บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) จัดเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับขิงและข่า อยู่ในสกุล *Curcuma* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดส่วนใหญ่อยู่ในแถบอินโดจีน เช่น ประเทศพม่า กัมพูชา และไทย สำหรับในประเทศไทยจะพบพืชสกุล *Curcuma* ในทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบความหลากหลายทางสายพันธุ์มากที่สุด ตั้งแต่ริมฝั่งทะเลไปจนถึงพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 900 เมตร แหล่งที่พบมากเช่นเขตวนอุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวงและเทือกเขาตะนาวศรี บริเวณน้ำตกสามหลั่นสระบุรี ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมากตั้งแต่ปราจีนบุรีไปจนถึงเขตชัยภูมิ (โสภิตา, 2548)

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปทุมมา

ปทุมมาเป็นไม้หัวล้มลุก อายุหลายปี มีลำต้นแท้จริงอยู่ใต้ดิน เรียกว่าเหง้า (rhizome)รูปร่างลักษณะค่อนข้างกลม มีข้อและปล้องชัดเจนอัดกันแน่นเรียกว่า stubbed rhizome ส่วนเหนือดินเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) เกิดจากการอัดตัวกันแน่นของกาบใบ ใบเป็นใบเดี่ยวรูปหอกหรือรูปไข่ กาบใบสีเขียวโคนสีแดง แผ่นใบเรียบไม่มีขน รากมี 2 แบบคือ แบบแรกเกิดขึ้นในระยะแรกของการเจริญเติบโตมีลักษณะเป็นรากฝอย (fibrous roots) ต่อมาหลังการเจริญเติบโตไปได้ระยะหนึ่งจึงสร้างรากแบบที่ 2 ซึ่งเป็นรากค้ำจุน (contractile root) ขึ้นเพื่อทำหน้าที่ค้ำยันต้นและดูดอาหารเมื่อใกล้ระยะพักตัวบริเวณปลายรากค้ำยันมีการขยายขนาดพองออกเป็นตุ้มเพื่อสะสมอาหาร (โสระยา, 2547) ช่อดอกเป็นแบบช่อเชิงลดแน่น (compact spike) เกิดขึ้นที่บริเวณปลายยอดของลำต้นเทียม ประกอบด้วยใบประดับ (bract) 2 แบบ คือ 1) ใบประดับส่วนบน มีสีชมพู เรียกว่า coma bract ซึ่งมีความยาวมากกว่าใบประดับส่วนล่าง 2) ใบประดับส่วนล่างมีสีเขียว หนาเป็นมัน ดอกจริงไม่มีก้านดอก ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 3 กลีบ เชื่อมกันเป็นรูปกรวยหรือหลอด กลีบดอก 3 กลีบ ดอกบานจากโคนขึ้นมาถึงปลายช่อ ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ เกิดขึ้นบริเวณซอกใบประดับในแต่ละใบประดับมีดอกจริงประมาณ 4-6 ดอก ดอกย่อยในช่อเดียวกันบานห่างกัน 4 วัน เกสรตัวผู้ประกอบด้วยก้านเกสรตัวผู้เป็นแผ่นเชื่อมติดกับกลีบดอก ปลายก้านชูมีอับละอองเกสร 2 พูโดยมีฐานอับละอองเกสร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื่อมติดกันเป็นหลอดล้อมก้านชูเกสรตัวเมีย ยอดเกสรตัวเมียเป็นแบบปลายปิดคล้ายปากแตรชูอยู่เหนืออับละอองเกสร รังไข่มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตรภายหลังการปฏิสนธิแล้วรังไข่ซึ่งมีไข่อ่อนอยู่ขยายขนาดขึ้นโดยเริ่มต้นนั้นผลมีรูปหน้าตัดเป็นเหลี่ยม 3 เหลี่ยม เนื่องจากรังไข่เกิดจากผนังรังไข่ 3 อันเชื่อมติดกัน เมื่อผลพัฒนาเต็มที่ลักษณะเป็น 3 พูอย่างชัดเจน ภายในแต่ละพูเป็นที่อยู่ของเมล็ดที่มีรูปร่างคล้ายหยดน้ำ ยาว 0.5 เซนติเมตร (จีรวัฒน์, 2535 ; สุรวิช, 2539)

2.2 การเจริญเติบโต

ปทุมมาเป็นไม้หัวหลายฤดูที่มีช่วงการเจริญเติบโตนาน 7-8 เดือน เริ่มจากเดือนมีนาคมถึงเดือนกันยายนในแต่ละปี และออกดอกในช่วงฤดูฝน ช่วงเวลาในการออกดอก 2-3 เดือน โดยที่ต้นปทุมมาเริ่มมีการกำเนิดช่อดอกเมื่อต้นมีอายุเฉลี่ย 70 วันหลังปลูกและแทงช่อดอกใน 91 วันหลังปลูก ช่อดอกที่ยืดตัวแล้วบานดอกย่อยดอกแรกภายใน 105 วันหลังปลูก (จีรวัฒน์, 2535) หลังดอกบานแล้วส่วนของลำต้นที่อยู่ใต้ดินเริ่มมีการสะสมอาหาร ส่วนโคนของลำต้นเริ่มบวมพอง รากค้ำยันเริ่มมีการสะสมอาหารทำให้บริเวณปลายรากพองออกเป็นตุ้ม ขณะเดียวกันปทุมมายังมีการเจริญเติบโต แตกหน่อเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ประมาณ 2-5 หน่อ ต่อมาเมื่อเข้าสู่ฤดูหนาวพืชจึงเริ่มพักตัว เมื่อส่วนของพืชแห้งเหี่ยวแล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวหัวพันธุ์ (โสระยา, 2547)

2.3 การปลูกและการดูแลรักษา

ปทุมมาเป็นไม้ดอกประเภทหัวที่มีการพักตัวในช่วงอากาศแล้งและช่วงวันสั้น โดยอุณหภูมิมีผลร่วมในการชักนำการพักตัว ปกติการพักตัวเริ่มขึ้นในสัปดาห์สุดท้ายของเดือนกันยายน และเริ่มการเจริญเติบโตอีกครั้งสัปดาห์สุดท้ายของเดือนมีนาคม ดังนั้นการปลูกปทุมมาจึงสามารถกระทำได้เมื่อสิ้นสุดระยะพักตัวและมีน้ำเพียงพอเท่านั้น ซึ่งโดยทั่วไปการปลูกปทุมมาสามารถปลูกได้ 3 ช่วง คือ ปลูกก่อนฤดู (กุมภาพันธ์ ถึง มีนาคม) ปลูกฤดูปกติ (เมษายน ถึง พฤษภาคม) และปลูกหลังฤดู (ช่วงปลายเดือนมิถุนายน ถึง กรกฎาคม) วัสดุปลูกใช้ทรายผสมแกลบดิบและถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 หรือ ดินผสม ทราย อัตราส่วน 1:1 สำหรับการให้ปุ๋ยเริ่มเมื่อใบคู่แรกกาง โดยให้ปุ๋ยเคมีที่มีไนโตรเจนสูง และเมื่อออกดอกให้ปุ๋ยสูตร 13-13-21 อัตรา 15 กรัมต่อกอ เดือนละครั้ง และเมื่อพืชเริ่มลงหัวจึงให้ปุ๋ยที่มี ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมสูง (กรมวิชาการเกษตร,2545)

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย (2540) ได้ศึกษาปริมาณธาตุอาหารสะสมในหัวปทุมมาพันธุ์ Chiangmai Pink หลังการเก็บเกี่ยว โดยสุ่มเลือกหัวพันธุ์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร มา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิเคราะห์ปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในส่วนหัวและตุ้มราก แล้วนำปริมาณธาตุอาหารต่างๆเหล่านี้ มาประเมินความต้องการไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม พบว่า การปลูกปทุมมาให้ได้หัวพันธุ์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร พร้อมตุ้มราก 4 ตุ้ม ปทุมมามีความต้องการธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ประมาณ 2.56 0.77 และ 6.47 กรัม ตามลำดับ โสภิตา (2548) รายงานการศึกษาผลของไนโตรเจนและโพแทสเซียมต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา โดยให้สารละลายธาตุอาหารที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของไนโตรเจน 3 ระดับ คือ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโพแทสเซียม 3 ระดับคือ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ไนโตรเจนที่ระดับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ปทุมมามีการเจริญเติบโต คุณภาพดอก และจำนวนหัวใหม่มากที่สุด และการให้โพแทสเซียม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนตุ้มรากมากที่สุด นอกจากนี้ทิราภรณ์ (2549) รายงานการศึกษาผลของออกซิน (IAA) ต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา พบว่าการให้ IAA ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต คุณภาพดอก ปริมาณและคุณภาพหัวพันธุ์ แต่การเพิ่มระดับ IAA มีผลทำให้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในอวัยวะส่วนใต้ดินลดลง ขณะที่การให้ IAA มีผลทำให้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในอวัยวะส่วนใต้ดินสูงขึ้น

2.4 จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช

การตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Biological Nitrogen Fixing หรือ BNF) หมายถึง กระบวนการผลิตไนโตรเจนที่เกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัวกันระหว่างไฮโดรเจนเพื่อให้เกิดสารประกอบแอมโมเนียโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ และพลังงานในรูปของ ATP ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นในสภาวะอุณหภูมิและความดันปกติ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนมีหลายชนิดด้วยกันคือ แบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และแอคติโนมัยซีท ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ พวกที่อยู่อย่างอิสระ (Free living) กลุ่มที่อยู่แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Symbiosis) และกลุ่มที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช หรือที่เรียกว่า เอนโดไฟท์ (Endophyte) (สมพร, 2541)

โดยทั่วไปแล้วเอนโดไฟท์ (Endophyte) หมายถึง สิ่งมีชีวิตบางจำพวกที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อ หรือสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช อย่างไรก็ตามคำจำกัดความที่ใช้ในปัจจุบันหมายถึง ทุกๆสิ่งมีชีวิตที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางช่วงอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ที่อาจเป็นอันตรายหรือเกื้อกูลประโยชน์ให้กับพืชอาศัย ซึ่งเอนโดไฟท์มีทั้งกลุ่มที่เป็นเชื้อราและแบคทีเรีย ส่วน Diazotrophs หมายถึง จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยน di-nitrogen (N_2) จากบรรยากาศไปเป็นแอมโมเนีย (NH_3) ด้วย electron reduction และ protonation ของก๊าซ N_2 ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของ nitrogenase enzyme complex ที่อยู่ภายในของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ดังนั้น Diazotrophic endophyte คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบคทีเรียที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางช่วงอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนและเป็นประโยชน์แก่พืชนั้นได้ โดยไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคแก่พืชดังกล่าว นอกจากนี้แล้วยังสามารถแบ่งแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนตามความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและพืช ได้แก่ กลุ่ม associative หมายถึงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใช้ชีวิตส่วนมากอาศัยอยู่ที่บริเวณผิวนอกของเซลล์ และบางครั้งจะอาศัยอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ ส่วน symbiotic หมายถึงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใช้ชีวิตส่วนมากอยู่ภายในเซลล์ของพืช (หนึ่ง, มปป.)

2.4.1 ประโยชน์ที่ได้รับจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช

1. สร้างสาร metabolite ที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตและสรีระวิทยาของพืช Faentes, *et al*. ในปี 1993 ได้ทำการศึกษา อ้อย 13 สายพันธุ์ในแมกซิโกพบว่าเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* 18 ไอโซเลทที่แยกได้สามารถผลิตสาร indole acetic acid (IAA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLCในปริมาณ 0.14-2.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไอเอเอ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สำคัญมากชนิดหนึ่งต่อการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ เช่น เอทธิลีน ออกซิน และ ไซโตไคนิน จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้แก่ จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ในสกุล *Pseudomonas, Enterobacter, Staphylococcus, Azotobacter* และ *Azospirillum* (Hallman, *et al*., 1997 อ้างโดย เฉลิม, 2548)

2. ช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนให้พืชนำไปใช้ มีรายงานการศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มนี้กันมากในพืชเศรษฐกิจเช่น อ้อย ข้าว ข้าวโพด และสับประรด พบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสกุล *Azotobacter, Azoarcus, Azospirillum* และ *Herbaspirillum* (Boddy, *et al*., 1995; Reinhold-Hurek and Hurek, 1998; Olivares, 1996)

3. ลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนกับพืชบางชนิด ส่งผลให้ลดต้นทุนการผลิต ลดการใช้พลังงานปิโตรเลียมลง และเป็นไปตามแนวทางที่สอดคล้องกับธรรมชาติ Boddey, *et al*. (1995) รายงานการทดลองที่บราซิลไว้ว่า อ้อยสามารถให้ผลผลิตได้ในปริมาณที่สูงถึงแม้จะให้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณที่ต่ำ โดยอ้อยส่วนใหญ่ได้รับไนโตรเจนจากจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังใช้พลังงานจากเอทธานอลที่ผลิตมาจากอ้อยมาเป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์รถในประเทศกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Dobereiner,1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2 กลไกการเข้าสู่รากและลำต้นพืช

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์มีกลไกการเข้าสู่พืชมีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อที่ทำให้เกิดโรค Hurek (2003) ได้อธิบายตัวอย่างการเข้าสู่รากพืชของ *Azoarcus* sp. *BH 72* ที่เข้าสู่รากของ

หญ้า kallar โดยเริ่มเพิ่มจำนวนที่บริเวณเยื่อเซลล์ด้านนอกที่เอ็กโซเดอร์มิส และ สเคอเรนไคมา และในช่วงเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์พบประชากรแบคทีเรียทั้งภายในและภายนอกเซลล์ของคอร์เท็กซ์ จากนั้นจึงเคลื่อนตัวเข้าไปในส่วนของเซลล์พาเรนไคมา และท่อลำเลียงน้ำ ซึ่งกระจายไปสู่บริเวณลำต้นผ่านทางท่อลำเลียงเช่นกัน

2.4.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียมีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี การตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี และการตรวจสอบดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่เก็บรักษาข้อความทางพันธุกรรมของเซลล์ ดีเอ็นเออยู่ในนิวเคลียสและไมโตรคอนเดีย เป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่มาก ดีเอ็นเอของแบคทีเรียมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1 ล้านดาลตัน ดีเอ็นเอของคน สัตว์ หรือพืช มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1000 ล้านดาลตัน ดีเอ็นเอในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งมีปริมาณเท่ากันและคงที่เสมอไม่ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม อาหาร อายุ หรือสภาพของเซลล์ ในสัตว์หรือพืชต่างชนิดกันมีปริมาณของดีเอ็นเอต่างกัน (อุไรวรรณ, 2545) และการตรวจสอบดีเอ็นเอนั้นมีหลายวิธี วิธีที่นิยมมี 2 แบบ คือ เทคนิค RFLP และเทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีความสะดวกหลายประการในการตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนต่างๆ เช่น การใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณเพียงเล็กน้อยตรวจสอบดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพได้ เนื่องจากส่วนที่ใช้เพิ่มขยายอยู่ในช่วง 100-2000 เบส เท่านั้นซึ่งเป็นประสิทธิภาพสูงสุดของเทคนิคนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบนั้นๆการตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียนั้น นิยมตรวจสอบที่ยีน16S rRNA ซึ่งเป็น mRNA ที่มีเพียงชุดเดียวในยีโนมของแบคทีเรีย พบในแบคทีเรียทุกชนิดมีขนาดประมาณ 1500 เบสหรือมากกว่า การตรวจสอบยีนนี้มี 2 วิธีคือ PCR-RFLP และการหาลำดับเบส โดยการโคลนยีนด้วยไพรเมอร์จำเพาะให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1500 เบส แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบชิ้นที่ตัดด้วยวิธี Electrophoresis และโปรแกรมตรวจวิเคราะห์ หรือการนำชิ้นส่วนยีนที่โคลนได้ไปหาลำดับเบสแล้วตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูลของยีน โดยใช้โปรแกรมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ เช่น GCG Wisconsin Package, Gene Explorer หรือโปรแกรมที่ให้บริการผ่านทางอินเตอร์เน็ต เป็นต้น ก็สามารถจำแนกได้ว่าแบคทีเรียที่เราต้องการตรวจสอบเป็นชนิดใด อย่างไรก็ตามในแง่การปฏิบัติทั้งกระบวนการต้องใช้วิธีการดั้งเดิม เช่น สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการทดสอบกับสิ่งมีชีวิต (Bioassay) ประกอบเพื่อเป็นการคัดกรอง ในขั้นต้น และลดจำนวนซ้ำของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ลงไป (บุญเรือน, มปป.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.4 การตรวจวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลร่วมกับการใช้ฐานข้อมูลทางชีวภาพ

ribosomal RNAs เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ดีในการใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตเพราะเป็นโมเลกุลยุคโบราณ มีหน้าที่ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิตโดยการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มีการกระจายตัวของโมเลกุลนี้อย่างกว้างขวาง พบได้ทั่วไปและมีการอนุรักษ์ปานกลาง นิยมใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความคล้ายกัน (similarity) ของลำดับเบสของ 16S rRNA genes (อุไรวรรณ, 2545)

