

การผลิต indole-3-acetic acid โดยราเอนโดไฟท์สกุล
Colletotrichum ที่แยกได้จากต้นกาแฟสายพันธุ์
อาราบิก้า และผลต่อการเจริญของพืช



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
กันยายน 2559

การผลิต indole-3-acetic acid ของราเอนโดไฟท์สกุล *Colletotrichum*
ที่แยกได้จากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และผลต่อการเจริญของพืช

ทศพล นำนปลัก

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กันยายน 2559

การผลิต indole-3-acetic acid โดยราเอนโดไฟท์สกุล *Colletotrichum*
ที่แยกได้จากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และผลต่อการเจริญของพืช

ทศพล นำนปลัก

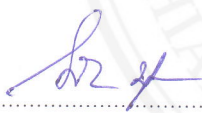
วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบ

อาจารย์ที่ปรึกษา


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. โสภณ บุญลือ)


.....
(ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง)


.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วสุ ปฐมอารีย์)

18 กันยายน 2559

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ. ดร. สายสมร ถ้ายอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่คอยให้คำปรึกษา ชี้แนะ แนวทางการทำงานวิจัย ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. โสภณ บุญลือ และ ผศ.ดร.วสุ ปฐมอารีย์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Kenji Matsui ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อสถานที่ตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัยที่ Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุนเมธีวิจัยอาวุโสของ ศ.ดร. สายสมร ถ้ายอง (RTA5580007) และ the short stay and short visit program (SSSV program supported by JASSO) ที่สนับสนุนทุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัย ด้านการพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ (SDBR) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ Laboratory of Plant Physiology-volatile, Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan ที่เอื้อเฟื้อสารเคมี อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ ดร. นครินทร์ สุวรรณราช และ ดร. จตุรงค์ คำห่อ ผู้ดูแล ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จ และสมาชิกทุกท่านในห้องปฏิบัติการวิจัย SDBR ที่ให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกท่านที่กรุณาให้การช่วยเหลืออำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดระยะเวลาการทำงานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณพ่อแม่ และครอบครัว ที่เลี้ยงดูอบรมสั่งสอน เป็นกำลังใจ และเห็นคุณค่า ของการศึกษาสนับสนุนการศึกษาตลอดชีวิตทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จทางการเรียนมาถึงทุกวันนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชา อบรมสั่งสอน และให้กำลังใจตลอดจนผู้ที่มีอุปการะคุณทุกท่าน

ทศพล นำนปลัก

การผลิต indole-3-acetic acid โดยราเอนโดไฟท์สกุล
Colletotrichum ที่แยกได้จากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า
และผลต่อการเจริญของพืช

นายทศพล นำปนลัก

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (อุตสาหกรรมวิทยาประยุกต์)

ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ถ้ายอง

ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ถ้ายอง

บทคัดย่อ

คัดแยกราเอนโดไฟท์จากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและประเมิน
เลือกเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืช ราเอนโดไฟท์ทั้งหมดจำนวน 51
อย่างไบนและก้านของกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าจำนวน 400 ชิ้น ซึ่งราเอน
ใน 39 กลุ่ม ราเอนโดไฟท์สกุลเด่น คือ *Colletotrichum* และ *Xylaria*
การองราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA พบว่า ราเอนโดไฟท์จำนวน 5

ชนิด คือ *Colletotrichum* sp. CMU-A18, CMU-A30, CMU-A45, สามารถผลิต IAA ในปริมาณ 480.97, 159.41, 172.18, 218.48 และ ตรวจสอบวิธีการผลิต IAA พบว่า ราทั้งหมดสามารถผลิต IAA ผ่านวิธีหมักของแข็งได้ โดย *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด 218.48 µg/ml เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ที่อุณหภูมิ 30°C หลังบ่มไว้ 26 วัน ซึ่ง IAA ของราสามารถกระตุ้นการขึ้นรากของข้าว ข้าวโพด และข้าวไรย์ และสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวของข้าวโพดได้ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถเพิ่มความยาวของลำต้นข้าวโพดได้ และปริมาณคลอโรฟิลล์ของกล้าข้าวได้เมื่อทำการปลูกสปอร์ของรา

นอกจากนี้ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถทนทานต่อยาฆ่าหญ้า (glyphosate) ยาฆ่าแมลง (methomyl และ propargite) และยาฆ่าเชื้อราก่อโรคราไฟ (matalaxyl) ได้ในอัตราแนะนำที่มีการใช้ใน ระดับแปลงเพาะปลูก *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ผลิต siderophore ชนิด hydroxamate การศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยาสามารถบ่งบอกชนิด *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ได้ว่า เป็น *Colletotrichum gloeosporioides*

คำสำคัญ ราเอนโดไฟท์, กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า, *Colletotrichum*, indole-3-acetic acid
วิธี indole-3-acetamide, การส่งเสริมการเจริญแก่พืช



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Indole-3-Acetic Acid Production by Endophytic Fungi in Genus *Colletotrichum* Isolated from Arabica Coffee Plant and Its Effect on Plant Growth

Author Mr. Tosapon Numponsak

Degree Master of Science (Applied Microbiology)

Advisor Professor Dr. Saisamorn Lumyong

ABSTRACT

Endophytic fungi were isolated from arabica coffee tree and evaluated the potential of selected endophytic fungi to promote plant growth. A total of 518 endophytic fungal isolates were recovered from 400 samples tissue of leaves and stems of arabica coffee plants. All isolates were grouped into 39 groups and the fungi in genus *Colletotrichum* and *Xylaria* were consistently abundant.

Screening of IAA producing endophytic fungi was investigated. The results indicated that five isolates from 39 isolates, *Colletotrichum* sp. CMU-A18, CMU-A30, CMU-A45, CMU-A49 and CMU-A109 were produced IAA levels 480.97, 159.41, 172.18, 218.48 and 662.96 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The determination of IAA biosynthetic pathway showed that all of fungal isolates were produced IAA via indole-3-acetamide (IAM) pathway. The *Colletotrichum* sp. CMU-A109 was produced the highest IAA and selected for the investigation of optimal conditions for IAA production. The results showed that *Colletotrichum* sp. CMU-A109 could produce the highest IAA level of 1205.58 $\mu\text{g/ml}$ when cultivating in potato dextrose broth (PDB) supplemented with 8 mg/ml L-tryptophan at temperature 30°C after 26 days of cultivation. The fungal IAA could stimulate coleoptile elongation of rice, maize and rye and increase the seed germination, root length and root dry weight of maize. *Colletotrichum* sp. CMU-A109 increased the length and dry weight of shoot and root and chlorophyll content in the inoculated rice seedlings by conidial suspension. Moreover, *Colletotrichum* sp. CMU-A109 could tolerant to herbicide (glyphosate),

insecticides (methomyl and propargite) and fungicide (matalaxyl) at the recommended dosages in a field application. *Colletotrichum* sp. CMU-A109 showed hydroxamate-type siderophore production. *Colletotrichum* sp. CMU-A109 was identified as *Colletotrichum gloeosporioides*, on the basis of morphological and molecular characteristics.

Key word Endophytic fungi, arabica coffee, *Colletotrichum*, indole-3-acetic acid

indole-3-acetamide pathway, plant growth promoting



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฐ
สารบัญภาพ	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	4
2.1 กาแฟ ความเป็นมา และความสำคัญของกาแฟในประเทศไทย	4
2.2 เอนโดไฟท์	7
2.2.1 ราเอนโดไฟท์	7
2.2.2 ราเอนโดไฟท์จากต้นกาแฟ	8
2.2.3 การนำราเอนโดไฟท์ไปใช้ประโยชน์	13
2.3 ออกซิน (auxin)	14
2.3.1 ความเป็นมา ความหมาย และตัวอย่างออกซิน	14
2.3.2 การใช้ประโยชน์จากสารกลุ่มออกซิน	15
2.4 จุลินทรีย์ผลิต indole-3-acetic acid (IAA)	17
2.4.1 วิธีการผลิต IAA โดยจุลินทรีย์	17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1.1 การผลิต IAA ผ่านวิถี Indole-3-acetamide (IAM)	18
2.4.1.2 การผลิต IAA ผ่านวิถี indole-3-pyruvic acid (IPyA)	18
2.4.1.3 การผลิต IAA ผ่านวิถี tryptophan side chain oxidase	19
2.4.1.4 การผลิต IAA ผ่านวิถี Tryptamine (TAM)	19
2.4.1.5 การผลิต IAA ผ่านวิถี Indole-3-acetonitrile (IAN)	20
2.4.2 จุลินทรีย์ที่ผลิต IAA	22
2.4.3 ราเอน โดไฟท์ผลิต IAA กระตุ้นการเจริญของพืช	28
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	29
3.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกราเอน โดไฟท์	28
3.2 การหาค่าความหนาแน่นของประชากรราต่อตัวอย่าง	30
3.3 การจัดกลุ่มราเอน โดไฟท์	30
3.4 การคัดกรองราเอน โดไฟท์ที่ผลิตสารกลุ่มอินโดล (indole) โดยวิธี colorimetric assay	30
3.5 การสกัดสารกลุ่มอินโดลจากน้ำเลี้ยงราเอน โดไฟท์ที่คัดเลือก	31
3.6 การตรวจสอบองค์ประกอบสารกลุ่มอินโดลเบื้องต้นที่ผลิตโดยราเอน โดไฟท์ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)	31
3.7 การตรวจสอบสารกลุ่มอินโดลในสารสกัดหยาบของราเอน โดไฟท์ที่คัดเลือกด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)	32
3.8 การศึกษาวิธีการสังเคราะห์ IAA ของราเอน โดไฟท์ที่คัดเลือก	32
3.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอน โดไฟท์ที่คัดเลือก	32
3.10 การศึกษาสารสกัดหยาบอินโดลของราเอน โดไฟท์ที่คัดเลือกต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชทดสอบ	33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.10.1 การทดสอบสารสกัดยับยั้งอินโดลของราเอนโดไฟท์ที่ผลิต IAA ที่คัดเลือกต่อการยืดตัวของ coleoptile ของพืชทดสอบ	33
3.10.2 การทดสอบสารสกัดยับยั้งต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและข้าวโพด	34
3.11 การทดสอบความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity test) ของราที่คัดเลือกต่อพืชทดสอบ	35
3.12 การศึกษาราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าวสาลีพันธุ์ กข6	35
3.13 การบ่งชี้ชนิดราเอนโดไฟท์ที่ผลิต IAA ที่คัดเลือกด้วยเทคนิคอนุชีววิทยา	36
3.14 การศึกษาความทนทานของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช	36
3.15 การทดสอบการผลิต siderophore เบื้องต้นด้วยเทคนิค CAS agar plate assay ของราที่คัดเลือก	39
3.16 การตรวจสอบชนิดของ siderophore จากราที่คัดเลือก	39
3.17 การวิเคราะห์ทางสถิติ	40
บทที่ 4 ผลการวิจัย	41
4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกราเอนโดไฟท์	41
4.2 การตรวจสอบสารอินโดลที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากต้นกาแฟโดยวิธี colorimetric assay	44
4.3 การตรวจสอบสารกลุ่มอินโดลที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)	46
4.4 การตรวจสอบสารกลุ่มอินโดลด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)	47
4.5 การศึกษาวิธีการสังเคราะห์ IAA ของราเอนโดไฟท์	48
4.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต CMU-A109	51

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.7 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบ IAA จากรา <i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109 ต่อการกระตุ้นการยืดยาวเนื้อเยื่อ coleoptile ของพืชทดสอบ	52
4.8 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากรา <i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109 ต่อการงอกและการส่งเสริมการเจริญในพืชทดสอบ	53
4.8.1 กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	53
4.8.2 ข้าวโพด	54
4.9 การทดสอบการก่อโรคในพืช (pathogenicity test) ของ <i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109	55
4.10 การศึกษาความสามารถของรา <i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109 ต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าวสาลีพันธุ์ กข6	56
4.11 การบ่งชี้ชนิดรา <i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109 โดยลักษณะสัณฐานวิทยา และเทคนิคอนุชีววิทยา	58
4.12 การศึกษาความทนทานของ <i>Coll. gloeosporioides</i> CMU-A109 ต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช	61
4.13 การศึกษาการผลิต siderophore ของราเอนโดไฟท์ <i>Coll. gloeosporioides</i> CMU-A109	62
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	63
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	69
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	91
ภาคผนวก ก	92
ภาคผนวก ข	94
ภาคผนวก ค	96

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ประวัติผู้เขียน	101



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 2.1 ปริมาณการส่งออกกาแฟประจำปี ค.ศ. 2015 ของประเทศผู้ผลิตสำคัญ 10 อันดับของโลก	5
ตาราง 2.2 รายงานการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากต้นกาแฟ	9
ตาราง 2.3 รายงานจุลินทรีย์ผลิออกซิน	23
ตาราง 3.1 สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ทดสอบความทนทานต่อสารกำจัดศัตรูพืชที่คัดเลือก	38
ตาราง 4.1 ราเอนโดไฟท์จากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	41
ตาราง 4.2 ความหนาแน่นของประชากรราต่อตัวอย่าง (intensity) และจำนวนกลุ่มราที่แยก ได้จากตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (Total taxa recover rate)	42
ตาราง 4.3 ความถี่ของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าในแต่ละเดือน	42
ตาราง 4.4 การคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากต้นกาแฟที่ผลิตสารกลุ่มอินโดล	45
ตาราง 4.5 ปริมาณ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์เมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค HPLC	48
ตาราง 4.6 ผลของสารสกัดหยาบของรา <i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109 ต่อการกระตุ้นการงอก และส่งเสริมการเจริญกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าเปรียบเทียบกับฮอร์โมนพืชมาตรฐาน	54
ตาราง 4.7 ผลของสารสกัดหยาบของรา <i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109 ต่อการกระตุ้นการงอก และส่งเสริมการเจริญข้าวโพดเปรียบเทียบกับฮอร์โมนพืชมาตรฐาน	55
ตาราง 4.8 ผลของ <i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109 ต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าว สายพันธุ์ กข6 ในวัสดุปลูก	57

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 2.1 ตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	4
ภาพ 2.2 ตัวอย่างโครงสร้างออกซินธรรมชาติ และออกซินสังเคราะห์	15
ภาพ 2.3 ขั้นตอนการผลิต IAA ผ่านวิถี IAM ของจุลินทรีย์	18
ภาพ 2.4 ขั้นตอนการผลิต IAA ผ่านวิถี IPyA ของจุลินทรีย์	19
ภาพ 2.5 ขั้นตอนการผลิต IAA ผ่านวิถี tryptophan side chain reaction ของจุลินทรีย์	19
ภาพ 2.6 ขั้นตอนการผลิต IAA ผ่านวิถี TAM ของจุลินทรีย์	20
ภาพ 2.7 ขั้นตอนการเปลี่ยนจาก IAN เป็น IAA และการเปลี่ยนจาก tryptophan เป็น IAN	21
ภาพ 3.1 การวางตัวอย่างชิ้นส่วนพืชบนอาหารคัดแยกราเอนโดไฟท์	30
ภาพ 4.1 ราเอนโดไฟท์ที่สังเกตเห็นได้จากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าในการศึกษานี้	42
ภาพ 4.2 การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์เมื่อทำปฏิกิริยากับสาร Salkowski's reagent	44
ภาพ 4.3 โครมาโตแกรมแสดงการตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มอินโดลของราเอนโดไฟท์	47
ภาพ 4.4 โครมาโตแกรมของ HPLC	49
ภาพ 4.5 การเปลี่ยนแปลงระหว่าง IAA และ IAM โดยราเอนโดไฟท์	50
ภาพ 4.6 ผลของปริมาณความเข้มข้นของ L-tryptophan, อุณหภูมิ และระยะเวลา ในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลต CMU-A109	52
ภาพ 4.7 การยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าว, ข้าวโพด และข้าวไรย์	53
ภาพ 4.8 การทดสอบการเกิดโรคของ <i>Colletotrichum</i> CMU-A109 ในข้าวสายพันธุ์ กข6	54
ภาพ 4.9 ประสิทธิภาพของรา <i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109 ต่อการเจริญของกล้าข้าว สายพันธุ์ กข6 อายุ 10 วัน	55
ภาพ 4.10 แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-parsimonious tree) ของ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CMU-A109	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพ 4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CMU-A109	60
ภาพ 4.12 ดัชนีความทนทาน (Toleration index, TI) ของรา <i>Coll. gloeosporioides</i> CMU-A109 ต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช	61
ภาพ 4.13 การทดสอบการผลิต siderophore บนอาหาร CAS agar	62



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 1

บทนำและวัตถุประสงค์

กาแฟเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกซึ่งมูลค่าการส่งออกเมล็ดกาแฟมีขนาดใหญ่รองจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม และกาแฟเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยโดยประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกของเมล็ดกาแฟเป็นอันดับสามในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รองจากเวียดนามและอินโดนีเซีย (Angasith, 2001) ในปี 2559 ประเทศไทยส่งออกเมล็ดกาแฟจำนวน 246.316 ตัน ในช่วงเดือนมกราคมถึงกรกฎาคม มูลค่า 47.884 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรโดยความร่วมมือของกรมศุลกากร, 2559) เมล็ดกาแฟที่ไทยส่งออกคือเมล็ดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าซึ่งมีพื้นที่เพาะปลูกอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ ในขณะที่กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าซึ่งเป็นที่ต้องการสูงในตลาด มีราคาแพง เนื่องจากรสชาติและกลิ่นที่ดีกว่าเมล็ดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าปริมาณผลผลิตเพียงพอสำหรับการบริโภคภายในประเทศเท่านั้น กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าของไทยสามารถปลูกได้ในไม่กี่จังหวัดของพื้นที่ภาคเหนือ (เชียงใหม่, เชียงราย) เนื่องจากการเจริญของกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้ามีข้อจำกัดในเรื่องของลักษณะทางภูมิศาสตร์และสภาพอากาศ นอกจากนี้การปลูกกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าจำเป็นต้องดูแลเป็นพิเศษเพราะต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าโตช้าและง่ายต่อการเกิดโรค (สำนักงานพัฒนาวิจัยการเกษตร, 2551)

ราเอนโดไฟท์ คือกลุ่มราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการโรค (Carroll, 1988; Stone et al., 2004; Rodriguez et al., 2009) และมีบทบาทในการช่วยให้พืชตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันทำให้พืชสามารถต้านทานต่อโรค และสามารถส่งเสริมการเจริญแก่พืชได้ (Arnold et al., 2003; Bae et al., 2009; Verma et al., 2009; Pineda et al., 2010) มีการรายงานมากมายเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากพืชชนิดต่างๆว่ามีศักยภาพในการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด สารที่มีฤทธิ์ทางยา และที่สำคัญราเอนโดไฟท์มีศักยภาพในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืช (plant growth promoting agent) เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน และ siderophore (Strobel et al., 2001;

Sette et al., 2006; Dolatabadi et al., 2012; Suwannarach et al., 2012; Khan et al., 2014; Siri-udom et al., 2015)

Indole-3-acetic acid (IAA) เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถส่งเสริมการเจริญแก่พืชได้ดี และสามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์พืชได้หลากหลาย (Lambrecht et al., 2000; Quint and Gray, 2006) การรายงานการศึกษาการผลิต IAA พบว่าไม่เพียงแต่พืชเท่านั้นที่สามารถผลิต IAA ได้ มีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิต IAA ได้เช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้น IAA ที่จุลินทรีย์ผลิตมีศักยภาพในการกระตุ้นการงอกของเมล็ด การเกิดราก การยืดยาวของเซลล์ และการเจริญของเมล็ดพืชทดสอบได้เป็นอย่างดี (Vysotskaya et al., 2001; Contreras-Cornejo et al., 2009; Chutima and Lumyong, 2012; Khan et al., 2012; Kumla et al., 2014; Shim et al., 2015) ในประเทศไทยได้มีการใช้สารกลุ่มออกซินเพื่อการเกษตรกรรมมากมาย อาทิ เร่งการเกิดรากพืช การเปลี่ยนเพศดอก เพิ่มการติดผล เพิ่มขนาดผล ป้องกันการหลุดร่วง กำจัดวัชพืช และใช้ส่งเสริมการเจริญของพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น

การปลูกต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า กล้ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าที่จะนำมาปลูกควรมีอายุ 8–12 เดือน มีความสมบูรณ์แข็งแรงสูงประมาณ 45–50 cm มีใบ 6–8 คู่ (Kafaesansuk, 2011) ปัจจุบันต้นกล้ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าที่มีความสูง 25–30 cm มีราคาสูงถึง 15 บาท ต่อต้น (Coffeedeep, 2013) ปัญหาของการเพาะกล้ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า คือเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกาแฟ การเจริญเติบโตที่ช้า ความสมบูรณ์ของต้นกล้า และการเกิดโรค เนื่องจากในระยะ 1–3 เดือนแรกเป็นระยะที่ต้นกล้าอ่อนแอต่อการเกิดโรคกล้าเน่า (สำนักงานพัฒนาวิจัยการเกษตร, 2551) ซึ่งความชื้นที่เหมาะสมและความสมบูรณ์แข็งแรงของต้นกล้าสามารถลดการเกิดโรคกล้าเน่าได้ ดังนั้นการใช้ IAA จากราเอนโดไฟท์ในการส่งเสริมการเจริญของกล้ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าจึงมีความสำคัญ เพื่อกระตุ้นการเจริญของกล้ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าให้เติบโตอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์แข็งแรงช่วยให้พืชต้านทานต่อโรคต่างๆ ได้ เป็นการช่วยลดความเสียหายของกล้ากาแฟในขั้นตอนการเพาะกล้า และช่วยให้เกษตรกรได้กล้ากาแฟที่สมบูรณ์แข็งแรงในการนำไปเพาะปลูกต่อไป นอกจากนี้มีการรายงานว่าสารออกซินสังเคราะห์ที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) มีความคงตัวในธรรมชาติสูงเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นสารก่อมะเร็ง มีผลเสียต่อสุขภาพเกษตรกรผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม (พีรเดช, 2537; Saad and Elshahed, 2012; Kumar, 2016; Sedbrook, 2016) ดังนั้นการใช้สารกลุ่มออกซินชีวภาพจากราเอนโดไฟท์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สำคัญและควรได้รับการส่งเสริมเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการใช้ประโยชน์จากราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA เพื่อที่จะสามารถใช้ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ผลิตหรือตัวเชื้อราเอนโดไฟท์เป็นการใช้วิธีการทางชีวภาพในการส่งเสริมการเจริญแก่พืช ดังนั้นจึงได้มีการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและคัดกรองการผลิต IAA เพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและพืชเศรษฐกิจอื่น เพื่อเป็นทางเลือกของเกษตรกรในการใช้สารกลุ่มออกซินและสามารถลดการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่มีผลเสียต่อทั้งเกษตรกรผู้ใช้ ประชาชนผู้บริโภค และสิ่งมีชีวิตอื่นในสิ่งแวดล้อม ยิ่งไปกว่านั้นเพื่อเป็นองค์ความรู้ในการศึกษาราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากกาแฟอาราบิก้าในการผลิต IAA ซึ่งการศึกษาในประเทศไทยยังมีน้อยเพื่อจะได้นำไปพัฒนาและต่อยอดเพื่อเป็นประโยชน์ต่อภาคเกษตรกรรมของประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกราเอนโดไฟท์จากใบและก้านกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA
2. เพื่อศึกษาวิธีการผลิต IAA และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ที่ผลิต IAA ที่คัดเลือก
3. เพื่อทดสอบคุณสมบัติของ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ผลิต และการใช้ราเอนโดไฟท์ที่ผลิต IAA ที่คัดเลือกต่อการส่งเสริมการเจริญแก่พืชทดสอบ
4. เพื่อระบุชนิดของราเอนโดไฟท์ไอโซเลตที่ผลิต IAA ในปริมาณสูงที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 กาแฟ ความเป็นมา และความสำคัญของกาแฟในประเทศไทย

กาแฟเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledonae) จัดอยู่ใน วงศ์ (family) Rubiaceae สกุล (genus) *Coffea* เป็นไม้ขนาดกลาง สูงประมาณ 3—5 เมตร การปลูกโดยทั่วไปนิยมตัดแต่งกิ่งให้มีความสูงไม่เกิน 3 เมตร เพื่อให้สะดวกแก่การเก็บเกี่ยว ใบแตกเป็นคู่ๆ ทรงต้นส่วนล่างกว้างกว่าส่วนบนทำให้มีลักษณะคล้ายพืระมิด ดอกมีสีขาวและมีกลิ่นหอมคล้ายมะลิป่า ผลสีเขียวออกรอบโคนก้านและเมื่อสุกเต็มที่จะมีสีแดงหรือแดงปนน้ำตาล พืชในสกุล *Coffea* มีประมาณ 100 ชนิด โดยมี 4 ชนิดที่มีความสำคัญในตลาดโลก ตามลำดับ คือ กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea arabica*) (ภาพ 2.1) กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า (*Coff. canephora* var. *robusta*) กาแฟสายพันธุ์ลิเบอริก้า (*Coff. liberica*) และ กาแฟสายพันธุ์เอ็กเซลซ่า (*Coff. excelsa*) (หลวงบุเรศบำรุงการ, 2505; พันธ์, 2549)



ภาพ 2.1 ตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า; กล้ากาแฟอายุ 15 วัน (a), กล้ากาแฟอายุ 4 เดือน (b), ดอกกาแฟ (c), ต้นกาแฟในแปลงปลูก (d), ผลกาแฟ (e) และเมล็ดกาแฟกะเทาะเปลือก (f)

กาแฟมีการค้นพบครั้งแรกในประเทศเอธิโอเปียและได้รับความสนใจหลังจากที่ชายเลี้ยงสัตว์ชื่อ คาลดี (Kaldi) สังเกตพฤติกรรมของแพะที่กินลูกเบอร์รี่สีแดง (เมล็ดกาแฟ) แสดงอาการคึกคะนองผิดปกติ เรื่องราวของกาแฟได้ถูกเผยแพร่อย่างรวดเร็วเมื่อผู้สอนศาสนาทดลองคั่วเมล็ดกาแฟสีแดง (เมล็ดกาแฟ) และรู้สึกกระปรี้กระเปร่าสามารถปฏิบัติศาสนพิธีได้ยาวนานตลอดทั้งคืน การคั่วกาแฟจึงเริ่มได้รับความนิยมและแพร่ไปสู่ชาวอิตาลีใน ค.ศ. 1645 และฝรั่งเศส (กองบรรณาธิการเฉพาะกิจฐานเกษตรกรรม, 2530) ปัจจุบันกาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยม อุตสาหกรรมกาแฟมีมูลค่าสูงเป็นอันดับสองรองจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Vega et al., 2010) นอกจากนี้ใช้ดื่มแล้วมีการนำกาแฟไปผสมในเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (brewing a cup of joe) กาแฟอื่นจากกาแฟนำไปใส่ในน้ำอัดลม เช่น cola ใช้ในด้านเภสัชกรรม และความงาม การรายงานขององค์การกาแฟระหว่างประเทศ (International Coffee Organization; ICO) รายงานอัตราการส่งออกของกาแฟในปี ค.ศ. 2016 (15 ตุลาคม 2015 ถึง 16 พฤษภาคม 2016) เพิ่มขึ้น 1.6% โดยแหล่งส่งออกกาแฟที่สำคัญ 10 อันดับแรกของโลก ดังตาราง 1 ซึ่งปริมาณการส่งออกกาแฟเป็นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าประมาณ 70% และกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า 30% (Worldatlas, 2016)

ตาราง 2.1 ปริมาณการส่งออกกาแฟประจำปี ค.ศ. 2015 ของประเทศผู้ผลิตสำคัญ 10 อันดับของโลก (Worldatlas, 2016)

ลำดับ	ประเทศ	ปริมาณ (ตัน)
1	บราซิล	2,594,073
2	เวียดนาม	1,649,983
3	โคลัมเบีย	809,992
4	อินโดนีเซีย	659,993
5	เอธิโอเปีย	383,996
6	อินเดีย	349,976
7	ฮอนดูรัส	344,997
8	ยูกันดา	285,297
9	เม็กซิโก	233,997
10	กัวเตมาลา	203,998

ประเทศไทยเป็นหนึ่งใน 50 กว่าประเทศทั่วโลกที่สามารถปลูกกาแฟและมีมูลค่าการส่งออกกาแฟสูงเป็นอันดับสามของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รองจากเวียดนามและอินโดนีเซีย (Prihastuti et al., 2009; Vega et al., 2010) ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันของประเทศไทยทำให้ภาคเหนือเหมาะแก่การเพาะปลูกกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า ในขณะที่กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าสามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตดีในพื้นที่ภาคใต้ อัตราส่วนผลผลิตของเมล็ดกาแฟในประเทศไทยพบว่า กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าให้ผลผลิตสูงกว่ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า เนื่องจากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าเจริญเติบโตได้ช้าและดูแลยากและมีการเพาะปลูกเพียงไม่กี่จังหวัดในภาคเหนือ (Angasith, 2001) ได้แก่ เชียงราย และเชียงใหม่ ส่วนกาแฟสายพันธุ์โรบัสตานิยมปลูกใน 4 จังหวัดในภาคใต้ ได้แก่ กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร และระนอง ปริมาณการส่งออกเมล็ดกาแฟของไทยสูงถึง 70,000 ตัน ในปี พ.ศ. 2544 และลดลงในปีถัดๆ ไป เนื่องจากเมล็ดกาแฟไทยมีราคาสูงกว่าเมล็ดกาแฟในตลาดโลก รวมทั้งประเทศคู่แข่งอย่างเวียดนามสามารถผลิตเมล็ดกาแฟได้ปริมาณมาก ส่งผลให้ผลผลิตเมล็ดกาแฟในตลาดโลกมีจำนวนมากกว่าความต้องการซึ่งทำให้ราคาคงต่ำและประเทศไทยส่งออกเมล็ดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าเป็นหลัก ในขณะที่เมล็ดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าซึ่งมีราคาแพง ราคาคือร้อยละ 10 และมีกลิ่นหอมเป็นที่นิยมมากกว่าเมล็ดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้ามีการใช้เพื่อการบริโภคภายในประเทศเป็นหลัก (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2559)

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตเมล็ดกาแฟในตลาดโลกยังคงขยายตัวอย่างต่อเนื่อง และความต้องการเมล็ดกาแฟที่มีคุณภาพดีจากประเทศไทยยังคงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา โปแลนด์ เยอรมนี และสวิตเซอร์แลนด์ ดังนั้นการส่งเสริมการปลูกกาแฟโดยเฉพาะกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดและการเพิ่มผลผลิตของกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าเพื่อการส่งออกควรได้รับการส่งเสริม ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการเจริญเติบโตของต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าจำเป็นต้องเพาะปลูกในสภาพภูมิศาสตร์ที่เหมาะสม และต้องการการดูแลเอาใจใส่อย่างพิถีพิถัน ปริมาณน้ำ ธาตุอาหาร สภาพอากาศ และความสมบูรณ์แข็งแรงของต้นกาแฟเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตของเมล็ดกาแฟทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ ต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าอ่อนแอต่อหลายโรค เช่น โรคราสนิม โรครากขาว โรคเน่าแห้ง และโรคใบจุดด่าง เป็นต้น ในขณะที่กล้ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าอ่อนแอต่อโรคเน่าคอดิน (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2559) นอกจากการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคที่เกิดกับกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าแล้ว การส่งเสริมการเจริญของกาแฟตั้งแต่ในระยะกล้าให้สมบูรณ์แข็งแรงสามารถช่วยให้พืชต้านทานต่อโรคได้ ดังนั้นการนำวิธีการทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ทั้งในรูปแบบสารที่มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเจริญต่อพืชที่ราเอนโดไฟท์ผลิตและตัวเชื้อราเอนโดไฟท์เป็นที่น่าสนใจ เพื่อส่งเสริม

ต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและพืชอื่นๆให้เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์แข็งแรง สามารถช่วยให้พืชต้านทานต่อโรค ช่วยเพิ่มผลผลิต เป็นการลดต้นทุนการผลิต และช่วยให้ผลผลิตมีคุณภาพดี

2.2 เอนโดไฟท์

เอนโดไฟท์ (endophyte) ซึ่งมาจากคำ 2 คำรวมกัน คือคำว่า endo แปลว่า ข้างใน และ phytes แปลว่า พืช ดังนั้นจุลินทรีย์เอนโดไฟท์คือ แบคทีเรีย (bacteria) รา (fungi) และแอคติโนมัยซีต (actinomycetes) ที่อาศัยในพืชมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualism) ก็ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ (Stone et al., 2004; Schulz and Boyle, 2006)

2.2.1 ราเอนโดไฟท์

ราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi) เป็นสภาวะที่กลุ่มราอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีสุขภาพดีและไม่ก่ออันตรายแก่พืชมีทั้งที่เพาะเลี้ยงได้และไม่ได้ในอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานและสภาวะปกติ (Azevedo, 2014) ซึ่งแตกต่างทางด้านอนุกรมวิธานและนิเวศวิทยา ส่วนใหญ่จัดอยู่ในดิวิชัน Ascomycota และ Basidiomycota โดยราเอนโดไฟท์มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการปรับตัวของพืชโดยการช่วยให้พืชทนต่อความเครียด (stress) ทั้งที่มีชีวิต (biotic) และ ไม่มีชีวิต (abiotic) ช่วยให้พืชทนทานต่อความเสียหายที่ได้รับจากสัตว์กินพืช (herbivory) ความร้อน (heat) ความเค็ม (salt) โรค (disease) และความแห้งแล้ง (drought) และช่วยเพิ่มชีวมวล (biomass) แก่พืช อย่างไรก็ตามในสภาวะที่พืชอ่อนแอราเอนโดไฟท์สามารถเปลี่ยนบทบาทเป็นเชื้อก่อโรค (pathogen) หรือ ซาโพรบ (saprobe) ได้ (Khan et al., 2008) ราเอนโดไฟท์เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจเนื่องจากมีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ ทางการแพทย์ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของยาปฏิชีวนะ (antibiotic), ยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant), สารต้านมะเร็ง (anticancer) (Sette et al., 2006; Molina et al., 2012) ทางด้านการเกษตรราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารชีวภาพ (bioactive compound) สามารถนำไปใช้ควบคุมการเกิดโรคพืช (biocontrol) (Suwannarach et al., 2012, 2015; Mulaw et al., 2013; Siri-udom et al., 2015) สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญแก่พืช (plant growth promoter) และกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน (immune respond) เพื่อต้านทานโรคได้ (Arnold et al., 2003; Bae et al., 2009; Pineda et al., 2010; Chutima and Lumyong, 2012; Dolatabadi et al., 2012; Khan et al., 2014)

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ราเอนโดไฟท์ คือ กลุ่มราที่ช่วงชีวิตหนึ่งหรือทั้งหมดอาศัยภายในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ (ใบ ต้น ผล ราก เมล็ด และอื่นๆ) ของพืชที่สมบูรณ์ สามารถหรือไม่สามารถแยกและเพาะเลี้ยงได้หรือไม่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน ไม่ก่อความเสียหายแก่พืชอาศัยอาจช่วยปกป้อง

พืชอาศัยจากศัตรู ผลิตภัณฑ์เสริมการเจริญแก่พืช ช่วยให้พืชปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อม เป็นต้น โดยทั่วไปชนิดและประชากรของราเอนโดไฟท์สามารถพบได้ในพืชอาศัยที่หลากหลายโดยไม่จำเพาะเจาะจง อย่างไรก็ตามชนิดและประชากรเด่นของราเอนโดไฟท์บางชนิดขึ้นอยู่กับพืชอาศัยที่จำเพาะและสภาวะแวดล้อมเฉพาะของพืชอาศัย และเมื่อพืชอาศัยอยู่ในสภาวะที่อ่อนแอราเอนโดไฟท์สามารถเปลี่ยนบทบาทเป็นเชื้อราก่อโรคหรือซาโพรบได้

2.2.2 ราเอนโดไฟท์จากต้นกาแฟ

มีการรายงานความหลากหลายของราเอนโดไฟท์จากกาแฟในพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกกาแฟ ได้แก่ โคลัมเบีย ฮาวาย เม็กซิโก เปอร์โตริโก ไทย กัวเตมาลา อินเดีย เคนยา เวียดนาม บราซิล และ เอธิโอเปีย เป็นต้น (Vega et al., 2008, 2010; Prihastuti et al., 2009; Oliveira et al., 2015; Saucedo-Garcia et al., 2014) ราเอนโดไฟท์สามารถแยกได้จากส่วนต่างๆของตัวอย่างจากต้นกาแฟ ทั้งใบ ก้าน ผล และราก โดยวิธีการที่นิยมใช้แยกราเอนโดไฟท์ คือ การฆ่าเชื้อบริเวณผิวตัวอย่าง (surface sterilization) แล้วนำไปวางบนอาหารแยกเชื้อเพื่อให้ราเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อพืชเจริญบนอาหารและตัดปลายเส้นใยของราเอนโดไฟท์ย้ายลงอาหารใหม่เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ตัวอย่างรายงานการคัดแยก ราเอนโดไฟท์จากต้นกาแฟดังตาราง 2.2 ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ที่พบในกาแฟ ได้แก่ *Colletotrichum* sp., *Xylaria* sp. และ *Guignardia* sp. เป็นต้น (Santamaría and Bayman, 2005; Vega et al., 2010; Saucedo-García et al., 2014) การศึกษาของ Peterson et al. (2005) รายงานว่าสามารถคัดแยก *Penicillium coffeae* ซึ่งเป็นราชนิดใหม่ที่แยกได้จากตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า Mulaw et al. (2013) รายงานว่า *Trichoderma* sp. C.P.K. 1812 ที่แยกได้จากตัวอย่างรากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้ามีความสามารถในการควบคุมการเกิดโรค Tracheomycosis ที่มีสาเหตุมาจาก *Fusarium* spp. อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากกาแฟและการศึกษาราเอนโดไฟท์จากกาแฟค่อนข้างจำกัดเพียงในพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกกาแฟเท่านั้น นอกจากนี้ Oliveira et al. (2015) รายงานการศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างใบกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าที่มีระบบการจัดการและการเพาะปลูกแบบดั้งเดิม (conventional crop management systems) และแบบอินทรีย์ (organic crop management systems) ในประเทศบราซิล พบจำนวนราเอนโดไฟท์ระยะที่เป็นช่วงการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) จากตัวอย่างกาแฟที่เพาะปลูกแบบอินทรีย์มีมากกว่าที่เพาะปลูกแบบดั้งเดิมแต่ประชากรหลักของทั้งสองระบบไม่แตกต่างกัน

ตาราง 2.2 รายงานการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากต้นกาแฟ

ผู้วิจัย	สายพันธุ์กาแฟ	ชิ้นส่วนที่ใช้ แยกรา	แหล่งปลูก กาแฟ	เทคนิคการฆ่าเชื้อบริเวณผิวตัวอย่าง / อาหารแยก / อุณหภูมิ	สกุลราเอนโดไฟท์ที่ได้
Saucedo-García et al. (2014)	<i>Coffea arabica</i>	ใบ	เม็กซิโก	70% เอทานอล 1 นาที, 2.6% NaClO 3 นาที, 70% เอทานอล 1 นาที - Oatmeal Agar (OA) + chloramphenicol (50 mg/L¹) - อุณหภูมิห้อง	<i>Alternaria</i> , <i>Beauveria</i> , <i>Collectotrichum</i> , <i>Coniosporium</i> , <i>Cryptosporiosis</i> , <i>Diplodia</i> , <i>Glomerella</i> , <i>Guignardia</i> , <i>Mycelia sterilia</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Phomopsis</i> และ <i>Xylaria</i>
Mulaw et al. (2013)	<i>Coff. arabica</i>	ราก	เอธิโอเปีย	95% เอทานอล 2 นาที, 4% NaClO 5 นาที - Potato Dextrose Agar (PDA) + Streptomycin sulphate (400 mg/L) 25°C	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Macrophomina</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phomopsis</i> , <i>Trichoderma</i> และ <i>Rhizopycins</i>

ตาราง 2.2 (ต่อ)

ผู้วิจัย	สายพันธุ์กาแฟ	ชิ้นส่วนที่ใช้ แยกรา	แหล่งปลูก กาแฟ	เทคนิคการฆ่าเชื้อบริเวณผิวตัวอย่าง / อาหารแยก/ อุณหภูมิ	สกุลราเอนโดไฟท์ที่ได้
Vega et al. (2010)	<i>Coff. arabica</i> , <i>Coff. canephora</i> , <i>Coff. congensis</i> , <i>Coff. liberica</i> , <i>Coff. macrocarpa</i> , <i>Coff. racemosa</i> และ <i>Coff. stenophylla</i>	ใบ ก้าน ผล และราก	โคลัมเบีย ฮาวาย เม็กซิโก และ เปอร์โตริโก	0.5% NaClO 2 นาที, 70% เอทานอล 2 นาที - Yeast Malt Agar (YMA) + 0.1% (tetracycline, Streptomycin และ penicillin จาก stock 2 g/L) - อุณหภูมิห้อง	<i>Aspergillus</i> , <i>Beauveria</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Clavicipitaceae</i> , <i>Clonostachys</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Petriella</i> , <i>Phlebiopsis</i> , <i>Phomopsis</i> , <i>Pseudozyma</i> , <i>Schizophyllum</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Stagonospora</i> , <i>Stereum</i> , <i>Tilletia</i> , <i>Tilletiopsis</i> , <i>Trametes</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Xylaria</i> , Xylariaceous taxa

ตาราง 2.2 (ต่อ)

ผู้วิจัย	สายพันธุ์กาแฟ	ชิ้นส่วนที่ใช้ แยกรา	แหล่งปลูก กาแฟ	เทคนิคการฆ่าเชื้อบริเวณผิวตัวอย่าง / อาหารแยก/ อุณหภูมิ	สกุลราเอนโดไฟท์ที่ได้
Vega et al. (2008)	<i>Coff. arabica</i>	ผลดิบ	โคลัมเบีย กัวเตมาลา อินเดีย เคนยา ปาปัวนิวกินี เปอร์โตริโก และเวียดนาม	■ 0.5% NaClO 2 นาที, 70% เอทานอล 2 นาที ■ YMA + 0.1% (tetracycline, streptomycin และ penicillin จาก stock 2 g/L) ■ อุณหภูมิห้อง	<i>Acemonium, Aspergillus, Clavicipitaceae, Eurotium, Gibberella, Penicillium</i> และ <i>Pseudozyma</i>
Peterson et al. (2005)	<i>Coff. arabica</i>	ก้าน	ฮาวาย	■ 0.5% NaClO 2 นาที, 70% เอทานอล 2 นาที ■ YMA + 0.1% (tetracycline, streptomycin และ penicillin จาก stock 2 g/L) ■ อุณหภูมิห้อง	<i>Penicillium</i>

ตาราง 2.2 (ต่อ)

ผู้วิจัย	สายพันธุ์กาแฟ	ชิ้นส่วนที่ใช้ แยกรา	แหล่งปลูก กาแฟ	เทคนิคการฆ่าเชื้อบริเวณผิวตัวอย่าง / อาหารแยก/ อุณหภูมิ	สกุลราเอนโดไฟท์ที่ได้
Santamaría and Bayman (2005)	<i>Coff. arabica</i>	ใบ	เปอร์โตริโก	70% เอทานอล 1 นาที, 2.6% NaClO 3 นาที, 70% เอทานอล 1 นาที - PDA + 50 ppm tetracycline, Streptomycin และ penicillin 22°C	<i>Botryosphaeria</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Guignardia</i> , <i>Pestalotia</i> และ <i>Xylaria</i>

2.2.3 การนำราเอนโดไฟท์ไปใช้ประโยชน์

ราเอนโดไฟท์ถือได้ว่าเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในธรรมชาติ (natural bioactive compound) และเป็นแหล่งสำคัญในการค้นพบสารใหม่ๆ ในช่วงสองร้อยปีที่ผ่านมาพบว่า ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งสำคัญของการค้นพบยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ยาฆ่าแมลง (insecticidal) ยาต้านมะเร็ง (anticancer) การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ การควบคุมทางชีวภาพและการส่งเสริมการเจริญในพืช (Schulz et al., 2002; Zhao et al., 2010) ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ทั้งทางด้านการเกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรมอาหารและยา (Strobel et al., 2004; Verma et al., 2009)

ด้านการเกษตร ราเอนโดไฟท์มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืช (Sette et al., 2006; Suwannarach et al., 2012; Siri-udom et al., 2015) Siri-udom et al. (2015) รายงานสารระเหยที่ผลิตโดย *Muscodor heveae* มีฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเกี่ยวกับรากของต้นยางพาราได้ ศักยภาพของราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตฮอร์โมนพืช (phytohormone) ได้แก่ ออกซิน (Auxin) จิบเบอเรลลิน (gibberellin) และไซโตไคนิน (cytokinin) เพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting agent) ทั้งในสภาวะการปลูกพืชที่มีความเครียด (stress) เช่น ความแห้งแล้ง (droughty) ความเค็ม (salinity) รวมทั้งใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชในงานด้านการปลูกป่า (Khan et al. 2008, 2012) Fouda et al. (2015) ศึกษาราเอนโดไฟท์ *Penicillium chrysogenum* Pc_25, *Alternaria alternate* Aa_27 และ *Sterile hyphae* Sh_26 ที่แยกได้จากพืช *Asclepias sinaica* (Bioss.) ว่าสามารถผลิตแอมโมเนียและ Indole-3-acetic acid (IAA) ส่งเสริมให้รากของข้าวโพดเจริญได้ดีกว่าชุดควบคุม ยิ่งไปกว่านั้นราเอนโดไฟท์ *Mus. cinnamomi* คัดแยกจาก *Cinnamomum bejolghota* มีศักยภาพทั้งสร้างไอระเหยอินทรีย์ที่สามารถควบคุมการเกิดโรครากเน่าในมะเขือเทศและสามารถผลิต indole-3-acetic acid (IAA) ส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชได้อีกด้วย (Suwannarach et al., 2015)

ทางด้านการแพทย์ สารทุติยภูมิชีวภาพที่ผลิตจากราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ก่อโรค และถูกนำไปพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อราก่อโรค (antifungal) แบคทีเรีย (antibacterial) (Suryanarayanan et al., 2009) นอกจากนี้พบว่า ราเอนโดไฟท์เป็นจุลินทรีย์กลุ่มแรกที่ถูกค้นพบว่าผลิตสาร taxol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Stierle et al., 1994) งานวิจัยของ Gangadevi and Muthumary (2008) ที่คัดแยก *Bartalinia robillardoides* Tassi. ราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพร (*Aegle marmelos* Correa ex Roxb.) ที่สามารถผลิตสาร taxol ซึ่งมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง (cancer cell lines) ทั้งเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิดมะเร็งทางเดินหายใจ ลำไส้ส่วนต่างๆ ปอด และ เม็ดเลือดขาว (leukemia)

Siri-udom et al. (2015) รายงานราเอนโดไฟท์ *Muscador* spp. คัดแยกจากยางพารา (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.) ผลิตไอร่หะเหยอินทรีย์สามารถควบคุม แบคทีเรีย รา และยีสต์ก่อโรค การศึกษาของ Fouda et al. (2015) ที่รายงานว่าสารสกัดหยาบจาก *Pen. chrysogenum* Pc_25, *Alt. alternate* Aa_27 และ *Ste. hyphae* Sh_26 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* และ *Candida albicans* ได้

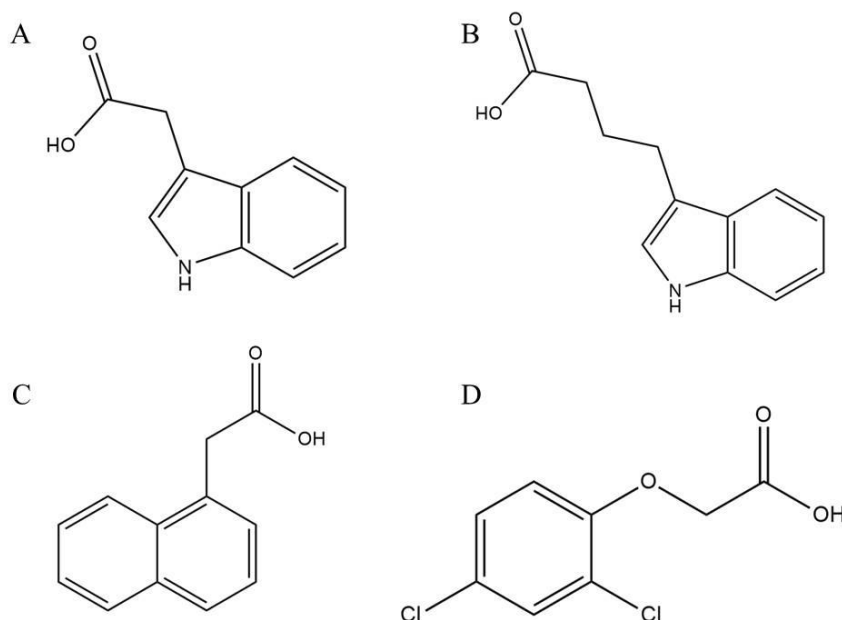
ในด้านอุตสาหกรรมเอนไซม์จากจุลินทรีย์ราเอนโดไฟท์ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เอนไซม์อะไมเลส (amylase) เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมเอนไซม์ ใช้ในการเปลี่ยนแป้ง (starch) ให้เป็นน้ำเชื่อมกลูโคส (glucose syrup) เพื่อผลิต cyclodextrins ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมยา (Burhan et al., 2003) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจาก *Cylindrocephalum* sp. ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืช *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe. พบว่าสามารถผลิตอะไมเลสที่มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ และคาดว่าจะสามารถพัฒนานำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้ (Sunitha et al., 2012) และปัจจุบันได้มีการศึกษาราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) และกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากราเอนโดไฟท์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลากหลาย ได้แก่ pectinase, cellulase, lipase, amylase, laccase และ proteinase เป็นต้น (Sunitha et al., 2013)

2.3 ออกซิน (auxin)

2.3.1 ความเป็นมา ความหมาย และตัวอย่างออกซิน

ออกซินถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1880 โดยชาลส์ ดาร์วิน ซึ่งในสมัยนั้นยังไม่มีการใช้คำว่า ออกซิน (Spaepen et al., 2007; Spaepen and Vanderleyden, 2011) ออกซินจัดเป็นฮอร์โมนพืช (plant hormone) กล่าวคือ เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น โดยส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสรีระวิทยาในพืช ออกซินในธรรมชาติที่พืชสร้างขึ้นและค้นพบเป็นชนิดแรกคือ indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นโครงสร้างออกซินที่พบมากที่สุดที่สิ่งมีชีวิตสามารถผลิตได้ และมีฤทธิ์ออกซินสูงสุด กล่าวคือมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีกว่าสารออกซินตัวอื่นในปริมาณความเข้มข้นที่เท่ากัน ในปัจจุบันมนุษย์สามารถสังเคราะห์ออกซินเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ รวมทั้งมีการรายงานการสร้างออกซินจากสิ่งมีชีวิตอื่น ได้แก่ แบคทีเรีย รา และสาหร่าย ออกซินในปัจจุบันจึงถูกจัดให้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulating chemical) หมายถึง

สารอินทรีย์ไม่จำกัดว่าสร้างโดยพืชหรือสิ่งมีชีวิตใดๆ หรือสังเคราะห์ขึ้นโดยมนุษย์ และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืชทั้งด้านการกระตุ้นและยับยั้ง (พีรเดช, 2537) ตัวอย่างออกซิน (ภาพ 2.2) ได้แก่ indole-3-butylic acid (IBA), phenylacetic acid (PAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), L-naphthylacetic acid (NAA) เป็นต้น (Patten and Glick, 1996)



ภาพ 2.2 ตัวอย่างโครงสร้างออกซินธรรมชาติ และออกซินสังเคราะห์; indole-3-acetic acid (A), indole-3-butyric acid (B), L-naphthylacetic acid (C) และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (D)

2.3.2 การใช้ประโยชน์จากสารกลุ่มออกซิน

ออกซินทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช กระตุ้นการสร้างและขยายขนาดเซลล์ กระตุ้นการเกิดรากและการเจริญของราก (Saad and Elshahed, 2012) ในพืชมีการสร้างออกซินบริเวณปลายยอด ปลายราก เนื้อเยื่อเจริญ ผลอ่อน ซึ่งมากน้อยแตกต่างกันไป การรักษาปริมาณออกซินในเนื้อเยื่อต่างๆจะมีการสร้างและทำลายไปพร้อมๆกัน ในเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญจะมีการสร้างมากกว่าในเนื้อเยื่อที่อายุมาก จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำออกซินไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรกรรมต่างๆ ดังนี้ (พีรเดช, 2537; Weaver, 1972)

1. การเร่งการเกิดราก รากเป็นอวัยวะหลักที่เกี่ยวข้องในการดูดซึมน้ำ สารอาหาร และแร่ธาตุให้แก่พืช มีการรายงานว่าชีวมวลของรากและการพัฒนาของรากที่เพิ่มขึ้นของต้นข้าวโพดส่งผลให้ผลผลิตของข้าวโพดเพิ่มขึ้นด้วย (Harman et al., 2004) การใช้ออกซินกระตุ้นการเกิดรากในกิ่งปักชำ

และกิ่งตอนของพืชหลายชนิด อาทิ คาวเรือง ฤๅษีผสม ไทร (รากงอกง่าย) มะม่วง มังคุด ขนุน บัวย (รากงอกยาก) เป็นต้น ชนิดของพืชมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของออกซินที่ใช้โดยพืชที่รากงอกง่ายจะใช้ความเข้มข้นของออกซินที่ต่ำกว่าพืชที่รากงอกยาก นอกจากนี้ชนิดของออกซินที่ใช้ก็มีความสำคัญขึ้นอยู่กับการมีฤทธิ์ออกซินสูง ความคงตัวและความเป็นพิษต่อเซลล์พืช ออกซินที่นิยมใช้ในการเร่งราก ได้แก่ IBA และ NAA (พีรเดช, 2537; Kumar, 2016)

2. การเปลี่ยนของเพศดอก เพศของดอกมีความสำคัญต่อการติดผลของพืชโดยเฉพาะพืชที่มีดอกตัวผู้และตัวเมียแยกต้นกันจึงทำให้การปฏิสนธิเกิดได้ยาก ประเทศไทยใช้ NAA พ่นช่อดอกเงาะของต้นตัวเมีย ขณะดอกตูมส่งผลให้ดอกเงาะตัวเมียที่ได้รับสารกลายเป็นดอกตัวผู้สามารถปลอญละอองเกสรผสมกับดอกตัวเมียได้ (พีรเดช, 2537) การพ่นออกซินในพืชตระกูลแตงและฟักสามารถเพิ่มจำนวนดอกเพศเมียได้ เช่นเดียวกับการพ่นออกซินในข้าวโพดสามารถกระตุ้นให้ข้าวโพดมีดอกสมบูรณ์เพศเป็นการช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดฝักข้าวโพดได้ (Laibach and Kribben, 1950; Kumar, 2016)

3. เพิ่มการติดผล ออกซินช่วยในการงอกของเกสรตัวผู้ของพืชบางชนิดทำให้พืชติดผลได้ดีขึ้น เช่น มะเขือเทศ พริก และส้มเขียวหวาน ในทางกลับกันพืชเมล็ดเดี่ยวอย่าง มะม่วง ท้อ ไม่ตอบสนองต่อออกซินในการกระตุ้นการติดผล (พีรเดช, 2537) นอกจากนั้นพบว่าการใช้กรดแอบไซคิกยังช่วยเพิ่มการติดผลในพืชบางชนิดที่รังไข่สามารถเติบโตเป็นผลได้โดยไม่ต้องมีการผสมนิวเคลียส (Parthenocarpic fruit) เช่น องุ่น (Weaver, 1972)

4. การเพิ่มขนาดผล การทดลองดั่งเมล็ดของสตรอเบอรี่ออกในระยะแรกของการพัฒนาผลพบว่าผลสตรอเบอรี่ไม่เจริญและเมื่อทาออกซินบนผลเพื่อทดแทนเมล็ดที่ติดออกพบว่าผลสตรอเบอรี่สามารถเจริญได้เท่าปกติ แสดงว่าเมล็ดสตรอเบอรี่มีบทบาทสำคัญในระบบการสร้างออกซิน เพื่อกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ทำให้ผลสตรอเบอรี่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ (Nitsch, 1950; Ponappa and Miller, 1996) ในสับปะรดมีการฉีดพ่นออกซินเพื่อกระตุ้นให้สร้างผลเดี่ยวเป็นการเพิ่มขนาดของสับปะรดได้ สารกลุ่มออกซินที่ใช้กันมากเพื่อเพิ่มขนาดผลได้แก่ 2, 4-D, 4-CPA (4-chlorophenoxyacetic acid) และ NAA (Kumar, 2016)

5. การป้องกันผลร่วง สาเหตุของการหลุดร่วงของอวัยวะพืชเกิดจากฮอร์โมนบางชนิด เช่น เอทิลีน ซึ่งส่งเสริมการทำงานของไฮโดรไลติกเอนไซม์ โพลีกาแลคทูโรเนส (polygalacturonase) และ เซลลูเลส (Cellulase) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของผนังเซลล์และมิดเดิลลามลล่า (middle lamellar)

ทำให้เกิดรอยแยกของเนื้อเยื่อพืชบริเวณข้อหรือก้าน (Goren, 1993) ในการศึกษาการป้องกันการหลุดร่วงของผลอ่อนในผลไม้ตระกูลส้ม แอปเปิ้ล แพร์ และพีช พบว่าการหลุดร่วงของผลอ่อนลดลงเมื่อฉีดพ่นด้วยออกซิน (Leopold, 1958; Weaver, 1972; Arteca, 1996; Kumar, 2016) เนื่องจากออกซินทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ข้างต้น ทำให้ป้องกันผลร่วงก่อนการเก็บเกี่ยวและช่วยพัฒนาลักษณะของสีและรสชาติของผลไม้ให้สมบูรณ์ (Goren and Huberman, 1976) อย่างไรก็ตามออกซินไม่สามารถป้องกันการหลุดร่วงในกรณีที่ผลร่วงจากการพัฒนาผลขึ้นมาโดยไม่ผสมเกสร ต้นสมบูรณ์ไม่เพียงพอ การหลุดร่วงที่เกิดจากการกีดกันของแมลงหรือการเข้าทำลายของโรค นอกจากนี้การใช้ออกซินที่ความเข้มข้นสูงเกินไปมีผลทำให้เกิดผลร่วงได้เช่นกัน (พีรเดช, 2537)

6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ออกซินมีบทบาทสำคัญ โดยการเติมออกซินลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช (Saad and Elshahed, 2012)

7. ใช้กำจัดวัชพืช ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการใช้ประโยชน์จากออกซินเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพนั้นต้องคำนึงถึงชนิดพืช ชนิดออกซิน และที่สำคัญคือความเข้มข้นของออกซินที่ใช้ ออกซินที่มีความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าพืชได้ ดังนั้นจึงได้มีการนำออกซินมาเป็นสารกำจัดวัชพืชอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งออกซินที่มีฤทธิ์ออกซินมาก ได้แก่ 2, 4-D และ 4-CPA (พีรเดช, 2537; Weaver, 1972; Kumar, 2016)

2.4 จุลินทรีย์ผลิต indole-3-acetic acid (IAA)

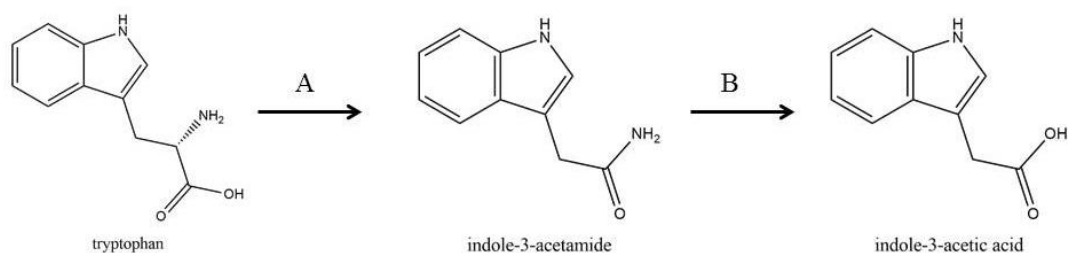
2.4.1 วิธีการผลิต IAA โดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถผลิต IAA ได้ (Arshad and Frankenberger, 1991) ผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์โดยใช้ tryptophan เป็นสารตั้งต้นการผลิต ซึ่ง IAA ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์จะอาศัยเอนไซม์และกระบวนการที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวิธีการผลิตที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ นอกจากชนิดของจุลินทรีย์แล้วปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอาจมีผลต่อการเลือกใช้วิธีการผลิต IAA ด้วย กระบวนการผลิต IAA ผ่านวิธีการผลิตของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันทำให้เกิดสารตัวกลาง (intermediate) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นออกซินแต่มีฤทธิ์ออกซินอ่อนกว่า IAA เช่น indole-3-pyruvic acid (IPyA), indole-3-acetamide (IAM), indole-3-acetaldehyde (IAAld), indole-3-acetonitrile (IAN) เป็นต้น การศึกษาวิธีการผลิต IAA ของจุลินทรีย์ได้มีการนำความรู้ทางพันธุศาสตร์และการวิเคราะห์ชีวเคมีที่หลากหลายมาใช้เพื่อบ่งบอกชนิดของวิธีการผลิต IAA ของจุลินทรีย์ แต่การศึกษายังไม่ครอบคลุมยีนและเอนไซม์ทั้งหมด การบ่งบอกวิธีการผลิต IAA ของจุลินทรีย์จึงเน้นการติดตามสาร

ตัวกลางที่เกิดขึ้นเป็นหลัก ซึ่งในขณะนี้วิธีการผลิต IAA ของจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้เป็น 5 วิธีดังต่อไปนี้ (Patten and Glick, 1996; Spaepen et al., 2007; Spaepen and Vanderleyden, 2011)

2.4.1.1 การผลิต IAA ผ่านวิถี indole-3-acetamide (IAM)

สารตัวกลางที่สำคัญในวิธีการผลิตนี้คือ indole-3-acetamide (IAM) ดังแสดงในภาพ 2.3 เริ่มต้นเมื่อจุลินทรีย์เปลี่ยน tryptophan เป็น IAM โดยเอนไซม์ tryptophan-2-monooxygenase การศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิต IAA ผ่านวิถี IAM พบว่า จุลินทรีย์ก่อโรคพืช (pathogen) อาศัยวิถี IAM ในการสร้างความรุนแรงของโรค ได้แก่ *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Colletotrichum gloeosporioides* อย่างไรก็ตาม *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืชกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจน (nitrogen-fixing bacteria) ผลิต IAA ผ่านวิถี IAM เช่นกัน อย่างไรก็ตามการผลิต IAA ผ่านวิถี IAM อาจถูกควบคุมโดย tryptophan-2-monooxygenase ขึ้นอยู่กับระดับของ tryptophan ที่จำกัด และปริมาณของ IAM และ IAA ที่สูงขึ้น (Hutcheson and Kosuge, 1985) เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นกับเซลล์

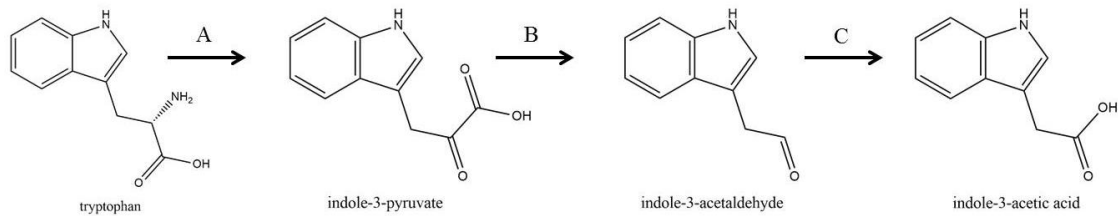


ภาพ 2.3 ขั้นตอนการผลิต IAA ผ่านวิถี IAM ของจุลินทรีย์; เอนไซม์ tryptophan-2-monooxygenase (A) และ indole-3-acetamide hydrolase (B)

2.4.1.2 การผลิต IAA ผ่านวิถี indole-3-pyruvic acid (IPyA)

วิถี IPyA เป็นวิถีหลักของการผลิตออกซินในพืชดังแสดงในภาพ 2.4 เริ่มเมื่อ tryptophan ถูกเปลี่ยนเป็น IPyA โดยเอนไซม์ tryptophan transferase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์ จากนั้น IPyA จะถูก indole-3-pyruvate decarboxylase เปลี่ยนเป็น indole-3-acetaldehyde (IAAld) เรียกขั้นตอนนี้ว่า decarboxylation และ IAAld จะถูกออกซิไดซ์โดย indole-3-acetaldehyde dehydrogenase เป็น IAA การศึกษาพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิต IAA ผ่านวิถี IPyA ทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช เช่น *Pantoea agglomerans*, *Ustilago maydis* จุลินทรีย์ส่งเสริมการ

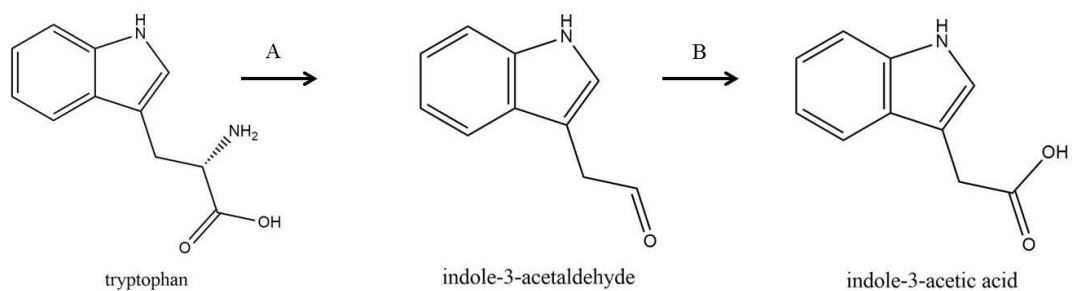
เจริญเติบโตแก่พืช ได้แก่ *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter cloacae*, *Trichoderma virens* และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc* การผลิต IAA ผ่านวิถี IPyA ขั้นตอนการผลิต IAA ผ่านวิถี IPA



ภาพ 2.4 ขั้นตอนการผลิต IAA ผ่านวิถี IPyA ของจุลินทรีย์; เอนไซม์ tryptophan transferase (A), indole-3-pyruvate decarboxylase (B) และ indole-3-acetaldehyde dehydrogenase (C).

2.4.1.3 การผลิต IAA ผ่านวิถี tryptophan side chain oxidase

เริ่มจาก tryptophan เป็น indole-3-acetaldehyde (IAAld) โดยไม่ต้องผ่าน indole-3-pyruvic acid (IPyA) และเปลี่ยน IAAld เป็น IAA โดยใช้เอนไซม์ indole-3-acetaldehyde dehydrogenase เรียกขั้นตอนการผลิต IAA นี้ว่าผ่านวิถี tryptophan side chain oxidase ดังแสดงในภาพ 2.5 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต IAA โดยอาศัย tryptophan side chain oxidase เช่น *Pseudomonas fluorescens*

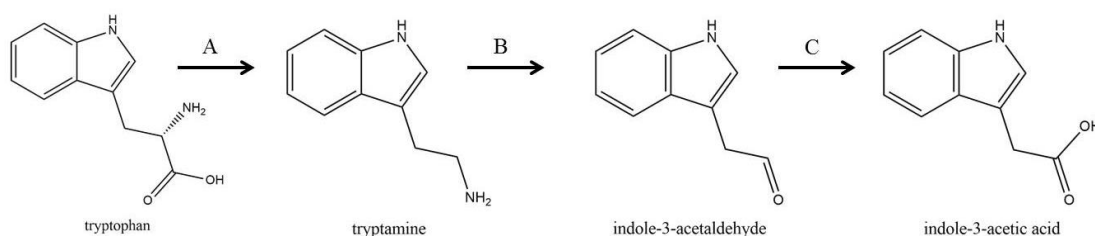


ภาพ 2.5 ขั้นตอนการผลิต IAA ผ่านวิถี tryptophan side chain oxidase ของจุลินทรีย์; เอนไซม์ tryptophan side chain oxidase (A) และ indole-3-acetaldehyde dehydrogenase (B)

2.4.1.4 การผลิต IAA ผ่านวิถี tryptamine (TAM)

จุลินทรีย์มีความสามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole-3-acetaldehyde (IAAld) โดยผ่านสารตัวกลางคือ tryptamine ดังแสดงในภาพ 2.6 เริ่มต้นโดยจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ tryptophan

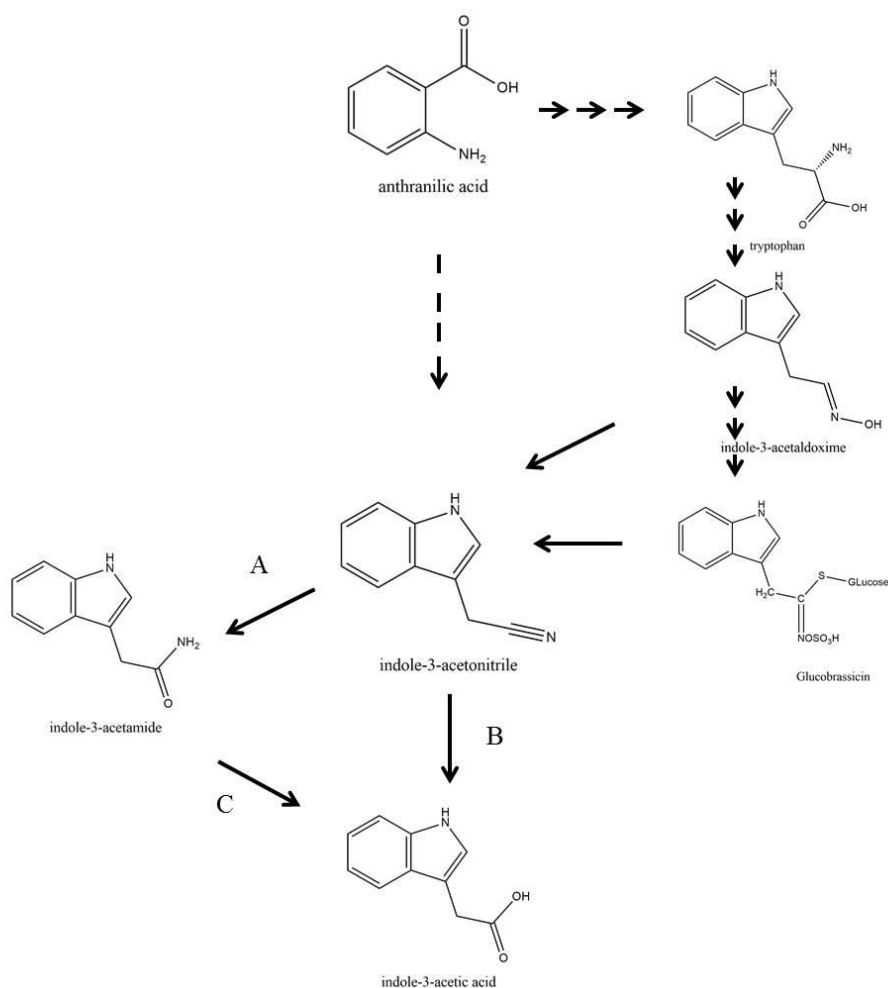
decarboxylase เปลี่ยน tryptophan เป็น tryptamine จากนั้นเปลี่ยนเป็น IAAld และ IAA โดย amine oxidase และ indole-3-acetaldehyde dehydrogenase ตามลำดับ มีการรายงานอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับการผลิต IAA ผ่านวิถี TAM ทั้งในพืชและรา เช่น *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp.



ภาพ 2.6 ขั้นตอนการผลิต IAA ผ่านวิถี TAM ของจุลินทรีย์; เอนไซม์ tryptophan decarboxylase (A) amine oxidase (B) และ indole-3-acetaldehyde dehydrogenase (C)

2.4.1.5 การผลิต IAA ผ่านวิถี indole-3-acetonitrile (IAN)

การศึกษาการผลิต IAA ผ่านวิถี IAN pathway ดังแสดงในภาพ 2.7 มีการรายงานว่าพืชสามารถเปลี่ยน indole-3-acetonitrile (IAN) เป็น IAA โดยอาศัยเอนไซม์ nitrilase (Bartling et al., 1994) แต่ขั้นตอนการเปลี่ยนจาก tryptophan เป็น IAN ยังไม่แน่ชัดระหว่างสองวิถี คือ indolic glucosinolates (Glucobrassicin) และ indole-3-acetaldoxime ที่ใช้เปลี่ยน tryptophan เป็น IAN การศึกษาการผลิต IAA ผ่านวิถี IAN ในจุลินทรีย์มีการตรวจพบการสร้างเอนไซม์ nitrilase ที่จำเพาะกับ IAN ในการเปลี่ยนไปเป็น IAA ของเชื้อ *Alcaligenes faecalis* ในขณะเดียวกัน Kobayashi et al. (1995) รายงานการสร้าง nitrile hydratase ที่เปลี่ยน IAN เป็น IAM และเอนไซม์ amidase ที่เปลี่ยน IAM เป็น IAA ใน *Ag. tumefaciens* และ *Rhizobium* spp. ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการศึกษาการผลิต IAA ผ่านวิถี IAN



ภาพ 2.7 ขั้นตอนการเปลี่ยนจาก IAN เป็น IAA และการเปลี่ยนจาก tryptophan เป็น IAN; ลูกศรต่อกัน ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow$) ขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์และลูกศรขาด (--->) วิธีการผลิตที่เกิดขึ้นไม่แน่ชัด, เอนไซม์ nitrile hydratase (A), nitrilase (B) และ amidase (C)

Costacura และ Vanderlayden (1995) รายงานการผลิต IAA ของ *Rhizobium* ผ่านวิถี IAM เมื่ออาศัยอยู่ร่วมกับพืช ในขณะที่ *Rhizobium* ที่อยู่อย่างอิสระใช้วิถี IPyA ในการผลิต IAA (Kaneshiro et al., 1983; Ernstsens et al., 1987) ได้มีการทดสอบการยับยั้งวิธีการผลิต IAA ในจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่าจุลินทรีย์เหล่านั้นยังคงผลิต IAA ได้ปกติ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สามารถผลิต IAA ผ่านวิธีการผลิตได้หลากหลาย อย่างไรก็ตามการที่จุลินทรีย์จะใช้วิถีใดในการผลิต IAA นั้นขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์และสภาวะแวดล้อมขณะนั้นๆ (Spaepen and Vanderleyden, 2011)

นอกจากสิ่งมีชีวิตจะสามารถผลิต IAA จาก tryptophan ผ่านวิถีต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว พบว่าพืชสามารถผลิต IAA โดยปราศจาก tryptophan (tryptophan-independent pathway) ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษที่ผ่านมายังไม่สามารถระบุเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ tryptophan-independent

pathway ได้ เช่นเดียวกับความพยายามในการศึกษาการผลิต IAA โดยปราศจาก tryptophan ใน จุลินทรีย์ที่ไม่พบหลักฐานทั้งด้านพันธุศาสตร์และชีวเคมีที่สามารถยืนยันการผลิต IAA ของจุลินทรีย์ ผ่านวิถี tryptophan-independent pathway

2.4.2 จุลินทรีย์ที่ผลิต IAA

การศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ผลิต IAA พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม tryptophan เป็นสารตั้งต้นได้ ดังตาราง 2.3 Mohite (2013) รายงานการคัดแยก แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* และ *L. casei* จากดินบริเวณรอบราก ต้นกล้วย ฝ้าย ข้าวโพด และข้าวสาลี ว่าสามารถผลิต IAA ในช่วง 60–110 µg/ml เช่นเดียวกับ Goswami et al. (2015) รายงานแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (*Bacillus* spp., *Kocuria* spp. และ *Pseudomonas* sp.) ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืชสามารถผลิต IAA ในช่วง 1.06–8.04 µg/ml ยิ่งไปกว่านั้นมีการรายงานการศึกษาแบคทีเรียในกลุ่มของแอคติโนมัยซีท ทั้งที่เป็นเอนโดไฟต์และแยกจากตัวอย่างดินทั้งในกลุ่ม *Streptomyces* และ non-*Streptomyces* ว่ามีความสามารถในการผลิต IAA ได้เช่นกัน (Khamna et al., 2009; Abd-Alla et al., 2013; Goudjal et al., 2013) โดย Khamna et al. (2010) รายงานการศึกษา *Streptomyces* sp. CMU-H009 ว่าสามารถผลิต IAA ได้สูงถึง 300 µg/ml ว่าเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจในการศึกษาการผลิต IAA มีการรายงานการผลิต IAA จากราอย่างแพร่หลาย ทั้งราเอนโดไฟต์ ตัวอย่างเช่น *Mus. cinnamomi* ที่แยกจากพืชอบเชย *Paecilomyces formosus*, *Penicillium* sp. และ *Phoma glomerata* ที่คัดแยกจากแตงกวา ซึ่งสามารถผลิต IAA ในช่วง 3.89–45.36 µg/ml (Khan et al., 2012; Waqas et al., 2012; Suwannarach et al., 2015) ราที่อาศัยอยู่ทั่วไป เช่น *Trichoderma virens* สามารถผลิต IAA เท่ากับ 0.23 µg/ml (Contreras-Cornejo et al., 2009) white rot fungi ได้แก่ *Pleurotus ostreatus* สามารถผลิต IAA ปริมาณ 473.55 µg/ml ยิ่งไปกว่านั้นมีการรายงานราเอดโตไมคอร์ไรซากลุ่ม Sclerodermatoid fungi ได้แก่ *Astraeus odoratus*, *Pisolithus albus*, *Scleroderma sinnamariense* และ *Phlebopus portentosus* ซึ่งเป็นราเอดโตไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่ในรากพืชว่าสามารถผลิต IAA อยู่ในช่วง 40.76–65.29 µg/ml (Kumla et al., 2014) นอกจากพบว่า ยีสต์และสาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิดก็มีรายงานว่าสามารถผลิต IAA ได้เช่นกัน (Labeeuw et al., 2016; Nutaratat et al., 2016) อย่างไรก็ตาม การผลิต IAA ของจุลินทรีย์นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแล้ว ปริมาณ tryptophan อาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงก็มีผลต่อการผลิต IAA ของจุลินทรีย์เช่นกัน

ตาราง 2.3 รายงานจุลินทรีย์ผลิตออกซิน

จุลินทรีย์	แหล่งจุลินทรีย์	ปริมาณ IAA ($\mu\text{g/ml}$)	อ้างอิง
1. Bacteria			
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Kocuria flava</i> , <i>K. turfanensis</i> และ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rhizobacteria	1.06—8.04	Goswami et al. (2015)
<i>Bacillus</i> sp. JH2-2	ดินบริเวณ rhizosphere รอบรากพืชในเหมืองแร่	4.6	Shim et al. (2015)
<i>Bacillus</i> spp. และ <i>Paenibacillus</i> spp.	<i>Lonicera japonica</i>	11.5—49.2	Zhao et al. (2015)
<i>Streptomyces</i> spp.	ดินบริเวณรอบรากข้าวสาลี, ข้าวโพด และถั่วปากอ้า ในอียิปต์	3.54—22.56	Abd-Alla et al. (2013)
<i>Streptomyces</i> และ Non- <i>Streptomyces</i>	spontaneous plants (<i>Aristida pungens</i> , <i>Astragalus armatus</i> , <i>Cleome arabica</i> , <i>Panicum turgidum</i> และ <i>Solanum nigrum</i>)	12.28—100.03	Goudjal et al. (2013)
<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i>	ดินบริเวณรอบรากต้นกล้วย, ฝ้าย, ข้าวโพด และ ข้าวสาลี	60—110	Mohite (2013)

ตาราง 3 (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งจุลินทรีย์	ปริมาณ Indole/IAA ($\mu\text{g/ml}$)	อ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp. SF5	ดินที่อุดมสมบูรณ์จาก El-Ourissia region, North of Algeria (Sétif)	55.58	Ameur and Ghoul (2012)
<i>Bacillus</i> spp., Rhizobacteria และ <i>Serratia</i> spp.	ดินรอบรากพืชต่างๆ เช่น ข้าว, มะเขือเทศ, ถั่ว ลูกไก่ และ แครอท ในเมือง Mandalay ประเทศพม่า	2.50–121.1	Lwin et al. (2012)
Endophytic bacteria	ต้นแอปเปิ้ล	27–42	Miliute and Buzaitė (2011)
<i>Rubrivivax benzoatilyticus</i> JA2	ดินบริเวณรอบรากข้าวที่ถูกน้ำท่วม (Ramana et al. 2006)	58.1	Mujahid et al. (2011)
<i>Klebsiella</i> SN1.1	ดินบริเวณรอบรากข้าว	291.97	Chaiharn and Lumyong (2011)
<i>Streptomyces</i> sp. CMU-H009	ดินบริเวณ Rhizosphere ของพืชสมุนไพร	300	Khamna et al. (2010)
<i>Vibrio</i> spp.	รากของ <i>Spartina alterniflora</i> และ <i>Juncus roemerianus</i>	0.12–12.78	Gutierrez et al. (2009)

ตาราง 3 (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งจุลินทรีย์	ปริมาณ Indole/IAA ($\mu\text{g/ml}$)	อ้างอิง
<i>Streptomyces</i> และ Non- <i>Streptomyces</i>	ดินบริเวณรอบราก ของพืชสมุนไพรใน จังหวัดลำพูน ประเทศไทย	5.47–143.95	Khamna et al. (2009)
<i>Azospirillum</i> spp.	เนื้อเยื่อรากของ ข้าวสาลี, ข้าวโพด, ข้าว บาร์เลย์, ข้าวไรย์ และหญ้า	29.0–761.0	Akbari et al. (2007)
<i>Bacillus</i> sp. 21	Orchid root (<i>Pholidota articulata</i>)	58	Tsavkelova et al. (2007)
2. Fungi			
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	ใบข้าว	321.7	Nutaratat et al. (2016)
<i>Muscodor cinnamomi</i>	<i>Cinnamomum bejolghota</i> (Buch-Ham)	45.36	Suwannarach et al. (2015)
Endophytic fungi isolate KN10	Aromatic rice	2.6	Syamsia et al. (2015)
<i>Astraeus odoratus</i> , <i>Pisolithus albus</i> , <i>Scleroderma sinnamariense</i> และ <i>Phlebopus</i> <i>portentosus</i>	Sclerodermatoid fungi	40.76–65.29	Kumla et al. (2014)

ตาราง 2.3 (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งจุลินทรีย์	ปริมาณ Indole/IAA (µg/ml)	อ้างอิง
<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Chrysosporium pseudomerdarium</i> , <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Penicillium</i> sp. และ <i>Phoma glomerata</i>	รากของ <i>Glycine max</i> (L.) Merr. และ <i>Cucumis sativus</i>	0.23—71.51	Waqas et al. (2014)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	White rot fungus	473.55	Bose et al. (2013)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CMU-AU006	Orchid root (<i>Spathoglottis affinis</i>)	243.56	Chutima and Lumyong (2012)
<i>Chaetomium globosum</i>	รากของ <i>Capsicum annuum</i> L.	16.71	Khan et al. (2012)
<i>Paecilomyces formosus</i> LHL10	Cucumber plant	10.2	Khan et al. (2012)
<i>Penicillium</i> sp. และ <i>Phoma glomerata</i>	Cucumber plant	3.89—29.8	Waqas et al. (2012)
<i>Trichoderma virens</i>	พบได้ทั่วไป	0.23	Contreras-Cornejo et al. (2009)
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Citrus plant	0.64—8.42	Chung et al. (2003)

ตาราง 2.3 (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งจุลินทรีย์	ปริมาณ Indole/IAA ($\mu\text{g/ml}$)	อ้างอิง
3. Microalgae			
<i>Emiliana huxleyi</i> CCMP3266	Culture collection [Provasoli-Guillard National Centre for Marine Algae And Microbiota (NCMA)]	8.76	Labeeuw et al. (2016)

2.4.3 ราเอนโดไฟท์ผลิต IAA กระตุ้นการเจริญของพืช

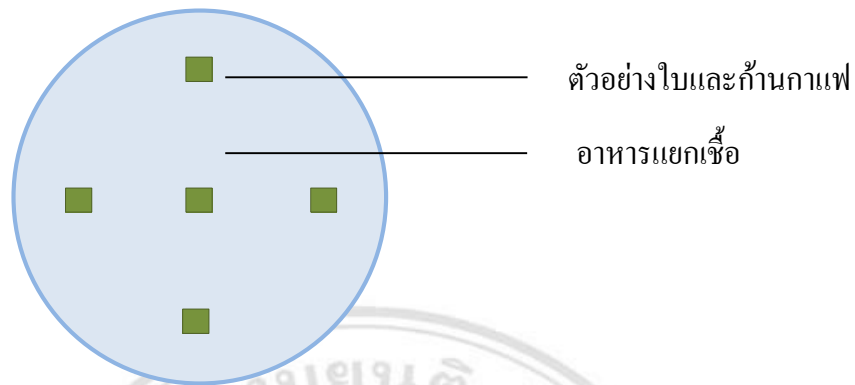
ราเอนโดไฟท์เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญที่มนุษย์นำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย การศึกษาและวิจัยการใช้ประโยชน์จากราเอนโดไฟท์เพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชมีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA เพื่อกระตุ้นการเจริญของพืช Chutima and Lumyong (2012) ศึกษาราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้พบ *Collectotrichum gloeosporioides*, *Tulasnella* spp., *Fusarium* spp. *Trichocladium pyriforme*, *Eupenicillium* sp. สามารถผลิต IAA ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม tryptophan และเมื่อนำ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ผลิตไปทดสอบการส่งเสริมการเกิดราก การงอก และการยืดยาวเนื้อเยื่อเจริญในพืชทดสอบ พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชทดสอบได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน มีการรายงานว่าราเอนโดไฟท์ในรากกล้วยไม้ช่วยให้กล้วยไม้งอกและเจริญ ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากกับกล้วยไม้ในธรรมชาติ เนื่องจากกล้วยไม้ในธรรมชาติเมื่อออกแล้วต้องอาศัยราเอนโดไฟท์ในการส่งเสริมการเจริญทั้งด้านการดูดซึมน้ำ ธาตุอาหาร ป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค และสร้างสารส่งเสริมการเจริญ (Swarts and Dixon, 2009; Wright et al., 2009) Syamsia et al. (2015) ศึกษาผลของ IAA จากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากชิ้นส่วนใบและก้านของข้าวหอมเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชทดสอบพบว่า IAA ที่ผลิตจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของ *Vigna radiate* และ *Cicer arietinum* ได้ 95% และ 87% ตามลำดับ Waqas et al. (2012) รายงาน *Phoma glomerata* LWL2 และ *Penicillium* sp. LWL3 ที่แยกจากรากแตงกวาสามารถผลิตจิบเบอเรลลิน (Gibberellins; GAs) และ IAA (3.89 และ 29.8 µg/ml ตามลำดับ) และเมื่อนำไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญของพืชในสถานะตั้งเครียดพบว่าในต้นแตงกวาที่ปลูกในสถานะตั้งเครียดสถานะเกลือสูงและสภาวะการขาดน้ำที่เดิมราเอนโดไฟท์ *Pho. glomerata* LWL2 และ *Penicillium* sp. LWL3 มีค่าชีวมวลสูงกว่าต้นแตงกวาที่ไม่ได้เติมราเอนโดไฟท์ ทั้งความยาวราก น้ำหนักสดและแห้งของราก และปริมาณคลอโรฟิลล์เช่นเดียวกับการรายงานใช้ *Paecilomyces formosus* LHL10 ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากแตงกวาสามารถผลิต IAA และ GAs ช่วยให้แตงกวาและข้าวเจริญได้ในสภาวะที่ความเข้มข้นของเกลือสูง (Khan et al., 2012)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกราเอนโดไฟท์

เก็บตัวอย่างใบและก้านลักษณะสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคไม่อ่อนและไม่แก่เกินไปโดยการสุ่มจากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea arabica*) ในแปลงเพาะปลูกกาแฟ ณ หน่วยวิจัยและพัฒนาเกษตรที่สูงขุนช่างเคี่ยน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (18°50'43.0"N, 98°54'26.0"E) จำนวน 5 ต้น ในเดือนกรกฎาคมและเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 โดยแยกแต่ละตัวอย่างใส่ในถุงพลาสติกอย่างมิดชิดและติดฉลากก่อนนำมาแยกราเอนโดไฟท์ในห้องปฏิบัติการ การวิจัยด้านการพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพภายใน 24 ชั่วโมง ล้างตัวอย่างใบและก้านกาแฟโดยผ่านน้ำไหลประมาณ 15 นาที ตัดใบและก้านให้มีขนาดความยาวเล็กลงขนาด 5–10 cm เพื่อสะดวกต่อการลดปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนบริเวณผิวตัวอย่าง นำตัวอย่างพืชที่ได้มาแยกราเอนโดไฟท์โดยวิธี triple surface sterilization (Suwannarach et al., 2012) ทำการห่อตัวอย่างกาแฟด้วยผ้าขาวบางและแช่ใน 70% เอทานอล 1 นาที, 3% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) 2 นาที และ 95% เอทานอล 30 วินาที ตามลำดับ ผึ่งตัวอย่างให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นตัดใบกาแฟให้มีขนาด 5×5 mm และตัดก้านกาแฟให้มีขนาด 10 mm วางบนอาหาร half potato dextrose agar (half-PDA) และ water agar (WA) ที่เติม chloramphenicol 0.05 g/L และ Rose bengal 0.035 g/L ทำการวางชิ้นพืชจำนวน 5 ชิ้นต่อ 1 จานอาหารดังแสดงในภาพ 8 บ่มราเอนโดไฟท์ที่อุณหภูมิ 25°C เมื่อเส้นใยราเอนโดไฟท์เจริญออกจากเนื้อเยื่อพืช ตัดส่วนปลายเส้นใยและย้ายลงในอาหาร potato dextrose agar (PDA) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเก็บรักษาราเอนโดไฟท์ 2 วิธี คือ เลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารวุ้น PDA เอียง (PDA slant) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) และตัดชิ้นวุ้นราเอนโดไฟท์ใส่ในหลอดเก็บเชื้อที่มี 20% glycerol เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C



ภาพ 3.1 การวางตัวอย่างชิ้นส่วนพืชบนอาหารคัดแยกราเอนโดไฟท์

3.2 การหาค่าความหนาแน่นของประชากรราต่อตัวอย่าง

หาได้จากจำนวนราที่พบทั้งหมดหารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการแยกตามวิธีของ Suwannarach et al. (2012)

3.3 การจัดกลุ่มราเอนโดไฟท์

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน จัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยตาเปล่าและได้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ เช่น ลักษณะโคโลนี เส้นใย รูปร่าง และขนาดของสปอร์ (Ellis, 1971; Carmichael et al., 1980)

3.4 การคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารกลุ่มอินโดล (indole) โดยวิธี colorimetric assay

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 3–5 วัน จากนั้นตัดชิ้นส่วนของราเอนโดไฟท์ขนาด 5 mm จำนวน 1 ชิ้น ใส่หลอดทดลองขนาด 18×180 mm ที่บรรจุ 5 ml อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ที่เติม 2 mg/ml L-tryptophan ทำ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบซ้ายขวาในสภาวะมืดที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) เมื่อครบ 7 วัน ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ราออกจากน้ำเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำเอาน้ำเลี้ยงมาตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มอินโดลของราเอนโดไฟท์โดยวิธี colorimetric assay (Tsavkelova et al., 2007) โดยการปิเปต 2 ml สารละลาย Salkowski's reagent ลงในหลอดทดลองขนาด 13×100 mm และนำน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ 1 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า

บ่มปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที สารละลายที่ผสมมีสีชมพูจนถึงสีแดงหลังจากการเกิดปฏิกิริยาแสดงผลเชิงบวกกับการผลิตสารกลุ่มอินโดล นำสารละลายสีที่ทำปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 530 nm โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) นำค่า OD ที่ได้คำนวณผลรวมของการผลิตสารกลุ่มอินโดลเบื้องต้นที่ราเอนโดไฟท์ผลิตโดยเทียบกับสมการกราฟมาตรฐาน IAA

3.5 การสกัดสารกลุ่มอินโดลจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก

กรองแยกเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงและปรับค่า pH ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ให้ค่า pH อยู่ระหว่าง 2.5–3.0 ด้วย 1 N HCl สกัดสารกลุ่มอินโดลจากน้ำเลี้ยงด้วย ethyl acetate ต่อน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการระเหย ethyl acetate โดยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) เพื่อให้ได้สารสกัดจากราเอนโดไฟท์ เก็บสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ในขวดสีชาที่ 4°C เพื่อรักษาสภาพประกอบของสารสำหรับการทดสอบต่อไป (Ahmad et al., 2005; Chaiharn and Lumyong, 2011)

3.6 การตรวจสอบองค์ประกอบสารกลุ่มอินโดลเบื้องต้นที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)

ละลาย 1 mg สารสกัดหยาบที่สกัดได้จากราเอนโดไฟท์ด้วยเมทานอล จุดสารละลายสารสกัดหยาบบนแผ่น TLC ขนาด 5×10 cm (Silica gel G F257, thickness 0.25 mm, Merk, Germany) และนำแผ่น TLC จุ่มลงสารละลายของ chloroform: methanol: water (84:14:1) ที่ใช้เป็น mobile phase ให้สารเกิดการเคลื่อนที่ถึงตำแหน่งที่กำหนด ทำการตรวจสอบค่า R_f ของสารสกัดหยาบเทียบกับสารมาตรฐาน IAA ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ความยาวคลื่น 254 nm และการฉีดพ่นด้วย Salkowski's reagent (Ehmann, 1977)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

3.7 การตรวจสอบสารกลุ่มอินโดลในสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

ละลายสารสกัดหยาบ (บันทึกปริมาณสารเพื่อใช้คำนวณกลับ) จากราเอนโดไฟท์ด้วยเมทานอล จากนั้นกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 μm นำสารละลายของสารสกัดหยาบมาตรวจเพื่อวัดปริมาณ IAA โดยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu, Japan (Shimadzu Prominence UFLC system ประกอบด้วย LC-20 AD pump, SIL-20ACHT auto sampler, CTO-20 AC column oven, CBM-20A system controller และ SPD-20A UV/VIS detector) column ที่ใช้คือ Mightysil RP-18 ขนาด 250×4.6 mm, 5 μm อุณหภูมิ column เท่ากับ 40°C โดยใช้ 45% สารละลาย A (1% กรดอะซิติก) และ 55% สารละลาย B (100% เมทานอล) เพื่อใช้เป็น mobile phase ในการเคลื่อนที่ของสารสกัดหยาบและสารเปรียบเทียบมาตรฐาน มีอัตราการไหลของตัวอย่างเท่ากับ 0.5 ml/min ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 10 μl ทำการตรวจวัดสารกลุ่มอินโดลที่ความยาวคลื่น 280 nm เปรียบเทียบกับ retention time ของสารมาตรฐาน IAA โดยการคำนวณหาปริมาณของ IAA จากสารสกัดหยาบที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ ได้จากการคำนวณสมการกราฟมาตรฐาน IAA ที่ได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (Chung et al., 2003; Kumla et al., 2014)

3.8 การศึกษาวิธีการสังเคราะห์ IAA ของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก

เลี้ยงราเอนโดไฟท์ในหลอดทดลองขนาด 18×180 mm ที่ผสม 2 mg/ml L-tryptophan ในอาหาร PDB 5 ml เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบซ้ายขวาที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาวะมืดเป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บผลทุกวันโดยการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงและทำการสกัดสารกลุ่มอินโดลตามวิธีวิจัยที่กล่าวมาแล้ว นำสารสกัดหยาบที่ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงในแต่ละวันของปริมาณ IAA และสารตัวกลาง (intermediate) สารตัวกลางที่ใช้ในการศึกษา คือ สารมาตรฐาน indole-3-acetamide (IAM) และ indole-3-pyruvic acid (IPA) โดยเทคนิค HPLC ดังที่กล่าวมาแล้ว

3.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก

การศึกษาสภาวะความเข้มข้นของ L-tryptophan, อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก การศึกษาสภาวะความเข้มข้นของ L-tryptophan โดยการตัดชิ้นวุ้นราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกขนาด 5 mm เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 18×180 mm ในอาหาร PDB 5 ml ที่ผสม L-tryptophan ในระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/ml ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบซ้ายขวาความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ใน

สภาวะมืดที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงและนำน้ำเลี้ยงไปสกัด IAA และนำสารสกัดหยาบ IAA ของราเอนโดไฟท์ที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณ IAA ด้วยเทคนิค HPLC เลือกความเข้มข้นของ L-tryptophan ที่ราเอนโดไฟท์ผลิตปริมาณ IAA ได้สูงสุดไปศึกษาสภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก โดยเฉพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนเครื่องเขย่าแบบซ้ายขวาที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 22°C , อุณหภูมิห้อง ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), 30°C และ 37°C อุณหภูมิละ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงและนำน้ำเลี้ยงไปสกัด IAA ของราเอนโดไฟท์ที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณ IAA ด้วยเทคนิค HPLC เลือกอุณหภูมิที่ราเอนโดไฟท์ผลิต IAA ได้ปริมาณสูงสุดไปศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก โดยการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหาร PDB 5 ml ที่ผสม L-tryptophan ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการศึกษาก่อนหน้านี้ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบซ้ายขวาที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิที่เหมาะสมได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ เป็นเวลา 30 วัน โดยการเก็บน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ทุก 2 วัน จากนั้นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงและนำน้ำเลี้ยงไปสกัด IAA และนำสารสกัดหยาบ IAA ของราเอนโดไฟท์ที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณ IAA ด้วยเทคนิค HPLC โดยทำ 3 ชั่วโมงในแต่ละการทดลอง

3.10 การศึกษาสารสกัดหยาบอินโดลของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชทดสอบ (Khamna et al., 2010; Chutima and Lumyong, 2012; Kumla et al., 2014)

3.10.1 การทดสอบสารสกัดหยาบอินโดลของราเอนโดไฟท์ที่ผลิต IAA ที่คัดเลือกต่อการยืดยาวของ coleoptile ของพืชทดสอบ

ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเมล็ดพืชทดสอบ ได้แก่ ข้าว (*Oryza sativa* L.) ข้าวโพด (*Zea mays*) และข้าวไรย์ (*Secale cereal* L.) โดยแช่ในสารละลาย 2% NaClO เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นแช่เมล็ดพืชทดสอบในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อนาน 1 วัน เพาะเมล็ดพืชทดสอบลงในกระบะทรายในที่มีมืดที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 3 วัน เมื่อส่วน coleoptile ของพืชงอกยาว 3–4 cm ตัดส่วนปลาย ทั้ง 1–2 mm จากนั้นตัดเนื้อเยื่อ coleoptile ถัดจากที่ตัดทิ้งยาว 10

mm นำไปทดสอบการยืดตัวของเนื้อเยื่อ coleoptile โดยแช่ในสารสกัดหยาบอินโดลของราเอนโด-
ไฟท์ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ (ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าประกอบด้วย 20 และ 30 $\mu\text{g/ml}$
ของ IAA และ IAM ตามลำดับ) ที่ละลายในน้ำเปล่าฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 ml ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm บ่มที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืดนาน 24 ชั่วโมง ตรวจวัดความยาวของ
เนื้อเยื่อ coleoptile ของพืชกับการทดลองของสารละลายสารมาตรฐานของ IAA และ IAM ความ
เข้มข้น 20 และ 30 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ, IAA+IAM ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ (ประกอบด้วย 20 $\mu\text{g/ml}$ ของ
IAA ผสมกับ 30 $\mu\text{g/ml}$ ของ IAM) และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ใช้เป็นชุดควบคุม โดยทำ 3 ซ้ำในแต่ละการ
ทดสอบ

3.10.2 การทดสอบสารสกัดหยาบต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและ ข้าวโพด

กะเพาะเปลือกเมล็ดกาแฟออก จากนั้นฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดกาแฟโดยแช่ในสารละลาย 0.2%
Tween 80 ที่ผสมใน 5% NaClO นาน 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดกาแฟที่
ผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิวไปแช่ในสารสกัดหยาบอินโดลของราเอนโดไฟท์ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ (ซึ่ง
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าประกอบด้วย 20 และ 30 $\mu\text{g/ml}$ ของ IAA และ IAM ตามลำดับ)
ที่ละลายในน้ำเปล่าฆ่าเชื้อปริมาตร 250 ml นาน 24 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายสารมาตรฐานของ IAA
และ IAM ความเข้มข้น 20 และ 30 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ, IAA+IAM ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$
(ประกอบด้วย 20 $\mu\text{g/ml}$ ของ IAA ผสมกับ 30 $\mu\text{g/ml}$ ของ IAM) และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ใช้เป็นชุด
ควบคุม นำเมล็ดกาแฟเพาะลงกระบะที่บรรจุวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ทราย: แกลบขี้เถ้า
อัตราส่วน 1: 1) กระบะละ 50 เมล็ด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางกระบะไว้ในโรงเรือนเพาะปลูกและ
รดน้ำวันละ 1–2 ครั้ง หลังจาก 40 วัน นับเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกาแฟ ตรวจวัดความยาวราก
และลำต้นของกล้ากาแฟ วัดน้ำหนักแห้งของรากและลำต้น และนับจำนวนราก โดยเทียบผลการ
ทดลองกับการใช้สารมาตรฐานและน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ใช้เป็นชุดควบคุม

ในกรณีของข้าวโพดทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบในเมล็ดกาแฟมีข้อแตกต่างกันคือ
ใช้ทรายเป็นวัสดุเพาะและเก็บผลเมื่ออายุครบ 5 วัน

3.11 การทดสอบความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity test) ของราที่คัดเลือกต่อพืชทดสอบ

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคพืชทดสอบ ได้แก่ ข้าวสายพันธุ์ กข6 ข้าวโพด ข้าวไรย์ (พืชใบเลี้ยงเดี่ยว) ถั่วลิ้นเต่า ถั่วฝักยาว แตงกวา มะเขือเทศ และคะน้า (พืชใบเลี้ยงคู่) โดยเพาะเมล็ดพืชให้งอกความสูงประมาณ 3–4 cm จากนั้นทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวเนื้อเยื่อพืชด้วยแอลกอฮอล์ 70% และใช้เข็มสะกิดให้เกิดแผล นำไปวางในกล่องพลาสติก ขนาด 20 cm ยาว 30 cm และ สูง 10 cm ที่ทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70% ภายในบรรจุกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อและพรมด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพื่อให้ความชื้น จากนั้นทำการหยดสปอร์ของราที่คัดเลือกลงบริเวณแผลของพืชทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 10 วัน ตรวจสอบการเกิดโรค เทียบกับชุดควบคุมที่หยดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และแยกกลับเชื้อเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่ทำการปลูก (Sinclair and Dhingra, 1995; Nuangmek et al., 2015)

3.12 การศึกษารานโดไฟที่คัดเลือกต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าวสายพันธุ์ กข6

ฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดข้าวสายพันธุ์ กข6 โดยการจุ่มในสารละลาย 0.2% Tween 80 ใน 5% NaClO นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นแช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อนาน 1 วัน นำเมล็ดที่งอกไปปลูกในกระถางเพาะปลูกที่บรรจุ vermiculite และ peat moss ในอัตราส่วน 9: 1 กระถางขนาด 60×55 mm กระถางละ 5 เมล็ด จำนวน 10 ซ้ำ และหยดการละลายสปอร์ของรานโดไฟที่มีจำนวนสปอร์ 10^6 spore/ml ปริมาตร 1 ml ปลูกไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิความชื้นและแสงสว่าง (growth chamber) ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C มีความชื้นสัมพัทธ์ 80% ให้แสงโดยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สลับมืด 14: 10 ชั่วโมง โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม เมื่อครบ 10 วัน ตรวจวัดความยาวราก ความยาวต้น จำนวนราก น้ำหนักแห้งของรากและลำต้น และปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยเทียบผลการทดลองกับการใช้น้ำกลั่น

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมของข้าว โดยชั่งน้ำหนักสดส่วนต้นและใบของข้าว จากนั้นนำไปสกัดคลอโรฟิลล์โดยแช่ต้นข้าวใน 80% อะซีโตน (acetone) ปริมาตร 1 ml ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 13×100 mm บ่มที่อุณหภูมิ 4°C ในสภาวะมืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 663 และ 645 nm ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (Chlorophyll a and b) คำนวณได้จากสูตร $[(8.02 \times A_{663}) + (20.2 \times A_{645})] \times V / 1000 \times W$ เมื่อ V=ปริมาตร, W=น้ำหนักสด, A_{663} =ค่าการดูดกลืนแสงที่ 663 nm และ A_{645} =ค่าการดูดกลืนแสงที่ 645 nm (Palta, 1990)

3.13 การบ่งชี้ชนิดราเอนโดไฟท์ที่ผลิต IAA ที่คัดเลือกด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

เลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA นาน 7 วัน จากนั้นขูดเส้นใยราใส่ใน centrifuge tube ขนาด 1.5 ml สกัดดีเอ็นเอ (DNA) โดยชุด FAVORGEN Kit (Taiwan) และตรวจเช็คดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้ 1% agarose จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยศึกษาในส่วน Internal Transcribed Spacer (ITS) ของ rRNA ยีน ด้วยไพรเมอร์ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC, 5'--->3') และ ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG, 5'--->3') (White et al., 1990) โดยมีสภาวะดังต่อไปนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย Annealing ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 นาที และ Extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที และรักษาผลิตภัณฑ์ PCR ไว้ที่ 4°C (Kumla et al., 2014) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 1% agarose และทำบริสุทธิ์ด้วย NucleoSpin® Gel (MACHERAY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) จากนั้นนำไปอ่านผลลำดับเบสโดยส่งผลที่บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย เมื่อได้ลำดับเบสราเอนโดไฟท์แล้วตรวจเช็คความถูกต้องของลำดับเบสโดยโปรแกรม Codon Code Aligner และค้นหาความเหมือนของลำดับเบสด้วยโปรแกรม Blast เพื่อค้นหาและเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) คัดเลือกสายของลำดับเบสของราที่ใกล้เคียงกับราเอนโดไฟท์ที่ศึกษาในการทำแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดย ClustalW ในโปรแกรม BioEdit และ MEGA6.06 (Tamura et al., 2013)

3.14 การศึกษาความทนทานของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

การศึกษความทนทานของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกต่อสารกำจัดวัชพืช 3 ชนิด ได้แก่ glyphosate, 2,4-D-dimethylammonium และ paraquat dichloride สารกำจัดแมลง 2 ชนิด ได้แก่ methomyl และ propargite สารกำจัดเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ propiconazole, metalaxyl, benomyl, prochloraz และ captan โดยปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีในอัตราแนะนำแสดงในตาราง 4 การทดลองโดยเฉพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกศึกษาในหลอดทดลองขนาด 18×180 mm ที่มีอาหาร PDB ที่ผสมสารเคมีกำจัดศัตรูพืช 3 ความเข้มข้น คือ ครึ่งหนึ่งของอัตราแนะนำ, อัตราแนะนำ และสองเท่าของอัตราแนะนำ โดยเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบช้าๆด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) เป็นเวลา 10 วัน เมื่อครบกำหนดทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์รา และทำให้แห้งด้วยการอบในตู้อบความร้อน 60°C เป็นเวลา 2 วัน และเก็บไว้ใน desiccator ก่อนนำไปชั่งเพื่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ราเอนโดไฟท์ ค่าความต้านทานของราเอนโดไฟท์ต่อสารเคมีแสดงใน

ส่วนของ tolerance index (TI) จากน้ำหนักเซลล์แห้งของราเอนโดไฟท์ (Fomina et al., 2005) ค่า TI ที่น้อยกว่า 50% และที่ 0% แสดงว่าการเจริญของราเอนโดไฟท์ถูกยับยั้งและไม่สามารถเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ตามลำดับ

$$\text{Tolerance index (TI)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ที่ผสมสารเคมีกำจัดศัตรูพืช}}{\text{น้ำหนักแห้งราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหาร PDB}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ทดสอบความทนทานของราเอนโคไฟท์ที่คัดเลือกต่อสารกำจัดศัตรูพืช

สารกำจัดศัตรูพืช	ชื่อสามัญ	สารสำคัญ/สารออกฤทธิ์	อัตราแนะนำ (ppm)
1. สารกำจัดวัชพืช	Glyphosate 48	<i>N</i> -(phosphonomethyl) glycine, isopropylammonium	2640
	DMA-6	2,4-D-dimethylammonium	1838
	Paraquat dichloride	1,10-dimethyl-4,40-bipyridiniumdichloride	1380
2. สารกำจัดแมลง	Methomyl	(E,Z)-methyl N-(methylamino)-carbonyl-oxy-ethanimidothioate	1500
	Propargite	2-(4-tert-butylphenoxy) cyclohexyl prop-2-ynyl sulfite	350
3. สารกำจัดรา	Propiconazole	(+)-1-[2(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl]-1H-1,2,4-triazole	300
	Metalaxyl	methyl N-(methoxyacetyl) DL-alanate	2000
	Benomyl	methyl 1-(butylcarbonyl)-benzimidazol-2-ylcarbamate	1500
	Prochloraz	N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl] imidazole-1-carboximide	620
	Captan	N-(trichloromethylthio) cyclohex-ene-1, 2-dicarboximide	2000

3.15 การทดสอบการผลิต siderophore เบื้องต้นด้วยเทคนิค CAS agar plate assay ของราที่คัดเลือก (Schwyn and Neilands, 1987)

ตัดปลายเส้นใยของราเอนโดไฟท์ขนาด 5 mm วางบนอาหาร CAS agar 3 จุด บ่มเชื้อในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 10 วัน ตรวจผลการสร้างวงสีเหลือง สีชมพู และสีส้ม รอบโคโลนีราโดยเป็นผลเชิงบวกในการผลิต siderophore และเมื่อราเอนโดไฟท์เกิดผลบวกกับการทดสอบด้วยเทคนิค CAS agar plate assay ให้ตรวจวัดปริมาณและชนิดของ siderophore ในอาหารเหลวต่อไป

3.16 การตรวจสอบชนิดของ siderophore จากราที่คัดเลือก

เลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Gaus No.1 ปริมาตร 5 ml ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 18×180 mm บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) บนเครื่องเขย่าแบบซ้ายขวาความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 10 วัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ออกจากเซลล์โดยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ไปตรวจสอบชนิดและปริมาณ siderophore ดังนี้

15.1 การตรวจสอบ siderophore ชนิด hydroxamate (Atkin et al., 1970)

ปิเปตน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ปริมาตร 0.5 ml ใส่หลอดทดลองขนาด 13×100 mm จากนั้นเติม 2.5 ml สารละลาย ferric perchlorate [$\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$] ผสมให้เข้ากันโดย vortex mixer บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 480 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย deferoxamine mesylate

15.2 การตรวจสอบ siderophore ชนิด catecholate (Arnold, 1937)

ปิเปตน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ปริมาตร 1 ml ใส่หลอดทดลองขนาด 13×100 mm จากนั้นเติม 0.5 M กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปริมาตร 1 ml ตามด้วย 1 ml สารทดสอบ nitrite molybdate ผสมให้เข้ากันโดย vortex mixer สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นเติมสารละลาย 1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย 2,3 -dihydroxybenzoic acid

3.17 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20 (สำหรับระบบปฏิบัติการ window) เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีปัจจัยเดียว (one-way analysis of variance; ANOVA) และ Tukey's multiple comparison test ในการเปรียบเทียบเชิงซ้อน (multiple comparisons) ที่ค่าความแตกต่าง $P < 0.05$ ระหว่างค่ากลางของแต่ละการทดสอบ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกราเอนโดไฟท์

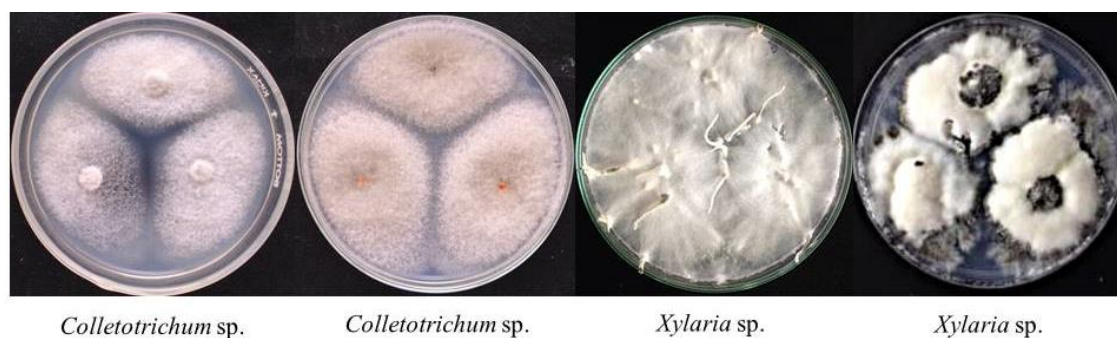
จากตัวอย่างใบและก้านของกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าจำนวนทั้งหมด 400 ชิ้นสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด จำนวน 518 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างเดือนพฤศจิกายนมากที่สุด จำนวน 281 ไอโซเลต ส่วนเดือนกรกฎาคม จำนวน 237 ไอโซเลต และพบว่าตัวอย่างของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากชิ้นส่วนใบได้จำนวนไอโซเลตมากกว่าก้าน ส่วนอาหารที่ใช้แยกราเอนโดไฟท์อาหาร half PDA เป็นอาหารที่สามารถแยกได้จำนวนไอโซเลตมากที่สุดเท่ากับ 295 ไอโซเลต และ WA แยกได้เพียง 223 ไอโซเลต ดังแสดงในตาราง 4.1

ตาราง 4.1 ราเอนโดไฟท์จากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า

ตัวอย่าง	ราเอนโดไฟท์ ทั้งหมด (ไอโซเลต)	ราเอนโดไฟท์จากชนิด อาหาร (ไอโซเลต)		ราเอนโดไฟท์จากชิ้นส่วน พืช (ไอโซเลต)	
		half PDA	WA	ใบ	ก้าน
เดือนกรกฎาคม	237	138	99	147	90
เดือนพฤศจิกายน	281	157	124	162	119
รวม	518	295	223	309	209

จากตัวอย่างราเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่แยกได้ พบว่า เป็นราที่อยู่ในกลุ่ม ascomycete และราในระบบสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 39 กลุ่ม ซึ่งมีสกุลที่พบเป็นชนิดเด่น คือ *Colletotrichum* spp. และ *Xylaria* spp. ดังแสดงในภาพ 4.1 นอกจากนี้ยังพบราเอนโดไฟท์ในจีนัสอื่นๆ ได้แก่ *Cercospora* sp., *Cheatomium* sp., *Cladosporium* spp., *Cylindrocarpon* sp., *Fusarium* spp., *Glomerella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* spp., *Nigrosporum* sp. และราที่พบ

แต่การเจริญของเส้นใยไม่สร้างโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (mycelia sterilia) การศึกษาความหนาแน่นของประชากรราเอนโดไฟท์ต่อตัวอย่าง และจำนวนกลุ่มราที่แยกได้จากตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า พบว่า ความหนาแน่นของประชากรราเอนโดไฟท์ในเดือนพฤศจิกายนสูงกว่าเดือนกรกฎาคม และจำนวนกลุ่มราที่แยกได้ของทั้งสองเดือนไม่แตกต่างกัน (ตาราง 4.2)



ภาพ 4.1 ราเอนโดไฟท์สกุลเด่นที่แยกได้จากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าในการศึกษานี้

ตาราง 4.2 ความหนาแน่นของประชากรราต่อตัวอย่าง และจำนวนกลุ่มราที่แยกได้จากตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า

	กรกฎาคม	พฤศจิกายน
ความหนาแน่นของประชากรราต่อตัวอย่าง	1.18	1.40
จำนวนกลุ่มราที่แยกได้จากตัวอย่าง	30	31

ตาราง 4.3 ความถี่ของราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าในแต่ละเดือน

กลุ่มที่	กลุ่มราเอนโดไฟท์ (taxa)	กรกฎาคม	พฤศจิกายน
1	<i>Cercospora</i> sp.	-	3
2	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	9	15
3	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	29	34
4	<i>Colletotrichum</i> sp. 3	8	2
5	<i>Colletotrichum</i> sp. 4	13	9
6	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	16	14

ตาราง 4.3 (ต่อ)

กลุ่มที่	ราเอนโดไฟท์ (taxa)	กรกฎาคม	พฤศจิกายน
7	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	12	-
8	<i>Colletotrichum</i> sp. 7	-	9
9	<i>Colletotrichum</i> sp. 8	15	17
10	<i>Colletotrichum</i> sp. 9	19	15
11	<i>Colletotrichum</i> sp. 10	5	2
12	<i>Colletotrichum</i> sp. 11	9	7
13	<i>Colletotrichum</i> sp. 12	21	20
14	<i>Colletotrichum</i> sp. 13	2	-
15	<i>Colletotrichum</i> sp. 14	-	4
16	<i>Cheatomium</i> sp.	-	1
17	<i>Cladosporium</i> sp. 1	2	1
18	<i>Cladosporium</i> sp. 2	-	3
19	<i>Cladosporium</i> sp. 3	1	3
20	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	1	-
21	<i>Fusarium</i> sp. 1	2	5
22	<i>Fusarium</i> sp. 2	1	-
23	<i>Fusarium</i> sp. 3	1	-
24	<i>Glomerella</i> sp.	1	-
25	<i>Mycelia steriria</i> 1	2	9
26	<i>Mycelia steriria</i> 2	-	5
27	<i>Mycelia steriria</i> 3	1	3
28	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	7
29	<i>Phoma</i> sp.	-	3
30	<i>Phomopsis</i> sp. 1	1	9
31	<i>Phomopsis</i> sp. 2	1	6
32	<i>Nigrospora</i> sp.	-	5
33	<i>Xylaria</i> sp. 1	17	23
34	<i>Xylaria</i> sp. 2	3	12

ตาราง 4.3 (ต่อ)

กลุ่มที่	กลุ่มราเอนโคไฟท์ (taxa)	กรกฎาคม	พฤศจิกายน
35	<i>Xylaria</i> sp. 3	13	-
36	<i>Xylaria</i> sp. 4	5	11
37	<i>Xylaria</i> sp. 5	9	11
38	<i>Xylaria</i> sp. 6	8	-
39	<i>Xylaria</i> sp. 7	10	13
รวม		237	281

4.2 การตรวจสอบสารอินโดลที่ผลิตโดยราเอนโคไฟท์ที่คัดแยกจากต้นกาแฟโดยวิธี colorimetric assay

ราเอนโคไฟท์ที่แยกจากตัวอย่างใบและก้านกาแฟทั้งหมด 39 กลุ่ม เลือกตัวแทนแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในอาหารทดสอบการผลิต IAA และตรวจสอบโดยวิธี colorimetric assay พบว่า ราเอนโคไฟท์จำนวน 5 ไอโซเลต ให้ผลบวกต่อการทดสอบโดยปรากฏสีชมพูม่วงจนถึงแดง (ภาพ 4.2) เมื่อทำปฏิกิริยากับ Salkowski's reagent (ตาราง 4.4) ได้แก่ ราเอนโคไฟท์ไอโซเลต CMU-A18, CMU-A30, CMU-A45, CMU-A49 และ CMU-A109



ภาพ 4.2 การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงราเอนโคไฟท์เมื่อทำปฏิกิริยากับสาร Salkowski's reagent

ตาราง 4.4 การคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากต้นกาแฟที่ผลิตสารกลุ่มอินโดล

รหัส	ชนิด	ผลการทดสอบการผลิตสาร กลุ่มอินโดล
CMU-A20	<i>Cercospora</i> sp.	-
CMU-A07	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	-
CMU-A18	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	+
CMU-A22	<i>Colletotrichum</i> sp. 3	-
CMU-A26	<i>Colletotrichum</i> sp. 4	-
CMU-A30	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	+
CMU-A45	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	+
CMU-A277	<i>Colletotrichum</i> sp. 7	-
CMU-A49	<i>Colletotrichum</i> sp. 8	+
CMU-A75	<i>Colletotrichum</i> sp. 9	-
CMU-A89	<i>Colletotrichum</i> sp. 10	-
CMU-A101	<i>Colletotrichum</i> sp. 11	-
CMU-A109	<i>Colletotrichum</i> sp. 12	+
CMU-A202	<i>Colletotrichum</i> sp. 13	-
CMU-A279	<i>Colletotrichum</i> sp. 14	-
CMU-A100	<i>Cheatomium</i> sp.	-
CMU-A24	<i>Cladosporium</i> sp. 1	-
CMU-A96	<i>Cladosporium</i> sp. 2	-
CMU-A210	<i>Cladosporium</i> sp. 3	-
CMU-A63	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	-
CMU-A42	<i>Fusarium</i> sp. 1	-
CMU-A189	<i>Fusarium</i> sp. 2	-
CMU-A237	<i>Fusarium</i> sp. 3	-
CMU-A01	<i>Glomerella</i> sp.	-
CMU-A117	<i>Mycelia steriria</i> 1	-
CMU-A178	<i>Mycelia steriria</i> 2	-

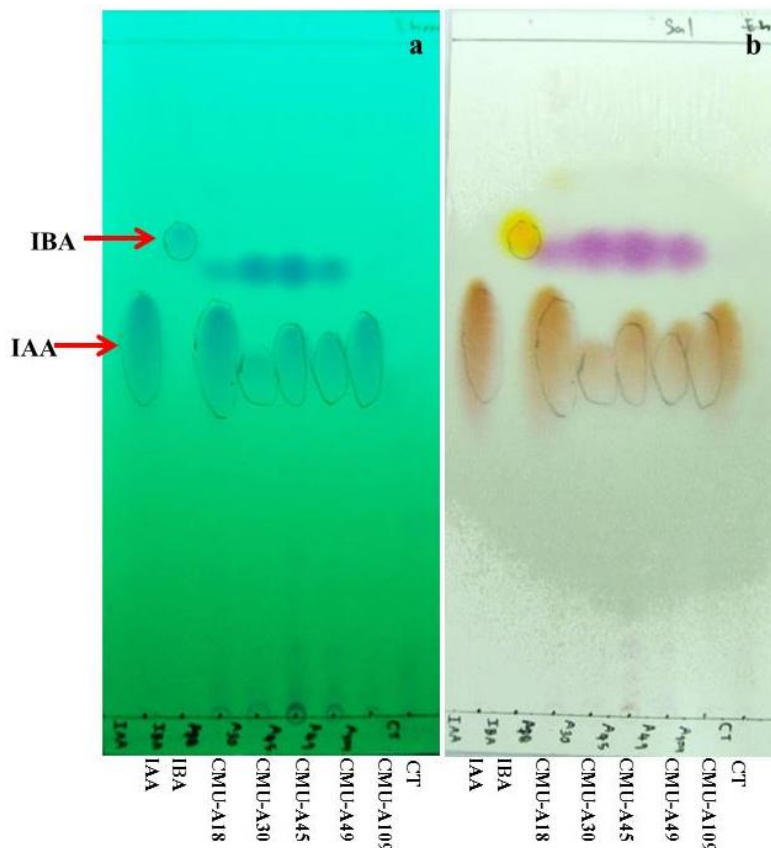
ตาราง 4.4 (ต่อ)

รหัส	ชนิด	ผลการทดสอบการผลิตสาร กลุ่มอินโดล
CMU-A186	<i>Mycelia steriria</i> 3	-
CMU-A163	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-
CMU-A37	<i>Phoma</i> sp.	-
CMU-A144	<i>Phomopsis</i> sp. 1	-
CMU-A197	<i>Phomopsis</i> sp. 2	-
CMU-A200	<i>Nigrospora</i> sp.	-
CMU-A29	<i>Xylaria</i> sp. 1	-
CMU-A60	<i>Xylaria</i> sp. 2	-
CMU-A99	<i>Xylaria</i> sp. 3	-
CMU-A130	<i>Xylaria</i> sp. 4	-
CMU-A150	<i>Xylaria</i> sp. 5	-
CMU-A270	<i>Xylaria</i> sp. 6	-
CMU-A281	<i>Xylaria</i> sp. 7	-

หมายเหตุ + คือให้ผลบวกกับปฏิกิริยาการผลิตอินโดล และ - คือให้ผลลบกับปฏิกิริยาการผลิตอินโดล

4.3 การตรวจสอบสารกลุ่มอินโดลที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)

การตรวจสอบสารกลุ่มอินโดลที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกศึกษาจำนวน 5 ชนิด คือ *Colletotrichum* sp. CMU-A18, *Colletotrichum* sp. CMU-A30, *Colletotrichum* sp. CMU-A45, *Colletotrichum* sp. CMU-A49 และ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ด้วยเทคนิค TLC โดยสกัดสารกลุ่มอินโดลจากน้ำเลี้ยงในอาหารทดสอบเหลวให้ได้สารสกัดหยาบ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC แสดงค่า R_f เท่ากับ 0.52 ซึ่งตรงกับค่า R_f ของสารมาตรฐาน IAA ที่ใช้เป็นตัวแทนเมื่อตรวจสอบภายใต้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm แสดงในภาพ 4.3a และเมื่อตรวจสอบด้วย Salkowski's reagent จะปรากฏจุดสีแดงและจุดสีแดงของตัวอย่างที่ปรากฏมีค่า R_f เท่ากันกับสารมาตรฐาน IAA ดังแสดงในภาพ 4.3b



ภาพ 4.3 โครมาโตแกรมแสดงการตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มอินโดลของราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลต CMU-A18, CMU-A30, CMU-A45, CMU-A49 และ CMU-A109 การตรวจสอบได้รังสี UV ความยาวคลื่น 254 nm (a), การตรวจสอบด้วย Salkowski's reagent (b)

4.4 การตรวจสอบสารกลุ่มอินโดลด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

การตรวจสอบสารกลุ่มอินโดลด้วยวิธี HPLC ของราเอนโดไฟท์สกุล *Colletotrichum* spp. จำนวน 5 ไอโซเลต คือ CMU-A18, CMU-A30, CMU-A45, CMU-A49 และ CMU-A109 พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถผลิต IAA ได้ดังแสดงในตาราง 4.5 โดย retention time ของสารมาตรฐาน IAA และ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ผลิตตรงกันที่เวลา 9.6 นาที และราไอโซเลต CMU-A109 สามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 662.96 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นจึงได้เลือกไอโซเลต CMU-A109 ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ในการทดลองต่อไป

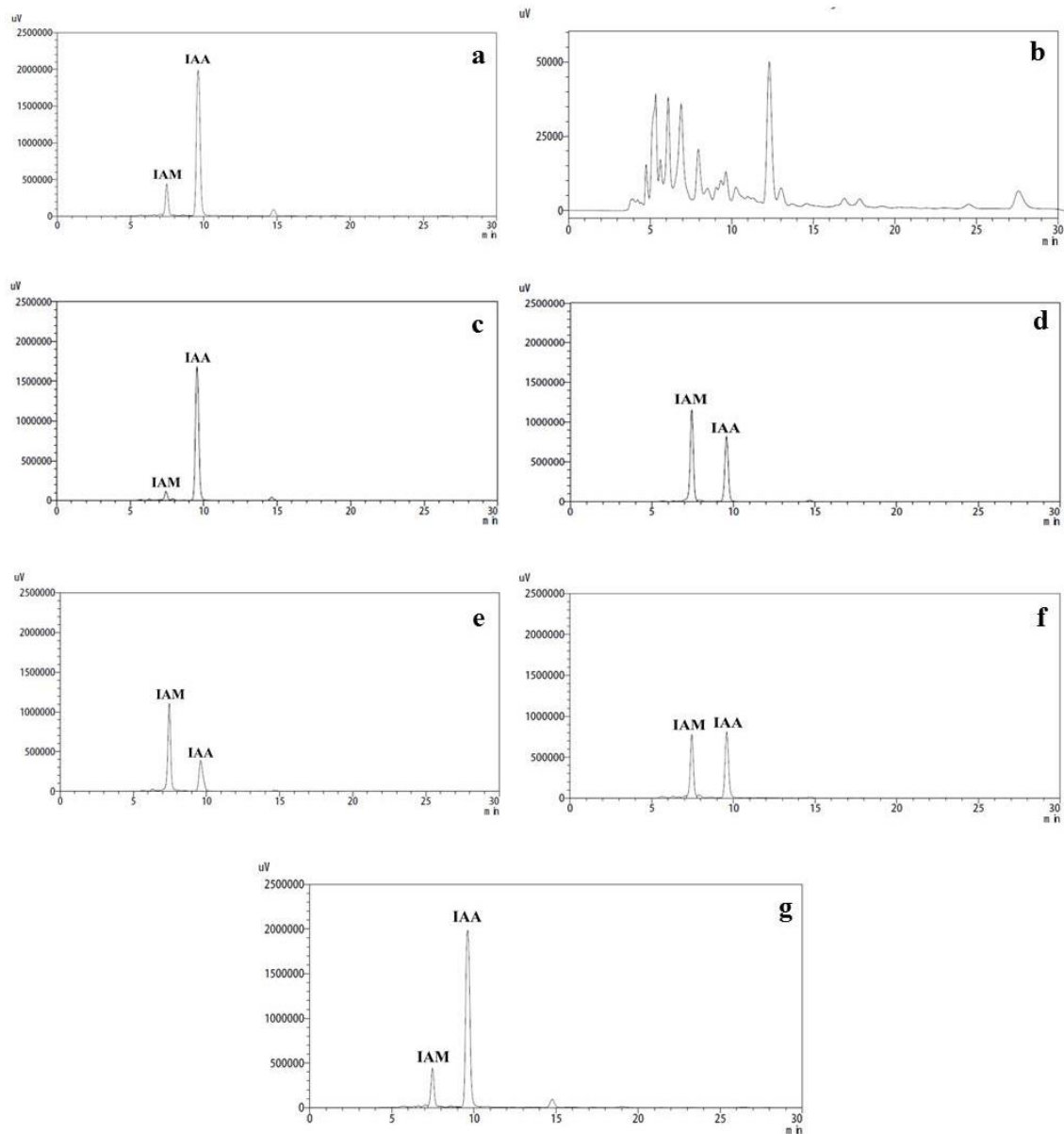
ตาราง 4.5 ปริมาณ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์เมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค HPLC

ราเอนโดไฟท์	ปริมาณ IAA ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A18	480.97 $\pm$ 53.62
<i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A30	159.41 $\pm$ 23.68
<i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A45	172.18 $\pm$ 15.54
<i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A49	218.48 $\pm$ 34.86
<i>Colletotrichum</i> sp. CMU-A109	662.96 $\pm$ 56.18

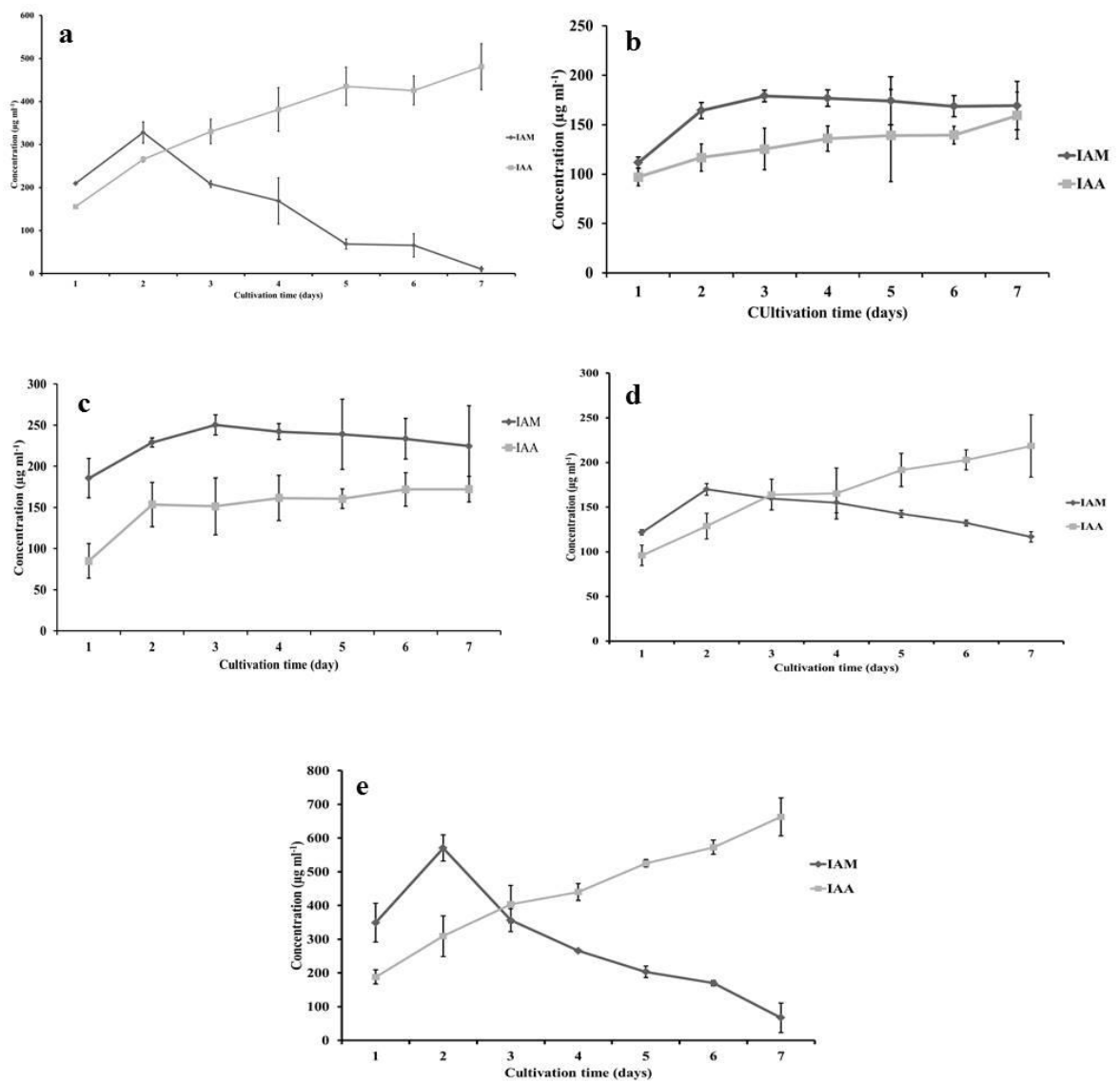
4.5 การศึกษาวิธีการสังเคราะห์ IAA ของราเอนโดไฟท์

การตรวจสอบวิธีการผลิต IAA ในราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* sp. จำนวน 5 ไอโซเลต คือ CMU-A18, CMU-A30, CMU-A45, CMU-A49 และ CMU-A109 ระหว่างการเพาะเลี้ยงตรวจสอบ indole-3-acetamide (IAM) ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในกระบวนการผลิต IAA (ภาพ 4.4) โดย retention time ของ IAM และ IAA ทั้งสารมาตรฐานและที่ราเอนโดไฟท์ผลิตตรงกันที่เวลา 7.4 และ 9.6 นาที ตามลำดับ ราเอนโดไฟท์สามารถเปลี่ยน L-tryptophan เป็น IAM และเปลี่ยน IAM เป็น IAA ในช่วงแรกของการศึกษาจึงพบปริมาณ IAM สูงกว่า IAA จากนั้นปริมาณ IAM ลดลงและปริมาณ IAA เพิ่มขึ้น (ภาพ 4.5) *Colletotrichum* sp. CMU-A18, CMU-A49 และ CMU-A109 มีความสามารถในการใช้ L-tryptophan และเปลี่ยน IAM ไปเป็น IAA ได้ดีกว่า *Colletotrichum* sp. CMU-A30 และ CMU-A45 ซึ่งความสามารถในการใช้ L-tryptophan และการเปลี่ยน IAM เป็น IAA ของราเอนโดไฟท์แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตัวราเอนโดไฟท์ จากการศึกษาสรุปได้ว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 5 ไอโซเลต ผลิต IAA ผ่านทางวิถี IAM (IAM pathway)

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4.4 โครมาโตแกรมของ HPLC ของสารมาตรฐาน IAA และ IAM standards (a), อาหารพะละเลี้ยง (b), สารสกัดเหยาบ IAA *Colletotrichum* CMU-A18 (c) CMU-A30 (d), CMU-A45 (f), CMU-A49 (e) and CMU-A109 (g)



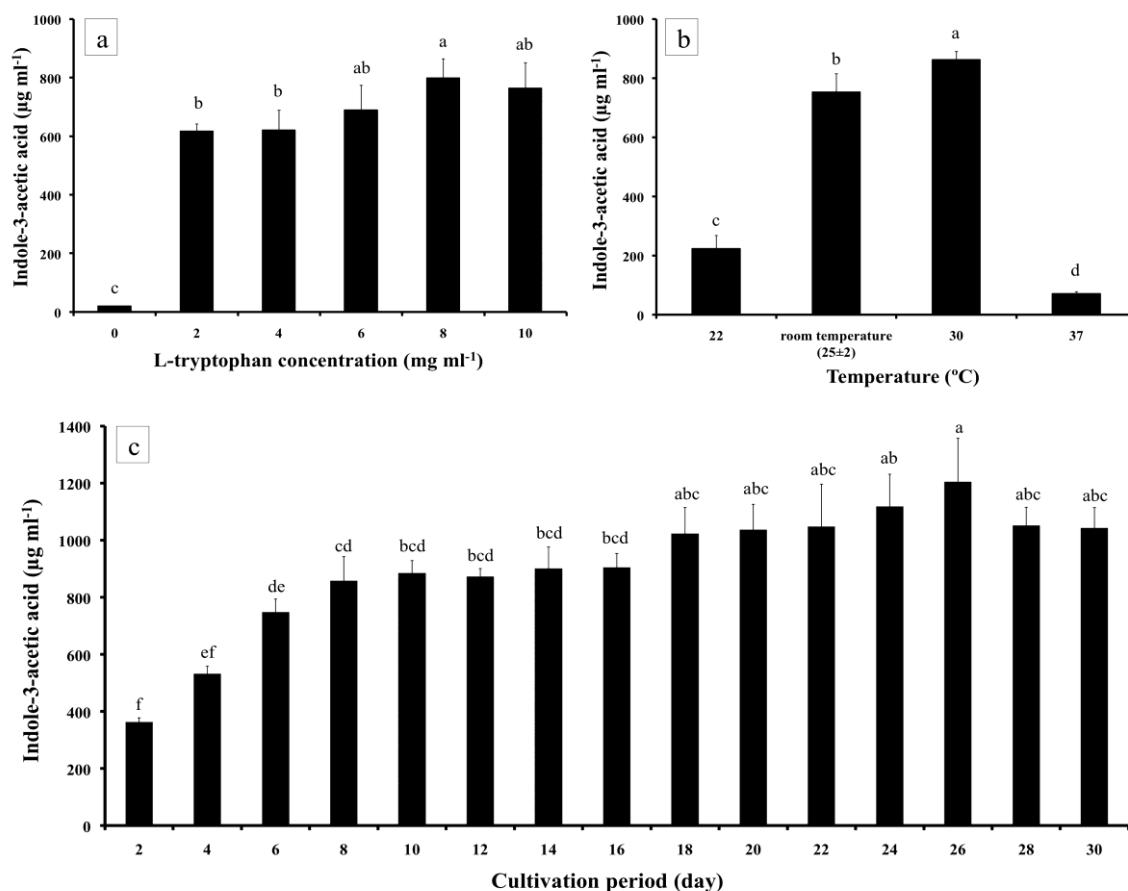
ภาพ 4.5 การเปลี่ยนแปลงระหว่าง IAA และ IAM โดยราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* CMU-A18 (a), CMU-A30 (b), CMU-A45 (c), CMU-A49 (d) และ CMU-A109 (e)

4.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* sp. CMU-A109

จากการทดลองในข้อ 4. สามารถเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิต IAA ได้มากที่สุดคือ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA พบว่า ความเข้มข้นของ L-tryptophan ที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิต IAA ของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ดังแสดงในภาพ 4.6a โดยเมื่อเพาะเลี้ยงราไอโซเลตนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม 8 mg/ml L-tryptophan บนเครื่องเขย่าแบบซ้ายขวาที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูงสุดคือ $799.18\pm 65.00\text{ }\mu\text{g/ml}$

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการผลิต IAA ของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ดังแสดงในภาพ 4.6b พบว่า รา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถผลิต IAA ได้ในทุกอุณหภูมิของการทดลองในครั้งนี้และสามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูงสุด คือ $862.26\pm 28.03\text{ }\mu\text{g/ml}$ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) สามารถผลิตได้ $752.75\pm 62.30\text{ }\mu\text{g/ml}$ และผลิต IAA ได้ปริมาณน้อยสุดเท่ากับ $70.39\pm 7.23\text{ }\mu\text{g/ml}$ ที่อุณหภูมิ 37°C

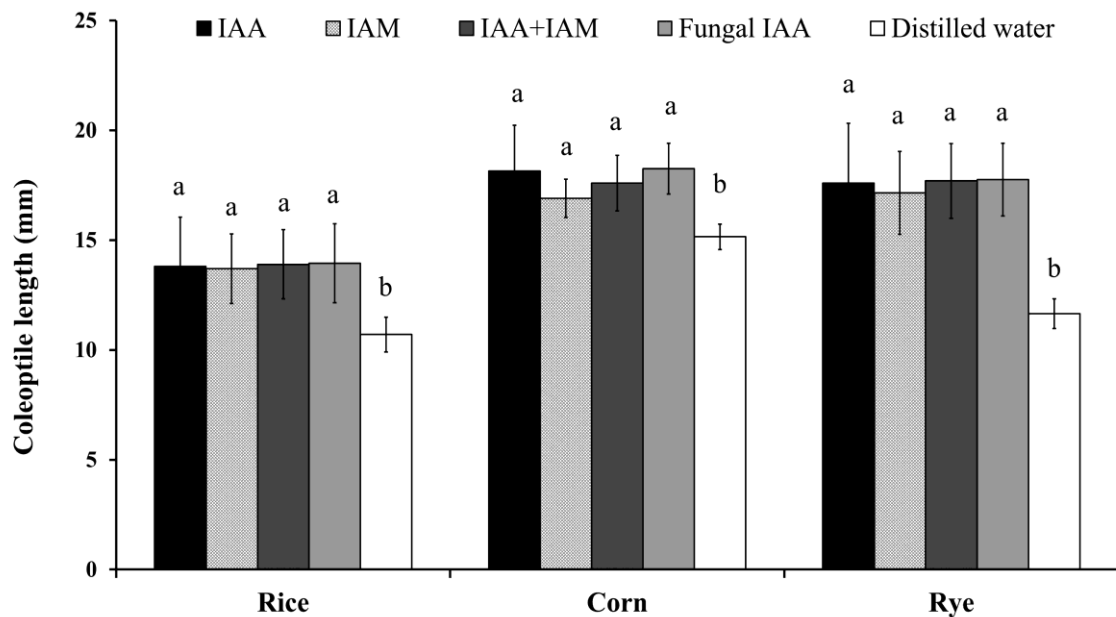
การศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิต IAA ของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ดังแสดงในภาพ 4.6c พบว่า ปริมาณ IAA เพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 26 จากนั้นจึงลดลง โดยไอโซเลต CMU-A109 สามารถผลิตได้ปริมาณ IAA สูงสุดเท่ากับ $1,205.58\pm 151.89\text{ }\mu\text{g/ml}$ ในวันที่ 26 ของการเพาะเลี้ยง



ภาพ 4.6 ผลของปริมาณความเข้มข้นของ L-tryptophan (a) อุณหภูมิ (b) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (c) ต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ตัวอักษรที่แตกต่างกันบนกราฟแต่ละแท่งในการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.7 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบ IAA จากรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการกระตุ้นการยืดยาวเนื้อเยื่อ coleoptile ของพืชทดสอบ

การทดสอบสารสกัดหยาบ IAA จากรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ข้าว ข้าวโพด และ ข้าวไรย์ ดังแสดงในภาพ 4.7 พบว่า สารสกัดหยาบ IAA จากรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถกระตุ้นความยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของพืชทดสอบทั้งหมดได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน IAA, IAM และ IAA+IAM และสามารถกระตุ้นความยาวเนื้อเยื่อ coleoptile ได้ดีกว่าน้ำกลั่น



ภาพ 4.7 การยืดตัวของเนื้อเยื่อ coleoptile ข้าว (rice) ข้าวโพด (corn) และ ข้าวไรย์ (rye) โดย IAA = แฉใน $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ IAA , IAM = แฉใน $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ IAM , IAA+IAM = แฉในสารผสม $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ IAA และ $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ IAM, Fungal IAA = แฉในสารสกัดยับยั้ง IAA ของราเอนโคไฟท์ (ที่มี $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ IAA และ $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ IAM) และ distilled water = แฉในน้ำกลั่น ตัวอักษรที่แตกต่างกันบนกราฟแต่ละแท่งในการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.8 การศึกษาผลของสารสกัดยับยั้งจากรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการงอกและการส่งเสริมการเจริญในพืชทดสอบ

4.8.1 กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า

ผลการทดลอง พบว่า ค่าของเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวรากและลำต้น และน้ำหนักแห้งของรากและลำต้นของกาแฟในการทดลองของ สารสกัดยับยั้งจากรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109, สารมาตรฐาน IAA, สารมาตรฐาน IAM, สารมาตรฐาน IAA+IAM และน้ำกลั่น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในตาราง 4.6

ตาราง 4.6 ผลของสารสกัดหยาบของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการกระตุ้นการงอกและส่งเสริมการเจริญกาเฟสายพันธุ์อาราบีก้าเปรียบเทียบกับฮอร์โมนพืชมาตรฐาน

การทดลอง	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)	ความยาว (mm)		น้ำหนักแห้ง (mg)	
		ราก	ต้น	ราก	ต้น
CMU-A109	41.33±5.51a	39.79±0.52a	36.35±0.16a	16.29±2.14a	15.36±0.72a
IAA	42.67±5.51a	45.14±0.48a	39.26±0.39a	16.15±1.22a	15.70±2.06a
IAM	41.33±4.04a	39.45±0.40a	36.11±0.40a	15.36±0.63a	14.82±0.64a
IAA+IAM	42.00±1.73a	44.27±0.19a	39.63±0.44a	16.20±0.66a	15.77±0.83a
น้ำกลั่น	45.33±1.53a	37.78±0.25a	34.82±0.11a	15.66±2.16a	15.14±0.57a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสัณณธ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.8.2 ข้าวโพด

ผลการทดลอง พบว่า ค่าของเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของรากของข้าวโพดในการทดลองของสารสกัดหยาบจากรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109, สารมาตรฐาน IAA, สารมาตรฐาน IAM, สารมาตรฐาน IAA+IAM มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการทดลองของน้ำกลั่นดังแสดงในตาราง 4.7 แต่พบว่าความยาวของลำต้นในทุกการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตาราง 4.7 ผลของสารสกัดหยาบของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการกระตุ้นการงอกและส่งเสริมการเจริญข้าวโพดเปรียบเทียบกับฮอร์โมนพืชมาตรฐาน

การทดลอง	เปอร์เซ็นต์การ งอก (%)	ความยาว (cm)		น้ำหนักแห้ง (mg)	
		ราก	ต้น	ราก	ต้น
CMU-A109	98.67±2.31a	14.18±0.94a	7.97±0.17a	32.94±0.07a	24.71±1.19ab
IAA	93.00±2.00a	13.22±0.68a	8.04±0.71a	32.45±3.56a	25.82±1.25a
IAM	95.33±3.05a	13.62±1.10a	6.75±0.18a	31.95±2.50a	23.98±1.27ab
IAA+IAM	98.67±2.31a	14.08±0.94a	7.95±0.72a	33.43±0.91a	24.19±2.00ab
น้ำกลั่น	87.33±3.06b	10.58±0.79b	6.69±0.47a	25.74±2.23b	21.84±0.72b

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสมมติเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.9 การทดสอบการก่อโรคในพืช (pathogenicity test) ของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109

การทดสอบการก่อโรคในพืชทดสอบของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 เมื่อหยดสปอร์ของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ลงในแผลที่สร้างขึ้นของกล้าพืชทดสอบ พืชใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ ข้าวสาลีพันธุ์ กข6 ข้าวโพด และ ข้าวไรย์ พืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ ถั่วลิสงเตา ถั่วฝักยาว แตงกวา มะเขือเทศ และคะน้า พบว่า พืชทดสอบทุกชนิดแสดงอาการโรค การแยกเชื้อกลับจากรอยโรคในพืชทดสอบและตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อ พบว่าเป็น *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ซึ่งเป็นเชื้อชนิดเดียวกันกับเชื้อที่หยดลงไปในกลุ่มกล้าพืช อย่างไรก็ตามการทดสอบในข้าวพบว่า ข้าวมีเชื้อหุ้มต้นอ่อนที่สามารถป้องกันต้นกล้าข้าวจากการหยดสปอร์ของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ได้ ทำให้ต้นกล้าข้าวไม่เกิดโรค (ภาพ 4.8) ดังนั้น จึงได้เลือกข้าวเพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชทดสอบต่อไป



ภาพ 4.8 การทดสอบการเกิดโรคของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ในข้าวสายพันธุ์ กข6

4.10. การศึกษาความสามารถของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าวสายพันธุ์ กข6

ผลการทดลอง พบว่า ข้าวสายพันธุ์ กข6 ที่ปลูกสปอร์รา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 มีความสูงและความยาวรากสูงกว่ากล้าข้าวสายพันธุ์ กข6 ที่ไม่ได้ปลูกสปอร์รา เช่นเดียวกันกับน้ำหนักแห้งลำต้นและรากของกล้าข้าวสายพันธุ์ กข6 ที่ปลูกสปอร์รา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 มีน้ำหนักมากกว่ากล้าข้าวสายพันธุ์ กข6 ที่ไม่ปลูกสปอร์ ยิ่งไปกว่านั้นคลอโรฟิลล์รวมจากกล้าข้าวสายพันธุ์ กข6 ที่ปลูกสปอร์รา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 มีปริมาณสูงกว่ากล้าข้าวสายพันธุ์ กข6 ที่ไม่ได้ปลูกสปอร์ (ตาราง 4.8, ภาพ 4.9) จากผลการทดลองแสดงว่ารา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถส่งเสริมการเจริญของกล้าข้าวสายพันธุ์ กข6 โดยการเพิ่ม ความยาวลำต้นและราก น้ำหนักแห้งลำต้นและราก และปริมาณคลอโรฟิลล์รวม

ตาราง 4.8 ผลของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการส่งเสริมการเจริญข้าวสายพันธุ์ กข6 ในวัสดุปลูก

การทดลอง	ความยาวต้น (cm)	ความยาวราก (cm)	น้ำหนักแห้ง (mg)		คลอโรฟิลล์ (mg/fresh weight)
			ต้น	ราก	
CMU-A109	15.63±2.38a	12.64±2.33a	8.42±1.12a	3.20±1.12a	0.11±0.08a
น้ำกลั่น	12.32±3.74b	11.16±2.68b	6.39±2.17b	2.55±0.83b	0.01±0.01b

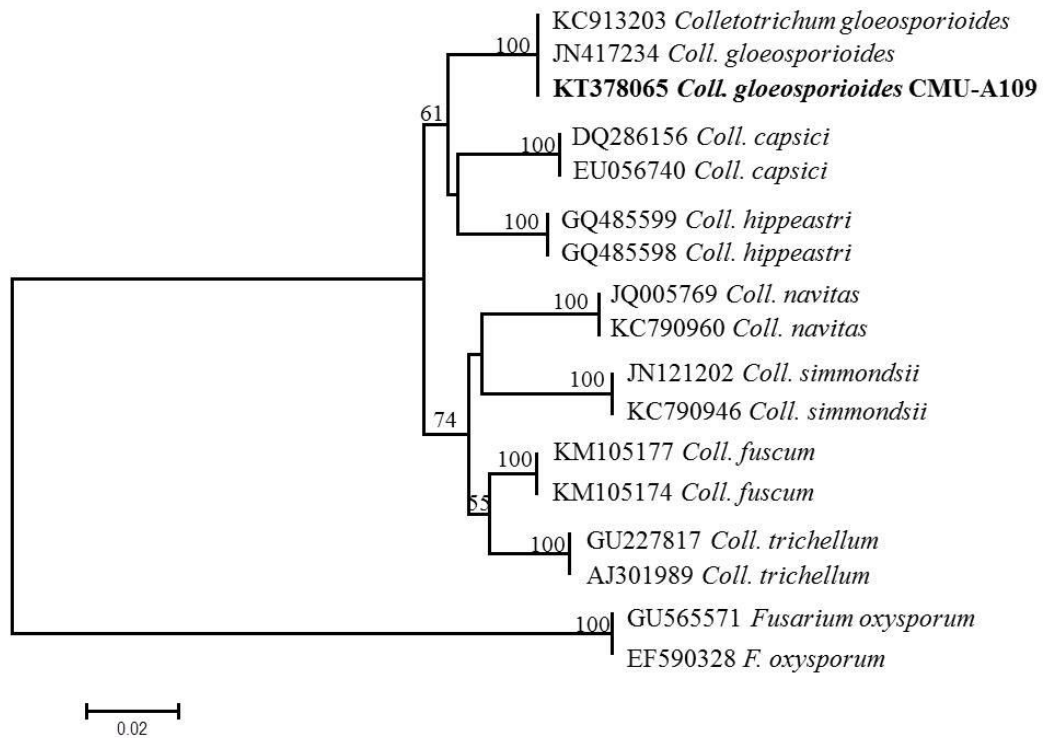
หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพ 4.9 ประสิทธิภาพของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการเจริญของกล้าข้าวสายพันธุ์ กข6 อายุ 10 วัน โดย CMU-A109 = ปลูกสปอร์รา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 และ Control = ไม่ปลูกสปอร์รา *Colletotrichum* sp. CMU-A109, บาร์ = 2 cm

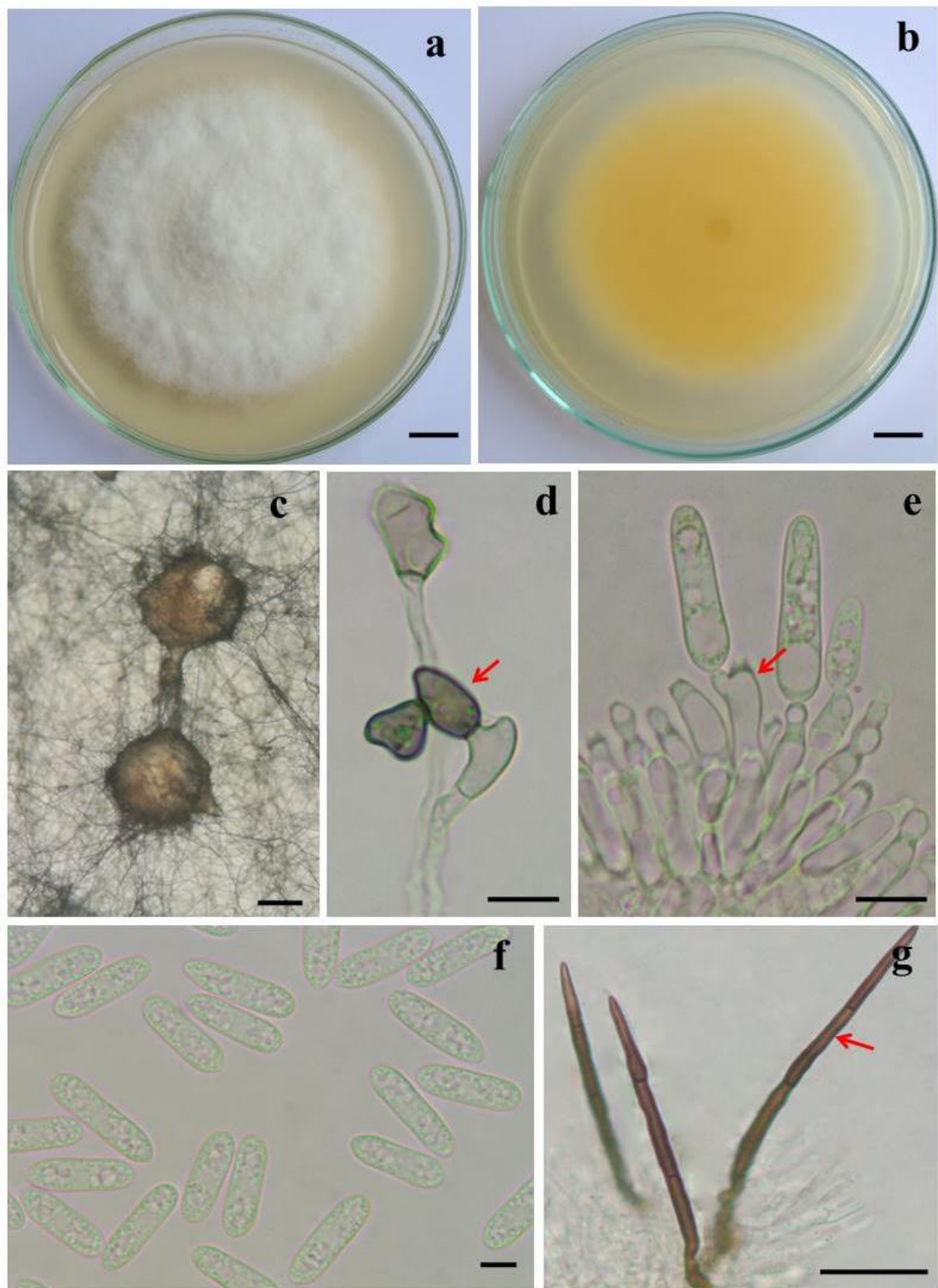
4.11 การบ่งชี้ชนิดรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 โดยลักษณะพื้นฐานวิทยาและเทคนิค อณูชีววิทยา

การศึกษาระดับอณูชีววิทยาของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 เมื่อทำการ blast เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Genbank ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 แสดงค่าความเหมือน กับ *Colletotrichum gloeosporioides* KX197387.1 ที่ 100% และจากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่า *Colletotrichum* sp. CMU-A109 จัดอยู่ในกลุ่ม *Colletotrichum gloeosporioides* โดยค่า bootstrap เท่ากับ 100% (ภาพ 4.10) นอกจากนี้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ภาพ 4.11) พบว่า *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8–9 cm หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร 10 วัน โคลนนี้มีสีขาวถึงเทา เมื่อตรวจสอบโครงสร้างต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ พบการสร้างโคนิเดียรูปร่างเรียวยาวทรงกระบอก เรียบ ปลายทู่ ใส ขนาด 4–5×14–20 μm สร้างบน conidiogenous cell พบ appressorium มีตีนน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้มปานกลาง ขนาด 3–10×6–11 μm โดยมีทั้งรูปร่าง กลมรี และรูปร่างไม่แน่นอน นอกจากนี้พบว่า *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สร้าง setae มีตีนน้ำตาลเข้มถึงดำสอดคล้องกับสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Prihastuti et al., 2009; Xie et al., 2010) จากลักษณะทางสัณฐานและอณูชีววิทยาจึงสรุปได้ว่า *Colletotrichum* sp. CMU-A109 เป็น *Coll. gloeosporioides*



ภาพ 4.10 แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-parsimonious tree) ของ *Colletotrichum gloeosporioides* CMU-A109 แสดงความสัมพันธ์กับราที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรม และมี *Fusarium oxysporum* เป็นราก; ค่า bootstrap ($\geq 50\%$) แสดงในแต่ละก้านของแผนภูมิ; บาร์เท่ากับ = 0.02 แสดงการแทนที่ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์

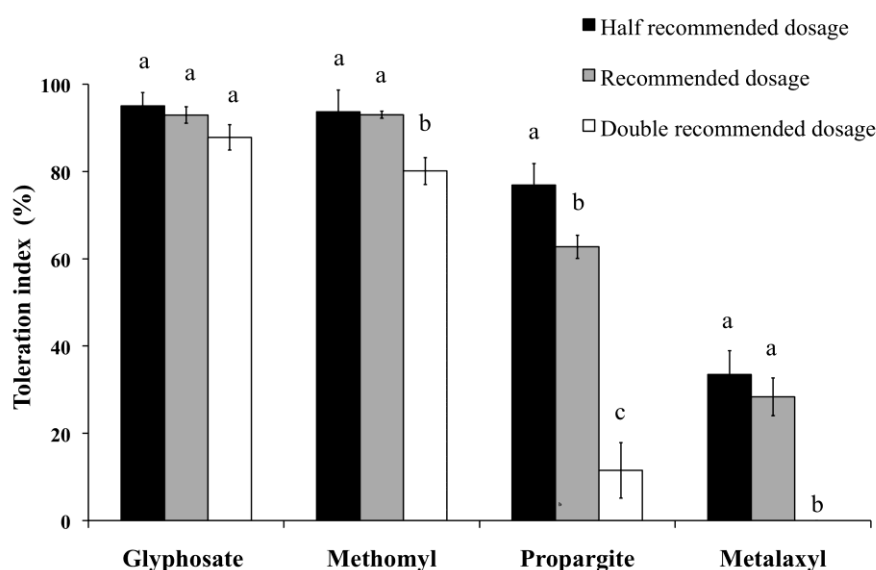
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Colletotrichum gloeosporioides* CMU-A109 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 7 วัน ลักษณะโคโลนีอายุ 7 วัน (a และ b); conidiomata (c), appressoria (ลูกศร) (d), conidiogenous cell (ลูกศร) (e), conidia (f) และ setae (ลูกศร) (g). บาร์: a และ b = 1 cm; c = 0.15 mm; d–g = 10 μ m.

4.12 การศึกษาความทนทานของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

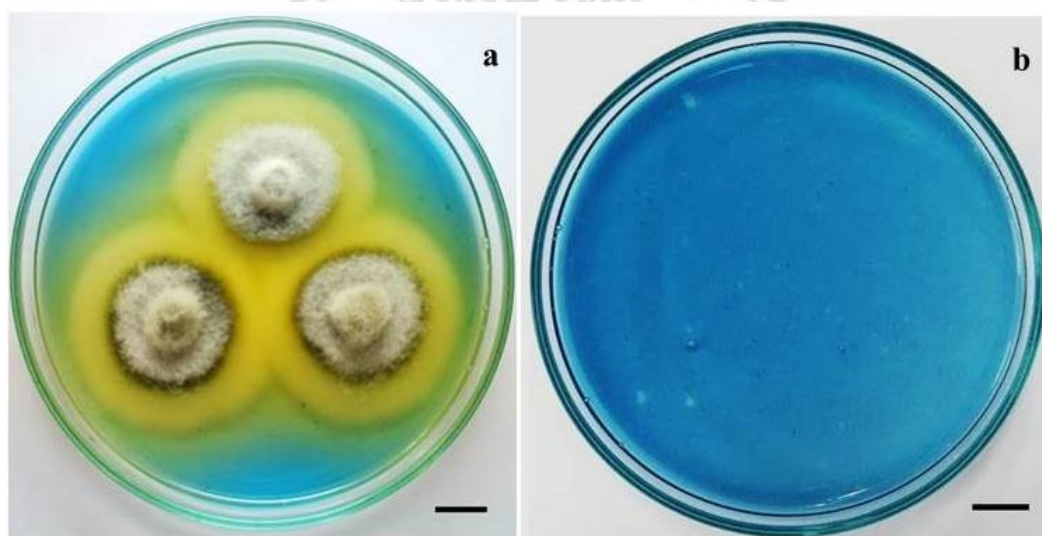
ความทนทาน (TI) ของราต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ สารกำจัดวัชพืช สารกำจัดแมลง และสารกำจัดเชื้อรา แสดงดังภาพ 4.12 พบว่า ค่าความทนทานต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 แสดงค่าความทนทานต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (TI value $\geq 50\%$) ในทุกความเข้มข้นของ glyphosate และ methomyl ที่ผสมในอาหาร PDB และแสดงค่าความทนทานต่อสารเคมีมากกว่า 50% ในความเข้มข้นครึ่งหนึ่งและอัตราแนะนำ และน้อยกว่า 50% ในความเข้มข้น 2 เท่าของอัตราแนะนำของ propargite ที่ผสมในอาหาร PDB และความทนทานของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 น้อยกว่า 50% (TI value $< 50\%$) เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB ที่ผสม metalaxyl ทั้งความเข้มข้นครึ่งหนึ่งและอัตราแนะนำ นอกจากนี้พบว่า *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ไม่สามารถทนทานต่อทุกความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช คือ 2,4-D-dimethylammonium และ paraquat dichloride และสารกำจัดเชื้อรา คือ propiconazole, benomyl, prochloraz และ captan เช่นเดียวกับความเข้มข้น 2 เท่าของอัตราแนะนำ ของ metalaxyl



ภาพ 4.12 ดัชนีความทนทาน (Toleration index, TI) ของรา *Colletotrichum gloeosporioides* CMU-A109 ต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตัวอักษรที่แตกต่างกันบนกราฟแต่ละแท่งในการทดลองเดียวกันแสดง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.13 การศึกษาการผลิต siderophore ของราเอนโดไฟท์ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109

การทดสอบรา *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ในการผลิต siderophore บนอาหาร CAS agar พบว่ารา *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 สามารถสร้างวงสีเหลืองรอบโคโลนีบนอาหาร CAS agar (ภาพ 4.13) แสดงว่ารา *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ให้ผลเชิงบวกในการผลิต siderophore และเมื่อทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณ siderophore ของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ในอาหารเหลว พบว่า เป็น siderophore ชนิด hydroxamate และมีปริมาณ 239.44 $\mu\text{mol/L}$



ภาพ 4.13 การทดสอบการผลิต siderophore บนอาหาร CAS; ราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum gloeosporioides* CMU-A109 สร้างวงสีเหลืองรอบโคโลนีบนอาหาร CAS agar (a), อาหาร CAS agar ที่ไม่ได้เพาะเชื้อ (b), บาร์ = 1 cm

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การคัดแยกราเอนโคไฟท์โดยวิธีฆ่าเชื้อบริเวณผิวตัวอย่าง (surface sterilization) และวางบนอาหารแข็งเป็นวิธีที่นิยมในการใช้คัดแยกราเอนโคไฟท์จากตัวอย่างพืชหลากหลายชนิด (Santamaría and Bayman, 2005; Suwannarach et al., 2012; Siri-udom et al., 2015) การคัดแยกราเอนโคไฟท์ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานการคัดแยกราเอนโคไฟท์จากตัวอย่างกาแฟโดยการฆ่าเชื้อบริเวณผิวตัวอย่างและวางบนอาหารคัดแยกเพื่อให้ราเอนโคไฟท์จากตัวอย่างพืชเดินเส้นใยบนอาหารที่ใช้แยก (Vega et al., 2010; Mulaw et al., 2013; Saucedo-García et al., 2014) จากการคัดแยกราเอนโคไฟท์จากตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า พบว่า *Colletotrichum* และ *Xylaria* เป็นราสกุลเด่นที่แยกได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Santamaría and Bayman (2005) ที่รายงานว่า *Xylaria*, *Colletotrichum* และ *Guignardia* มีความถี่สูงสามารถคัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า ในขณะเดียวกัน Vega et al. (2010) รายงานการคัดแยกราเอนโคไฟท์จากตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Coffea arabica*, *Coff. canephora*, *Coff. congensis*, *Coff. liberica*, *Coff. macrocarpa*, *Coff. racemosa* และ *Coff. stenophylla* พบว่า *Colletotrichum* เป็นราเอนโคไฟท์สกุลเด่นที่คัดแยกได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Oliverira et al. (2014) ที่รายงานว่า *Coll. gloeosporioides* เป็นราเอนโคไฟท์ชนิดเด่นที่แยกได้จากตัวอย่างกาแฟ นอกจากนี้ Costa et al. (2012) รายงานว่า *Colletotrichum* เป็นกลุ่มของราที่มีการรายงานว่าสามารถคัดแยกได้จากตัวอย่างพืชทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชเขตร้อน อย่างไรก็ตามชนิดพืช แหล่งเพาะปลูก และวิธีการที่ใช้ในการคัดแยกมีความสำคัญต่อชนิดและประชากรของจุลินทรีย์ที่พบ (Petrini et al., 1992; Azevado, 2014)

มีการรายงานการศึกษาจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์กับพืชที่สามารถผลิต IAA อย่างแพร่หลาย (Khan et al., 2012; Kumla et al., 2014; Suwannarach et al., 2015; Nutaratat et al., 2016) ในการทดลองนี้ราเอนโคไฟท์ *Colletotrichum* จำนวน 5 ไอโซเลต สามารถผลิต IAA เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เติม L-tryptophan สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าราเอนโคไฟท์สามารถผลิต

IAA ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี L-tryptophan (Chutima and Lumyong, 2012; Khan et al., 2014; Suwannarach et al., 2015; Syamsia et al., 2015) ซึ่ง ราเอนโดไฟท์ทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถผลิต IAA ได้ในช่วง 151.41 ถึง 662.96 $\mu\text{g/ml}$ และปริมาณ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ดังกล่าวผลิตได้สูงกว่าปริมาณ IAA ของราเอนโดไฟท์ที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ซึ่ง ส่วนใหญ่ IAA ที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยกว่า 150 $\mu\text{g/ml}$ โดยศักยภาพในการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของราเอนโดไฟท์ ตัวอย่างเช่น Waqas et al. (2012, 2014) และ Khan et al. (2012) รายงานว่าราเอนโดไฟท์ (*Aspergillus fumigatus*, *Chrysosporium pseudomerdarium*, *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp. and *Phoma* spp.) ที่คัดแยกจากรากของ แตงกวา และถั่วเหลืองผลิต IAA ในช่วง 0.23–71.51 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ *Fusarium tricinctum* และ *Alternaria alternata* ที่แยกจาก *Solanum nigrum* และ *Muscodor cinnamomi* ที่แยกจาก *Cinnamomum bejolghota* ผลิต IAA ที่ 54.00, 30.00 และ 45.36 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Khan et al., 2015; Suwannarach et al., 2015) Syamsia et al. (2015) รายงานว่าราเอนโดไฟท์จำนวน 16 ไอโซเลต ที่คัดแยกจาก aromatic rice ผลิต IAA ในปริมาณ 0.63 ถึง 2.62 $\mu\text{g/ml}$ และ Khan et al. (2012) รายงานว่า *Chaetomium globosum* LK14 ที่คัดแยกจาก *Capsicum annuum* ผลิต IAA ปริมาณ 16.71 $\mu\text{g/ml}$ การศึกษาราเอนโดไฟท์จากรากกล้วยไม้ของ Chutima and Lumyong (2012) พบว่า *Tulasnella* sp. CMU-SLP 007 และ CMU-NUT 013 ผลิต IAA ปริมาณ 149.35 และ 101.00 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม *Coll. gloeosporioides* CMU-AU 006 ก็สามารถผลิต IAA ได้สูง 214.83 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งยังต่ำกว่า *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ในการศึกษาครั้งนี้

อนุพันธ์ของอินโดล (indole derivative) หรือ สารตัวกลาง (intermediate) เป็นตัวหลักที่ใช้ในการบ่งชี้วิถีการสังเคราะห์ IAA ของสิ่งมีชีวิต (Spapen et al., 2011) ปัจจุบันมีการรายงานเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับวิถีการสังเคราะห์ IAA (IAA biosynthesis pathway) ของจุลินทรีย์ (Spapen et al., 2007) การศึกษาวิถีการสังเคราะห์ IAA จึงเป็นสิ่งจำเป็นและได้รับความสนใจเพื่อเป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาและต่อยอดในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิถีการสังเคราะห์ IAA ของราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* ทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่ามีการสังเคราะห์ IAA โดยใช้สารตั้งต้นคือ L-tryptophan ผ่านวิถี indole-3-acetamide (IAM) เนื่องจากมีการตรวจพบสารตัวกลางคือ IAM ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Robinson et al. (1998) และ Maor et al. (2004) ที่รายงานว่า *Coll. gloeosporioides* สังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี IAM นอกจากนี้มีการรายงานว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้วิถี IAM ในการสังเคราะห์ IAA โดยใช้ L-tryptophan เป็นสารตั้งต้น ตัวอย่างเช่น *Fusarium* sp. (Tsavkelova et al., 2012), *Pseudomonas chlororaphis* O6 (Dimkpa et al., 2012) และ *Streptomyces* spp. (Manulis et al., 1994). ในขณะที่จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี

การสังเคราะห์อื่นเช่นกัน อาทิ *Bradyrhizobium* สังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี indole-3-acetonitrile (IAN) pathway (Vega-Hernández et al., 2002) นอกจากนี้ *Piriformospora indica*, *Rhodosporidium paludigenum* และ *Ustilago maydis* สังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี indole-3-pyruvic acid (IPyA) (Reineke et al., 2008; Hilbert et al., 2012; Nutaratat et al., 2016) ยิ่งไปกว่านั้น Chung et al. (2003), Mujahid et al. (2011) และ Luo et al. (2016) พบว่า *Coll. acutatum*, *F. graminearum* และ *Rubrivivax benzoatilyticus* มีความสามารถสังเคราะห์ IAA ได้หลายวิถี

การศึกษาความเข้มข้นของ L-tryptophan ในอาหารเพาะเลี้ยง อุณหภูมิและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการผลิต IAA ของจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยดังกล่าวต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่สามารถผลิต IAA ได้ในปริมาณสูงสุดจากราเอนโดไฟท์ทั้ง 5 ไอโซเลต ราเอนโดไฟท์ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 สามารถผลิตปริมาณ IAA ได้สูงสุดที่ L-tryptophan ความเข้มข้น 8 mg/ml และปริมาณของ IAA จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ L-tryptophan เพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าความเข้มข้นของ L-tryptophan มีผลต่อการผลิต IAA ของจุลินทรีย์ Chutima and Lumyong (2012) รายงานว่า *Coll. gloeosporioides* CMU-AU 006 และ *Tulasnella* sp. CMU-SLP 007 สามารถผลิต IAA ได้สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ L-tryptophan ถึง 6 mg/ml และปริมาณ IAA จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ L-tryptophan เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ Bose et al. (2013) รายงานว่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดต่อการผลิต IAA ของเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* คือ 1 mg/ml ในปี 2014 Kumla et al. รายงานความเข้มข้นที่เหมาะสมของ L-tryptophan ต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไมคอร์ไรซากลุ่ม sclerodermatoid ว่ามีความเข้มข้นที่แตกต่างกันโดยพบว่าที่ความเข้มข้นของ L-tryptophan ที่ 2 mg/ml *Astraeus odoratus*, *Pisolithus albus* และ *Scleroderma sinnamariense* สามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นของ L-tryptophan ที่ 4 mg/ml เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของ *Phlebopus portentosus* และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ L-tryptophan ขึ้นจากความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาณ IAA ที่ราดังกล่าวผลิตจะลดลง การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 คือ 30°C สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่รายงานว่าราเอนโดไฟท์สามารถผลิต IAA ได้ในช่วง 25°C ถึง 30°C (Khan et al., 2012, 2015; Waqas et al., 2012; Chutima and Lumyong, 2012; Waqas et al., 2014; Suwannarach et al., 2015; Syamsia et al., 2015) นอกจากนี้มีการรายงานว่าอุณหภูมิ 30°C เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Lentinus sajor-caju* (Yurekli et al., 2003), *Streptomyces* sp. CMU-H009 (Khamna et al., 2010), *Pantoea agglomerans* strain PVM (Apine and Jadhav, 2011) และ ราเอนโดไมคอร์ไรซา *Ast. odoratus*, *Phl. portentosus*, *Pis. albus* และ *Sc. sinnamariense* (Kumla et al., 2014) ปัจจัยเกี่ยวกับ

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ซึ่งจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้มีความเกี่ยวเนื่องกันในส่วนของชนิดจุลินทรีย์ ปริมาณ L-tryptophan ที่มีในอาหารเพาะเลี้ยงและอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (Khamna et al., 2010; Bose et al., 2013; Kumla et al., 2014) ซึ่งปริมาณ IAA ที่จุลินทรีย์ผลิตจะพบปริมาณสูงสุดเมื่อจุลินทรีย์เจริญอยู่ในช่วง stationary phase ของการเพาะเลี้ยง (Tsavkelova et al., 2007; Chutima and Lumyong, 2012; Kumla et al., 2014)

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบ IAA ของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ต่อการกระตุ้นการยืดยาวของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าว, ข้าวโพด, และข้าวไรย์ พบว่าสารสกัดหยาบ IAA ของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 สามารถกระตุ้นการยืดยาวของ coleoptile ของพืชที่ทดสอบได้ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าสารสกัดหยาบ IAA จากรากลุ่มเอนโดไฟท์ (*Coll. gloeosporioides* CMU-AU 006, *Tulasnella* sp. CMU-SLP 007, *Tulasnella* sp. CMU-NUT 013 และ *M. cinnamomi*) กลุ่มเอคโตไมคอร์ไรซา (*Ast. odoratus*, *Pis. albus*, *Phle. portentosus* และ *Sc. sinnamariense*) สามารถกระตุ้นการยืดยาวเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าวและข้าวโอ๊ตได้ (Chutima and Lumyong, 2012; Kumla et al., 2014; Suwannarach et al., 2015) เช่นเดียวกับการทดสอบสารสกัดหยาบ IAA จากเห็ดนางรม (*Pleu. Ostreatus*) ที่สามารถกระตุ้นการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าวสาลีได้ (Bose et al., 2013) สารสกัดหยาบ IAA ของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวรากและน้ำหนักแห้งรากของข้าวโพดได้ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานการศึกษา IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ (*Coll. gloeosporioides*, *Phoma* spp., *Penicillium* sp., *Tulasnella* sp.) สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งรากของพืชทดสอบได้ (Chutima and Lumyong, 2012; Waqas et al., 2012; Kedar et al., 2014) นอกจากนี้มีการรายงานว่า IAA ผลิตโดยรา (*Fusarium oxysporum*) และเอคโตไมคอร์ไรซา (*Ast. odoratus*, *Pis. albus*, *Phle. portentosus* และ *Sc. sinnamariense*) สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งรากของพืชทดสอบได้เช่นกัน (Hasan, 2002; Kumla et al., 2014)

การศึกษการส่งเสริมการเจริญของกล้าข้าวโดยใช้โคโคเนียของราเอนโดไฟท์ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ซึ่งใช้ตัวชี้วัดคือความยาวและน้ำหนักแห้งของต้นและราก และปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่า สามารถเพิ่มความยาวต้นและราก เพิ่มน้ำหนักแห้งต้นและราก และเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าราเอนโดไฟท์สามารถส่งเสริมการเจริญของกล้าพืชต่างๆได้ทั้งในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) และระดับทดสอบกับสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) (Meena et al., 2009; Kedar et al., 2014; Suwannarach et al., 2015) ตัวอย่างเช่น

ราเอนโดไฟท์ *Piri. indica* สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช ข้าวบาร์เลย์ (barley) ข้าวโพด (maize) พาร์สลีย์ (parsley) ปอปลาร์ (poplar) และ ยาสูบ (tobacco) (Varma et al., 1999; Waller et al., 2005) เช่นเดียวกับการปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ (*Scolecobasidium humicola* และ *Mus. cinnamomi*) ลงในกล้ามะเขือเทศ พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญทำให้ต้นมะเขือเทศเจริญได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ (Mahmoud and Narisawa, 2013; Suwannarach et al., 2015) ในขณะเดียวกัน Zhou et al. (2014) รายงานราเอนโดไฟท์ (*Alternaria* spp., *Phomopsis* sp. และ *Cladosporium* sp.) ที่คัดแยกจากดอกไม้ในเมืองยูนานประเทศจีนสามารถส่งเสริมการเจริญและเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นกล้ายาสูบได้ มีการรายงานการปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ (*Phoma* spp.) ที่คัดแยกจากพืชสมุนไพร (*Tinospora cordifolia* และ *Calotropis procera*) สามารถส่งเสริมการเจริญของกล้าข้าวโพดได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (Kedar et al., 2014) ในขณะที่ Khan et al. (2012) และ Waqas et al. (2012) รายงานว่าราเอนโดไฟท์ *Pae. formosus*, *Penicillium* sp. และ *Pho. glomerata* สามารถส่งเสริมการเจริญของแตงกวาภายใต้สภาวะที่มีความเครียดจากความแห้งแล้งและเกลือได้ เช่นเดียวกับการรายงานราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากกล้วยไม้สามารถส่งเสริมการเจริญและการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ (Chen et al., 2010; Chutima et al., 2011) ยิ่งไปกว่านั้น Mejía et al. (2008) รายงานว่า *Coll. gloeosporioides* สามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพและสามารถส่งเสริมการเจริญของกล้าโกโก้ (*Theobroma cacao*) ได้

จุลินทรีย์ที่สามารถทนทานต่อยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าแมลงและยาฆ่าเชื้อราก่อโรคพืชได้ เนื่องจากมีความสามารถในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชดังกล่าว ซึ่งมีความสามารถแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสารเคมีกำจัดศัตรูพืชนั้นๆ (Bending et al., 2002; Ortiz-Hernández and Sánchez-Salinas, 2010; Mohiddin and Khan, 2013; Oliveira et al., 2015) งานวิจัยนี้พบว่า *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 สามารถทนทานต่อยาฆ่าวัชพืช glyphosate ได้ ทนยาฆ่าแมลง methomyl และ propagate ได้ และทนยาฆ่าเชื้อราก่อโรคพืช matalaxyl ได้ ในระดับปริมาณที่มีการใช้จริงในแปลงเพาะปลูก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการที่ได้รายงานไว้ว่า ราเบียนแมลง (entomopathogenic fungi) (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Neozygites floridana* และ *Nomuraea rileyi*), ราที่แยกจากดินในฟาร์ม (*Asp. flavus* WDCZ2, *Pen. spiculisporus* ASP5 และ *Pen. verruculosum* WGP1) และราที่ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีววิธี (*Mus. cinnamomi* and *Trichoderma atroviridae*) สามารถทนทานต่อ glyphosate ในระดับปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ในแปลงเพาะปลูกได้ (Morjan et al., 2002; Eman et al., 2013; Santoro et al., 2014; Suwannarach et al., 2015) นอกจากนี้ Suwannarach et al. (2015) รายงานว่า *Mus. cinnamomi* สามารถทนทานต่อ paraquat dichloride, 2,4-dimethylammonium และ methomyl ในปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ในแปลงเพาะปลูกได้อีกด้วย ในทำนองเดียวกัน Mohiddin and Khan (2013) รายงานว่า *Pochonia chlamydosporia*, *Tri. harzianum*

และ *Tri. virens* สามารถทนทานต่อ matalaxyl ในปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ในแปลงเพาะปลูกได้เช่นกัน ซึ่งผลการวิจัยการทนทานของจุลินทรีย์ที่จะนำไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการนำไปพัฒนาเพื่อสามารถใช้ในแปลงเพาะปลูกได้

ผลการศึกษาการผลิต siderophore ของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 พบว่า *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 สร้างวงสีเหลืองบนอาหารแข็ง CAS ซึ่งเป็นผลบวกในการผลิต siderophore และเมื่อตรวจสอบชนิด siderophore โดยสารทดสอบพบว่า *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ผลิต siderophore ชนิด hydroxamate สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ว่าราเอนโคไฟท์สามารถผลิต siderophore ชนิด hydroxamate ตัวอย่างเช่น *Arthrinium* sp., *Phialocephala fortinii*, *Fusarium* spp., *M. cinnamomi* (Bartholdy et al., 2001; Kajula et al., 2010; Suwannarach, 2013) นอกจากนี้มีรายงานการสร้าง siderophore ชนิด hydroxamate ในรากกลุ่มเอคโตไมคอร์ไรซา ได้แก่ *Laccaria bicola*, *Lac. laccata*, *Suillus granulatus* (Haselwendter et al., 2011, 2013) จุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิต siderophore เพื่อจับกับธาตุเหล็ก (Fe^{3+}) และแร่ธาตุอื่นๆในสิ่งแวดล้อมเพื่อนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์ได้ (Neiland, 1995; Chaiham et al., 2009; Khamna et al., 2009) และพืชอาจใช้ siderophore เป็นแหล่งของธาตุเหล็ก (Bar-Ness et al., 1991; Wang et al., 1993) นอกจากนี้ siderophore ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์สามารถส่งเสริมการเจริญแก่พืชโดยการเพิ่มธาตุเหล็กให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นการส่งเสริมการเจริญแก่พืช อีกทั้งการแย่งจับธาตุเหล็กของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยใช้ siderophore ทำให้ปริมาณธาตุเหล็กในสิ่งแวดล้อมลดลงส่งผลให้การนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชไม่สมบูรณ์เนื่องจากธาตุเหล็กไม่เพียงพอ ซึ่งธาตุเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์และการเข้าทำลายพืชของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชเช่นกัน ดังนั้นจึงทำให้ความสามารถในการก่อโรคพืชของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชลดลง (Mahmoud and Abd-Alla, 2001; Renshaw et al., 2002; Chaiham et al., 2009; Khamna et al., 2009)

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างใบและก้านของกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า สามารถคัดแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 518 ไอโซเลต และจัดกลุ่มราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 39 กลุ่ม การตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มอินโดลของตัวแทนในแต่ละกลุ่มทั้งหมด 39 ไอโซเลต พบว่า ราเอนโดไฟท์ 5 ไอโซเลต ได้แก่ *Colletotrichum* sp. CMU-A18, *Colletotrichum* sp. CMU-A30, *Colletotrichum* sp. CMU-A45, *Colletotrichum* sp. CMU-A49 และ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ให้ผลบวกต่อการผลิตสารกลุ่มอินโดล และเมื่อตรวจวัดปริมาณ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ทั้ง 5 ไอโซเลตผลิตพบว่า *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ผลิต IAA ปริมาณสูงที่สุด (662.96 ± 56.18 $\mu\text{g/ml}$) นอกจากนี้การตรวจสอบวิธีการผลิต IAA พบว่า ทั้ง 5 ไอโซเลตผลิต IAA ผ่านวิถี indole-3-acetamide (IAM)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิต IAA ของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 คือ ใช้ L-tryptophan ความเข้มข้น 8 mg/ml อุณหภูมิ 30°C และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 26 วัน *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถผลิต IAA ได้ปริมาณ $1,205.58 \pm 151.89$ $\mu\text{g/ml}$ โดยสารสกัดหยาบของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถกระตุ้นการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าว ข้าวโพด และ ข้าวไรย์ และสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของรากข้าวโพดได้

การทดสอบการใช้สปอร์ของ *Colletotrichum* sp. CMU-A109 ต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าวสายพันธุ์ กข6 พบว่า *Colletotrichum* sp. CMU-A109 สามารถเพิ่มความยาวต้นและราก น้ำหนักแห้งต้นและราก และปริมาณคลอโรฟิลล์ของข้าวสายพันธุ์ กข6 ได้ เมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่ปลูกสปอร์ของรากับต้นข้าว

การระบุชนิดของรา *Colletotrichum* sp. CMU-A109 โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา พบว่า *Colletotrichum* sp. CMU-A109 เป็น *Colletotrichum gloeosporioides*

ความทนทานของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช แสดงในค่า tolerance index (TI) พบว่า *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 สามารถทนทานต่อยาฆ่าหญ้า glyphosate ยาฆ่าแมลง methomyl และ propargite และยาฆ่าแมลง matalaxyI ในความเข้มข้นอัตราแนะนำ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ผลิต siderophore ชนิด hydroxamate

จากการศึกษาข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าราเอนโดไฟท์ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ที่คัดแยกจากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าสามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูง สารสกัดยับยั้ง IAA และตัวเชื้อ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืช

ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบการใช้สารสกัดยับยั้งของรา *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ต่อการส่งเสริมการงอกของเมล็ดกาแฟ ควร pretreatment เมล็ดกาแฟก่อนนำไปแช่สารสกัดยับยั้ง เนื่องจากเมล็ดกาแฟมีลักษณะแข็ง อาจทำให้สารสกัดยับยั้งไม่สามารถเข้าไปกระตุ้นการงอกของเมล็ดกาแฟได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ
2. ควรทดสอบการใช้ตัวเชื้อ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ต่อการส่งเสริมการเจริญของกล้ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และทดสอบความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity test) ของ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 ต่อกล้ากาแฟ
3. การนำไปประยุกต์ใช้ เนื่องจากรา *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 เป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคในพืชได้หลากหลาย ดังนั้นการนำไปใช้สามารถใช้สาร IAA ที่ราเอนโดไฟท์ผลิตเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชต่างๆ ส่วนการใช้ตัวเชื้อ *Coll. gloeosporioides* CMU-A109 เพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชนั้น ควรทดสอบความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity test) ต่อพืชที่จะนำไปส่งเสริม และต้องมีการควบคุมการแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

- [กองบรรณาธิการ เฉพาะกิจฐาน เกษตรกรรม, 2530] กองบรรณาธิการเฉพาะกิจฐานเกษตรกรรม กาแฟ สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม พ.ศ. 2530
- [พชันี, 2549] พชันี สุวรรณวิศลกิจ *สรรพสาระกาแฟ* โรงพิมพ์นันทพันธ์ 33/3-5 ต.แม่เหียะ อ.เชียงใหม่-หางดง อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50000 พ.ศ. 2549
- [พีรเดช, 2537] พีรเดช ทองอำไพ *ฮอว์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย* พิมพ์ครั้งที่ 4 สำนักพิมพ์วิชัยการพิมพ์ พ.ศ. 2537
- [สำนักงาน พัฒนาการวิจัย การเกษตร, 2559] สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, “กาแฟ; สถานการณ์ในปัจจุบันและแนวโน้มในอนาคต,” เว็บไซต์: <http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/coffee/trends/index.php>, 6 กรกฎาคม 2559.
- [หลวงบุเรศรบำรุง การ, 2505] หลวงบุเรศรบำรุงการ *การทำไร่กาแฟ* สมาคมพฤกษชาติแห่งประเทศไทย โรงพิมพ์เจริญพัฒน์ กรุงเทพฯ แพร่พิทยา 716-718 วังบูรพา กทม. พ.ศ. 2505
- [Abd-Alla et al., 2013] Abd-Alla, M.H., El-Sayed, E.S.A. and Rasme, A.H.M., “Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt,” *Journal of Biology and Earth Sciences*, Vol. 3, No. 2, August 2013, pp. 182–193.
- [Ameur and Ghoul, 2012] Ameur, H. and Ghoul, M., “Screening of actinomycetes producing antibacterial substances and indole acetic acid (IAA) and optimization of growth and IAA production conditions in *Streptomyces* sp. SF5,” *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, Vol. 3, No. 3, June 2012, pp. 545–551.
- [Ahmad et al., 2005] Ahmad, F., Ahamad, I. and Khan, M.S., “Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan,” *Turkish Journal of Biology*, Vol. 29, 2005, pp. 29–34.

- [Akbari et al., 2007] Akbari, Gh.A., Arab, S.M., Alikhani, H.A., Allahdadi, I. and Arzanesh, M.H., "Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots," World Journal of Agricultural Sciences, Vol. 3, No. 4, 2007, pp. 523–529.
- [Angasith, 2001] Angasith, P., "Coffee production status and potential of organic arabica coffee in Thailand," Proceeding, the First Asian Regional Round-table on Sustainable, Organic and Speciality Coffee Production, Processing and Marketing, 26–28 February 2001, Chiang Mai, Thailand.
- [Apine and Jadhav, 2011] Apine, O.A. and Jadhav, J.P., "Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM," Journal of Applied Microbiology, Vol. 110, February 2011, pp. 1235–1244.
- [Arnold et al., 2003] Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A., "Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree," Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 100, No. 26, December 2003, pp. 15649–15654.
- [Arshad and Frankenberger, 1991] Arshad, M. and Frankenberger, W.T., "Microbial production of plant hormones," Plant and Soil, Vol. 133, No. 1, May 1991, pp. 1–8.
- [Arteca, 1996] Arteca, R.N., *Plant Growth Substances: Principles and Applications*, Chapman and Hall Press, 1996.
- [Arnow, 1937] Arnow, L.E., "Colorimetric determination of the components of 3,4–dihydroxyphenylalanine tyrosine mixture," The Journal of Biological Chemistry, Vol. 118, 1937, pp. 531–537.
- [Atkin et al., 1970] Atkin, C.L., Neilands, J.B. and Phaff, H.J., "Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*," Journal of Bacteriology, Vol. 103, No. 3, September 1970, pp. 722–733.

- [Azevedo, 2014] Azevedo, J.L., *Microbial diversity and biotechnology in food security*, Kharwar, R.N., Upadhyay, R.S., Dubey, N.K. and Raghuwanshi, R. eds., 2014, pp.17–22, ISBN: 978-81-322-1800-5.
- [Bar-Ness et al., 1991] Bar-Ness, E., Chen, Y., Hadar, Y., Marschner, H. and Römheld, V., “Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants,” *Plant and Soil*, Vol. 130, No. 1, January 1991, pp. 231–241.
- [Bartholdy et al., 2001] Bartholdy, B.A., Berreck, M. and Haselwandter, K., “Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte,” *BioMetals*, Vol. 14, No. 1, Murch 2001, pp. 33–42.
- [Bartling et al., 1994] Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R.C. and Weiler, E.W., “Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 91, January 1994, pp. 6021–6025.
- [Bae et al., 2009] Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S.H., Strem, M.D., Melnick, R.L. and Bailey, B.A., “The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*,” *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, June 2009, pp. 3279–3295.
- [Bending et al., 2002] Bending, G.D., Friloux, M., and Walker, A., “Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential,” *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 212, No.1, July 2002, pp. 59–63.
- [Bose et al., 2013] Bose, A., Shah, D. and Keharia, H., “Production of indole-3-acetic-acid (IAA) by white rot fungus *Pleurotus ostreatus* under submerged condition of *Jatropha* seedcake,” *Mycology*, Vol. 4, August 2013, pp. 103–111.
- [Carmichael et al., 1980] Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Connors, I.L. and Sigler, L., *Genera of Hyphomycetes*, The University of Alberta Press, Alberta, 1980, pp. 1–386.
- [Carroll, 1988] Carroll, G., “Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont,” *Ecology*, Vol. 69, February 1988, pp. 2–9.

- [Chaiharn and Lumyong, 2011] Chaiharn, M. and Lumyong, S., "Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth," *Current Microbiology*, Vol. 62, No. 1, January 2011, pp. 173–181.
- [Chaiharn et al., 2009] Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S. and Lumyong, S., "Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 25, June 2009, pp. 1919–1928.
- [Chen et al., 2010] Chen, X.M., Dong, H.L., Hu, K.X., Sun, Z.R., Chen, J. and Guo, S.X., "Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe," *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 29, September 2010, pp. 328–337.
- [Chung et al., 2003] Chung, K.R., Shilts, T., Ertürk, Ü., Timmer, L.W. and Ueng, P.P., "Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus," *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 226, September 2003, pp. 23–30.
- [Chutima et al., 2011] Chutima, R., Dell, B., Vessabutr, S., Bussaban, B. and Lumyong, S., "Endophytic fungi from *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand" *Mycorrhiza*, Vol. 21, No. 3, April 2011, pp. 221–229.
- [Chutima and Lumyong, 2012] Chutima, R. and Lumyong, S., "Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi," *Symbiosis*, Vol. 56, March 2012, pp. 35–44.
- [Contreras-Cornejo et al., 2009] Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. and López-Bucio, J., "*Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*," *Plant Physiology*, Vol. 149, March 2009, pp. 1579–1592.
- [Coffeedeep, 2013] Coffeedeep, "Coffee," Website: <http://www.coffeedeep.com/>, 6 July 2016.

- [Costacura and Vanderleyden, 1995] Costacura, A. and Vanderleyden, J., "Synthesis of phytohormone by plant-associated bacteria," *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 21, No. 1, 1995, pp. 1–18.
- [Costa et al., 2012] Costa, I.P.M.W., Assunção, M.M.C., Lima, T.E.F., Oliveira, R.J.V. and Cavalcanti, M.A.Q., "Checklist of endophytic fungi from tropical regions," *Mycotaxon*, Vol. 119, 2012, pp. 493–494.
- [Elilis, 1971] Ellis, M.B., *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, London, 1971, pp. 1–608.
- [Ehmann, 1977] Ehmann, A., "The van Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives," *Journal of Chromatography A*, Vol. 132, February 1977, pp. 267–276.
- [Emann et al., 2013] Emann, A., Abdel-Megeed, A., Suliman, A.M.A., Sadik, M.W. and Sholkamy, E.N., "Biodegradation of glyphosate by fungal strains isolated from herbicides polluted-soils in Riyadh area," *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Vol. 2, No.8, 2013, pp. 359–381.
- [Ernstsen et al., 1987] Ernstsen, A., Sandberg, G., Crozier, A. and Wheeler, C.T., "Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*," *Planta*, Vol. 171, No. 3, July 1987, pp. 422–428.
- [Dimkpa et al., 2012] Dimkpa, C.O., Zeng, J., McLean, J.E., Britt, D.W., Zhan, J. and Anderson, A., "Production of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in the plant-beneficial bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 is inhibited by ZnO nanoparticles but enhanced by CuO nanoparticles," *Applied and Environmental*, Vol. 78, No. 5, March 2012, pp. 1404–1410.

- [Dolatabadi et al., 2012] Dolatabadi, H.K., Goltapeh, E.M., Moieni, A. and Varma, A., "Evaluation of different densities of auxin and endophytic fungi (*Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera*) on *Mentha piperita* and *Thymus vulgaris* growth," African Journal of Biotechnology, Vol. 11, No. 7, January 2012, pp.1644–1650.
- [Fomina et al., 2005] Fomina, M.A., Alexander, I.J., Colpaert, J.V. and Gadd, G.M., "Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi," Soil Biology and Biochemistry, Vol. 37, No. 5, May 2005, pp. 851–866.
- [Fouda et al., 2015] Fouda, A.H., Hassan, S.E.D., Eid, A.M. and Ewais, E.E.D., "Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.)," Annals of Agricultural Sciences. Vol. 60, May 2015, pp. 95–104.
- [Gangadevi and Muthumary, 2008] Gangadevi, V. and Muthumary, J., "Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb," World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 24, May 2008, pp. 717–724.
- [Goren, 1993] Goren, R., "Anatomical, physiological, and hormonal aspects of abscission in citrus," Horticultural Reviews, Vol. 15, August 1993, pp. 145–182.
- [Goren and Huberman, 1976] Goren, R. and Huberman, M., "Effects of ethylene and 2,4-D on the activity of cellulose isoenzymes in abscission zone of the developing orange fruit," Physiologia Plantarum, Vol. 37, June 1976, pp.123–130.
- [Goswamia, et al., 2015] Goswamia, D., Thakker, J.N. and Dhandhukia, P.C., "Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from l-tryptophan (Trp) using HPTLC," Journal of Microbiological Methods, Vol. 110, March 2015, pp. 7–14.

- [Goudjal et al., 2013] Goudjal, Y., Toumatia, O., Sabaou, N., Barakate, M., Mathieu, F. and Zitouni, A., "Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity," World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 29, 2013, pp. 1821—1829.
- [Gutierrez et al., 2009] Gutierrez, C.K., Matsui, G.Y., Lincoln, D.E. and Lovell, C.R., "Production of the phytohormone indole-3-acetic acid by estuarine species of the genus *Vibrio*," Applied and Environmental Microbiology, Vol. 75, No. 8, April 2009, pp. 2253—2258.
- [Harman et al., 2004] Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., "Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts," Nature Reviews Microbiology, Vol. 2, No. 1, January 2004, pp. 43—56.
- [Hasan, 2002] Hasan, H.A., "Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction," Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, Vol. 49, No. 1, 2002, pp. 105—118.
- [Haselwandter et al., 2011] Haselwandter, K., Häninger, G. and Ganzera, M., "Hydroxamate siderophores of the ectomycorrhizal fungi *Suillus granulatus* and *S. luteus*," BioMetals, Vol. 24, No. 1, February 2011, pp. 153—157.
- [Haselwandter et al., 2013] Haselwandter, K., Häninger, G., Ganzera, M., Haas, H., Nicholson, G. and Winkelmann, G., "Linear fusigen as the major hydroxamate siderophore of the ectomycorrhizal Basidiomycota *Laccaria laccata* and *Laccaria bicolor*," BioMetals, Vol. 26, No. 6, December 2013, pp. 969—979.
- [Hilbert et al., 2012] Hilbert, M., Voll, L.M., Ding, Y., Hofmann, J., Sharma, M. and Zuccaro, A., "Indole derivative production by the root endophyte *Piriformospora indica* is not required for growth promotion but for biotrophic colonization of barley roots," New Phytologist, Vol. 196, October 2012, pp. 520—534.
- [Hutcheson and Kosuge, 1985] Hutcheson, S.W. and Kosuge, T., "Regulation of 3-indole acetic acid production in *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. purification and properties of tryptophan 2-monooxygenase," Journal of Biological Chemistry, Vol. 260, No. 10, May 1985, pp. 6281—6287.

- [Kafaesansuk, 2011] Kafaesansuk, “การปลูกกาแฟ,” Website: <http://kafaesansuk.wordpress.com/catagory/จากต้นสู่แก้ว/1-การปลูกกาแฟ/>, 6 July 2016.
- [Kajula et al., 2010] Kajula, M., Tejesvi, M.V., Kolehmainen, S., Mäkinen, A., Hokkanen, J., Mattila, S. and Pirttilä A.M., “The siderophore ferricrocin produced by specific foliar endophytic fungi *in vitro*,” Fungal Biology, Vol. 114, NO. 2–3, February–March 2010, pp. 248–254.
- [Kaneshiro et al., 1983] Kaneshiro, T., Slodki, M.E. and Plattner, R.D., “Tryptophan catabolism to indole pyruvic and indole acetic acid by *Rhizobium japonicum* L-259 mutants,” Current Microbiology, Vol. 8, 1983, pp. 301–306.
- [Kedar et al., 2014] Kedar, A., Rathod, D., Yadav, A., Agarkar, G. and Rai, M., “Endophytic *Phoma* sp. isolated from medicinal plants promote the growth of *Zea mays*,” Nusantara Bioscience, Vol. 6, No. 2, November 2014, pp. 132–139.
- [Khan et al., 2012] Khan, A.L., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Jung, H.Y., Lee, J.H. and Lee, I.J., “Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10,” BMC Microbiology, Vol. 12, January 2012, pp. 1–14.
- [Khan et al., 2014] Khan, A.L., Waqas, M., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Al-Hosni, K., Kim, M.J., Adnan, M. and Lee, I.J., “Endophytes *Aspergillus caespitosus* LK12 and *Phoma* sp. LK13 of *Moringa peregrine* produce gibberellins and improve rice plant growth,” Journal of Plant Interactions, Vol. 9, April 2014, pp. 731–737.
- [Khan et al., 2012] Khan, A.L., Kim, Y.H., Waqas, M. and Kamran M., “Role of endophyte *Chaetomium globosum* LK4 in growth of *Capsicum annuum* by production of gibberellins and indole acetic acid,” Pakistan Journal of Botany, Vol. 44, No. 5, October 2012, pp. 1601–1607.

- [Khan et al., 2015] Khan, A.R., Ullah, I., Waqas, M., Shahzad, R., Hong, S.J., Park, G.S., Jung, B.K., Lee, I.J. and Shin, J.H., "Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves," World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 31, No. 9, September 2015, pp. 1461–1466.
- [Khamna et al., 2009] Khamna, S., Yokota, A. and Lumyong, S., "Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production," World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 25, April 2009, pp. 649–655.
- [Khamna et al., 2010] Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J.F. and Lumyong, S., "Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some medicinal plant rhizosphere soils," EurAsian Journal of BioSciences, Vol. 4, February 2010, pp. 23–32.
- [Khan et al., 2008] Khan, S.A., Hamayun, M., Yoon, H., Kim, H.Y., Suh, S.J., Hwang, S.K., Kim, J.M., Lee, I.J., Choo, Y.S., Yoon, U.H., Kong, W.S., Lee, B.M. and Kim, J.G., "Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*," BMC Microbiology, Vol. 8, December 2008, pp. 1–10.
- [Kobayashi et al., 1995] Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M. and Shimizu, S., "Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 92, January 1995, pp. 714–718.
- [Kumla et al., 2014] Kumla, J., Suwannarach, N., Bussaban, B., Matsui, K. and Lumyong, S., "Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerotium fungi collected from northern Thailand," Annals of Microbiology, Vol. 64, June 2014, pp. 707–720.
- [Kumar, 2016] Kumar, "Uses of Auxins in Agriculture and Horticulture (With Economic Importance)," Website: <http://www.biologydiscussion.com/agriculture/uses-of-auxins-in-agriculture-and-horticulture-with-economic-importance/15755>, 20 August 2016.

- [Labeeuw et al., 2016] Labeeuw, L., Khey, J., Bramucci, A.R., Atwal, H., de la Mata, A.P., Harynuk, J. and Case, R.J., "Indole-3-acetic acid is produced by *Emiliania huxleyi* coccolith-bearing cells and triggers a physiological response in bald cells," *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7, June 2016, pp. 1–16.
- [Laibach and Kribben, 1950] Laibach, F. and Kribben, F.I., "Effect of growth substance on the formation of male and female flowers in a monoecious plant (*Cucumis sativus*), *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Vol. 62, 1950, pp. 53–55.
- [Lambrecht et al., 2000] Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A.V. and Vanderleyden, J., "Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions," *Trends in Microbiology*, Vol. 8, No. 7, July 2000, pp. 298–300.
- [Leclère et al., 2005] Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M. and Jacques, P., "Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 8, August 2005, pp. 4577–4584.
- [Leopold, 1958] Leopold, A.C., "Auxin uses in the control of flowering and fruiting," *Annual Review of Plant Physiology*, Vol. 9, June 1958, pp. 281–310.
- [Luo et al., 2016] Luo, K., Rocheleau, H., Qi .P.F., Zheng, Y.L., Zhao, H.Y. and Ouellet, T., "Indole-3-acetic acid in *Fusarium graminearum*: identification of biosynthetic pathways and characterization of physiological effects," *Fungal Biology*, Vol. 120, No. 9, September 2016, pp. 1135–1145.
- [Lwin et al., 2012] Lwin, K.M., Myint, M.M., Tar, Y. and Aung, W.Z.M., "Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid - IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling," *Engineering Journal*, Vol. 16, No. 5, May 2012, pp. 137–144.
- [Mahmoud and Abd-Alla, 2001] Mahmoud, E. and Abd-Alla, H.I., "Siderophores production by some microorganisms and their effect on *Bradyrhizobium*-mungbean symbiosis," *International Journal of Agriculture and Biology*, Vol. 3, No. 2, January 2001, pp. 157–162.

- [Mahmoud and Narisawa, 2013] Mahmoud, R.S. and Narisawa, K., "A new fungal endophyte, *Scolecobasidium humicola*, promotes tomato growth under organic nitrogen conditions," Plos One, Vol. 8, November 2013, pp. 1–8.
- [Manulis et al., 1994] Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A. and Barash, I., "Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp.," Microbiology, Vol. 140, May 1994, pp. 1045–1050.
- [Maor et al., 2004] Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H. and Sharon, A., "In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*," Applied and Environmental Microbiology, Vol. 70, No. 3, March 2004, pp. 1852–1854.
- [Meena et al., 2009] Meena, K.K., Mesapogu, S., Kumar, M., Yandigeri, M.S., Singh, G. and Saxena, A.K., "Co-inoculation of the endophytic fungus *Piriformospora indica* with the phosphate-solubilising bacterium *Pseudomonas striata* affects population dynamics and plant growth in chickpea," Biology and Fertility of Soils, Vol. 46, November 2009, pp. 169–174.
- [Mejía et al., 2008] Mejía, L.C., Rojas, E.I., Maynard, Z., Bael, S.V., Arnold, A.E., Hebbar, P., Samuels, G.J., Robbins, N. and Herre, E.A., "Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens," Biological Control, Vol. 46, No. 1, July 2008, pp. 4–14.
- [Miliute and Buzaitė, 2011] Miliute, I. and Buzaitė, O., "IAA production and other plant growth promoting traits of endophytic bacteria from apple tree," Biologija, Vol. 57, No. 2, 2011, pp. 98–102.
- [Mohiddin and Khan, 2013] Mohiddin, F.A. and Khan, M.R., "Tolerance of fungal and bacterial biocontrol agents to six pesticides commonly used in the control of soil borne plant pathogens," African Journal of Agricultural Research, Vol. 8, No. 43, November 2013, pp. 5331–5334.
- [Mohite, 2013] Mohite, B., "Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth," Journal of Soil Science and Plant Nutrition, Vol. 13, No. 3, 2013, pp. 638–649.

- [Molina et al., 2012] Molina, G., Pimentel, M.R., Bertucci, T.C.P. and Pastore, G.M., "Application of fungal endophytes in biotechnological processes," *Chemical Engineering Transactions*, Vol. 27, October 2012, pp. 289–294.
- [Morjan et al., 2002] Morjan, W.E., Pedigo, L.P. and Lewis, L.C., "Fungicidal effects of glyphosate and glyphosate formulations on four species of entomopathogenic fungi," *Environmental Entomology*, Vol. 31, No. 6, December 2002, pp. 1206–1212.
- [Mujahid et al., 2011] Mujahid, Md., Sasikala, Ch. and Ramana, Ch.V., "Production of indole-3-acetic acid and related indole derivatives from L-tryptophan by *Rubrivivax benzoatilyticus*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 89, No. 4, February 2011, pp. 1001–1008.
- [Mulaw et al., 2013] Mulaw, T.B., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. and Atanasova, L., "Novel endophytic *Trichoderma* spp. isolated from healthy *Coffea arabica* roots are capable of controlling coffee tracheomycosis," *Diversity*, Vol. 5, No. 4, October 2013, pp.750–766.
- [Neilands, 1995] Neilands, J.B., "Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds," *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, No. 45, November 1995, pp. 26723–26726.
- [Nitsch, 1950] Nitsch, J.P., "Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin," *American Journal of Botany*, Vol. 37, No. 3, March 1950, pp. 211–215.
- [Nuangmek et al., 2015] Nuangmek, W., Thongkled, K. and Tityavan, M., "Efficacy of plant pathogenic fungi as biological control agents of water hyacinth," *Khon Kaen Agriculture Journal*, Vol. 1, 2015, pp. 933–938.
- [Nutaratat et al., 2016] Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P. and Limtong, S., "Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium paludigenum*," *Archives of Microbiology*, Vol. 198, No. 5, July 2016, pp. 429–437.

- [Oliveira et al., 2014] Oliveira, R.J.V., Souza, R.G., Lima, T.E.F. and Cavalcanti, M.A.Q., “Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems,” *Mycosphere*, Vol. 5, No. 4, August 2014, pp. 523–530.
- [Oliveira et al., 2015] Oliveira, B.R., Penetra, A., Cardoso, V.V., Benoliel, M.J., Crespo, M.T.B., Samson, R.A. and Pereira, V.J., “Biodegradation of pesticides using fungi species found in the aquatic environment,” *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 22, August 2015, pp. 11781–11791.
- [Ortiz-Hernández and Sánchez-Salinas, 2010] Ortiz-Hernández, M.L. and Sánchez-Salinas, E., “Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in Mexico,” *Revista Internacional de Contaminación ambiental*, Vol. 26, NO.1, 2010, pp. 27–38.
- [Palta, 1990] Palta, J.P., “Leaf chlorophyll content,” *Remote Sensing Reviews*, Vol. 5, No. 1, January 1990, pp. 207–213.
- [Patten and Glick, 1996] Patten, C.L. and Glick, B.R., “Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid,” *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 42, No. 3, March 1996, pp. 207–220.
- [Peterson et al., 2005] Peterson, S.W., Vega, F.E. and Posada, F., “*Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences,” *Mycologia*, Vol. 97, No. 3, May/June 2005, pp. 659–666.
- [Petrini et al., 1992] Petrini, O., Sieber, T.N., Toti, L. and Viret, O., “Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi,” *Natural Toxins*, Vol. 1, 1992, pp. 185–196.
- [Pineda et al., 2010] Pineda, A., Zheng, S.J., van Loon, J.J.A., Pieterse, C.M.J. and Dicke, M., “Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes,” *Trends in Plant Science*, Vol. 15, No. 9, September 2010, pp. 507–514.

- [Ponappa and Miller, 1996] Ponappa, T. and Miller, A.R., "Polyamines in normal and auxin-induced strawberry fruit development, *Physiologia Plantarum*, Vol. 98, No. 3, November 1996, pp. 447–454.
- [Prihastuti et al., 2009] Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D., "Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand," *Fungal Diversity*, Vol. 39, December 2009, pp. 89–109.
- [Quint and Gray, 2006] Quint, M. and Gray, W.M., "Auxin signaling," *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 9, No. 5, September 2006, pp. 448–453.
- [Renshaw et al., 2002] Renshaw, J.C., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., Wiebe, M.G., Livens, F.R., Collison, D. and Taylor, R.J., "Fungal siderophores: structures, functions and applications," *Mycological Research*, Vol. 106, No. 10, October 2002, pp. 1123–1142.
- [Reineke et al., 2008] Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R. and Basse, C.W., "Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation," *Molecular Plant Pathology*, Vol. 9, No. 3, April 2008, pp. 339–355.
- [Robinson et al., 1998] Robinson, M., Riov, J. and Sharon, A., "Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Collectotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 12, December 1998, pp. 5030–5032.
- [Rodriguez et al., 2009] Rodriguez, R.J., White, Jr.J.F., Arnold, A.E. and Redman, R.S., "Fungal endophytes: diversity and functional roles," *New Phytologist*, Vol. 182, February 2009, pp. 314–330.
- [Saad and Elshahed, 2012] Saad, A.I.M. and Elshahed, A.M., *Plant Tissue Culture Media*, Leva, A. and Rinaldi, L.M.R. eds., October 2012, pp. 29–40, ISBN 978-953-51-0787-3.
- [Santamaría and Bayman, 2005] Santamaría, J. and Bayman, P., "Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, Vol. 50, July 2005, pp. 1–8.

- [Santoro et al., 2014] Santoro, P.H., Cavaguchi, S.A., Alexandre, T.M., Zorzetti, J. and Neves, P.M.O.J., "In vitro sensitivity of antagonistic *Trichoderma atroviride* to herbicides," Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol. 57, No. 2, March/April 2014, pp. 238–243.
- [Saucedo-García et al., 2014] Saucedo-García, A., Anaya, A.L., Espinosa-García, F.J. and González, M.C., "Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, Mexico," Plos One, Vol. 9, No. 6, June 2014, pp. 1–11.
- [Schulz et al., 2002] Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.K. and Krohn, K. "Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites," Mycological Research, Vol. 106, No. 9, September 2002, pp. 996–1004.
- [Schulz and Boyle, 2006] Schulz, B. and Boyle, C., *Microbial root endophyte*, Schulz, B., Boyle, C. and Sieber, T.N. eds., 2006, pp. 1–13, ISBN: 978-3-540-33525-2.
- [Schwyn and Neilands, 1987] Schwyn, B. and Neilands, J.B., "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores," Analytical Biochemistry, Vol. 160, No. 1, January 1987, pp. 47–56.
- [Sedbrook, 2016] Sedbrook, D., "2,4-D: The Most Dangerous Pesticide You've Never Heard Of," Website: <https://www.nrdc.org/stories/24-d-most-dangerous-pesticide-youve-never-heard>, 20 August 2016.
- [Sette et al., 2006] Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F. and Duarte, M.C.T., "Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants," World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 22, No. 11, November 2006, pp. 1185–1195.
- [Shim et al., 2015] Shim, J., Kim, J.W., Shea, P.J. and Oh, B.T., "IAA production by *Bacillus* sp. JH 2-2 promotes Indian mustard growth in the presence of hexavalent chromium," Journal of Basic Microbiology, Vol. 55, No. 5, May 2015, pp. 652–658.

- [Sinclair and Dhingra, 1995] Sinclair, J.B. and Dhingra, O.D., *Basic Plant Pathology Methods*, CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1995, pp. 355, ISBN 9780873716383.
- [Siri-udom et al., 2015] Siri-udom, S., Suwannarach, N. and Lumyong, S., "Existence of *Muscodor vitigenus*, *M. equiseti* and *M. heveae* sp. nov. in leaves of the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.), and their biocontrol potential," *Annals of Microbiology*, Vol. 66, No. 1, July 2015, pp. 437–448.
- [Stierle et al., 1994] Stierle, A., Stierle, D., Strobel, G., Bignami, G. and Gothaus, P., *Taxane anticancer agents*, Georg, G.I., Chen, T.T., Ojima, I. and Vyas, D.M. eds., 1994, pp. 81–97. ISBN13: 9780841230736.
- [Stone et al., 2004] Stone, J.K., Polishook, J.D. and White, J.R.J., *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*, Mueller, G., Bills, G.F. and Foster, M.S. eds., 2004, pp. 241–270, ISBN: 978-0-12-509551-8.
- [Strobel et al., 2001] Strobel, G.A., Dirkse, E., Sears, J. and Markworth, C., "Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus," *Microbiology*, Vol. 147, No. 11, November 2001, pp. 2943–2950.
- [Strobel et al., 2004] Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J., "Natural products from endophytic microorganisms," *Journal of Natural Products*, Vol. 67, No. 2, February 2004, pp. 257–268.
- [Spaepen and Vanderleyden, 2011] Spaepen, S. and Vanderleyden, J., "Auxin and plant-microbe interactions," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 3, No. 4, April 2011, pp. 1–13.
- [Spaepen et al., 2007] Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R., "Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling," *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 31, No. 4, July 2007, pp. 425–448.
- [Sunitha et al., 2013] Sunitha, V.H., Devi, D.N. and Srinivas, C., "Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants," *World Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 9, No.1, 2013, pp. 1–9.

- [Sunitha et al., 2012] Sunitha, V.H., Ramesha, A., Savitha, J. and Srinivas, C., "Amylase production by endophytic fungi *Cylindrocephalum* sp. isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe," Brazilian Journal of Microbiology, Vol. 43, No. 3, July/September 2012, pp. 1213–1221.
- [Suryanarayanan et al., 2009] Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Sasse, F., Jansen, R. and Murali, T.S., "Fungal endophytes and bioprospecting," Fungal Biology Reviews, Vol. 23, No. 1-2, February 2009, pp. 9–19.
- [Suwannarach, 2013] Suwannarach, N., *Biodiversity and secondary metabolites of endophytic fungi isolated from some medicinal plants in northern Thailand*, 2013, pp. 1–270.
- [Suwannarach et al., 2012] Suwannarach, N., Bussaban, B., Nuangmak, W., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Lumyong, S., "Diversity of endophytic fungi associated with *Cinnamomum bejolghota* (Lauraceae) in northern Thailand," Chiang Mai Journal of Science, Vol. 39, No. 3, July 2012, pp. 389–398.
- [Suwannarach et al., 2015] Suwannarach, N., Kumla, J., Matsui, K. and Lumyong, S., "Characterization and efficacy of *Muscodor cinnamomi* in promoting plant growth and controlling *Rhizoctonia* root rot in tomatoes," Biological Control, Vol. 90, May 2015, pp. 25–33.
- [Swarts and Dixon, 2009] Swarts, N.D. and Dixon, K.W., "Terrestrial orchid conservation in the age of extinction," Annals of Botany, Vol. 104, 2009, pp. 543–556.
- [Syamsia et al., 2015] Syamsia, Kuswinanti, T., Syam'un, E. and Masniawati, A., "The potency of endophytic fungal isolates collected from local aromatic rice as indole-3-acetic acid (IAA) producer," Procedia Food Science, Vol. 3, December 2015, pp. 96–103.
- [Tamura et al., 2013] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0," Molecular Biology and Evolution, Vol. 30, No. 12, October 2013, pp. 2725–2729.
- [Tsavkelova et al., 2007] Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Botina, S.G. and Netrusov, A.I., "Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin," Microbiological Research, Vol. 162, No.1, January 2007, pp. 69–76.

- [Tsavkelova et al., 2012] Tsavkelova, E., Oeser, B., Oren-young, L., Israeli, M., Sasson, Y., Tudzynski, B. and Sharon, A., "Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species," *Fungal Genetics and Biology*, Vol. 49, No. 1, January 2012, pp. 48–57.
- [Varma et al., 1999] Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütchorn, B. and Franken, P., "*Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 6, June 1999, pp. 2741–2744.
- [Vega et al., 2008] Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Peterson, S.W. and Rehner, S.A., "Fungal endophytes in green coffee seeds," *Mycosystema*, Vol. 27, No. 1, January 2008, pp. 75–84.
- [Vega et al., 2010] Vega, F.E., Simpkins, A., Aime, M.C., Posada, F., Peterson, S.W., Rehner, S.A., Infante, F., Castillo, A. and Arnold, A.E., "Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico," *Fungal ecology*, Vol. 3, August 2010, pp. 122–138.
- [Vega-Hernández et al., 2002] Vega-Hernández, M.C., León-Barrios, M. and Pérez-Galdona, R., "Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*," *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 34, No. 5, May 2002, pp. 665–668.
- [Verma et al., 2009] Verma, V.C., Kharmar, R.N. and Strobel, G.A., "Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi," *Natural Product Communications*, Vol. 4, No. 11, November 2009, pp. 1511–1532.
- [Vysotskaya et al., 2001] Vysotskaya, L.B., Timergalina, L.N., Simonyan, M.V., Veselov, S.Yu. and Kudoyarova, G.R., "Growth rate, IAA and cytokinin content of wheat seedling after root pruning," *Plant Growth Regulation*, Vol. 33, No. 1, January 2001, pp. 51–57.

- [Waller et al., 2005] Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K.H., "The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102, No. 38, September 2005, pp. 13386–13391.
- [Wang et al., 1993] Wang, Y., Brown, H.N., Crowley, D.E. and Szaniszió P.J., "Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber," *Plant, Cell and Environment*, Vol. 16, No. 5, June 1993, pp. 579–585.
- [Waqas et al., 2012] Waqas, M., Khan, A.L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H. and Lee, I.J., "Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress," *Molecules*, Vol. 17, September 2012, pp. 10754–10773.
- [Waqas et al., 2014] Waqas, M., Khan, A.L. and Lee, I.J., "Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth," *Journal of Plant Interactions*, Vol. 9, No. 1, April 2014, pp. 478–487.
- [Weaver, 1972] Weaver, R.J., *Plant Growth Substances in Agriculture*, University of California Press, 1972.
- [White et al., 1990] White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J.W., *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. eds., January 1990, pp. 315–322.
- [Worldatlas, 2016] Worldatlas, "Top coffee producing countries," Website: <http://www.worldatlas.com/articles/top-coffee-producing-countries.html>, 6 July 2016.
- [Wright et al., 2009] Wright, M., Cross, R., Dixon, K., Huynh, T., Lawrie, A., Nesbitt, L., Prichard A., Swarts, N. and Thomson, R., "Propagation and reintroduction of *Caladenia*," *Australian Journal of Botany*, Vol. 57, July 2009, pp. 373–387.

- [Xie et al., 2010] Xie, L., Zhang, J.Z., Wan, Y. and HU, D. "Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China," Journal of Zhejiang University Science B, Vol. 11, No. 1, January 2010, pp. 61–70.
- [Yurekli et al., 2003] Yurekli, F., Geckil, H. and Topcuoglu, F., "The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus *Lentinussajor-caju* under different culture conditions," Mycological Research, Vol. 107, No. 3, March 2003, pp. 305–309.
- [Zhao et al., 2010] Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X. and Gao, X., *Current research, Technology and Education Topics in Applied Microbial Biotechnology*, Méndez-Vilas, A. ed., 2010, pp. 567–576.
- [Zhao et al., 2015] Zhao, L., Xu, Y., Lai, X.H., Shan, C., Deng, Z. and Ji, Y., "Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters," Brazilian Journal of Microbiology, Vol. 46, No. 4, October–December 2015, pp. 977–989.
- [Zhou et al., 2014] Zhou, Z., Zhang, C., Zhou, W., Li, W., Chu, L., Yan, J. and Li, H., "Diversity and plant growth-promoting ability of endophytic fungi from the five flower plant species collected from Yunnan, Southwest China," Journal of Plant Interactions, Vol. 9, No. 1, January 2014, pp. 585–591.



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose broth (PDB, Conda/Pronadisa®)

PDB	26.5	g
น้ำกลั่น	1,000	ml
pH	6.9±0.2	

ฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato dextrose agar (PDA)

PDB	26.5	g
วุ้น (agar)	18.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml
pH	6.9±0.2	

ฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Chrome azurol S-modified Gaus No.1 (CAS-MGs-1) agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (You et al., 2004)

3.1 การเตรียม MGs-1 agar

น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	20.0	g
Potassium nitrate (KNO ₃)	1.0	g
Sodium chloride (NaCl)	0.1	g

Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.5	g
Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	0.1	g
วุ้น (agar)	20.0	g
น้ำ Deionized	900	ml
pH	7.0±0.2	

ละลายสารในน้ำ DI ปริมาตร 900 ml ปรับ pH เท่ากับ 7.0 และเติมวุ้น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2 การเตรียม Chrome azurol S-modified Gaus No.1 (CAS-MGs-1) agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

เท CAS solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) ลงใน 900 มิลลิลิตร MGs-1 agar (อุณหภูมิสารขณะผสมประมาณ 60°C) ผสมให้เข้ากัน เทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 ml ได้อาหาร CAS-MGs-1 agar สีฟ้าเพื่อทดสอบการผลิต siderophore

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. การเตรียมสารละลาย Chrome azurol S (CAS solution) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Chrome azurol S (CAS)	302.5 mg
Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA)	364.5 mg

1. ละลาย 302.5 mg CAS ในน้ำ DI ปริมาตร 250 ml
2. ละลาย 0.008 g FeCl_3 ในสารละลาย 50 ml 10 mM HCl (ปีเปต 40 μl 70% HCl ลงน้ำ DI ปริมาตร 49.96 ml) ได้สารละลาย 50 ml 1 mM FeCl_3 ใน 10 mM HCl
3. เทสารละลายข้อ 2 ผสมกับ ข้อ 1
4. ละลาย 364.5 mg Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) ในน้ำ DI ปริมาตร 200 ml
5. เทสารละลายข้อ 4 อย่างช้าๆลงสารละลายข้อ 3 ผสมให้เข้ากัน ได้สารละลาย CAS ปริมาตร 500 ml เก็บไว้ในขวดสีชา

เมื่อต้องการใช้ให้นำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. การเตรียมสารตรวจสอบชนิด siderophore

1. Ferric perchlorate solution ปริมาตร 250 ml; 5 mM FeCl_3 in 0.1 M HClO_4

ปีเปต 70% HClO_4 ปริมาตร 2.16 มิลลิลิตร ลงน้ำ DI (Deionized water) ปริมาตร 247.84 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง FeCl_3 ปริมาณ 0.2029 กรัม ละลายในสารละลาย HClO_4 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

2. 0.5 M Hydrochloric acid (HCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ปิเปต 37% HCl ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร ลงน้ำ DI ปริมาตร 95.8 มิลลิลิตร

3. Nitrite molybdate reagent

นำสาร sodium nitrite (NaNO_2) ปริมาณ 10 กรัม และ sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ปริมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำ DI และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. 1 M NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง NaOH ปริมาณ 4 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียม Salkowski's reagent; 1 ml 0.5 M FeCl_3 ใน 50 ml 35% HClO_4

ตวง 250 มิลลิลิตร 70% HClO_4 เทช้าๆลงน้ำ DI ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ได้สารละลาย 35% HClO_4 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย 0.8 กรัม FeCl_3 ในน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และผสม 35% HClO_4 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

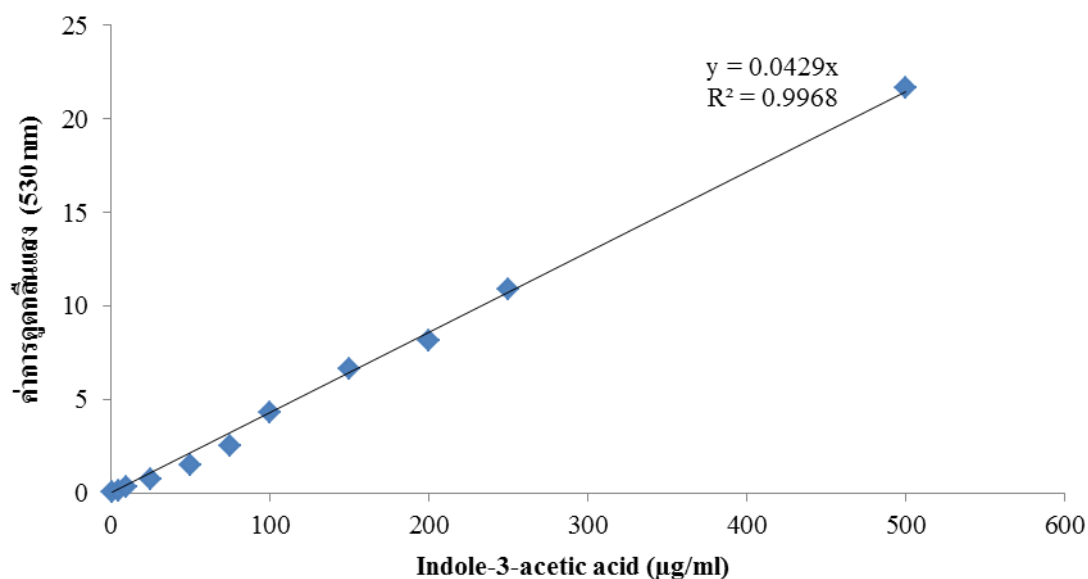
กราฟมาตรฐาน

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลาย indole-3-acetic acid (IAA) โดย colorimetric assay

เตรียมสารละลาย IAA ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ปิเปตสารละลายในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 13×100 mm ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นเติม 2 ml Salkowski's reagent ผสมให้เข้ากันโดย vortex mixer บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เขียนกราฟมาตรฐาน IAA ระหว่างปริมาณความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm

ตาราง ค1 ปริมาณ IAA และค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 nm โดย colorimetric assay

indole-3-acetic acid ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง (530 nm)
1	0.030
5	0.110
10	0.290
25	0.740
50	1.470
75	2.520
100	4.320
150	6.620
200	8.150
250	10.890
500	21.670



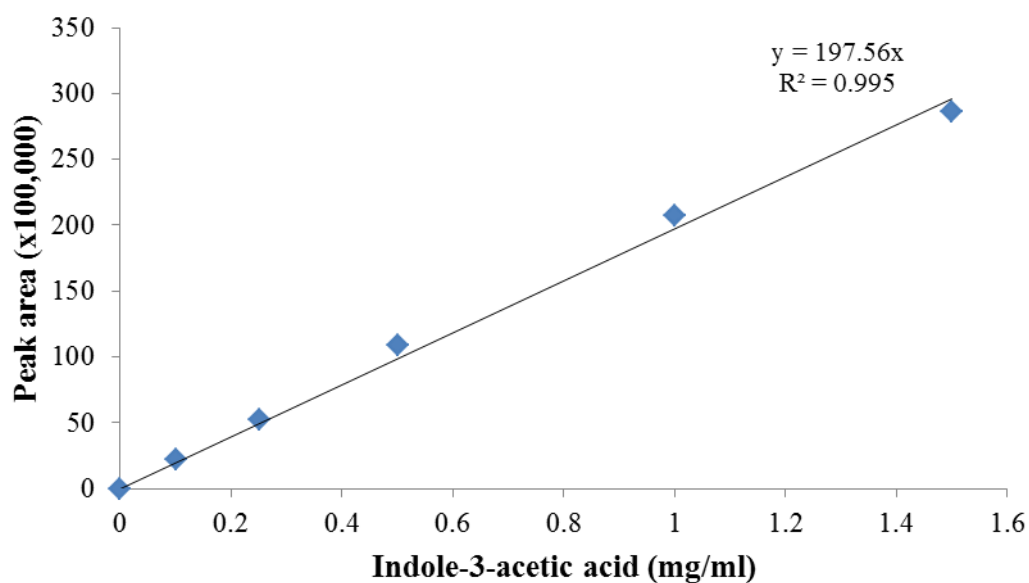
ภาพ ค1 กราฟมาตรฐานสารละลาย indole-3-acetic acid

2. กราฟมาตรฐานสารละลาย Indole-3-acetic acid (IAA) โดย HPLC

ซึ่งสารมาตรฐาน IAA ละลายในเมทิลแอลกอฮอล์ ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 1.5 mg/ml ตรวจวัดปริมาณ IAA โดยเครื่อง HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐาน IAA จาก peak area ที่ได้ในแต่ละ ความเข้มข้นของสารละลาย IAA

ตาราง ค2 ปริมาณ IAA และพื้นที่ใต้พีคโดย HPLC

Indole-3-acetic acid (mg/ml)	พื้นที่ใต้พีค IAA ($\times 100,000$)
0	0.0000
0.1	22.0103
0.25	52.5369
0.5	108.4978
1	207.3947
1.5	285.8727



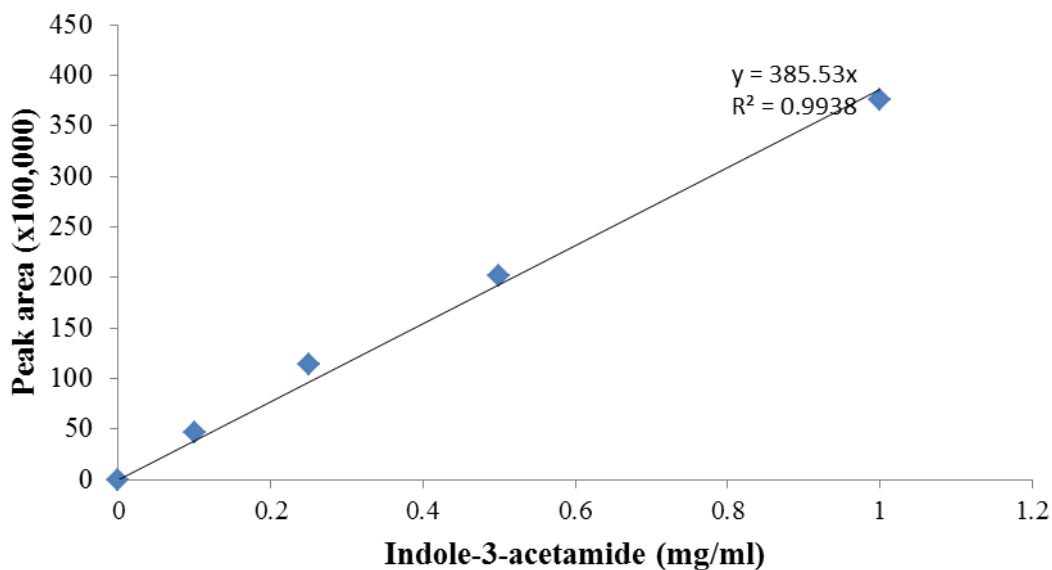
ภาพ ค2 กราฟมาตรฐานสารละลาย indole-3-acetic acid

3. กราฟมาตรฐานสารละลาย Indole-3-acetamide (IAM)

ซึ่งสารมาตรฐาน IAM ละลายในเมทิลแอลกอฮอล์ ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ตรวจวัดปริมาณ IAM โดยเครื่อง HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐาน IAM จาก peak area ที่ได้ในแต่ละ ความเข้มข้นของสารละลาย IAM

ตาราง ค3 ปริมาณ IAM และพื้นที่ใต้พีคโดย HPLC

indole-3-acetamide (mg/ml)	พื้นที่ใต้พีค IAM (×100,000)
0	0.0000
0.1	46.6346
0.25	113.8204
0.5	201.9931
1	375.7483



ภาพ ค3 กราฟมาตรฐานสารละลาย indole-3-acetamide

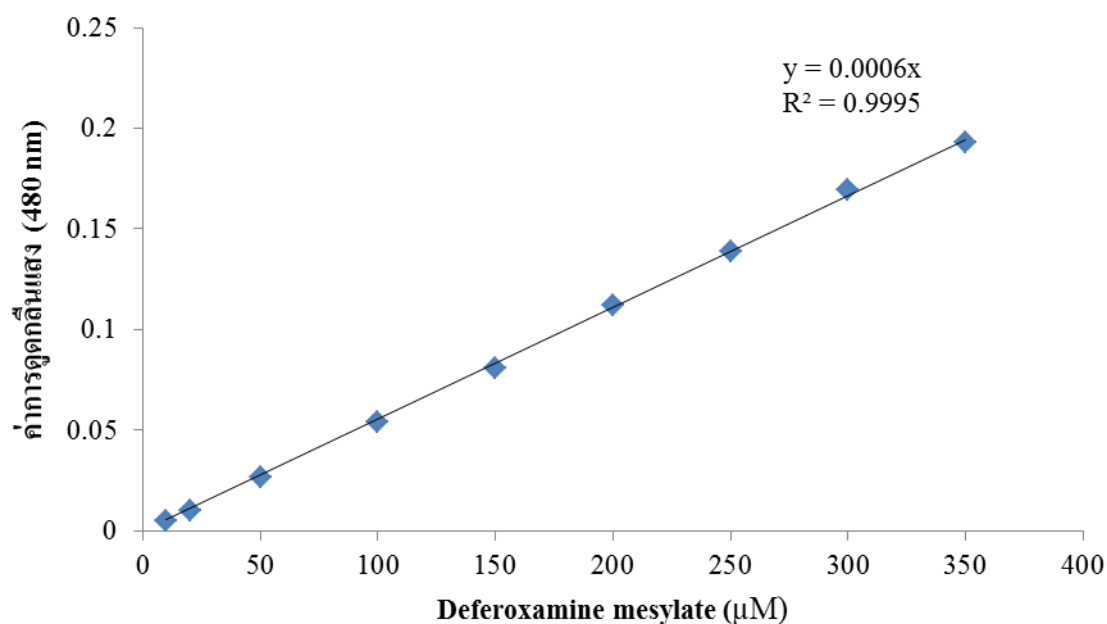
4. การเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลาย deferoxamine mesylate

เตรียมสารละลาย deferoxamine mesylate ที่ความเข้มข้น 0, 10, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 และ 350 μM ปิเปตสารละลายในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 5 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 13×100 mm ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นเติม 2.5 ml สารละลาย ferric perchlorate ผสมให้เข้ากัน โดย vortex mixer บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 480 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เขียนกราฟมาตรฐาน deferoxamine mesylate ระหว่างปริมาณความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 nm

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Deferoxamine mesylate (μM)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ (480 nm)
10	0.005
20	0.010
50	0.027
100	0.054
150	0.081
200	0.112
250	0.139
300	0.169
350	0.193

ตาราง ค4 ปริมาณ deferoxamine mesylate และค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 nm



ภาพ ค4 กราฟมาตรฐานสารละลาย deferoxamine mesylate

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายทศพล นำปนัส

วัน เดือน ปี เกิด 14 กรกฎาคม 2532

ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา 2554 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (วท.บ. จุลชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับสอง

ปีการศึกษา 2550 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนจักรคำคณาทร จังหวัดลำพูน

ปีการศึกษา 2547 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนจักรคำคณาทร จังหวัดลำพูน

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุนเมธีวิจัยอาวุโสของ ศ.ดร. สายสมร ลำยอง (RTA5580007) ปี 2555-2557

การนำเสนอและผลงานทางวิชาการ

นำเสนอผลงานวิชาการแบบโปสเตอร์ในงานการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 8 ประจำปี 2559 (วันที่ 30-31 พฤษภาคม 2559) ณ อาคารเรียนรวม มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

นำเสนอผลงาน วิชาการแบบปากเปล่า ในงาน The 10th Young Scientist Seminar: Establishment of International Research Network for Tropical Bioresources and Their Utilization. (16-17 November, 2014) Seminar Park, Yamaguchi, Japan

