

ราเอนโดไฟต์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซีติกและส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกร
Endophytic Fungi Producing Indole Acetic Acid and Promoting Seed Germination of
Habenaria rhodocheila Hance

ณมนรัก คำฉัตร^{1*} อรรถกร คำฉัตร¹ อาทร สกุลวรกิจ¹ พรพิมล กาญจนवास² และ ศุภรสิริ รุ่งเรือง³
Na-monrug Khamcharta^{1*} Attakorn Khamchatra¹ A-thorn Sakulworakit¹ Pornpimol Kanjanavas²
and Suksiri Rungrueang³

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จันทบุรี 22000 ประเทศไทย

²คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษมบัณฑิต กรุงเทพมหานคร 10510 ประเทศไทย

³อุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิ้ว จันทบุรี 22190 ประเทศไทย

¹Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000, Thailand

²Faculty of Nursing, Kasem Bundit University, Bangkok 10510, Thailand

³Namtok Phlio National Park, Chanthaburi 22190, Thailand

*E-mail: namonrug.k@rbru.ac.th

Received: Dec 16, 2023

Revised: May 09, 2024

Accepted: Jun 06, 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกราเอนโดไฟต์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) และส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกร จากการแยกราเอนโดไฟต์จากรากกล้วยไม้ลิ้นมังกร ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 26 ไอโซเลต เมื่อนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาตรวจสอบ การผลิต IAA ด้วยวิธี Salkowski's method พบราเอนโดไฟต์เพียง 6 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิต IAA คือ ไอโซเลต HRNP-F01, HRNP-F06, HRNP-F14, HRNP-F17, HRNP-F21 และ HRNP-F22 จากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลิ้นมังกรร่วมกับราเอนโดไฟต์ ที่ผลิต IAA ทั้ง 6 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต HRNP-F06 และ HRNP-F14 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงสุด เท่ากับ 97.27 และ 98.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากค่าที่ได้จากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยไอโซเลต HRNP-F06 สามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอก และพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 2 ของการงอกของเมล็ด (ระยะที่เอบริโอขยายขนาดเพิ่มขึ้น) ในขณะที่ไอโซเลต HRNP-F14 สามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอก และพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 3 ของการงอกของเมล็ด (ระยะที่เอบริโอพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ของ ribosomal DNA ทำให้สามารถระบุชนิดของ ราไอโซเลต HRNP-F06 และ HRNP-F14 ได้เป็น *Fusarium oxysporum* และ *Annulohyphoxylon* sp. ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *F. oxysporum* HRNP-F06 และ *Annulohyphoxylon* sp. HRNP-F14 มีศักยภาพที่จะใช้ส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้

คำสำคัญ: ราเอนโดไฟต์ กรดอินโดลอะซีติก การงอกของเมล็ด กล้วยไม้ลิ้นมังกร

Abstract

This research aimed to isolate endophytic fungi producing indole acetic acid (IAA) and promoting seed germination of *Habenaria rhodocheila* Hance. A total of 26 isolates of endophytic fungi were isolated from *H. rhodocheila* roots. By using Salkowski's method to examine IAA production of the isolated endophytic fungi, only 6 isolates were found to be able to produce IAA including isolates HRNP-F01, HRNP-F06, HRNP-F14, HRNP-F17, HRNP-F21 and HRNP-F22. From co-culture of *H. rhodocheila* seeds with 6 isolates of IAA producing endophytic fungi, it was found that the isolates HRNP-F06 and HRNP-F14 exhibited the highest percentages of seed germination of 97.27% and 98.02%, respectively which were significantly different ($p < 0.05$) from that of the control. The

isolate HRNP-F06 was able to stimulate seeds to germinate and develop into stage 2 of seed germination (the stage at which embryo enlargement continues), while the isolate HRNP-F14 was able to stimulate seeds to germinate and develop into stage 3 of seed germination (the stage at which embryo develops into protocorm). Nucleotide sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA identified the isolates HRNP-F06 and HRNP-F14 as *Fusarium oxysporum* and *Annulohyphoxylon* sp., respectively. This study indicated that *F. oxysporum* HRNP-F06 and *Annulohyphoxylon* sp. HRNP-F14 had potential to be used to promote germination of seeds.

Keywords: Endophytic fungi, Indole acetic acid, Seed germination, *Habenaria rhodicheila* Hance

1. บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชดอกกลุ่มใหญ่ สามารถเจริญเติบโตได้ในหลากหลายสภาพแวดล้อม จึงทำให้พบราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) ในกล้วยไม้ได้หลากหลายชนิดด้วยเช่นกัน ราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ เป็นราที่อาศัยอยู่ร่วมกัน (Symbiosis) ในเนื้อเยื่อทุกส่วนของกล้วยไม้ มีวงจรชีวิตบางช่วงหรือตลอดชีวิตภายในกล้วยไม้ มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน (Mutualism) ไม่ก่อโรคพืชในกล้วยไม้ [1] การศึกษาวิจัยในราเอนโดไฟต์ที่พบในกล้วยไม้ที่ผ่านมา ส่วนใหญ่มุ่งไปที่ราออร์คิดไมคอร์ไรซา (Orchid mycorrhiza) ซึ่งเป็นราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับกล้วยไม้ และสามารถพบได้เฉพาะในรากกล้วยไม้เท่านั้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจที่จะศึกษา และทำความเข้าใจบทบาทของราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้เพิ่มขึ้น ราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycota ซึ่งเคยมีรายงานว่าสาเหตุของโรคพืช แต่ไม่พบรายงานการเกิดโรคพืชในกล้วยไม้ [2] เนื่องจากบทบาทและศักยภาพของราเอนโดไฟต์ในบางสกุล เช่น *Fusarium*, *Aspergillus*, *Xylaria*, *Annulohyphoxylon* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช ทนต่อสภาวะเครียดในสภาพแวดล้อมได้ [3] ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุต่าง ๆ ได้แก่ คาร์บอน ฟอสฟอรัส และไนโตรเจน ได้ดีขึ้น [1] และบางชนิดสามารถผลิตสารควบคุมการเจริญของพืช (Plant growth regulators) ได้แก่ จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) ไซโตไคนิน (Cytokinin) และออกซิน (Auxin) ที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช [4]-[6] นอกจากนี้ยังพบว่าราเอนโดไฟต์บางชนิดในสกุล *Fusarium* ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในสกุล *Cypripedium* และ *Platanthera* ได้อีกด้วย [7]

