล์ มีการรายงานพบราที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดสามารถผลิต IAA ได้ในปริมาณสูง เช่นใน รา *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. *Phlebia* sp. และ *Phoma* sp. (Waqas *et al*., 2012; Anuar *et al*., 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราเอนโดไฟต์มีความสามารถในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Liu *et al*., 2007; Devi *et al*., 2012) และสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียได้ (Hussan *et al*. 2014) ราบางชนิดมีความสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้เมื่อมีการเลี้ยงร่วมกัน ซึ่งเรียกว่าการเพาะเมล็ดแบบสมชีพ (symbiotic seed germination) (Yam and Arditti, 2009) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกราเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้ช้างกระที่สามารถผลิต IAA และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เพื่อพัฒนาเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกราเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้ช้างกระและการเตรียมน้ำเลี้ยงรา

นำรากกล้วยไม้มาทำความสะอาดผิวด้านนอก (ดัดแปลงจาก Naik *et al*., 2009) โดยใช้ 70% v/v เอธิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 1 นาที 5 % v/v โซเดียมไฮโปคลอไรด์ เป็นเวลา 3 นาที และ 70% v/v เอธิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ทำการคัดแยกรา (ดัดแปลงจาก Shah *et al*., 2018) โดยตัดพืชตามขวางเป็นชิ้นหนา 1-2 มิลลิเมตร ด้วยใบมีดโกนใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเพื่อตรวจสอบหาเส้นใยรา (pelotons) จากนั้นจึงวางชิ้นรากที่ถูกตัดแล้วลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin และ penicillin ความเข้มข้น 50 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกราจนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเส้นใยราบริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหาร PDA อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาด 0.5 cm เจาะราบริเวณใกล้ขอบของปลายโคโลนี จำนวน 5 ชิ้น นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวปลอดเชื้อ สูตร Czapek medium ปริมาตร 100 mL ที่เติม L-tryptophan ความเข้มข้น 200 µg/mL นำไปเลี้ยงโดยการเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน นำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1) แยกเอาเฉพาะน้ำเลี้ยงรานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบการสร้าง IAA

วิเคราะห์ปริมาณ IAA ด้วยวิธี salkowski's method (Rahman *et al*., 2010) โดยทำการดูดส่วนใส ปริมาตร 1 mL เติมลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Salkowski reagent (35% perchloric acid ปริมาตร 50 mL, 0.5 M $FeCl_3$ ปริมาตร 1 mL) ปริมาตร 2 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer นำไปบ่มในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA แล้วคำนวณปริมาณ IAA ในหน่วยของ µg/mL

3. ผลของน้ำเลี้ยงราต่อการงอกของเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 และคะน้า

นำเมล็ดข้าวและคะน้ามาแช่น้ำและคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) โดยทำการทดลองจำนวน 7 ซ้ำ ซ้ำละ 50 เมล็ด นำเมล็ดมาแช่ในน้ำเลี้ยงราเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีอาหารที่ไม่เติมราเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำเมล็ดมาเรียงบนถาดพลาสติก ที่รองด้วยกระดาษทิชชู่ แล้วเติมน้ำกลั่น 100 mL คลุมด้วยพลาสติกใส ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สังเกตการงอก วัดความยาวของรากและลำต้นเมื่ออายุครบ 7 วัน

4. ผลของน้ำเลี้ยงราต่อการงอกของกล้วยไม้ช้างกระ

เตรียมอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 150 mL/L น้ำตาล 20 g/L และผงวุ้น 8 g/L เติมน้ำเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทลงในอาหาร ปริมาตร 10 mL/L (1:100) นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที นำฝักกล้วยไม้อายุ 11 เดือน มาทำความสะอาดผิวด้านนอกโดยใช้ 10 % v/v โซเดียมไฮโปคลอไรด์ เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง และใช้มีดกรีดตามยาวของฝักในจานแก้วปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ทำการทดลองจำนวน 7 ซ้ำ ซ้ำละ 100-200 เมล็ด เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2°C บันทึกความกว้าง ความยาว และจำนวนการงอกของโปรโตคอร์ม ภายใต้กล้องสเตอริโอ เมื่ออายุครบ 16 สัปดาห์

