

ความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียจากห้อมใบใหญ่ (*Strobilanthes cusia*)
และห้อมใบเล็ก (*Strobilanthes* sp.) โดยการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์
Bacterial Diversity in Large-Leaf Indigo (*Strobilanthes cusia*) and Small-Leaf Indigo
(*Strobilanthes* sp.) Revealed by Metagenomic Analysis

ณัฐพร จันทร์ฉาย* ปิยวรรณ แสงทอง และอัญศญา บุญประจวบ

Nuttaporn Chanchay*, Piyawan Sangthong and Ansaya Boonpajaub

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ แพร่ 54140

Department Agro-industrial Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Phare, Thailand 54140

*Corresponding author: nuttapornchanchay@gmail.com

*ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0009-9323-8299>

Received: December 27, 2024

Revised: December 12, 2025

Accepted: January 27, 2026

Abstract

Metagenomics is an effective tool for analyzing the composition and diversity of microbial communities in the environment without the need for cultivation, making it suitable for studying plant-associated microorganisms. *Strobilanthes* spp. (indigo plant) is an economically and scientifically important medicinal plant in northern Thailand. Its leaves are used to produce natural indigo dye and contain bioactive compounds with potential pharmaceutical applications. Understanding the microbial communities associated with *Strobilanthes* spp. is essential for elucidating their roles in promoting plant growth and synthesizing secondary metabolites. This study aimed to investigate the bacterial community diversity in leaves of *S. cusia* (large-leaf) and *Strobilanthes* sp. (small-leaf) collected from five sites in Phrae province using 16S rRNA gene sequencing on the illumina platform. The bacterial communities were predominantly affiliated with the phylum Proteobacteria, particularly the class Gammaproteobacteria and the order Pseudomonadales, including *Pseudomonas* spp. and unclassified bacteria. These taxa are known to contribute to plant growth promotion and the biosynthesis of bioactive compounds. The findings provide insight into the microbial diversity associated with *S. cusia*, offering potential applications in the pharmaceutical, textile, and agricultural industries.

Keywords: *Strobilanthes cusia*, *Strobilanthes* sp., DNA purity, metagenomics, genetic diversity

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์องค์ประกอบและความหลากหลายของชุมชนจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยง ทำให้เหมาะสมสำหรับการศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพร ห้อม (*Strobilanthes* spp.) ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของภาคเหนือของประเทศไทย ใบของห้อมถูกนำมาใช้ผลิตสีย้อมครามธรรมชาติและมีรายงานว่ามีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพทางการแพทย์ การศึกษาชุมชนจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับห้อมจึงมีความสำคัญต่อการทำความเข้าใจบทบาทของจุลินทรีย์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียจากใบของห้อมใบใหญ่ (*Strobilanthes cusia*) และห้อมใบเล็ก (*Strobilanthes* sp.) ที่เก็บจาก 5 พื้นที่ในจังหวัดแพร่ ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene sequencing บนแพลตฟอร์ม Illumina ผลการศึกษาพบว่าชุมชนแบคทีเรียส่วนใหญ่จัดอยู่ในไฟลัม Proteobacteria โดยเฉพาะคลาส Gammaproteobacteria และอันดับ Pseudomonadales ซึ่งกลุ่มหลักที่พบ ได้แก่ Pseudomonas และแบคทีเรียที่ยังไม่ถูกจำแนกสายพันธุ์ (unclassified bacteria) ที่มีรายงานว่ามียบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและการผลิตสารเมตาโบไลต์สำคัญ ผลการศึกษานี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับองค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับห้อม และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อยอดในอุตสาหกรรม การแพทย์ สิ่งทอ และเกษตรกรรม ได้อีกในอนาคต

คำสำคัญ: ห้อมใบใหญ่ ห้อมใบเล็ก ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ เมตาจีโนมิกส์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์

บทนำ

ห้อมใบใหญ่ (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) และห้อมใบเล็ก (*Strobilanthes* sp.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและวิทยาศาสตร์สูงในหลายภูมิภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่จังหวัดแพร่ซึ่งเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญ (Chanchay *et al.*, 2021) ใบของห้อมถูกนำมาใช้ในการผลิตสีย้อมครามธรรมชาติ และยังมีการรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิด เช่น isocoumarin strobilanthes A ที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ และอินโดลอัลคาลอยด์กลุ่ม indigodoles A–C ที่แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Wei *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017) ความสามารถในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิที่มีคุณค่าเหล่านี้ มักมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (endophytic microorganisms) ซึ่งอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อโรค (Ulrich *et al.*, 2008) จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยตรง หรือมีส่วนร่วมในการปรับเปลี่ยนสารที่พืชผลิตขึ้น (Walker *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2016) ดังนั้น การทำความเข้าใจองค์ประกอบของชุมชนจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับห้อมจึงเป็นกุญแจสำคัญในการไขกลไกการผลิตสารสำคัญ และการค้นหาศักยภาพเชิงประยุกต์ใหม่ ๆ

