ผลของไกลโฟเซตต่อการเจริญ การงอกของสปอร์ และการสร้างกรดอินโดลอะซิติกของราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกจากรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.)

Effect of Glyphosate on Mycelial Growth, Spore Germination and Indoleacetic acid-Producing of Endophytic Fungi Isolated from *Thunbergia laurifolia* Linn.

วิไลลักษณ์ โคมพันธุ์* วราภรณ์ ฉุยฉาย และ นิสิต ชำนาญเพชร

Wilailuck Khompun*, Waraporn Chouychai and Nisit Chamnanpet

สาขาวิชาชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ จ.นครสวรรค์

Biology and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Nakhonsawan Rajabhat University, Nakhonsawan

**E-mail: wililuck.k@nsru.ac.th โทร. 091-8411886*

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของไกลโฟเซตต่อการเจริญของเส้นใย การงอกของสปอร์ และการสร้างกรดอินโดลอะซิติก (IAA) ของราเอนโดไฟท์ คัดแยกจากรางจืด จำนวน 10 ไอโซเลต เมื่อทดสอบการสร้าง IAA มีเพียง 5 ไอโซเลตที่สร้าง IAA ได้ และเมื่อตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) จำแนกราเอนโดไฟท์ได้เป็น 2 ชนิด คือ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Corynespora cassiicola* ทดสอบการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ผสมไกลโฟเซตความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ความเข้มข้นของไกลโฟเซตที่เพิ่มขึ้นทำให้การเจริญของเส้นใย และสปอร์ของราทั้ง 2 ชนิด ลดลง เส้นใยของ *C. cassiicola* เจริญได้ที่ความเข้มข้น 20 และ 10 มิลลิโมลาร์ (92.32 และ 87.97 เปอร์เซ็นต์ ของชุดควบคุม) และ *C. gloeosporioides* เจริญได้ที่ความเข้มข้น 30 และ 20 มิลลิโมลาร์ (77.80 และ 76.15 เปอร์เซ็นต์ ของชุดควบคุม) ส่วนการงอกของสปอร์ ราทั้ง 2 ชนิดงอกได้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (78.55 และ 63.67 เปอร์เซ็นต์ ของชุดควบคุม) เมื่อทดสอบการสร้าง IAA ในอาหาร PDB ที่ผสมทริปโตแฟน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไกลโฟเซตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 วัน พบว่า ความเข้มข้นของไกลโฟเซตที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ปริมาณการสร้าง IAA ของราทั้ง 2 ชนิด ลดลง โดยความเข้มข้นของไกลโฟเซตที่ *C. gloeosporioides* และ *C. cassiicola* สร้าง IAA ได้มากที่สุด คือ 10 มิลลิโมลาร์ (125.0 และ 51.73 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็น 64.1 และ 52.4 เปอร์เซ็นต์ ของชุดควบคุม)

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟท์ กรดอินโดลอะซิติก ไกลโฟเซต การเจริญของเส้นใย

Abstract

The effect of glyphosate on in vitro mycelium growth, spore germination and Indoleacetic acid production (IAA) of endophytic fungi isolated from *Thunbergia laurifolia* Linn. was studied. Ten isolates of endophytic fungi were analyzed and only 5 isolates could produce IAA. They were classified as *Corynespora cassiicola* and *Colletotrichum gloeosporioides* according to the internal transcribed spacer (ITS). Their mycelium and spore were tested for growing on Potato Dextrose Agar (PDA) medium containing 10, 20, 30, 40 and 30 mM glyphosate for 7 days. The mycelium and spore growth were more inhibited when the concentration of glyphosate was increased. Mycelium of *C. cassiicola* could grow at 20 and 10 mM glyphosate (92.32 and 87.97% of control, respectively) and *C. gloeosporioides* could grow at 30 and 20 mM glyphosate (77.80 and 76.15% of control,

respectively). Spore germination could germinate at 10 mM glyphosate (78.55 and 63.67% of control) in both fungi. The IAA production of each species was tested in PDB containing 2 mg/l tryptophan and varying concentration of glyphosate for 12 days. The results showed that increasing of glyphosate concentration decreased IAA production of both fungi. *C. gloeosporioides* and *C. cassiicola* could produce the highest IAA concentration in PDB containing glyphosate at 10 mM glyphosate (125 and 51.73 mg/l that were 64.1 and 52.4% of control, respectively)