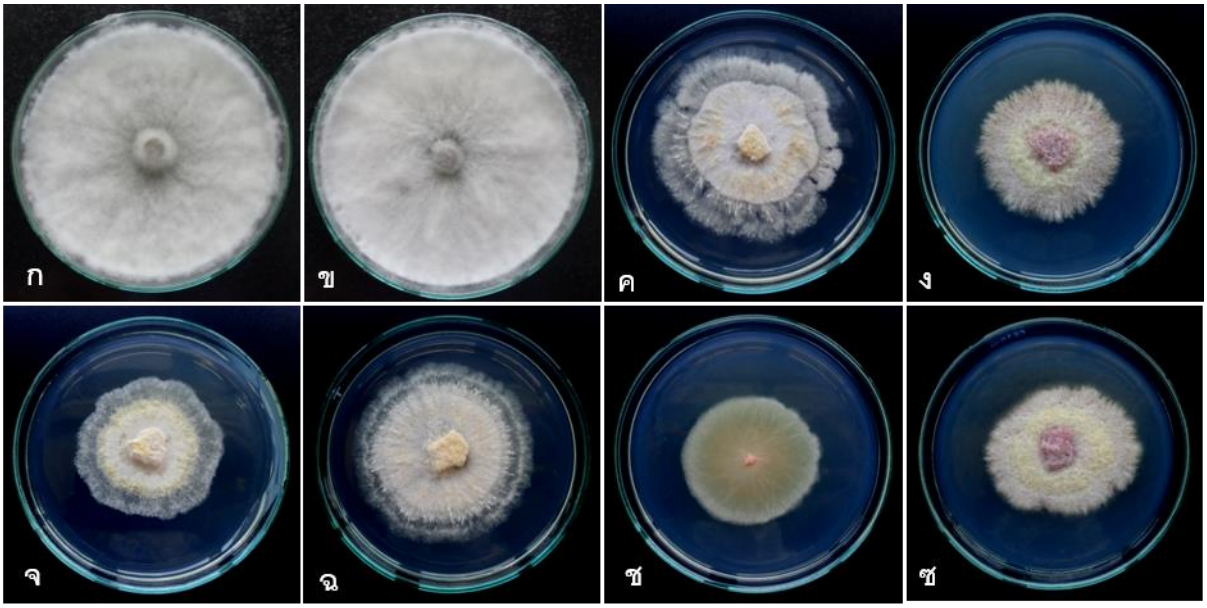
5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบจำแนกทางเดียว (one way analysis of variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของดันแคน (Duncan' s Multiple Range Test : DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกราเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้ช้างกระ

การคัดแยกราจากกล้วยไม้ช้างกระสามารถแยกได้จำนวน 8 ไอโซเลท มีลักษณะของเส้นใยที่แตกต่างกัน และเส้นใยมีสีขาว ขาวปนชมพู และเหลือง โดยมีลักษณะสัณฐานวิทยาดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การเจริญของเส้นใยราเอนโดไฟต์บนอาหาร PDA ก. ไอโซเลท 1 ข. ไอโซเลท 2 ค. ไอโซเลท 3 ง. ไอโซเลท 4 จ. ไอโซเลท 5 ฉ. ไอโซเลท 6 ช. ไอโซเลท 7 ซ. ไอโซเลท 8

2. การทดสอบการผลิต IAA

ราจากกล้วยไม้ช้างกระสามารถสร้าง IAA อยู่ระหว่าง 0.52-2.54 µg/mL โดยราที่สร้าง IAA ได้สูงที่สุดคือ ไอโซเลทที่ 2 มีปริมาณ 2.54 µg/mL รองลงมาคือไอโซเลที่ 1 และ 7 มีปริมาณ IAA เท่ากับ 1.84 และ 0.82 µg/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

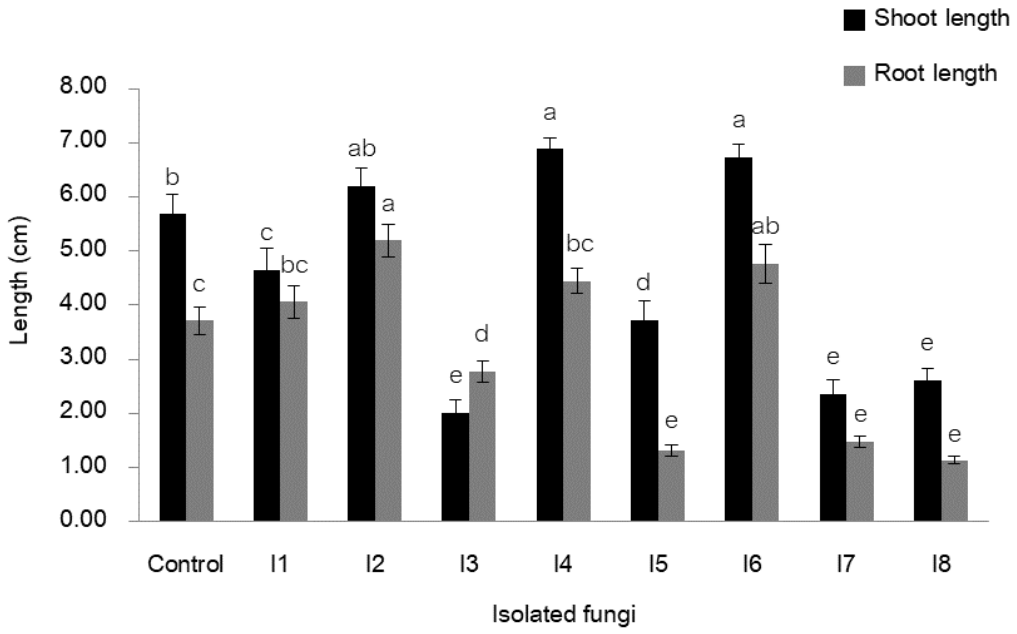
ตารางที่ 1 ปริมาณ IAA ที่พบได้ในน้ำเลี้ยงรา

ทรีตเมนต์	ปริมาณ IAA µg/mL ±SE
ไอโซเลท 1	1.84±0.07^{b}
ไอโซเลท 2	2.54±0.02^{a}
ไอโซเลท 3	0.51±0.06^{e}
ไอโซเลท 4	0.59±0.05^{de}
ไอโซเลท 5	0.72±0.09^{cd}
ไอโซเลท 6	0.62±0.01^{de}
ไอโซเลท 7	0.82±0.02^{c}
ไอโซเลท 8	0.60±0.01^{de}

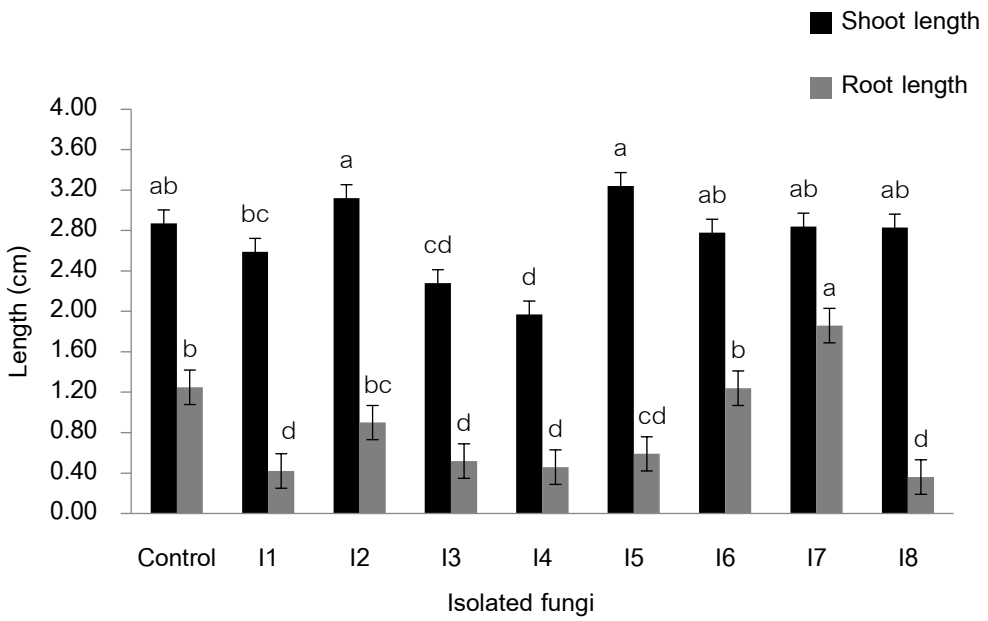
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันกำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3. ผลของน้ำเลี้ยงราต่อการเจริญของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 และคะน้า

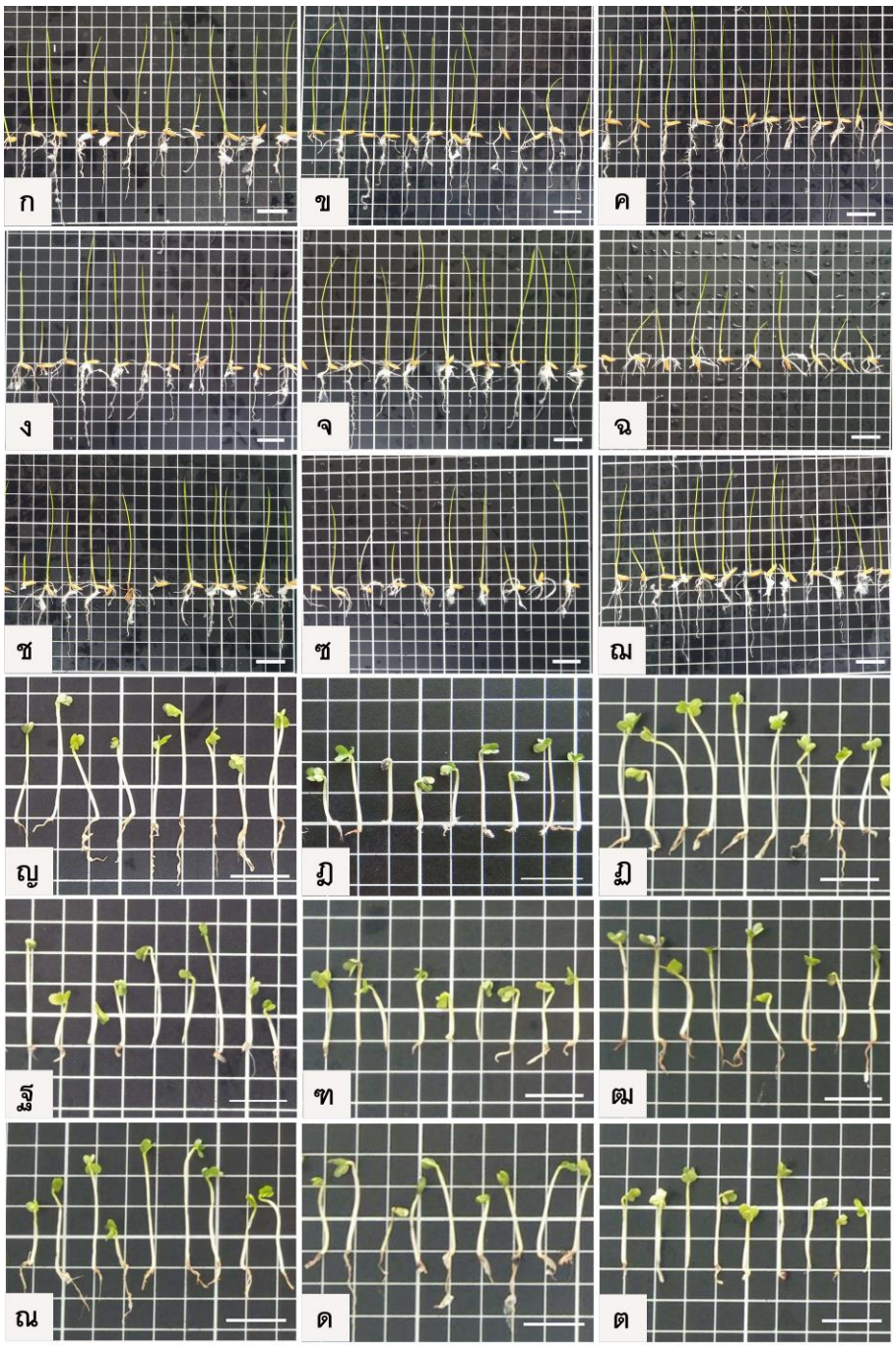
การทดสอบน้ำเลี้ยงราต่อการเจริญของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 และคะน้าพบว่าน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 2 ส่งผลต่อความยาวรากของต้นกล้าข้าวได้สูงสุด (5.19 cm) และราไอโซเลทที่ 4 สามารถส่งเสริมความยาวยอดของต้นกล้าข้าวได้สูงสุด (6.88 cm) (ภาพที่ 2) ราไอโซเลทที่ 7 สามารถส่งเสริมความยาวรากของต้นกล้าคะน้าได้สูงสุด (1.86 cm) แต่การเจริญของความยาวยอดของต้นกล้าคะน้าไม่มีความแตกต่างกันในน้ำเลี้ยงราแต่ละไอโซเลท (ภาพที่ 3) ขนาดของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 และคะน้าแสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 2 ผลของน้ำเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทต่อการเจริญของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 (ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันกำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แถบ error bar แสดงค่า SE)



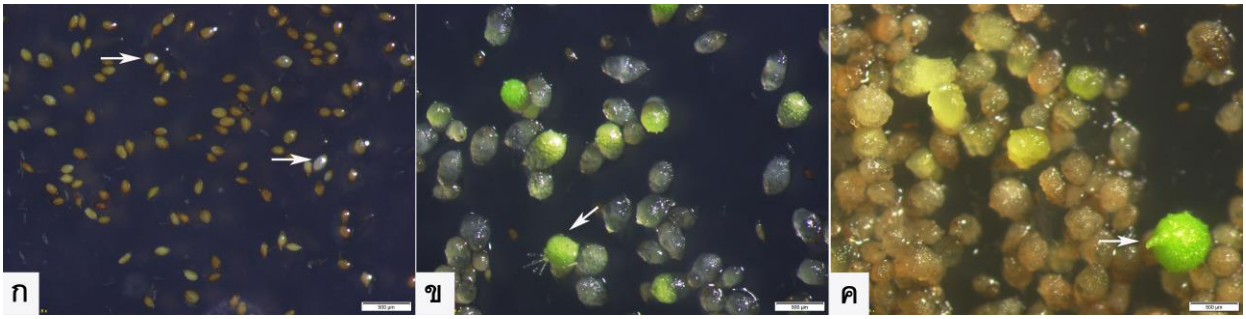
ภาพที่ 3 ผลของน้ำเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทต่อการเจริญของต้นกล้าคะน้า (ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันกำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แถบ error bar แสดงค่า SE)



ภาพที่ 4 การเจริญของต้นกล้าข้าวและคะน้าที่แช่น้ำเลี้ยงราแต่ละไอโซเลท ก-ฌ ต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 ก. ชุดควบคุม ข. ไอโซเลท 1 ค. ไอโซเลท 2 ง. ไอโซเลท 3 จ. ไอโซเลท 4 ฉ. ไอโซเลท 5 ช. ไอโซเลท 6 ซ. ไอโซเลท 7 ฌ. ไอโซเลท 8 และ ญ-ต ต้นกล้าคะน้า ญ. ชุดควบคุม ฎ. ไอโซเลท 1 ฏ. ไอโซเลท 2 ฐ. ไอโซเลท 3 ฑ. ไอโซเลท 4 ฒ. ไอโซเลท 5 ณ. ไอโซเลท 6 ด. ไอโซเลท 7 และ ต. ไอโซเลท 8 (Scale bars เท่ากับ 2 เซนติเมตร)

4. ผลของน้ำเลี้ยงราต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ

การทดสอบผลของน้ำเลี้ยงราต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ พบว่าเมล็ดกล้วยไม้เริ่มงอกเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 5ก) และมีการพัฒนารากและยอด ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 ตามลำดับ (ภาพที่ 5ข-ค) เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ เมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 1 มีการงอกสูงสุด (92.83%) และมีขนาดความกว้าง (0.16 cm) และความยาว (0.21 cm) ของโปรโตคอร์มสูงสุด (ตารางที่ 2) เมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 1, 2, 4 และ 5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของโปรโตคอร์ม แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยชุดการทดลองที่เติมน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงที่สุด (45.71%) รองลงมาคือ น้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 1 (44.86%) และ 4 (29.71%) ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติมน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 1 และ 2 ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของโปรโตคอร์ม แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ภาพที่ 6)

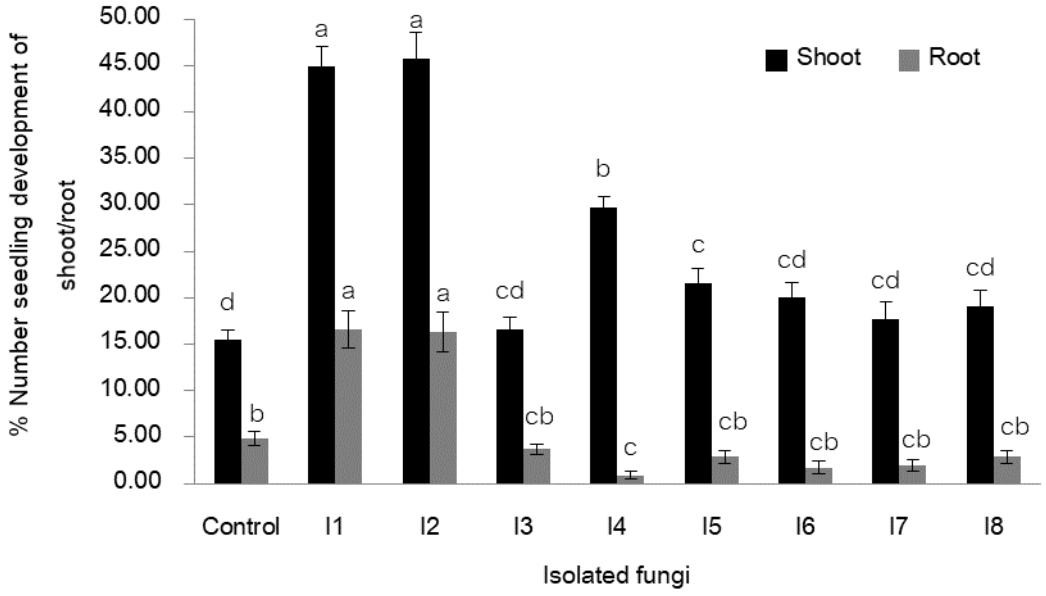


ภาพที่ 5 การงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ ก. เมล็ดกล้วยไม้เริ่มงอกเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ข. โปรโตคอร์มเริ่มพัฒนารากเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ค. โปรโตคอร์มเริ่มพัฒนายอดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (Scale bars เท่ากับ 500 ไมโครเมตร)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การงอกและขนาดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระที่เติมน้ำเลี้ยงราแต่ละไอโซเลท

Treatment	% Germination	Size of protocorms (cm)±SE (n=50)	
		width	length
I 1	92.83	0.16±0.005[a]	0.21±0.005[a]
I 2	90.33	0.13±0.006[bc]	0.19±0.006[abc]
I 3	85.66	0.12±0.005[c]	0.19±0.005[bc]
I 4	92.50	0.15±0.007[ab]	0.20±0.006[abc]
I 5	89.50	0.15±0.008[ab]	0.20±0.006[abc]
I 6	87.83	0.16±0.003[a]	0.21±0.004[ab]
I 7	89.83	0.14±0.006[bc]	0.20±0.006[abc]
I 8	90.00	0.15±0.006[ab]	0.21±0.006[ab]
Control	89.83	0.12±0.002[c]	0.18±0.002[c]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันกำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 6 ผลของน้ำเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและรากของโปรโตครอมกล้วยไม้ช้างกระ (ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันกำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แถบ error bar แสดงค่า SE)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากกล้วยไม้ช้างกระ จำนวน 8 ไอโซเลท มีความสามารถสร้าง IAA ใกล้เคียงกับราที่คัดแยกได้จากข้าว (Local aromatic rice) ในประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งมีปริมาณ IAA อยู่ในช่วง 0.63-2.65 µg/mL (Syamsia *et al*., 2015) โดย IAA เป็นฮอร์โมนกลุ่มสำคัญที่ช่วยในการเจริญในส่วนของราก และรากแขนง โดยความสามารถในการสร้าง IAA ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม tryptophan ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิต IAA ได้สูงขึ้น (Fu & Wang, 2011) การทดสอบน้ำเลี้ยงราต่อการเจริญของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 และคะน้า พบว่าความยาวของรากข้าวหอมมะลิ 105 ที่แช่ด้วยน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 2 ให้ค่าความยาวสูงสุด สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณ IAA ที่มีค่าสูงสุด และการเจริญของยอดต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 ที่แช่ในน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 7 ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าการศึกษาก่อนหน้า ที่ทดสอบการเจริญของเมล็ดข้าวกับน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากข้าวหอมมะลิ 105 ที่มีความสูง ระหว่าง 4.23-4.51 cm (Pangkam *et al*., 2016) การเจริญเติบโตของต้นกล้าคะน้าที่แช่ในน้ำเลี้ยงราไอโซเลตที่ 7 มีค่าความยาวรากแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้าได้ทดสอบราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นคะน้าโดยตรงมาเลี้ยงร่วมกับเมล็ดคะน้า พบว่าให้ผลค่าเปอร์เซ็นต์การงอก ค่าน้ำหนักสด และค่าน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง (Doungsaard *et al*., 2009) สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ว่าราที่สามารถผลิต IAA สามารถเพิ่มความสูง ความยาวราก และน้ำหนักของต้นกล้าได้ (Wongcharoen, 2014) และมีรายงานว่าราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกจากกล้วยไม้พื้นเมืองไทย มีความสามารถสร้าง IAA และสามารถส่งเสริมการเติบโตของถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) และข้าวโพดได้ (Chutima and Lumyong, 2012) โดยรากลุ่มเอนโดไฟต์เป็นราที่สำคัญที่สร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น IAA, cytokinin และยังช่วยกระตุ้นให้พืชมีการดึงแร่ธาตุที่จำเป็นไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี (Ahmad *et al*., 2010; Syamsia *et al*., 2015) อย่างไรก็ตามค่าความยาวรากในบางชุดการทดลอง มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม เนื่องจากราหลายชนิดสามารถสร้างสารควบคุมการเจริญของพืชได้หลากหลาย (Pons *et al*., 2020) และการได้รับควบคุมการเจริญของพืชในปริมาณที่ไม่เหมาะสมอาจจะมีผลยับยั้งการเจริญของพืชได้ (Novak *et al*., 2014)

การทดสอบผลของน้ำเลี้ยงราต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ พบว่ามีน้ำเลี้ยงรา 4 ไอโซเลท (ไอโซเลท 1, 2, 4 และ 5) ที่ส่งผลต่อการพัฒนายอด และมี 3 ไอโซเลท (ไอโซเลท 1, 6 และ 8) ที่ส่งผลต่อทั้งความกว้างและความยาวของโปรโตคอร์ม แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะเห็นได้ว่าราแต่ละไอโซเลทส่งผลต่อการเจริญของโปรโตคอร์มได้แตกต่างกัน ซึ่งในธรรมชาติต้นพืชจะมีราเอนโดไฟต์ที่หลากหลาย ราแต่ละชนิดสามารถสร้างสารควบคุมการเจริญของพืชและมีความเหมาะสมในแต่ละช่วงการเจริญของพืชที่แตกต่างกัน (Xia *et al*., 2019) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่คัดแยกราเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้ชนิด *Dendrobium moniliforme* สามารถผลิต IAA และส่งผลต่อการเจริญของกล้วยไม้ได้เช่นกัน (Shah *et al*., 2018) โดยในธรรมชาติเมล็ดกล้วยไม้ไม่มีส่วนของเอนโดสเปิร์ม จึงทำให้เมล็ดส่วนใหญ่ไม่งอกหากขาดรากลุ่ม Mycorrhiza ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการงอกโดยเป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon sources) และสารอนินทรีย์ (Swarts and Dixon, 2009; Wright *et al*. 2009)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ช้างกระ สามารถคัดแยกราได้จำนวน 8 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลวและทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างฮอร์โมน IAA พบว่ามีความสามารถในการสร้าง IAA อยู่ระหว่าง 0.52-2.54 µg/mL โดยมีไอโซเลทที่ 2 สามารถผลิตได้สูงสุด การทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 และคะน้าพบว่า น้ำเลี้ยงราที่ส่งผลต่อความยาวยอดและรากข้าวหอมมะลิ 105 สูงสุด คือ น้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 4 และ 2 ตามลำดับ การเจริญของเมล็ดคะน้า พบว่าเมล็ดที่แช่ในน้ำเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทให้ผลการเจริญของความยาวยอดไม่แตกต่างกัน และเมล็ดที่แช่ในน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 7 มีความยาวรากสูงสุด การทดสอบน้ำเลี้ยงราต่อการงอกและการเจริญของโปรโตครอมกล้วยไม้ช้างกระพบว่า น้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 2 ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สูงสุด และน้ำเลี้ยงราไอโซเลทที่ 1 ส่งผลต่อความกว้างและความยาวของโปรโตครอมกล้วยไม้สูงสุด จะเห็นได้ว่าน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากกล้วยไม้ช้างกระมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการศึกษาในครั้งนี้เป็นองค์ความรู้พื้นฐาน เพื่อการต่อยอดพัฒนาน้ำเลี้ยงราไปใช้ทดแทนสารควบคุมการเจริญของพืชที่ได้จากการสังเคราะห์ซึ่งมีราคาสูง เพื่อลดต้นทุนการผลิตพืชในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ โปรแกรมวิชาเคมีและโปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ทำวิจัย ขอขอบคุณคุณอังคาร คำวงษา และคุณวินัฐ จิตรเกาะ ที่ช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Ahmad, N., Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Lee, I.J. & Shin, D.H. (2010). Gibberellins-producing endophytic fungi isolated from *Monochoria vaginalis. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20*(12), 1744-1749.

Anuar, E.N., Nulit, R., & Idris, A.S., (2015). Growth promoting effects of endophytic fungus *Phlebia* GanoEF3 on oil palm (*Elaeis guineensis*) seedlings. *International journal of agriculture and biology*, *17*(1), 135-141.

Buatong, J., S. Phongpaichit, V. Rukachaisirikul, & J. Sakayaroj. (2011). Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World Journal Microbiol Biotechnology*, *27*, 3005–3008.

Buensanteai, N., Yuen, G.Y., & Prathuangwong, S. (2008). The biocontrol bacterium Bacillus Amyloliquefaciens KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of cucumber plant, *Thai J. Agric. Sci., 41*(3-4), 101-116.

Chutima, R., & Lumyong, S. (2012). Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. *Symbiosis. 56*(1), 35-44.

Devi, N.N., Prabakaran, J.J., & Wahab, F. (2012). Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from Centella asiatica. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2*(3), 1280-1284.

Doungsaard, D., Athipunyakom, P., & Seemadua, S. (2009). Enhance plant growth by using endophytic fungi. Plant Protection Research and Development Office Annual report 2009. Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture.1387-1394. Retrieved October 12, 2021, from https://www.doa.go.th/plprotect/wp-content/uploads/fullResearch/Research2552/Research2552-2.pdf

Fu, J., & Wang, S. (2011). Insights into auxin signaling in plantpathogen interactions. *Front Plant Sci., 2*, 1–7.

Hussan, H., Kliche-Spory, C., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Abbas, G., Green, I. R., & Shah, A. (2014). Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 7*(Special), 224-227.

Kaewkrajay. C., Dethoup. T., & Sathitpanawong. L. (2014). Efficacy of endophytic fungi isolated from *Sesbania javanica* against plant pathogenic funji. *Khon Kaen AGR. J., 42*(3), 271-282. (in Thai)

Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Yan, G. (2007). Antioxidant activity and phenolics of an endophytic Xylaria sp. from Ginkgo biloba. *Food Chemistry, 105*(2), 548-554.

Mei, C.X., Ling, D.H., Xing, H.K., Rong, S.Z., Juan, C., & Xing, G.S. (2010). Diversity and antimicrobial antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. *Journal of plant growth regulation, 29*(3), 328-337.

Naik, B.S., Shashikala, J., & Krishnamurthy, Y. (2009). Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. *Microbiol. Res., 164*, 290-296.

Novak, S.D., Luna, L.J., & Gamage, R.N. (2014). Role of Auxin in Orchid Development. *Plant Signal Behavior, 9*(10), 1-8.

Pangkam, P., Chaimungyong, R., & Chomchoei. A. (2016). Effects of Endophytic fungi producing Indole Acetic Acid (IAA) on Seedling and growth of jasmine rice (KDML 105). In *Proceeding 7th National & International Conference*. Suan Sunandha Rajabhat University, Thailand, 2904-2917 (in Thai)

Pons, S., Fournier, S., Chervin, C., Becard, G., Rochange S., Frey, N.F., & Pages, V.P. (2020). Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus Rhizophagus irregularis. *PLOS ONE*, *15*(10), 1-18.

Rahman, A., Sitepu, I.R., Tang, S.Y., & Hashidoko, Y. (2010). Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Biosci. Biotechnol. Biochem., 74*(11), 2202-2208.

Rodriguez, R.J., Henson, E. Volkenburgh, V.M., Hoy, L., Wright, F., Beckwith, Y.O., Kim, & Redman, R.S. (2008). Stress tolerance in plant via habitat-adapted symbiosis. *The ISME J., 2*, 404-416.

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

Strobel, G.A. (2006). Muscodor albus and its biological promise. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 33*, 514-522.

Swarts, N.D., & Dixon K.W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Ann. Bot*., *104*, 543-556.

Syamsia, S., Kuswinantib, T., Syam'unb, E., & Masniawati, A. (2015). The potency of endophytic fungal Isolated collected from local aromatic rice as indole acetic acid (IAA) producer. *Procedia food Science, 3*, 96-103

.

Vacin, E., & Went, F.W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, *110*, 605-613.

Waqas, M., Khan, A. L., Kamean, M., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., & Lee I.J. (2012). Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during stress. *Molecules, 17*(9), 10754-10773.

Wongcharoen, A. (2014). Screening of endophytic fungi from rice (*Oryza sativa* L.) against rice pathogenic fungi. *Khon Kaen AGR. J., 42*(3), 385-396. (in Thai)

Wongcharoen, A. (2014). Roles of endophytic fungi in plant disease control. *Khon Kaen AGR. J., 42*(4), 643-654. (in Thai)

Wright. S.H., Berch, S.M., & Berbee, M.L. (2009). The effect of fertilization on the below-ground diversity and community composition of ectomycorrhizal fungi associated with western hemlock (*Tsuga heterophylla*). *Mycorrhiza*. *19*, 267-276.

Xia, Y., Sahib, M.R., Amna, A., Opiyo, S.O., Zhao, Z., & Gao, Y.G. (2019). Culturable endophytic fungal communities associated with plants in organic and conventional farming systems and their effects on plant growth. *Sci. Rep*. *9*(1), 1-10.

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