การศึกษาลักษณะความหลากหลายของจุลินทรีย์ในปัจจุบันอาศัยแนวทางเมตาจีโนมิกส์ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์สารพันธุกรรมโดยตรงจากสิ่งแวดล้อมโดยไม่พึ่งพาการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถเปิดเผยองค์ประกอบและความหลากหลายของชุมชนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้อย่างครอบคลุม (Rondon, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการหาลำดับยีน 16S rRNA ที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ชุมชนของเชื้อแบคทีเรีย (Klindworth *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่มีอยู่ก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่มุ่งเน้น

การศึกษาจุลินทรีย์ที่แยกได้จากส่วนรากหรือไรโซสเฟียร์เป็นหลัก (López-López *et al.*, 2010) ยังคงขาดการศึกษาที่ชัดเจนเกี่ยวกับองค์ประกอบและความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ภายในส่วนใบ ของห้อมทั้งสองชนิดที่ปลูกในจังหวัดแพร่ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญ ข้อมูลนี้มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการเป็นฐานข้อมูลทางนิเวศวิทยา และชี้ให้เห็นถึงกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารสำคัญที่สามารถต่อยอดสู่การใช้งานเชิงอุตสาหกรรมในอนาคต

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาองค์ประกอบและความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ภายในใบห้อม ทั้งชนิด *S. cusia* และ *Strobilanthes* sp. ที่เก็บจากพื้นที่ปลูกในจังหวัดแพร่ โดยใช้เทคนิค 16S rRNA gene sequencing ทั้งนี้เพื่อสร้างฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่จะเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการคัดเลือก และค้นพบจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจและการแพทย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมพืชห้อม

ทำการเก็บห้อมใบใหญ่สายพันธุ์ *Strobilanthes cusia* และห้อมใบเล็กสายพันธุ์ *Strobilanthes* sp. จากพื้นที่ 5 แหล่ง รวมทั้งสิ้น 7 ตัวอย่าง จาก 5 แหล่งในจังหวัดแพร่ ได้แก่ ห้อมใบใหญ่บ้านน้ำจ้อม (รหัส A) ห้อมใบเล็กบ้านน้ำจ้อม (รหัส B) ห้อมใบใหญ่บ้านนาแคม (รหัส C) ห้อมใบใหญ่บ้านนาควา (รหัส D) ห้อมใบใหญ่บ้านแม่ลาว (รหัส E) ห้อมใบใหญ่บ้านนาตอง (รหัส F) และห้อมใบเล็กบ้านนาตอง (รหัส G) ตัวอย่างถูกเก็บรวบรวมจากแต่ละแหล่งในปริมาณ 1 กิโลกรัมต่อแหล่ง โดยทำการเก็บในช่วงเช้า ด้วยวิธีการเก็บที่สะอาดเพื่อป้องกันการปนเปื้อน และทำการล้างฆ่าเชื้อโดยน้ำเกลือ 0.85% (aseptic technique) แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และจากนั้นทำการบดใบห้อมให้ละเอียด

ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นจึงทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากเนื้อเยื่อใบ และวิเคราะห์ความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค metagenomic sequencing ผ่านการหาลำดับยีน 16S rRNA เพื่อมุ่งเน้นศึกษาชุมชนจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ภายในใบห้อมโดยเฉพาะ

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดและการหาลำดับดีเอ็นเอด้วยชุดแยก PowerSoil DNA (MoBioLaboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) คัด DNA จีโนมจากตัวอย่างใบห้อมที่ทำการบดเรียบร้อยแล้วอย่างละ 0.25 กรัม โดยยึดตามคู่มือของบริษัท ข้อมูลทั้งหมดถูกสร้างขึ้นโดยการหาลำดับเมตาจีโนม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ได้ ได้ทำการส่งตรวจที่ Next Generation Sequencing (NGS) service from Gibthai Co., Ltd. 3N Holding House, 44/6Sutthisamvinitchai Road, Huaykwang, Samsaennok, Bangkok 10310 THAILAND

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอหลังการสกัด

การสกัดและการหาลำดับดีเอ็นเอด้วยชุดแยก PowerSoil DNA (MoBioLaboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านบนไมโครเพลท รุ่น SynergyTH multimode microplate reader (BioTek)

การวิเคราะห์จีโนมจุลินทรีย์ด้วยเมตาจีโนมิกส์

การวิเคราะห์จีโนมจุลินทรีย์ด้วยเมตาจีโนมิกส์จะใช้ดีเอ็นเอแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายในการระบุตำแหน่งอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย จากนั้นอ่านข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค high-throughput sequencing ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะผ่านการตรวจสอบคุณภาพ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ F-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละทรีตเมนต์โดยใช้ The Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS version 28

ผลการวิจัย

ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอหลังการสกัด

ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอหลังการสกัดของพืชให้สีครามทั้ง 7 ตัวอย่าง ได้แก่ บ้านน้ำจ้อม

ใบใหญ่ (รหัส A) บ้านน้ำจ้อมใบเล็ก (รหัส B) บ้านนาแคม (รหัส C) บ้านนาคูหา (รหัส D) บ้านแม่ลัว (รหัส E) บ้านนาตองใบใหญ่ (รหัส F) และบ้านนาตองใบเล็ก (รหัส G) แสดงตาม Table 1 เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติด้วยการทดสอบ F-test และ LSD ($p < 0.05$) พบว่าค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอในตัวอย่าง A และ B สูงกว่าตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ โดยตัวอย่าง A และ B มีค่าเฉลี่ย 1.849 และ 1.824 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงดีเอ็นเอคุณภาพดีและไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีน ในขณะที่ตัวอย่าง D และ G มีค่าเฉลี่ยสูงกว่า 2.2 ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ค่าทั้งหมดอยู่ในช่วงที่สามารถนำไปใช้ในการหาลำดับเมตาจีโนมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Table 1 DNA concentration and purity with statistical comparison (F-test, LSD 0.05)

Sample	A260	A280	A260/280	Concentration (ng/ μ l)
A	0.289 $\pm$ 0.407	0.033 $\pm$ 0.006 ^a	1.849 $\pm$ 0.015 ^a	61.206 $\pm$ 12.484 ^a
B	0.057 $\pm$ 0.012	0.031 $\pm$ 0.006 ^a	1.824 $\pm$ 0.005 ^a	57.552 $\pm$ 12.653 ^{ab}
C	0.053 $\pm$ 0.003	0.024 $\pm$ 0.005 ^{ab}	2.171 $\pm$ 0.052 ^{bc}	53.787 $\pm$ 2.984 ^{bc}
D	0.032 $\pm$ 0.018	0.014 $\pm$ 0.008 ^{ab}	2.243 $\pm$ 0.165 ^{cd}	31.899 $\pm$ 18.232 ^e
E	0.057 $\pm$ 0.004	0.029 $\pm$ 0.002 ^b	2.008 $\pm$ 0.021 ^{ab}	57.852 $\pm$ 4.333 ^{ab}
F	0.049 $\pm$ 0.002	0.022 $\pm$ 0.002 ^b	2.169 $\pm$ 0.022 ^{bc}	48.857 $\pm$ 2.448 ^{cd}
G	0.036 $\pm$ 0.005	0.014 $\pm$ 0.002 ^b	2.425 $\pm$ 0.089 ^d	35.994 $\pm$ 13.720 ^{de}

*Means followed by different letters in the same vertical were significantly different at $p < 0.05$ by LSD

An A260/280 ratio between 1.8 and 2.0 indicates good-quality DNA. If the ratio is higher than 2.0, it may suggest slight RNA contamination, which does not affect subsequent metagenomic analysis.

ผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชให้สีครามแสดงให้เห็นว่า ค่าความบริสุทธิ์ (อัตราส่วน A260/280) ของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.82–2.42 (Table 1) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล โดยพบว่าตัวอย่างห้อมใบใหญ่จากบ้านน้ำจ้อม (รหัส A) และห้อมใบเล็กจากบ้านน้ำจ้อม (รหัส B) มีค่าความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 1.824–1.849 ซึ่งถือว่ามีความบริสุทธิ์สูง

และไม่พบการปนเปื้อนของโปรตีนหรือสารประกอบอื่น (ค่า A260/280 ที่เหมาะสมคือ 1.65–1.85) เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้การทดสอบ LSD พบว่าค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอในตัวอย่าง A และ B สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งแสดงถึงคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีเยี่ยม นอกจากนี้ตัวอย่าง A และ B ยังมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเฉลี่ยสูงถึง 61.206 และ 57.552 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

ในขณะที่ตัวอย่างอื่น ๆ มีค่า A260/280 มากกว่า 1.85 โดยเฉพาะตัวอย่าง D และ G ที่มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่ม A และ B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ว่าอาจมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอในปริมาณที่สูงกว่าตัวอย่าง A และ B

ผลการวิเคราะห์จีโนมจุลินทรีย์ด้วยเมตาจีโนมิกส์

การวิเคราะห์องค์ประกอบอนุกรมวิธาน (taxonomic composition) ของชุมชนแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับพืช *Strobilanthes* ทั้งสองชนิด ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene metagenomics แสดงให้เห็นถึงรูปแบบการครอบงำที่ชัดเจนในระดับไฟลัม (Phylum) โดยพบว่า Proteobacteria เป็นไฟลัมที่มีความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์เฉลี่ย (mean relative abundance) สูงที่สุดในทุกตัวอย่าง โดยมีสัดส่วนอยู่ในช่วง 45.20–71.24% ซึ่งบ่งชี้ถึงบทบาทสำคัญของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในระบบนิเวศของพืชเจ้าบ้าน ตามมาด้วยไฟลัมสำคัญอื่น ๆ คือ Actinobacteriota และ Firmicutes (Figure A) ในระดับชั้น (Class) พบว่า Gammaproteobacteria เป็นชั้นที่ครอบงำภายในไฟลัม Proteobacteria (สัดส่วน 35–65%) และแสดงความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างตัวอย่างห่อใบใหญ่และห่อใบเล็ก ($p < 0.05$) ซึ่งสะท้อนถึงอิทธิพลของสายพันธุ์พืชเจ้าบ้าน host-specificity) ต่อการคัดเลือก

องค์ประกอบของชุมชนจุลินทรีย์ที่ผิวใบ (phyllosphere) ความโดดเด่นของชั้น Gammaproteobacteria นั้นสอดคล้องกับการพบ Pseudomonadales ในระดับลำดับ (Order) และ Pseudomonadaceae ในระดับวงศ์ (Family) ครอบงำมากที่สุด (22–50% และ 19–43% ตามลำดับ) การครอบงำของวงศ์ Pseudomonadaceae บ่งชี้ว่าชุมชนแบคทีเรียอาจมีศักยภาพในการเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) หรือทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol agents) นอกจากนี้ ยังพบ Burkholderiales (3–10%) และ Sphingobacteriales (1–10%) เป็นลำดับสำคัญตามมา ในระดับสกุล (Genus) พบว่า unclassified_Pseudomonas มีความอุดมสมบูรณ์เฉลี่ยสูงสุด (30.19%) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสายพันธุ์ที่พบ ยังไม่ได้ถูกบรรจุในฐานข้อมูลอ้างอิงอย่างสมบูรณ์ (หรือเป็นสายพันธุ์ใหม่) ตามด้วย unclassified_Bacteria (24.84%) และ unclassified_Stenotrophomonas (3.53%) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ตัวอย่างห่อใบเล็กจากบ้านน้ำจ้อม (B) และบ้านนาทอง (G) พบสัดส่วนของสกุล Pseudomonas สูงกว่าตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งเน้นย้ำถึงความแปรผันขององค์ประกอบจุลินทรีย์ที่ถูกขับเคลื่อนด้วยปัจจัยเฉพาะพื้นที่ (local environmental factors)

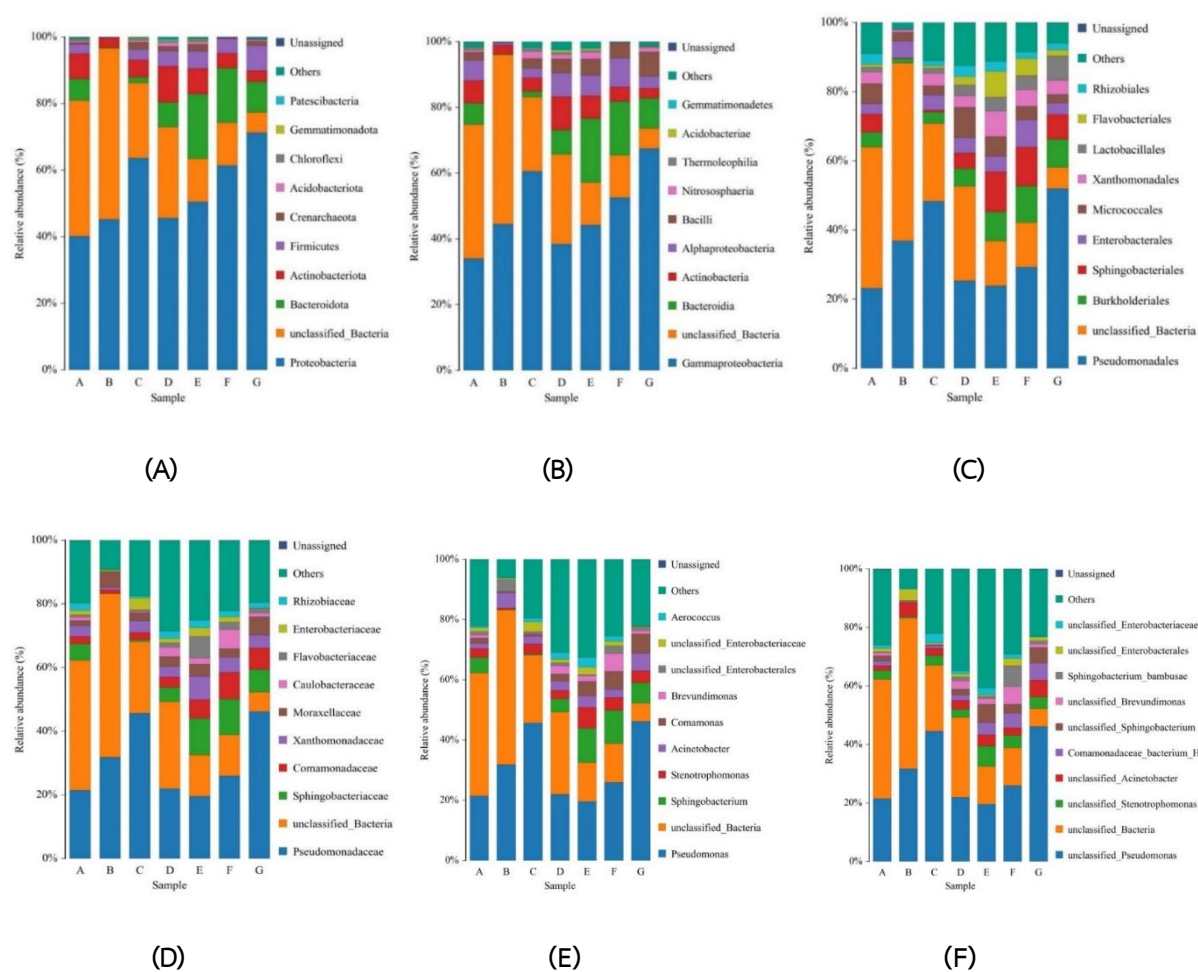


Figure 1 Relative abundance of microbial taxa at phylum, class, order, family, and genus levels

Colored bars represent the relative abundance of each taxon in samples A–G; Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$, LSD test).

พบว่าในระดับลำดับ (order) Pseudomonadales เป็นกลุ่มที่มีความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์สูงสุดในทุกตัวอย่าง (สัดส่วน 22–50%) และความโดดเด่นนี้ยังคงสอดคล้องอย่างต่อเนื่องในระดับวงศ์ (family) โดยพบว่า Pseudomonadaceae มีการครอบงำสูงสุด (สัดส่วน 19–43%) ซึ่งเน้นย้ำถึงบทบาทของกลุ่มจุลินทรีย์ในสกุล *Pseudomonas* ที่มีความสามารถในการเป็น PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ในเชิงชีวโมเลกุล จุลชีพกลุ่มนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้หลายกลไก เช่น การผลิตไฟโตฮอร์โมน Indole-3-acetic acid (IAA) การสร้างซิเดอโรฟอรัส

(siderophores) เพื่อแย่งชิงธาตุเหล็กจากเชื้อก่อโรค และการผลิตสารต้านจุลชีพ (antibiotics) เพื่อควบคุมสมดุลของชุมชนจุลินทรีย์อื่น วงศ์สำคัญอื่น ๆ ที่พบรองลงมา ได้แก่ unclassified_Bacteria (5–38%) ซึ่งการมีสัดส่วนสูงนี้สะท้อนถึงความไม่สมบูรณ์ของฐานข้อมูลอ้างอิง (database incompleteness) และอาจบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของสายพันธุ์เฉพาะถิ่น (endemic หรือ novel taxa) ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากที่เคยถูกรายงาน นอกจากนี้ ยังพบ Sphingobacteriaceae (5–10%) ซึ่งเป็นที่รู้จักในบทบาทการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีความซับซ้อนสูง (complex organic matter) เช่น โพลีเมอร์

และสารประกอบอะโรมาติก Xanthomonadaceae (3–5%) ที่แสดงถึงความยืดหยุ่นทางเมตาบอลิซึม (metabolic flexibility) และสามารถอยู่ร่วมกับพืชในฐานะกลุ่มที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic residents) และ Comamonadaceae (2–8%) ซึ่งมีความสำคัญ

ในวัฏจักรไนโตรเจน และความสามารถในการสลายสารประกอบอินทรีย์ที่หลากหลาย ตามลำดับการรวมกันของวงศ์เหล่านี้ แสดงถึงชุมชนจุลชีพที่มีความสามารถในการสนับสนุนการเจริญเติบโตและสุขภาพของพืชอย่างครบวงจร

Table 2 Taxonomic distribution in all sample of species of microorganisms most commonly found in samples A, B, C, D, E, F and G here metagenomics

	A	B*	C	D	E	F	G*	$\bar{x}$
Unclassified_Pseudomonas	21.44	31.7	44.5	21.97	19.59	25.97	46.15	30.19
Unclassified_Bacteria	40.77	51.41	22.56	27.28	12.92	12.85	6.10	24.84
Unclassified_Stenotrophomonas	3.08	0.48	3.32	2.74	6.93	4.23	3.96	3.53
Unclassified_Acinetobacter	1.57	5.04	2.51	3.04	3.82	2.66	5.76	3.47
Comamonadaceae_bacterium_HBT44_5	1.64	0.40	0.77	1.86	4.27	5.00	5.80	2.82
Unclassified_Sphingobacterium	1.76	0.06	0.30	2.02	6.26	3.08	5.40	2.70
Unclassified_Brevundimonas	1.07	0.01	0.28	2.81	1.86	5.95	1.11	1.87
Sphingobacterium_bambusae	0.34	0.00	0.03	1.32	0.90	7.13	1.15	1.55

This table shows the distribution of the most abundant microbial genera found in indigo leaf samples from each location.

The genera *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* are noteworthy, as they have been reported to play roles in the synthesis of indigo and bioactive compounds, which are associated with natural color formation and antimicrobial activity in indigo-producing plants.

ผลการสรุปองค์ประกอบจุลชีพในระดับอนุกรมวิธาน (order) พบว่าความชุกสัมพันธ์ของ Pseudomonadales 34.14% และความชุกสัมพันธ์ของ Burkholderiales 24.84% เป็นกลุ่มเด่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอินทรีย์และการต้านจุลชีพ ในขณะที่กลุ่ม *Lactobacillales* 3.89% และ *Flavobacteriales*

3.04% มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง (Table 3) โดยรวมผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า ชุมชนจุลชีพเอนโดไฟต์ในใบห้อมมีความหลากหลายสูง และมีองค์ประกอบที่แตกต่างตามพื้นที่ปลูก ซึ่งอาจได้รับอิทธิพลจากความอุดมสมบูรณ์ของดินและสภาพแวดล้อมเฉพาะพื้นที่

Table 3 Summary of the taxonomy results found and their uses

Taxonomic (order)	Relative abundance (%)	Type	Utilization
Rhizobiales	2.10	Antagonistic microorganisms	Agricultural industry
Flavobacteriales	3.04	Flavobacterial	Food and cosmetic industry
Lactobacillales	3.89	Probiotic	Medical industry /Food and cosmetic industry
Xanthomonadales	4.57	Pathogenic disease	Agricultural industry / Research
Micrococcales	4.61	Pathogenic disease	Agricultural industry / Research
Enterobacterales	5.77	Pathogenic disease	Agricultural industry / Research
Sphingobacteriales	5.88	Pathogenic microorganism in human	Medical industry /Food industry / Research
Burkholderiales	24.84	Pathogenic microorganism in human	Medical industry
Pseudomonadales	34.14	Antagonistic microorganisms	Agricultural industry

This table summarizes the dominant microbial groups at the order level found in indigo leaf samples, along with their types and relevant applications. It highlights the potential of these microorganisms in various industries—for instance, members of the order Pseudomonadales exhibit antifungal properties and can be utilized in agricultural industries, while Lactobacillales show probiotic potential and can be applied in the food and pharmaceutical sectors.

การวิเคราะห์องค์ประกอบจุลชีพในระดับสกุล (Genus) และสปีชีส์ (species) เผยให้เห็นการครอบงำที่ชัดเจนของกลุ่มที่มีความสำคัญต่อพืชและสิ่งแวดล้อม โดยพบ unclassified_Pseudomonas มีสัดส่วนเฉลี่ยสูงที่สุด (30.19%) ตามมาด้วย unclassified_Bacteria (24.84%) และ unclassified_Stenotrophomonas (3.53%) unclassified_Acinetobacter (3.47%) และ Comamonadaceae_bacterium_HBT44_5

(2.82%) ในระดับสกุล Pseudomonas มีความอุดมสมบูรณ์สูงที่สุดในทุกตัวอย่าง (20–43%) ซึ่งความโดดเด่นนี้ชี้ให้เห็นถึงความยืดหยุ่นทางสรีรวิทยา (physiological flexibility) ของสกุลนี้ในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของพืช และเน้นย้ำถึงบทบาทหลักในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) Stenotrophomonas (1–7%) และ Acinetobacter (2–5%) ซึ่งเป็นสกุลที่มีชื่อเสียงในความสามารถในการ

ย่อยสลายสารแปลกปลอม (Xenobiotics) และของเสียที่ติดต่อยาที่ได้จากน้ำมันและมลพิษอื่น ๆ อีกมากมาย จึงมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การพบกลุ่มที่จัดเป็น โปรไบโอติกสำหรับพืช (plant probiotics) เช่น unclassified_Sphingobacterium, unclassified_Brevundimonas และพบในสปีชีส์ Sphingobacterium_bambusae (ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของ Sphingobacterium ที่มีสัดส่วน 1–15%) นั้นบ่งชี้ถึงศักยภาพของชุมชนจุลินทรีย์ในการช่วยย่อยสลายชีวมวลและโพลีแซ็กคาไรด์ในพืช และการมีสัดส่วนสูงของ unclassified_Bacteria สะท้อนถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยังไม่ถูกจัดจำแนกอย่างสมบูรณ์ ซึ่งเป็นโอกาสในการค้นพบจุลินทรีย์เอนโดไฟต์สายพันธุ์ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับหอม

วิจารณ์ผลการวิจัย

การประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอผ่านค่าอัตราส่วน A260/A280 ซึ่งส่วนใหญ่มีค่ามากกว่า 1.8 สะท้อนถึงความบริสุทธิ์ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล แสดงให้เห็นว่ากระบวนการสกัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพและข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือในการใช้วิเคราะห์ชุมชนจุลินทรีย์ต่อไป แม้ตัวอย่างบางส่วนมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพข้อมูลโดยรวม ซึ่งสะท้อนถึงความสอดคล้องของวิธีสกัดกับชนิดตัวอย่างพืชใบหอม ผลการศึกษาชุมชนแบคทีเรียในใบหอมจาก 5 พื้นที่ พบความแตกต่างอย่างเด่นชัดโดยมีความสัมพันธ์สอดคล้องกับคุณภาพดิน โดยเฉพาะพื้นที่บ้านน้ำจ้อมและบ้านนาตองที่มีปริมาณอินทรีย์วัตถุสูง ส่งผลให้มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่ม Gammaproteobacteria มากกว่าพื้นที่อื่น การทดสอบทางสถิติ (F-test และ LSD) ยืนยันความแตกต่างดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งทำให้ผลที่ได้มีน้ำหนักเชิงหลักฐานรองรับว่าปัจจัยสภาพแวดล้อมมีผลต่อโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในใบหอมจริง องค์ประกอบหลักของชุมชนจุลินทรีย์คือไฟลัม

Proteobacteria ซึ่งพบมากที่สุดในตัวอย่างเป็นบ้านน้ำจ้อมและบ้านน้ำจ้อมใบเล็ก โดยคิดเป็นสัดส่วนสูงถึง 40–70% ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับบทบาททางนิเวศวิทยาของแบคทีเรียแกรมลบที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน การสังเคราะห์สารอินทรีย์ และการคงอยู่ของจุลินทรีย์ในพืชที่ขึ้นในพื้นที่ชื้นและอุดมด้วยอินทรีย์วัตถุ

ขณะที่กลุ่ม Gammaproteobacteria พบมากในพื้นที่บ้านนาตองใบเล็ก สะท้อนถึงศักยภาพของพื้นที่ดังกล่าวในการสนับสนุนจุลินทรีย์ที่มีเส้นทางเมตาบอลิซึมหลากหลาย ในระดับสกุล พบว่า *Pseudomonas* เป็นจุลินทรีย์เอนโดไฟต์หลักที่ตรวจพบอย่างต่อเนื่องในทุกพื้นที่ที่สอดคล้องกับงานของ Meijuan *et al.* (2018) ที่รายงานว่ากลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารสีคราม (indigoid compounds) รวมทั้งมีบทบาทต่อคุณสมบัติด้านชีวโมเลกุลในพืชสกุลหอม การศึกษาพบว่าสกุลนี้กระจายตัวสูงสุดในพื้นที่บ้านนาตองใบเล็กและบ้านนาแคม ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าพื้นที่ดังกล่าวมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการตั้งถิ่นของจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่ม นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Chanchay *et al.* (2022) ที่พบ เอนโดไฟต์ในกลุ่มใกล้เคียงกัน เช่น *Pseudoxanthomonas spadix* ที่มีบทบาทสนับสนุนการเจริญเติบโตของต้นหอมและยับยั้งเชื้อราก่อโรค ซึ่งช่วยเสริมความเข้าใจว่าชุมชนจุลินทรีย์ในใบหอมไม่เพียงมีความหลากหลาย แต่ยังสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสุขภาพของพืชและกระบวนการสังเคราะห์สารสำคัญ เช่น tryptanthrin และ indigo

โดยรวมแล้ว ผลการวิจัยนี้ชี้ว่าความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่มีผลต่อองค์ประกอบจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ในใบหอมอย่างชัดเจน และองค์ประกอบที่โดดเด่น เช่น Proteobacteria และสกุล *Pseudomonas* มีบทบาทสำคัญต่อชีววิทยาของพืชและการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับคุณค่าทางเศรษฐกิจของหอม ผลลัพธ์ดังกล่าวจึงเป็นหลักฐานที่เสริมความเข้าใจด้านนิเวศวิทยาจุลินทรีย์ของหอมในเชิงระบบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นรายงานฉบับแรกที่วิเคราะห์ความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในใบห้อม (*Strobilanthes cusia* และ *Strobilanthes* spp.) จากพื้นที่จังหวัดแพร่ โดยใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์เชิง (metagenomic sequencing) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนถึงการครอบงำของแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria โดยเฉพาะสกุล *Pseudomonas* ซึ่งมีสัดส่วนสูงสุดและมีความสำคัญทางนิเวศวิทยาอย่างยิ่ง การครอบงำนี้สะท้อนถึงบทบาทสำคัญของจุลินทรีย์เหล่านี้ต่อการดำรงชีพของพืชห้อม ผ่านกลไกเชิงชีวโมเลกุลในการปกป้องและส่งเสริมการเจริญเติบโต (PGPM) ยิ่งไปกว่านั้น การค้นพบนี้ชี้ให้เห็นว่า *Pseudomonas* และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องมีศักยภาพสูงในการเป็นจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPM) และ/หรือในการมีส่วนร่วมในกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เช่น สารอินดิโกและไตรพแทนทริน ข้อมูลที่ได้จึงเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการศึกษาต่อยอดเชิงหน้าที่ (functional genomics) เพื่อพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ให้เป็นชีวภัณฑ์ (bioproducts) หรือแหล่งผลิตสารธรรมชาติเชิงพาณิชย์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาคความหลากหลายและลักษณะการทำงานของชุมชนจุลินทรีย์จากห้อม ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนวิจัยจาก โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (อพ.สธ.-มจ.) ปี 2568 และศูนย์ความเป็นเลิศชีวิตนวัตกรรมเกษตรตามอัตลักษณ์ท้องถิ่นดิน-น้ำ-ป่าอย่างยั่งยืน ห้องปฏิบัติการชีวนวัตกรรมสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Chanchay, N., A. Boonprajaub and R. Dachprom. 2022. Effect of endophytic bacteria on growth of indigo plants. **VRU Agricultural and Food Journal** 1(2): 23–33. [in Thai]
- Chanchay, N., M. Jumpatase and A. Boonprajaub. 2021. Carboxymethyl Cellulose with Crude Extracts of Hom, Bamboo Mushroom Mucus and Vegetable Watercress for Cosmetics Application. pp. 1292-1302. *In Proceeding of MJU Annual Conference 24-25 December 2021*. Chiang Mai: Maejo university. [in Thai]
- Klindworth, A., E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn and F.O. Glöckner. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research** 41(1): 1–11.
- López-López, A., MA. Rogel, E. Ormeño-Orrillo, J. Martínez-Romero and E. Martínez-Romero. 2010. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. **Syst. Applied Microbiology** 33: 322–327.

- Meijuan, Z., Z. Yongjia, C. Shijie and D. Yong. 2018. Deciphering the bacterial composition in the rhizosphere of *Baphicacanthus cusia* (NeeS) Bremek. **Scientific Reports** 18(8): 15831.
- Rondon, M.R., P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K.A. Loiacono, B.A. Lynch, I.A. MacNeil, C. Minor, C.L. Tiong, M. Gilman, M.S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman and R.M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology Journal** 66: 2541–2547.
- Ulrich, K., A. Ulrich and D. Ewald. 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. **FEMS Microbiology Ecology** 63(2): 169–180.
- Walker, R., A.A. Powell and B. Seddon. 1998. Bacillus isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. **Journal of Applied Microbiology** 84: 791–801.
- Walsh, A.M., F. Crispie, K. Kilcawley, O. O’Sullivan, M.G. O’Sullivan, M.J. Claesson and P.D. Cotter. 2016. Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. **mSystems** 1(5): 00052–16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00052-16>
- Wei, G., Y. Zang, X.J. Hao, F.M. Yang, Q.Y. Sun, L. Susan, M. Natschke, K.H. Lee, Y.H. Wang and C.L. Long. 2014. Indole alkaloid glycosides from the aerial parts of *Strobilanthes cusia*. **Journal of Natural Products** 77: 2590–2594.
- Zhou, B., Z. Yang, Q. Feng, X. Liang, J. Li, M. Zanin, Z. Jiang and N. Zhong. 2017. Aurantiamide acetate from *Baphicacanthus cusia* root exhibits anti-inflammatory and anti-viral effects via inhibition of the NF-κB signaling pathway in Influenza A virus-infected cell. **Journal of Ethnopharmacology** 199: 60–67.