Keywords : Endophytic fungi, Indoleacetic acid, Glyphosate, Mycelium growth, Spore germination

1. บทนำ

ไกลโฟเซต (glyphosate) จัดเป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มของสารกำจัดวัชพืชที่เกษตรกรนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เนื่องจากไกลโฟเซตสามารถเคลื่อนย้ายและทำลายส่วนต่างๆ ของวัชพืชได้ง่าย ดังนั้นเกษตรกรจึงนิยมนำมาใช้ในการกำจัดวัชพืชประเภทข้ามปีที่มี ราก เหง้า หัว และไหล (Chouychai *et al*., 2012) จนทำให้เกิดการตกค้างในดิน แหล่งน้ำ หรือในระบบนิเวศ ซึ่งการตกค้างดังกล่าวส่งผลกระทบต่อพืชที่ปลูกในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสาร โดยมีผลทำให้พืช มีการเจริญเติบโตที่ช้าลง หรือ เกิดความผิดปกติไป จนทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดต่ำลง หรือไม่ได้คุณภาพ

นอกจากพืชที่ได้รับผลกระทบจากไกลโฟเซตแล้วจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่อยู่ในดินหรือบริเวณรอบรากพืชได้รับผลกระทบจากไกลโฟเซตเช่นกัน สารกำจัดศัตรูพืชมีผลต่อการเจริญของรา ซึ่งจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของรา ชนิดของสารกำจัดศัตรูพืช ปริมาณของสาร และสภาวะแวดล้อม (Ubogu *et al*., 2017) เช่น เพริทิลาคลอร์ (pretilachlor) ไม่มีผลต่อการเจริญของไมซีเลียมรา แต่สารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ มีผลทำให้การเจริญของไมซีเลียมลดลง ตามความเข้มข้นของสาร และชนิดของสารกำจัดศัตรูพืช (Praveena *et al*., 2007) จากรายงานวิจัยของ Ahemad and Khan (2012) ศึกษาความเป็นพิษสารกำจัดศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ สารกำจัดวัชพืช เช่น เมทไตรบูซิน (metribuzin) และไกลโฟเซต (glyphosate) สารกำจัดแมลง เช่น อิมิดาคลอพริด (imidacloprid) และไธอะมีโทแซม (thiamethoxam) และสารกำจัดรา เช่น เฮกซาโคนาโซล (hexaconazole) เมตาแลกซิล (metalaxyl) และไคตาซิน (kitazin) ต่อการเจริญของ *Mesorhizobium* sp. สายพันธุ์ MRC4 พบว่า ไกลโฟเซตความเข้มข้น 1,444 ไมโครกรัมต่อลิตร มีผลต่อการสร้างกรดอินโดลอะซีติก (indoleacetic acid; IAA) ของ *Mesorhizobium* sp. มากที่สุด การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรได้ จุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้นั้น มีทั้งแบคทีเรีย แอกติโนมัยสีท และรา คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ คือ การสร้างกรดอินโดอะซิติก (indoleacetic acid; IAA) ตัวอย่างเช่น ราเอนโดไฟท์ *Collectotricum gloeosporioides* และ *Tulasnella* sp. ที่คัดแยกได้จากรากของกล้วยไม้ 3 สายพันธุ์ สร้าง IAA ที่ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นถั่ว ต้นข้าวโพด และต้นข้าวได้ โดยมีผลทำให้ความยาวของรากถั่ว และความยาวของลำต้นถั่วเพิ่มขึ้น การงอกของเมล็ดข้าวโพด และความยาวรากของข้าวโพดเพิ่มขึ้น ตลอดจนการยืดของโคลีออพไทล์ในข้าวเพิ่มขึ้น (Chuatima and Lumyong, 2012) อย่างไรก็ตาม อุปสรรคสำคัญประการหนึ่งของการนำจุลินทรีย์เหล่านี้ไปใช้ทางการเกษตรคือการที่ต้องสัมผัสกับสารกำจัดศัตรูพืชที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน โดยเฉพาะไกลโฟเซต ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการกำจัดวัชพืชอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในนาข้าว (Wattanasunthorn and Amornsanguansin, 2016) ดังนั้น ราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้าง IAA ที่ทนทานต่อไกลโฟเซตจึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำไปใช้งานทางการเกษตร งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดแยกราเอนโดไฟท์จากรางจืดที่สามารถสร้าง IAA และทนต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเซตได้ เพื่อเป็นแนวทางในการนำราเอนโดไฟท์ไปประยุกต์ใช้กับการปลูกพืชในดินที่มีการปนเปื้อนของสารพิษดังกล่าวได้ต่อไป

2. วิธีการทดลอง

2.1 การคัดแยกและทดสอบการสร้าง IAA ของราเอนโดไฟท์

นำส่วนใบของรางจืดมาล้างผ่านน้ำให้สะอาด ตัดใบให้มีขนาด 5×5 มิลลิเมตร แล้วฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3 นาที และแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที เก็บน้ำล้างชิ้นส่วนใบครั้งสุดท้ายมาเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อสำหรับการคัดกรองราเบื้องต้นจากนั้นนำชิ้นส่วนใบของรางจืดวางบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (35-37องศาเซลเซียส) (Chutima and Lumyong, 2012) คัดแยกเชื้อราที่แทง เส้นใยออกมาจากชิ้นส่วนใบ โดยเชื้อราที่คัดแยกออกมานี้จะต้องไม่ซ้ำกับเชื้อราที่พบในน้ำล้างชิ้นส่วนใบ จากนั้นทดสอบการสร้าง IAA ในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ที่ผสมทริปโตแฟน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของราจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในอาหาร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (35-37องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 13 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงราปั่นเหวี่ยงความเร็ว 1,409Xg เป็นเวลา 30 นาที และเก็บส่วนใสด้านบน มาตรวจวัดปริมาณ IAA ในอาหารเหลวเลี้ยงราด้วยการวัดสี (colorimetric assay) โดยดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร หยดกรดออร์โธฟอสฟอริก 2 หยด เติม Salkowski reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วดูการเปลี่ยนแปลงของสี ถ้าเกิดสีชมพูแสดงว่ามีการสร้าง IAA และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย IAA มาตรฐาน (5-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Tsavkelova *et al*., 2011)

2.2 การทดสอบผลของไกลโฟเซตต่อการเจริญของเส้นใยและสปอร์ของราเอนโดไฟท์

นำราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้าง IAA ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (35-37องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแบ่งออกเป็นสองชุด โดยชุดแรกนำไปทดสอบการเจริญของเส้นใย โดยใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของราและใช้เข็มเขี่ย ๆ ราวางบริเวณกึ่งกลางจานอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซต 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ โดยแต่ละความเข้มข้นทำทั้งหมด 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (35-37 องศาเซลเซียส) วัดการเจริญของเส้นใย โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน ส่วนชุดที่สองนำมาเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร เทลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราเจริญอยู่ จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขูดไปมาเบา ๆ เพื่อให้สปอร์ของราหลุดออกมา จากนั้นทำการเก็บสปอร์ที่ได้โดยการกรองด้วยผ้าขาวบางใส่ขวดใสที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเจาะบริเวณกลางจานอาหาร PDA ที่มีไกลโฟเซตที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ เพื่อให้เกิดหลุม ดูดสารแขวนลอยสปอร์ของราเอนโดไฟท์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลุม โดยแต่ละความเข้มข้นทำทั้งหมด 5 ซ้ำ เช่นเดียวกับการทดสอบการเจริญของเส้นใย บ่มที่อุณหภูมิห้อง (35-37 องศาเซลเซียส) วัดการเจริญของเส้นใยที่เกิดจากการงอกของสปอร์รา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

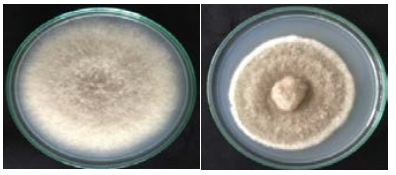
2.3 การทดสอบผลของไกลโฟเซตต่อสร้าง IAA ของราเอนโดไฟท์

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้าง IAA บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (35-37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ตัดเส้นใยของราบริเวณขอบโคโลนีด้วยที่เจาะจุกคอร์ก จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในอาหาร PDB ที่ผสมทริปโตแฟนความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผสมไกลโฟเซตความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (35-37 องศาเซลเซียส) เก็บน้ำเลี้ยงราทุก 3 วัน เป็นเวลา 12 วัน ปั่นเหวี่ยงความเร็ว 1,409Xg เป็นเวลา 30 นาที และเก็บส่วนใสด้านบนมาตรวจวัดปริมาณ IAA ในอาหารเหลวเลี้ยงราด้วยการวัดสี วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย One way-ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วย LSD โดยโปรแกรม Microsoft Office Excel

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการคัดแยกและทดสอบการสร้าง IAA ของราเอนโดไฟท์

คัดแยกราเอนโดไฟท์จากใบรางจืดที่เก็บจากพื้นที่ อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร ได้ราเอนโดไฟท์ทั้งหมด จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ Bb1 Bb2 Bb3 Bb4 Bb5 Bb6 Bb7 Bb8 Bb9 และ Bb-10 เมื่อทดสอบการสร้าง IAA ในอาหาร PDB ที่ผสมทริปโตแฟน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์แต่ละชนิดมาทดสอบการสร้าง IAA ในวันที่ 3, 6, 9 และ 12 พบว่าราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้าง IAA ได้ คือ Bb1 Bb6 Bb7 Bb9 และ Bb10 เมื่อตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) สามารถจำแนกราเอนโดไฟท์ได้เป็น 2 ชนิด โดยไอโซเลต Bb1 Bb7 และ Bb10 คือ *Colletotrichum gloeosporioides* ส่วน Bb6 และ Bb9 คือ *Corynespora cassiicola* (ภาพที่ 1)



(ก) (ข)

ภาพที่ 1 ราเอนโดไฟท์ (ก) *C. cassiicola* และ (ข) *C. gloeosporioides*

3.2 ผลการทดสอบผลของไกลโฟเซตต่อการเจริญของเส้นใยและสปอร์ของราเอนโดไฟท์

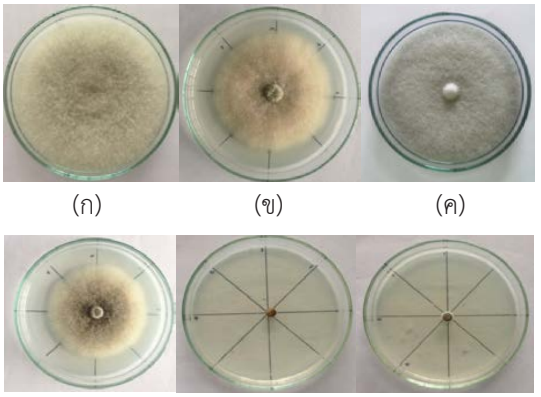
จากการทดสอบการเจริญของ *C. cassiicola* บนอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซตความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ความเข้มข้นของไกลโฟเซตเพิ่มมากขึ้นมีผลทำให้การเจริญของเส้นใยของ *C. cassiicola* ลดลง ยกเว้นอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญของเส้นใยโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเทียบเท่ากับชุดควบคุม คือ อาหาร PDA ที่ไม่ได้ผสมไกลโฟเซตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และที่ความเข้มข้น 40-50 มิลลิโมลาร์ พบว่า *C. cassiicola* ไม่สามารถเจริญได้ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2) ส่วนการเจริญของสปอร์ *C. cassiicola* บนอาหารที่ผสมไกลโฟเซตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าความเข้มข้นของไกลโฟเซตที่เพิ่มสูงขึ้น มีผลต่อการเจริญของสปอร์เช่นเดียวกับการเจริญของเส้นใย โดยมีเพียงความเข้มข้นเดียวที่ *C. cassiicola* สามารถเจริญได้ คือ 10 มิลลิโมลาร์ แต่เจริญได้ไม่ดี เมื่อเทียบกับบนอาหารที่ไม่ผสมไกลโฟเซตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3)

การทดสอบการเจริญของ *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซตความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ความเข้มข้นของไกลโฟเซตเพิ่มมากขึ้นมีผลทำให้การเจริญของเส้นใยของ *C. gloeosporioides* ลดลง เมื่อเทียบกับอาหาร PDA ที่ไม่ผสมไกลโฟเซต และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า *C. gloeosporioides* สามารถเจริญบนอาหารที่ผสมไกลโฟเซตความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ รองลงมา คือ 20 และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และที่ความเข้มข้น 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ *C. gloeosporioides* ไม่สามารถเจริญได้ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 4) ส่วนการเจริญของสปอร์เช่นเดียวกับการเจริญของเส้นใย โดยมีเพียงความเข้มข้นเดียวที่ *C. cassiicola* สามารถเจริญได้ คือ 10 มิลลิโมลาร์ แต่เจริญได้ไม่ดีเมื่อเทียบกับบนอาหารที่ไม่ผสมไกลโฟเซตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 1 การเจริญของ *C. cassiicola* บนอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้นของไกลโฟเสต (มิลลิโมลาร์)	การเจริญของเส้นใย (เซนติเมตร)	การเจริญของสปอร์ (เซนติเมตร)
0	8.73±0.01[a]	9.00±0.01[a]
10	7.68±0.02[b]	7.07±0.48[b]
20	8.06±0.21[ab]	0.97±0.38[c]
30	4.44±0.12[c]	0.05±0.01[d]
40	0.84±0.01[d]	0.05±0.01[d]
50	1.00±0.05[d]	0.05±0.01[d]

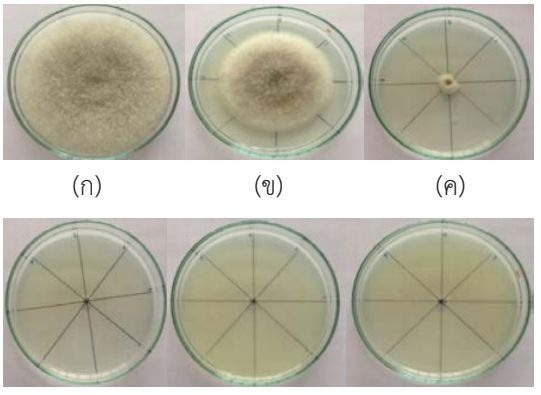
ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ของการเจริญของ *C. cassiicola* ที่ความเข้มข้นของไกลโฟเซตที่แตกต่างกัน



(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ) (ฉ)

ภาพที่ 2 การเจริญของเส้นใยของ *C. cassiicola* บนอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซต ก) 0 มิลลิโมลาร์ ข) 10 มิลลิโมลาร์ ค) 20 มิลลิโมลาร์ ง) 30 มิลลิโมลาร์ จ) 40 มิลลิโมลาร์ และ ฉ) 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน



(ก) (ข) (ค)

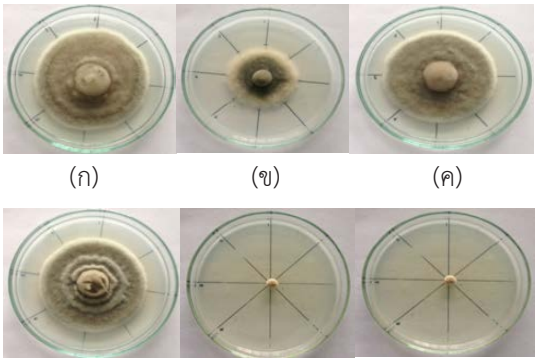
(ง) (จ) (ฉ)

ภาพที่ 3 การเจริญของสปอร์ของ C. Cassiicola บนอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซต ก) 0 มิลลิโมลาร์ ข) 10 มิลลิโมลาร์ ค) 20 มิลลิโมลาร์ ง) 30 มิลลิโมลาร์ จ) 40 มิลลิโมลาร์ และ ฉ) 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 2 การเจริญของ *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้นของไกลโฟเสต (มิลลิโมลาร์)	การเจริญของเส้นใย (เซนติเมตร)	การเจริญของสปอร์ (เซนติเมตร)
0	8.47±0.01[a]	6.36±0.20[a]
10	4.43±0.02[d]	4.05±0.30[b]
20	6.45±0.07[c]	1.08±0.04[c]
30	6.59±0.12[b]	0.50±0.01[d]
40	0.86±0.01[e]	0.50±0.01[d]
50	0.75±0.05[e]	0.50±0.01[d]

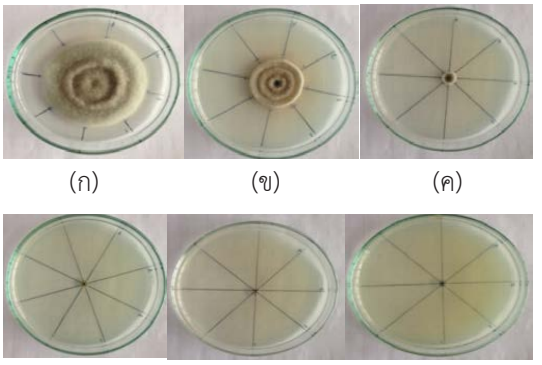
ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในการเจริญของ *C. gloeosporioides* ความเข้มข้นของไกลโฟเซตที่แตกต่างกัน



(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ) (ฉ)

ภาพที่ 4 การเจริญของเส้นใยของ *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซต ก) 0 มิลลิโมลาร์ ข) 10 มิลลิโมลาร์ ค) 20 มิลลิโมลาร์ ง) 30 มิลลิโมลาร์ จ) 40 มิลลิโมลาร์ และ ฉ) 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน



(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ) (ฉ)

ภาพที่ 5 การเจริญของสปอร์ของ *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่ผสมไกลโฟเซต ก) 0 มิลลิโมลาร์ ข) 10 มิลลิโมลาร์ ค) 20 มิลลิโมลาร์ ง) 30 มิลลิโมลาร์ จ) 40 มิลลิโมลาร์ และ ฉ) 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน

3.3 ผลการทดสอบผลของไกลโฟเซตต่อสร้าง IAA ของราเอนโดไฟท์

จากการทดสอบการสร้าง IAA ของราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ชนิดในอาหาร PDB ที่มีทริปโตแฟน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไกลโฟเซตที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 12 วัน โดยทดสอบการสร้าง IAA ในวันที่ 3, 6, 9 และ 12 (ตารางที่ 3) พบว่า ความเข้มข้นของไกลโฟเซตที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลต่อการสร้าง IAA ของราเอนโดไฟท์ โดยมีผลทำให้ปริมาณการสร้าง IAA ลดลง แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารที่ผสมไกลโฟเซตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ชนิดสร้าง IAA ได้มากที่สุด และปริมาณ IAA ลดลง ตามลำดับความเข้มข้นของไกลโฟเซต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

สารกำจัดศัตรูพืชมีผลทำให้การงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยราลดลง โดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือทำให้ราตายได้ โดยเฉพาะสารฆ่ารามีผลต่อการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยมากที่สุด รองลงมาเป็นสารกำจัดแมลง ส่วนสารกำจัดวัชพืชมีผลน้อยที่สุด (Rachappa et al., 2007) ไกลโฟเซต 3.6 กรัมต่อลิตรสามารถชะลอการเจริญของรา *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นราก่อโรคในกล้วยได้ โดยทำให้ราในรูปเส้นใยเจริญเต็มจานเพาะเชื้อภายใน 12 วัน ในขณะที่หากไม่มีไกลโฟเซต ราจะเจริญเต็มจานเพาะเชื้อภายใน 4 วัน (Westerhuis *et al*., 2007)

ตารางที่ 3 การสร้าง IAA ของ *C. cassiicola* และ *C. gloeosporioides* ในอาหาร PDB ที่ผสมไกลโฟเซตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 วัน

ความเข้มข้นของไกลโฟเซต (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณการสร้าง IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	C. cassiicola	*C. gloeosporioides*
0	194.94 ± 0.009[a]	98.66 ± 0.017[a]
10	125.00 ± 0.000[b]	51.73 ± 0.008[b]
20	110.36 ± 0.009[c]	49.95 ± 0.005[c]
30	90.04 ± 0.016[d]	46.31 ± 0.008[d]
40	81.42 ± 0.000[e]	41.88 ± 0.017[e]
50	68.67 ± 0.017[f]	35.66 ± 0.017[f]

ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ของการสร้าง IAA ของราเอนโดไฟท์แต่ละชนิดในอาหารที่ผสมไกลโฟเซตที่แตกต่างกัน

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าเส้นใยและสปอร์ของราเอนโดไฟท์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีไกลโฟเซตที่ความเข้มข้นต่ำ (10 - 20 มิลลิโมลาร์) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Benarlee and Thaochan (2014) พบว่าไกลโฟเซตที่ความเข้มข้น 274.3 กรัมต่อลิตร (1.622 มิลลิโมลาร์) ราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* PSUM04 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เท่ากับ 95.80±2.28 เปอร์เซ็นต์ และการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 8.270±6.39 เซนติเมตร นอกจากนี้เส้นใยของราเอนโดไฟท์เจริญได้ดีกว่าสปอร์ อาจจะเนื่องจากในสภาวะปกติราสามารถสร้าง IAA ขึ้นมาได้เอง โดย IAA ที่สร้างได้จะมีผลต่อการชักนำให้เกิดเส้นใยของรา ซึ่งการสร้าง IAA นี้เกิดขึ้นจากเส้นใยที่เกิดก่อน ดังนั้นราเอนโดไฟท์จึงสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีไกลโฟตความเข้มข้นสูงกว่าสปอร์จากรายงานการวิจัยของ (Rao *et al*., 2010) ศึกษาผลของ IAA จาก *Saccharomyces cerevisiae* ต่อการสร้างเส้นใยของ *Candida albicans* พบว่า IAA ที่ถูกสร้างขึ้นจาก *S. cerevisiae* มีผลทำให้ *C. albicans* เกิดการสร้างเส้นใยเทียม (pseudohyphal) ซึ่งโดยปกติ *C. albicans* เป็นยีสต์ที่มีความแตกต่างจากยีสต์โดยทั่วไป คือ มีความสามารถสร้างเส้นใยเทียมได้ จึงเรียกว่าเป็นยีสต์ที่คล้ายรา (yest-like fungi) ดังนั้น IAA จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการชักนำให้เกิดการเจริญของเส้นใย แต่สปอร์มีความต้องการ IAA เพื่อใช้ในการงอกไปเป็นเส้นใยมากกว่า เนื่องจากสปอร์จะต้องเกิดการงอกเป็นเส้นใยก่อนจึงสามารถเจริญได้ ดังนั้นสปอร์จึงเจริญได้ช้ากว่าเส้นใยในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไกลโฟเซตเท่ากันนอกจากนี้การงอกของสปอร์มีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมแทบอลิซึม ดังนั้นสปอร์จะดูดน้ำเพื่อให้เกิดอัตราการหายใจที่เพิ่มมากขึ้น มีการสังเคราะห์โปรตีน และกรดนิวคลีอิก

เพิ่มขึ้นจึงจะเกิดการการงอกและมีการเจริญต่อมาเป็นเส้นใย ดังนั้นที่ความเข้มข้นไกลโฟเซต ที่เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณของน้ำลดลง จึงอาจจะส่งผลต่อการงอกและเจริญเป็นเส้นใยของราด้วยเช่นกัน (Aupensuk, 2009)

4. สรุป

ราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้าง IAA ได้ คือ *C. gloeosporioides* และ *C. cassiicola* เมื่อความเข้มข้นของไกลโฟเซตเพิ่มสูงขึ้นมีผลทำให้การเจริญของเส้นใยและสปอร์ของราทั้ง 2 ชนิดลดลง โดยเส้นใยสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 30 มิลลิโมลาร์ แต่สปอร์เจริญได้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ส่วนการสร้าง IAA ที่ความเข้มข้นของไกลโฟเซตเพิ่มสูงขึ้นมีผลต่อการสร้าง IAA เช่นกัน

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ที่สนับสนุนสถานที่สำหรับการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

Ahemad, M. and M.S. Khan. 2012. **Effect of pesticides on plant growth promoting traits of *Mesorhizobium* strain MRC4**. J Saudi Soc Agricult Sci. 11: 63-71.

Aupensuk S. 2009. **Mycology**. Pongsawatprinting, Chiang Mai. (in Thai)

Baur J.R. 1979. **Effect of glyphosate on auxin transport in corn and cotton tissues**. Plant Physiol. 63: 882-886.

Benarlee, R. and N. Thaochan. 2014. **Effects of Different Pesticides Application with Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae* PSUM04, on Spore Germination and Mycelial Growth**. Songklanakarin J. Pl. Sci. 1(1): 59-65. (in Thai)

Chouychai, W., Thummatoon, N. and K. Somtrakoon. 2012. **Toxicity of Glyphosate Contamination in Soil and Plant Residues on Cucumber Seedling Growth**. Agri. research & Extension. 30(1): 25-32. (in Thai)

Chutima, R. and S. Lumyon. 2012. **Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi**. Symbiosis. 56: 35-44.

Praveena, R., Naseema A. and S. George. 2007. **Effect of herbicides on *Fusarium pallidoroseum* - a potential biocontrol agent of water hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms]**. J. Trop Agricult. 45(1-2): 55–57.

Rachappa, V., Lingappa, S. and R.K. Patil. 2007. **Effect of Agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae***. Agricultural Sci. 20: 410-413.

Rao, R.P., Hunter, A., Kashpur, O. and J. Normanly. 2010. **Aberrant synthesis of indole-3-aceticacid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi**. Genetics. 185: 211-220.

Tsavkelova, E., Oeser, B., Oren-Young, L., Israeli, M., Sasson, Y., Tudzynski, B. and A. Sharon. 2011. **Identificational characterization and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species**. Fungal Genet Biol. 49: 48-57.

Ubogu, M., Akponah, E. and S.O. Dickson. 2017. ***In vitro* Evaluation of growth inhibition of some common soil fungi by selective and non-selective herbicides**. Front Environ Microbiol. 3(1): 1-8.

Wattanasunthorn, P. and C. Amornsanguansin. 2016. **Detections of pesticide and herbicides residues in soil samples from paddy fields in Chainat province**. Acad J URU. 11(2). 245-258. (in Thai)

Westerhuis, D., Vawdrey, L.L. and R. Piper. 2007. **An *in vitro* study into the effect of glyphosate on *Sclerotium rolfsii***. J Aust Plant Pathol Soc. 2: 23-24.

(Received: 25/Oct/2019, Revised: 25/May/2020, Accepted: 1/Jun/2020)