วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การศึกษาเมทาจีโนมิกส์ของเชื้อราและประสิทธิภาพในการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของเชื้อราที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน *Perionyx* sp. 1

Study of fungal metagenomics and potential to produce secondary metabolites fungus isolated from *Perionyx* sp. 1 gut

รุ่งโรจน์ ไกรสิทธิพาณิชย์[1,3]*, อานัฐ ตันโช[3], ศุภธิดา อ่ำทอง[2], ปิยะนุช เนียมทรัพย์[1], ศรีกาญจนา คล้ายเรือง[1] และ วศิน เจริญตัณฑนกุล[1]

Rungroj Kraisittipanit[1,3]*, Arnat Tancho[3], Supatida Aumtong[2], Piyanuch Niamsup[1], Srikanjana Klayraung[1] and Wasin Chareantantanakul[1]

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290 ประเทศไทย
[1] Department of Biotechnology, Faculty of Science, MaeJo University, Chiang Mai 50290
[2] สาขาวิชาปฐพี คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290 ประเทศไทย
[2] Faculty of Agricultural production, MaeJo University, MaeJo University, Chiang Mai 50290
[3] ศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290 ประเทศไทย
[3] Natural Agriculture Research and Development Center, Maejo University, Chiang Mai 50290

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของเชื้อราในลำไส้ของไส้เดือนดิน *Perionyx* sp. 1 และศึกษาประสิทธิภาพการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (IAA, GA และอนุพันธุ์ไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์) ขอเชื้อราที่คัดแยกได้ผลการศึกษาเมทาจีโนมิกส์ พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโทด์ ITS1 ของเชื้อรา สามารถจัดจำแนกได้ 3 ไฟลัม 8 คลาส 32 จีนัส 49 เมื่อคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA และ YMA สามารถคัดแยกเชื้อราที่แตกต่างกันได้ 11 ไอโซเลต จากการตรวจสอบยืนบริเวณ ITS1 สามารถระบุชนิดของเชื้อราได้เป็น *Talaromyces wortmannii* (YL1), *Chaetomium globosum* (YL2), *T. indioticus* (YL3), *T. angelicus* (RL1), *Trichoderma* sp. (RL2), *Aspergillus niger* (RL3), *Penicillium citrinum (Pe1), A. fumigatus* (Pe2), *A. flavus* (Pe3), *Humicola* sp. (Pe5) และ *Fusarium* sp. (Pe6) จากการทดสอบความสามารถในการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิทั้งสามชนิด พบว่า เชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDBt ที่เติม 0.4% L-tryptophan สามารถผลิต IAA เฉลี่ย 36.58 µg/ml ส่วนอาหารที่ไม่เติม L-tryptophan ผลิต IAA เฉลี่ย 23.55 µg/ml ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อรามีแนวโน้มการผลิตฮอร์โมน GA ที่สัมพันธ์กับฮอร์โมน IAA ส่วนสารอนุพันธ์ไฮโดรซาเมตพบว่าเชื้อราผลิตได้เฉลี่ย 180.993 µg/ml โดยเชื้อราไอโซเลต RL3 (*Aspergillus niger*) มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถผลิตได้ปริมาณ 1,629.90 ± 0.0128 µg/ml และน้ำเลี้ยงเชื้อรา RL3 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของถั่วเขียวได้ดีที่สุดเมื่อเติมสารละลายเหล็ก 1:10^3 งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อราที่คัดแยกได้จากลำไส้ของไส้เดือนดินต่อการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจึงน่าจะสามารถนามาใช้ประโยชน์ในการ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้

คำสำคัญ: เพอริโอนิกส์; ความหลากหลายเชื้อรา; เมทาจีโนมิกส์; เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ

ABSTRACT: The aim of this research was to identify the fungi species from Thai economic earthworm gut (*Perionyx* sp. 1) and testing on the efficiency to produce secondary metabolites (IAA, GA, Hydroxamate siderophore). As metagenomics level, revealed 3 phyla 8 classes 32 genera and 49 species. On the other hand, the conventional method could collect 11 different fungal isolates using ITS1. i.e., *Talaromyces wortmannii* (YL1), *Chaetomium globosum* (YL2), *T. indioticus* (YL3), *T. angelicus* (RL1), *Trichoderma* sp. (RL2), *Aspergillus niger* (RL3), *Penicillium citrinum (Pe1), A. fumigatus* (Pe2), *A. flavus* (Pe3), *Humicola* sp. (Pe5) and *Fusarium* sp. (Pe6). Three secondary

* Corresponding author: kraisittipanit@gmail.com

Received: date; April 7, 2021 Accepted: date; September 10, 2021 Published: date; March 7, 2022

metabolites (IAA, GA, Hydroxamate siderophore) were examined. The result showed that the PDBt added 0.4% L-tryptophan could produce IAA as 36.58 µg/ml higher than without. The GA showed the metabolite secretion related to IAA. However, the average of all fungal isolates could produce hydroxamate as 180.993 µg/ml and the RL3 isolate (*Aspergillus niger*) was the best fungi producing hydroxamate as 1,629.90 ± 0.0128 µg/ml. Furthermore, RL3 supernatant mixed iron solution ($1:10^3$) could stimulate the growth of green pea shoot more than outers, all of which confirm that within the intestinal gut of *Perionyx* sp.1 compose of effective fungi which can stimulate plant growth.
Keywords: *Perionyx*, fungal diversity, metagenomics, secondary metabolite

บทนำ

ไส้เดือนดิน *Perionyx* sp. 1 เป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มความสมบูรณ์ของดิน โดยปัจจุบันจัดได้ว่าเป็นสัตว์ที่สร้างรายได้ทางหนึ่ง เนื่องจากสามารถนามาใช้ในการย่อยขยะและมูลไส้เดือนที่ได้ยังมีสมบัติดีในการเป็นปุ๋ยอินทรีย์และใช้ในการการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด จากการศึกษาพบภายในลำไส้ของไส้เดือนดินมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และสามารถคัดหลั่งสารเคมี เอนไซม์ หรือสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิต่าง ๆ เช่น ฮอร์โมนออกซิน (Auxin) ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน (Gibberellin) และไซเดอร์โรฟอร์ (Siderophore) ส่งเสริมให้พืชสร้างผลผลิตทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี (Tancho, 2013) ในประเทศอินเดียสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ไส้เดือนดินชนิด *Eudrillus eugeniae* พบว่า สามารถจำแนกได้ 10 สกุล 15 ชนิด และแยกเชื้อราได้อีก 5 ชนิด (*Aspergillus* spp., *Pytium* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp.) (Esakkiammal and Lakshmibai, 2013; Emperor and Kumar, 2015) สำหรับเอเชีย พบว่าไส้เดือนดินชนิด *Perionyx excavatus* ว่าสามารถคัดแยกเชื้อราได้ 10 ชนิด ได้แก่ *Penicillium rubrum, Penicillium humicola, Aspergillus niger, Mucor luteus, Trichoderma viride, Mucor luteus, Cladosporium herbarum, Fusarium roseum, Rhizopus nigricans* และ *Cladosporium herbarum* (Chowdhury et al., 2007) สำหรับประเทศไทย ศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ซึ่งดาเนินการวิจัยทางด้านการเลี้ยงไส้เดือนดิน เพื่อผลิตปุ๋ยและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน สามารถคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียจากไส้เดือนดินชนิด *Perionyx* sp. 1 ซึ่งเป็นไส้เดือนดินทางการค้าที่มีอยู่ภายในศูนย์วิจัยและของโครงการหลวงอ่างขางได้สำเร็จ (Suleerak et al., 2016) แต่ยังไม่พบการรายงานชนิดของเชื้อราจากลาไส้ไส้เดือนดินชนิด Perionyx sp. 1

การวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นคัดแยกเชื้อราจากลำไส้ไส้เดือนดินชนิดดังกล่าว ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง (cultural method) และวิธีการศึกษาชนิดของเชื้อราทั้งหมดจากเมทาจีโนมิกส์ (Metagenomics) ด้วยเทคโนโลยี Next Generation Sequencing (NGS) พร้อมศึกษาประสิทธิภาพการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่สำคัญต่อภาคการเกษตร อาทิ ฮอร์โมนออกซิน ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน และไซเดอร์โรฟอร์ ผลการศึกษานอกจากจะได้ข้อมูลความหลากหลายของเชื้อราจากลำไส้ไส้เดือนดิน *Perionyx* sp. 1 แล้ว ข้อมูลการทดสอบสารเมแทบอไลต์สามารถนำมาปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ของศูนย์วิจัยฯ และสร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยของเราสืบไปได้เป็นอย่างดี

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาความหลากหลายเชื้อราจากเทคโนโลยี NGS

รวบรวมไส้เดือนดินดิน *Perionyx* sp.1 จากบ่อเพาะเลี้ยงของศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรธรรมชาติ จำนวน 10 ตัว นำมาล้างผิวลำตัวให้สะอาดและแช่ใน 70% เอทานอล จากนั้นตัดผ่าตลอดลำตัวเพื่อเก็บส่วนของลำไส้ลงในหลอด 1.5 ml จากนั้นทำการสกัดเมทาจีโนมิกส์ด้วยชุดสกัดเมทาจีโนมิกส์สำเร็จรูป (Genomic DNA Isolation Kit, BIO HELIX) และตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอเบื้องต้นด้วยเครื่อง nanodrop และตรวจสอบคุณภาพเมทาจีโนมิกส์ผ่าน 1.0% อะกาโรสเจล และทำการส่งตัวอย่างเมทาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อหาลำดับเบสด้วย Next Generation Sequencing นำข้อมูล raw data มาทำการประมวลผลค่า alpha diversity ค่าสถิติ OTUs, Chao1, Shannon, Inverse Simpson, Good’s Coverage และแปลผลร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

2. การคัดแยกเชื้อราจากลำไส้ของไส้เดือนดิน และการพิสูจน์เชื้อ

รวบรวมไส้เดือนดิน *Perionyx* sp.1 จากบ่อเพาะเลี้ยงของศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรธรรมชาติ จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 10 ตัว แช่ด้วย 70% เอทานอล จากนั้นตัดผ่าตลอดลำตัวโดยระวังไม่ให้ลำไส้ฉีกขาด และเก็บส่วนของลำไส้ทั้งหมดลงในหลอด 1.5 ml จากนั้นทำการเจือจางลำดับส่วนให้ได้ 10^{-3} ถึง 10^{-5} และนำมา spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติม rose bengal (30 mg/ml) และเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล กับอาหาร Yeast Malt Agar (YMA) ที่เติมยาปฏิชีวนะสเต็ปโตมัยซิน จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 ถึง 7 วัน จึงเขี่ยแยกโคโลนีที่แตกต่างมาเลี้ยงบนอาหารใหม่ (PDA) บ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เก็บแยกเส้นใยราแล้วแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำมาเลี้ยงในอาหาร PDBt เป็นเวลา 3 วัน อีกส่วนนำมาเก็บในหลอดรักษาสภาพในสารละลายกลีเซอรอลเก็บไว้ในตู้-20 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อราที่เลี้ยงใน PDBt เมื่อเชื้อเจริญสมบูรณ์แล้ว นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Genomic DNA Isolation Kit, BIO HELIX นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย nanodrop จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อราทุกไอโซเลตด้วยชุดเพิ่มปริมาณสำเร็จรูป (BIO HELIX) จากยีนบริเวณ ITS1 และ ITS4 ด้วยเครื่อง thermocycler และตั้งค่าขั้นก่อน denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นรัน 30 รอบดังนี้ ตั้งอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที ปรับ annealing ที่ 60 องศาซลเซียส 1 นาที และปรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และปรับทิ้งไว้ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการเคลื่อนผ่าน 2.0% เจลอะกาโรส และทำความสะอาดผลิตผลของ PCR ด้วย PCR purify (BIO HELIX) ก่อนส่งหาลำดับเบสด้วยวิธี Sanger sequencing และลำดับเบสถูกเทียบในฐานข้อมูล NCBI และสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Mega 7

3. การศึกษาสารเทแทบอไลต์ทุติยภูมิ

3.1 การทดสอบไซเดอร์โรฟอร์และอนุพันธ์ไฮโดรซาเมตด้วยวิธี ferric perchlorate assay

เลี้ยงเชื้อรา 11 ไอโซเลตบน CAS blue agar ในที่มืดเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 26.5 องศาเซียลเซียส จากนั้นทำการวัด clear zone และ growth zone พร้อมทั้งสีของอาหารบริเวณ clear zone จากนั้นเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว Guaze No. 2 ปริมาณ 10 ml. ที่ปรับ pH 7.00 นำมาเขย่าที่มืดเป็นเวลา 10 วัน ที่ (120 รอบต่อนาที) จากนั้นกรองเอาแต่น้ำใสผ่านใยกรอง จากนั้นทดสอบอนุพันธ์ไฮโดรซาเมตด้วย ferric perchlorate ทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 480 nm. ทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ blank เป็นน้ำเลี้ยงที่เติม ferric perchlorate จากนั้นคัดเลือกเชื้อรา isolate ที่ผลิตสารได้ในปริมาณสูงมาทดสอบการเจริญเติบโตกับต้นถั่วเขียวที่ปลูกร่วมกับธาตุเหล็ก

