Proceedings of
The 5th National Meeting on Biodiversity Management in Thailand
การประชุมวิชาการการบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 5 (2018) : 120 – 126

ความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้ป่าในกลุ่มป่าภูเขียว-น้ำหนาว และศักยภาพในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

วินันท์ดา หิมะมาน[1,*], กรรณิการ์ ดวงมาลย์[2], สุพัตรา อารีจันทวัฒน์[1], ปานรดา แจ้งสันเทียะ[1], บารมี สกลรักษ์[3], กิตติมา ด้วงแค[4], กฤษณา พงษ์พานิช[1]

[1]ส่วนวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้, สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[3]สำนักงานหอพรรณไม้, สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช
[4]ห้องรองอธิบดีกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (นายปิ่นสักก์ สุรัสวดี), กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช
*อีเมลล์ผู้รับผิดชอบบทความ : winandah@gmail.com

บทคัดย่อ: แอคติโนมัยสีท 121 ไอโซเลตคัดแยกจากรากกล้วยไม้ป่า โดยใช้อาหาร starch casein agar และ humic acid vitamin agar การศึกษาชนิดของกรด diaminopimelic (DAP) ในผนังเซลล์พบว่า 84 ไอโซเลต (69.4 เปอร์เซ็นต์) มี *LL*-DAP เป็นองค์ประกอบ จัดเป็นกลุ่มสเตรปโตมัยสีท และแอคติโนมัยสีท 37 ไอโซเลต (30.6 เปอร์เซ็นต์) มี *meso*-DAP จัดเป็นกลุ่มที่ไม่ใช่สเตรปโตมัยสีท การจัดกลุ่มสเตรปโตมัยสีทตามสีสปอร์จัดได้ 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มสร้างสปอร์สีเทา เขียว ขาว และเหลือง การศึกษาความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าแอคติโนมัยสีท 100 ไอโซเลต (82.6 เปอร์เซ็นต์) และ 38 ไอโซเลต (31.4 เปอร์เซ็นต์) สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ และละลายฟอสเฟตได้ ตามลำดับ และนำแอคติโนมัยสีท 5 ไอโซเลตที่สร้างไซเดอโรฟอร์และละลายฟอสเฟตได้ไปศึกษาต่อ พบว่าสามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติกได้ คัดเลือกแอคติโนมัยสีท 27 ไอโซเลตที่เป็นตัวแทนกลุ่มมาจำแนกชนิด โดย ศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA จำแนกได้เป็น 16 ชนิด ได้แก่ *Actinomycetospora succinea*, *Amycolatopsis bartoniae, Micromonospora aurantiaca, Micromonospora avicenniae, Micromonospora chaiyaphumensis, Micromonospora haikouensis, Micromonospora halotolerans, Micromonospora humi, Micromonospora olivasterospora, Micromonospora terminaliae, Micromonospora tulbaghiae, Micromonospora schwarzwaldensis, Streptomyces cinerochromogenes, Streptomyces glomeratus, Streptomyces nanshensis* และ *Streptomyces similanensis*

คำสำคัญ: แอคติโนมัยสีท, เอนโดไฟต์, ความหลากหลาย, สารส่งเสริมการเจริญของพืช, ลำดับดีเอ็นเอ

Biodiversity of Endophytic Actinomycetes from Wild Orchids in Phu Khiao-Nam Nao Forest Complex and Potential Production for Plant Growth Promoting Agents

Winanda Himaman[1,*], Kannika Duangmal[2], Supattra Areejanthawat[1], Panrada Jangsantear[1], Baramee Sakolrak[3], Kittima Duengkae[4], Krisna Pongpanich[1]

[1]Forest Conservation Research Division, Forest and Plant Conservation Research Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation (DNP) [2]Departmant of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University [3]Office of the Forest Herbarium, Forest and Plant Conservation Research Office, DNP [4]Office of Deputy Director General (Dr. Pinsak Suraswadi), DNP

Corresponding author e-mail: winandah@gmail.com

Abstract: One hundred and twenty one actinomycete strains were successfully isolated from wild orchid roots using starch casein agar and humic acid vitamin agar. The isomer type of diaminopimelic acid (DAP) in whole-organism hydrolysates of the isolates and mycelial formation were examined. Eighty four isolates (69.4 %) contained the *LL*–isomer of DAP, a result consistent with their assignment to the streptomycete group. The remaining 37 isolates (31.4 %) were assigned to the non–streptomycete group based on the presence of *meso*–isomer of DAP. These streptomycete group was assigned to 4 spore-colour groups, which were gray, green, white and yellow. All isolates were tested for their abilities to produce siderophores and solubilise phosphate. Most isolates (100, 82.6 %) produced siderophores. Thirty eight isolates (31.4 %) solubilised phosphate. Five isolates which produced siderophores and solubilise phosphate also produced indole-3-acetic acid. 16S rRNA gene analysis of the representative of these two groups revealed that 27 isolates belonged to 16 species such as *Actinomycetospora succinea*, *Amycolatopsis bartoniae*, *Micromonospora aurantiaca*, *Micromonospora avicenniae*, *Micromonospora chaiyaphumensis*, *Micromonospora haikouensis*, *Micromonospora halotolerans*, *Micromonospora humi*, *Micromonospora olivasterospora*, *Micromonospora terminaliae*, *Micromonospora tulbaghiae*, *Micromonospora schwarzwaldensis, Streptomyces cinerochromogenes*, *Streptomyces glomeratus*, *Streptomyces nanshensis* and *Streptomyces similanensis.*

Keywords: Actinomycetes, Endophyte, Diversity, Plant Growth Promoting Agents, DNA Sequence

บทนำ

จุลินทรีย์เป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในต้นพืชและไม่ทำอันตรายแก่พืชที่อาศัยอยู่ที่เรียกว่า เอนโดไฟต์ (endophyte) แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกพบมากในดินและมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และยังสามารถพบในส่วนต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อพืชด้วย บทบาทที่สำคัญของแอคติโนมัยสีทในระบบนิเวศคือ ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารในธรรมชาติ และผลิตสารทุติยภูมิหลากหลายชนิดที่ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้แก่ เกษตร เภสัชกรรม และอุตสาหกรรม เป็นต้น

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง กลุ่มป่าภูเขียว–น้ำหนาว จัดเป็นกลุ่มป่าที่สมบูรณ์ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีพื้นที่ประมาณ 4.99 ล้านไร่ และมีระบบนิเวศที่หลากหลาย ดังนั้นจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทจากกลุ่มป่าภูเขียวและน้ำหนาวจึงน่าที่จะมีชนิดพันธุ์ที่หลากหลายสูงตามไปด้วย โดยเฉพาะกลุ่มของแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในกล้วยไม้ป่าที่มีแหล่งอาศัยที่กระจายตัวไปตามความแตกต่างกันของระบบนิเวศวิทยา ที่ผ่านมา การศึกษาข้อมูลของชนิดพันธุ์ของแอคติโนมัยสีทและการใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในด้านป่าไม้ในประเทศไทยยังมีอยู่ในวงที่จำกัด รากของกล้วยไม้ป่าจึงเป็นอีกแหล่งที่น่าสนใจในการคัดแยกแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญของพืชต่อไป

วิธีการ

การเก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้ ได้แก่ สกุลเอื้อง (เอื้องหนวดพราหมณ์ เอื้องตาเหิน เอื้องดอกมะขาม) สกุลช้าง กล้วยไม้ดิน โดยเลือกจากต้นที่สมบูรณ์มีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในเขตอุทยานแห่งชาติภูเรือ จังหวัดเลย อุทยานแห่งชาติน้ำพอง และ อุทยานแห่งชาติภูเวียง จังหวัดขอนแก่น

การแยกแอคติโนมัยสีทจากรากและเก็บเชื้อแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์

นำตัวอย่างรากมาล้างกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิวราก (surface sterilization) ตามวิธีของ Himaman *et al.* (2016) แล้วนำรากที่ผ่านขั้นตอนการล้างแล้วมาบดในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร starch casein agar (SCA) และ humic acid-vitamin agar (HV) ที่เติมสารปฏิชีวนะ nalidixic acid (25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ ketoconazole (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและรา ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-30 วัน เขี่ยโคโลนีแอคติโนมัยสีทมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร glucose yeast extract (GYE) เก็บรักษาแอคติโนมัยสีทบนอาหารผิวเอียง GYE ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนการเก็บรักษาเชื้อระยะยาวทำการขูดสปอร์และเส้นใยใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ผสมให้เข้ากันและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Wellington and Williams, 1978)

การจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่แยกได้

วิเคราะห์ไอโซเมอร์ของ DAP โดยใช้วิธีดัดแปลงของ Becker *et al.* (1964) และ Hasegawa *et al.* (1983) และศึกษาสีสปอร์ สีเส้นใย และสีรงควัตถุที่ละลายน้ำตามวิธีของ Shirling and Gottlieb (1966) แล้วจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีท

การศึกษาความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์ การละลายฟอสเฟต และการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติก

ศึกษาการสร้างไซเดอโรฟอร์ตามวิธีของ Schwyn and Neilands (1987) การเปลี่ยนฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่ละลายได้ตามวิธีของ Gaur (1990) และการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติกตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Khamna *et al*. (2009)

การศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA เพื่อระบุชนิดแอคติโนมัยสีท

เลือกแอคติโมสีทจากตัวอย่างรากกล้วยไม้ให้ครอบคลุมทุกตัวอย่างจากแหล่งเก็บตัวอย่างรากทั้ง 3 แห่ง รวมทั้งมีสีสปอร์ สีเส้นใย และสีรงควัตถุที่ละลายน้ำแตกต่างกัน เพื่อเป็นตัวแทนจากกลุ่มสเตรปโตมัยสีทและกลุ่มที่ไม่ใช่สเตรปโตมัยสีท นำมาจัดจำแนกชนิดโดยศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-‘3) และไพรเมอร์ 1492R (5’- TACGGYTACCTTGTTACGACTT -‘3) แล้วนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูล 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในฐานข้อมูล ezbiocloud (https://www.ezbiocloud.net/) (Yoon *et al*., 2017)

ผลการศึกษา

รากกล้วยไม้ป่าที่นำมาศึกษา

เก็บรากกล้วยไม้ป่า 70 ตัวอย่าง จากอุทยานแห่งชาติภูเรือ (25 ตัวอย่าง) อุทยานแห่งชาติน้ำพอง (36 ตัวอย่าง) และอุทยานแห่งชาติภูเวียง (9 ตัวอย่าง)

การแยกแอคติโนมัยสีทจากรากกล้วยไม้ป่า

คัดแยกแอคติโนมัยสีท 121 ไอโซเลต โดยสามารถมองเห็นโคโลนีแอคติโนมัยสีทด้วยตาเปล่ากระจายบนอาหารคัดเลือกที่เกลี่ยด้วยสารแขวนลอยรากบด โคโลนีส่วนใหญ่มีสีขาวลักษณะแข็งและฝังลงในเนื้อวุ้น ต่อมาสร้างสปอร์สีขาวหรือสีเทาคล้ายผงแป้ง เมื่อบ่มนานประมาณ 1-3 สัปดาห์ พบโคโลนีสีส้ม แดง หรือดำ ซึ่งมีลักษณะโคโลนีมัน เยิ้ม แตกต่างจากลักษณะของโคโลนีแอคติโนมัยสีทที่พบโดยทั่วไป

จากการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากรากกล้วยไม้ป่าบางตัวอย่างไม่พบแอคติโนมัยสีท อาจเป็นเพราะชิ้นรากที่นำมาศึกษานั้นไม่มีแอคติโนมัยสีทเข้าอยู่อาศัย หรือมีแอคติโนมัยสีท แต่สภาวะในการคัดแยกและเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ เช่น อาหารที่ใช้คัดแยก วิธีการแยกเชื้อ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้บ่ม เป็นต้น ในการศึกษาได้ทดลองใช้ชิ้นรากกล้วยไม้ที่ถูกบดเป็นชิ้นขนาดเล็ก วางบนผิวหน้าอาหารทดสอบ พบว่า ตัวอย่างชิ้นรากทั้งหมดมีการปนเปื้อนของรา ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* เจริญปกคลุมชิ้นราก ทำให้ไม่พบแอคติโนมัยสีทซึ่งมีการเจริญที่ค่อนข้างช้า การคัดแยกแอคติโนมัยสีทให้บริสุทธิ์จึงเป็นไปได้ยาก วิธีการแยกแอคติโนมัยสีทและอาหารที่ใช้คัดแยกและเพาะเลี้ยงแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการแยกว่าต้องการได้เชื้อกลุ่มไหน โดยทั่วไปสูตรอาหารที่นิยมใช้ ได้แก่ starch-casein agar (Küster and Williams, 1964) humic acid-vitamin (HV) agar ซึ่งเหมาะสำหรับแยกแอคติโนมัยสีทกลุ่มหายาก ได้แก่ *Microbispora*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* และ *Dactylosporangium* (Hayakawa and Nonomura, 1987) อาหารที่ใช้ในการแยกแอคติโนมัยสีทจำเป็นต้องมีการเติมสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรีย มีรายงานการใช้สารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ได้แก่ nystatin, cyclohexamide และ nalidixic acid (Khamna *et al*., 2009)

ผลการจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีท

ผลวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของ DAP พบว่าแอคติโนมัยสีท 84 ไอโซเลต (69.4 เปอร์เซ็นต์) มี *LL*-DAP เป็นองค์ประกอบจัดเป็นกลุ่มสเตรปโตมัยสีท และแอคติโนมัยสีท 37 ไอโซเลต (30.6 เปอร์เซ็นต์) ที่มี *meso*-DAP จัดเป็นกลุ่มที่ไม่ใช่สเตรปโตมัยสีท (non-streptomycete) และจัดกลุ่มสเตรปโตมัยสีทตามสีสปอร์ได้ 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่สร้างสปอร์สีเทา เขียว ขาว และเหลือง ซึ่งการคัดแยก แอคติโนมัยสีทมักพบแอคติโนมัยสีทในกลุ่มสเตรปโตมัยสีทมากกว่ากลุ่ม *meso*-DAP โดยพบแอคติโนมัยสีทสร้างสปอร์สีเทาเป็นจำนวนมากที่สุด 51 ไอโซเลต (60.7 เปอร์เซ็นต์) แอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่สร้างเส้นใยอาหารเทา ไม่พบการสร้างรงควัตถุ จำนวน 41 ไอโซเลต (48.8 เปอร์เซ็นต์)

การศึกษาความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์ การละลายฟอสเฟต และการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติก

แอคติโนมัยสีทจำนวน 100 ไอโซเลต (82.6 เปอร์เซ็นต์) และ 38 ไอโซเลต (31.4 เปอร์เซ็นต์) สามารถผลิตไซเดอโรฟอร์และละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์และละลายฟอสเฟตสูงจำนวน 5 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติก พบว่าแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกทั้งหมดสามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติกได้ ตามตารางที่ 1

การผลิตไซเดอโรฟอร์เกิดขึ้นเมื่อแอคติโนมัยสีทอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีธาตุเหล็กในปริมาณต่ำ (Lee *et al*., 2012) ขณะที่การละลายฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์นั้นมีหลายกลไกเข้ามาเกี่ยวข้อง แต่ส่วนใหญ่มาจากการสร้างกรดอินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำ ซึ่งจุลินทรีย์จะผลิตกรดออกมา แล้วเปลี่ยนรูปฟอสเฟตที่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ (Ivanova *et al*., 2006) ปัจจัยหลักที่มีต่อกลไกการสังเคราะห์กรดอินโดล-3-แอซิติกของแบคทีเรีย ได้แก่ สภาพแวดล้อมที่มีความเครียด (ดินเป็น

กรด ความเครียดออสโมติก (osmotic stress) และการจำกัดของคาร์บอน (carbon limitation) (Spaepen *et al*., 2007) ดังนั้นปริมาณธาตุอาหารและสิ่งแวดล้อมของดินจึงเป็นปัจจัยหนึ่งในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแอคติโนมัยสีท

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแอคติโนมัยสีท

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ด้วยเทคนิค PCR และ ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส

แอคติโนมัยสีท 27 ไอโซเลต จัดในกลุ่มที่มี *LL*-DAP เป็นองค์ประกอบ 10 ไอโซเลต และกลุ่มที่มี *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบ 17 ไอโซเลต จัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Streptomyces cinerochromogenes* (2 ไอโซเลต) *Streptomyces glomeratus* (1 ไอโซเลต) *Streptomyces nanshensis* (5 ไอโซเลต) และ *Streptomyces similanensis* (2 ไอโซเลต) ส่วนสายพันธุ์ที่มี *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบ พบว่าจัดอยู่ใน *Actinomycetospora succinea* (1 ไอโซเลต), *Amycolatopsis bartoniae* (1 ไอโซเลต), *Micromonospora aurantiaca* (1 ไอโซเลต), *Micromonospora avicenniae* (1 ไอโซเลต), *Micromonospora chaiyaphumensis* (1 ไอโซเลต), *Micromonospora haikouensis* (1 ไอโซเลต), *Micromonospora halotolerans* (1 ไอโซเลต), *Micromonospora humi* (1 ไอโซเลต), *Micromonospora olivasterospora* (1 ไอโซเลต), *Micromonospora schwarzwaldensis* (4 ไอโซเลต), *Micromonospora terminaliae* (1 ไอโซเลต) และ *Micromonospora tulbaghiae* (3 ไอโซเลต) รายละเอียดตามตารางที่ 2 ทั้งนี้ผลศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า HCS5H6 คล้ายคลึงกับ *Amycolatopsis bartoniae* SF26 (T) 97.39 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดใหม่ของโลก ซึ่งจะได้มีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้จำแนกสายพันธุ์ของแอคติโนมัยสีททุกไอโซเลตที่คัดแยกได้ จึงไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนถึงความจำเพาะระหว่างชนิดของกล้วยไม้ป่ากับสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่มนี้ ในเบื้องต้นพบรากเอื้องหนวดพราหมณ์เป็นแหล่งอาศัยที่สำคัญของแอคติโนมัยสีทโดยเฉพาะในสกุล *Micromonospora*

บทสรุป

การศึกษาครั้งนี้คัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ 121 ไอโซเลต ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่า แอคติโนมัยสีท 100 ไอโซเลต (82.6 เปอร์เซ็นต์) สามารถสร้างไซเดอโรฟอร์ได้ และแอคติโนมัยสีท 38 ไอโซเลต (31.4 เปอร์เซ็นต์) มีความสามารถละลายฟอสเฟตได้ และเมื่อคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สร้างไซเดอโรฟอร์และละลายฟอสเฟตสูง 5 ไอโซเลตไปทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติก พบว่าแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกทั้งหมดสามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติกได้ จึงมีแนวโน้มในการใช้แอคติโนมัยสีทเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชได้ จำแนกชนิดของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้โดยศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA (ช่วงความยาว 1.1-1.4 กิโลเบส) จำแนกได้เป็น *Actinomycetospora succinea*, *Amycolatopsis bartoniae*, *Micromonospora aurantiaca*, *Micromonospora avicenniae*, *Micromonospora chaiyaphumensis*, *Micromonospora haikouensis*, *Micromonospora halotolerans*, *Micromonospora humi*, *Micromonospora olivasterospora*, *Micromonospora terminaliae*, *Micromonospora tulbaghiae*, *Micromonospora schwarzwaldensis*, *Streptomyces cinerochromogenes*, *Streptomyces glomeratus*, *Streptomyces nanshensis* และ *Streptomyces similanensis* กล่าวได้ว่ารากกล้วยไม้ป่าในพื้นที่กลุ่มป่าภูเขียว-น้ำหนาวจัดเป็นแหล่งหนึ่งที่พบว่ามีความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทสูง

กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จากหัวหน้าอุทยานแห่งชาติ รวมถึงเจ้าหน้าที่ในอุทยานแห่งชาติภูเรือ อุทยานแห่งชาติน้ำพอง และอุทยานแห่งชาติภูเวียง เป็นอย่างดีมาโดยตลอด ขอขอบคุณที่ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานภาคสนาม

เอกสารอ้างอิง

Becker, B., Lechevalier, M. P., Gordon, R. E., and Lechevalier, H. A. 1964. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole–cell hydrolysates. Appl. Microbiol. 12: 421–423.

Gaur, A. C. 1990. Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizer. Omega Scientific Publishers, New Delhi.

Hasegawa, T., Takizawa, M., and Tanida, S. 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. J. Gen. Appl. Microbiol. 29: 319–322.

Hayagawa, M., and Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J. Ferment. Technol. 65: 501–509.

Himaman, W., Thamchaipenet, A., Pathom-aree, W., and Duangmal, K. 2016. Actinomycetes from *Eucalyptus* and their biological activities for controlling *Eucalyptus* leaf and shoot blight. Microbiol. Res. 169: 59–65.

Ivanova, R., Bojinova, D., and Nedialkova, K. 2006. Rock phosphate solubilization by soil bacteria. J. Univ. Chem. Technol. Metallurgy 41: 297–302.

Khamna, S., Yokota, A., and Lumyong, S. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soil: diversity and screening of antifungal compound, indole-3-acetic acid and siderophore production. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 649–655.

Küster, E., and Williams, S. T. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. Nature 202: 928–929.

Lee, J., Postmaster, A., Soon, H. P., Keast, D., and Carson, K. C. 2012. Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. BioMetals 25: 285–296.

Schwyn, B., and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochem. 160: 47–56.

Shirling, E. B., and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313–340.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. FEMS Microbial. Rev. 31: 425–448.

Wellington, M.H., and Williams, T. 1978. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. Microbios Letters 6: 151–157.

Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. 2017. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67: 1613–1617.

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทในการสร้างไซเดอร์โรฟอร์ กรดอินโดล-3-แอซิติก และการละลายฟอสเฟต

รหัส แอคติโนมัยสีท	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มม.)		ความสามารถในการสร้าง กรดอินโดล-3-แอซิติก
	ไซเดอโรฟอร์	การละลายฟอสเฟต	
NP10S2	30	18	+
NP14H6	38	13	+
NP14H7	36	9.2	+
PR9H1	37	15	+
PR9H4	39	13	+

ความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิติก: + สร้างได้; - ไม่สร้าง

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA จากแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้

ลำดับ	รหัส แอคติโนมัยสีท	กล้วยไม้	สายพันธุ์ใกล้เคียง	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (nt diff./nt total)
1	BYD1H1	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Micromonospora tulbaghiae* DSM 45142 (T)	99.70 (4/1322)
2	BYD3S2	สกุลเอื้อง	*Micromonospora tulbaghiae* DSM 45142 (T)	99.30 (1/1371)
3	BYD5S2	สกุลเอื้อง	*Micromonospora schwarzwaldensis* HKI0641 (T)	99.41(8/1352)
4	BYD7S1	สกุลเอื้อง	*Micromonospora schwarzwaldensis* HKI0641 (T)	99.93 (1/1366)
5	HCS2S1	กล้วยไม้ดิน	*Streptomyces glomeratus* LMG 19903 (T)	100 (0/1343)
6	HCS3H1	กล้วยไม้ดิน	*Micromonospora terminaliae* TMS7 (T)	99.55 (6/1337)
7	HCS5H6	กล้วยไม้ดิน	*Amycolatopsis bartoniae* SF26 (T)	97.39 (36/1377)
8	NP10S17	สกุลช้าง	*Streptomyces cinerochromogenes* NBRC 13822 (T)	99.06 (13/1380)
9	NP10S2	สกุลช้าง	*Streptomyces cinerochromogenes* NBRC 13822(T)	99.18 (11/1342)
10	NP14H8	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Micromonospora olivasterospora* DSM 43868 (T)	98.76 (17/1372)
11	NP15H8	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Actinomycetospora succinea* TT00-49 (T)	99.12 (12/1367)
12	NP16H4	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 (T)	100 (0/1349)
13	NP18H37	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Micromonospora avicenniae* DSM 45758 (T)	98.68 (18/1367)
14	NP18S9	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 (T)	99.64 (5/1380)
15	NP19S10	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Micromonospora tulbaghiae* DSM 45142 (T)	99.85 (2/1368)
16	NP2S2	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 (T)	99.92 (1/1179)
17	NP4H3	เอื้องตาเหิน	*Micromonospora humi* DSM 45647 (T)	99.3 (8/1284)
18	NP4H5	เอื้องตาเหิน	*Micromonospora schwarzwaldensis* HKI0641 (T)	99.53 (6/1284)
19	PM2S1	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 (T)	99.78 (3/1350)
20	PR9H1	สกุลเอื้อง	*Streptomyces similanensis* KC-106 (T)	99.85 (2/1358)
21	PR9H4	สกุลเอื้อง	*Streptomyces similanensis* KC-106 (T)	99.85 (2/1374)
22	PW1H1	เอื้องดอกมะขาม	*Micromonospora schwarzwaldensis* HKI0641 (T)	99.12 (12/1364)
23	PW2H1	เอื้องดอกมะขาม	*Micromonospora chaiyaphumensis* DSM 45246 (T)	99.5 (7/1396)
24	PW3S1	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Micromonospora haikouensis* 232617 (T)	99.42 (8/1381)
25	PW5H1	สกุลเอื้อง	*Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 (T)	99.78 (3/1381)
26	PW7H6	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 (T)	99.93 (1/1346)
27	PW7S2	เอื้องหนวดพราหมณ์	*Micromonospora halotolerans* CR18 (T)	98.71 (16/1245)