



การผลิต IAA โดยเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบไม้ผลและส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Zephyranthes rosea* Lindl. ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Production of IAA by Fruit Leaves Endophytic Fungi and Promoted Growth of *Zephyranthes rosea* Lindl. *in vitro*.

จรินทร์ พุดงาม*, อมรพันธ์ แก้วศรีนวล

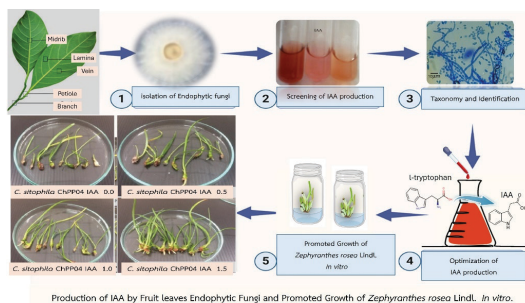
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช 80110

Jarin Poodngam*, Amornpan Kaewsrinuan

Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakonsrihammarat 80110.

Received 2 September 2024; Received in revised 12 December 2024; Accepted 19 December 2024

GRAPHICAL ABSTRACT



Production of IAA by Fruit leaves Endophytic Fungi and Promoted Growth of *Zephyranthes rosea* Lindl. *in vitro*.

ABSTRACT

Endophytic fungi in symbiotic association with their host plant are well known to enhance plant growth. Indole-3-acetic acid (IAA), a key plant hormone synthesized by fungi, regulates nearly all aspects of plant growth and development. This study investigated the plant growth-promoting activities of endophytic fungi isolated from various parts of *Garcinia mangostana* Linn, *Nephelium lappaceum* Linn, *Artocarpus altilis* (Parkinson ex F.A.Zorn) Fosberg, *Artocarpus integer*, *Artocarpus heterophyllus* Lam, *Lansium domesticum* Corr and *Lansium parasiticum* (Osbeck) K.C.Sahni & Bennet. The fungi were cultured on potato dextrose agar (PDA) supplemented with tetracycline and ampicillin at 50 mg/L. All endophytic fungi strains were screened for their ability to produce

plant growth-promoting hormones, particularly IAA. Out of 53 isolates, 26 were found to produce IAA. The endophytic fungi isolate *Chrysonilia sitophila* ChPP04 produced the highest level of IAA (675.97 ± 0.32 $\mu\text{g/mL}$) when grown in Czapek broth supplemented with 1.50 mg/L of L-tryptophan. The biological activity of IAA from *C. sitophila* ChPP04 was tested on the growth of *Zephyranthes rosea* Lindl., cultured on MS medium supplemented with 2.0 mg/mL BA, 1.5 mg/L IAA, and 1.0 mg/L NAA. The explants responded with both shoot and root development. On average, each explant produced 7.11 ± 1.98 shoots with an average length of 2.90 ± 1.10 cm, 1.90 ± 3.11 roots with a root length of 1.40 ± 2.21 cm. These results suggest that IAA produced by endophytic fungi can promote plant growth in Amaryllidaceae species *in vitro*.

คำสำคัญ

ราเอนโดไฟต์;
กรดอินโดลอะซิดิก;
บัวดิน;
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Keywords

Endophytic fungi;
IAA;
Zephyranthes spp;
Tissue culture

บทคัดย่อ

ราเอนโดไฟต์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแบบพึ่งพาอาศัยโดยไม่ก่อให้เกิดอาการโรค สามารถสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิดิก(IAA)ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช การศึกษานี้เพื่อศึกษากิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของบัวดินในสภาพปลอดเชื้อโดยเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของใบมังคุด เงาะ สาก จำปาตะ ขนุน ลองกอง และ ลำสาดี บนอาหาร PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะ tetracycline และ ampicillin เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 53 ไอโซเลทที่แยกได้ มีเพียง 26 ไอโซเลท ที่ผลิต IAA ได้ โดยรา *Chrysonilia sitophila* ChPP04 ที่แยกจากกันใบจำปาตะ ผลิต IAA ได้สูงสุด 675.97 ± 0.32 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมในอาหาร Czapek broth ที่เติม L-tryptophan เข้มข้น 1.50 มิลลิกรัม/ลิตร ประสิทธิภาพ IAA จากรา *C. sitophila* ChPP04 ต่อการเจริญของบัวดินผสมอาหาร MS เติมน้ำ BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตรร่วมกับ IAA เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดจำนวน 7.11 ± 1.98 ยอด ความยาวยอด 2.90 ± 1.10 เซนติเมตร และชักนำให้เกิดรากโดยใช้ NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนราก 1.90 ± 3.11 ราก มีความยาวราก 1.40 ± 2.21 เซนติเมตร จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า IAA ที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์มีศักยภาพในการเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชในวงศ์ Amaryllidaceae ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

*ผู้รับผิดชอบบทความ: jarin.p@rmuts.ac.th

DOI: 10.14456/tstj.2025.23

1. บทนำ

ราเอนโดไฟท์ (Endophytic fungi) เป็นราที่มีช่วงชีวิตหนึ่งหรือตลอดทั้งชีวิตอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแทบทุกสายพันธุ์ โดยจะมีการสร้างเส้นใยแทรกเข้าไปบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืช (Intercellular space) ในชั้นมีโซฟิลล์ (Mesophyll) และชั้นพาราไคมะ (Parenchyma) ของพืชเจ้าบ้านที่ไม่ทำให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้น ๆ [1] ราเอนโดไฟท์จะผลิตสารทุติยภูมิ เช่น ฟลาโวนอยด์ สารเคมีที่เป็นปฏิปักษ์ และเอนไซม์ มีบทบาทสำคัญในการลดความเครียดทางชีวภาพ ช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานศัตรูพืช เพิ่มความแข็งแรงและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Abiotic stress) [2,3] ราเอนโดไฟท์หลายชนิดสามารถสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิดิก (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน (Auxin) โดยอาศัยทริปโตเฟน (Tryptophan) เป็นสารตั้งต้น มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชของพืช ได้แก่ การยืดขยายตัวและการแบ่งเซลล์ การพัฒนาของเนื้อเยื่อและการตอบสนองต่อแสงและแรงโน้มถ่วง จะช่วยให้พืชทนทานและหลีกเลี่ยงความเครียด [4] การผลิตพืชเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีคุณภาพสูงจำเป็นต้องพึ่งพาสารออกซินสังเคราะห์ ซึ่งมีต้นทุนสูงและอาจส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม [5] มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Amaryllidaceae โดยใช้สารเร่งการเจริญเติบโตทางการค้า เช่น วานแอสกอติค [6] วานิลลิค [7,8] บอนสี [9,10] ฟลอปิ่ง [11,12] แต่ยังไม่พบรายงานใช้สารเร่งการเจริญเติบโตจากราเอนโดไฟท์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลนี้ ทำให้มีความสนใจนำราเอนโดไฟท์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช [13] การใช้ IAA ที่ผลิตจากราเอนโดไฟท์จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งช่วยลดต้นทุนในการผลิตพืชปลอดเชื้อโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากใบไม้ผลเพื่อศึกษาความสามารถในการผลิต IAA และนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อใบดิน โดยการวิจัยจะเริ่มต้นจากการเก็บตัวอย่างใบไม้ผลที่สำคัญทางภาคใต้ คือ มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn) เงาะ (*Nephelium lappaceum* Linn.) สาเก (*Artocarpus altilis* (Parkinson ex F.A.Zorn) Fosberg) จำปาตะ (*Artocarpus integer* Merr.) ขนุน (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) ลองกอง (*Lansium domesticum* Corres.) และ ลางสาด (*Lansium parasiticum* (Osbeck) K.C.Sahni & Bennet) นำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้มาประเมินความสามารถในการผลิต IAA และวิเคราะห์ผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อใบดินสีชมพู (*Zephyranthes rosea* Lindl.) ที่ขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การวิจัยครั้งนี้มีความสำคัญในการพัฒนากระบวนการผลิตพืชที่ยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และใช้เป็นแนวทางในการนำ IAA ที่ผลิตจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ไปพัฒนาเป็นสารส่งเสริมการเจริญของพืชเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวงศ์ Amaryllidaceae หรือพืชชนิดอื่นต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1. การแยกราเอนโดไฟท์

เก็บใบมังคุด เงาะ สาเก จำปาตะ ขนุน ลองกอง และ ลางสาด (รวมกิ่ง) จากต้นที่ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและไม่มีอาการของโรคภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช ล้างน้ำให้สะอาด ตัดใบพืชแต่ละส่วนประมาณ 1x1 ตารางเซนติเมตร ตามตำแหน่งในภาพที่ 1 ห่อด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ แช่ในแอลกอฮอล์ 95 % 1 นาที โขติเยมไฮเปอร์คลอไรด์ 3 % นาน 7 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อ แช่ในแอลกอฮอล์ 95 % อีก 30 วินาที [14] ล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำมาวางบนจานอาหาร PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะ tetracycline และ ampicillin เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร [15] จานละ 3 ตำแหน่ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-5 วัน

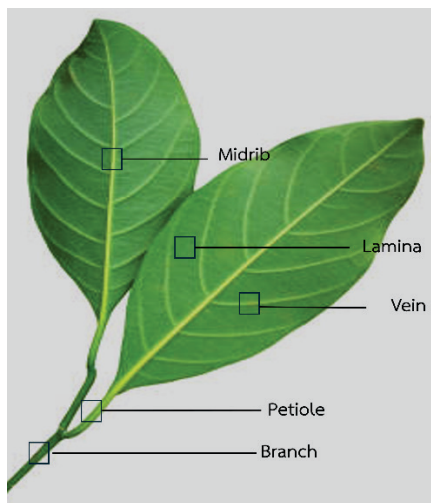


Figure 1 Position of leaf sections for endophytic fungi isolation.

2.2 การตรวจสอบการผลิตสาร Indole-3-Acetic Acid (IAA)

นำเชื้อราที่แยกได้อายุ 3-4 วัน บนอาหาร PDA ใช้ใบมีดปลอดเชื้อตัดขอบโคโลนี ขนาด 1x1 ตร. เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ถ่ายลงในอาหาร Czapek broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่เติม Tryptophan (0.1 กรัมต่อลิตร) pH 6.5 เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน กรองน้ำเลี้ยงด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ดูดส่วนใส 1 มิลลิลิตร หยดสาร Salkowski reagent 4 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส 25 นาที หากสารผสมเปลี่ยนเป็นสีชมพู/สีแดง แสดงว่าผลิต IAA ได้ นำส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PC ($\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ใช้น้ำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Tryptophan ไม่มีเชื้อเป็น Blank นำมาเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานของ IAA [16]

2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกเชื้อรา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ที่ผลิต IAA ได้สูงสุด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo และ Compound โดยวิธี Slide culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ Mount slide ด้วยน้ำยา Lactophenol cotton blue บันทึกภาพลักษณะลักษณะที่สำคัญเช่น รูปร่างสปอร์ ลักษณะเส้นใย สำหรับเอนโดไฟท์ที่ไม่สามารถสร้างสปอร์จะจัดอยู่ในพวก Sterile form เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast protein Soluble starch (YpSs) [17] ตรวจดูลักษณะทางโคโลนี เช่นลักษณะการเจริญ สี กลิ่น ขนาดโคโลนี การสร้าง Pigment การเปลี่ยนสีอาหาร ฯลฯ บันทึกรายละเอียด และถ่ายภาพเชื้อราบนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ และนำมาจัดจำแนกชนิดเชื้อราโดยอาศัยลักษณะโครงสร้างและลักษณะโคโลนี [18, 19, 20]

2.4 ศึกษาปริมาณของ L-tryptophan ที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA

เลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการผลิต IAA มากที่สุด ในอาหาร Czapek broth (120 มิลลิลิตร) ที่มี L-tryptophan 0, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 กรัม/ลิตร pH 6.5 เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน ครึ่งละ 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 15 นาที เก็บส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PC 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Tryptophan แต่ไม่มีเชื้อเป็นหลอดควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple test (DMRT)

2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของ IAA จากเชื้อรา ที่แยกได้ต่อการเจริญของบัวดินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.5.1 ปริมาณ IAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอด

นำชิ้นส่วนของหัวบัวดินสีชมพู มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 20 % 10 นาที ตามด้วยคลอโรกซ์ 10% 5 นาที เติม Tween 20 ปริมาณ 1- 2 หยด ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง นำมาผ่าหัวตามยาวผ่านตายอดเป็น 4 ส่วน เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง [21] เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ IAA จากเชื้อราที่สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด (ผลจากข้อ 2.4) ตั้งแต่ 0 - 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้ชิ้นส่วนหัวบัวดินที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม IAA ทางการค้า 1.5 มิลลิกรัม/ลิตรเป็น Positive control เลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงความเข้ม 45 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วนเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนการเกิดยอด และความสูงยอด วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

2.5.2 ปริมาณ NAA เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก

คัดเลือกชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการชักนำให้เกิดยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ที่เหมาะสมจากชุดการทดลองที่ 2.5.1 ร่วมกับการเติม NAA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ใช้ชิ้นส่วนหัวบัวดินที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม IAA ทางการค้า 1.5 มิลลิกรัม/ลิตรเป็น Positive control เพื่อชักนำให้เกิดราก ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนและความยาวราก วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

3. ผลและวิจารณ์

3.1 การแยกราเอนโดไฟต์จากใบไม้ผล

การแยกราเอนโดไฟต์บริเวณ เส้นกลางใบ (Midrib) เส้นใบ (Vein) แผ่นใบ (Lamina) ก้านใบ (Petiole) และกิ่ง (Branch) จากใบมังคุด เงาะ สาก จำปาตะ ขนุน ลองกอง และกลางสาด สามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 53 ไอโซเลท (Figure 2) พบราเอนโดไฟต์ที่ก้านใบมากที่สุด คือ 18 ไอโซเลท (33.96%) พบที่ กิ่ง ตัวใบ เส้นกลางใบ และเส้นใบ รองลงมาจำนวน 11 (20.75%), 10 (18.87%), 7 (13.21%) และ 7 (13.21%) ไอโซเลท ตามลำดับ เนื่องจากอาหารที่ใบสร้างขึ้นจะถูกส่งลำเลียงไปตามเส้นกลางใบ และเส้นใบ แล้วไปรวมกันที่บริเวณก้านใบ อาจมีผลในการแยกราเอนโดไฟต์ได้มากที่สุด ซึ่งแตกต่างจากบริเวณเส้นใบและเส้นกลางใบ จะเป็นบริเวณที่แยกราเอนโดไฟต์ได้น้อยที่สุด เนื่องจากบริเวณนั้นจะทำให้หน้าที่ลำเลียงธาตุอาหารและน้ำ [22] ใบพืชที่แยกราเอนโดไฟต์ได้มากที่สุด คือ ใบสาเก ซึ่งอัตราการแยกราเอนโดไฟต์ที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อและชนิดของพืชที่ต่างกัน อาจเนื่องมาจากมีราเอนโดไฟต์บางชนิดที่มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ [23] หรือจำเพาะกับชนิดของพืชอาศัย [24] หากเนื้อเยื่อพืชมีอาหารที่เหมาะสมกับชนิดของราเอนโดไฟต์ หรือมีกลไกการป้องกันการเข้าอยู่อาศัยของราเอนโดไฟต์น้อย จะมีโอกาสพบราเอนโดไฟต์จำนวนมาก [25]

3.2 การคัดกรองการผลิตสาร IAA เบื้องต้นของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้

การคัดกรองการผลิตสาร IAA เบื้องต้นของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในอาหารเหลว Czapek broth ที่ผสม L-tryptophan เข้มข้น 0.1 กรัม/ลิตร พบว่า ราเอนโดไฟต์สามารถผลิต IAA ได้จำนวน 26 ไอโซเลท คิดเป็น

49.06 % (Figure 2) ราเอนโดไฟต์ที่ผลิต IAA มากที่สุด 3 อันดับ คือไอโซเลท ChPP04 แยกจากก้านใบจำปาตะ รongลงมาคือไอโซเลท BrPP03 แยกจากก้านใบสาเก และ ไอโซเลท JaBP05 แยกจากกิ่งของใบขนุน ปริมาณ IAA ที่ผลิตได้ เท่ากับ 617.63 ± 0.32 , 456.94 ± 0.21 และ 327.98 ± 0.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ เมื่อ

เทียบกับงานวิจัยของ Khunna, S. et al. [26] ที่ผลิต IAA จากเชื้อจุลินทรีย์ *Mucor ellipsoideus* ได้สูงสุด เท่ากับ 2.548 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรในอาหาร PDB ที่เติม L-tryptophan เข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์ในพืชวงศ์ Moraceae มีศักยภาพสูง ในการผลิต IAA ดีกว่าราเอนโดไฟต์จากพืชวงศ์อื่น

Table 1 Amount of IAA synthesized by different strains of endophytic fungi isolated from different parts of fruit leaves.

Fruit Leaf	Parts of the leaf	Endophytic fungi isolates	Concentration of IAA ($\mu\text{g/mL}$) Mean $\pm$ S.D.
<i>Garcinia mangostana</i> Linn	Midrib	MaMP01	$104.78 \pm 0.94^{\text{cd}}$
	Midrib	MaVP01	$32.21 \pm 0.12^{\text{de}}$
	Lamina	MaLP01	$35.96 \pm 0.84^{\text{de}}$
	Petiole	MaPP01	$159.23 \pm 0.21^{\text{cd}}$
	Branch	MaBP01	$151.31 \pm 0.21^{\text{cd}}$
<i>Nephelium lappaceum</i> Linn.	Lamina	RaLP02	$51.80 \pm 0.12^{\text{d}}$
	Petiole	RaPP02	$101.73 \pm 0.21^{\text{cd}}$
<i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson ex F.A.Zorn) Fosberg	Lamina	BrLP03	$58.19 \pm 0.21^{\text{d}}$
	Petiole	BrPP03	$456.94 \pm 0.21^{\text{b}}$
	Branch	BrBP03	$313.81 \pm 0.21^{\text{c}}$
<i>Artocarpus integer</i> Merr.	Lamina	ChLP04	$37.50 \pm 0.42^{\text{de}}$
	Petiole	ChPP04	$617.63 \pm 0.32^{\text{a}}$
	Branch	ChBP04	$158.40 \pm 0.42^{\text{cd}}$
<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	Midrib	JaMP05	$62.77 \pm 0.42^{\text{d}}$
	Lamina	JaLP05	$42.63 \pm 0.32^{\text{de}}$
	Petiole	JaPP05	$122.15 \pm 0.20^{\text{cd}}$
	Branch	JaBP05	$327.98 \pm 0.42^{\text{bc}}$
<i>Lansium domesticum</i> Corres.	Vein	LoVP06	$61.38 \pm 0.32^{\text{d}}$
	Lamina	LoLP06	$54.44 \pm 0.21^{\text{d}}$
	Petiole	LoPP06	$185.48 \pm 0.42^{\text{cd}}$
	Branch	LoBP06	$231.10 \pm 0.20^{\text{c}}$
<i>Lansium parasiticum</i> (Osbeck) K.C.Sahni & Bennet	Midrib	LaMP07	$152.70 \pm 0.44^{\text{cd}}$
	Vein	LaVP07	$112.77 \pm 0.21^{\text{cd}}$
	Lamina	LaLP07	$112.84 \pm 0.12^{\text{cd}}$
	Petiole	LaPP07	$159.65 \pm 0.20^{\text{cd}}$
	Branch	LaBP07	$52.21 \pm 0.43^{\text{d}}$

Note: Mean $\pm$ standard deviation for three replicates.

The numerical values followed by the same letter in the vertical direction were not statistically different at the $P < 0.05$ level by CRD

คัดเลือกราเอนโดไฟต์ ไอโซเลท ChPP04 ที่มีความสามารถในการผลิต IAA มากที่สุด เพียงไอโซเลทเดียวมาศึกษาทางสัณฐานวิทยาและจำแนกเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ราเอนโดไฟต์ ChPP04 มีลักษณะโคโลนี เส้นใยสีขาวฟู เจริญเร็ว (Figure 2) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยไม่มีสี (Hyaline) มีผนังกัน (Septate) สปอร์รูปร่างกลม (Ovoid) เชื่อมต่อกันเป็นสายโซ่ เทียบเคียงลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกับ *Chrysonilia sitophila* และ หาสภาพที่เหมาะสมในการผลิต IAA ของ *C. sitophila* ChPP04 ต่อไป

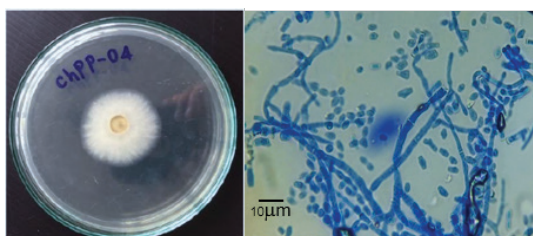


Figure 2 Morphological characteristics of endophytic fungi *Chrysonilia sitophila* ChPP04

3.3 ปริมาณ L-tryptophan ที่เหมาะสมต่อการสร้างสาร IAA ของรา *C. sitophila* ChPP04

ราเอนโดไฟต์ *C. sitophila* ChPP04 สามารถผลิต IAA ได้ดีที่สุดในอาหารเหลว Czapek broth ที่ผสม L-tryptophan ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Table 2) มีการผลิต IAA ในปริมาณที่สูงตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อสามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูงสุด $675.97 \pm$

0.32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 7 วัน และมีแนวโน้มการผลิต IAA เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม L-tryptophan 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูงสุดคือ 799.18 ± 65.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ปริมาณของ IAA จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ L-tryptophan เพิ่มขึ้นเกินกว่านี้ [27] ขณะที่ความเข้มข้นของ L-tryptophan ที่ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรทำให้ *Astraeus odoratus*, *Pisolithus albus* และ *Scleroderma sinnamariense* สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด [28] ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ IAA ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบพืชกว่า 80% ใช้สารตั้งต้นคือ L-tryptophan ผ่านวิถี indole-3-acetamide (IAM) โดยเชื้อราจะเปลี่ยน Tryptophan เป็น IAM ถูกควบคุมเอนไซม์ Tryptophan-2-monooxygenase ตามด้วยการไฮโดรไลซิส IAM เป็น IAA ขึ้นอยู่กับระดับของ Tryptophan การเพิ่ม L-tryptophan ลงไปในอาหารทำให้เชื้อราสามารถผลิต IAA ได้สูงขึ้น โดยศักยภาพในการผลิต IAA ของราเอนโดไฟต์มีความแตกต่างกันตามชนิดของราเอนโดไฟต์ด้วย หน้าที่หลักของ IAA ในจุลินทรีย์คือการควบคุมการเจริญเติบโต โดย IAA ที่มีความเข้มข้นต่างกันจะส่งผลทั้งส่งเสริมและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นอกจากจะออกฤทธิ์โดยตรงต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แล้ว IAA ยังสามารถทำหน้าที่เป็นปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย [29, 30]

Table 2 Amount of L-tryptophan concentration for IAA production by *C. sitophila* ChPP04 in Czapek broth.

L-tryptophan Concentrations (mg/mL)	IAA concentration (µg/mL)						
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
0.00	26.52 ± 0.21 ^{0d}	29.71 ± 0.64 ^d	28.60 ± 0.21 ^d	27.77 ± 0.21 ^d	27.63 ± 0.12 ^d	27.14 ± 0.21 ^d	24.44 ± 0.21 ^d
0.10	294.23 ± 0.63 ^{cd}	358.60 ± 0.63 ^c	415.27 ± 0.21 ^b	616.80 ± 0.3 ^a	639.72 ± 0.32 ^a	648.81 ± 0.21 ^a	666.73 ± 0.42 ^a
0.50	458.12 ± 1.26 ^b	608.40 ± 11.39 ^a	639.99 ± 0.32 ^a	642.98 ± 0.21 ^a	660.41 ± 0.44 ^a	671.80 ± 0.32 ^a	676.80 ± 0.32 ^a
0.80	310.90 ± 0.96 ^c	488.12 ± 0.12 ^b	512.70 ± 0.32 ^b	616.80 ± 0.32 ^a	649.92 ± 0.32 ^a	658.26 ± 0.12 ^a	674.02 ± 0.21 ^a
1.00	458.88 ± 0.94 ^b	588.05 ± 0.32 ^b	628.19 ± 0.21 ^a	642.01 ± 0.32 ^a	666.73 ± 0.42 ^a	670.83 ± 0.32 ^a	671.66 ± 0.32 ^a
1.50	645.62 ± 0.43 ^a	647.98 ± 0.42 ^a	651.31 ± 0.21 ^a	656.31 ± 0.42 ^a	671.31 ± 0.21 ^a	674.23 ± 0.21 ^a	675.97 ± 0.32 ^a

Note: Mean ± standard deviation for three replicates.

The numerical values followed by the same letter in the vertical direction were not statistically different at the P<0.05 level by CRD

3.4 ประสิทธิภาพของ IAA จากเชื้อรา *C. sitophila* ChPP04 ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวดิน

3.4.1 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนหัวของบัวดิน

ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดยอดของหัวบัวดินของ IAA ที่ผลิตจากเชื้อรา *C. sitophila* ChPP04 กับ IAA ทางการค้าบนอาหารสูตร MS พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ IAA จากรา *C. sitophila* ChPP04 เข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร/ลิตร สามารถชักนำหัวบัวดินให้มีจำนวนยอดได้ดีที่สุด เฉลี่ย 3.80 ± 0.76 ยอดต่อชิ้นส่วน และ มีความยาวยอดเฉลี่ย 7.86 ± 0.94 ยอดต่อชิ้นส่วน (Table 3, Figure 3) รองลงมาคืออาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 1.0, 0.5 และ 0.0

มิลลิลิตร/ลิตร ตามลำดับ สูงกว่า IAA ทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญ การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินร่วมกับไซโทไคนินในอัตราส่วนที่เหมาะสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของพืชเจริญเติบโตได้ดี [31] สอดคล้องรายงานของ Buddharaksa, P. et al. [9] เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสี (*Caladium bicolor* Vent.) บนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 1.50 มิลลิลิตร/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดถึงร้อยละ 60 จึงคัดเลือกต้นบัวดินจากชุดการทดลองที่ระดับเข้มข้น BA 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA จากรา *C. sitophila* ChPP04 1.5 มิลลิลิตร/ลิตร มาทดสอบการชักนำให้เกิดรากลำดับถัดไป

Table 3 Efficacy of IAA from *C. sitophila* ChPP04 and commercial IAA in inducing shoot emergence of *Zephyranthes rosea* Lindl. after cultured on MS supplemented with BA 2 mg/L during 8 weeks

Phytohormone concentration (mL/L)	Shoot length (cm)	Number of shoot
MS+ BA 2.0	3.65 ± 2.46^b	1.98 ± 0.50^a
MS+ BA 2.0 + <i>C. sitophila</i> ChPP04 IAA 0.5	4.13 ± 2.04^{cd}	2.50 ± 0.45^b
MS+ BA 2.0 + <i>C. sitophila</i> ChPP04 IAA 1.0	5.56 ± 2.62^d	2.90 ± 0.88^b
MS+ BA 2.0 + <i>C. sitophila</i> ChPP04 IAA 1.5	7.86 ± 0.94^e	3.80 ± 0.76^c
MS+ BA 2.0 + commercial IAA 0.5	2.15 ± 0.24^a	1.92 ± 1.27^a
MS+ BA 2.0 + commercial IAA 1.0	2.27 ± 0.71^a	2.41 ± 0.74^b
MS+ BA 2.0 + commercial IAA 1.5	3.17 ± 0.21^b	2.54 ± 0.56^b

Note: Mean $\pm$ standard deviation for three replicates.

The numerical values followed by the same letter in the vertical direction were not statistically different at the $P < 0.05$ level by Duncan's Multiple Rang Test (DMRT).

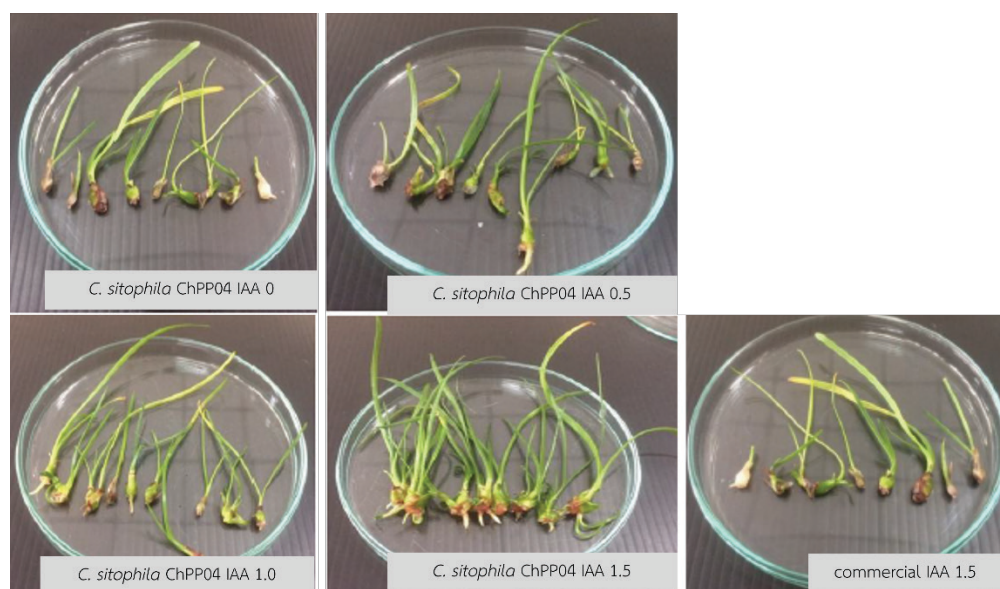


Figure 3 In vitro shoot and root formation of *Zephyranthes rosea* Lindl. after cultured on MS supplemented with BA and IAA from *C. sitophila* ChPP04 compared with commercial IAA, for 8 weeks.

3.4.2 การชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนหัวของ บัวดิน

ชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการชักนำให้เกิดยอดจากชุดการทดลองที่เติม IAA จากรา *C. sitophila* ChPP04 เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร นำมาชักนำให้เกิดราก บนอาหาร

สูตร MS ที่เติม IAA จากรา *C. sitophila* ChPP04 เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตรร่วมกับการเติม NAA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะเห็นว่าชิ้นส่วนยอดบัวดินที่เติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรสามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากและความยาวรากดี

ที่สุด มีจำนวนรากเฉลี่ย 7.50 ± 0.70 รากต่อต้น และ รากมีความยาวเฉลี่ย 12.92 ± 0.38 เซนติเมตร แตกต่างจากชุดการทดลองอื่น (Table 4) จากการสังเกตการเจริญของบัวดิน ในชุดการทดลองที่ใช้ IAA จากรา *C. sitophila* ChPP04 ที่ยังไม่มีการเติม NAA ก็สามารถเร่งการเกิดรากได้ เช่นเดียวกับการเติม NAA ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารส่งเสริมการเจริญเติบโตจากจากรา *C. sitophila* ChPP04 สามารถเร่งการเจริญเติบโตทั้งการเกิดยอดและรากได้พร้อมกัน ต้นอ่อนที่เจริญเติบโตบนอาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้ การที่มีทั้งต้นและรากเกิดขึ้นได้ในอาหารสูตรเดียวกัน เนื่องจาก NAA ที่จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน มีบทบาทในการควบคุมการขยายขนาดของเซลล์ กระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของรากพืช [32] Spaepen and Vander [29] แยกราเอนโดไฟต์ *C. sitophila* จากต้นยูคาลิปตัส พบว่า สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารฟลาโวนอยด์ สารประกอบ ฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง สามารถทนต่อความร้อนได้ดี

Table 4 In vitro Root formation of *Zephyranthes rosea* Lindl. after cultured on MS supplemented with various concentrations of NAA for 8 weeks

Phytohormone concentration (mg/mL)	Root length (cm)	Root number
MS+ NAA 0	0.49 ± 0.11^a	1.40 ± 0.14^a
MS+ NAA 0.5	0.74 ± 0.37^{ab}	5.73 ± 0.73^b
MS+ NAA 1.0	2.92 ± 0.38^c	7.50 ± 0.70^b

Note: Mean $\pm$ standard deviation for three replicates.
The numerical values followed by the same letter in the vertical direction were not statistically different at the $P < 0.05$ level by Duncan's Multiple Rang Test (DMRT).

4. สรุป

ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์ *C. sitophila* ChPP04 ที่แยกจากก้านใบจำปาตะ สามารถผลิตสาร IAA ได้สูงสุด 675.97 ± 0.32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารที่เติม L-tryptophan เข้มข้น 1.50 มิลลิกรัม/ลิตร มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของชิ้นส่วนบัวดินที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนยอด ความยาวยอด ได้ดีที่สุด และการเติม NAA เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากและความยาวรากมากที่สุด เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน IAA ทางการค้า แสดงให้เห็นว่า IAA ที่ผลิตจากราเอนโดไฟท์ *C. sitophila* ChPP04 มีศักยภาพในการเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในวงศ์ Amaryllidaceae ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดีกว่าสารมาตรฐาน IAA

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินโครงการวิจัย

6. References

- [1] Rodriguez, R.J., White, F.J., Arnold, A.E. and Redman, R.S., 2009, Fungal endophytes: diversity and functional roles, New Phytol. 182: 314-330.
- [2] Hashem, A.H., Attia, M.S., Kandil, E.K., Fawzi, M.M., Abdelrahman, A.S. and Khader, M.S., 2023, Bioactive compounds and biomedical applications of endophytic fungi: a recent review, Microb Cell Fact. 22(1): 1-23.

- [3] Devi, R., Verma, R., Dhalaria, R., Kumar, A., Kumar, D. and Puri, S., 2023, A systematic review on endophytic fungi and its role in the commercial applications, *Planta*. 257(4): 70-95.
- [4] Dwibedi, V., Rath, S.K., Joshi, M., Kaur, R., Kaur, G. and Singh, D., 2022, Microbial endophytes: Application towards sustainable agriculture and food security, *Appl Microbiol Biot*. 106(17): 5359-5384.
- [5] Debnath, S.C., Teixeira da Silva, J.A. and Bhowmik, N., 2006, Indole-3-acetic acid (IAA) and its role in plant tissue culture. *Plant Growth Regul*, 50(1): 1-19.
- [6] Behzad Kaviani and Sara Zakizadeh., 2013, Role of photoperiod on some growth characters of *Amaryllis* (*Hippeastrum johnsonii*), a bulbous plant, *Eur. J. Exp. Biol*. 3(1): 289-291.
- [7] Buddharaksa, P., Kaewdungtip, C. and U-Kong, W., 2011, In vitro culture of *Hippeastrum johnsonii* Bury and *Caladium bicolor* Vent, *Naresuan Univ. J. Sci. Technol*. 19(1): 18-23. (in Thai)
- [8] Khamrit, R. and Ngonphukhiao, S. 2020, In vitro shoot and root induction of *Hippeastrum johnsonii*, *Khon Kaen Agric. J.*, 48 Suppl 1: 1025-1030. (in Thai)
- [9] Buddharaksa, P., Chundet, R. and U-Kong, W., 2012, Micropropagation of *Caladium bicolor* Vent., *Kalanchoe blossfeldiana* Poellnitz. and *Kalanchoe pinnata* Pers, *J. Sci. Ladkrabang.*, 21(2): 1-15. (in Thai)
- [10] Rattana, K., Sangchanjiradet, S. and Munglue, P., 2017, Effect of BA and NAA on *in vitro* culture of young leaves of *Caladium bicolor* Vent, *SDU Res J*. 10 (3): 34-45. (in Thai)
- [11] Chomchuen, E., Hutangkur, P. and Chikhuntod, U., 2012, Factors affecting the propagation of water onion (*Crinum thaianum*) using *in vitro* bulb culture, *Agricultural Sci J*. 43(2): 589-592. (in Thai)
- [12] Ulrich, K., Ulrich, A. and Ewald, D., 2008, Diversity of endophytic bacterial communities in Poplar grown under field conditions, *FEMS Microbiol Ecol*. 63: 169-180.
- [13] Murali, M., Janardhan, A. and Krishna, N., 2020, Endophytic fungi as potential sources of IAA: Applications in plant tissue culture. *Fungal Biol Rev*. 34(2): 57-66.
- [14] Rodrigues, K.F. and Samuels, G.J., 2008, Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm, *Mycol Res*. 94: 827-830.
- [15] Greenfield, M., Pareja, R., Ortiz, V., Gómez-Jiménez, M.I., Vega, F.E. and Parsa, S., 2015, A novel method to scale up fungal endophyte isolations, *Biocontrol Sci Technol*. 25(10): 1208-1212.
- [16] Zhang, F., J. Yuan, X. Yang, Y. Cui, L. Chen, W. Ran, and Shen, Q., 2013, Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization, *Plant Soil*. 368: 433-444.

- [17] Banlangnak, W., Chueakrut, S. and Preechanukul, K., 2007, Isolation and Selection of Actinomycetes Capable of Producing Antibiotic-Resistant Bacteria, Master Thesis, Naresuan University, Phitsanulok, 125 p. (in Thai)
- [18] Navi, S.S., Bandy, R., Hall, A.J. and Bramel-Cox, P., 1999, A Pictorial Guide for the Identification of Mold Fungi on Sorghum Grain, Inf Bul. (59), International Crops Research Institute for Semi Arid Tropics, Patancheru, Andhra Pradesh, India, 118 p.
- [19] Dugan, F.M., 2008, The Identification of Fungi: An Illustrated Introduction with Keys, Glossary and Guide to Literature. St. Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society, 346 p.
- [20] Guarro, J., Gene, J. and Stihigel, A.M., 1999, Developments in Fungal Taxonomy, Clin Microbiol Rev. 12(3): 454-500.
- [21] Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, Plant Physio. 15(3): 473-497.
- [22] Chinorak, C. and Chinorak. P. 2008, Biology. Volume 3, 4th Printing, Aksorn Prasit Printing House, Bangkok, 350 p. (in Thai)
- [23] Siqueira, V.M., Conti, R., de Araújo, J.M., 2011, Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity, Symbiosis. 53: 89-95.
- [24] Arnold, A.E. and Lutzoni, F., 2007, Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotpot, Ecology. 88(3): 541-549.
- [25] Photita, W., Lumyang, S., Lumyang, P., Hyde, K.D., 2001, Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand, Mycol Res. 105(12): 1508-1513.
- [26] Khunna, S., Kitkha, B. and Nueangmak, W., 2016, Indol Acetic Acid Production by Fungi. *Mucor Ellipsoideus*, *Rhizopus Oryzae* and *Trichoderma Harzianum*, Research Report, Phuket Rajabhat University, Phuket, 79 p. (in Thai)
- [27] Numponsak, T., 2016, Indole-3-Acetic Acid Production by Endophytic Fungi in Genus *Colletotrichum* Isolated from Arabica Coffee Plant and Its Effect on Plant Growth, Master Thesis, Chiang Mai University, Chiang Mai, 117 p. (in Thai)
- [28] Bose, A., Shah, D. and Keharia, H., 2013, Production of indole-3-acetic-acid (IAA) by white rot fungus *Pleurotus ostreatus* under submerged condition of *Jatropha* seedcake, Mycology, 4(2): 103-111.
- [29] Spaepen, S. and Vander leyden, J., 2011, Auxin and plant-microbe interactions, Cold Spring Harb Perspect Biol. 1-13.
- [30] Tang, J., Li, Y., Zhang, L., Mu, J., Jiang, Y., Fu, H., Zhang, Y., Cui, H., Yu, X. and Ye, Z., 2023, Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms, Microorganisms, 11(8): 1-24.

- [31] Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A., 2013, Plant callus: mechanisms of induction and repression, *Plant Cell*. 25: 3159-3173.
- [32] Bunnag, S., 2013, *Plant Tissue Culture and Plant Gene Transfer*, KKU publishing, Khon Kaen, 150 p. (in Thai)