3.2 ทดสอบปริมาณ IAA ด้วยวิธี colorimetric assay (Tsavkelova et al., 2007)

เลี้ยงเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลตในอาหาร PDBt 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโน L-tryptophan และสภาวะที่มีการเติมกรดอะมิโน L-tryptophan 0.4% บ่มในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นกรองเอาแต่น้ำเลี้ยงด้วยผ้าขาวบาง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตมาทดสอบด้วยสารละลาย Salkowaski ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นบ่มไว้ในที่มืด 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายมาตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จาก IAA บริสุทธิ์ โดยการทดลองใช้ blank เป็นน้ำเลี้ยงที่เติมสารละลาย Salkowaski ทำ 3 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย

3.3 ทดสอบปริมาณ GA ด้วยวิธี colorimetric assay (Holbrook et al., 1961)

เลี้ยงเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลตในอาหาร PDBt 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโน L-tryptophan และสภาวะที่มีการเติมกรดอะมิโน L-tryptophan 0.4% บ่มในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตมาทดสอบด้วยสารละลาย Zinc acetate 1 ml. ทิ้งไว้ 2 นาทีก่อนเติม Potassium ferrocyanate จากนั้นตั้งทิ้งไว้ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 rpm นาน 15 นาที ก่อนดูดส่วนใสช้า ๆ 5 ml. เติม 30% HCl ปริมาณ 5 ml. สารละลายจะเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีเขียว ก่อนนำสารละลายมาตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 254 nm นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากกรดจิบเบลเรลลินบริสุทธิ์ โดยการทดลองให้ blank เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติม Zinc acetate เติม Potassium ferrocyanate และเติม 30% HCl ทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

3.4 อนุพันธ์ไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์จากรา RL3 และเหล็กต่อการเจริญเติบโตด้านความสูงของถั่วเขียว

การทดลองนี้เป็นการวัดการเจริญเติบโตของถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek.) ในระยะการงอก 7 วัน โดยก่อนทำการทดสอบ ได้ทำการเจือจางสารละลายไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์จากเชื้อรา RL3 ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม stock ของสารละลาย $FeCl_3$ ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเมล็ดถั่วเขียวมาล้างให้สะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Chorox ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นแบ่งเมล็ดถั่วเขียวเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 6 เมล็ด นำไปวางไว้ในกล่องพลาสติกที่รองด้วยกระดาษชำระที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วทั้ง 8 กล่อง (8 treatments) โดยทุก treatment เติมน้ำ sterile ลงไป 200 มิลลิลิตร และ treatment ที่ 1 เติมน้ำ sterile ลงไปอีก 200 มิลลิลิตร treatment ที่ 2 เติมสารละลายไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ส่วน treatment ที่ 3 เติม $FeCl_3$ ที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร treatment ที่ 4 เติมสารละลายผสมระหว่างไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์กับสารละลาย $FeCl_3$ เจือจาง 1:10 เท่า ให้ได้ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร ส่วน treatment ที่ 5 เติม $FeCl_3$ ที่เจือจาง $1:10^3$ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร treatment ที่ 6 เติมสารละลายผสมระหว่างไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์กับสารละลาย $FeCl_3$ เจือจาง 1: 10^3 เท่า ให้ได้ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร ส่วน treatment ที่ 7 เติม $FeCl_3$ ที่เจือจาง $1:10^5$ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร treatment ที่ 6 เติมสารละลายผสมระหว่างไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์กับสารละลาย $FeCl_3$ เจือจาง 1: 10^5 เท่า ให้ได้ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำกล่องทั้งหมดไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำออกมาวัดความสูง

ผลการศึกษา

1. การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในลำไส้ *Perionyx* sp. 1 ระดับเมทาจีโนมิกส์ด้วยวิธี NGS

การศึกษาเมทาจีโนมิกส์จากลำไส้ไส้เดือนดิน *Perionyx* sp. 1 ด้วยเทคโนโลยี NGS พบว่าเมทาจีโนมิกส์มีคุณภาพผ่านร้อยละ 99.9 ที่ระดับ Q30 ที่ 99.63 มีเบสทั้งหมด 28 ล้านเบส ผลทดสอบสถิติ 5 ชนิด (OTUs, Chao1, Shannon, Inverse Simpson, Good's Coverage) มีค่าเท่ากับ 373, 380.2, 4.4563835, 0.876819817 และ 0.99896203 ตามลำดับ การวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าตรงกับเชื้อรา 3 ไฟลัม 8 คลาส 32 จีนัส 49 ชนิด (**Table 1, 2 and 3**) โดยไฟลัม Ascomycota มีสมาชิกมากที่สุดประกอบด้วย 5 คลาส 25 จีนัส 40 ชนิด (**Table 1**) และไฟลัม Basidiomycota ประกอบด้วย 2 คลาส 7 จีนัส 8 ชนิด (**Table 2**) และไฟลัม Mucoromycota ประกอบด้วย 1 คลาส 1 กลุ่ม (**Table 3**)

Table 1 Metagenomics analysis of Phylum Ascomycota from *Perionyx* sp. 1 gut

class	genus	species	species richness
Dothideomycetes	Hortaea	*Hortaea werneckii*	0.01%
	Juxtiphoma	*Juxtiphoma eupyrena*	0.01%
	Paraconiothyrium	*Paraconiothyrium* sp.	0.02%
	Preussia	*Preussia* sp.	0.06%
Eurotiomycetes	Chaetothyriales	*Chaetothyriales* sp.	0.06%
	Aspergillus	*Aspergillus chevalieri*	0.63%
	Aspergillus	*Aspergillus flavus*	7.89%
	Aspergillus	*Aspergillus penicillioides*	0.59%
	Aspergillus	*Aspergillus pseudodeflectus*	0.02%
	Aspergillus	*Aspergillus* sp.	0.09%
	Aspergillus	*Aspergillus steynii*	0.02%
	Aspergillus	*Aspergillus tamarii*	0.04%
	Aspergillus	*Aspergillus versicolor*	0.06%
	Aspergillus	*Aspergillus violaceofuscus*	0.01%
	Penicillium	*Penicillium cinnamopurpureum*	0.05%
	Penicillium	*Penicillium oxalicum*	0.07%
	Penicillium	*Penicillium* sp.	0.04%
	Talaromyces	*Talaromyces wortmannii*	0.01%
Leotiomycetes	Chaetomella	*Chaetomella* sp.	0.05%
Saccharomycetes	Candida	*Candida tropicalis*	28.41%
	Yamadazyma	*[Candida] conglobata*	0.01%
		uncultured Galactomyces	2.07%
	Barnettozyma	*Barnettozyma californica*	0.01%
	Starmera	*[Candida] stellimalicola*	0.02%
	Pichia	*Pichia manshurica*	0.01%

Table 1 Metagenomics analysis of Phylum Ascomycota from *Perionyx* sp. 1 gut

class	genus	species	species richness
Sordariomycetes	Colletotrichum	*Colletotrichum truncatum*	0.02%
	Clonostachys	*Clonostachys* sp.	0.02%
	Fusarium	*Fusarium equiseti*	0.11%
	Fusarium	*Fusarium oxysporum*	0.07%
	Fusarium	*Fusarium solani*	2.99%
	Memnoniella	*Memnoniella longistipitata*	0.01%
	Microascus	*Microascus chartarus*	0.02%
	Microascus	*Microascus croci*	0.01%
	Microascus	*Microascus gracilis*	0.01%
	Parascedosporium	*Parascedosporium putredinis*	0.09%
	Chaetomium	*Chaetomium globosum*	0.01%
	Mycothermus	*Mycothermus thermophiles*	0.06%
	Ovatospora	*Ovatospora pseudomollicella*	0.05%
	Podospora	*Podospora prethopodalis*	0.09%
	Nigrospora	*Nigrospora oryzae*	0.08%

Table 2 Metagenomics analysis of Phylum Basidiomycota from *Perionyx* sp. 1 gut

class	genus	species	species richness
Agaricomycetes	Vascellum	*Vascellum pratense*	0.02%
	Coprinopsis	*Coprinopsis cinerea*	0.02%
	Psathyrella	*Psathyrella bivelata*	0.01%
	Amauroderma	*Amauroderma rugosum*	0.02%
	Ganoderma	*Ganoderma lucidum*	0.05%
	Hericium	*Hericium erinaceus*	0.02%
Malasseziomycetes	Malassezia	*Malassezia globosa*	0.01%
		Malassezia restricta	0.04%

Table 3 Metagenomics analysis of Phylum Mucoromycota from *Perionyx* sp. 1 gut

class	genus	species	species richness
Glomeromycetes	-	กลุ่ม Funneliformis	0.05%

2. การคัดแยกเชื้อราจากลำไส้ของไส้เดือนดิน

คัดแยกเชื้อราจากลำไส้ไส้เดือนดินชนิด *Perionyx* sp. 1 พบโคโลนีแตกต่างกันทั้งสิ้น 11 ไอโซเลต ทุกไอโซเลตเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยยีนบริเวณ ITS1 และ ITS4 พบว่าใกล้เคียงกับเชื้อรา 7 สกุล จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota โดยแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดัง **Table 4** และ **Figure 1**

Table 4 identification of 11 fungal isolates collected from *Perionyx* sp. 1 gut using ITS1

Isolate	Identify	Phylum	Accession no.
YL1	*Talaromyces wortmannii*	Ascomycota	AB025752.1
YL2	*Chaetomium globosum*	Ascomycota	NR_144833.1
YL3	*Talaromyces indioticus*	Ascomycota	EF123254.1
RL1	*Talaromyces angelicus*	Ascomycota	MK994099.1
RL2	*Trichoderma* sp.	Ascomycota	MK871174.1
RL3	*Aspergillus niger*	Ascomycota	MN636772.1
Pe1	*Penicillium citrinum*	Ascomycota	KY848519.1
Pe2	*Aspergillus fumigatus*	Ascomycota	JN226956.1
Pe3	*Aspergillus flavus*	Ascomycota	CO139467.1
Pe5	*Humicola* sp.	Ascomycota	KC797230.1
Pe6	*Fusarium* sp.	Ascomycota	DM039489.1

YL = Fungi isolated from *Perionyx* sp. 1 gut cultured in Yeast Malt on 3 days

RL = Fungi isolated from *Perionyx* sp. 1 gut cultured in Potato Dextrose Agar with rose Bengal on 7 days

Pe = Fungi isolated from *Perionyx* sp. 1 gut cultured in Yeast Malt Agar on 5 days

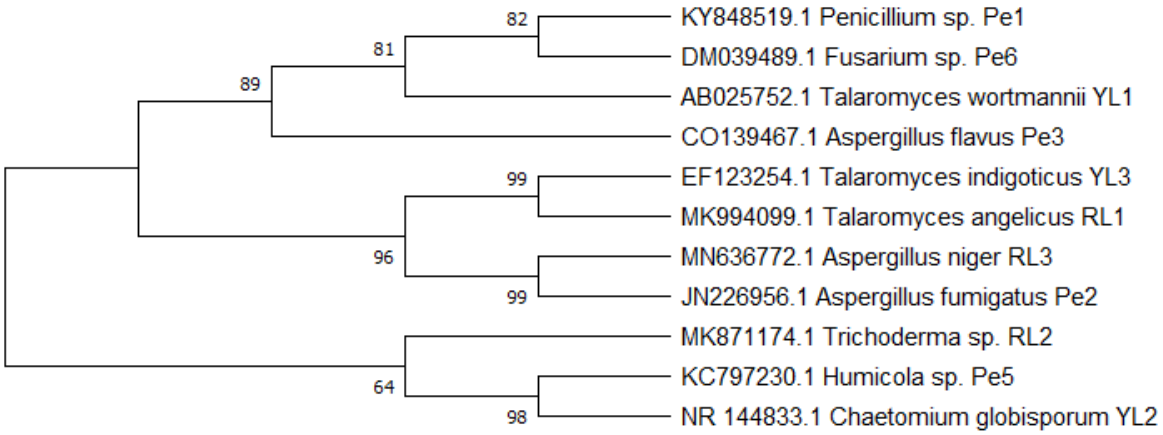

Figure 1 The Phylogetic tree of 11 fungal isolates from gut of *Perionyx* sp. 1

3. การทดสอบปริมาณสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจากเชื้อราที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินชนิด *Perionyx* sp. 1

3.1 สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิชนิดกรดอินโดลอะเซติก (IAA) และกรดจิบเบอเรลลิก (GA)

การทดสอบความสามารถในการผลิต IAA และ GA ใน PDBt สองสภาวะ คือ เติม 0.4% L-tryptophan เป็นสารตั้งต้นและไม่เติม L-tryptophan พบว่า เชื้อราที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลตสามารถผลิต IAA และ GA และ IAA ในสองสภาวะพบว่าในสภาวะที่เติม 0.4% L-tryptophan มีการผลิต IAA เฉลี่ยสูงกว่าไม่เติม ส่วน GA พบว่ามีแนวโน้มเหมือนกันกับ IAA คือ เมื่อเติม 0.4% L-tryptophan เข้าไปพบว่า เชื้อราสามารถผลิต GA ได้เพิ่มขึ้น โดยมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าไม่ได้เติม L-tryptophan สำหรับค่า pH ของน้ำเลี้ยงมีค่าเฉลี่ยเป็นกรด และสภาวะที่เติม 0.4% L-tryptophan มีค่า pH ที่สูงกว่าสภาวะที่ไม่เติม L-tryptophan โดยเชื้อราในกลุ่มที่แยกได้จากอาหาร YMA ในเวลา 3 วันคือเชื้อราคา YL1, คือเชื้อราคา YL1, YL2 และ YL3 ซึ่งคือเชื้อรา *Talaromyces wortmannii*, *Chaetomium globosum* และ *Talaromyces indioticus* โดยพบว่าเชื้อรา YL2 และ YL3 มีการเพิ่มขึ้นของทั้งปริมาณ IAA และ GA เมื่อทำการเติม L-tryptophan เข้าไป 0.4% ยกเว้น *T. wortmannii* สำหรับเชื้อรา RL1, RL2 และ RL3 เป็นกลุ่มเชื้อราที่คัดแยกได้จาก

อาหาร PDA ที่เติม rose Bengal คือเชื้อรา *Talaromyces angelicus*, *Trichoderma* sp. และ *Aspergillus niger* เชื้อราทุกชนิดที่คัดแยกได้มีการเพิ่มขึ้นทั้งปริมาณ IAA และ GA เมื่อเติม 0.4% L-tryptophan สำหรับเชื้อราในกลุ่ม Pe1, Pe2, Pe3, Pe5 และ Pe6 เป็นเชื้อราที่คัดแยกได้จากอาหาร YMA ที่ระยะเวลาวันที่ 5 ขงการเพาะเลี้ยง และแนวโน้มส่วนใหญ่คล้ายกันคือ เมื่อเพิ่ม L-tryptophan ทั้งปริมาณ IAA และ GA จะเพิ่มขึ้นมากกว่าไม่เติม ยกเว้นเชื้อรา Pe2 และ Pe3 ที่ปริมาณของ IAA เพิ่มขึ้นแต่กลับพบว่าปริมาณ GA ลดลง (**Table 5**)

Table 5 Amount of IAA and GA3 estimation in PDBt added L-tryptophan and without L-tryptophan

isolate	PDBt without L-tryptophan			PDBt added 0.4% L-tryptophan		
	Salkowaki's test (μg/ml) ± SD	HCl test (μg/ml) ± SD	pH (5.60)	Salkowaki's test (μg/ml) ± SD	HCl test (μg/ml) ± SD	pH (5.60)
YL1	22.66 ± 0.005^{b}	186.00 ± 0.043^{e}	1.58	16.61 ± 0.001^{f}	60.66 ± 0.013^{f}	5.14
YL2	18.36 ± 0.007^{d}	374.66 ± 0.005^{a}	2.98	36.25 ± 0.001^{c}	762.66 ± 0.010^{b}	4.17
YL3	29.48 ± 0.012^{a}	116.66 ± 0.017^{g}	4.90	30.15 ± 0.003^{c}	215.66 ± 0.016^{d}	3.50
RL1	18.87 ± 0.004^{d}	300.66 ± 0.026^{b}	2.21	23.02 ± 0.003^{d}	863.33 ± 0.023^{a}	2.28
RL2	17.13 ± 0.007^{e}	304.00 ± 0.033^{b}	3.96	151.33 ± 0.004^{a}	252.66 ± 0.012^{cd}	4.59
RL3	23.74 ± 0.003^{b}	146.66 ± 0.018^{f}	5.29	25.23 ± 0.026^{d}	297.33 ± 0.030^{c}	5.39
Pe1	24.05 ± 0.025^{b}	373.33 ± 0.009^{a}	5.42	12.56 ± 0.003^{fg}	164.66 ± 0.005^{de}	8.83
Pe2	30.97 ± 0.004^{a}	107.33 ± 0.005^{g}	5.92	52.36 ± 0.011^{b}	76.00 ± 0.015^{f}	8.89
Pe3	20.46 ± 0.005^{c}	250.66 ± 0.011^{c}	5.68	33.54 ± 0.009^{c}	139.38 ± 0.011^{e}	8.86
Pe5	21.43 ± 0.005^{c}	379.33 ± 0.010^{a}	6.04	19.53 ± 0.026^{e}	80.66 ± 0.012^{f}	4.02
Pe6	31.79 ± 0.009^{a}	220.66 ± 0.008^{d}	6.64	1.84 ± 0.003^{g}	0.13 ± 0.004^{g}	6.35
average	23.55	230.93	4.60	36.58	264.83	5.64

3.2 สารอนุพันธ์ไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์

การทดสอบความสามารถในการผลิต Siderophore บน CAS blue agar พบว่า มีเชื้อราที่ปรากฏวง clear zone 9 ไอโซเลต และมีสองสีคือ สีเหลืองจำนวน 6 ไอโซเลต และสีชมพูจำนวน 3 ไอโซเลต และคาดว่าสีดังกล่าวเกิดจากปริมาณอนุพันธุ์ของไซเดอร์โรฟอร์ต่างชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน แต่สำหรับการตรวจวัดปริมาณ Hydroxamate พบว่าทุกไอโซเลตผลิต Hydroxamate โดยไอโซเลตที่มีการผลิตได้สูงสุดคือ RL3 และค่า pH ส่วนใหญ่จากน้ำเลี้ยงมีสภาวะเป็นกรด (**Table 6**) และน้ำเลี้ยงจากเชื้อรา RL3 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นถั่วเขียวได้ในระยะเวลา 7 วัน และเมื่อทำการเติมสารประกอบเหล็กพบว่า สารอนุพันธ์ไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของยอดต้นถั่วได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (**Figure 2, Table 7**)

Table 6 Screening for siderophore and hydroxamate production by fungi of *Perionyx* sp

Isolate	Clear zone color	Clear zone/Growth ratio	Hydroxamate (μg/ml) ± SD	pH Guaze No.2 (7.00)
YL1	-	-	0.77 ± 0.0005[h]	5.67
YL2	yellow	1.81	36.88 ± 0.0047[d]	6.12
YL3	yellow	1.24	53.41 ± 0.0128[cd]	4.48
RL1	pink	2.76	78.95 ± 0.0036[c]	2.78
RL2	-	-	106.63 ± 0.0047[b]	8.11
RL3	yellow	2.65	1,629.90 ± 0.012[8a]	4.51
Pe1	yellow	2.80	49.54 ± 0.0030[cd]	4.44
Pe2	yellow	1.94	19.17 ± 0.0026[e]	4.81
Pe3	yellow	2.87	7.10 ± 0.0005[f]	4.37
Pe5	pink	2.59	6.96 ± 0.0010[f]	3.17
Pe6	pink	3.34	1.93 ± 0.0005[g]	2.88
average		2.00	180.993	4.67

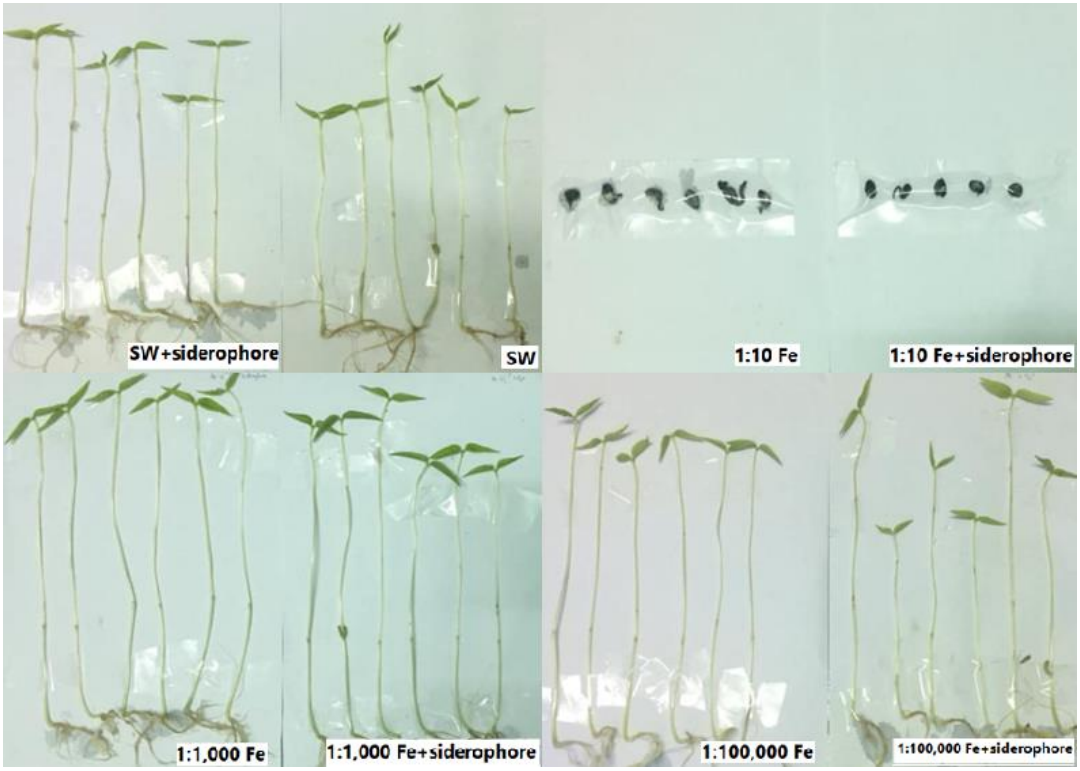

Figure 2 The effect of siderophore with 3 iron concentrations produced by RL3 on green beans early growth

Table 7 The iron quantitation of RL3 siderophore chelating in early growth of Green pea shoot

	Shoot height (lack siderophore)	Shoot height (added siderophore)
SW	16.83 ± 2.29[a]	19.05 ± 2.47[a]
1: 10^1 Fe	not growth	not growth
1: 10^3 Fe	21.45 ± 2.07[b]	23.16 ± 0.82[b]
1: 10^5 Fe	17.80 ± 3.76[ab]	19.65 ± 0.73[a]

SW = sterile water

วิจารณ์ผลการศึกษา

การคัดแยกลำไส้ไส้เดือนดินเศรษฐกิจชนิด *Perionyx* sp.1 ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบน PDA และ YMA สามารถคัดแยกโคโลนีได้ 11 ไอโซเลตที่แตกต่างกัน เมื่อทำการจำแนกโดยอาศัยลาดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตำแหน่ง ITS1 สามารถจำแนกออกเป็น 7 สกุลได้แก่ เชื้อราในสกุล *Talaromyces*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Humicola* และ *Fusarium* สอดคล้องกับรายงานของ Chowdhury *et al*., 2007 ถึง 4 สกุลที่ได้แก่ สกุล *Penicillium*, *Aspergillus, Trichoderma*, *Fusarium* โดยทั้งหมดสามารถคัดแยกได้จากลำไส้ของไส้เดือนดินสกุล *Perionyx excavatus* เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลจากวิธีเพาะเลี้ยงกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในระดับเมทาจีโนมิกส์พบว่า วิธีเมทาจีโนมิกส์สามารถจำแนกเชื้อราจากลำไส้ไส้เดือนดินชนิดดังกล่าวได้เป็น 3 ไฟลัมได้แก่ ไฟลัม Ascomycota ไฟลัม Basidiomycota และไฟลัม Mucoromycota โดยเชื้อราในไฟลัม Ascomycota มี species richness สูงที่สุดกว่า 40 ชนิด และเชื้อราใฟลัม Basidiomycota พบ 8 ชนิดและไฟลัม Mucoromycota พบ 1 กลุ่ม จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม python package สามารถประเมินค่า OTUs (Operational Taxonomic Units) สูงถึง 373 แสดงว่าในเมทาจีโนมของ *Perionyx* sp.1 ยังมีเชื้อราอีกว่า 324 ชนิด ที่ยังไม่สามารถตรวจสอบได้ (dark matter) อย่างไรก็ตาม วิธีเมทาจีโนมิกส์มีค่า Q30 99.63 ซึ่งหมายความว่ายังมีบางส่วนที่ตรวจไม่พบ และมีความแม่นยำที่น่าเชื่อถือในระดับจีนัส ทั้งนี้หากประเมินในระดับจีนัสพบว่าทุกจีนัสตรวจพบทั้งสองวิธีที่เหมือนกัน ยกเว้นจีนัส Trichoderma ซึ่งอาจเป็นไปได้ เนื่องจากตัวอย่างในการทดสอบครั้งนี้ของสองวิธีได้ถูกแยกส่วนศึกษากันคนละช่วงเวลาและไม่ได้เก็บตัวอย่างเดิมไว้

การทดสอบประสิทธิภาพการผลิต IAA พบเชื้อราที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโน L-tryptophan สามารถผลิต IAA ได้ เฉลี่ยเท่ากับ 23.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่เติม 0.4% L-tryptophan พบว่ามีค่าเฉลี่ยสูงกว่า (36.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยไอโซเลต RL2 (*Trichoderma* sp.) สามารถผลิต IAA ในสภาวะที่เติม 0.4% L-tryptophan สูงกว่าไม่เติมอย่างชัดเจน (ประมาณ 9 เท่า) (**Table 5**) แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน L-tryptophan เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ IAA โดยผ่านวิถีเมทาบอลิซึมของ L-tryptophan (tryptophan dependent partway) (Lynch, 1985) ซึ่งมีงานวิจัยหลายฉบับ รายงานว่ากระบวนการสังเคราะห์ IAA สามารถเกิดขึ้นได้หลายวิถี เช่น วิถีการสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี indole-3-acetamide partway (IAM) ผ่านวิถี indole-3-pyruvic acid partway (IPA) ผ่านวิถี tryptamine pathway (TAM) และผ่านวิถี indole-3-acetaldoxime partway (IAOx) (Mamo and Nemato, 2012) และมีรายงานว่าเชื้อราส่วนใหญ่สร้าง IAA โดยอาศัยกรดอะมิโน L-tryptophan ผ่านวิถี IPA (Hilbert et al., 2012) นอกจากนี้การวิจัยสอดคล้องการศึกษาอื่น พบว่าเชื้อราสกุล *Aspergillus* สกุล *Fusarium* และสกุล *Penicillum* สามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้อาหารที่หลากหลายอาทิ Czapek-Dox broth และ PDBt และการเติม 0.1% L-tryptophan ลงไปในอาหารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตฮอร์โมน IAA ได้ดีขึ้น (Bilkey et al., 2010; Hasan et al., 2002) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อราส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้จากลำไส้ อาศัยสารตั้งต้นคือ L-tryptophan สำหรับผลิตฮอร์โมน IAA ส่วนในสภาวะไม่เติมกรดอะมิโนเชื้อราอาจใช้วิถีที่เป็นอิสระจากกรดอะมิโน (tryptophan independent partway) เช่น Phenylacetic acid (PAA) ซึ่งสังเคราะห์มาจาก L-phenylalanine อีกที (Caron et al., 1995) สำหรับ GA พบว่า เชื้อราที่คัดแยกได้ทั้งหมดสามารถผลิต GA ได้ โดยพบว่าในอาหาร

PDBt ที่เติม 0.4% L-tryptophan ราส่วนใหญ่สามารถผลิตฮอร์โมน GA ได้มากกว่าอาหารที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโน L-tryptophan (**Table 5**) แสดงให้เห็นว่าการสร้างฮอร์โมน GA มีแนวโน้มสูงขึ้นตามการสร้างฮอร์โมน IAA (Taiz and Zeiger, 2010) สอดคล้องกับ Barlier et al. (2000), Mikkelsen et al. (2000) และ Nafisi et al. (2007) พบว่า เชื้อราบางชนิดสามารถผลิตฮอร์โมน GA ได้มากขึ้นตามปริมาณของฮอร์โมน IAA ที่สูงขึ้น เนื่องจากเชื้อราที่ผลิต IAA แบบวิถี tryptophan dependent partway และเข้าสู่วิถี IAOx (indole-3-acetaldoxime) ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase ที่จะทำหน้าที่ oxidize tryptophan ให้เป็น IAOx แสดงให้เห็นว่า tryptophan ที่มากขึ้นช่วยกระตุ้นให้เชื้อราสร้างเอนไซม์กลุ่มดังกล่าวเพิ่มขึ้น เช่น เอนไซม์ CDP synthase และ ent-kaurene synthase (Hedden et al. (2002); Sakamoto et al., (2004)) โดยเอนไซม์ทั้งหมดไปเร่งสาร ent-kaurene ที่เปลี่ยนแปลงมาจากสาร GGPP (Geranylgeranyl diphosphate) จากเซลล์ ให้เป็น GA12 ที่ endoplasmic reticulum ของเซลล์ (Taiz and Zeiger, 2010)

สำหรับไซเดอร์โรฟอร์และอนุพันธ์ไฮโดรซาเมต พบว่า เชื้อราที่คัดแยกได้จากลำไส้ของไส้เดือนดินชนิด *Perionyx* sp.1 สามารถผลิตไซเดอร์โรฟอร์บน CAS blue agar ได้จำนวน 9 ไอโซเลต (YL2, YL3, RL1, RL3, Pe1, Pe2, Pe3, Pe5, Pe6) โดยเชื้อรา Pe6 (*Fusarium* sp.) มีสัดส่วนของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อราสูงที่สุด แต่เมื่อพิจารณาการทดสอบอนุพันธ์ของไฮโดรซาเมต พบว่า เชื้อราไอโซเลต RL3 (*Aspergillus niger*) ตรวจพบสารไฮโดรซาเมตสูงสุด (1,629.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แสดงถึงประสิทธิภาพในการสารไฮโดรซาเมตเพื่อใช้ในการตรวจจับเหล็กนำมาใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Haydon et al., 1973) ทั้งนี้เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราไอโซเลตดังกล่าวมาเพิ่มขยายและแช่เมล็ดถั่วเขียวพบว่า น้ำเลี้ยงที่มีอนุพันธ์ไฮโดรซาเมตสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเขียวมากกว่าน้ำกลั่นในทุกความเข้มข้น ขณะที่สารละลายที่มีส่วนประกอบของเหล็กที่ความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่า ต้นถั่วที่ได้รับเหล็ก 1:10^3 ส่วน มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เติมเหล็กและที่เหล็ก 1:10^6 ส่วน ส่วนที่ 1:10^3 ที่เติมอนุพันธ์ไฮโดรซาเมตไซเดอร์โรฟอร์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นถั่วได้ดีที่สุด และการเติมสารละลายไซเดอร์โรฟอร์ร่วมกับสารละลายธาตุเหล็กช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตมากกว่าไม่เติม

จากผลการศึกษาทั้งหมดยืนยันว่า ภายในลำไส้ไส้เดือนดิน *Perionyx* sp. 1 ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรธรรมชาติ มีความหลากหลายของเชื้อราสูง และเชื้อราที่คัดแยกได้ทุกชนิดสามารถผลิตฮอร์โมนออกซิน ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน และสารไซเดอร์โรฟอร์ซึ่งทั้งสามชนิดนี้มีส่วนช่วยในการช่วยให้พืชที่มีไส้เดือนดินชนิดดังกล่าวอาศัยอยู่ร่วมกับพืช ได้รับสารส่งเสริมและกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ จึงน่าจะส่งผลดีต่อคุณภาพและผลผลิตของพืชอีกทางหนึ่ง ผลการวิจัยนี้นอกจากจะทำให้ได้ข้อมูลของความหลากหลายของเชื้อราในระดับ metagenome จากเทคโนโลยี NGS ซึ่งเป็นเทคโนโลยีในการศึกษาวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในตัวอย่าง ซึ่งครอบคลุมจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้แล้ว ยังสามารถนำข้อมูลมาประยุกต์เพื่อประโยชน์ทางการเกษตรและในระดับอุตสาหกรรมได้ อีกทั้งผลการวิจัยยังสามารถทราบกลุ่มของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพซึ่งมาจากไส้เดือนดินจึงเป็นไปได้ว่าผลผลิตของมูลไส้เดือนดินหรือปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ได้มีคุณสมบัติช่วยให้ไส้เดือนดินที่ได้รับปุ๋ยหมักมูลหรือไส้เดือนดินชนิดดังกล่าวอาศัยอยู่ จะสามารถผลิตและคัดหลั่งสารกระตุ้นการเจริญติบโตของพืชลงสู่เนื้อดิน เพื่อส่งเสริมการเจริญติบโตของพืชได้อีกทาง

ฉะนั้นปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินของไส้เดือนดินชนิด *Perionyx* sp.1 ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จึงเป็นปุ๋ยที่มีคุณภาพ ทั้งในแง่ของชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ และเชื้อราที่ตรวจพบสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้เป็นอย่างดี

สรุปผลการศึกษา

ไส้เดือนดินชนิด *Perionyx* sp. 1 ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เป็นไส้เดือนดินไทยที่มีคุณสมบัติพิเศษ และมีประโยชน์ต่อภาคการเกษตรไทยเป็นอย่างยิ่ง กล่าวคือ นอกจากจะเป็นไส้เดือนดินที่กินอาหารเก่งและสามารถผลิตมูลได้ปริมาณมากแล้ว มูลของไส้เดือนดินชนิดดังกล่าวยังสามารถช่วยเพิ่มคุณค่าของเนื้อดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากภายในลำไส้ของไส้เดือนดินชนิดนี้ พบเชื้อราที่มีคุณประโยชน์โดยสามารถคัดหลั่งสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิบางชนิด อาทิ IAA, GA และ Siderophore ซึ่งสารทั้งสามชนิดนี้สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของเติบโตของพืช โดยเฉพาะสารไซเดอร์โรฟอร์ ที่สามารถเปลี่ยนรูป

ของเหล็กให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ ส่งผลให้พืชสามารถดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ได้ดี ฉะนั้นงานวิจัยนี้ นอกจากจะทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานของชนิดเชื้อราทั้งหมดจากลำไส้ของไส้เดือนดินชนิดดังกล่าวในระดับ metagenome แล้ว เชื้อราที่คัดแยกได้ยังสามารถนำไปต่อยอดโดยนำเชื้อราที่ผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิสูง นำไปศึกษาต่อเพื่อผลิตเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์หรือนำไส้เดือนดินดังกล่าวไปปรับปรุงพื้นที่ของดินในพื้นที่การเกษตรให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น คณะผู้วิจัยเชื่อมั่นว่า การศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อภาคการเกษตรทั้งในระดับความรู้พื้นฐานและการนำไปใช้ต่อได้ในระดับชุมชนหรือประเทศชาติต่อไปได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย สถานที่วิจัยเพื่อศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Barlier, I., M. Kowalczyk, A. Marchant, K. Ljung, R. Bhalerao, M. Bennett, G. Sandberg, and C. Bellini. 2000. The SUR2 gene gene of Arabidopsis thaliana encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 97: 14819-14824.

Bilkey, I.S., S. Karakoc, and N. Aksoz. 2010. Indole-3-acetic and gibberellic acid production in Aspergillus niger. Turkish Journal of Biology. 34: 313-318.

Caron, M., C.L. Patten, and S. Ghosh. 1995. Effects of plant growth promoting rhizobacteria Pseudomonas putida GR-122 on the physiology of Canolla roots. Proceedings of Growth Regulation Society of America 2nd edition. Society press, Madison, Wisconsin.

Chowdhury, A., A. K. Hazra, S. Mahajan, and J. Choudhury. 2007. Microbial Community of Earthworm (*Perionyx excavatus* Perrier) gut, cast and adjacent soil in two different field of west Bengal. Records of the Zoological Survey of India. 107(4): 101-113.

Hasan, H.A.H. 2002. Gibberellin and auxin production by plant root fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Rostlinna Vyroba. 3: 101-106.

Haydon, A.H., W.B. Davis. J.E.L. Arceneaux, and B.R. Byers. 1973. Hydroxamate recognition during iron transport from hydroxamate ironchelates. Jornal of Bacteriology. 115: 912-918.

Hilbert, M., L.M. Voll, Y. Ding, J. Hofmann, M. Sharma, and A. Zuccaro. 2012. Indole derivative production by the root endophyte Piriformospora indica is not required for growth promotion but biotrophic colonization of barley roots. New Phytologist. 196: 520-534.

Holbrook, A.A., W.J. Edge. and F. Bailey. 1961. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. American Chemical Society. 28: 159-167.

Lynch, J.M., D. Vaughan, and R.E. Malcom, 1985. Origin, Nature and Biological Activity of Aliphatic Substances and Growth Hormones Found in Soil Organic Matter and Biological Activity. 16: 151-174.

Mano, Y., and K. Nemoto. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. Journal of Experimental Botany 63: 2853-2872.

Mikkelsen, M.D., C.H. Hansen, U. Wittstock, and B.A. Halkier. 2000. Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxine, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid, Journal of Biological Chemistry. 275: 33712-33717.

Nafisi, M., S. Goregaoker, C.J. Botanga, E. Glawischnig, C.E. Olsen, B.A. Halkier, and J. Glazebrook. 2007. Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxine in camelexin. Plant Cell. 19: 2039-2052.

Srivastava, L.M. 2002. Plant growth and development. Hormones and the Environment. Academic Press. New York.

Suleerak, A., T. Arnat, N. Piyanuch, and R. Pattaraporn. 2016. The Potential of Bacteria Isolated from Earthworm Intestines, Vermicompost and Liquid Vermicompost to Produce Indole- 3- acetic acid (IAA). Journal of Agricultural Technology. 12(2): 229-239

Taiz, L., and E. Zeiger. 2010. Plant physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., California.

Tancho, A. 2013. Natural Farming. Chiang Mai: Trio Advertising and Media Co., Ltd.

Tsavkelova, E.A., T.A. Cherdyntseva, S.G. Botin, and A.l. Netrusov. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiological Research. 162: 69-76.