บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช (Endophytic microorganisms)

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชหรือเอนโดไฟท์ (endophyte) หมายถึง จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ในช่วงหนึ่งของชีวิตจะสั้นหรือยาวก็แล้วแต่ อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชอาศัย มีทั้งที่เป็น แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืชอาศัย (mutualism), neutral symbiont และเป็นเชื้อสาเหตุของโรคพืช (pathogen) ด้วยแต่อยู่แบบพักอาศัยในพืชที่เป็นพืชอาศัย (สายสมร, 2541) และอาจทำให้พืชแสดงอาการของโรคเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด (Stone, 1990; Carroll, 1988) เชื้อเอนโดไฟท์มีทั้งชนิดที่เป็นเชื้อรา แอคติโนมัยซิสและแบคทีเรีย

Endophytic bacteria หมายถึง แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบเป็นแบคทีเรียแกรมลบ Kloepper และ Beauchamp (1992) กล่าวว่า แบคทีเรียที่เข้าอาศัยในพืชโดยสามารถกระจายและเข้าอาศัยในส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อของพืชนั้น ไม่จำเป็นต้องเป็นเชื้อสาเหตุของโรคพืชโดยไม่เป็นอันตรายต่อพืชอาศัย แบคทีเรียที่พบเป็นประโยชน์ต่อพืชอาศัย

Sturz และคณะ (2000). กล่าวว่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโปคาริโอต (prokaryote) ที่สามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช แต่ไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคแก่พืชอาศัย นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตให้กับพืชอาศัยโดยการสร้างสารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting) และช่วยในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ในการเจริญเติบโตขององพืช (อ้างโดย Asis และ Adachi, 2003) อย่างไรก็ตาม endophytic bacteria หลายสายพันธุ์ยังสามารถช่วยในการต้านทานโรค (Benhamou และคณะ., 1996) นอกจากนี้เอนโดไฟท์บางชนิดยังช่วยในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อในดิน ตลอดจนหาอาหารให้กับพืชอาศัย แบคทีเรียสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วภายในเนื้อเยื่อพืชอาศัยและมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชอาศัย นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการป้องกันตัวเองจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมมากกว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช (Reinhold-Hurek และ Hurek, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประโยชน์ที่ได้รับจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช

1. มีบทบาทในการป้องกันโรคและแมลง สายสมร (2539) รายงานว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ 3 สายพันธุ์ของต้น Balsom สามารถลดการเจริญและการอยู่รอดของหนอน spur budworm ลงได้ซึ่งก็คือ *Phylostricta* spp. Strain16.

2. สร้างสาร metabolite ที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตและสรีระวิทยาของพืช Fuentes และคณะ.(1993) ทำการศึกษาอ้อย 13 สายพันธุ์ ในแมกซิโก พบว่ามีเชื้อ *Acetobacter diazotreophocus* 18 สายพันธุ์ สามารถผลิตสาร indole acetic acid (IAA) ในอาหารได้ ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี HPLC จะอยู่ในระดับ 0.14-2.42 μgIAA/ ml ซึ่ง IAA ก็เป็น plant growth promoting regulator ที่สำคัญมากชนิดหนึ่งต่อการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ อีกเช่น ethylene, auxins และ cytokinins จุลินทรีย์กลุ่มนี้ ได้แก่ จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ในสกุล *Pseudomonas, Enterobacter, Staphylo coccus, Azotobacter* และ *Azospirillum* (Hallman และคณะ, 1997)

3. ลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนกับพืชบางชนิดส่งผลให้ลดต้นทุนการผลิต ลดการใช้พลังงานปิโตรเลียมและเป็นไปตามแนวทางที่สอดคล้องกับธรรมชาติ Boddy และคณะ. (1995) รายงานการทดลองที่ บราซิลไว้ว่า อ้อยสามารถให้ผลผลิตได้ในปริมาณที่สูง แม้ว่าจะใช้ปุ๋ยไนโตรเจนต่ำ โดยในอ้อยส่วนใหญ่ได้รับไนโตรเจนจากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ซึ่งมีปริมาณมากกว่า 60 % (>150 kg/ha/year) โดยตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ ซึ่งไนโตรเจนที่ได้รับมาจากการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ สามารถตรวจสอบด้วยวิธี ^{15}N isotope และ N balance นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มนี้อย่างกว้างขวางในพืชเศรษฐกิจ เช่น อ้อย ข้าว ข้าวโพด และสับปะรด พบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสกุล *Acetobacter, Azoarcus* และ *Azospirillum* (Boddy และคณะ. 1995; Reinhold-Hurek และ Hurek, 1998; Olivares และคณะ. 1996)

2.2 การศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถตรึงไนโตรเจน

Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria หมายถึง แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช โดยไม่ทำอันตรายต่อพืชอาศัย และไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารพืชที่สำคัญและการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางชีวภาพมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้กับพืช แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนหลายกลุ่มสามารถแยกได้จากดิน บริเวณรากพืช บริเวณรากพืชของพืชทั่วไปหรือภายในเนื้อเยื่อพืช ไม่เฉพาะในพืชตระกูลถั่ว อย่างไรก็ตามพืชที่มีเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอาศัยอยู่ ไม่จำเป็นต้องมีประสิทธิภาพในการตรึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไนโตรเจนดีทุกกลุ่ม แต่ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนมากน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่พบ และความสัมพันธ์กับพืชอาศัย สภาพแวดล้อมบริเวณรากพืชมีผลต่อจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ เนื่องจากสภาพแวดล้อมบริเวณรากพืชมีปัจจัยที่เอื้ออำนวยต่อการดำรงชีพของเชื้อจุลินทรีย์ ในการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (diazotroph) Dobereiuner (1958) รายงานถึงแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนบริเวณรากอ้อย พบว่ามีเชื้อในสกุล *Beijerinkia* อยู่เป็นจำนวนมากและยังพบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอีกหลายชนิด แต่ทว่าไม่มีตัวใดที่มีประสิทธิภาพไนโตรเจนให้แก่พืชได้เพียงพอ กลุ่มของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีการศึกษา เช่น *Beijerinckia, Azotobacter* และ *Derxia* spp. แยกได้บริเวณรากพืชของพืชตระกูลหญ้า (gramineous plants) (Dobereiner และ Ruschel, 1958 อ้างโดย Weber และคณะ , 1999) นอกจากการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช และเชื้อที่อยู่บริเวณผิวของพืช (Epiphyte) ปัจจุบันมีการศึกษาจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร

อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชอาศัย สามารถพัฒนาไปสู่เกษตรอินทรีย์ช่วยลดการใช้สารเคมี การตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้โดยการทำงานของแบคทีเรียหรือสาหร่าย การศึกษาการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชอาศัย เริ่มจากการศึกษาในพืชตระกูลถั่ว โดยเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว และการสร้างปมของเชื้อ ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ เชื้อไรโซเบียมจะอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชบริเวณปมราก ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีและมีการศึกษาอย่างแพร่หลาย แต่การศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว ยังมีข้อมูลการศึกษาที่ไม่มากนัก ต่อมามีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น พบว่ามีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในเนื้อเยื่อของรากพืช เช่น หญ้าอาหารสัตว์, หญ้า kallar และไม้ผล รวมถึงพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ที่เป็นพืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าว อ้อย ข้าวโพด

ในการศึกษาช่วงปี ค.ศ. 1960-1980 นั้นเน้นศึกษาการตรึงไนโตรเจนจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ในปัจจุบันได้มีการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่ได้รับจากกระบวนการทางชีวภาพที่มาจากแบคทีเรียซึ่งอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช หรือที่เรียกว่า endophytic diazotrophs bacteria (Doebereiner และคณะ, 1995) ในไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีการมุ่งเน้นไปที่การศึกษาแบคทีเรียในกลุ่มของเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยแยกเชื้อ*Acetobacter diazotrophicus* และ*Herbaspirillum* spp. ซึ่งแยกได้จากอ้อย เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช โดยไม่ใช่เชื้อสาเหตุของโรค โดยเชื้อ *A. diazotrophicus* ที่พบพบทั้งในเนื้อเยื่อของราก, ลำต้น และใบของอ้อย เนื่องจากช่องว่างขนาดใหญ่ภายในเนื้อเยื่อส่วนของลำต้นมีความสำคัญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการกระจายตัวของเชื้อเอนโดไฟท์ (Boddey และคณะ, 1991; Dong และคณะ, 1995) แบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลซูโครสในลำต้นของอ้อย เป็นแหล่งพลังงานในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ เชื้อเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ที่พบเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม *Acetobacter, Azoarcus, Azospirillum* และ *Herbaspirillum* ซึ่งแยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ อ้อย ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และพืชให้พลังงาน C-4 *Miscanthus sinesis, Penissetum* และหญ้า kalla (พืชทนดินเค็ม) นอกจากนั้นยังพบในไม้ผลเขตร้อนกล้วยและสับปะรด (*Ananas* sp. และ *Musa* sp.), ต้นปาล์มน้ำมัน และกาแฟ (Baldani, 1997; Kirchhof, 1997; Weber และคณะ, 1999) นอกจากนี้พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากที่มีการรายงาน สามารถพบได้ทั้งในส่วน หัว, ผล, ลำต้น , ใบ, ราก และเมล็ด อาจกล่าวได้ว่าพบในเกือบทุกส่วนแล้วแต่ชนิดของพืช นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในพืชอื่น อาทิ Hollis (1951) อธิบายถึงแบคทีเรีย16 ชนิดที่แตกต่างกันในลักษณะทางกายภาพที่พบในมันฝรั่ง Mundt และ Hinkle (1976) พบเชื้อแบคทีเรียโดยส่วนมากเป็นเชื้อในกลุ่มของเชื้อ *Bacillus, Enterobacter, Erwinai, Flavobacterium* และ *Pseudomonas* มีรายงานว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในกลุ่มสกุล *Azotobacter, Enterobacter, Bacillus, Klebsiella, Azosipirillum, Herbaspirillum, Gluconacetobacter, Burkholderia* และ *Azoarcus.* อาศัยอยู่ในพืชตระกูลหญ้า (Tarrand และคณะ, 1978; Rennie และคณะ, 1982; Gillis และคณะ, 1989 อ้างโดย Loiret และคณะ, 2004) โดยเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* และ *Herbaspirillum* spp. แยกได้จากอ้อย เชื้อ *Azoarcus* spp. แยกได้จากหญ้า kallar เชื้อ *Alcaligenes, Azospirillum, Bacillus, Enterobacter, Herbaspirillum, Klebsiella, Pseudomonas* และ *Rhizobium* บางสายพันธุ์แยกได้จากข้าวและข้าวโพด

ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1970 ได้มีการค้นพบเชื้อชนิด ใหม่ในตระกูล *Azospirillum* ซึ่งเจริญเติบโตได้ในดิน และยังพบเป็นจำนวนมากบริเวณรากของธัญพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าว หญ้าเลี้ยงสัตว์ อ้อย และปาล์มน้ำมัน ซึ่งพบว่ามี จุลินทรีย์บางกลุ่มเจริญ และ เพิ่มจำนวนได้ภายในเนื้อเยื่อ (Schloter และคณะ, 1994) นอกจากนี้มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่บริเวณรากและภายในเนื้อเยื่อของอ้อย แบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปเมื่อแยกทำการแยกเชื้อ ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มของ *Gluconacetobacter diazotrophicus, Herbaspirillum rubrissubalbicans* และ *H. seropedicae* (Baldani และคณะ, 1997 ; Loiret และคณะ, 2004)

ในช่วงปี ค.ศ.1980 Dobereiner ได้รายงานถึงแนวทางการแยกเชื้อ เอนโดไฟท์ที่อยู่บริเวณรากพืชว่า แม้จะมีผู้ศึกษาเชื้อบริเวณรากพืชมาเป็นจำนวนมากก็ตาม แต่การแยกเชื้อที่ตรึงไนโตรเจนได้นั้นยังคงประสบปัญหาอยู่ โดยให้ข้อแนะนำว่าอาหารที่ใช้ควรเป็นอาหารที่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนนั้นตอบสนอง โดยจำลองสภาพแวดล้อมภายในต้นไม้ที่จุลินทรีย์อาศัย ซึ่งนำไปสู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกว่า 10 ชนิด ในปี ค.ศ.1986-1987 โดยประเด็นสำคัญคือ การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อและการใช้อาหารกึ่งแข็งที่ปราศจากไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง Calcavante และ Dobereiner (1988) ทำการสำรวจหาจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในรากและลำต้นอ้อย ในแปลงปลูก 4 พื้นที่ ในประเทศแมกซิโก พบจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนประเภท micro-aerobic ซึ่งพบอยู่ในบริเวณลำต้นและรากที่ล้างแล้วเป็นจำนวนมาก การแยกเชื้อดำเนินการโดย ทำการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งผสมน้ำอ้อยปราศจากไนโตรเจน มีน้ำตาล 10% pH 4.5 พบแบคทีเรียชนิดใหม่มีลักษณะเป็นแท่ง อาศัยได้ในสภาพมีออกซิเจน เคลื่อนที่ได้ด้วย flagella ด้านข้าง 1-3 อัน ตรึงไนโตรเจนจากอากาศในอาหารกึ่งแข็งแต่ตรึงไม่ได้ในอาหารเหลว ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนไม่ปรากฏการทำงานของ nitrate reductase เมื่อมีปริมาณของ NO^-_3 10 mM จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10% สามารถเจริญเติบโตได้จนถึงความเข้มข้นของน้ำตาล 30% แต่ไม่เจริญที่ 35% แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสภาพความเป็นกรดที่ pH ต่ำกว่า 3 นั่น คือเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพอาหารเป็นกรด สามารถใช้เอธานอลได้และทำให้เกิดสภาพ overoxidised (เกิดการออกซิไดส์เป็น CO_2 และ H_2O) กรดอะซิติก และ แลคติกถูกออกซิไดส์เป็น CO_2 และ H_2O สามารถผลิต $CaCO_3$ ออกมาได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร potato agar เกิดเป็นโคโลนีสีน้ำตาลเข้ม และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำผสม bromothymol blue ลักษณะโคโลนีที่พบเป็นโคโลนีสีส้ม มีความแตกต่างกับเชื้อ *Frateuria, Glucocobacter, Acetobacter* หรือแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ชนิดอื่นๆ โดยแบคทีเรียชนิดใหม่นี้ให้ชื่อว่า *Saccharobacter nitrocaptans*

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์กับพืชอีกหลายชนิด เช่น Doom และคณะ. (1991) ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy) ศึกษาจุลินทรีย์ในระบบท่อน้ำเลี้ยง (xylem) ของกุหลาบ พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิด อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากเป็น *Pseudomonas* มากกว่า 70 % ที่เหลือเป็น *Enterobacter* ประมาณ 10% เป็น *E. agglomerars* และยังพบแบคทีเรียสกุลอื่นๆ *Acinetobacter, Bacillus, Aeromonas, Alcaligene, Citrobacter* และ *Flavobacteria* นอกจากนี้ยังพบเชื้อราบางชนิด แต่ไม่พบยีสต์อาศัยอยู่ในระบบท่อน้ำเลี้ยง (อ้างโดย นิตยา, 2542)

Fuentes-Ramirez, และคณะ. (1993) ได้ศึกษาท่อนพันธุ์อ้อย 13 สายพันธุ์ เพื่อหาเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน พบว่า จำนวนเชื้อที่แยกได้มีมากมายหลายระดับ (1.1-67%) โดยมีความสอดคล้องกับปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ให้แก่อ้อย ปริมาณเชื้อที่แยกได้มี 1.1- 2.5 % จากบริเวณที่มีการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่สูง (275 - 300

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

kg/ha) และมีปริมาณสูงสุดที่ 10-67 % บริเวณที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจน 120 kg/ha พบเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* 18 สายพันธุ์ เชื้อเอนโดไฟท์ที่พบสามารถผลิต indole acetic acid (IAA) ตรวจสอบด้วยเครื่องมือ HPLC พบปริมาณ IAA ที่เชื้อผลิตได้อยู่ระหว่าง 0.14-2.42 μg/ml

Dong และคณะ (1994) ทำการแยกจุลินทรีย์ภายในช่องว่าง parenchyma cell ของอ้อย โดยทำการแยกของเหลวด้วยการเหวี่ยงได้ของเหลวซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 12% มี pH 5.5 พบแบคทีเรียผลิตกรด ประมาณ 10^4 เซลล์/ มล. เมื่อทำการจำแนกชนิดของเชื้อที่พบโดยอาศัยวิธีการทางชีวเคมีและทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* แบคทีเรียดังกล่าวพบในช่องว่างระหว่างเซลล์ เมื่อทำการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถอาศัยอยู่ได้ภายใน apoplast fluid ซึ่งของเหลวดังกล่าวนับว่าเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อที่ตรึงไนโตรเจนได้เป็นอย่างดี โดยมีประมาณ 3 % โดยปริมาตรต่อน้ำหนักต้นอ้อย หรือเป็นปริมาณถึง 30 ตัน/ เฮกแตร์ของอ้อยที่ปลูก อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อยังขึ้นอยู่กับความต้องการปุ๋ยและชนิดพันธุ์ของอ้อย ทำให้ทราบว่าของเหลวดังกล่าวอาจมีส่วนสำคัญต่อการเกิดสภาวะพึ่งพาอาศัยกันและกันระหว่างเชื้อกับพืช ถัดมาในปีค.ศ. 1995, Dong และคณะ ทำการศึกษาแบคทีเรียซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้จากการสกัดออกมาจากภายในช่องว่างระหว่างเซลล์เนื้อเยื่ออ้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของ *Acetobacter diazotrophicus* (PAL-5) พบว่ามีความสอดคล้องกับลักษณะที่มีการศึกษามาทุกประการ ลักษณะที่ได้ศึกษาได้แก่ รูปสัณฐาน 37 แบบ การทดสอบด้านชีวเคมี องค์ประกอบของไขมันภายในเซลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) ซึ่งอาศัยเทคนิค acetylene reduction และ H_2 evolution พบว่าการใช้เทคนิค H_2 evolution ไม่สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากเมื่อมีความเข้มข้นของ acetylene สูง ทำให้ปฏิกิริยาถูกยับยั้งไว้เกินกว่าที่จะวัดออกมา

นอกจากนี้ทำการศึกษาในพืชอื่น เช่น Ferreira และคณะ (1995) รายงานการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในปาล์ม 2 ชนิด คือ ปาล์มน้ำมัน (*Elaesis guineensis*-Dende) และ Peachplam (*Bactris gasipaes*-Pupuncha) พบการเจริญของเชื้อ *Azospirillum brasilense, A. amazonense, A. lipoferum Herbaspirillum seropedical* ในปาล์มน้ำมัน ในขณะที่ Peachplam พบเชื้อ *Azospirillum brasilense, A. amazonense, A. lipoferum* และ *Beijerinckia* spp. และยังพบจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนไม่ทราบชนิดตามบริเวณราก ลำต้น ใบ และ เอนโดสเปิร์มของผล จากการศึกษาที่ผ่านมา ทำให้คาดไว้ว่าอาจพบเชื้อ *Herbaspirillum* ชนิดใหม่ที่สามารถเจริญบนราก ลำต้น และใบของปาล์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ureta และคณะ (1995) ได้รายงานการศึกษาเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus, Herbaspirillum seropedical, Herbaspirillum rubrisubalbicans* ที่สามารถเจริญเติบโตและเป็นแหล่งไนโตรเจนแก่อ้อยในปริมาณมาก โดยทำการจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์ออกเป็น 8, 2 และ 4 ชนิดตามลำดับ ด้วยเทคนิคโมเลกุลและชีวเคมี การจำแนกทางชีวเคมีได้แก่ การทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน, การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เพื่อทำการแบ่งกลุ่มเชื้อระหว่างเชื้อ *A. diazotrophicus* กับ *Herbaspirillum* spp. ออกจากกัน การจำแนกชนิดเชื้อภายในกลุ่มเดียวกันโดยอาศัยเทคนิค PCR โดยใช้ dctA ของเชื้อ *Rhizobium meliloti* เป็น primer เข้าคู่กับ DNA ในสภาพความจำเพาะต่ำ เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อที่แยกได้

ในปีค.ศ. 1996 มีรายงานการค้นพบแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนชนิดใหม่ คือ *Burkholderia brasilensis* โดย Banaldi (1996) แยกได้จาก มันเทศ และมันสำปะหลัง นอกจากนี้ยังพบ *Burkholderia* สายพันธุ์อื่นๆ จากอ้อย ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Burkholderia brasilensis* ซึ่งมีการทดสอบต่อมาโดยใช้เทคนิค 23S rDNA ในการจำแนกชนิดพบว่า เป็นคนละสายพันธุ์ (อ้างโดย Kirchhof และคณะ, 1997)

Teresita และคณะ (1997) ได้ทำการแยกเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* จากเนื้อเยื่อของต้นกาแฟบริเวณราก พบเชื้อประมาณ 15-40% ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดิน นอกจากนี้ยังทำการแยกจุลินทรีย์จากผลกาแฟ ภายในสปอร์ของ vescular-abuscular mycorhyza และ mealybugs (*Planococcus citri*) ซึ่งเป็นแมลงที่มีความสัมพันธ์กับกาแฟ แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จ นอกจากนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่สามารถสร้างกรดชนิดอื่นๆ จากบริเวณรากกาแฟได้อีกกว่า 20% เชื้อที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เหล่านี้มีคุณสมบัติบางอย่างใกล้เคียงกับเชื้อ *A. diazotrophicus* แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* เพราะยังคงมีความแตกต่างกันทางลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวเคมี อีกทั้งมีความแตกต่างกันอย่างมากใน electrophoresis mobility patterns ของ metabolic enzyme ที่สัมประสิทธิความสัมพันธ์ (coefficients) ทางความใกล้เคียงทางพันธุกรรม (genetic distance) สูงถึง 0.950 ในรายละเอียด แบคทีเรีย Acetobacter ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ชนิดนี้ มีความแตกต่างกันในส่วนของ small-subunit rRNA restriction fragment length polymorphism pattern ที่ประกอบกันอยู่เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้เอนไซม์ EcoRI โดยแสดงค่า homology ในระดับที่ต่ำมากระหว่าง 11 ถึง 15 % กับ *A. diazotrophicus* สายพันธุ์อ้างอิง PAI5^{T} ดังนั้นแบคทีเรีย *Acetobacter* ที่เกิดขึ้นมาใหม่ที่บริเวณรากของกาแฟนี้อาจเป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนในตระกูล *Acetobacter* ที่ไม่ใช่ *A. diazotrophicus* และอาจเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่มาอาศัยอยู่ก่อน มากกว่าที่จะเข้าไปภายหลัง ทำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นแนวทางการแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับพืชไร่ชนิดอื่นๆ ได้

Kirchhof และคณะ (1997) ทำการศึกษาโดยแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในพืชที่เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *Pennisetum purpureum, Miscanthus sinensis, M. sacchariflorus* และ *Spartina pectinata.* โดยเลี้ยงในอาหารกึ่งเหลวที่ไม่มีไนโตเจน (semi-solid nitrogen free medium) จะพบเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากในพืชที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน จำแนกและบ่งชี้ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียโดยหลักการพื้นฐานทั่วไป คือ ศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและสัณฐานวิทยา สรุปได้ว่า เชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นเชื้อ *Azospirillum lipoferum* และ *Herbaspirillum seropedicae*.

Reinhold-Hurek และ Hurek (1998) รายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อเอนโดไฟท์จากต้นหญ้า kallar ซึ่งเป็นพืชทนเค็มในปากีสถาน พบว่าเชื้อมีความใกล้เคียงในกลุ่ม beta subclass ของ *Proteobacteria* โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงที่สุดกับเชื้อแบคทีเรียสีม่วง ได้แก่ *Rhodocyclus purpureus* ผลจากการแยกเชื้อพบว่าเชื้อที่ได้มีความหลากหลายถึงแม้จะแยกออกมาจากต้นพืชเดียวกัน โดยทั้งหมดอยู่ในกลุ่มของ *Azoarcus* 5 ชนิดด้วยกัน ซึ่งเมื่อทำการวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล คือ 16S ribosomal RNA sequences นอกจากนี้ยังใช้กระบวนการทดสอบอื่นๆ ซึ่งสามารถที่จะตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อที่ไม่ทราบชนิดจากรากหญ้า kallar โดยเน้นพืชที่มีการเพาะปลูกแบบดั้งเดิม ซึ่งสามารถนับสำรวจประชากรเชื้อได้ และใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการ sequences กลุ่มเชื้อ *Azoarcus* ในรากจากแปลงปลูกข้าว ซึ่งสังเกตได้ว่าพืชอาศัยอาจครอบคลุมไปถึงข้าว ในการเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง เชื้อ *Azoarcus* สามารถที่จะเพิ่มจำนวนอาศัยในรากข้าวได้ โดยเชื้อจะเข้าไปปกคลุมในบางส่วนของรากข้าวที่เป็นเขตเซลล์ยืดตัว (elongation) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่ได้จากเขตแบ่งตัว มีการยืดตัวของเซลล์ออกทางด้านยาว บริเวณนี้ต่อไปจะเป็นจุดที่เซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นส่วนต่างๆ เช่น procambium เจริญเป็น xylem และส่วนรากขนอ่อน แล้วเพิ่มจำนวนทั้งภายในและระหว่างเซลล์ cortex และรุกล้ำเข้าไปยังระบบท่อน้ำท่ออาหาร เข้าไปยังท่อน้ำ จนกระทั่งกระจายไปยังบริเวณส่วนต้นได้

Yamada และคณะ (1997) จำแนกเชื้อแบคทีเรีย 36 สายพันธุ์ ในสกุล *Acetobacter, Gluconobacter* และ *Acidomonas* โดยอาศัยเทคนิค partial base sequence ที่ตำแหน่ง 1200 จนถึง 1375 เป็นจำนวน 156 เบส ของ 16S rRNA โดย *Gluconobacter* สายพันธุ์ Q-10 ถูกนำมาใช้ในการทดสอบแบ่งกลุ่มแบคทีเรีย 2 subgroup ในกลุ่มแบคทีเรีย *Gluconobacter* ระหว่างสายพันธุ์ *Gluconobacter oxydans* และ *Gluconobacter cerinus* ในสายพันธุ์ Q-9 ถูกนำมาจำแนก subgenus ของ genus *Acetobacter* ซึ่งมีความแตกต่างทาง phylogenetic ไม่มากนักกับ genus *Gluconobacter*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Elbaltagy และคณะ (2001) แยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากลำต้นของข้าวป่าและข้าวปลูกในอาหาร modified Rennie medium (RMR) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ 4 สกุล คือ *Herbaspirillum, Ideonella, Enterobacter* และ *Azospirillum* โดยเลือกศึกษาตัวอย่างเชื้อในสกุล *Herbaspirillum* ที่แยกได้จากข้าวป่าสายพันธุ์ *Oryza officinalis* และติดตามการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อโดยใช้ GFP (Green Fluorescent Protein)

Weber และคณะ (1999) รายงานการแยกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนได้จากกล้วย และสัปปะรด โดยอาศัยวิธีการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA restriction และ 16S rDNA sequence พบเชื้อ *Herbaspirillum seropedica, H. rubrisubalbicans, Burkhoderia brasilensis* และ *Burkhoderia tropicalis* และเชื้ออื่นๆ อีก 8 ชนิด ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อใน genera alpha และ beta *Proteobacteria*

Teaumroong และคณะ (2001) ศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าวไทย โดยทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากข้าวป่าและข้าวที่ได้จากการเพาะปลูก ทำการตรวจสอบโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน (N free medium) และตรวจวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง (rod) นอกจากนี้จากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมี โดยทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon source) ที่แตกต่าง ตรวจสอบได้ว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้ มาเลท (malate) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ เซลลูเลส (cellulose) และ pectinase ได้ อีกทั้งยังมีความสามารถในการผลิต IAA ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค 16S rDNA sequenc.

Sajjad และคณะ (2001) รายงานผลการศึกษาว่าพบเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* และ *Klebsiella oxytoca* ภายในเนื้อเยื่อของอ้อย ซึ่งอ้อยเป็นพืชที่ปลูกกันมากในประเทศคิวบา ปลูกมากกว่า 1 ล้านเฮกแตร์ คาดกันว่า จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนจะสามารถตรึงไนโตรเจนได้เพียงพอกับความต้องการ

Asis และ Adachi (2003) แยกเชื้อ *Pantoea agglomerans* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช และ *Enterobacter asburiae* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ตรึงไนโตรเจน เชื้อทั้ง 2 ชนิดอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของลำต้นมันเทศของประเทศญี่ปุ่นพันธุ์ *Japanese sweetpotato* cv. Koganesengen เลี้ยงเชื้อใน semi-solid modified Rennie medium ตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Assay (ARA) โดยบ่มเชื้อทิ้งไว้ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C สามารถแยกได้ 12 ไอโซเลท พบว่า 9 ไอโซเลท มีการตรึงไนโตรเจน (ให้ผล ARA เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

บวก) และอีก 3 ไอโซเลทไม่พบการตรึงไนโตรเจน ใช้ชุดตรวจสอบ API 20E ในการจำแนกสายพันธุ์ สามารถแบ่งได้ว่า มี 4ไอโซเลท เป็นสายพันธุ์ *Pantoea* spp. และ 5 ไอโซเลท เป็นสายพันธุ์ *Klebsella* spp. ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter* spp. เป็นสายพันธุ์ที่ไม่พบการตรึงไนโตรเจน

Loiret และคณะ. (2004) ทำการแยกเชื้อและบ่งชี้ลักษณะเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของอ้อยพันธุ์ ML3-18. ที่ปลูกในประเทศคิวบา อ้อยที่นำมาแยกหาเชื้อนั้นปลูกโดยไม่ใส่ปุ๋ยเคมี แยกเชื้อได้จากบริเวณรากและลำต้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิว (surface sterilized) พบเชื้อ 2 ไอโซเลท คือ 9C และ T2. ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลทตรวจพบการ*เปลี่ยน*ก๊าซ acetylene และการสร้าง H_2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน จัดกลุ่มเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทที่พบด้วยการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา, ชีวเคมี และ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง 16S rDNA (16S rDNA sequence) พบว่าเชื้อ ไอโซเลทที่ 9C เป็นเชื้อในกลุ่ม *Pantoea* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง และสร้าง H_2 ในปริมาณมาก (มากกว่า 67.7 nmol H_2 h^{-1} 10^{10} $cell^{-1}$) เจริญได้ในอาหารที่ pH ต่ำ และความเข้มข้นของเกลือสูง ส่วนเชื้อไอโซเลท T2 เป็นเชื้อสายพันธุ์ *Gluconacetobacter diazotrphicus.*

การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในปัจจุบันไม่ได้หยุดนิ่งหรือจำกัดแต่ในพืชตระกูลถั่ว หากแต่ขยายความสนใจในพืชเศรษฐกิจ นับตั้งแต่ อ้อย ข้าว เรื่อยมา ปัจจุบันมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นและมีข้อมูลที่หลากหลายมากกว่าแต่ก่อน ไม่จำกัดเพียงแต่ในพืชเศรษฐกิจที่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว แต่ยังมีการศึกษาในกาแฟ สับปะรด กล้วย อีกด้วย การวิจัยเหล่านี้เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาทางการเกษตร ไม่ว่าจะเป็นทางเศรษฐกิจ สังคม หรือสภาพแวดล้อมซึ่งเกี่ยวเนื่องกัน การวิจัยที่ก้าวหน้าย่อมค้นพบแนวทางใหม่ๆที่จะใช้ในการพัฒนาระบบการปลูกพืชและพัฒนาคุณภาพชีวิตอันนำไปสู่ การทำเกษตรยั่งยืนและรักษาสภาพแวดล้อม

2.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล(Identification of Bacteria by molecularbiology)

ความเจริญทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีมากขึ้น จึงเกิดแนวทางใหม่สำหรับการจัดอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิคที่ทำให้ทราบคุณสมบัติของยีนของแบคทีเรียจะช่วยสนับสนุนลักษณะภายนอกของสิ่งมีชีวิต การศึกษาระบบพันธุกรรมของแบคทีเรียในระดับโมเลกุลเพื่อหาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ซึ่งทำได้โดยการเปรียบเทียบเบสองค์ประกอบของ DNA

ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบโดยลำดับของนิวคลีโอไทด์แบบต่างๆในสาย DNA ข้อมูลเหล่านี้มีการแสดงออกมาเป็นลักษณะต่างๆ โดยผ่านทาง RNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการผลิตสารโปรตีนจำเพาะ ลักษณะที่ปรากฏในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นเป็นผลรวมของการกระทำร่วมกันของโปรตีนหลายชนิด ซึ่งมีต้นตอมาจาก DNA นั่นเอง

DNA เป็นสารพันธุกรรมที่เก็บรักษาข้อความทางพันธุกรรมของเซลล์ DNA มีอยู่ในนิวเคลียสและในไมโตคอนเดียร เป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่มาก DNA ของแบคทีเรีย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1 ล้านดาลตัน DNA ของคนสัตว์หรือพืช มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 1000 ล้านดาลตัน DNA ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆของสิ่งมีชีวิตตัวใดตัวหนึ่งจะมีปริมาณเท่ากันและคงที่เสมอไม่ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม อาหาร อายุ หรือสภาพของเซลล์ ในสัตว์หรือพืชต่างชนิดกัน จะมีปริมาณ DNA แตกต่างกัน เซลล์ง่ายๆจะมี DNA น้อยกว่าเซลล์ที่ยุ่งยาก เช่น ปริมาณDNA ของแบคทีเรียจะน้อยกว่าของเรา ซึ่งน้อยกว่าของคนหรือพืช ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียมีจำนวนยีนน้อยกว่าคนหรือพืช การหาลำดับเบสสามารถตรวจสอบลักษณะที่เกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนั้นยังตรวจหาชิ้น DNA เป้าหมาย หาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียมีหลายวิธี เช่น การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี การตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี และการตรวจสอบดีเอ็นเอ ซึ่งประการหลังมีหลายวิธี วิธีที่นิยมมี 2 แบบ คือ เทคนิค RFLP และเทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคหลังจัดเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างมาก ณ ปัจจุบัน เนื่องจากมีความสะดวกหลายประการในการตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนต่างๆ เช่น การใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณเพียงเล็กน้อยตรวจสอบดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพได้ เนื่องจากส่วนที่จะใช้เพิ่มขยายจะอยู่ในช่วง 100-2000 เบส เท่านั้น ซึ่งเป็นประสิทธิภาพสูงสุดของเทคนิคนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบนั้นๆ การตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียนั้น นิยมตรวจสอบที่ยีน 16S rRNA ซึ่งเป็น mRNA ที่มีเพียงชุดเดียวในยีโนมของแบคทีเรีย พบในแบคทีเรียทุกชนิดมีขนาดประมาณ 1500 เบสหรือมากกว่า การตรวจสอบยีนนี้มี 2 วิธีคือ PCR-RFLP และการหาลำดับเบส โดยการโคลนยีนด้วยไพรเมอร์จำเพาะจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1500 เบส แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบชิ้นที่ตัดด้วยวิธี Electrophoresis และโปรแกรมตรวจวิเคราะห์หรือการนำชิ้นส่วนยีนที่โคลนได้ไปหาลำดับเบสแล้วตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูลของยีน โดยใช้ software สำหรับการตรวจวิเคราะห์ เช่น GCG Wisconsin Package, Gene Explorer หรือโปรแกรมที่ให้บริการผ่านทางอินเตอร์เน็ต เป็นต้น ก็จะสามารถจำแนกได้ว่าแบคทีเรียที่เราต้องการตรวจสอบเป็นชนิดใดอย่างไรก็ตามในแง่การปฏิบัติทั้งกระบวนการก็จะต้องใช้วิธีการดั้งเดิม เช่น สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการทดสอบกับสิ่งมีชีวิต (Bioassay) ประกอบกันไปจะเป็นการกลั่นกรอง ในเบื้องต้นได้ และลดจำนวนซ้ำของตัวอย่างที่จะตรวจวิเคราะห์ลงไป

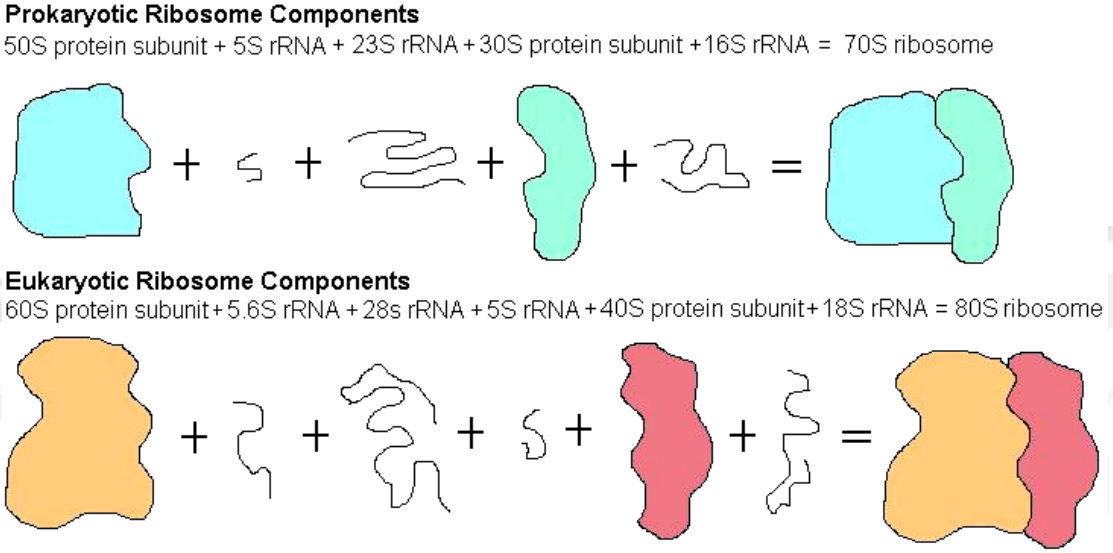
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การตรวจวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลร่วมกับการใช้ฐานข้อมูลทางชีวภาพ (Bioinformatics)

ribosomal RNA เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ดีในการใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตเพราะเป็นโมเลกุลยุคโบราณ มีหน้าที่ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิตโดยการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มีการกระจายตัวของโมเลกุลนี้อย่างกว้างขวาง พบได้ทั่วไปและมีการอนุรักษ์ปานกลาง นิยมใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับความคล้ายกัน (similarity) ของลำดับเบสของ 16S rRNA genes

2.4.1 โครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์

ไรโบโซมประกอบด้วยโครงสร้างหน่วยย่อย 2 หน่วย โดยเป็นหน่วยย่อยขนาดใหญ่และขนาดเล็กที่เลื่อนเข้าออกเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับการรับโมเลกุลของ RNA ที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นหน้าที่สำคัญของไรโบโซมก็คือ เป็นแหล่งที่สร้างโปรตีนพร้อมๆกับเป็นตัวสร้างโปรตีนให้กับเซลล์ ส่วนค่าที่ใช้ในการแยกขนาดของไรโบโซม คือ sedimentation coefficient ที่วัดได้เท่ากับ 70S ซึ่งประกอบไปด้วย ribosomal RNA ที่เรียงลำดับต่อกัน 3 ขนาด คือ 16S-23S-5S และโปรตีนอีกจำนวนประมาณ 50 ดังแสดงในรูปที่ 1 (Glaser และคณะ, 1992. อ้างโดย พรทิพย์, 2545.)



รูปที่ 1 ส่วนประกอบของไรโบโซม แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ไรโบโซมของพวกโปคาริโอต และไรโบโซมของยูคาริโอต
(http://homepages.ius.edu)

2.4.2 ส่วนประกอบโปรตีนของไรโบโซม

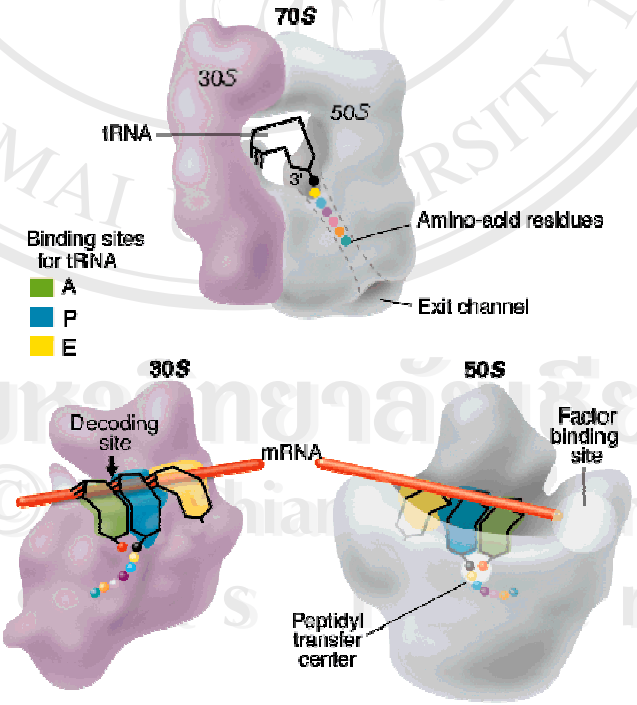
ไรโบโซมมีโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบจำนวนประมาณ 50 ชนิดโดยพบโปรตีนจำนวน 30 ชนิดที่หน่วย 50S และจำนวนประมาณ 20 ชนิดที่หน่วย 30S (Kawauchi และคณะ, 1982 อ้างโดย พรทิพย์, 2545) ดังรูปที่ 2

ส่วนประกอบ RNA ของไรโบโซม (ribosomal RNA)

มีส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่

1. จำนวนชุดของยีน rRNA

การที่เชื้อในอาณาจักร Prokaryotes มีลักษณะสำคัญประการหนึ่ง คือ มียีนสำหรับ rRNA และผลผลิตจาก rRNA ที่จัดว่าเป็นยีนอนุรักษ์ ซึ่งมีแบบแผนผังคงที่เฉพาะตัวหรือจำเพาะ จึงสามารถใช้คุณสมบัตินี้ในการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับ rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบกับ rRNA ของเชื้ออื่นๆ ในกลุ่มอาณาจักร Prokaryotes ที่ทราบลักษณะและคุณสมบัติมาก่อนแล้ว ทำให้ทราบว่ามียีนเพียง 1 หรือ 2 ชุด แบคทีเรียมียีน สำหรับควบคุมรหัส rRNA เป็นจำนวน 1-10 ชุด เช่น *E. coli* มี rRNA ยีน จำนวน 7 ชุด *B. subtilis* มี rRNA ยีน จำนวนอย่างน้อย 10 ชุด เป็นต้น (Neimark, 1984 ; Bove′ และGarnier, 1998 อ้างโดยพรทิพย์, 2545)



รูปที่ 2 ส่วนประกอบของโปรตีนไรโบโซม โครงสร้างหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ 30S และ 50S (www.mun.ca)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. จำนวนชุดของยีน rRNA

การที่เชื้อในอาณาจักร Prokaryotes มีลักษณะสำคัญประการหนึ่ง คือ มียีนสำหรับ rRNA และผลผลิตจาก rRNA ที่จัดว่าเป็นยีนอนุรักษ์ ซึ่งมีแบบแผนผังคงที่เฉพาะตัวหรือจำเพาะ จึงสามารถใช้คุณสมบัตินี้ในการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับ rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบกับ rRNA ของเชื้ออื่นๆ ในกลุ่มอาณาจักร Prokaryotes ที่ทราบลักษณะและคุณสมบัติมาก่อนแล้ว ทำให้ทราบว่ามียีนเพียง 1 หรือ 2 ชุด แบคทีเรียมียีน สำหรับควบคุมรหัส rRNA เป็นจำนวน 1-10 ชุด เช่น *E. coli* มี rRNA ยีน จำนวน 7 ชุด *B. subtilis* มี rRNA ยีน จำนวนอย่างน้อย 10 ชุด เป็นต้น (Neimark, 1984 ; Bove′ และGarnier, 1998 อ้างโดยพรทิพย์, 2545)

3. ลำดับของชุดยีนสำหรับ rRNA

ชุดยีนสำหรับ rRNA มีการเรียงตัวเป็นลำดับจากปลาย 5′ ไปยัง 3′ คือ 5′-16S-23S-5S-3′ โดยมีระยะห่างกันไม่มากนัก คือ ประมาณ 5 kbp ซึ่งโดยทั่วไปมักพบว่าระยะระหว่าง 16S กับ 23S อยู่ใกล้กันมากกว่าระยะห่างระหว่าง 23S กับ 5S (Taschke และคณะ., 1986 อ้างโดยพรทิพย์, 2545) และมีตำแหน่งของยีนควบคุมขบวนการถอดรหัส (transcription) ของโมเลกุล rRNA ได้แก่ Promotor P1, P2 ที่ตำแหน่งก่อนหน้ายีน 16S rRNA และ Terminator T1, T2 ที่ตำแหน่งต่อจาก 5S rRNA

4. ส่วนประกอบที่อยู่ช่วงแบ่งระยะภายในชุดของ rRNA genes (Spacer region)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงระหว่าง 16S-23S rRNA genes ก็ค่อนข้างคงที่ในแต่ละชนิดของเชื้อ จึงจัดว่าเป็นยีนที่มีความอนุรักษ์ เช่นเดียวกับยีนสำหรับ rRNA และสามารถใช้คุณสมบัตินี้ในการจำแนกชนิดหรือแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อได้เป็นอย่างดี (Weiburg, 1995., อ้างโดยพรทิพย์, 2545) เมื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบของเบสในยีนส่วนต่อระหว่าง 16S-23S-5S ทั้งหมด พบว่ามีสัดส่วนปริมาณ G+C ต่ำมาก คือเพียงประมาณ 20 mol% ขณะที่สัดส่วนปริมาณ G+C ในยีน rRNA ทั้งหมดสูงถึงประมาณ 48 mol% และสัดส่วนปริมาณ G+C ของจีโนมทั้งหมดประมาณ 25 mol %

2.5 การหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ผลผลิตของพีซีอาร์ที่ได้ ได้แก่ ยีน 16S rRNA ซึ่งควรจะมีประมาณ 1500-1600 เบส นำขนาดผลผลิตที่ได้ไปหาลำดับเบสต่อไป ซึ่งในการหาลำดับเบสมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น Chemical Cleavage Method, Enzymatic Method และ Automated DNA Sequence ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการสุดท้ายคือการหาลำดับเบสโดยเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งเป็นการพัฒนาอย่างมากของเทคโนโลยีนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

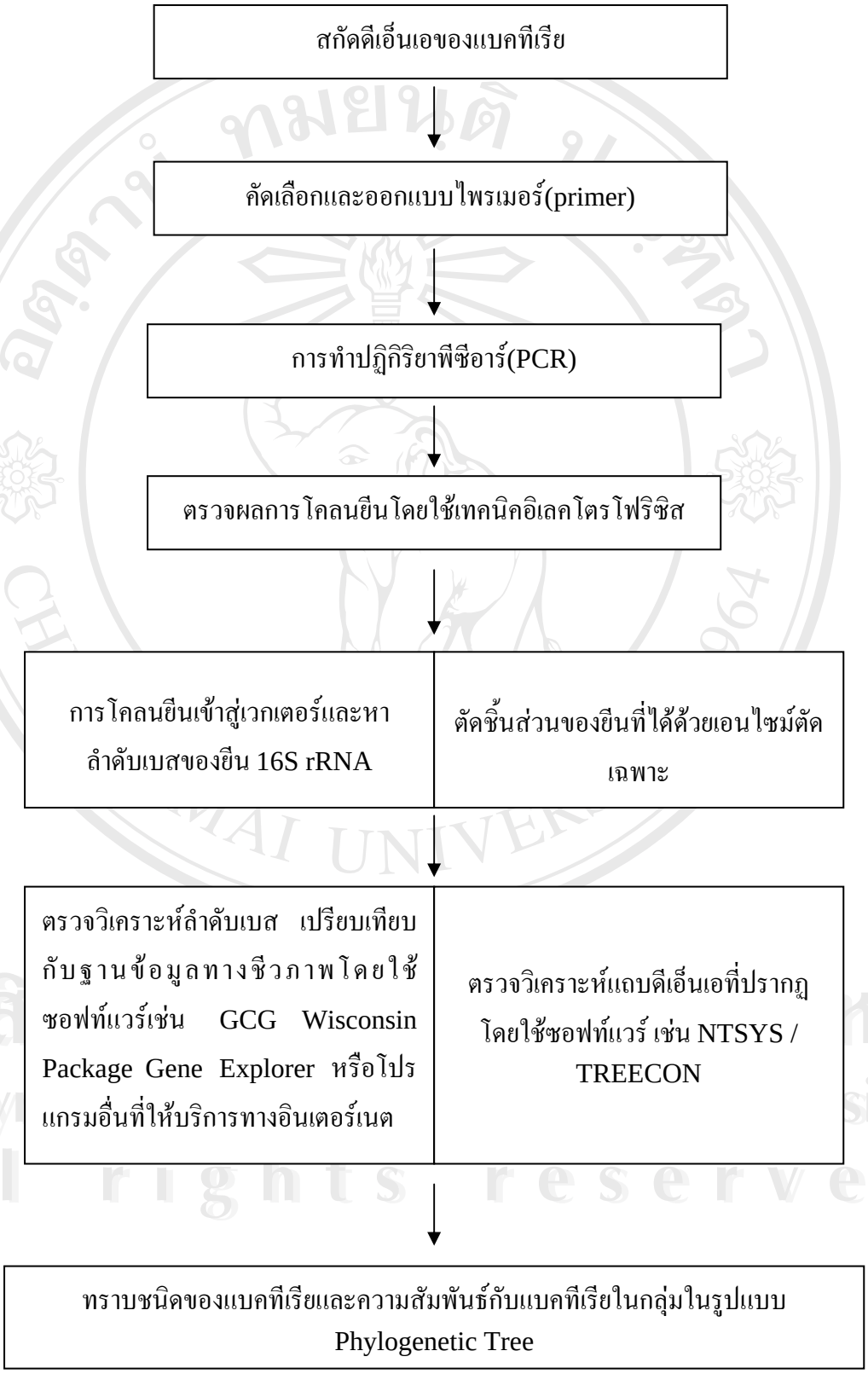
มีหลักการเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในธรรมชาติ อาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA Polymerase ในการสร้าง DNA สายใหม่ที่มีเบสคู่สม (Complementary base) กับดีเอ็นเอต้นแบบแล้วใช้นิวคลีโอไทด์ที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ ในการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี Cycle Sequencing ซึ่งจะต้องใช้ร่วมกับเทคนิค Electrophoresis สำหรับแยกโมเลกุลของ DNA บนวุ้นที่เรียกว่า slab gel ค่าที่อ่านได้จะมีความละเอียดสามารถแยกขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียง 1 base ได้ ปัจจุบันเทคนิคนี้พัฒนาเป็นระบบ capillary electrophoresis ซึ่งจะลดขั้นตอนการเตรียมแผ่นวุ้น และใช้งานได้สะดวกและแม่นยำขึ้น สามารถรองรับงานวิจัยด้านยีโนมของสิ่งมีชีวิตและงานด้านชีวโมเลกุลต่างๆ ได้มาก แต่ควรเป็นเครื่องที่สามารถทำปฏิกิริยาได้หลายๆ ตัวอย่างพร้อมๆ กัน จากการหาลำดับเบสของ 16SrRNA ของแบคทีเรียจะได้ลำดับเบสเป็นภาพกราฟิกหรือ text file ดังภาพที่แสดงข้างต้น สามารถนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพเพื่อการจัดจำแนกต่อไป

TTNATNNNNNNCTTTNAACGNNCTTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGT
CGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAC
GTACCATTTGCTACGGAATAACTCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATG
TGCCCGAAAGGGGAAAGATTTATCGGCAAATGATCGGCCCGCGTTGGATT
AGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTC
TGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTNCTAC
NGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAA
CCATGCCGCGTGAGTGATGAANGCCCTANGGTTGTAAAGCTCTTTNACCG
GTGAAGATAATGACNGTAACCGGAGAANAACCCCGGCTAACTTCNTGCCA
CAACCNCNGTAATACNAAAGGGGCTANCGTTNTTNNGATTTACTGGGCNT
AAANNCACTTANGCNGNCTAATAAATNANGGGTGAAATNCNNGGNTNAC
CCCNGAACTGNCTTTGATNCTTNTANTCTTGAATNTNGTANAAGTTAATTG
GAATTNCCAATTTANAAGNTNAAATTTNTNATATTTTNNNNGAANCACNA
TTNTNAAANGTNNNTNANTTNNANNATTATTTNCTTANNNNNNNAAANTT
TTNNNNATNTNTNTNNTTTNATTNCCTTNNNNTNATTCTNNTAANNNTNAA
ANNTNNNNCTTNTNNNNATTNTCTTTTTNNNNTNN

ตัวอย่างลำดับเบสของ 16S rDNA บริเวณที่นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับภาพรวมในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย สามารถสรุปได้ดังภาพต่อไปนี้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 กล้วยไม้

ภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิคถือว่าเป็นแหล่งกำเนิดธรรมชาติของกล้วยไม้ป่าที่สำคัญแหล่งหนึ่งของโลก จากผลการสำรวจในอดีต ปรากฏว่าประเทศไทยซึ่งเป็นหนึ่งในภูมิภาคนี้ มีกล้วยไม้อยู่ในป่าธรรมชาติไม่ต่ำกว่า 1000 ชนิด ทั้งประเภทที่พบบนต้นไม้ บนพื้นผิวของหิน ภูเขา และบนพื้นดิน ในอดีตมีการนำกล้วยไม้ป่ามาเลี้ยง แต่เป็นการเลี้ยงที่อิงธรรมชาติคือ นำมาปลูกไว้กับต้นไม้ที่ขึ้นอยู่ใกล้ๆกับที่พัก (กลุ่มเกษตรสัญจร, 2541) แต่ในปัจจุบันได้มีการเปลี่ยนมาเลี้ยงกล้วยไม้โดยปลูกเลี้ยงอย่างจริงจังและแพร่หลายมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะการเลี้ยงเพื่อการส่งออก และในปัจจุบันวิชาการทางด้านพันธุศาสตร์ ได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้ตัดดอกมากขึ้น

ประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมในการปลูกกล้วยไม้เมืองร้อน และสามารถส่งออกได้เป็นอันดับ 1 ของโลก ปี 2543 พื้นที่เพาะปลูกกล้วยไม้ มีประมาณ 14,319 ไร่ และเพิ่มขึ้นเป็น 15,000 ไร่ ในปี 2545 ในปี 2543 กล้วยไม้มีผลผลิตรวม 30,313 ตัน และเพิ่มขึ้น เป็น 30,848 ตัน ในปี 2544 (ตารางที่ 2) ผลผลิตกล้วยไม้ในงานวิจัยอยู่ระหว่าง 2,160-2,520 กิโลกรัมต่อไร่ ผลผลิตของเกษตรกร 1,843-1,930 กิโลกรัมต่อไร่ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงเนื้อที่ปลูกกล้วยไม้ ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ พ.ศ. 2537-2544

พ.ศ.	เนื้อที่เพาะปลูก(ไร่)	ผลผลิต(ตัน)	ผลผลิตต่อไร่(กก.)
2537	14,412	25,898	1,797
2538	14,853	25,413	1,711
2539	14,400	26,640	1,850
2540	14,500	26,825	1,850
2541	14,000	25,200	1,800
2542	14,139	29,579	2,092
2543	14,319	30,313	2,117
2544	14,503	30,848	2,127

ที่มา สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร
(http://www.doa.go.th/data-agri/ORCHID/1stat/st02.html)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กล้วยไม้เป็นพืชวงศ์ใหญ่ มีใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์ออคิเดซิอี้ (Orchidaceae) จึงมีขอบเขตครอบคลุมพืชไว้หลายร้อยสกุล จึงเกิดความแตกต่างในวงศ์ อย่างกว้างขวาง พืชทั่วไปในวงศ์นี้มีลักษณะต้นที่เป็นข้อ บริเวณเหนือข้อและติดอยู่กับข้อจะมีตา ซึ่งตานี้อาจเจริญเป็นหน่ออ่อน กิ่งอ่อน หรือช่อดอก ส่วนที่เป็นข้อนี้อาจจะมีใบและกาบใบระหว่างข้อแต่ละข้อเรียกว่า ปล้อง ส่วนของใบมีเส้นใบขนานกันตามความยาวใบ

ตารางที่ 3 แสดงผลผลิตเปรียบเทียบทางวิชาการกับของเกษตรกร และแหล่งเพาะปลูกกล้วยไม้

พันธุ์กล้วยไม้	ผลผลิตจากงานทดลอง (กก./ไร่)	ผลผลิตเฉลี่ยของเกษตรกร (กก./ไร่)	แหล่งปลูก
สกุลหวาย สกุลอื่นๆ	2,160-2,520. 2,450.	1,930. 1,843.	นครปฐม สมุทรสาคร กรุงเทพฯ ราชบุรี นนทบุรี อยุธยา กาญจนบุรี ปทุมธานี เชียงใหม่ สระบุรี สุพรรณบุรี สงขลาภูเก็ต สุราษฎร์ธานี ชลบุรี

ที่มา ข้อมูลงานค้นคว้าวิจัย สถาบันวิจัยพืชสวน สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (http://www.doa.go.th/data-agri/ORCHID/1stat/st02.html)

2.6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา แตกต่างไปจากดอกไม้ชนิดอื่นๆ เป็นไม้ดอกที่มีวิวัฒนาการขั้นสูงแล้ว ดังนี้

ดอก

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่มีลักษณะเด่น แปลกไปจากไม้ดอกชนิดอื่นๆคือ ส่วนของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย รวมอยู่บนฐานเดียวกัน เรียกโครงสร้างนี้ว่า เส้าเกสร (column) ซึ่งในไม้ดอกชนิดอื่นๆไม่มีโครงสร้างนี้ ลักษณะของกลีบดอก แบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ กลีบชั้นนอก (sepal) ประกอบไปด้วยกลีบดอก 3กลีบ คือ กลีบชั้นนอกด้านบน เรียกว่า dorsal sepal และกลีบชั้นนอกด้านข้างซึ่งมีอยู่ 2 กลีบ เรียกว่า lateral sepals ในส่วนกลีบดอกชั้นใน (petal) มีส่วนของกลีบดอกอยู่ 2 กลีบ และมีกลีบชั้นในอีกหนึ่งกลีบ ที่มีการแปรรูปไปเป็นส่วนที่เรียกว่า ปาก (labellum หรือ lip) ในบางครั้ง เมื่อมีการนับจำนวนกลีบดอกของกล้วยไม้ มักพูดว่ามี 5 กลีบ และ 1 ปาก ซึ่งส่วนของปากนี้ ในกล้วยไม้บางสกุล เรียกว่า กระเป๋า กระโปรง หรือหัวรองเท้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ช่อดอก

ช่อดอกของกล้วยไม้ มีทั้งที่เป็นดอกช่อและดอกเดียว ช่อดอกของกล้วยไม้ มีทั้งที่เป็นช่อเดียวและช่อแขนง

ลำต้น

ลักษณะต้นของกล้วยไม้ มีความหลากหลายอยู่มาก สามารถจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ด้วยกัน ตามลักษณะการเจริญของทรงต้น คือ

แบบเจริญไปทางเดียว(monopodial)

กล้วยไม้ในกลุ่มนี้ มีการเจริญเติบโตขึ้นไปทางสูงแต่เพียงอย่างเดียว การเกิดของใบเกิดสลับเป็นแบบฟันปลา ซ้อนกันขึ้นไปในระนาบเดียว จุดเจริญอยู่ที่ส่วนยอด รากเกิดขึ้นได้ตามลำต้นที่เจริญสูงขึ้นไป

แบบเจริญไปทางแนวนอน (sympodial)

กล้วยไม้ในกลุ่มนี้ การเจริญเติบโตเป็นไปในแนวนอน มีส่วนของลำต้นที่แท้จริงอยู่บริเวณโคน ในบางชนิดเรียกว่า เหง้า(rhizome) ส่วนที่เห็นเป็นลำต้นนั้น แท้จริงคือลำต้นเทียม หรือส่วนที่มีการพัฒนาไปในการสะสมอาหาร เรียกว่า ลำลูกกล้วย (pseudobulb) มีจุดเจริญอยู่ที่เหง้า เมื่อต้นเดิมพัฒนาไปได้ระยะหนึ่งแล้ว ก็เกิดต้นใหม่ขึ้นมาจากตาด้านข้าง

ใบ

ใบของกล้วยไม้มีอยู่หลากหลายลักษณะด้วยกัน สามารถแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะของใบได้ดังนี้

1. ใบกลม (terete) ใบแบบนี้มีลักษณะกลมเป็นทรงกระบอก มองดูคล้ายแท่งดินสอ
2. ใบร่อง (semi-terete) ใบมีลักษณะเกือบกลม แต่ยังคงแยกออกจากกันพอมองเห็นได้ ถ้าทำการตัดด้านข้าง จะมองเห็นเป็นรูปตัว V
3. ใบแบน (strap-leaf) ใบมีร่องตื้นๆอยู่ตรงกลางใบ แล้วส่วนของขอบใบแผ่ออกกว้าง บางชนิดใบโค้งห้อยลงเล็กน้อย

ราก

รากของกล้วยไม้ เป็นแบบ fibrous root system มีความสัมพันธ์อยู่อย่างใกล้ชิดกับ *Mycorrhiza* ซึ่งอยู่ร่วมกันแบบภาวะเกื้อกูล (symbiosis) โครงสร้างรากของกล้วยไม้ประกอบไปด้วย แกนตรงกลางที่เรียกว่า stele มีส่วนของ velamen หุ้มอยู่โดยรอบ โดยที่ระหว่างแกนตรงกลางและ velamen มีชั้นของ cortex อยู่ ส่วนของ velamen นี้ มีหน้าที่ในการดูดความชื้นจากอากาศและธาตุอาหาร และยึดเกาะติดกับต้นไม้ที่อาศัยอยู่ ปลายรากของกล้วยไม้พวกอิงอาศัย มีส่วนของคลอโรฟิลล์ สามารถทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงได้ ถ้าเป็นพวกกล้วยไม้ดิน มีส่วนของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

rhizodermis ทำหน้าที่ในการดูดธาตุอาหาร นอกจากนั้นแล้วพวกกล้วยไม้ดินมักมีส่วนหัว ทำหน้าที่สะสมอาหารอีกด้วย

เมล็ด

เมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็ก น้ำหนักประมาณ 0.3-0.6 ไมโครกรัม เนื่องจากกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก เป็นเหตุที่ทำให้การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้จากเมล็ดต้องการเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วย ไม่สามารถที่จะทำการเพาะเมล็ดของกล้วยไม้เหมือนดอกไม้ชนิดอื่นๆ

2.6.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้

2.6.2.1. ปัจจัยภายใน ปัจจัยนี้ เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมของกล้วยไม้

2.6.2.2. ปัจจัยภายนอก ปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยที่มีผลต่อขบวนการทางสรีระวิทยาของกล้วยไม้โดยตรง ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่

แสง

แสงในส่วนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้มากที่สุด คือ ความเข้มแสง เนื่องมาจากกล้วยไม้ส่วนมากไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อรับแสงโดยตรงจากดวงอาทิตย์ ในการปลูกเลี้ยงจึงต้องพรางแสงให้แก่กล้วยไม้ โดยกล้วยไม้ต้องการพรางแสง 50% หรือ 60% การจะทราบว่ากล้วยไม้ชนิดใดต้องการแสงมากน้อยเพียงใด สามารถดูจากลักษณะใบได้

1. ใบกลม หรือใบร่อง พวกนี้ต้องการแสงแดดมาก สามารถปลูกเลี้ยงกลางแจ้งได้ โดยเฉพาะในที่ที่มีความชื้นสูง
2. ใบแบน หนาและอวบน้ำ ใบมีสีเข้มไม่มาก เช่นใบของสกุลช้าง สกุลหวาย ใบลักษณะเช่นนี้พอบอกได้ว่า การพรางแสงไม่ต้องมีมากนัก ประมาณ50-60% ก็เพียงพอ แต่ยังขึ้นอยู่กับความชื้นในการปลูกเลี้ยงด้วย
3. ใบแบนมากๆ และใบมีสีเขียวเข้ม พวกนี้ชอบที่ร่ม การพรางแสงอาจต้องมากถึง 80%

การดูลักษณะของใบอาจช่วยทำให้คาดการณ์ได้ว่ากล้วยไม้ชนิดนั้นๆ ควรมีการพรางแสงให้มากน้อยเพียงใดโดยทั่วไปกล้วยไม้ควรได้รับแสง 10,000-15,000 แรงเทียน/วัน

น้ำและความชื้น

ปัจจัยทั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดคุณภาพของน้ำและการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้มีความสำคัญต่อกันเป็นอย่างมาก กล้วยไม้เป็นดอกที่มีความทนทานต่อปริมาณธาตุที่เจือปนอยู่ในน้ำได้น้อยมาก น้ำที่ใช้รดกล้วยไม้ต้องเป็นน้ำสะอาด มีค่า pH อยู่ระหว่าง 6-6.5 และต้องเป็นน้ำที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณของเหล็ก แมงกานีส และแคลเซียมสูง การให้น้ำควรให้แต่พอดี ไม่ควรมากเกินไป โดยเฉพาะกล้วยไม้ที่ใช้วัสดุปลูกที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูง เช่น กาบมะพร้าว เพราะการให้น้ำที่มากเกินไป กล้วยไม้อาจเกิดการฉ่ำน้ำ และทำให้เชื้อโรคเข้าทำลายได้ง่าย โดยทั่วไป กล้วยไม้สามารถทนสภาพแห้งได้ดีกว่าสภาพเปียก

การรดน้ำควรรดให้เปียกทั้งใบและราก ควรระวังช่อดอกในขณะที่ดอกบาน ไม่ควรให้น้ำโดนช่อดอก เพราะจะทำให้อายุการบานของดอกลดลง การรดน้ำควรรดเมื่อมีแสงแดดบ้าง ในช่วงเช้าควรอยู่ระหว่าง 8.00-9.00 น. ในกรณีที่อากาศร้อนมาก อาจมีการให้น้ำอีกครั้งในช่วงประมาณ 15.00-16.00 น. ไม่ควรให้น้ำแก่กล้วยไม้เมื่อแสงแดดใกล้หมด เพราะน้ำที่ค้างอยู่ตามยอด เป็นอันตรายต่อต้น ในการให้เชื้อเข้าทำลาย

การถ่ายเทอากาศ

ปัจจัยนี้ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้มาก เพราะการถ่ายเทอากาศที่ไม่ดี อาจก่อให้เกิดปัญหาเรื่องโรคระบาดที่เกิดมาจากเชื้อรา

อุณหภูมิ

กล้วยไม้สามารถเจริญได้ในที่ที่มีอุณหภูมิแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของกล้วยไม้ บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศเย็น เช่น ซิมบีเดี้ยมดอกใหญ่ เป็นกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตได้ดีในที่เย็น การนำมาเลี้ยงที่พื้นที่ราบของจังหวัดเชียงใหม่อาจพอทำได้ แต่อาจไม่ให้ดอก เนื่องจากอุณหภูมิเย็นไม่พอในการชักนำให้เกิดตาดอก

ธาตุอาหาร

กล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติ มีการเจริญเติบโตอยู่ในภาวะเกื้อกูล กับเชื้อราในกลุ่ม Mycorrhiza ซึ่งเชื้อราเหล่านี้ เป็นแหล่งในการสร้างสารพวกคาร์โบไฮเดรตแก่กล้วยไม้ โดยเฉพาะเมล็ดกล้วยไม้ที่กำลังงอก โดยทั่วไปกล้วยไม้มีความสามารถในการดูดซับธาตุอาหารมาใช้ได้อยู่แล้ว ปริมาณธาตุอาหารที่กล้วยไม้ต้องการ ขึ้นอยู่กับชนิดและระยะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) มีความต้องการฟอสฟอรัส โปแตสเซียม และแคลเซียมสูง ในขณะที่สกุลแคทลียา (*Cattleya*) ต้องการไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมากกว่าสกุล *Avanda* และ *Vanda* กล้วยไม้พวกใบกลม ต้องการปุ๋ยอินทรีย์มากกว่าปุ๋ยเคมี

ในระยะที่มีการเจริญเติบโตทางใบ ควรให้ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนค่อนข้างสูง เช่นสูตร 30-20-10 หรือบางครั้งให้สูตรเสมอ 15-15-15 หรือมีการสลับกันให้สัปดาห์ละครั้ง ในระยะเริ่มมีการให้ดอก การให้ปุ๋ยแก่กล้วยไม้ ควรใช้ปุ๋ยที่มีฟอสฟอรัสและโปแตสเซียมค่อนข้างสูง เช่นสูตร 10-21-21 หรือ 13-27-27 ก็ได้ (ณัฐา, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โรคและแมลง

โรคและแมลงเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญมากต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ โรคและแมลงที่พบบ่อยได้แก่

1. โรคเหี่ยวหรือเน่าแห้งที่เกิดจากเชื้อราเมล็ดผักกาด
2. โรคใบปื้นเหลือง
3. โรคเน่าดำ หรือยอดเน่า
4. โรคใบจุด หรือใบขี้กลาก
5. โรคแอนแทรกโนส
6. เพลี้ยไฟ

ในบรรดากล้วยไม้สกุลต่างๆทั้งหมด กล้วยไม้สกุลเดนโดเบี้ยม (*Dendrobium*) หรือที่เราเรียกกันว่ากล้วยไม้สกุลหวาย นับเป็นสกุลใหญ่ที่สุดและเป็นสกุลของไม้ตัดดอกที่ในปัจจุบันมีการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศเป็นจำนวนมากถึงประมาณร้อยละ 90 ของดอกกล้วยไม้ที่ส่งออกทั้งหมด กล้วยไม้สกุลหวายมีการแพร่กระจายพันธุ์ออกไปในบริเวณกว้างทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกออกเป็นหมู่ประมาณ 20 หมู่ และรวบรวมกล้วยไม้ชนิดนี้ที่ค้นพบแล้วได้ประมาณ 1,000 ชนิดพันธุ์ นับเป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุดที่พบในประเทศไทย คือ พบในป่าธรรมชาติมากกว่า 130 ชนิด ซึ่งมีรูปร่างลักษณะทั้งดอกใบและลำลูกกล้วยแตกต่างกันออกไปอย่างกว้างขวาง

กล้วยไม้สกุลหวาย เป็นกล้วยไม้ที่มีระบบรากกึ่งอากาศ มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล คือ มีลำลูกกล้วย เมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ ใบแข็งหนาสีเขียว ดอกมีลักษณะทั่วไปของกลีบชั้นนอกคู่บนและคู่ล่างขนาดยาวพอๆ กันโดยกลีบชั้นนอกบนจะอยู่อย่างอิสระเดี่ยวๆ ส่วนกลีบชั้นนอกคู่ล่างจะมีส่วนโคน ซึ่งมีลักษณะยื่นออกไปทางด้านหลังของส่วนล่างของดอกประสานเชื่อมติดกับฐานหรือสันหลังของเส้าเกสร และส่วนโคนของกลีบชั้นนอกคู่ล่างและส่วนฐานของเส้าเกสรซึ่งประกอบกันจะปูดออกมา มีลักษณะคล้ายเดือยที่เรียกว่า “เดือยดอก” สำหรับกลีบชั้นในทั้งสองกลีบมีลักษณะต่างๆ กันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้นั้นๆ กล้วยไม้หวายป่าของไทยมีสีสวยงาม ก้านช่อสั้น เหมาะสำหรับไว้ดูเล่นและเพื่อเป็นการค้นคว้าเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายที่เป็นกล้วยไม้อยู่ในป่าของประเทศไทยนั้นก็มีด้วยกันมากมายหลายชนิด อันได้แก่ พวกเอื้อง ต่างๆ เช่น เอื้องผึ้ง, เอื้องหม่อนไข่, เหลืองจันทรบูร, เอื้องพวงหยก, เอื้องช้างน้าว, เอื้องมัจฉานุ, เอื้องเงินหลวง, เอื้องเงิน, เอื้องคำ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีหวายต่างประเทศ เป็นกล้วยไม้ที่มีความสำคัญทางการค้า ปลูกเลี้ยงเป็นหวายตัดดอกขาย เช่น หวายฟาแลนนอฟซิส หวายกูลดีอี้ (บรรณ, 2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 ฮอร์โมนพืช (ดนัย, 2004)

ฮอร์โมนพืชเป็นสารเคมีภายในพืชซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชทั้งต้น และการเจริญของพืชในแต่ละส่วน มีทั้งชนิดที่กระตุ้นการเจริญเติบโต และระงับการเจริญเติบโต สำหรับฮอร์โมนพืชที่พบในปัจจุบันได้แก่ ออกซิน (Auxin) จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) ไซโตไคนิน (Cytokinins) กรดแอบซิสิค (Abscisic) หรือ ABA และเอทิลีน (Etylene) ซึ่งมีสภาพเป็นก๊าซ

ออกซิน

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับออกซินนั้นเกิดขึ้นจากงานของ Charles Darwin ซึ่งศึกษาเรื่อง Phototropism ซึ่งพืชจะโค้งงอเข้าหาแสง Darwin ทดลองกับต้นกล้าของ *Phalaris canariensis* และพบว่าโคลีออพไทล์ของพืชชนิดนี้จะตอบสนองต่อการได้รับแสงเพียงด้านเดียว ทำให้เกิดการโค้งเข้าหาแสง Darwin สรุปว่าเมื่อต้นกล้าได้รับแสงจะทำให้มีอิทธิพล (Influence) บางอย่างส่งผ่านจากส่วนยอดมายังส่วนล่างของโคลีออพไทล์ ทำให้เกิดการโค้งงอเข้าหาแสง ซึ่งนักวิทยาศาสตร์รุ่นต่อมาได้ศึกษาถึงอิทธิพลดังกล่าว ต่อมา Boysen-Jensen และ Paal ได้ศึกษาและแสดงให้เห็นว่าอิทธิพลดังกล่าวนี้มีสภาพเป็นสารเคมี ซึ่งในสภาพที่โคลีออพไทล์ได้รับแสงเท่ากันทั้งสองด้าน สารเคมีนี้จะเคลื่อนที่ลงสู่ส่วนล่างของโคลีออพไทล์ ในอัตราเท่ากันทุกด้านและทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต

ในปี ค.ศ. 1926 Went ได้ทำงานทดลองและสามารถแยกสารชนิดนี้ออกจากโคลีออพไทล์ได้ โดยตัดส่วนยอดของโคลีออพไทล์ของข้าวโอ๊ตแล้ววางลงบนวุ้นจะทำให้สารเคมีที่กระตุ้นการเจริญเติบโตไหลลงสู่วุ้น เมื่อนำวุ้นไปวางลงที่ด้านหนึ่งของโคลีออพไทล์ที่ไม่มียอดด้านใดด้านหนึ่งจะทำให้โคลีออพไทล์ดังกล่าวโค้งได้ เขาสรุปว่าสารเคมีได้ซึมลงสู่วุ้นแล้วซึมจากวุ้นลงสู่ส่วนของโคลีออพไทล์ วิธีการดังกล่าวนอกจากเป็นวิธีการแรกที่แยกสารเคมีชนิดนี้ได้แล้ว ยังเป็นวิธีการวัดปริมาณของฮอร์โมนได้ด้วย เป็นวิธีที่เรียกว่า Bioassay

สารเคมีดังกล่าวได้รับการตั้งชื่อว่า ออกซิน ซึ่งในปัจจุบันพบในพืชชั้นสูงทั่วๆ ไป และมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช สังเคราะห์ได้จากส่วนเนื้อเยื่อเจริญของลำต้น ปลายราก ใบอ่อน ดอกและผล และพบมากที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ โคลีออพไทล์และคัพภะ รวมทั้งใบที่กำลังเจริญด้วย

ออกซินที่เกิดขึ้นในธรรมชาติมีด้วยกัน 3 ชนิด

สำหรับ IAA (Indole-3-acetic acid) หรือ Indoleacetic acid เป็นสารที่พบในธรรมชาติมากที่สุด บางครั้งจึงเรียก IAA ว่าเป็นออกซินที่แท้จริงเพียงชนิดเดียว ส่วน 4-chloro IAA (4-chloro-Indoleacetic acid) และ PAA (phenylacetic acid) ก็เป็น IAA ประเภทหนึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากออกซินที่พบในธรรมชาติยังมีออกซินที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น เอ็นเอเอ (NAA) ไอบีเอ (IBA) 4-ซีพีเอ (4-CPA) เป็นต้น

การวัดปริมาณออกซิน

1. Bioassay คือ การวัดปริมาณออกซินโดยใช้ชิ้นส่วนของพืช เช่น โคลีออพไทล์ของข้าวโอ๊ต หรือพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอื่นๆ แล้ววัดความโค้งของยอดโดยการวางออกซินที่ต้องการวัดปริมาณลงบนส่วนของโคลีออพไทล์ซึ่งตัดยอดออกแล้ว มุมที่โค้งจะบอกปริมาณของออกซินได้โดยเปรียบเทียบจากเส้นมาตรฐาน (Standard Curve)

2. การวัดจากคุณสมบัติทางฟิสิกส์ คือ การวัดปริมาณของออกซินโดยใช้การดูดกลืนแสงของ IAA ซึ่งเมื่อมีความเข้มข้นต่างกันจะดูดกลืนแสงได้ต่างกัน โดยใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 280 nm หรือสกัดจนเป็นสารบริสุทธิ์แล้วจึงใช้เครื่อง Gas Chromatograph ร่วมกับ Mass Spectrometry ในการจำแนกและหาปริมาณ

3. การวัดโดยวิธีเคมี โดยให้ออกซินทำปฏิกิริยากับ Salkowski's Reagent (acidified ferric chloride) หรือใช้ Ehrllch's Reagent ซึ่งจะเกิดสีขึ้นมา จากนั้นวัดความเข้มของสีแล้วเปรียบเทียบกับเส้นมาตรฐาน

จิบเบอเรลลิน (Gibberellins)

การค้นพบกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่ปัจจุบันเรียกว่าจิบเบอเรลลินนั้น เกิดประมาณปี 1920 เมื่อ Kurosawa นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ศึกษาในต้นข้าวที่เป็นโรค Bakanae หรือโรคข้าวตัวผู้ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* หรือ *Fusarium moniliforme* ซึ่งทำให้ต้นข้าวมีลักษณะสูงกว่าต้นข้าวปกติ ทำให้ล้มง่าย จากการศึกษาพบว่า ถ้าเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้วกรองเอาเชื้อราออกไปเหลือแต่อาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไปราดต้นข้าวจะทำให้ต้นข้าวเป็นโรคได้ จึงเป็นที่แน่ชัดว่า เชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างสารบางชนิดขึ้นในต้นพืชหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งกระตุ้นให้ต้นข้าวเกิดการสูงผิดปกติได้ ในปี 1939 ได้มีผู้ตั้งชื่อสารนี้ว่าจิบเบอเรลลิน การค้นพบจิบเบอเรลลิน เกิดขึ้นในช่วงเดียวกับที่พบออกซิน การศึกษาส่วนใหญ่จึงเน้นไปทางออกซิน ส่วนการศึกษาจิบเบอเรลลินในช่วงแรกจะเป็นไปในแง่ของโรคพืช ในการศึกษาขั้นแรกค่อนข้างยาก เพราะมักจะมีกรดฟิวซาริค (Fusaric Acid) ปะปนอยู่ซึ่งเป็นสารระงับการเจริญเติบโต ความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างและส่วนประกอบทางเคมีของจิบเบอเรลลินนั้นได้รับการศึกษาในปี 1954 โดยนักเคมีชาวอังกฤษซึ่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* และเรียกสารนี้ว่ากรดจิบเบอเรลลิค (Gibberellic Acid)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การให้กรดจิบเบอเรลลิคกับพืชที่สมบูรณ์ทั้งต้น จะเร่งให้เกิดการยืดตัวเพิ่มขึ้นของลำต้นและใบอย่างผิดปกติ การตอบสนองจะปรากฏเด่นชัดเมื่อให้กรดนี้กับพืชที่เตี้ยแคระโดยพันธุกรรม เพราะจะกระตุ้นให้พืชเหล่านี้เจริญสูงตามปกติ กรดจิบเบอเรลลิคที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อรานั้นมีโครงสร้างทางเคมี และกิจกรรมทางชีววิทยาเหมือนกับกรดจิบเบอเรลลิคในพืชปกติทุก ๆ ชนิด (พืชปกติหมายถึงพืชที่ไม่เป็นโรค) มีสารประกอบประเภทนี้จำนวนมากที่แยกเป็นสารบริสุทธิ์ได้จากพืชชั้นสูง ในปัจจุบันมีจิบเบอเรลลินซึ่งเป็นชื่อเรียกทั่ว ๆ ไปของสารประกอบประเภทนี้ประมาณไม่น้อยกว่า 80 ชนิด ชื่อเรียกสารประกอบชนิดนี้จะตั้งชื่อดังนี้ คือ Gibberellins $A_1(GA_1)$, A_2, A_3 เป็นต้น โดยที่กรดจิบเบอเรลลิค คือ GA_3

GA ทุกชนิดจะมีโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลเป็น Gibberellane Carbon Skeleton ซึ่งจะเหมือนกับกรดจิบเบอเรลลิค จะแตกต่างกันตรงจำนวนและตำแหน่งของกลุ่มที่เข้าแทนที่ในวงแหวนและระดับของความอิ่มตัวของวงแหวน A GA ประกอบด้วยคาร์บอนประมาณ 19-20 อะตอม ซึ่งจะรวมกันเป็นวงแหวน 4หรือ 5 วงและจะต้องมีกลุ่มคาร์บอกซิลอย่างน้อย 1 กลุ่ม โดยใช้ชื่อย่อว่า GA ซึ่ง GA_3 เป็นชนิดที่พบมากและได้รับความสนใจศึกษามากกว่าชนิดอื่นๆ GA เป็นฮอร์โมนที่พบในพืชชั้นสูงทุกชนิด นอกจากนั้นยังพบในเฟิร์น สาหร่าย และเชื้อราบางชนิด แต่ไม่พบในแบคทีเรีย

การหาปริมาณจิบเบอเรลลิน

1. ใช้วิธีโครมาโตกราฟ เช่น GC หรือ Gas Chromatograph และ Paper Chromatograph
2. ใช้วิธี Bioassay โดยการที่จิบเบอเรลลินสามารถทำให้พืชแคระ (ข้าวโพดและถั่ว) เจริญเป็นต้นปกติได้ หรือโดยการที่จิบเบอเรลลินสามารถป้องกันการเกิดการเสื่อมสลาย (Senescence) หรือโดยหาปริมาณจิบเบอเรลลินจากการกระตุ้นให้เมล็ดข้าวบาร์เลย์สร้างเอนไซม์ แอลฟาอะมัยเลส (a-amylase) ในอาหารสำรอง

ไซโตไคนิน (Cytokinins)

การค้นพบฮอร์โมนในกลุ่มนี้เริ่มจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยในปี ค.ศ. 1920 Haberlandt ได้แสดงให้เห็นว่ามีสารชนิดหนึ่งเกิดอยู่ในเนื้อเยื่อพืชและกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพาเรนไคมาในหัวมันฝรั่งกลับกลายเป็นเนื้อเยื่อเจริญได้ ซึ่งแสดงว่าสารชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์ ต่อมามีการพบว่าน้ำมะพร้าวและเนื้อเยื่อของหัวแครอทมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์เช่นกัน

นักวิทยาศาสตร์หลายท่าน เช่น Skoog และ Steward ทำการทดลองในสหรัฐอเมริกา โดยศึกษาความต้องการสิ่งที่ใช้ในการเจริญเติบโตของกลุ่มก้อนของเซลล์ (Callus) ซึ่งเป็นเซลล์ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพเกิดขึ้นของ pith จากยาสูบและรากของแครอท จากผลการทดลองนี้ทำให้รู้จักไซโตไคนินในระยะปี ค.ศ. 1950 ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพของเนื้อเยื่อ ในปัจจุบันพบว่าไซโตไคนิน ยังเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพ (Senescence) และการควบคุมการเจริญของตาข้างโดยตายอด (Apical Dominance)

จากการศึกษาของ Skoog โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อ pith ของยาสูบ พบว่าการที่เนื้อเยื่อจะเจริญต่อไปได้นั้นจะต้องมีอาหารและฮอร์โมน เช่น ออกซิน โดยถ้าให้ออกซินในอาหารจะมีการเจริญของเนื้อเยื่อนั้นน้อยมาก เซลล์ขนาดใหญ่เกิดขึ้นโดยไม่แบ่งเซลล์ นอกจากนั้นจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพ อย่างไรก็ตามหากเพิ่มพิวรีน เบส (Purine Base) ชนิดอะดีนีน (Adenine) ลงไปในอาหารรวมกับ IAA พบว่า เนื้อเยื่อจะกลายเป็นกลุ่มเซลล์ (Callus) ถ้าใส่อะดีนีนอย่างเดียวรวมกับอาหาร เนื้อเยื่อจะไม่สร้างกลุ่มเซลล์ขึ้นมา ดังนั้นจึงมีปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ระหว่าง อะดีนีน และ IAA ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ขึ้น อะดีนีน เป็นพิวรีนเบส ซึ่งมีสูตรเป็น 6-อะมิโนพิวรีน (6-aminopurine) และปรากฏอยู่ในสภาพธรรมชาติโดยเป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิค

ในปี 1955 Miller ได้แยกสารอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายคลึงแต่มีประสิทธิภาพดีกว่าอะดีนีน ซึ่งได้จากการสลายตัวของ DNA ของสเปิร์มจากปลาแฮร์ริง สารชนิดนี้ คือ 6-(furfuryl-amino) purine ซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้ายอะดีนีน เนื่องจากสารชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์โดยร่วมกับออกซิน จึงได้รับชื่อว่าไคเนติน (Kinetin)

ไคเนติน เป็นสารที่ไม่พบตามธรรมชาติในต้นพืช แต่เป็นสารสังเคราะห์ ต่อมาได้มีการค้นพบไซโตไคนินสังเคราะห์อีกหลายชนิด สารสังเคราะห์ที่มีกิจกรรมของไซโตไคนินสูงที่สุดคือ เบนซิลอะดีนีน (Benzyladenine หรือ BA) และเตตระไฮโดรไพรานีลเบนซิลอะดีนีน (tetrahydropyranylbenzyladenine หรือ PBA)

ไซโตไคนินที่พบในพืช

แม้ว่าไคเนติน BA และ PBA เป็นสารที่ไม่พบในต้นพืช แต่สารซึ่งพบในอวัยวะของพืชหลายชนิด เช่น ในน้ำมะพร้าว ในผลอ่อนของข้าวโพด ให้ผลทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกับสาร BA และ PBA สารที่เกิดตามธรรมชาติและสารสังเคราะห์หลายชนิด ซึ่งมี คุณสมบัติเหมือนไคเนตินนั้น เรียกโดยทั่วๆ ไปว่า ไซโตไคนิน ซึ่งเป็นสารที่เมื่อมีผลร่วมกับออกซินแล้วจะเร่งให้เกิดการแบ่งเซลล์ในพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

มีหลักฐานเด่นชัดชี้ว่าไซโตไคนินที่เกิดในธรรมชาติเป็นสารประกอบพิวรีน ในปี 1964 Letham ได้แยกไซโตไคนินชนิดหนึ่งจากเมล็ดข้าวโพดหวาน และพบว่า เป็นสาร 6-(4-hydroxy-3-methyl but-2-enyl) aminopurine ซึ่ง Letham ได้ตั้งชื่อว่า ซีเอติน (Zeatin)

นับตั้งแต่มีการแยกไซโตไคนินชนิดแรกคือซีเอตินแล้ว ก็มีการค้นพบไซโตไคนิน อีกหลายชนิดซึ่งทุกชนิดเป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน คือ เป็น 6-substituted amino purines ซีเอตินเป็นไซโตไคนินธรรมชาติซึ่งมีประสิทธิภาพสูงที่สุด

การหาปริมาณของไซโตไคนิน

1. ใช้ Tobacco callus test โดยให้ไซโตไคนินกระตุ้นการเจริญของ tobacco pith cell โดยการชั่งน้ำหนักเนื้อเยื่อพืชที่เพิ่มขึ้น แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน
2. Leaf senescence test ไซโตไคนินทำให้คลอโรฟิลล์ไม่สลายตัวในแผ่นใบที่ลอยอยู่ในสารละลายไซโตไคนินในที่มืด แล้วหาจำนวนของคลอโรฟิลล์ที่เหลืออยู่ หลังจากลอยไว้ 3-4 วัน วิธีนี้ให้ผลไม่ดีเท่าวิธีแรก

กรดแอบซิสิค (Abscisic Acid) หรือ ABA

ในการศึกษาถึงการร่วงของใบ การพักตัวของตาและเมล็ดในช่วงปี ค.ศ. 1950-1960 นั้น ชี้ให้เห็นว่าเป็นไปได้ว่ามีสารระงับการเจริญปรากฏอยู่ในต้นพืช โครงสร้างของสารเคมีดังกล่าวถูกค้นพบในปี 1965 ในผล และใบของฝ้าย สารเคมีดังกล่าวได้รับการตั้งชื่อว่า กรดแอบซิสิค หรือ ABA และพบว่าเป็นสารจำพวกเซสควิเทอร์พีนอยด์

โมเลกุลของ ABA ประกอบด้วย asymmetric carbon atom จึงสามารถแสดงลักษณะของ optical isomerism ได้ อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติ ABA จะเกิดเพียงชนิด (+) enantiomorph เท่านั้น ABA ยังแสดงลักษณะ geometric isomerism ได้ด้วย side chain จะเป็น trans รอบๆ คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 เสมอ แต่โมเลกุลสามารถเป็นได้ทั้ง cis- หรือ trans รอบๆ คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ABA ส่วนใหญ่ที่พบในพืชจะเป็น (+)-2-cis ABA แม้ว่าจะพบ (+)-2-trans ABA บ้างแต่น้อยมาก ดังนั้นรูป (+)-2-cis ของ ABA จึงมักหมายถึง ABA ทั่ว ๆ ไป

ABA ถูกแยกออกจากพืชหลายชนิดทั้งแองจิโอสเปิร์มส์ จิมโนสเปิร์มส์ เฟินและมอส (Angiosperms, Gymnosperms, Ferns และ Mosses)

การหาปริมาณ ABA

1. Bioassay โดยทดสอบการยับยั้งการยืดตัวของโคลีออพไทล์ของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว หรือใช้ใบของ Commelina ลอยใน ABA ในบรรยากาศที่ไม่มี CO_2 จะทำให้ปากใบปิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ใช้ Gas chromatograph นับว่าใช้ได้ผลดีกว่าฮอร์โมนชนิดอื่นเพราะมีคุณสมบัติ ในการจับอีเลคตรอนได้ดีและดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ตได้

เอทธิลีน (Ethylene)

เป็นฮอร์โมนพืชซึ่งควบคุมการเจริญเติบโตในหลายแง่ เช่น การพัฒนา การเสื่อมสลาย ขึ้นอยู่กับเวลาและสถานที่ ซึ่งเกิดเอทธิลีนขึ้นมา ผลของเอทธิลีนมีทั้งในแง่ที่เป็นประโยชน์หรือเป็นโทษต่อพืช เอทธิลีนเป็นฮอร์โมนที่มีสภาพเป็นก๊าซซึ่งรู้จักกันมานานแล้ว จากการบ่มผลไม้ ในปี 1934 ได้มีการพิสูจน์ให้เห็นว่าเอทธิลีนเป็นก๊าซที่สังเคราะห์ขึ้นโดยพืช และสามารถเร่งกระบวนการสุกได้ ต่อมาพบว่าการก่อกองไฟใกล้ ๆ สวนมะม่วงและสับปะรดจะกระตุ้นให้ออกดอกได้ ซึ่งสารที่ทำให้เกิดการออกดอก คือ เอทธิลีนนั่นเอง เอทธิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญในด้านหลังเก็บเกี่ยวด้วย

ต่อมาพบว่า ดอก เมล็ด ใบ และรากพืชสามารถสังเคราะห์เอทธิลีนได้ เช่น ในเซเลอรี่ พันธุ์ซึ่งต้นขาวเอง (Self blanching) พบว่า เซเลอรี่สามารถสร้างเอทธิลีนมากำจัดสีเขียวที่ก้านได้ นอกจากนั้นในปี 1935 ยังพบว่า การให้ออกซินกับพืชอาจจะกระตุ้นให้พืชสร้างเอทธิลีนได้ ซึ่งเป็นคำอธิบายได้ชัดเจนสำหรับกรณีที่เมื่อให้ออกซินกับพืชแล้วพืช ตอบสนองเหมือนกับได้รับเอทธิลีน ออกซินกับเอทธิลีนนั้นเมื่อให้กับพืชมักจะให้ผลส่งเสริมกัน ส่วนของพืชที่พบเอทธิลีนมากคือ ใบแก่ ผลไม้สุก และเนื้อเยื่อที่อยู่ภายใต้สภาพความเครียด (Stress)

การหาปริมาณของเอทธิลีน

1. Bioassay ใช้การตอบสนองของต้นถั่วลันเตาที่งอกในที่มืด ต่อความเข้มข้นของเอทธิลีนในอัตราความเข้มข้นที่ต่าง ๆ กัน ต้นกล้าของถั่วที่งอกในที่มืดจะแสดงอาการตอบสนองต่อเอทธิลีนโดยเนื้อเยื่อใต้ยอดบวม ยอดจะสูญเสียสภาพการตอบสนองต่อแรงดึงดูดของโลก ซึ่งถ้าหากได้รับเอทธิลีนสูงก็จะแสดงอาการมาก แต่ลักษณะอาการดังกล่าวอาจจะเกิดจากการตอบสนองต่ออะเซทีลีนและโปรปีลีนได้ด้วย
2. การใช้คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของเอทธิลีน ซึ่งอาจจะวัดโดย Gas Chromatograph
3. การใช้วิธีทางเคมี โดยวัดจำนวนโบรมีนที่ถูกใช้

2.8 กล้วยไม้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช ซึ่งอาจมีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งเนื้อเยื่อ แล้วได้เป็นแคลลัสขึ้นมา โดยไม่มีโครงสร้างหรือหน้าที่ที่เกี่ยวข้องร่วมกับเนื้อเยื่อเดิมเลย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลองเป็นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ปลอดจากเชื้อที่ปนเปื้อนจากภายนอก ความปลอดเชื้อจัดว่ามีความสำคัญมากต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงต่างๆ จะส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี ดังนั้นหากมีจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์เหล่านี้จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และจะทำลายหรือยับยั้งการเจริญของชิ้นส่วนพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved