# บทที่ 5

## วิจารณ์ผลการทดลอง

### การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อบริเวณผิวชิ้นส่วนปทุมมา

วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอกของชิ้นส่วนพืชทั้ง 4 ส่วน พบว่าใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์และระยะเวลาในการแช่ตัวอย่างพืชดังนี้คือ ส่วนของเนื้อเยื่อใบและกาบใบ แช่ในสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ส่วนเนื้อเยื่อของหัวใหม่และราก แช่ในสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 และ 7 นาทีตามลำดับ โดยทั่วไปเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของพืชเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 – 20 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืชที่ฟอก (ประศาสตร์, 2538) ซึ่งถ้าชิ้นส่วนที่นำมามีขนจำนวนมากเช่น ราก หรือลำต้นใต้ดิน ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่คลอรอกซ์เพิ่มขึ้น (บุญยืน, 2547) ประสิทธิภาพการฟอกกำจัดเชื้อที่ผิวเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อ เวลา และปริมาณของสารที่ใช้ โดยปกติประสิทธิภาพมากขึ้นถ้าใช้เวลาและความเข้มข้นของสารมากขึ้น แต่ถ้าใช้มากเกินไปอาจทำอันตรายต่อความมีชีวิตของเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของพืชได้ วิธีการฟอกกำจัดเชื้อที่ผิวโดยทั่วไป ในส่วนของลำต้น ใบ ราก แช่ในคลอรอกซ์(1.0 – 1.4 เปอร์เซ็นต์) นาน 20 นาที ส่วนสะสมอาหาร เช่น หัว แช่ในคลอรอกซ์ (1.0 – 1.4 เปอร์เซ็นต์) นาน 30 นาที (รังสฤษดิ์, 2545) ในงานทดลองของเฉลิม (2548) ใช้สารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ในการฆ่าเชื้อที่ผิวของลำลูกกล้วย สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นส่วนปทุมมาในการทดลองนี้ ส่วนของใบและกาบใบใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์และเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการฟอกฆ่าเชื้อของปล้องกุหลาบที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที (อมรา,2549) และใบของเจตมูลเพลิงใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 นาที (สุรางค์, 2542) ส่วนหัวใหม่และรากใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์และเวลาในการฟอกน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการฟอกฆ่าเชื้อตาอ่อนจากเหง้าของดาหลาสีขาว ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที (กุหลาบและคณะ, มปป.) ซึ่งเห็นว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่ใช้สำหรับการแยกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนใช้ความเข้มข้นและเวลาในการแช่คลอรอกซ์น้อยกว่าการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากกว่าสารละลายคลอรอกซ์สามารถกำจัดจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้จาก available chlorine เข้าทำลายโปรตีนที่ผนังเซลล์เกิด N- chloro compound และออกซิไดซ์ส่วนประกอบในเซลล์แบคทีเรียทำให้เชื้อตาย ซึ่งถ้ามีความเข้มข้นสูงๆก็จะทำลายเชื้อเอนโดไฟท์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อได้

**การทดลองที่ 2 การแยกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนจากเนื้อเยื่อปทุมมา**

จากการศึกษาแยกเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อใบ กาบใบ หัวใหม่ และรากของปทุมมา พบว่ามีการเจริญของเชื้อบนหลอดอาหารที่แยกได้จากการสกัดจากเนื้อเยื่อของใบ กาบใบ และหัวใหม่ ให้ผลการทดลองดังนี้

2.1 การจัดกลุ่มของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของปทุมมา

2.1.1 ลักษณะของโคโลนี

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช เมื่อทำการแยกออกมาแล้ว สามารถจัดกลุ่มตามลักษณะของสีและรูปร่างของโคโลนีได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท ซึ่งส่วนใหญ่ลักษณะของสีโคโลนีเป็นสีเหลือง และขาว มีเพียงไอโซเลทECL 104 ที่ลักษณะของสีแตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆ คือ ลักษณะของโคโลนีมีสีชมพู ซึ่งเป็นไปได้ว่ากลุ่มของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชนั้นมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ Reinhold-Hurek, *et al.* (1998) รายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อเอนโดไฟท์จากต้นหญ้า kallar ซึ่งเป็นพืชทนเค็มในประเทศปากีสถาน พบเชื้อที่มีความใกล้เคียงในกลุ่ม beta subclass ของ *Proteobacteria* ผลจากการแยกเชื้อพบว่า เชื้อที่ได้มีความหลากหลายถึงแม้จะแยกออกจากต้นพืชเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการแยกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนจากกล้วยไม้สกุลหวายบางชนิด ซึ่งพบกลุ่มของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากเอื้องสามสีทั้งหมด 18 ไอโซเลท ซึ่งเกือบทั้งหมดมีลักษณะของโคโลนีสีเหลือง ตรงกลางนูน ขอบเรียบ และมี 2 ไอโซเลท ที่มีลักษณะของโคโลนีสีขาวขุ่น ตรงกลางนูน ขอบเรียบ เอื้องสายน้ำผึ้งพบทั้งหมด 18 ไอโซเลท โดยเชื้อมีลักษณะทั้งโคโลนีสีขาวขุ่น สีขาวอมเหลือง และสีเหลือง เอื้องแซะหอม พบ 6 ไอโซเลท โคโลนีมีลักษณะทั้งสีขาว สีขาวขุ่น สีขาวอมเหลือง และสีเหลืองอ่อน และในเอื้องมอนไข่ พบทั้งหมด 20 ไอโซเลท มีทั้งสีเหลืองอ่อน สีเหลืองเข้ม สีขาวใส สีส้มเข้ม สีขาวขุ่น และสีขาวขุ่นอมเหลือง (เฉลิม, 2548)

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการย้อมติดสีแกรม (Gram's stain)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกจากเนื้อเยื่อปทุมมาส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก และรูปร่างของเซลล์ส่วนมากมีลักษณะกลม แต่ในบางไอโซเลทมีรูปร่างแบบแท่ง คล้ายกับเชื้อเอนโดไฟท์ที่พบในข้าวส่วนใหญ่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Teaumroong, *et al*., 2001) อย่างไรก็ตามในข้าวป่ามีรายงานการพบเชื้อเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน ในกลุ่มของ *Herbasirillum* 3 ไอโซเลท พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด และมีรูปร่างเซลล์เป็นรูปแท่ง (rod) (Ellbeltagy, *et al*., 2001) Muthakumarasamy, *et al*. (1999) รายงานว่าเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* และ *Herbaspirillum* spp. ที่พบในอ้อยพันธุ์อินเดียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Acetobacter* ในกาแฟซึ่งเป็นเชื้อเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน เชื้อที่พบทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Teresita, *et al*.,1997) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีทั้งกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และมีรูปร่างของเซลล์แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับพืชอาศัยและกลุ่มของเชื้อที่พบ

2.2 อัตราการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อปทุมมา

จากการนำเชื้อทั้ง 13 ไอโซเลท ไปวัดอัตราตรึงไนโตรเจนพบว่า มีเพียง 11 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยมีอัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 0.0200 – 4.2024 นาโนโมลเอทธิลีนต่อ $10^6$ เซลล์ต่อชั่วโมง Asis and Adachi (2003) รายงานว่าจากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของลำต้นมันเทศ เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร Modifield Rennie และนำไปตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค acetylene reduction assay (ARA) พบว่าสามารถแยกเชื้อออกมาได้ 12 ไอโซเลท พบ 9 ไอโซเลทที่มีการตรึงไนโตรเจน และ 3 ไอโซเลทไม่พบการตรึงไนโตรเจน การแยกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อกล้วย โดยแยกจากส่วนของราก ลำต้น ใบ พบว่ามีเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 1453 ไอโซเลท จากส่วนของพืชทั้งสามส่วน พบ 53 ไอโซเลทที่มีความสามารถ ตรึงไนโตรเจนได้ (Martinez*, et al*., 2003 ) เชื้อเอนโดไฟท์ในข้าวไทยที่มาจากการเพาะปลูก มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนค่อนข้างสูงประมาณ 66.24 – 753.94 นาโนโมลเอทธิลีนต่อ $10^6$ เซลล์ต่อวัน (Teaumnoong, *et al*., 2001) Prasad, *et al*. (2001) รายงานว่าในข้าวพบเชื้อ *Serratia marcescens* ซึ่งมีความสามารถตรึงไนโตรเจนประมาณ 65 ± 15 นาโนโมลต่อเอทธิลีนต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อ *Klebsiella planticola* มีอัตราการตรึงไนโตรเจนประมาณ 150 ± 24 นาโนโมลต่อเอทธิลีนต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อ *Enterobacter cloacae* ตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 135 ± 30 นาโนโมลต่อต่อเอทธิลีนต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีน เฉลิม (2548) รายงานว่าการแยกจุลินทรีย์จากเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย 18 ชนิด และสกุล *Coelogealy* sp. 1 ชนิด จากส่วนของลำลูกกล้วย พบว่าในสกุล *Dendrobium crystallinum* มีอัตราตรึงไนโตรเจน 0.004 – 0.320 *D. primulinum* 0.002- 2.469 *D. findlayanum* 0.003 – 0.600 *D. ochreatum* 0.009 – 0.529 *D. scrabrilingue* 0.151 – 4.047 *D. thrysiflorum* 0.010 – 1.500 และ *Coelogeny* 0.025 – 87.378 นาโนโมลเอทธิลีนต่อ $10^6$ เซลล์ต่อ 24 ชั่วโมง ซึ่งเห็นว่าอัตราการตรึงไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากปทุมมามีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของไรโซเบียมในพืชตระกูลถั่ว หรือแม้แต่กลุ่มของ *Acetobacter diazotrophicus* และ *Herbaspirillum* spp. ที่พบในอ้อยและข้าว

2.3 อัตราการสร้างไอเอเอของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อ

จากการวัดอัตราการสร้างไอเอเอ ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของปทุมมา เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเปลี่ยนทริปโตเฟน (tryptophan) ไปเป็นอิลโดเอทธานอล (indole ethanol) จากนั้นพืชจึงเปลี่ยนสารนี้ไปเป็นไอเอเอต่อไป พบว่าเชื้อทั้ง 13 ไอโซเลท มีความสามารถในการผลิตไอเอเอได้ระหว่าง 0.0097 - 0.2960 ไมโครลิตรต่อไมโครกรัมโปรตีน เชื้อเอนโดไฟท์บางสายพันธุ์ไม่มีความสามารถในการผลิตไอเอเอ ดังในการทดลองของ Loiret, *et al.* (2004) ซึ่งแยกเชื้อจากอ้อย และเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อ *Pantoea* sp. ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิต $H_2$ สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างกว้าง แต่ไม่สามารถผลิตไอเอเอได้ Teaumroong, *et al.* (2001) พบว่าเชื้อเอนโดไฟท์จำนวน 3 ใน 4 ไอโซเลทที่แยกได้จากข้าว สามารถผลิตไอเอเอได้ ไม่เฉพาะแต่เชื้อเอนโดไฟท์ที่พบในข้าว ในพืชอื่น เช่น ถั่วเหลือง พบว่า 34 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในถั่วเหลืองมีความสามารถในการผลิตไอเอเอ ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงใกล้เก็บเกี่ยว (Jalia, *et al.* ,2004) Fuentes, *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาอ้อย 13 สายพันธุ์ในแมกซิโก พบว่า เชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* 18 ไอโซเลทที่แยกได้สามารถผลิตสาร Indole acetic acid (IAA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในปริมาณ 0.14 – 2.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* ที่พบในเนื้อเยื่ออ้อยนี้นอกจากผลิตไอเอเอ เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชแล้ว ยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชอาศัยได้ด้วย และจากการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในการสังเคราะห์ออกซิน พบว่าเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท มีความสามารถผลิตไอเอเอได้ระหว่าง 0.00047 – 0.04509 ไมโครโมลต่อ $10^6$ เซลล์ (วรยุวัน, 2549) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อเอนโดไฟท์ที่พบบางสายพันธุ์สามารถผลิตไอเอเอได้ แต่บางสายพันธุ์ไม่สามารถผลิตไอเอเอได้ และผลิตได้ในปริมาณที่มากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อ

2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

จากการนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ทั้ง 4 ไอโซเลท ไปจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค16S rDNA Sequencing พบว่าลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ ECL101ใกล้เคียงกับเชื้อ *Sphingomonas* sp. E-(s)-e-D-4(2) ECS202 ใกล้เคียงกับเชื้อ *Glacial ice bacterium* M3C1.8K-TD1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ECS203 ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus* sp. WN559 และECS204 ใกล้เคียงกับเชื้อ *Brevibacillus borstelensis* strain IPH701 และเมื่อนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 4 ไอโซเลทเปรียบเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนโดยทำแผนภูมิแสดงความใกล้ชิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่มีผู้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้ อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อที่พบเป็นเชื้อใหม่ที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อน หรือมีข้อผิดพลาดในขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับเบส ทำให้ลำดับเบสที่ได้มีความคลาดเคลื่อน อย่างเช่น มี N มากเกินไป คือ ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นลำดับเบสชนิดใด เมื่อเข้าโปรแกรมเพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์จึงมีความคลาดเคลื่อน

**การทดลองที่ 3 ผลของการปลูกถ่ายเชื้อต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา**

3.1 การทดสอบเชื้อที่คัดเลือกต่อการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของไนโตรเจนในพืช

การแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากต้นปทุมมา และคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและสร้างไอเอเอได้ดีที่สุด 4 ไอโซเลท คือ ECL101 ECS202 ECS203 และ ECS204 นำไปปลูกถ่ายให้กับหัวพันธุ์ปทุมมาที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอก (sterillize) ที่ความเข้มข้นของเชื้อ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลการทดลองดังนี้

3.1.1 การเจริญเติบโตและคุณภาพดอก

จากการทดลองพบว่า ผลของการปลูกถ่ายเชื้อมีผลต่อความสูงของต้นในช่วง 30 40 และ 50 วันหลังปลูก โดยกรรมวิธีที่ปลูกถ่ายเชื้อให้กับหัวพันธุ์ก่อนปลูกมีค่าเฉลี่ยความสูงต้นสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (ไม่ปลูกถ่ายเชื้อ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การปลูกถ่ายเชื้อไม่มีผลต่อความยาวและความกว้างใบ ทางด้านคุณภาพดอกพบว่า กรรมวิธีที่ปลูกถ่ายเชื้อจะทำให้ดอกมีความยาวช่อดอก และเส้นรอบวงช่อดอกมากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในพืชชนิดอื่น Baldani, *et al.* (2000) และ Teaumroong, *et al.* (2001) รายงานการตอบสนองทางด้านการเจริญเติบโตของพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อ *H. seropediae* และ *Burkholderin* spp. ในข้าว ข้าวฟ่าง และข้าวโพด ซึ่งทำให้พืชมีน้ำหนักรากเพิ่มขึ้นมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักต้นและใบเพิ่มขึ้น 12 – 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้มีการศึกษาการปลูกถ่ายเชื้อ *Azospirillum brasilense* กับต้นข้าวสาลีพบว่า ต้นข้าวสาลีที่ปลูกถ่ายเชื้อ *Azospirillum brasilense* มีการสะสมชีวมวล และให้ผลผลิตในปริมาณที่สูงกว่าข้าวสาลีที่ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อ *Azospirillum brasilense* ซึ่งไปเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดธาตุอาหารของราก (Marin, *et al.*, 2002) จากการปลูกถ่ายเชื้อ *Enterobacter* spp. *Citrobacter* spp. *Risobium* spp. และ *Klebsella* spp. ให้กับต้นกล้วยพบว่า จุลิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นทรีย์กลุ่มนี้ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้กับพืช ซึ่งพบว่ามีความสูงและน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น (Martinez, 2003) Munasamy (2006) รายงานการศึกษาการเพิ่มผลผลิตของการขยายพันธุ์อ้อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้เชื้อ *Burholderia vietamiensis* และการใช้เชื้อ *B. vietamiensis* ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน พบว่าการใช้เชื้อร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้ชีวมวล และการเพิ่มผลผลิตได้ดีกว่าการปลูกถ่ายเชื้อเพียงอย่างเดียว