2.5 การศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในพืชบางชนิด

การศึกษาการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชอาศัย เริ่มจากการศึกษาในพืชตระกูลถั่ว โดยเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วและการสร้างปมของเชื้อ ซึ่งเป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ เชื้อไรโซเบียมอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชบริเวณปมราก ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีและมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย แต่การศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่วยังมีข้อมูลการศึกษาไม่มากนัก เริ่มจาก ปี ค.ศ. 1958 Dobereiner ได้รายงานถึงจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนบริเวณรากอ้อย พบว่ามีเชื้อตระกูล *Beijerinkia* อยู่เป็นจำนวนมากและพบจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอีกหลายชนิด แต่ไม่พบว่ามีชนิดใดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการของพืช จนกระทั่ง 20 ปีผ่านมา การศึกษาจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนได้รับความสนใจมากขึ้นทำให้มีการค้นพบจุลินทรีย์ขึ้นมาอีกหลายกลุ่มซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ Genera *Azospirillum, Herbaspirillum, Acetobacter* และ *Burkholderia* ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้แยกออกมาจากต้นพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่วหลายชนิด เช่น อ้อย ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และหญ้า Kallar ซึ่งเป็นพืชทนเค็ม (Balndi, 1997; Kirchhof, 1997 และ Waber, 1999) ดังตัวอย่างการศึกษาในบางพืช เช่น

หญ้า

Reinhold-Hurek, *et al.* (1998) รายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อเอนโดไฟท์จากต้นหญ้า Kallar ซึ่งเป็นพืชทนเค็มในประเทศปากีสถาน พบเชื้อที่มีความใกล้เคียงในกลุ่ม beta subclass ของ Proteobacteria โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงที่สุดกับแบคทีเรียสีม่วงได้แก่ *Rhodocyclus purpureus* ผลจากการแยกเชื้อพบว่าเชื้อที่ได้มีความหลากหลายถึงแม้จะแยกออกจากต้นพืชเดียวกัน โดยทั้งหมดอยู่ในกลุ่มของ *Azoarcus* 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อ้อย

ในช่วง ค.ศ. 1985 Dobereiner ได้กล่าวถึงแนวทางการแยกเชื้อเอนโดไฟท์ที่อยู่บริเวณรากพืชว่า แม้มีผู้ศึกษาเชื้อบริเวณรากพืชมาเป็นจำนวนมากก็ตาม แต่การแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้นั้นยังคงประสบปัญหาอยู่ โดยให้ข้อแนะนำว่าอาหารที่ใช้ควรเป็นอาหารที่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนนั้นตอบสนอง โดยจำลองสภาพแวดล้อมภายในต้นที่จุลินทรีย์อาศัย ซึ่งนำไปสู่การค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกว่า 10 ชนิด ในปี 1986-1987 มีการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อและการใช้อาหารกึ่งแข็งที่ปราศจากไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง Calcavante and Dobereiner (1988) ทำการสำรวจหาจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในรากและลำต้นอ้อยในแปลงปลูก 4 พื้นที่ในประเทศแมกซิโก พบจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนประเภท micro-aerobic ซึ่งพบอยู่ในบริเวณลำต้นและรากเป็นจำนวนมาก การแยกเชื้อดำเนินการโดยทำการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งผสมน้ำอ้อยที่ปราศจากไนโตรเจน มีน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ pH 4.5 ทำให้พบแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีลักษณะเป็นแท่ง อาศัยอยู่ได้ในสภาพที่มีออกซิเจน เคลื่อนที่ได้ด้วย flagella ด้านข้าง 1-3 อัน และสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ในอาหารกึ่งแข็ง แต่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ในอาหารเหลว

ปี ค.ศ. 1993 Fuentess Ramirez และคณะศึกษาท่อนพันธุ์ของอ้อย 13 สายพันธุ์เพื่อประเมินหาเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ พบว่าจำนวนเชื้อที่แยกได้มีมากหลายระดับ(1.1-67เปอร์เซ็นต์) และมีความสอดคล้องกับปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ให้แก่อ้อย ปริมาณเชื้อที่แยกได้มี 1.1-2.5เปอร์เซ็นต์ จากบริเวณที่มีการให้ปุ๋ยไนโตรเจนสูง(275-300 กิโลกรัมต่อเฮก-แตร์) และมีปริมาณสูงสุดที่ 10-67 เปอร์เซ็นต์ จากบริเวณที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจน 120 กิโลกรัมต่อเฮกแตร์ พบเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* 18 สายพันธุ์ซึ่งสามารถสร้าง ไอเอเอ โดยสร้างได้ในระดับความเข้มข้น 0.14-2.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถัดมาในปี 1994 Dong, *et al*. ทำการแยกจุลินทรีย์ภายในช่องว่างเซลล์พาเรนไคมาของอ้อย โดยทำการแยกของเหลวโดยการเหวี่ยงทำให้ได้ของเหลวที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส 12 เปอร์เซ็นต์ pH 5.5 และพบแบคทีเรียผลิตกรด (ประมาณ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และเมื่อทำการจำแนกโดยอาศัยวิธีการทางชีวเคมี และทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* ซึ่งพบในส่วนของช่องว่างระหว่างเซลล์ และเมื่อทำการทดสอบทำให้เห็นว่าเชื้อสามารถอาศัยอยู่ได้ในของเหลวในอะโปพลาสต์ ซึ่งของเหลวดังกล่าวเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ทำให้ทราบว่าของเหลวดังกล่าวอาจมีส่วนสำคัญต่อการเกิดสภาวะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันระหว่างเชื้อกับพืช และในปี 1995 Dong, *et al*. ทำการศึกษาแบคทีเรียซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้จากการสกัดออกมาจากภายในช่องว่างระหว่างเซลล์เนื้อเยื่ออ้อย โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของ *Acetobacter diazotrophicus* (PAL-5) พบว่ามีความสอดคล้องกับลักษณะที่มีการศึกษาทุกประการ ลักษณะที่ได้ศึกษา ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปสัณฐาน 37 แบบ การทดสอบด้านชีวเคมี องค์ประกอบของไขมันภายในเซลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งอาศัยเทคนิค acetylene reduction และ H_2 evolution ซึ่งพบว่าการใช้เทคนิค H_2 evolution ไม่สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากเมื่อมีความเข้มข้นของ acetylene สูงๆทำให้ปฏิกิริยาถูกยับยั้งไว้ไม่สามารถวัดออกมาได้ ในปีเดียวกันนี้ยังมีรายงานการศึกษาเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* ที่สามารถเจริญเติบโตและเป็นแหล่งให้ไนโตรเจนแก่อ้อยในปริมาณมาก โดยการจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์ออกเป็น 8, 2 และ 4 ชนิดตามลำดับ ด้วยเทคนิคโมเลกุลและชีวเคมี การจำแนกทางชีวเคมีได้แก่ การทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน การต้านทานยาปฏิชีวนะ เพื่อทำการแบ่งกลุ่มของเชื้อระหว่าง *Acetobacter diazotrophicus* และ *Herbaspirillum* spp. ออกจากกัน และการใช้เทคนิค PCR โดยใช้ dctA ของเชื้อ *Rhizobium meliloti* เป็นไพร์เมอเข้าคู่กับ ดีเอ็นเอ เพื่อจำแนกชนิดเชื้อภายในกลุ่มเดียวกัน (Ureta, 1995)

Loriet, *et al.* (2004) ทำการแยกเชื้อและบ่งชี้ลักษณะเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของอ้อยพันธุ์ ML3-18 ที่ปลูกในประเทศคิวบา และอ้อยที่นำมาใช้เป็นตัวอย่างในการแยกเชื้อนั้นปลูกโดยไม่ใส่ปุ๋ยเคมี ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้จากส่วนของราก และลำต้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิวแล้ว พบว่าแยกออกมาได้ 2 ไอโซเลท คือ 9C และ T2 และทั้ง 2 ไอโซเลทตรวจพบว่ามีการเปลี่ยนก๊าซ acetylene และมีการสร้าง H_2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน จัดกลุ่มเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทโดยการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา ชีวเคมี การทดสอบด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง 16S rDNA พบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 9C เป็นเชื้อในกลุ่ม Pantoea และเชื้อไอโซเลทที่ T2 เป็นเชื้อสายพันธุ์ *Gluconacetobacter diazotrphicus* นอกจากรายงานการศึกษาที่กล่าวมา ยังพบว่ามีการนำเอาจุลินทรีย์ที่แยกได้มาปลูกถ่ายให้กับต้นอ้อย เช่น Oliveria (2002) ได้ทดสอบการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับอ้อย พบว่าต้นอ้อยที่มีการปลูกถ่ายเชื้อนั้นมีจำนวนรากเพิ่มมากขึ้น และมีน้ำหนักแห้งของรากมากกว่าต้นอ้อยปกติ (ไม่ปลูกถ่ายเชื้อ) นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากปลูกถ่ายเชื้อแล้วทำการแยกเชื้อออกมาอีกครั้งพบว่ามีปริมาณของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชเพิ่มขึ้นและสามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ของผลรวมไนโตรเจนทั้งหมด ในปีถัดมา Erineud (2003) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการปลูกถ่ายเชื้อ *Herbaspirillum seropedicae* และ *Gluconacetobacter* ที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการไม่ปลูกถ่ายเชื้อและการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 50 กิโลกรัม ที่มีต่อการเจริญเติบโตของอ้อย พบว่าในทรีทเมนต์หรือต้นที่ปลูกถ่ายเชื้อทำให้มีน้ำหนักแห้งของต้นสูงกว่ากลุ่มของต้นที่ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อ แต่มีปริมาณที่ต่ำกว่าต้นที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน และเมื่อทำการแยกเชื้อใหม่อีกครั้งพบว่าในต้นที่ปลูกถ่ายด้วย *Herbaspirillum seropedicae* พบจำนวนเชื้อในปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่สูง และMunasamy, *et al*. (2006) ได้ศึกษาการปลูกถ่ายเชื้อ *Burkholderia vietnamiensis* ที่แยกมาจากส่วนของ ราก ลำต้น และใบของต้นอ้อย ให้กับต้นกล้าอ้อยที่มีอายุ 95 วันที่ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับต่างๆทั้งในสภาพแปลงปลูกและการปลูกในกระถาง พบว่าการปลูกในกระถางนั้นมีการสะสมไนโตรเจน และชีวมวล ในปริมาณที่สูงเมื่อปลูกถ่ายเชื้อร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจน และในแปลงปลูกพบว่า การสะสมไนโตรเจนที่ใบและชีวมวลสูงเมื่อปลูกถ่ายเชื้อร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจน 140 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกแตร์ และในปีเดียวกันนี้มีการศึกษาการปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่อยู่ภายในเนื้อเยื่ออ้อยที่ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ 2 สายพันธุ์คือ Nif 8 และ Ni 15 โดยปลูกถ่ายเชื้อ *Herbaspirillum* sp. *B501gfp1* ที่ความเข้มข้น 10^8 และ 10^2 แบคทีเรียเซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าหลังจากปลูกถ่ายเชื้อ 1 วัน เมื่อทำการแยกเชื้อ ไม่พบประชากรของ *Herbaspirillum* sp. *B501gfp1* เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน พบว่ามีประชากรของ *Herbaspirillum* sp. *B501gfp1* อยู่เล็กน้อย แต่พบประชากรสูงสุดเมื่อมีการปลูกถ่ายเชื้อไปแล้ว 28 วันโดยเฉพาะในส่วนของราก และเมื่อทำการตรวจสอบการสร้างโคโลนี พบว่าเชื้อ *Herbaspirillum* sp. *B501gfp1* เริ่มสร้างโคโลนีหลังจากปลูกถ่ายเชื้อไปแล้ว 7 วัน และพบว่ามีการสร้างในบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ของรากแขนง และบริเวณเซลล์คอเรนไคมา และ พาเรนไคมาในลำต้น แต่การปลูกถ่ายเชื้อในความเข้มข้นที่ต่างกันนั้นไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกัน) (Njoloma, 2006)

ข้าว

Elbaltagy, *et al*. (2001) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากลำต้นของข้าวป่าและข้าวพันธุ์การค้า ใน modified Rennie medium ที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ 4 สกุล คือ *Herbaspirillum, Ideonella, Enterobacter* และ *Azospirillum* โดยเลือกศึกษาตัวอย่างเชื้อในสกุล *Herbaspirillum* ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ป่า และติดตามการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อโดยใช้ GFP (Green Fluorescent protein) และพบว่าเชื้อในสกุล *Herbaspirillum* นั้นอาศัยอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ภายในใบของข้าวพันธุ์ป่า นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าวไทย โดยทำการแยกและเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน และตรวจสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี acetylene reduction assay (ARA) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง (rod) และยังพบว่าสามารถสร้าง ไอเอเอ ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Teaumroong, *et al*., 2001)

ในปี 2000 Baldani, *et al*. ; Teaumroong, *et al*. (2001) รายงานการตอบสนองในด้านการเจริญเติบโตของพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อ *H.* seropediae และ *Burkholderia* spp. ในข้าว ข้าวฟ่าง และข้าวโพด ซึ่งทำให้พืชมีน้ำหนักรากเพิ่มขึ้นมากกว่า 100% และน้ำหนักต้นและใบเพิ่มขึ้น 12-20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์ ในปีถัดมา ได้มีการศึกษาการปลูกถ่ายเชื้อ *Azospirillum brasilense* กับต้นข้าวสาลี พบว่าต้นข้าวสาลีที่ปลูกถ่ายเชื้อ *Azospirillum brasilense* มีการสะสมของไนโตรเจน ชีวมวล และให้ผลผลิตในปริมาณที่สูงกว่าข้าวสาลีที่ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อ ซึ่งการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นนั้นมาจากการปลูกถ่ายเชื้อ *Azospirillum brasilense* เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดธาตุอาหารของราก (Marin, *et al*., 2002)

มันเทศ

Asis and Adachi (2003) แยกเชื้อ *Pantoea agglomerans* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช และ *Enterobacter asburiae* เป็นเชื้อที่ไม่ตรึงไนโตรเจน ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของลำต้นมันเทศของประเทศญี่ปุ่นพันธุ์ Japanese sweetpotato เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร modified Rennie medium และนำไปตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค acetylene reduction assay (ARA) โดยบ่มเชื้อไว้ 5 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล พบว่าสามารถแยกเชื้อออกมาได้ 12 ไอโซเลท มี 9 ไอโซเลทพบว่ามีการตรึงไนโตรเจน และ 3 ไอโซเลทไม่พบการตรึงไนโตรเจน ซึ่งมีการจำแนกสายพันธ์โดยใช้ชุดตรวจสอบ API 20E สามารถแบ่งออกเป็นสายพันธุ์ *Pantoea* spp. 4 ไอโซเลท และสายพันธุ์ *klebsella* spp.

กล้วยและสับปะรด

Cruz, *et al*. (2001) ได้รายงานการแยกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนได้จากกล้วยและสับปะรด โดยอาศัยวิธีการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA restriction และ 16S rRNA sequence พบเชื้อ *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans, Burkhoderia brasilensis และ Burkhoderia tropicalis* และอื่นๆอีก 8 ชนิดซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อ genera alpha และ beta proteobacteria และในปี 2003 Martinez, *et al.* ได้ศึกษาจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อของกล้วย โดยแยกจากส่วนของ ราก ลำต้น และใบ เลี้ยงในอาหาร semisolid nitrogen free ทำการคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยวิธี acetylene reduction assay (ARA) และจัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้วิธีการทดสอบทางชีวเคมี alloenyme profies 16S rRNA และ rpoB partial gene sequences พบว่ามีเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 1453 ไอโซเลท จากส่วนของพืชทั้งสามส่วน พบ 53 ไอโซเลทที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจน และจัดกลุ่มได้ 5 กลุ่มคือ *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Rhizobium* spp. และสองกลุ่มสุดท้ายอยู่ใน *Klebsella* spp. และเมื่อนำเอากลุ่มที่แยกออกมาได้กลับไปปลูกถ่ายเชื้อให้กับต้นกล้วยอีกครั้งพบว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้กับพืช ซึ่งพบว่ามีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นถึง 60 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved