



การระบุชนิดและคัดกรองรา *Aspergillus* species ละลายฟอสเฟต ที่แยกได้จากดินสามจังหวัดชายแดนใต้ของประเทศไทย

Identification and Screening of Phosphate Solubilizing *Aspergillus* Species Isolated from Soil in the Three Southern Border Provinces of Thailand

อิทธิพล จิตพิทักษ์¹, สายทอง แก้วฉาย², ชนินันท์ พรสุริยา^{1*}

Ithipon Chitphithak¹, Saithong Kaewchai², Chaninun Pornsuriya^{1*}

(Received: Jun 13, 2019; Revised: Sep 23, 2019; Accepted: Oct 11, 2019)

บทคัดย่อ

รา *Aspergillus* มีความสำคัญอย่างยิ่งในระบบนิเวศ งานวิจัยนี้ดำเนินการเพื่อระบุชนิดของรา *Aspergillus* spp. ซึ่งแยกจากดินในจังหวัดนราธิวาส ปัตตานี และยะลา และคัดกรองสายพันธุ์ที่ละลายฟอสเฟตได้ ผลการทดลองแยกรา *Aspergillus* spp. ได้ 43 ไอโซเลตด้วยวิธีเจือจางสารละลายดินเป็นลำดับครั้งละ 10 เท่า บนอาหาร PDA ระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) ได้ 7 ชนิด ได้แก่ *A. aculeatus*, *A. alabamensis*, *A. carbonarius*, *A. clavatus*, *A. japonicus*, *A. niger* และ *A. terreus* การทดสอบการละลายฟอสเฟตของรา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้โดยวิธี halo zone test บนอาหารแข็ง Pikovskaya พบว่า *A. alabamensis* และ *A. carbonarius* สามารถละลายฟอสเฟตได้ดี

คำสำคัญ: รา *Aspergillus* spp. การระบุชนิด ฟอสเฟต

Abstract

Fungi of the genus *Aspergillus* have great importance in ecological systems. This research was conducted to identify *Aspergillus* spp. isolated from soil in Narathiwat, Pattani, and Yala provinces and screen phosphate solubilizing strains. Forty-three species of *Aspergillus* spp. were isolated from soil by ten-fold serial dilution method, and potato dextrose agar (PDA) pour plate method. All isolates were identified, based on morphological characters and nucleotide sequence of the internal transcribed spacers (ITS) and distributed into 7 species, namely: *A. aculeatus*, *A. alabamensis*, *A. carbonarius*, *A. clavatus*, *A. japonicus*, *A. niger* and *A. terreus*. Phosphate solubilizing ability of *Aspergillus* spp., isolated from soil, was screened by halo zone test on Pikovskaya's agar medium. The result revealed that *A. alabamensis* and *A. carbonarius* were able to solubilize phosphate in vitro.

Keywords: *Aspergillus* spp., Identification, Phosphate

¹ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

¹ Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University

² คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

² Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University

* Corresponding author: chaninun.p@psu.ac.th

บทนำ

ฟอสฟอรัส (phosphorus; P) เป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นของพืช โดยพืชใช้ฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบของแหล่งพลังงานในรูป ATP กรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิปิด ไขมัน น้ำตาลฟอสเฟต และโคเอนไซม์ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม การสังเคราะห์และทำลายสารต่างๆ ภายในเซลล์ พืชดูดซึมฟอสฟอรัสจากดินในรูปของฟอสเฟตที่ละลายน้ำ (ออร์โทฟอสเฟตไอออน) อย่างไรก็ตามดินที่เกษตรกรใช้ในการทำเกษตรมักมีฟอสเฟตไอออนในสารละลายดินไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของพืช จึงมีการเติมฟอสฟอรัสในรูปของปุ๋ยเคมีฟอสฟอรัสแก่ดิน แต่อุปสรรคคือฟอสฟอรัสในปุ๋ยที่เติมเปลี่ยนรูปจากฟอสเฟตที่ละลายได้ดี ไปอยู่ในรูปที่ไม่ละลายด้วยกระบวนการตรึงฟอสเฟตทางเคมี เช่น แคลเซียมฟอสเฟต เหล็กฟอสเฟต อลูมิเนียมฟอสเฟต ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของดิน และไอออนของสารต่างๆ ภายในดิน ทำให้พืชนำฟอสเฟตที่ละลายในดินไปใช้ได้น้อย พืชที่ขาดฟอสฟอรัสจะแสดงลักษณะอาการของใบมีสีเขียวคล้ำ ใบล่างมีสีม่วงตามบริเวณขอบใบ รากของพืชจะมีการเจริญเติบโต ทำให้ต้นแคระแกร็น ไม่ออกดอกและผล อย่างไรก็ตามฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายสามารถถูกละลายให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ด้วยกิจกรรมของจุลินทรีย์จำพวกเฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) ในกลุ่มแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีส ที่ย่อยอินทรีย์วัตถุ จุลินทรีย์เหล่านี้สร้างกรดอินทรีย์มาละลายฟอสเฟต มีรายงานว่าราบางชนิดที่สร้างสปอร์สามารถละลายฟอสเฟตได้ และสามารถดำรงชีวิตในดินได้เป็นเวลานาน เช่น *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. และ *Rhizopus* sp. (Mehta, Sharma, Putatunda, & Walia, 2019)

ในปัจจุบันพบว่า *Aspergillus* บางชนิดเป็นราปฏิปักษ์ที่สามารถเข้าทำลายศัตรูพืชอย่างเฉพาะเจาะจง และมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้มีการนำมาใช้ควบคุมรากโรคพืชโดยชีววิธี เช่น รา *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์สามารถใช้ในการควบคุมรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* สาเหตุโรคเหี่ยวของเมลอนได้ (Suarez, Vagas, Lopez, Capel, & Moreno, 2007) หรือ *A. pipensis* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าคอดินของมะเขือเทศ (Petrovic et al., 2016) และ *Aspergillus* บางชนิดสามารถละลายฟอสเฟตได้ เช่น *A. flavus* และ *A. niger* (Arulselvi, Kanimozhi, & Panneerelam, 2018)

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อระบุชนิดของรา *Aspergillus* ที่แยกได้จากดินและทดสอบความสามารถในการย่อยฟอสเฟต เพื่อพัฒนาไปใช้เป็นราที่มีประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง การแยกรา และการระบุชนิด

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่สามจังหวัดชายแดนใต้ จังหวัดนราธิวาส ปัตตานี และยะลา บริเวณที่มีต้นไม้อุดมสมบูรณ์ โดยใช้อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน (soil probe) ขุดดินลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร จำนวน 5 ตำแหน่งรอบๆ ต้นไม้ นำตัวอย่างดินมาผสมกันประมาณ 200-300 กรัม ใส่ในถุงซีปล็อกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 10 °C แล้วนำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการต่อไป

1.2 การแยกราจากดิน

นำดินจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางเป็นลำดับครึ่งละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-5} หยดดินแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA: potato 200 g, dextrose 20 g, agar 17 g, น้ำกลั่น 1000 ml.) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °C) เป็นเวลา 3-7 วัน เชียสเปอร์รา *Aspergillus* spp.



เลี้ยงลงบนอาหาร *Aspergillus Differentiation Medium Base* (HiMedia) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น เทียสปอร์เดี่ยวของรา *Aspergillus* spp. ที่ไม่สร้างสารสีเหลืองอมส้มมาเลี้ยงลงบนอาหาร เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (วิทยาเขตหาดใหญ่)

1.3 การระบุชนิดราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA (HiMedia) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ดัดชิ้นอาหารที่มีราเจริญอยู่ขนาด 5x5 มล. วางบนแผ่นสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน เมื่อราเจริญไปตามสไลด์และกระจกปิดสไลด์แล้วจึงนำชิ้นรานอก นำแผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์มาทำสไลด์กึ่งถาวร จัดบันทึกลักษณะและถ่ายภาพโครงสร้างราใต้กล้องจุลทรรศน์ (Leica DM750, Germany) ที่ประกอบด้วยกล้องถ่ายภาพ (Leica MD170 HD, Germany) วัดขนาดโครงสร้างสืบพันธุ์ของเชื้อราจากภาพถ่ายด้วย Leica application suite (LAS software version 4.9.0) เปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง Taxonomic studies on the genus *Aspergillus* (Samson, Noonim, Meijer, Houbraken, Frisvad, & Varga, 2007)

นำเชื้อบริสุทธิ์มาสกัด DNA ตามวิธีของ (Saitoh, Togashi, & Arie, 2006) ตรวจหา DNA โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล (agarose gel) กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงยูวี UV transilluminator (GenedireX, Taiwan) เพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ที่ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS1-5.8-ITS2) ด้วยคูไพรเมอร์ ITS1/ITS4 (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990) โดยปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA 2 ไมโครลิตร forward primer 1 ไมโครลิตร reverse primer 1 ไมโครลิตร Dream Taq (Thermo Scientific) 12.5 ไมโครลิตร Rnase-free water 8.5 ไมโครลิตร นำหลอด PCR ใส่เครื่อง Thermal cycler (BIO-RAD T100TM, USA) ตั้งเวลาและอุณหภูมิดังนี้ Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ ตามด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 5 นาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ Final extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจหา PCR product โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่ง PCR product ไปยังบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลีใต้) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับมาเทียบหาชนิดของราใน GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเทียบกับรา *Aspergillus* spp. ไอโซเลตต้นแบบ (ex-type) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างราสกุล *Aspergillus* spp. จากฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 1) ที่มีความใกล้เคียงกับชนิดของราที่ได้จากการทดลองนี้มาจัดเรียง (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) และตรวจสอบผลที่ได้อีกครั้งด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.3 (Noth Carolina State University, U.S.A.) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, & Kumar, 2011) โดยใช้โปรแกรม MEGA v. 7.0 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016) กำหนดค่า bootstrap analysis เท่ากับ 1,000 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อใช้ในการจัดจำแนกต่อไป เมื่อระบุชนิดที่ถูกต้องได้แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank เพื่อขอเลขทะเบียน (accession NO.)

ตารางที่ 1 รา *Aspergillus* spp. จากฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	ไอโซเลต	ITS Accession NO.
<i>A. aculeatus</i>	tropical soil, unknown origin	CBS 172.66 ^T	NR_111412
<i>A. alabamensis</i>	soil, Argentina	CBS 125693 ^T	MH875099
<i>A. allahabadii</i>	garden soil, Allahabad, India	CBS 164.63 ^T	MH869852
<i>A. carbonarius</i>	paper, origin unknown	CBS 111.26 ^T	MH866354
<i>A. clavatus</i>	cotton, potatoes, Japan	CBS 513.65 ^T	MH870334
<i>A. japonicus</i>	saito 5087, origin unknown	CBS 114.51 ^T	NW_020291800
<i>A. niger</i>	Connecticut, USA	CBS 554.65 ^T	MH870353
<i>A. solicola</i>	soil, unknown origin	NRRL 35723 ^T	NR_137493
<i>A. terreus</i>	soil, Connecticut, USA	CBS 601.65 ^T	MH870368
<i>F. solani</i>	pea crop, Europe	U38558.1 ^T	U38558

T = Ext Type, Out group is *Fusarium solani*

2. การคัดกรองรา *Aspergillus* spp. ละลายฟอสเฟต

สุ่มเลือกรา *Aspergillus* ที่แยกได้จากดินในจังหวัดยะลาชนิดละ 1 ไอโซเลต มาทดสอบการละลายฟอสเฟต โดยใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีของรา *Aspergillus* sp. ที่มีอายุ 7 วันบนอาหาร PDA มาวางลงบนจุดกึ่งกลางของจานอาหาร Pikovskaya's medium (HiMedia) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีของวงใสและรัศมีของโคโลนีเพื่อนำมาคำนวณหาค่า Halo: Colony ratio ดังนี้ $\text{Halo : Colony ratio} = (\text{Colony diameter} + \text{Halo zone diameter}) / \text{Colony diameter}$ (Premono, Moawad, & Vlek, 1996) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's HSD test $P \leq 0.05$

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง การแยกและการระบุชนิด

แยกรา *Aspergillus* spp. จากดินสามจังหวัดชายแดนใต้ได้รา 43 ไอโซเลต ระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA บริเวณ ITS ได้ 7 ชนิด ได้แก่ *A. aculeatus*, *A. alabamensis*, *A. carbonarius*, *A. clavatus*, *A. japonicus*, *A. niger* และ *A. terreus* (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1) ซึ่งมีเลขทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank LC496490-LC496504 (ภาพที่ 2) ราที่แยกได้เป็นชนิดเดียวกับที่ Klich (2002) ได้รายงานไว้ว่าเป็นรา *Aspergillus* ที่พบได้ในดิน และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากดินในจังหวัดยะลา (เป็นตัวแทนของรา *Aspergillus* แต่ละชนิด) สามารถจัดกลุ่มชนิดของรา *Aspergillus* spp. ได้สอดคล้องกับการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ มีเพียงรา *A. aculeatus* และ *A. japonicus* เท่านั้นที่ไม่สามารถจัดกลุ่มออกจากกันได้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (ภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Varga, Frisvad, Kocsabé, Brankovics, Tóth, Szigeti, & Samson, 2011) ที่ไม่สามารถจัดกลุ่มรา *A. aculeatus* และ *A. japonicus* รวมถึงรา *Aspergillus* spp. ใน *A. aculeatus* clade ออกจากกันได้โดยการสร้างไฟโลเจเนติกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แต่สามารถแยกรา *Aspergillus* ใน clade นี้ออกจากกันได้โดยการสร้างไฟโลเจเนติกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *clamodulin* และ *β-tubulin*



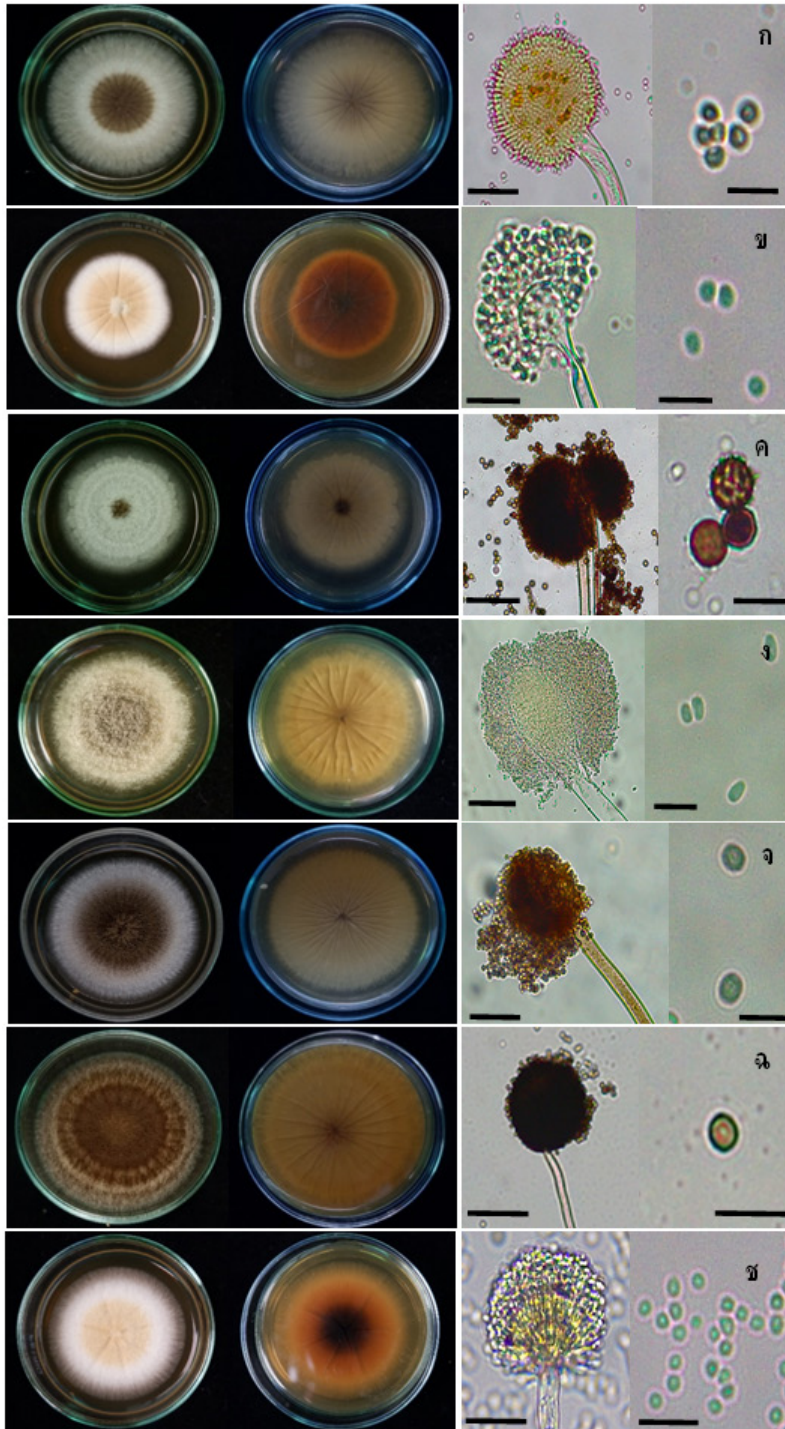
ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Aspergillus* spp. จำนวน 7 ชนิด ที่แยกได้จากดิน

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์	ชนิด	ภาพที่ 1
YLA (2,6,13*) NTW (1,3) PTN (11,16,17)	The colony is dark to dark brown in the middle, surrounded by white hypha.	Conidia are brown Conidiophore has smooth and small walls.	<i>A. aculeatus</i>	ก
YLA (11*,14) NTW (7) PTN (19,20)	The young white colonies are then yellowed with brown cinnamon.	Conidiophore large, smooth skin, smooth conidia, smooth elliptic conidia	<i>A. alabamensis</i>	ข
YLA (4*) PTN (3)	Colony is carbon black. At first, it is yellow, and when it is older, it turns brown to black.	Conidiophore, long, colorless, vesicle, rounded shape, sterigma, brown, covering both vesicle conidia, smooth shape	<i>A. carbonarius</i>	ค
YLA (8*) PTN (15)	Small colonies, bluish-grey green in colour	Vesicles are large, with thick phialides.	<i>A. clavatus</i>	ง
YLA (5*,7,10) NTW (6,8) PTN (4,5,14)	Colonies are white with brown in the middle.	Conidia has a circular shape.	<i>A. japonicus</i>	จ
YLA (1*,3,9,15) NTW (2,4,5) PTN (1,2,6,8,9,12,13,18)	The black colonies in the middle are darker and fainter until the edges are visible. The conidial head is clear and the long conidiophore stalks.	Vesicle has a rounded sterigma shape, covering both vesicle conidia.	<i>A. niger</i>	ฉ
YLA (12*) PTN (7,10)	Dietary fiber Colonies are yellowish brown. In the middle of the colony, the conidial head grows densely.	Conidiophore colorless, slightly below the vesicle, slightly rounded, conidia-shaped, round, smooth and creamy.	<i>A. terreus</i>	ช

YLA = ยะลา NTW = นราธิวาส PTN = ปัตตานี

ตัวหนา = ไอโซเลทที่นำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

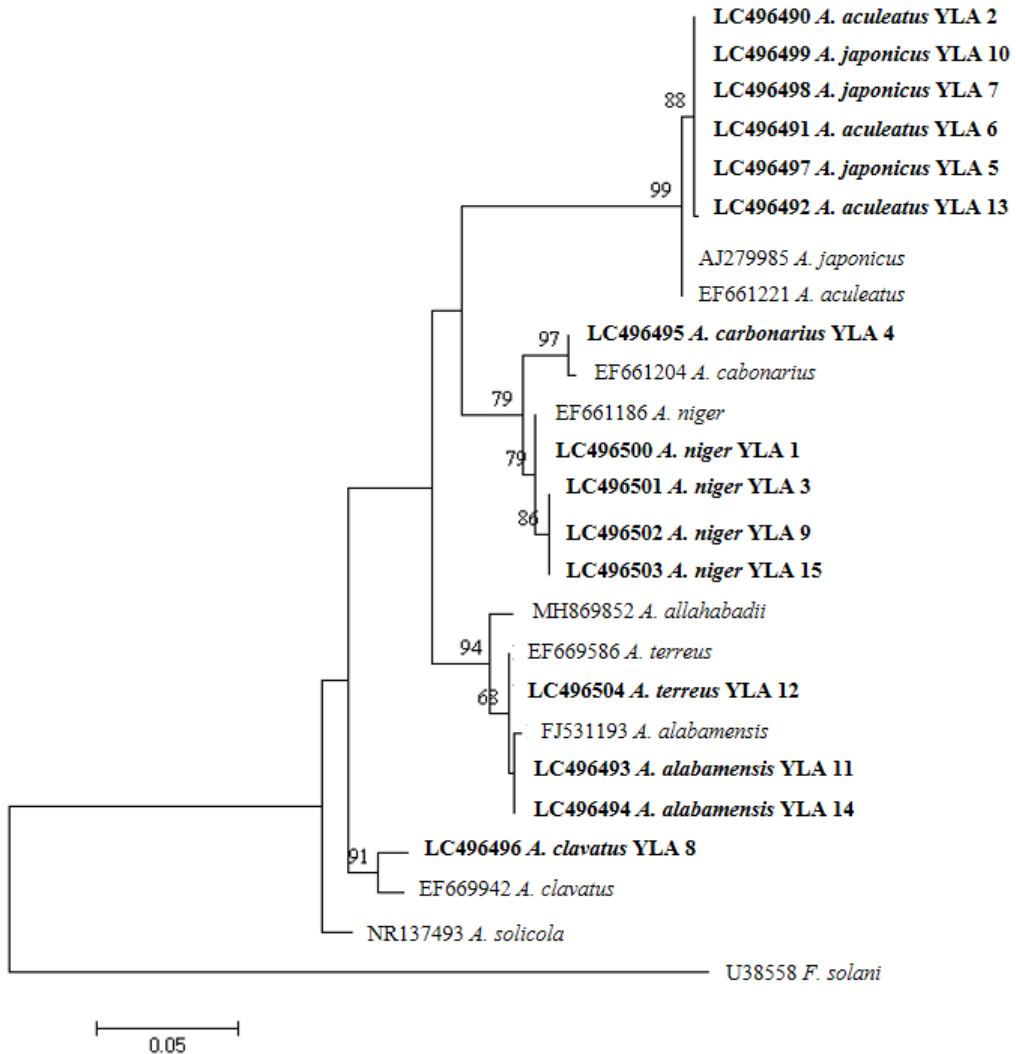
*ไอโซเลทที่นำไปทดสอบการละลายฟอสเฟต



ภาพที่ 1 ลักษณะด้านบนและล่างโคโลนี เวกิลและโคนเดี่ยวของรา *Aspergillus* spp.

ก. *A. aculeatus*, ข. *A. alabamensis*, ค. *A. carbonarius*, ง. *A. clavatus*, จ. *A. japonicus*,

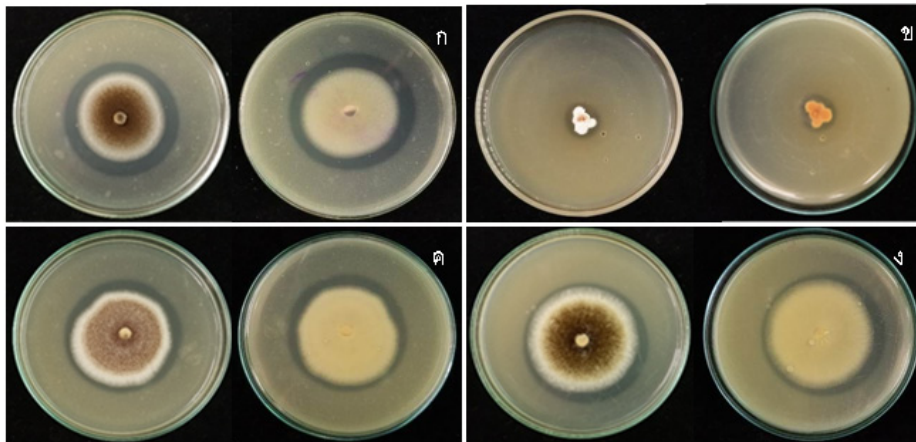
ฉ. *A. niger* และ ช. *A. terreus* สเกลบาร์ภาพเวกิล = 20 ไมครอน และภาพโคนเดี่ยว = 10 ไมครอน



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *Aspergillus* spp. จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) และค่า bootstrap ของรา *Aspergillus* spp.

2. การคัดกรองรา *Aspergillus* spp. ละลายฟอสเฟต

รา *Aspergillus* spp. 4 ไอโซเลท ได้แก่ *A. aculeatus* YLA13, *A. alabamensis* YLA11, *A. carbonarius* YLA4 และ *A. niger* YLA1 สามารถละลายฟอสเฟตได้ โดยเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีบนอาหาร Pikovskaya's medium (ภาพที่ 3) ส่วนอีก 3 ไอโซเลท (YAL5, YAL8 และ YAL12) ไม่สามารถละลายฟอสเฟตได้ (ไม่เกิดวงใส) วงใสรอบโคโลนีเกิดจากในอาหาร Pikovskaya นั้นมีแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) เป็นส่วนผสมอยู่ซึ่งเป็นแหล่งของฟอสเฟตอย่างเดียวนั้นมีในอาหาร และจากการทดสอบพบว่า *A. carbonarius* YLA4 และ *A. alabamensis* YLA11 สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 1.40 และ 1.33 เซนติเมตร (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับที่ (Hefnawy, Gharieb, Eissa, & Ammar, 2009) รายงานไว้ว่ารา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากดิน ได้แก่ *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus* และ *A. flavus* สามารถละลายฟอสเฟตได้



ภาพที่ 3 ลักษณะด้านบนและล่างของวงไฮโรบโคโลนีรา *Aspergillus* spp. ที่ละลายฟอสเฟตได้บนอาหาร Pikovskaya
ก. *A. aculeatus* YLA13 ข. *A. alabamensis* YLA11 ค. *A. carbonarius* YLA4 ง. *A. niger* YLA1

ตารางที่ 3 ค่า Halo : Colony ratio ของรา *Aspergillus* spp. ที่ละลายฟอสเฟตได้

ไอโซเลต	Halo: Colony ratio (ซม.) ¹
<i>A. aculeatus</i> YLA13	1.15 ± 0.09b
<i>A. alabamensis</i> YLA11	1.33 ± 0.08ab
<i>A. carbonarius</i> YLA4	1.40 ± 0.10a
<i>A. niger</i> YLA1	1.14 ± 0.07b
Agar plug (control)	0 ± 0.00c

1 Value are the mean ± SD from 3 replications

The value in the column followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's HSD test

$P < 0.05$

สรุป

จากการทดลองแยกจากดินจากจังหวัดนราธิวาส บัตตานี และยะลา ได้เชื้อราจำแนก *Aspergillus* จำนวน 43 ไอโซเลต สามารถระบุชนิด *Aspergillus* spp. ได้ 7 ชนิด ได้แก่ *A. aculeatus*, *A. alabamensis*, *A. carbonarius*, *A. clavatus*, *A. japonicus*, *A. niger* และ *A. terreus* โดยที่รา *A. carbonarius* YLA14 และ *A. alabamensis* YLA11 สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีค่า Halo: colony ratio เท่ากับ 1.40 และ 1.33 เซนติเมตร ตามลำดับ ราทั้งสองชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นตัวช่วยละลายฟอสเฟตในดิน เพื่อให้พืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และเพิ่มประสิทธิภาพการเป็นมูลของหินฟอสเฟตในดินที่มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่ำ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากสถานีวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองต่อไปจะนำทั้งสองชนิดไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชในดิน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชร่วมกับการละลายฟอสเฟต

รายการอ้างอิง (References)

- Arulselvi, T., Kanimozhi, G. & Panneerselvam, A. (2018). Isolation and characterization of phosphate solubilizing fungi from the soil sample of Muthupet mangroves. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, 4(9), 30 – 37.
- Hefnawy, A.M., Gharieb, M.M., Eissa, A.O. & Ammar, M.A. (2009). Evolution and optimization of rock phosphate and tricalcium phosphate solubilization by some soil fungi. *The Egyptian Society of Experimental Biology*, 5, 75 – 84.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870 – 1874.
- Klich, M.A. (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 94(1), 21 – 27.
- Mehta, P., Sharma, R., Putatunda, C., Walia, A. (2019). Endophytic fungi: role in phosphate solubilization. In Singh, B. (editor), *Advances in Endophytic Fungal Research*. (pp.183 – 209). Fungal Biology: Springer, Cham.
- Petrovic, J.J., Jeremic, S., Vuckovic, I., Vojnovic, S., Bulajic, A., Raicevic, V. et al., (2016). *Aspergillus piperis* A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen. *Pythium aphanidermatum Archives of Biological Sciences*, 68(2), 279–289.
- Premono, M.E., Moawad, A.M. & Vlek, P.L.G. (1996). Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*, 11(1), 13 - 23.
- Saitoh, K.I., Togashi, K. & Arie, T. (2006). A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology*, 72(6), 348 – 350.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbaken, J., Frisvad, J.C. & Varga, J. (2007). Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in Mycology*, 59, 129-145.
- Suarez, E.F., Vargas, G.C., Lopez M.J., Capel, C. & Moreno, J. (2007). Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f sp. melonis. *Crop Protection*, 26(1), 46-53.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739



- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. et al., (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 69(1), 1-17.
- White, J.T., Bruns, D.T., Lee, B.S. & Taylor, J.W. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (editor), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (pp.315-322). New York: Academic Press.