ออกซินที่ผลิตได้จากราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่ คือ กรดอินโดล-3-อะซีติก (Indole-3-acetic acid) หรือ กรดอินโดลอะซีติก (Indole acetic acid, IAA) มีหน้าที่ช่วยในการ

แบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ ช่วยให้เอ็มบริโอ (Embryo) พัฒนาในระยะแรกของกระบวนการเกิดเอ็มบริโอ (Embryogenesis) และช่วยให้เกิดกระบวนการสร้างราก (Root formation) [8] โดยมีทริปโตเฟน (Tryptophan) เป็นสารตั้งต้นหลักของกระบวนการสังเคราะห์ IAA [9] มีรายงานพบว่าราเอนโดไฟต์จากรากกล้วยไม้อิงอาศัย (Epiphytic orchids) และกล้วยไม้ดิน (Terrestrial orchids) หลายชนิด เช่น *Spathoglottis affinis*, *Paphiopedelum bellatulum*, *Phaius tankervilleae* [10], *Vanda cristata* [11], *Epiderndrum radicans*, *Oncidium sphacelatum*, *Rhynchostylis retusa* [12], *Rhynchostylis gigantean* [8], *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium longicomu* [6] และ *Habenaria brachyphylla* [13] สามารถผลิต IAA ได้นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราเอนโดไฟต์บางชนิดสามารถผลิต IAA ได้ในปริมาณสูง ได้แก่ รา *Cladosporium* sp., *Coniochaeta* sp., *Collectotrichum gloeosporioides*, *Penicillium* sp., *Trichoderma*, *Fusarium* sp., *Xylaria* sp. [6], [10], [11], [14] เป็นต้น ซึ่งเมื่อเพาะเมล็ดร่วมกับราเอนโดไฟต์โดยตรงหรือสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungal extract) สามารถช่วยให้การงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนในกล้วยไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [11], [15]

กล้วยไม้ลิ้นมังกร (*Habenaria rhodochela* Hance) เป็นกล้วยไม้ดินที่พบการกระจายพันธุ์ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยสามารถพบการกระจายตัวทั่วภูมิภาคของประเทศ สำหรับภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจังหวัดจันทบุรี พบได้ในอุทยานแห่งชาติเขาคิชฌกูฏ และอุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิ้ว กลีบปากดอกกล้วยไม้ชนิดนี้มีลักษณะคล้ายลิ้นมังกร สีของดอกฉูดฉาด หลากหลายสีเช่น สีเหลือง สีส้ม สีชมพู และสีแดง เป็นที่สังเกตได้ง่าย [16] จึงทำให้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในธรรมชาติ นักวิทยาศาสตร์จึง

เล็งเห็นถึงความสำคัญและความสามารถของราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) ที่ส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มปริมาณจำนวนต้นอ่อน ช่วยในการขยายพันธุ์ และการอนุรักษ์กล้วยไม้ชนิดนี้ได้ [17] งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกราเอนโดไฟต์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) และส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลั่นทมกร โดยใช้เทคนิคการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราเอนโดไฟต์ในสภาพปลอดเชื้อ (*In vitro* symbiotic seed germination technique) [18] เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ชนิดที่ใกล้สูญพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงทั้งในและนอกถิ่นกำเนิด (*in situ* and *ex situ*) ได้

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การแยกราเอนโดไฟต์บริสุทธิ์

เก็บรากกล้วยไม้ลั่นทมกรในระยะออกดอก (Figure 1) จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกพลู จังหวัดจันทบุรี นำรากกล้วยไม้ลั่นทมกรล้างทำความสะอาดด้วยน้ำไหลเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซับให้แห้ง ตัดรากเป็นชิ้นขนาด 1 เซนติเมตร แชลงในแอลกอฮอล์ (Alcohol) ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 นาที ย้ายลงฟอกฆ่าเชื้อในสารละลาย Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ใช้เทคนิคปลอดเชื้อทำการแยก โดยตัดชิ้นรากกล้วยไม้ตามยาวเป็นชิ้นบาง ๆ ใช้เข็มเย็บฟิโลตอน (Pelotons) จากเนื้อเยื่อชั้นคอร์เทกซ์ (Cortex) ภายใต้กล้องสเตอริโอ (Stereomicroscope) ล้างฟิโลตอนด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 6 ครั้ง ดูดฟิโลตอนด้วยไมโครปิเปต (Micropipette) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

Masuhara and Katsuya 1/6 Nutrient dextrose yeast extract agar (1/6 NDY) [19] ที่ผสมสารปฏิชีวนะเตตระไซคลิน (Tetracycline) และสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) muj,u ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืด เป็นเวลา 7 วัน แยกเชื้อราจนได้เชื้อราบริสุทธิ์

2.2. การทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซีติก

นำเส้นใยราบริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เจาะเส้นใยเชื้อราที่บริเวณขอบโคโลนีด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น เลี้ยงในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติม L-tryptophan ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน กรองเส้นใยเชื้อราด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1) นำส่วนใสที่แยกได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณ IAA ด้วยวิธี Salkowski's method [20] ดูดส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองหุ้มกระดาษฟอยล์ (foil) ที่มีสารละลาย Salkowski reagent (35% Perchloric acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร, Ferric chloride ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer นำไปบ่มในสภาพมืด เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA แล้วคำนวณหาปริมาณ IAA หน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



Figure 1 *Habenaria rhodocheila* Hance

2.3. การทดสอบประสิทธิภาพในการงอกของเมล็ดกล้วยไม้พันธุ์ม้งกรของราเอนโดไฟต์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซีติก

การทดสอบการงอกของเมล็ดกล้วยไม้พันธุ์ม้งกรเมื่อเลี้ยงร่วมกับราเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติก หรือ IAA ในสภาพปลอดเชื้อ (Symbiosis *in vitro* culture) โดยดัดแปลงวิธีของ Khamchatra et al. [18] นำฝักกล้วยไม้ที่แก่เต็มที่อายุ 1 เดือน ใส่ซองกระดาษ เก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) จนฝักแตกออก นำเมล็ดกล้วยไม้เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน พอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะเส้นใยราเอนโดไฟต์ที่บริเวณขอบโคโลนี จำนวน 1 ชิ้น วางขึ้นวุ้นเส้นใยราเอนโดไฟต์ที่บริเวณปลายมุมของกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 4) รูปสามเหลี่ยมที่วางอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat meal agar (OMA) จากนั้นดูดเมล็ดกล้วยไม้ปลอดเชื้อและโรยเมล็ดกล้วยไม้ประมาณ 50-100 เมล็ด ลงบนกระดาษกรองนั้น เก็บรักษาจนเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราเอนโดไฟต์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 4 เดือน นับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้พันธุ์ม้งกรในแต่ละระยะพัฒนาการของเมล็ด [21] (Table 1) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้} = \frac{b+c+d+e+f}{a+b+c+d+e+f} \times 100$$

2.4. การระบุชนิดราเอนโดไฟต์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Lysis buffer ดัดแปลงจากวิธีการของ Liu et al. [22] โดยเลี้ยงเส้นใยราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน เกี่ยวเส้นใยใส่ในหลอด Microcentrifuge เติม lysis buffer เติมสารละลาย Potassium acetate ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตูดส่วนใส (Supernatant) 300-350 ไมโครลิตร ใส่หลอดอันใหม่ เติม Isopropyl alcohol ในปริมาณที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากันอย่างเบามือเป็นระยะเวลานาน ๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง เติมเอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500

รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ภายใต้แสงยูวี (Ultraviolet, UV)

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ของ ribosomal DNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [23] โดยแต่ละปฏิกิริยา PCR ใช้ส่วนประกอบดังแสดงใน Table 2 และการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle ใช้สภาวะดังแสดงใน Table 3 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่ได้ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานภายใต้แสงยูวี

นำ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR purified (GenPflow™ Gel/PCR Kit, Taiwan) ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยส่งไปทำที่บริษัท ATGC จำกัด (จังหวัดปทุมธานี) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการ BLAST เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology International (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) สำหรับการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุดในการระบุชนิด

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล GenBank มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA-7 โดยคำนวณความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Kimura 2-parameter+G+I สร้างสายวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum likelihood และ Neighbor-joining เพื่อยืนยันชนิดของราเอนโดไฟต์ [24], [25]

2.5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่ม (Completely Randomized Design, CRD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS) เวอร์ชัน 17 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Table 1 Stages of seed germination of *Habenaria rhodocheila* [21]

Stage	Code	Description
0	a	No germination, viable embryo
1	b	Swelled embryo, production of rhizoid (= germination)
2	c	Continued embryo enlargement
3	d	Ruptured testa, protocorm
4	e	Emergence of first leaf
5	f	Elongation of first leaf

Table 2 PCR reaction components

Component	Volume (μ L)
ddH ₂ O	34.5
10X PCR buffer	5
100 mM dNTP	1
10 μ M ITS1	1
10 μ M ITS4	1
5X Band Helper TM	5
Taq Polymerase	0.5
DNA sample	2
Total	50

Table 3 PCR cycling conditions

Step	Number of cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95°C	2 min
Denaturation		95°C	30 sec
Annealing	30	57°C	1 min
Extension		72°C	1 min
Final extension	1	72°C	10 min

3. ผลการวิจัย

3.1. การแยกและคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติก

งานวิจัยในครั้งนี้สามารถแยกราเอนโดไฟต์จากรากกล้วยไม้ลั่นทมในอุทยานแห่งชาตินันทขว้าง จังหวัดจันทบุรี ได้จำนวน 26 ไอโซเลท (Isolate) และเมื่อนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) ด้วยวิธี Salkowski's method พบราเอนโดไฟต์เพียง 6 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิต IAA มากกว่า 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (Table 4) โดยราเอนโดไฟต์ไอโซเลท

HRNP-F14 ผลิต IAA สูงที่สุด เท่ากับ 16.67 ± 0.69 ไมโครกรัมต่อลิตร รองลงมาคือราเอนโดไฟต์ไอโซเลท HRNP-F06 มีความสามารถผลิต IAA เท่ากับ 7.31 ± 0.83 ไมโครกรัมต่อลิตร ในขณะที่ราเอนโดไฟต์ไอโซเลท HRNP-F17, HRNP-F22, HRNP-F01 และ HRNP-F021 มีความสามารถผลิต IAA ระหว่าง 1.01 ± 0.62 ถึง 2.68 ± 0.341 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ดังนั้นจึงเลือกราเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิต IAA ทั้ง 6 ไอโซเลท (Figure 2) ไประบุชนิดด้วยวิธีทางอนุวิธาน และศึกษาการออกของเมลิคกล้วยไม้ลั่นทมที่เพาะเมล็ดร่วมกับราเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลท

Table 4 IAA production of endophytic fungi isolated from *H. rhodocheila* roots

Fungal isolate	IAA concentration ($\mu\text{g/mL}$)
HRNP-F01	1.31 ± 0.35^d
HRNP-F06	7.31 ± 0.83^b
HRNP-F14	16.67 ± 0.69^a
HRNP-F17	2.68 ± 0.34^c
HRNP-F21	1.01 ± 0.62^d
HRNP-F22	1.67 ± 0.67^{cd}

Data are expressed as means $\pm$ standard deviations (SD).

Means with different superscript letters in a column are significantly different ($p < 0.05$).

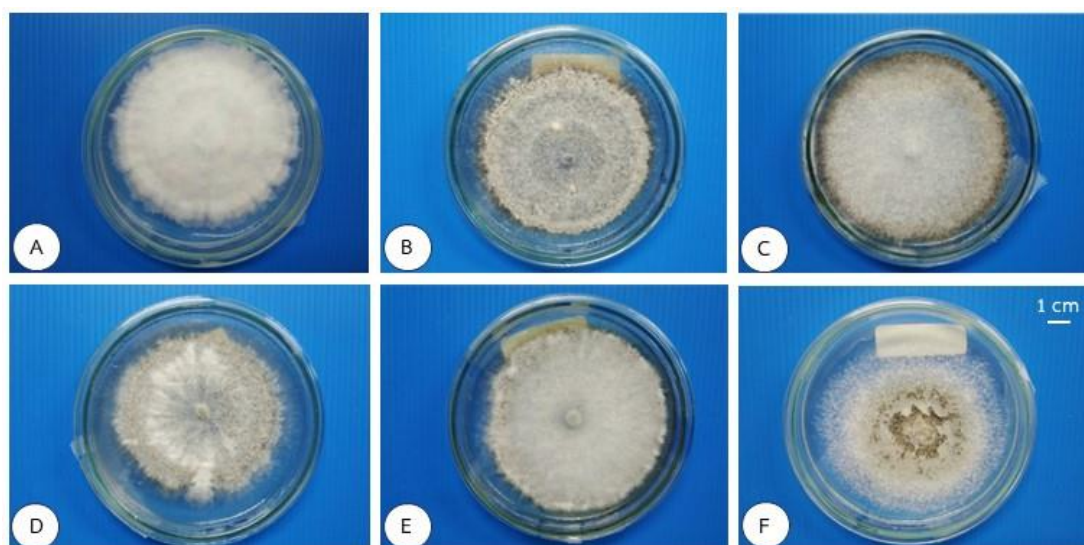


Figure 2 Colony Morphology of 6 endophytic fungi grown in the dark on PDA for 10 days at 30°C

(A) HRNP-F01, (B) HRNP-F06, (C) HRNP-F14, (D) HRNP-F17, (E) HRNP-F21 and (F) HRNP-F22

3.2. การระบุชนิดราเอนโดไฟต์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

การจัดจำแนกและระบุชนิดราเอนโดไฟต์จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ HRNP-F01, HRNP-F06, HRNP-F14, HRNP-F17, HRNP-F21 และ HRNP-F22 ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ของ ribosomal DNA เมื่อนำข้อมูลลำดับ

นิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ของ NCBI สามารถระบุชนิดราเอนโดไฟต์ได้ดังแสดงใน Table 5 และ Figure 3 โดยราไอโซเลท HRNP-F01 จัดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycota ส่วนราไอโซเลท HRNP-F06, HRNP-F14, HRNP-F17, HRNP-F21 และ HRNP-F22 จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycota

Table 5 Molecular identification of 6 endophytic fungi isolated from *H. rhodocheila* roots based on the closest matches in the nucleotide database at GenBank

Fungal Isolate	% Similarity	Closest organism (accession number)	Family
HRNP-F01	100.00	<i>Ganoderma williamsianum</i> (ON202928)	Polyporaceae
HRNP-F06	100.00	<i>Fusarium oxysporum</i> (MT560381)	Nectriaceae
HRNP-F14	99.68	<i>Annulohypoxyton</i> sp. (MG881826)	Hypoxyloaceae
HRNP-F17	100.00	<i>Aspergillus versicolor</i> (OR259030)	Aspergillaceae
HRNP-F21	100.00	<i>Aspergillus versicolor</i> (MZ133740)	Aspergillaceae
HRNP-F22	99.53	<i>Annulohypoxyton viridistratum</i> (KX376325)	Hypoxyloaceae

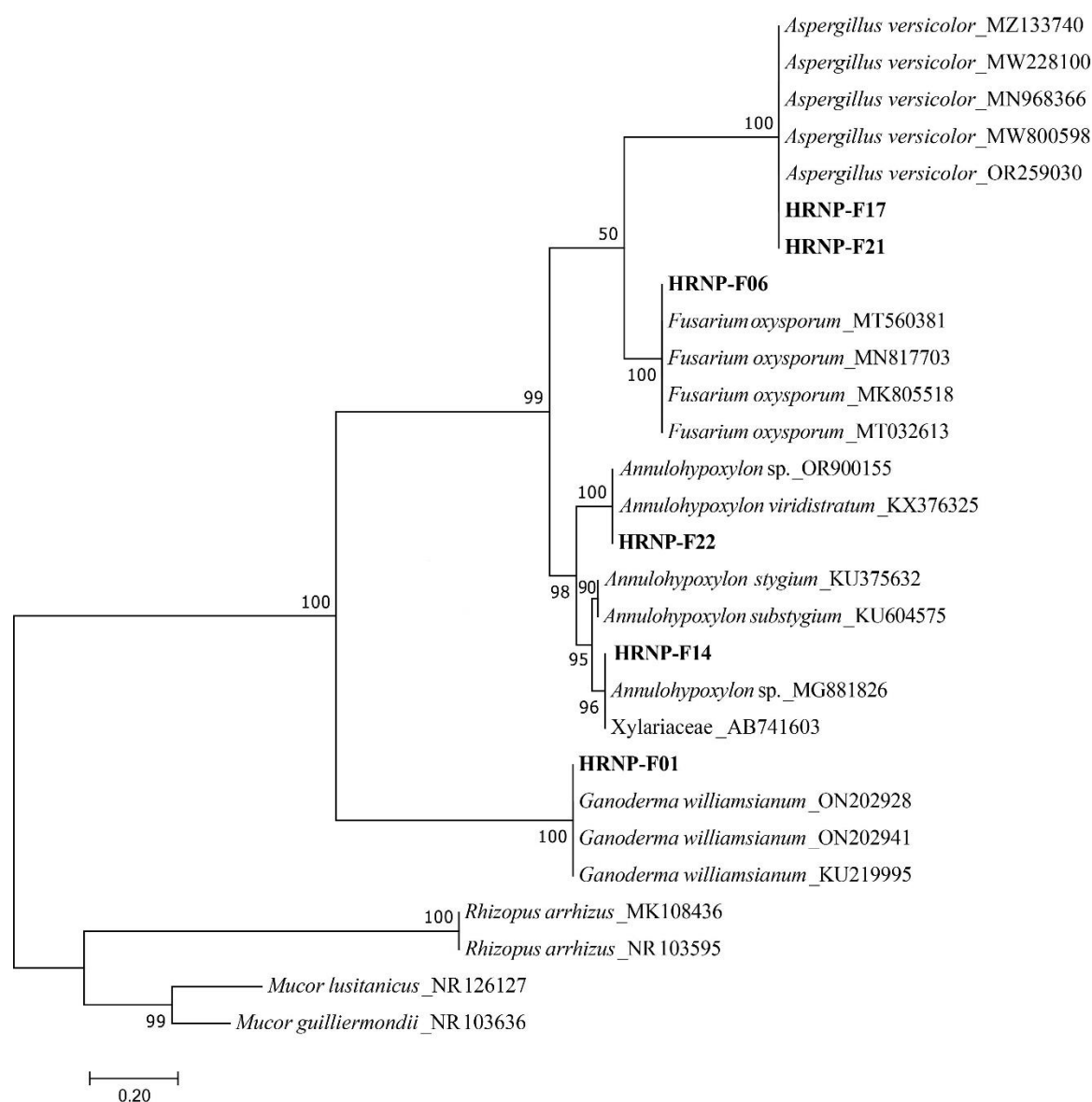


Figure 3 Phylogenetic tree showing the relationship between IAA producing endophytic fungi isolated from *H. rhodocheila* roots and reference strains. The tree was constructed on the basis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA (ITS1 and ITS4). Numbers above branches represent bootstrap percentages from maximum likelihood analysis of 1000 replicates. The scale bar indicates 0.2 substitutions per nucleotide position.

3.3. การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลั่นมังกงที่เลี้ยงร่วมกับราเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลั่นมังกงร่วมกับราเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิต IAA ในสภาพปลอดเชื้อ จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ *Ganoderma williamsianum* HRNP-F01, *Fusarium oxysporum* HRNP-F06, *Annulohyphoxylon* sp. HRNP-F14, *Aspergillus versicolor* HRNP-F17, *Aspergillus versicolor* HRNP-F21 และ *Annulohyphoxylon viridistratum* HRNP-F22 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OMA (Figure 4) เพื่อศึกษาการงอกและระยะพัฒนาการของเมล็ดกล้วยไม้ลั่นมังกง พบว่า ราเอนโดไฟต์เกือบทุกไอโซเลทช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ด ยกเว้น *Ganoderma williamsianum* HRNP-F01 ที่ย่อย และทำลายเมล็ดกล้วยไม้โดยเส้นใยราเจริญคลุมเมล็ดทั้งหมด ไม่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ (Figure 4A) ส่วนราเอนโดไฟต์ *Fusarium oxysporum* HRNP-F06, *Annulohyphoxylon* sp. HRNP-F14, *Aspergillus versicolor* HRNP-F17, *Aspergillus versicolor* HRNP-F21 และ *Annulohyphoxylon viridistratum* HRNP-F22 สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Table 6 และ Figure 4B-4F) มีพัฒนาการอยู่ในระยะที่ 1 และ 2 แม้ว่าราเอนโดไฟต์ *Fusarium oxysporum* HRNP-F06 และ *Annulohyphoxylon* sp. HRNP-F14 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ราเอนโดไฟต์ *Annulohyphoxylon* sp. HRNP-F14 สามารถกระตุ้นการงอก

ของเมล็ดกล้วยไม้ลั่นมังกงได้สูงสุด 98.02 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดกล้วยไม้สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 3 คือเมล็ดพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มได้ 1.57 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3C) เมื่อพิจารณาระยะพัฒนาการของเมล็ดกล้วยไม้ระหว่างที่เพาะเมล็ดร่วมกับ *Fusarium oxysporum* HRNP-F06 และ *Annulohyphoxylon* sp. HRNP-F14 พบว่าเมล็ดกล้วยไม้ส่วนใหญ่มีเอ็มบริโอที่ขยายขนาดซึ่งพัฒนาอยู่ในระยะที่ 2 จำนวนมาก (Table 6 และ Figure 4B-4F)

4. อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถแยกราเอนโดไฟต์จากรากกล้วยไม้ลั่นมังกง ได้ 26 ไอโซเลท ความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยร่วมกันกับพืชมีความผันแปร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัย [26] แม้ว่าจะเป็นกล้วยไม้ชนิดเดียวกันราเอนโดไฟต์ที่พบภายในเนื้อเยื่อพืชก็ยังคงแตกต่างกันได้ หากสภาพทางสรีรวิทยาของพืชหรือกล้วยไม้แต่ละต้นแตกต่างกัน [27] ที่ผ่านมามีงานวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสำคัญกับราออร์คิดไมคอร์ไรซา ซึ่งเป็นราที่อาศัยอยู่เฉพาะบริเวณรากกล้วยไม้เท่านั้นและมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัย ช่วยการงอกของเมล็ดและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติ แต่ปัจจุบันพบว่าราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ที่ไม่ใช่ราไมคอร์ไรซา (Non-mycorrhizal fungi) ซึ่งเป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อทุกส่วนของกล้วยไม้ มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยเช่นเดียวกัน มีความหลากหลายและมีบทบาทสำคัญต่อกล้วยไม้เพิ่มขึ้นเช่นกัน [2], [11] โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

Table 6 Germination percentages and percentages of seed germination at different stages of *H. rhodocheila* co-cultured with IAA producing endophytic fungi on oatmeal agar for four months

Fungal Isolate	Germination (%)*	Seed germination at different stages (%)**			
		0	1	2	3
Control	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
HRNP-F01	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
HRNP-F06	97.27±2.06 ^a	5.46±4.12 ^c	38.25±6.92 ^b	56.29±5.38 ^a	0.00±0.00 ^c
HRNP-F14	98.02±0.66 ^a	3.96±1.32 ^c	36.28±5.76 ^b	58.19±7.36 ^a	1.57±0.29 ^c
HRNP-F17	89.92±3.34 ^b	20.17±6.68 ^b	51.63±6.65 ^a	28.21±5.44 ^b	0.00±0.00 ^c
HRNP-F21	81.14±3.01 ^c	37.71±6.02 ^a	28.09±5.26 ^a	34.19±11.28 ^a	0.00±0.00 ^b
HRNP-F22	88.55±2.13 ^b	22.9±4.25 ^b	43.59±12.27 ^a	33.51±13.21 ^{ab}	0.00±0.00 ^c

Data are expressed as means ± standard deviations (SD).

*Means with different superscript letters in a column are significantly different ($p < 0.05$).

**Means with different superscript letters in a row are significantly different ($p < 0.05$).

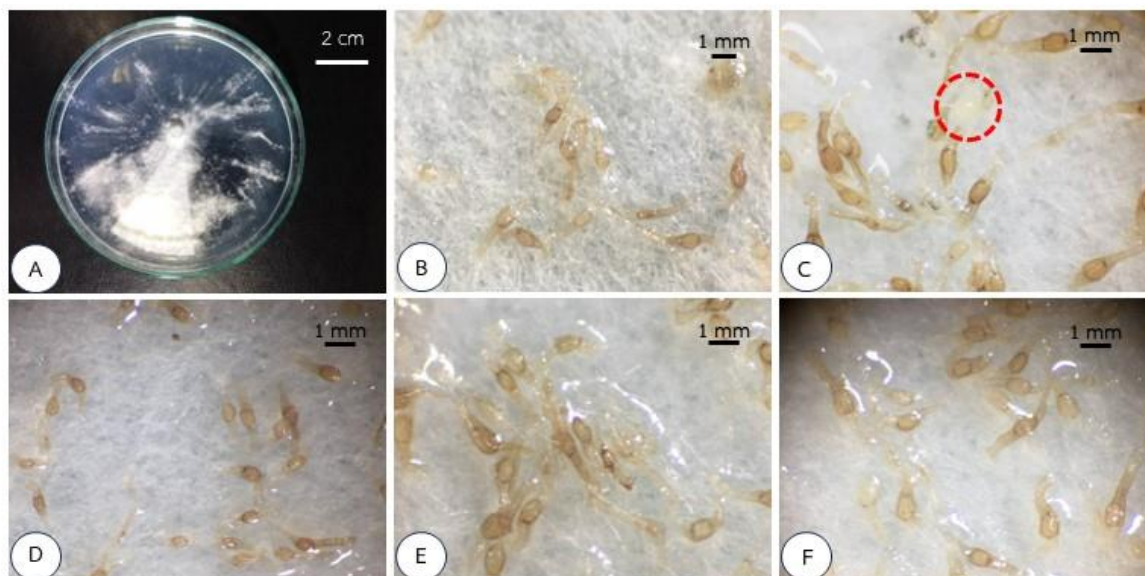


Figure 4 Symbiotic seed germination of *H. rhodocheila* promoted by IAA producing endophytic fungi on oatmeal agar for four months

(A) Seeds incubated with incompatible HRNP-F01;

(B-F) Seeds incubated with compatible HRNP-F06, HRNP-F14, HRNP-F17, HRNP-F21 and HRNP-F22, respectively;

The red circle in (C) indicates the seed reaching the protocorm stage.

ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน [28] จากการทดลองแยกราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ลิ้นมังกร พบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ การผลิต IAA ของราเอนโดไฟต์เป็นสัญญาณหนึ่งที่ส่งผลต่อการสื่อสารกันระหว่างราเอนโดไฟต์และพืชอาศัยเพื่อให้เกิดความสมดุลต่อการดำรงชีวิตของพืชจัดเป็นกลุ่มที่มีภาวะพึ่งพาอาศัย [29] ซึ่งราเอนโดไฟต์เหล่านั้นจะย่อยสลายอาหารที่อยู่บริเวณรอบ ๆ ราก หรือภายในเนื้อเยื่อพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารอาหารในกลุ่มกรดอะมิโนชนิดหนึ่ง คือ Tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นหลักที่สำคัญในการสังเคราะห์ IAA [30], [31] จากการทดลองพบว่า ราเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลท ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติม L-tryptophan ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการผลิต IAA ได้แตกต่างกัน อยู่ในช่วง 1.01 ถึง 16.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นที่ได้น้อยกว่าและแตกต่างจากความเข้มข้นของ IAA ที่ผลิตได้จากราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum gloeosporioides* ไอโซเลท CMU-AU 006 (214.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), *Fusarium* sp. ไอโซเลท CMU-NUT 001, CMU-AU 202, CMU-AU208 และ CMU-SLP 040 (3.80-19.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *Trichocaldium pyriforme* ไอโซเลท

CMU-AU 210 (2.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ดิน *Spathoglottis affinis*, *Paphiopedelum bellatulum* และ *Phaius tankervilleae* ในประเทศไทย [10] อย่างไรก็ตามปริมาณ IAA ที่ผลิตได้มากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของราเอนโดไฟต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของ L-tryptophan รวมไปถึงแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ได้รับ [32] การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าราเอนโดไฟต์ *Collectotrichum fructicola* ไอโซเลท CMU-A109 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม L-tryptophan ในปริมาณ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิต IAA [9] ในขณะที่ราเอนโดไฟต์ *Collectotrichum gloeosporioides* CMU-AU 006 และ *Tulasnella* sp. CMU-SLP 007 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม L-tryptophan ในปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [10] ส่วนราเอนโดไฟต์ *Tulasnella* sp. CMU-NUT 013007 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม L-tryptophan ในปริมาณ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [10] จากผลการทดลองที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการผลิต IAA จากการศึกษานี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของราเอนโดไฟต์และปริมาณของ L-tryptophan ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการระบุชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกล้วยไม้
ลั่นมั่งกรด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่าเป็นราเอนโดไฟต์ที่
ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Ascomycota ได้แก่ *Fusarium oxysporum*
HRNP-F06, *Annulohypoxyton* sp. HRNP-F14, *Aspergillus*
versicolor HRNP-F17, HRNP-F21 และ *Annulohypoxyton*
viridistratum HRNP-F22 สอดคล้องกับรายงานที่พบว่า
ราเอนโดไฟต์ในรากกล้วยไม้จัดเป็นราในกลุ่ม Ascomycota ที่
มีสมาชิกมากกว่า 64 สกุล ในสภาพแวดล้อมที่มีความ
หลากหลายสูง สามารถพบได้ทั้งในกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้
อิงอาศัย [2] และมีรายงานว่าสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด
เช่น โรครากเน่าโคนเน่าในพืชวงศ์แตง มะเขือเทศ กล้วย
ปาล์มน้ำมัน เป็นต้น [33] และราบางชนิดสามารถสร้าง
สารพิษ (Mycotoxins) ที่ส่งผลต่อการเจ็บป่วยของมนุษย์ได้
เช่นสกุล *Fusarium*, *Aspergillus* เป็นต้น [34]

จากการทดลองในครั้งนี้ยังพบว่าราเอนโดไฟต์
Annulohypoxyton sp. HRNP-F14 และ *F. oxysporum*
HRNP-F06 สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้
ลั่นมั่งกรในสภาพปลอดทดลองได้ โดยเมล็ดกล้วยไม้ลั่นมั่งกร
พัฒนาเข้าสู่ในระยะที่ 2 คือเอ็มบริโอขยายขนาดเพิ่มขึ้น
มีรายงานว่าราเอนโดไฟต์ *F. oxysporum* สามารถกระตุ้นการ
งอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินสกุล *Cypripedium* [7] และส่งเสริม
การพัฒนาโปรโตคอร์มไปเป็นต้นอ่อนได้ในกล้วยไม้ *Eulophia*
alta [35] นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบราเอนโดไฟต์
F. oxysporum ในกล้วยไม้ *Pecteilis susanae* [36] รา
เอนโดไฟต์ในสกุล *Annulohypoxyton* เป็นรากกลุ่มผู้ย่อย
สลายมีบทบาทที่สำคัญต่อระบบนิเวศและการสร้างสารทุติยภูมิ
(Secondary metabolites) สร้างเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่อพืช
รวมทั้งสามารถผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้ [37]
จากการทดลองพบว่าราเอนโดไฟต์ *Annulohypoxyton* sp.
HRNP-F14 สามารถผลิต IAA ที่ความเข้มข้นสูงสุด เท่ากับ
16.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ทำให้เมล็ดได้รับการกระตุ้นการ
งอกและส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 3 คือระยะ
โปรโตคอร์มได้ ซึ่งราเอนโดไฟต์สกุล *Annulohypoxyton*
สามารถพบได้ในเมล็ด และมีความสัมพันธ์ระหว่างรากับ
กล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัย นอกจากนี้ยังมีราที่มีบทบาทเป็น
ผู้ย่อยสลายเนื้อไม้ในซากพืชบนผืนป่าโดยได้รับแหล่งคาร์บอน
จากซากไม้เหล่านี้ [38] ได้แก่ สกุล *Cladosporium*,
Cylindrocladium, *Fusarium*, *Hypocrea*, *Penicillium*,
Xylaria และ *Annulohypoxyton* [39] ในขณะเดียวกันรา

เอนโดไฟต์สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไลติก (Lytic enzymes)
ได้แก่ อะไมเลส (Amylase) ไลเปส (Lipase) เซลลูเลส
(Cellulase) และเพคตินเนส (Pectinase) [40] เพื่อช่วยย่อย
ลิกนิน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงของเปลือกหุ้มเมล็ด (Seed
coat) [41] ซึ่งเปลือกหุ้มเมล็ดในกล้วยไม้สกุล *Habenaria*
พัฒนามาจากผนังอวุลสองชั้น (Bitegmic ovule) โดยที่ผนัง
อวุลชั้นใน (Inner integuments) มีกระบวนการต้านทาน
การผ่านเข้ามาของราเอนโดไฟต์ที่เข้ากันไม่ได้ (Incompatible
endophyte fungi) แต่ยอมให้ราเอนโดไฟต์ที่เข้ากันได้
(Compatible endophyte fungi) แทะเส้นใยผ่านเยื่อหุ้ม
เมล็ดเข้าสู่เมล็ดบริเวณส่วนฐานของเมล็ด ทำให้ความชื้นหรือน้ำ
จากภายนอกสามารถแพร่ผ่านเข้ามาได้ ในขณะที่เดียวกัน
ราเอนโดไฟต์สร้างเส้นใยในช่องว่างระหว่างเมล็ดและเอ็มบริโอ
[41], [42] รวมทั้งส่งผ่านไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และสาร
ควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน คือ IAA [43] ที่
ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์และขยายขนาดของเซลล์เอ็มบริโอ
ในกระบวนการเกิดเอ็มบริโอ (Embryogenesis) และเกิดการ
งอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ [44] ดังนั้นการเพาะเมล็ดกล้วยไม้
ร่วมกับราเอนโดไฟต์ในสภาพปลอดทดลอง (Co-culture *in*
vitro) จึงเป็นการจำลองหรือเลียนแบบการงอกของเมล็ด
กล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติที่ต้องอาศัยเอนไซม์ต่าง ๆ [40]
และสารควบคุมการเจริญเติบโตจากราเอนโดไฟต์ นอกจากนี้
ราเอนโดไฟต์แต่ละชนิดในรากกล้วยไม้สามารถสร้างสาร
ควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมในแต่ละช่วง
การเจริญเติบโตของกล้วยไม้แตกต่างกัน [45] เนื่องจาก
ปริมาณ Tryptophan และปริมาณ IAA ที่เหมาะสมมีผลต่อ
การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดังรายงานที่กล่าวมาแล้วข้างต้น
ดังนั้นแนวทางในการฟื้นฟูและการอนุรักษ์กล้วยไม้ที่เสี่ยงต่อ
การสูญพันธุ์หรือใกล้สูญพันธุ์ มีโอกาสรอดชีวิตเพิ่มขึ้นใน
ธรรมชาติทั้งในและนอกถิ่นกำเนิด (*in situ* and *ex situ*)
[46], [47] ควรมีงานวิจัยหรือการทดลองที่จะทำให้เมล็ด
กล้วยไม้ได้รับ IAA ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น เช่น การเพิ่มความ
เข้มข้นของ L-tryptophan หรือการเพาะเมล็ดกล้วยไม้
ร่วมกับสารสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Annulohypoxyton*
sp. HRNP-F14 และ *Fusarium oxysporum* HRNP-F06 ที่
เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม L-tryptophan ที่เหมาะสม [10]
เพื่อที่จะทำให้เมล็ดกล้วยไม้ลั่นมั่งกรสามารถพัฒนาไปเป็นกล้า
กล้วยไม้ที่แข็งแรง ทนต่อสภาพแวดล้อมเมื่อย้ายออกปลูกและ
เพิ่มประชากรในถิ่นกำเนิดได้

5. บทสรุป

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกราเอนโดไฟต์จากรากกล้วยไม้ลิ้นมังกรได้จำนวน 26 ไอโซเลท โดยมี 6 ไอโซเลทที่สามารถผลิต IAA ได้ในช่วงความเข้มข้น 1.01 ถึง 16.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ ไอโซเลท HRNP-F01, HRNP-F06, HRNP-F14, HRNP-F17, HRNP-F21 และ HRNP-F22 การระบุชนิดด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer ของ ribosomal DNA สามารถระบุราเอนโดไฟต์ได้เป็น *Ganoderma williamsianum* HRNP-F01, *Fusarium oxysporum* HRNP-F06, *Annulohypoxyton* sp. HRNP-F14, *Aspergillus versicolor* HRNP-F17, *Aspergillus versicolor* HRNP-F21 และ *Annulohypoxyton viridistratum* HRNP-F22 โดยราไอโซเลท HRNP-F01 จัดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycota ส่วนราไอโซเลท HRNP-F06, HRNP-F14, HRNP-F17, HRNP-F21 และ HRNP-F22 จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycota ราเอนโดไฟต์ *Annulohypoxyton* sp. HRNP-F14 ผลิต IAA ได้ความเข้มข้นสูงสุด เท่ากับ 16.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้สูงสุด เท่ากับ 98.02 เปอร์เซ็นต์ และส่งเสริมการพัฒนาของเมล็ดเข้าสู่ระยะที่ 3 คือระยะโปรโตคอร์รมได้ ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ลิ้นมังกรสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกระตุ้นและส่งเสริมการงอกและพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ที่มีสถานภาพใกล้เสี่ยงสูญพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงทั้งในและนอกถ้ำน้ำก้นเพื่อการเพิ่มประชากรและอัตราการรอดชีวิตในธรรมชาติที่มีสภาพแวดล้อมที่ผันแปรได้

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ (Grant no.1101/2562) มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ที่สนับสนุนสถานที่ทำการวิจัย และอุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิ้ว จังหวัดจันทบุรี ที่อนุญาตให้ดำเนินการวิจัยในพื้นที่ (ทส 0907.4/27408)

7. References

- [1] Bhatti, S. and Thakur, M. 2022. An overview on orchids and their Interaction with endophytes. **The Botanica Review**. 88: 485-504.
- [2] Ma, X. and et al. 2015. Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. **Current Science**. 109(1): 72-87.
- [3] Sarsaiya, S., Shi, J. and Chen, J. 2019. A comprehensive review on fungal endophytes and its dynamics on Orchidaceae plants: current research, challenges, and future possibilities. **Bioengineered**. 10(1): 316-334.
- [4] Chen, J. and et al. 2011. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae). **World Journal Microbiology and Biotechnology**. 27: 1009-1016.
- [5] Khan, A.L. and et al. 2012. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**. 12: 3.
- [6] Shah, S. and et al. 2022. Colonization with non-mycorrhizal culturable endophytic fungi enhances orchid growth and indole acetic acid production. **BMC Microbiology**. 22: 101.
- [7] Vujanovic, V. and et al. 2000. Viability testing of orchid seeds and the promotion of colouration and germination. **Annals of Botany**. 86(1): 79-86.
- [8] Jaroszuk-Scisel, J., Kurek, E. and Trytek, M. 2014. Efficiency of indoleacetic acid, gibberellic acid and ethylene synthesized *in vitro* by *Fusarium culmorum* strains with different effects on cereal growth. **Biologia**. 69(3): 281-292.
- [9] Numponsak, T. and et al. 2018. Biosynthetic pathway and optimal conditions for the production of indole-3-acetic acid by an endophytic fungus, *Colletotrichum fruticicola* CMU-A109. **PLoS One**. 13(10): e0205070.
- [10] Chutima, R. and Lumyong, S. 2012. Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. **Symbiosis**. 56: 35-44.
- [11] Chand, K. and et al. 2020. Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid *Vanda cristata*. **Plant Signaling & Behavior**. 15: 1744294.

- [12] Deepthi, A.S. and Ray, J.G. 2021. Ecological relevance of the endophytic fungal diversity in velamen roots of tropical epiphytic orchids. **Czech Mycology**. 73(1): 91-108.
- [13] Avhad, A., Patil, N. and Zunjarrao, R. 2023. Isolation and identification of rhizospheric and endophytic fungi associated with *Habenaria rrachyphylla* (Lindl.) Aitch.: An endemic and rare orchid of the Western Ghats of Maharashtra, India. **Biological Forum-An International Journal**. 15(5): 1535-1542.
- [14] Tsavkelova, E. and et al. 2012. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**. 49(1): 48-57.
- [15] Suwattanachai, N., Posoongnoen, S. and Thummavongsa, T. 2022. Effects of endophytic fungal extract on seed germination and seedling growth of *Aerides houlletiana* Rchb.f. (Orchidaceae) *in vitro*. **Burapha Science Journal**. 27(1): 467-480. (in Thai)
- [16] Kurzweil, H. 2009. The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in Thailand. **Thai Forest Bulletin (Botany)**. 37: 7-105.
- [17] Jolman, D. and et al. 2022. The challenges of growing orchids from seeds for conservation: An assessment of asymbiotic techniques. **Applications in Plant Sciences**. 10(5): e11496.
- [18] Khamchatra, N. and et al. 2016. Symbiotic seed germination of an endangered epiphytic slipper orchid, *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein. from Thailand. **South African Journal Botany**. 104: 76-81.
- [19] Masuhara, G. and Katsuya, K. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). **New Phytologist**. 127: 711-718.
- [20] Rahman, A. and et al. 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. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 74(11): 2202-2208.
- [21] Stewart, S. and Zettler, L. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. **Aquatic Botany**. 72(1): 25-35.
- [22] Liu, D. and et al. 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. 38 (1): 471.
- [23] Toju, H. and et al. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. **PLoS One**. 7(7): e40863.
- [24] Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. 16(2): 111-120.
- [25] Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. 33(7): 1870-1874.
- [26] Vega, F.E. and et al. 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**. 3(3): 122-138.
- [27] Aly, A.H., Debbab, A. and Proksch, P. 2011. Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 90(6): 1829-1845.
- [28] Shah, S. and et al. 2019. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic fungi from the roots of *Dendrobium moniliforme*. **Plants**. 8(1): 5.

- [29] Jahn, L., Hofmann, U. and Ludwig-Muller, J. 2021. Indole-3-acetic acid is synthesized by the endophyte *Cyanoderma asteris* via a tryptophan-dependent and -independent way and mediates the interaction with a non-host plant. **International Journal of Molecular Sciences**. 22(5): 2651.
- [30] Duca, D. and et al. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 106(1): 85-125.
- [31] Carreno-Lopez, R. and et al. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. **Molecular & General Genetics: MGG**. 264(4): 521-530.
- [32] Nieto-Jacobo, M.F. and et al. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Frontiers in Plant Science**. 8: 102.
- [33] Michielse, C.B. and Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**. 10(3): 311-324.
- [34] Pfliegler, W.P. and et al. 2020. The Aspergilli and their mycotoxins: metabolic interactions with plants and the soil biota. **Frontiers in Microbiology**. 10: 2921.
- [35] Johnson, T.R. and et al. 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)-preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 90(3): 313-323.
- [36] Chutima, R. and et al. 2011. Endophytic fungi from *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. **Mycorrhiza**. 21(3): 221-229.
- [37] Singh, V.K. and Kumar, A. 2023. Secondary metabolites from endophytic fungi: production, methods of analysis, and diverse pharmaceutical potential. **Symbiosis**. 90: 111-125.
- [38] Kuhnert, E. and et al. 2017. Phylogenetic and chemotaxonomic resolution of the genus *Annulohypoxylon* (Xylariaceae) including four new species. **Fungal Diversity**. 85(1): 1-43.
- [39] Pecoraro, L. 2021. Fungal diversity driven by bark features affects phorophyte preference in epiphytic orchids from southern China. **Scientific Reports**. 11(1): 11287.
- [40] Mishra, R. and et al. 2019. Endophytic fungi and their enzymatic potential. In: Singh, B.P. (ed) **Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges**. Cham: Springer International Publishing.
- [41] Lee, Y.I. and Yeung, E.C. 2023. The orchid seed coat: A developmental and functional perspective. **Botanical Studies**. 64(1): 27.
- [42] Chen, X.G. and et al. 2022. What role does the seed coat play during symbiotic seed germination in orchids: an experimental approach with *Dendrobium officinale*. **BMC Plant Biology**. 22: 375.
- [43] Fu, S.F. and et al. 2015. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. **Plant Signal & Behavior**. 10(8): e1048052.
- [44] Li, M. and et al. 2022. Auxin biosynthesis maintains embryo identity and growth during baby boom-induced somatic embryogenesis. **Plant Physiology**. 188(2): 1095-1110.
- [45] Xia, Y. and et al. 2019. Culturable endophytic fungal communities associated with plants in organic and conventional farming systems and their effects on plant growth. **Scientific Reports**. 9: 1669.
- [46] Phillips, R.D., Reiter, N. and Peakall, R. 2020. Orchid conservation: from theory to practice. **Annals of Botany**. 126: 345-362.
- [47] Vitt, P. and et al. 2023. Global conservation prioritization for the Orchidaceae. **Scientific Reports**. 13: 6718.