

## ศักยภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวดำไร่

## Potential of Endophytic Fungi for Enhancing Growth in Upland Black rice

ธนวันต์ เกตุตา (Thanawan Gateta)\* ดร.วสันต์ สีมาราม (Dr.Wasan Seemakram)\*\*

ดร.โสภณ บุญลือ (Dr.Sophon Boonlue)\*\*\*

## บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 56 ไอโซเลตจากข้าวไร่ 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ การละลายฟอสเฟต การผลิตอินโดลอะซีติก การผลิตแอมโมเนีย และการผลิตไซโตโรพอร์ พบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟต์ 4 ไอโซเลต คือ PBMP16, PBMP28, KKMP34, และ PBMP43 มีความสามารถผลิตสารที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดีที่สุด จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อราเอนโดไฟต์ในข้าวไร่ 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย ในระดับกระถาง พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต PBMP28 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมนำเชื้อรามาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลสามารถระบุชนิดของเชื้อรา *Talaromyces pinophilus* PBMP28

## ABSTRACT

Isolation endophytic fungi were isolated from 2 upland rice species Niew Dam Hmong and Maled Phai total of 56 isolates. All endophytic fungi were determined of plant growth promoting properties including; phosphate solubilization, Indole-3-acetic production, ammonia production and siderophore production. The results showed that the endophytic fungi 4 isolates, PBMP16, PBMP28, KKMP34 and PBMP43 were produced of high plant growth promoter. The efficacy of endophytic fungi in growth promoting on 2 upland rice species, Niew Dam Hmong and Maled Phai in the pot condition. It was found that the endophyte fungi isolate PBMP28 had shown the highest efficacy in growth promoting on both 2 rice species when compared to the control. The endophytic fungi isolate PBMP28 was identified by morphological and molecular methods. Its isolate could identify namely, *Talaromyces pinophilus* PBMP28.

**คำสำคัญ:** เชื้อราเอนโดไฟต์ ข้าวดำไร่ การส่งเสริมการเจริญเติบโต

**Keywords:** Endophytic Fungi, Upland Black rice, Plant Growth Promotion

\*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\*นักวิจัยหลังปริญญาเอก สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\*\*รองศาสตราจารย์ สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## บทนำ

การปลูกข้าวในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนั้น โดยส่วนใหญ่อาศัยน้ำฝนเป็นหลัก ประมาณร้อยละ 90 แต่อาจมีบางพื้นที่ที่สามารถปลูกข้าวได้ในระบบชลประทาน คิดเป็นร้อยละ 10 ของพื้นที่ปลูกทั้งหมด ในบางฤดูปริมาณน้ำฝนที่น้อยทำให้เกิดความแห้งแล้ง เนื่องจากข้าวเป็นพืชที่มีความต้องการน้ำสูง (Price et al., 2002) ทำให้ข้าวไม่เจริญเติบโตที่ดี ส่งผลให้มีผลผลิตลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า ธาตุอาหารที่จำกัดในดิน ความเค็ม และอุณหภูมิที่สูงเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของข้าว ดังนั้นแนวทางการแก้ปัญหาโดยใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา (Arbuscular mycorrhizal fungi; AMF) ซึ่งเป็นเชื้อราดินที่มีความสำคัญต่อพืช โดยอาศัยร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) โดยพืชให้สารอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์แสงเพื่อให้เชื้อรานำไปใช้เพื่อการเจริญ ในขณะที่เชื้อราช่วยดูดซับสารอาหารและน้ำในดินให้กับพืช ทำให้ได้รับธาตุอาหารและน้ำได้เพิ่มขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกข้าวไร่สายพันธุ์พื้นเมืองเนื่องจากมีระบบรากที่ลึก และต้องการน้ำน้อย ทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี (Bernier et al., 2008) ซึ่งข้าวไร่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าข้าวทั่วไป มีสารฟีนอลิกชั้นที่สำคัญ โดยเฉพาะสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำมั่ง และข้าวเมล็ดฝ้าย พบว่ามีการสะสมของปริมาณ anthocyanin และ phenolic compound ในเมล็ดข้าวสูงกว่าข้าวสายพันธุ์ทางการค้า และสายพันธุ์พื้นเมืองอื่นๆ มาก (Kapcum et al., 2016) ดังนั้น จึงทำให้ข้าวไร่สองสายพันธุ์นี้จึงเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจในการใช้จุลินทรีย์ในการปลูกข้าวเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเนื่องจากผลผลิตที่ได้จากการปลูกด้วยระบบอินทรีย์จะมีคุณค่าทางโภชนาการที่สูงและมีความนิยมของผู้บริโภคที่สูงโดยจุลินทรีย์กลุ่มที่นิยมนำมาปลูกร่วมกับพืชจะเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดีในสภาพเครียดจากการขาดธาตุ ความแห้งแล้ง ความเค็ม และโรคพืช เช่น เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสเป็นต้น โดยเฉพาะเชื้อราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) ซึ่งเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำอันตรายพืช และไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชที่เป็นผู้ให้อาศัย (Souza et al., 2016) เชื้อราเอนโดไฟต์มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการเจริญเติบโตของพืช โดยการเพิ่มการดูดซับธาตุอาหารให้กับพืช การละลายฟอสเฟต การผลิตแอมโมเนีย และเพิ่มความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชในพืชอาศัยได้ (Jan et al., 2019) เช่น เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium corylophilum*, *P. cyclopium*, (Waqas et al., 2012) เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นเรื่องการส่งเสริมการเจริญข้าวไร่ 2 สายพันธุ์ ข้าวเหนียวดำมั่ง และข้าวเมล็ดฝ้าย โดยการปลูกร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ซึ่งการนำเชื้อราเอนโดไฟต์มาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์พื้นเมือง จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ และไม่เคยมีรายงานในข้าว 2 ชนิดนี้มาก่อน ซึ่งผลที่ได้จะนำไปสู่การทดลองในสภาพไร่ และผลิตเป็นกล้าเชื้อสำหรับการนำไปใช้เพาะปลูกร่วมกับข้าวพันธุ์พื้นเมืองนี้ในอนาคต

## วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย ในระดับกระถาง ภายใต้สภาพเรือนทดลอง

## วิธีการวิจัย

### 1. การคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์และตรวจสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

#### 1.1. การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากต้นข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย

ทำการเก็บตัวอย่างข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย จากแปลงเกษตรกรจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดเพชรบูรณ์ แยกเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยนำชิ้นส่วนของต้นข้าวจากส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า และฆ่าเชื้อที่ผิวตามวิธีของ (นาถอนงค์, 2555) โดยแช่ชิ้นพืชในสารละลาย EtOH เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย 2% NaOCl นาน 3 นาที และสารละลาย EtOH เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชวางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จากนั้นแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์และเก็บ และเก็บไว้ศึกษาต่อไป

#### 1.2. การตรวจสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

##### ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ทำการตรวจสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก โดยใช้อาหารเหลว Pikovskaya's broth medium (PVK) ที่มี 5% tricalcium phosphate เป็นองค์ประกอบ (Pikovskaya, 1948) โดยเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวัฏบริเวณส่วนปลายเส้นใยด้วย Cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้นใส่ในอาหารเหลว pikovskaya's ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่จากนั้นทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเส้นใยและส่วนใส ดูดส่วนใสลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Boric acid เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Murphy's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมสารละลาย Ascorbic acid เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI (Deionized water) ปริมาตรสุดท้าย 25 มิลลิลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 820 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

##### ความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติก

การตรวจสอบการผลิตกรดอินโดลอะซีติกของเชื้อราเอนโดไฟต์ ดัดแปลงจากวิธีการของ Chutima and Lumyong. (2012) โดยเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ที่ปราศจาก L-tryptophan และเติม L-tryptophan เป็นสารตั้งต้น แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องบ่มเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกน้ำเลี้ยงเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Salkowski reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 530 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซีติกที่ผลิตได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

##### ความสามารถในการผลิตแอมโมเนีย

ทำการตรวจสอบความสามารถในการผลิตแอมโมเนียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Peptone water โดยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟต์ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร Peptone water ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อราเอนโดไฟต์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ ดูดส่วนใสลงในหลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Nessler's reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 530 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

### การทดสอบความสามารถในการผลิตไซโตโครฟอร

เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน เจาะชิ้นวุ้นบริเวณส่วนปลายเส้นใยด้วย Cork borer ที่มีขนาด 0.5 เซนติเมตร และใช้เข็มเย็บเย็บย้ายชิ้นวุ้นใส่ในอาหาร Chrome Azurol S agar (CAS agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตผลการทดลองทุกวันโดยเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สร้าง Siderophore จะเปลี่ยนสีน้ำเงินของอาหารเป็นสีส้มที่บริเวณรอบๆ เส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟต์

## 2. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์

ทำการจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุล

### 2.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเอนโดไฟต์ทำได้โดยตรวจสอบลักษณะโครงสร้างขนาดใหญ่ ได้แก่ ลักษณะ และการเจริญของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และตรวจสอบโครงสร้างขนาดเล็กภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ลักษณะของสปอร์ Conidia, Phialide และ Vesicle โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture technique) (Raper and Thom, 1949) นำลักษณะของเชื้อราที่ตรวจสอบได้ไปเทียบเคียงกับคู่มือในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราของ Raper and Thom (1949), Raper and Funnell (1965) และ Ramirez (1982)

### 2.2. วิธีชีวโมเลกุล

ทำการสกัดดีเอ็นเอเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชสูงสุด 4 ไอโซเลต จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ด้วยเครื่อง Thermal cycle (GeneQ TC24) โดยปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอมีขั้นตอนดังนี้ Pre-denaturation เป็นขั้นตอนที่ปรับอุณหภูมิสูงขึ้นที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที Denaturation โดยจะใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50-66 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Extension อุณหภูมิที่ 74 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที Final-Extension ที่อุณหภูมิอยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยการลดอุณหภูมิลงเหลือ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ที่ U2Bio (Korea) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GenBank โดยโปรแกรม Blast ([www.ncbi.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nih.gov/blast))

## 3. ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย ในระดับกระถาง ภายใต้สภาพเรือนทดลอง

นำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายๆ ด้าน (multifunctional) ที่ได้จาก การทดลองในข้อที่ 1.2 มาคัดเลือกหาเชื้อราที่มีประสิทธิภาพต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้ายที่ดีที่สุด ในสภาพการทดลองในระดับกระถาง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ซึ่งประกอบด้วย ดำรับการทดลองที่ 1 ไม่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ (ชุดควบคุม) ดำรับการทดลองที่ 2: *Trichoderma citrinoviride* PBMP16, ดำรับการทดลองที่ 3: *Talaromyces pinophilus* PBMP28, ดำรับการทดลองที่ 3: *Aspergillus flavus* KKMP34 และ ดำรับการทดลองที่ 4: *Trichoderma harzianum* PBMP43 กำหนดให้แต่ละดำรับการทดลอง จำนวน 6 ซ้ำ ทำการเพาะต้นกล้าข้าวให้มีอายุกล้าประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นกล้าปลูกในดินที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อบรรจุในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นิ้ว ปลูกทดลองนาน 60 วัน โดยจะทำการตรวจหาค่าเฉลี่ยของความสูงลำต้น จำนวนกอ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี เป็นระยะเวลา 30 ถึง 60 วัน และวิเคราะห์ผลทางสถิติ

## การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลและทดสอบทางสถิติ (statistical analysis) ด้วยโปรแกรม Statistix 8.0 โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ทุกลักษณะที่ศึกษาตามแผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Gomez and Gomez, 1984)

## ผลการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์และตรวจสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

จากการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวไร่สองสายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย จากจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดเพชรบูรณ์ สามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้จำนวน 56 ไอโซเลต จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่ามีจำนวน 10 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต การผลิตกรดอินโดลอะซีติก การผลิตแอมโมเนีย และการผลิตไซโตไคน์สูงสุด (ตารางที่ 1) ซึ่งเชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต PBMP43 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตสูงสุดที่ 2325.83 มิลลิกรัม/ลิตร ไอโซเลต KKMP34 มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติกได้สูงสุดที่ 314.56 มิลลิกรัม/ลิตรและไอโซเลต PBMP28 มีความสามารถในการผลิตแอมโมเนียได้สูงสุดที่ 76.09 มิลลิกรัม/ลิตร นอกจากนี้พบว่ามีเพียงไอโซเลต PBMP28 และ KKMP34 ที่มีความสามารถผลิตสารไซโตไคน์ได้ (ตารางที่ 1) จากนั้นนำเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต ไปทำการจัดจำแนกชนิดเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิธีทางชีวโมเลกุล

**ตารางที่ 1** คุณสมบัติของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการละลายฟอสเฟต การผลิตกรดอินโดลอะซิติก การผลิตแอมโมเนีย และการผลิตไซโตโครฟอร์แต่ละไฮโซเลตที่แยกมาจากข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย

| Isolates | Phosphate<br>solubilization<br>(mg.l) | IAA<br>production<br>(mg.l) | Ammonia<br>production<br>(mg.l) | Siderophore<br>production |
|----------|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| KKDM04   | 1050.00                               | 118.48                      | 62.56                           | -                         |
| KKDM22   | 1068.96                               | 126.92                      | 35.41                           | -                         |
| PBMP28   | 1082.52                               | 273.29                      | 76.09                           | +                         |
| KKMP20   | 944.17                                | 292.99                      | 41.36                           | -                         |
| KKDM18   | 936.67                                | 117.76                      | 27.97                           | +                         |
| KKDM23   | 1045.67                               | 156.76                      | 10.88                           | +                         |
| KKMP42   | 1020.00                               | 135.48                      | 36.89                           | -                         |
| PBMP16   | 1176.67                               | 307.17                      | 44.27                           | -                         |
| KKMP34   | 1055.83                               | 314.56                      | 45.23                           | +                         |
| PBMP43   | 2325.83                               | 160.84                      | 51.87                           | -                         |

## 2. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยตรวจสอบลักษณะโครงสร้างขนาดใหญ่ ได้แก่ ลักษณะ และการเจริญของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) และตรวจสอบโครงสร้างขนาดเล็กภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ลักษณะของ conidia, phialide, hyphae, septate/ non-septate of

mycelium, vesicle, spore โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture technique) (Raper and Thom, 1949) นำลักษณะของเชื้อราที่ตรวจสอบได้ไปเทียบกับคู่มือในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราของ Raper and Thom (1949), Raper and Funnell (1965) และ Ramirez (1982) พบว่า สามารถระบุสกุลของเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ดังนี้ *Trichoderma*, *Penicillium* และ *Aspergillus* การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ด้วยวิธีชีวโมเลกุล เป็นการยืนยันการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำเชื้อราเอนโดไฟต์มาทำการสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณส่วนของยีนบริเวณ ITS rDNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยอาศัยไพรเมอร์ชนิด ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') และ ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATCG – 3') พบว่าสามารถเพิ่มขยายยีนบริเวณดังกล่าวได้โดยมีขนาดประมาณ 500 คู่เบส และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS rDNA แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลในโปรแกรม NCBI (National Center for Biotechnology Information) ในรูปแบบของ FASTA (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จากลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถจัดจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด ดังต่อไปนี้ เชื้อราไอโซ PBMP16, PBMP28, KKMP34, และ PBMP43 จัดจำแนกเป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิด *Trichoderma citrinoviride* PBMP16, *Talaromyces pinophilus* PBMP28, *Aspergillus flavus* KKMP34 และ *Trichoderma harzianum* PBMP43 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ระบุสายพันธุ์เชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีโมเลกุลจากข้าวดำไร่ 2 สายพันธุ์

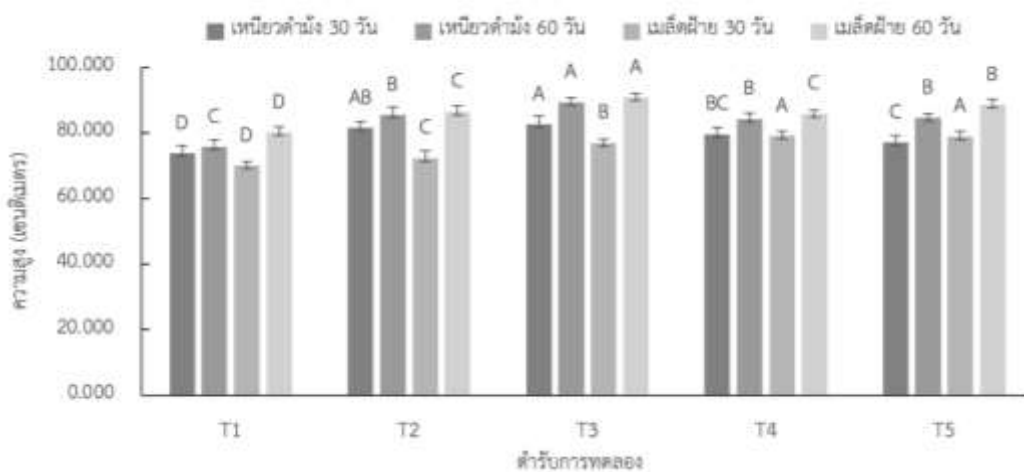
| Fungal isolates | Identification         |                                  | GenBank accession no. | Similarity (%) |
|-----------------|------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------|
|                 | Morphology             | Molecular**                      |                       |                |
| PBMP16          | <i>Trichoderma</i> sp. | <i>Trichoderma citrinoviride</i> | HQ596983.1            | 99.86          |
| PBMP28          | <i>Penicillium</i> sp. | <i>Talaromyces pinophilus</i>    | CP017345.1            | 99.85          |
| KKMP34          | <i>Aspergillus</i> sp. | <i>Aspergillus flavus</i>        | KX067887.1            | 100            |
| PBMP43          | <i>Trichoderma</i> sp. | <i>Trichoderma harzianum</i>     | HQ596983.1            | 99.12          |

\*\*/ Identification by comparsion of Internal Transcribed Spacer (ITS1-ITS4) regions in GenBank using BLAST

### 3. ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำม่วง และเมล็ดฝ้าย ในระดับกระถาง ภายใต้สภาพเรือนทดลอง

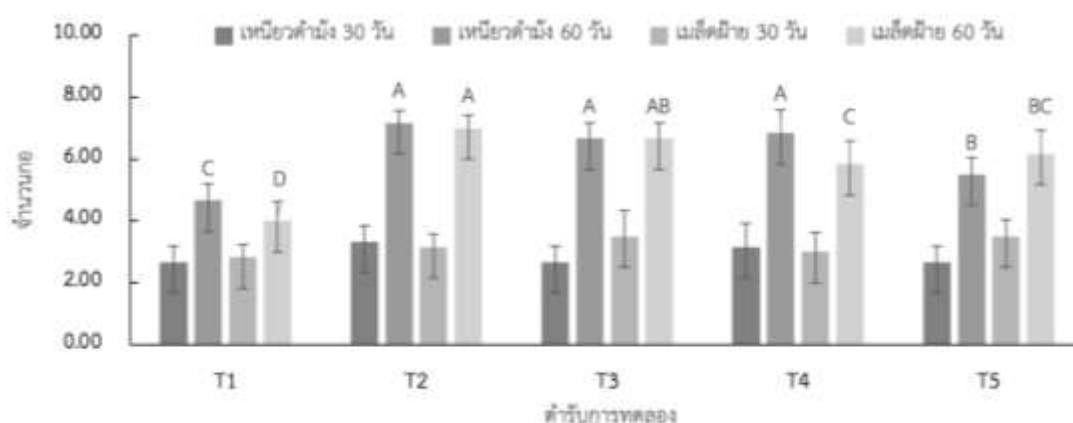
จากการตรวจสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. citrinoviride* PBMP16, *T. pinophilus* PBMP28, *A. flavus* KKMP34 และ *T. harzianum* PBMP43 ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว 2 สายพันธุ์ พบว่าในทุกตำหรับการทดลองที่ปลูกข้าวร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต ในด้านความสูงในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในระยะเวลาปลูก 30 วัน และ 60 วัน ซึ่ง ในตำหรับการทดลองที่ 3 ที่มีการปลูกข้าวเหนียวดำม่วง และเมล็ดฝ้ายร่วมกับเชื้อรา *T. pinophilus* PBMP28 เป็นระยะเวลา 60 วัน ต้นข้าวมีความสูงสูงสุดที่ 89.42 และ 90.83 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) ซึ่งแตกต่างกับข้าวไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )





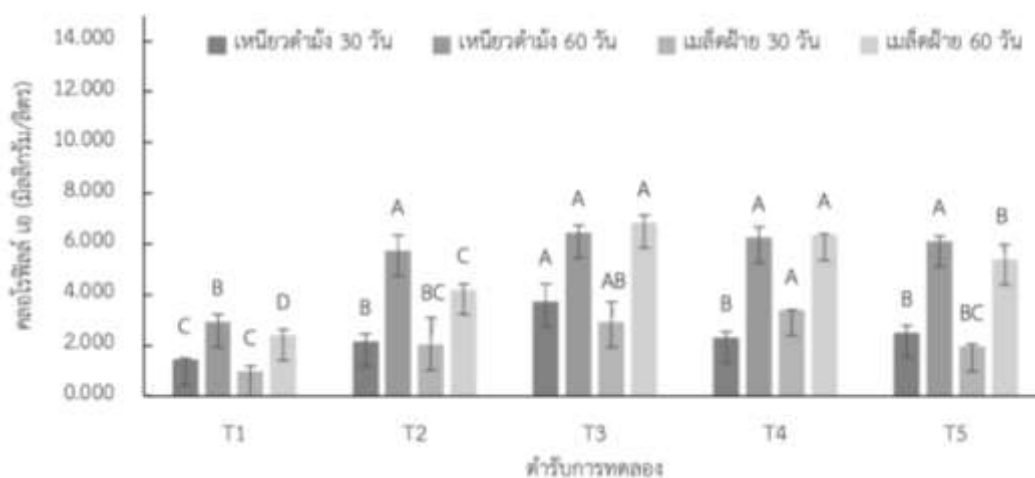
ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวดำไร่ 2 สายพันธุ์; เหนียวดำมั่ง และ เมล็ดฝ้าย ในด้านความสูงในระยะเวลาปลูก 30 วัน และ 60 วัน T1; ไม่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ (ชุดควบคุม), T2; *T. citrinoviride* PBMP16, T3; *T. pinophilus* PBMP28, T3; *A. flavus* KKMP34 และ T4; *T. harzianum* PBMP43 ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

นอกจากนี้ข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ปลูกด้วยเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไส้เลต ที่ระยะ 30 วัน พบว่าจำนวนกอไม่มี ความแตกต่างกับข้าวไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์ซึ่งเมื่อข้าวมีอายุ 60 วัน นับจากวันปลูกในการทดลองที่ปลูก ข้าวร่วมกับเชื้อรา *T. citrinoviride* PBMP16 (T2) มีจำนวนกอเฉลี่ยสูงสุดในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ (เหนียวดำมั่ง 7.167, เมล็ดฝ้าย 7.0) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับค่าการทดลองที่ไม่มีการปลูก ร่วมกับเชื้อรา (T1) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวดำไร่ 2 สายพันธุ์; เหนียวดำมั่ง และ เมล็ดฝ้าย ในด้านจำนวนกอในระยะเวลาปลูก 30 วัน และ 60 วัน T1; ไม่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ (ชุดควบคุม), T2; *T. citrinoviride* PBMP16, T3; *T. pinophilus* PBMP28, T3; *A. flavus* KKMP34 และ T4; *T. harzianum* PBMP43 ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

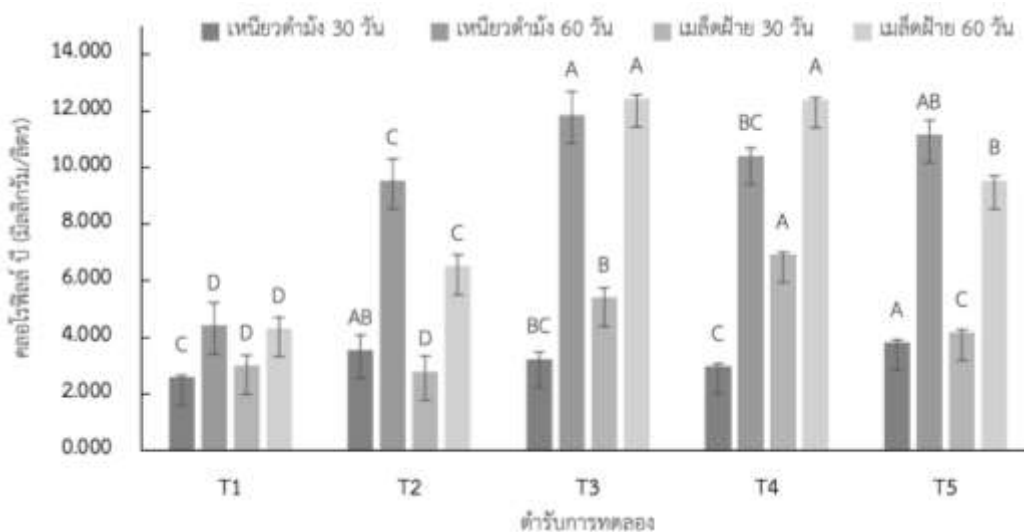
จากการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อายุ 30 และ 60 วัน พบว่าในทุกตำหรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ร่วมกับข้าวเหนียวดำมั่ง (T2, T3, T4 และ T5) ที่อายุ 30 และ 60 วัน มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าข้าวไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์ (T1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งในตำหรับการทดลองที่ปลูกเชื้อรา *T. pinophilus* PBMP28 ร่วมกับข้าวเหนียวดำมั่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดที่ 3.74 มิลลิกรัม/ลิตร ในส่วนของข้าวไร่สายพันธุ์เมล็ดฝ้ายพบว่าที่อายุ 30 วัน ในตำหรับการทดลองที่ปลูกเชื้อรา *A. flavus* KKMP34 ร่วมกับข้าวเมล็ดฝ้าย (T4) มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดที่ 3.38 มิลลิกรัม/ลิตร และที่ระยะ 60 วัน ในตำหรับการทดลองที่ปลูกเชื้อรา *T. pinophilus* PBMP28 ร่วมกับข้าวเมล็ดฝ้าย (T2) มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดที่ 6.84 มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวดำไร่ 2 สายพันธุ์; เหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย ในด้านคลอโรฟิลล์เอนในระยะเวลาปลูก 30 วัน และ 60 วัน T1; ไม่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ (ชุดควบคุม), T2; *T. citrinoviride* PBMP16, T3; *T. pinophilus* PBMP28, T3; *A. flavus* KKMP34 และ T4; *T. harzianum* PBMP43 ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

และในส่วนของปริมาณคลอโรฟิลล์บีในข้าวเหนียวดำมั่งพบว่า ที่อายุ 30 วัน ในตำหรับการทดลองที่ปลูกเชื้อรา *T. harzianum* PBMP43 ร่วมกับข้าวเหนียวดำมั่ง (T5) มีปริมาณคลอโรฟิลล์บีสูงสุดที่ 3.82 มิลลิกรัม/ลิตร และที่อายุ 60 วัน พบว่าในทุกตำหรับการทดลองที่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ (T2, T3, T4 และ T5) มีปริมาณคลอโรฟิลล์บีสูงกว่าชุดควบคุม (T1) มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งในตำหรับการทดลองที่ปลูกเชื้อรา *T. pinophilus* PBMP28 ร่วมกับข้าวเหนียวดำมั่ง (T2) มีปริมาณคลอโรฟิลล์บีสูงสุดที่ 11.85 มิลลิกรัม/ลิตร ในส่วนของข้าวไร่สายพันธุ์เมล็ดฝ้าย พบว่าที่อายุ 30 และ 60 วัน ในตำหรับการทดลองที่ปลูกเชื้อรา *A. flavus* KKMP34 ร่วมกับข้าวเมล็ดฝ้าย (T4) มีปริมาณคลอโรฟิลล์บีสูงสุดที่ 6.93 และ 12.40 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4)





ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวดำไร่ 2 สายพันธุ์; เหนียวดำมั่ง และ เมล็ดฝ้าย ในด้านคลอโรฟิลล์ปี ในระยะเวลาปลูก 30 วัน และ 60 วัน T1; ไม่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ (ชุดควบคุม), T2; *T. citrinoviride* PBMP16, T3; *T. pinophilus* PBMP28, T3; *A. flavus* KKMP34 และ T4; *T. harzianum* PBMP43 ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกจากข้าวไร่ 2 สายพันธุ์ คือ เหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย จากการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าสามารถจัดจำแนกชนิดเชื้อราได้ดังนี้ *Trichoderma citrinoviride* PBMP16, *Talaromyces pinophilus* PBMP28, *Aspergillus flavus* KKMP34 และ *Trichoderma harzianum* PBMP43 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ชนิดมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต การผลิตอินโดลอะซีติก การผลิตแอมโมเนีย และการผลิตไซโตไคน์ได้ในปริมาณที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Motaal, F.A. et al., (2020) ซึ่งทำการทดสอบคุณสมบัติของ *A. flavus* พบว่า มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA และยังสามารถในการละลายฟอสเฟตได้เช่นกัน รวมถึงการศึกษาของ Bader. A.N. et al., (2020) ที่รายงานว่า *T. harzianum* มีความสามารถผลิต IAA และละลายฟอสเฟตได้ และยังสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชได้อีกด้วย Patel, D. et al., (2021) รายงานว่า *T. pinophilus* มีความสามารถในการผลิตไซโตไคน์ได้ และผลิตสูงสุดได้ที่ระยะเวลา 8 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย ในระดับกระถาง ภายใต้สภาพเรือนทดลอง โดยตรวจสอบการเจริญเติบโตเมื่อข้าวมีอายุ 30 และ 60 วัน ซึ่งพบว่าความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ปลูกร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์มีความสูงที่สูงกว่าข้าวที่ไม่ปลูกร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์ ในส่วนของจำนวนกอของข้าวทั้งสองสายพันธุ์จะเห็นว่าข้าวที่ปลูกร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์จะมีจำนวนที่มากกว่าชุดควบคุมที่ระยะ 60 วัน หลังจากการปลูก และปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี พบว่า ข้าวที่ปลูกร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต *T. pinophilus* PBMP28 ช่วยทำให้ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีมากที่สุดและมากกว่าข้าวที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟต์

จากการศึกษาพบว่าเชื้อรา *T. pinophilus* PBMP28 มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และจากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวเหนียวดำมั่ง และเมล็ดฝ้าย ในระดับกระถาง ภายใต้สภาพเรือนทดลองสูงสุด ดังนั้นเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดนี้ จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรเพื่อการส่งเสริมการเพาะปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองนี้ แก่เกษตรกรต่อไปในอนาคต

### เอกสารอ้างอิง

- นาถอนงค์ ยอดสิงห์. การคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรไทย และผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชและเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์บางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2555.
- Bader, A. N., Salerno, G. L., Covacevich, F. and Consolo, V. F. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Journal of King Saud University – Science. 2020; 32: 867–873.
- Bernier, J., G.N. Atlin, R. Serraj, A. Kumar, and D. Spaner. Breeding upland rice for drought resistance. Journal of Science Food Agriculture. 2008; 88: 927–939.
- Chutima, R., Lumyong, S. Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. Symbiosis. 2012; <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-012-0158-2>
- Gomez, K.A. and Gomez, A.A. “Statistical procedures for agricultural research” New York: John Wiley and Sons. 1984.
- Jan, F.G., Hamayun, M., Hussain, A., Jan, G., Iqbal, A., Khan, A. and Lee, I.J. An endophytic isolate of the fungus *Yarrowia lipolytica* produces metabolites that ameliorate the negative impact of salt stress on the physiology of maize. BMC Microbiology. 2019; 19(3).
- Kapcum, N., J. Uriyapongson, I. Alli, and S. Phimphilai. Anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant activities in colored corn cob and colored rice bran. International Food Research Journal. 2016; 23(6): 2347-2356.
- Motaal, F.A., Kamel, N., Zayat, S.E. and Ellail, M.A. Early blight suppression and plant growth promotion potential of the endophyte *Aspergillus flavus* in tomato plant. Annals of Agricultural Sciences. 2020; 65: 117–123.
- Patel, D., Patel, A., Patel, M. and Goswami, D. *Talaromyces pinophilus* strain M13: a portrayal of novel groundbreaking fungal strain for phytointensification. Environmental Science and Pollution Research. 2021; 28: 8758–8769.
- Ramirez, C. Manual and atlas of the *Penicillia*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. 1982.
- Raper, K.B. and Fennell, D.I. The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1965.
- Raper, K.B. and Thom, C. A manual of the *Penicillia*. USA: The Williams and Wilkins company. 1949.
- Souza, I.F., T.H. Napoleão, K.X. de Sena, P.M. Paiva, J.M. de Araújo. and L.C. Coelho. Endophytic microorganisms in leaves of *Moringa oleifera* collected in three localities at Pernambuco State, Northeastern Brazil. British Microbiology Research Journal. 2016; 13(5): 1-7.
- Waqas, M., A.L. Khan, M. Kamran, M. Hamayun, S.M. Kang, Y.H. Kim and I.J. Lee. Endophytic fungi produce gibberellins and indole acetic acid and promotes host-plant growth during Stress. Molecules. 2012; 17(9): 10754-10773.