3.1.2 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในพืช

จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในพืชทั้งสองส่วนคือ ส่วนที่อยู่เหนือดิน(ใบและกาบใบ) และส่วนที่อยู่ใต้ดิน (หัวใหม่และราก) โดยเก็บตัวอย่างในระยะการเจริญเติบโตทางใบ พบว่า ความเข้มข้นของไนโตรเจนในทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปกติแล้วการปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนให้กับพืชทำให้พืชมีการสะสมและดูดธาตุอาหารได้ดีโดยเฉพาะธาตุไนโตรเจนดังการทดลองของ Oliveria (2002) ได้ทดสอบการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับอ้อย พบว่าหลังจากปลูกถ่ายเชื้อแล้วทำการแยกเชื้อออกมาอีกครั้ง พบว่ามีปริมาณของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชเพิ่มขึ้น และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ของผลรวมไนโตรเจนทั้งหมด การที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนในกรรมวิธีต่างๆที่ปลูกถ่ายเชื้อให้กับหัวพันธุ์ก่อนปลูกไม่มีความแตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม (ไม่ปลูกถ่ายเชื้อ) อาจเกิดจากการที่จุลินทรีย์ที่นำมาปลูกถ่ายให้กับปทุมมานั้นมีอัตราการตรึงไนโตรเจนต่ำทำให้ไม่เพียงพอเนื่องจากโดยทั่วไปแล้วพืชหัวต้องการไนโตรเจนมากในระยะแรกสำหรับการเจริญเติบโตของส่วนเหนือดินเพื่อให้มีใบมากทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงได้สูง (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2544) Munasamy, *et al.* (2006) กล่าวว่าการปลูกถ่ายเชื้อ *Burholderia vietamiensis* ให้กับต้นอ้อยอายุ 95 วันที่ความเข้มข้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับต่างๆ พบว่า มีการสะสมไนโตรเจนและชีวมวลในปริมาณที่สูงเมื่อปลูกถ่ายเชื้อร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจน ดังนั้นในปทุมมาควรมีการปรับปริมาณของเชื้อที่ปลูกถ่ายให้มีปริมาณของเชื้อเพิ่มมากขึ้น หรือปรับเปลี่ยนวิธีการปลูกถ่ายเชื้อ เช่น การแช่หัวในสารละลายเลี้ยงเชื้อ หรือการคลุกหัวพันธุ์กับเชื้อก่อนปลูก หรือการใช้สารละลายเลี้ยงเชื้อฉีดพ่นทางใบให้กับปทุมมา เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 ผลของระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อและชนิดของเชื้อต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา (กรณีทำให้หัวพันธุ์และวัสดุปลูกปลอดเชื้อ)

จากการทดลองในข้อ 3.1 พบว่าการปลูกถ่ายเชื้อให้กับหัวพันธุ์ปทุมมาถึงแม้ว่ามีแนวโน้มในการเพิ่มความสูงของต้น ความยาวช่อดอก และเส้นรอบวงช่อดอกเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้

รับการปลูกถ่ายเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในระยะหลังช่วง 60 – 80 วันหลังปลูกความสูงไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณไนโตรเจนก็ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม ดังนั้นในการทดลองข้อ 3.2 จึงปรับวิธีการและความเข้มข้นของปริมาณเชื้อดังนี้ คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและการสร้างไอเอเอ คือ ECS101 ECS202 ECS203 และ ECS204 และการใช้เชื้อร่วมกันทั้ง 4 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น $10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อนาน 30 และ 60 นาที ให้ผลดังนี้

3.2.1 การเจริญเติบโตและคุณภาพดอก

จากการทดลองพบว่า ระดับของเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อไม่มีผลต่อ จำนวนใบ พื้นที่ใบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต้น น้ำหนักแห้งต้น และคุณภาพของดอก แต่ระดับของเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อมีผลต่อความสูงต้นของปทุมมา โดยเมื่อปทุมมาได้รับการปลูกถ่ายเชื้อที่เวลา 60 นาที มีความสูงของต้นมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่ระยะเวลา 60 นาที อาจทำให้เชื้อที่ปลูกถ่ายนั้นสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อได้ดีและมีปริมาณของเชื้อที่สามารถเข้าอาศัยได้มากกว่าที่ระยะเวลา 30 นาที

ผลของชนิดของเชื้อที่ปลูกถ่ายไม่มีผลต่อจำนวนใบ พื้นที่ใบ ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางต้น น้ำหนักแห้งต้น และคุณภาพดอก แต่ชนิดของเชื้อมีผลต่อความสูง โดยเมื่อปทุมมาได้รับการปลูกถ่ายด้วยเชื้อ ECL101 และ ECS202 มีความสูงของต้นมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลทดังกล่าวข้างต้นมีความสามารถในการสร้างไอเอเอ ได้มากกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นๆทั้งยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ด้วยซึ่งอาจทำให้มีระบบรากที่ดีส่งผลให้ดูดธาตุอาหารได้ดีกว่าการปลูกถ่ายด้วยเชื้อไอโซเลทอื่นๆ ลิลลี่และคณะ (2549) กล่าวว่า ออกซินมีบทบาทต่อการพัฒนาการและการเจริญเติบโตของพืชโดยทำให้พืชมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มการยืดยาวของเซลล์ ถ้าให้ออกซินแก่ลำต้นหรือเนื้อเยื่อจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้น และออกซินที่ระดับความเข้มข้นสูงกระตุ้นการเกิดรากแขนงได้ Teaumrooong, *et al.* (2001) ศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าวไทย พบว่ามีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน และเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเพกติเนส (pectinase) ได้ อีกทั้งยังมีความสามารถในการผลิตไอเอเอ ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

3.2.2 ความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในปทุมมาส่วนที่อยู่เหนือดิน (ใบและกาบใบ) และส่วนที่อยู่ใต้ดิน (หัวใหม่และราก) โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ระยะออกดอก

3.2.2.1 ส่วนที่อยู่เหนือดิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจน พบว่า ระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อและชนิดของเชื้อไม่มีผลต่อความเข้มข้นของไนโตรเจนในส่วนเหนือดิน อาจเนื่องจากกว่าจุลินทรีย์ที่นำมาปลูกถ่ายให้กับพืชมีอัตราการตรึงไนโตรเจนต่ำ จึงไม่เพียงพอที่ทำให้เกิดความแตกต่าง ซึ่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของโปรตีนซึ่งมีหน้าที่สำคัญมากในเซลล์ โดยเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของไซโตพลาสซึม เนื้อเยื่อ และเอนไซม์ รวมถึงเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระและสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลิอิค และเป็นองค์ประกอบของฮอร์โมนพืช (สมบุญ, 2538 ; ยงยุทธ, 2543) ซึ่งพืชจะต้องนำเอาไนโตรเจนไปใช้จึงทำให้ความเข้มข้นที่ส่วนเหนือดินในแต่ละกรรมวิธีมีความเข้มข้นน้อยจึงทำให้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ผลของระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อมีผลต่อความเข้มข้นของฟอสฟอรัสแต่ไม่มีผลต่อความเข้มข้นของโพแทสเซียม โดยเมื่อพืชได้รับการปลูกถ่ายเชื้อนาน 30 นาที ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสสูงที่สุด ชนิดของเชื้อมีผลต่อความเข้มข้นของฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม โดยเมื่อปลูกถ่ายเชื้อด้วยไอโซเลท ECS202 ทำให้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องจากว่า เชื้อไอโซเลท ECS202 มีความสามารถในการสังเคราะห์ไอเอเอได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ ส่งผลให้ปทุมมามีระบบรากที่ดี ทำให้สามารถดูดธาตุอาหารได้ดี หรืออาจเนื่องจากกว่า เชื้อไอโซเลท ECS202 มีอัตราการตรึงไนโตรเจนต่ำมาก จึงทำให้มีความเข้มข้นของไนโตรเจนในปทุมมาที่ปลูกถ่ายด้วยเชื้อไอโซเลท ECS202 ต่ำ ส่งผลให้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในส่วนเหนือดินสูง โสภิตา (2548) รายงานว่าในระยะการเจริญของดอกปทุมมา พบว่า เมื่อพืชได้รับไนโตรเจนมากทำให้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในใบลดลง ทั้งนี้มีการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าวไทย พบว่ามีความสามารถสร้างไอเอเอได้ ซึ่งส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ดี (Teauroong, *et al., 2002*) นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอ้อย มีการผลิตสาร indole acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตดี สามารถทำให้ประสิทธิภาพในการดูดธาตุอาหารได้ดียิ่งขึ้น (Faentes, *et al*., 1993)

3.2.3.2 ส่วนที่อยู่ใต้ดิน (หัวใหม่และราก)

จากการศึกษาผลของปัจจัยหลัก 2 ปัจจัยพบว่า ระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อและชนิดของเชื้อไม่มีผลต่อความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม อาจเนื่องจากว่า ระยะที่ทำการวิเคราะห์ (ออกดอก) ยังไม่มีการลำเลียงธาตุอาหารเหล่านี้ไปสะสมในส่วนของหัวและราก โสภิตา (2548) รายงานว่า จากการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารสะสมในเนื้อเยื่อของปทุมมาตลอดระยะการเจริญเติบโตทำให้ทราบว่า ปทุมมามีการสะสมธาตุอาหารแต่ละชนิดในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น ช่วงออกดอกและเมื่อเข้าสู่ระยะพักตัวแตกต่างกัน โดยเมื่อพืชมีการเจริญเติบโตทางลำต้น พบว่าปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แมกนีเซียม ลดลงเล็กน้อย ธาตุอาหารส่วนใหญ่สะสมในหัวและตุ้มราก ต่อมาในระยะออกดอก ปริมาณธาตุอาหารส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ที่ใบและดอก

3.3 ผลของระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อและชนิดของเชื้อต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา (กรณีไม่ทำให้หัวพันธุ์และวัสดุปลูกปลอดเชื้อ)

จากการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและการสร้างไอเอเอ คือ ECS101 ECS202 ECS203 และ ECS204 และการใช้เชื้อร่วมกันทั้ง 4 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น $10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อนาน 30 และ 60 นาที ให้ผลดังนี้ คือ

3.3.1 การเจริญเติบโตและคุณภาพดอก

จากการศึกษาผลของปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย พบว่า ระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อและชนิดของเชื้อไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพดอกของปทุมมา ทั้งนี้เนื่องจากว่า วิธีการปลูกถ่ายเชื้อด้วยการแช่หัวพันธุ์ในสารละลายที่มีเชื้ออาศัยอยู่ อาจทำให้ประสิทธิภาพการเข้าอาศัยของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไม่ดีพอส่งผลให้เชื้อที่ปลูกถ่ายไม่สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ภายในหัวพันธุ์หรือสามารถเข้าอาศัยได้แต่ในปริมาณที่น้อย ทำให้การเจริญเติบโตและคุณภาพดอกไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกรรมวิธีที่ปลูกถ่ายเชื้อและกรรมวิธีที่ไม่ปลูกถ่ายเชื้อ ซึ่งเชื้อทีใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นเชื้อที่ได้จากการแยกและเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1 ปี และอีกสาเหตุหนึ่ง อาจเกิดจากวัสดุปลูกและหัวพันธุ์ไม่ได้มีการฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้ ซึ่งอาจมีจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอาศัยอยู่ รวมถึงจุลินทรีย์ในดินที่มีประโยชน์ต่อพืช จึงทำให้ผลการเจริญเติบโตและคุณภาพดอกของกรรมวิธีที่ปลูกถ่ายเชื้อและไม่ปลูกถ่ายเชื้อไม่มีความแตกต่างกัน

3.3.2 ความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในปทุมมาส่วนที่อยู่เหนือดิน (ใบและกาบใบ) และส่วนที่อยู่ใต้ดิน (หัวใหม่และราก)

จากการศึกษาผลของปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย พบว่าระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อและชนิดของเชื้อไม่มีผลต่อความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ทั้งส่วนที่อยู่เหนือดินและส่วนที่อยู่ใต้ดิน เนื่องจาก ประสิทธิภาพของเชื้ออาจด้อยลงซึ่งเป็นผลมาจากการเก็บรักษาเชื้อไว้นาน (1 ปี) ซึ่งทำให้การเข้าอาศัยภายในหัวพันธุ์ไม่ดีพอ หรือการปลูกถ่ายด้วยการแช่หัวพันธุ์ในสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ยังเป็นวิธีการทีไม่เหมาะสม จึงทำให้ความเข้มข้นของธาตุอาหารทั้งกรรมวิธีที่ปลูกถ่ายเชื้อและไม่ปลูกถ่ายเชื้อไม่มีความแตกต่างกัน มีการศึกษาการปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่ออ้อยที่ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ โดยปลูกถ่ายเชื้อ *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. ที่ความเข้มข้น $10^8$ และ $10^2$ แบคทีเรียเซลล์ต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าการปลูกถ่ายเชื้อในความเข้มข้นที่ต่างกันไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตและการสะสมธาตุอาหาร (Nijoloma, 2006)การปลูกถ่ายเชื้อ *Burholderi vietamiensis* และ *Gluconancetobacter* ให้กับอ้อยพบว่าปริมาณของเชื้อ *Burholderia vietamiensis* ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื้อพืชมีปริมาณของเชื้อคงที่ตลอด แต่ปริมาณของเชื้อ *Gluconancetobacter* ลดลงเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไป 120 วันหลังปลูกถ่ายเชื้อให้กับพืช (Munasamy, *et al.*, 2006) แสดงให้เห็นว่าชนิดของเชื้อจะมีผลต่อการเข้าอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเชื้อบางตัวสามารถอยู่ร่วมกับพืชได้ตลอดช่วงชีวิต แต่เชื้อบางชนิดจะตายเมื่อเวลาผ่านไป ดั้งนั้นอาจทำให้การเจริญเติบโตของพืชแตกต่างกัน

จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยร่วม 2 ปัจจัย คือระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อและชนิดของเชื้อ พบว่าปัจจัยทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันต่อความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในส่วนใต้ดิน โดยเมื่อพืชได้รับการปลูกถ่ายเชื้อไอโซเลท ECS203 นาน 60 นาที ปทุมมามีความเข้มข้นของไนโตรเจนมากที่สุด เมื่อพืชได้รับการปลูกถ่ายเชื้อไอโซเลท ECS204 นาน 60 นาที ปทุมมามีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสมากที่สุด และปลูกถ่ายด้วยเชื้อไอโซเลท ECS203 นาน 30 นาที ความเข้มข้นของโพแทสเซียมมากที่สุด

จากการทดลองในข้อ 3.1 3.2 และ 3.3 จะเห็นได้ว่าผลการทดลองยังไม่ชัดเจนโดยเฉพาะอย่างยิ่งความสัมพันธ์ของการปลูกถ่ายเชื้อ ชนิดของเชื้อต่อการเจริญเติบโต และปริมาณการสะสมธาตุอาหาร จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังกล่าว เพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ในการช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมีในการผลิตปทุมมาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved