

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ (Endophyte Actinomycete)

2.1.1 เอนโดไฟท์ (Endophyte)

Endophyte microbe เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (plant tissue) ทั้งพืชบกและพืชน้ำ โดยมีช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช อาจอยู่ในส่วนของราก ลำต้น กิ่ง หรือ ใบ สามารถใช้ชีวิตร่วมกับพืชได้หลายรูปแบบ ความสัมพันธ์ระหว่างเอนโดไฟท์กับพืชมีหลายแบบด้วยกัน เช่น การอยู่ร่วมกันแบบ mutualism neutral symbiotic หรือ antagonistic pathogen โดยเอนโดไฟท์ เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biological control) และเป็นแหล่ง metabolite สำหรับทางการแพทย์ การป้องกันโรคให้กับพืชอาศัย อีกทั้งเป็นต้นแบบในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ต่างๆ ในธรรมชาติ บางชนิดนอกจากการผลิตสาร primary metabolite แล้วยังสามารถผลิตสาร secondary metabolite ในกลุ่มของสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งมีคุณสมบัติด้านการเจริญของ จุลินทรีย์ก่อโรค เช่น ด้านเชื้อรา (antifungal) และ ด้านแบคทีเรีย (antibacterial) ที่ก่อโรคในคน สัตว์ หรือในพืช (Brunner and Pertrini, 1992)

จุลินทรีย์เอนโดไฟท์เป็นเชื้อที่ไม่ทำอันตรายต่อพืชอาศัย และยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ และในทางตรงกันข้ามยังช่วยต้านทาน หรือป้องกันการเกิดโรคพืชบางชนิดให้กับพืชอาศัย จุลินทรีย์เอนโดไฟท์ประกอบด้วยแบคทีเรีย รา และ แอคติโนมัยซีท สามารถพบได้ในพืชทุกชนิด มีการศึกษาในด้านการคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟท์กันอย่างแพร่หลายในพืชหลากหลายชนิด ในปี 1997 ได้มีการคัดเลือกแบคทีเรียที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) โดยคัดเลือกมาจากพืชที่สมบูรณ์ปราศจากโรค และแมลง พบแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้งหมด 129 สปีชีส์ และได้นำเสนอไปแล้วมากกว่า 54 จินัส (Hallmann *et al.*, 1997) แอคติโนมัยซีทเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งใน อากาศ ดิน แหล่งน้ำ ตะกอน และบริเวณรากพืช แม้กระทั่งในเนื้อเยื่อพืช แอคติโนมัยซีทเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ สามารถสร้างสารที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุของโรคพืช สร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืช ผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยสลายอินทรีย์สาร และมีบางชนิดมีประโยชน์ในแง่ของการตรึงไนโตรเจน (Valois *et al.*, 1996)

2.1.2 แอคติโนมัยซีท (Actinomycete)

แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ คือ เชื้อแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช เช่น ใบ กิ่ง และ ราก เป็นต้น แอคติโนมัยซีทเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์เซลล์เดียว เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีค่า GC-content สูง มีลักษณะเป็นเส้นสาย หรือเส้นสายที่แตกแขนง มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียทั้งขนาดและรูปร่าง มีเซลล์แบบ prokaryotes (ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส) อัตราการเจริญของแอคติโนมัยซีทจะช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา (Waksman *et al.*, 1967)

แอคติโนมัยซีทพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ อาหาร และในพืช แหล่งที่พบมากได้แก่บริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น ดินที่เพาะปลูก วัตถุเน่าเปื่อย โคลน ตะกอนในแม่น้ำ ได้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน หรือป่าชายเลน นอกจากนี้ยังพบมากในดินบริเวณรอบๆ รากพืช (rhizosphere) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* และ *Nocardia* และในชั้นส่วนของดินพืชยังสามารถพบแอคติโนมัยซีท (endophytic actinomycete) ได้อีกหลายชนิด ขึ้นอยู่กับพืชอาศัย จะเห็นได้ว่าสามารถพบแอคติโนมัยซีทได้ทั่วไป โดยมีปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมปริมาณของแอคติโนมัยซีท คือ สภาพและปริมาณอินทรีย์วัตถุ ความเป็นกรดด่าง และระดับความชื้น อุณหภูมิ และฤดูกาลของพืชอาศัย (Porter, 1971)

แอคติโนมัยซีทเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม เนื่องจากสามารถผลิตสาร Metabolite ได้หลายชนิด และยังสามารถผลิตสารที่เป็นปฏิชีวนะกับเชื้อสาเหตุโรคพืช และยังผลิตสารที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย

2.2 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีท แบ่งออกได้เป็น 8 กลุ่ม ตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) ซึ่งได้แก่ group 22 – group 29 (ส่วนในกลุ่มที่ 1 – 21 นั้น เป็นกลุ่มของแบคทีเรีย) ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญดังนี้

Group 22 Nocardioform Actinomycetes

เป็นกลุ่มที่มีลักษณะแตกต่างกัน สร้างเส้นใยสายสั้นๆ บางชนิดสร้าง aerial mycelium และอาจสร้างสปอร์เป็นสายโซ่ แยกความแตกต่างของจีนัสโดยใช้องค์ประกอบของผนังเซลล์ และสาร mycolic acid ที่พบภายในเซลล์และลักษณะทางเคมีอื่นๆ ประกอบ แบ่งได้ 4 subgroup คือ

Subgroup 1 Mycolic – containing bacteria

Subgroup 2 *Psuedonocardia* และ related genera

Subgroup 3 *Nocardioides* และ Terrabacter

Subgroup 4 *Promicromonospora* และ related genera

Group 23 Genera with multilocular sporangia

แอกติโนมัยซีทในจินัสนี้สร้างเส้นใยที่มีผนังกันตามขวาง สปอร์ที่มีลักษณะทรงกลม อาจเคลื่อนที่ได้ เช่น *Dermatophilus* และ *Geodermmatophilus* หรือเป็นแบบไม่เคลื่อนที่ เช่น *Frankia*

Group 24 Actinoplanetes

สร้างเส้นใยที่คงทน (Stable filament) อาจจะมี aerial mycelium น้อยถึงไม่มีเลย สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้อยู่ในสปอร์แรงเฉย เช่น ในจินัส *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium* และ *Pilimelia* หรืออาจจะสร้างสปอร์เดี่ยวๆ ไม่เคลื่อนที่ เช่น *Micromonospora* หรือในบางกรณีสร้างสปอร์ที่เป็นสายโซ่สั้นๆ เช่น *Catrillaspora* ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้ ประกอบด้วยสาร diaminopimelic acid แบบ meso - DAP และ glycine เมื่อวิเคราะห์น้ำตาลพบว่าป็นน้ำตาล arabinose และ xylose

Group 25 Streptomycetes and related genera

เป็นกลุ่มที่มีลักษณะแตกต่างกัน มีผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วย aminopimelic acid แบบ LL - DAP และ glycine บน aerial mycelium สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่ เช่น ในจินัส *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* ส่วนจินัสอื่นๆ เช่น *Intrasporangium*, *Kineosporia* และ *Sporichthya* สร้าง aerial mycelium น้อยหรือไม่สร้างเลย และสปอร์มีหลายรูปแบบ

Group 26 Madolomycetes

มีการสร้างเส้นใยที่คงทนและสร้างสปอร์แบบไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เช่น จินัส *Microbispora* (สร้าง 2 spores/chain) *Microtetraspora* (สร้าง 4 spores/chain) และ *Actinomadura* (มากกว่า 2 spores/chain) ส่วนจินัสอื่นๆ สร้างสปอร์ใน sporangia พบใน *Streptosporangium* ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้ ประกอบด้วยสาร meso - DAP แอกติโนมัยซีทกลุ่มนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 subgroup คือ

Subgroup 1 Streptosporangium และ related genera

Subgroup 2 Actinomadura

Group 27 Thermomonospora and related genera

มี aerial mycelium เป็นเส้นใยแบบคงทน สร้างสปอร์เป็นคู่ ซึ่งอยู่เดี่ยวๆ ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี เช่น แอกติโนมัยซีทในกลุ่ม *Thermomonospora* กลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายโซ่ พบใน *Actinosynnema* และ *Nocardiopsis* ในบางกลุ่มสร้างโครงสร้างที่คล้ายสปอร์แรงเฉย พบใน *Streptoalloteichus* ผนังเซลล์แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้ประกอบด้วย meso - DAP ไม่พบ amino acid และน้ำตาล

Group 28 Thermoactinomycetes

มีการสร้างเส้นใยที่คงทน และสร้างสปอร์แบบเดี่ยวๆ บน aerial mycelium และ substrate mycelium แอคติโนมัยซีทในกลุ่มนี้พบเพียงแค่จีโนมเดียวคือ *Thermoactinomyces* ทุกสปีชีส์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) ผนังเซลล์ประกอบด้วยสาร aminopimelic acid แบบ meso – DAP แต่ไม่พบสาร amino acid หรือ น้ำตาลชนิดอื่นๆ

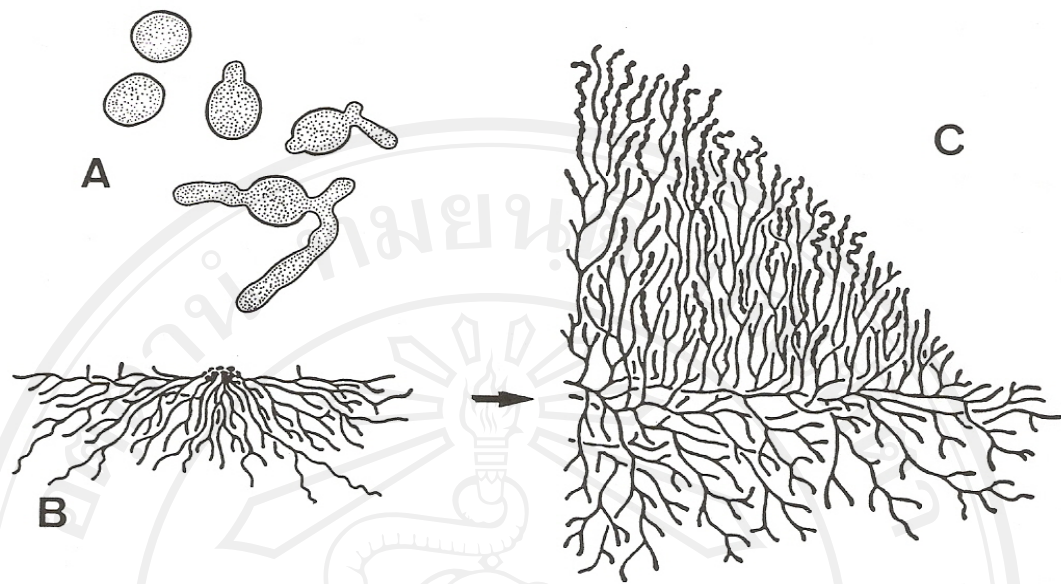
Group 29 Other genera

แอคติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มี 3 จีโนม ซึ่งมีลักษณะไม่เหมือนกับแอคติโนมัยซีทในกลุ่มอื่นๆ สร้าง aerial mycelium ที่มีสปอร์เป็นสายโซ่ ไม่พบสาร mycolic acid ในเซลล์ ได้แก่ *Glycomyces*, *Kitasatosporia* และ *Saccharotrix*

2.2.1 ลักษณะทางลักษณะของแอคติโนมัยซีท (Morphology of actinomycete)

2.2.1.1 การสร้างตัวของโคโลนี (Formation of colonies)

โคโลนีของแอคติโนมัยซีทสร้างมาจากเส้นใย (mycelium) การเจริญของโคโลนีจะเริ่มตั้งแต่การใส่เชื้อ คือ single spore, sporangium และชิ้นส่วนของเส้นใย ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เชื้อที่ใส่ลงไปจะมีการพัฒนาขึ้นแรกโดยมีการสร้าง substrate mycelium หรือที่รู้จักกันในชื่อ primary หรือ vegetative mycelium การเจริญของเส้นใยจะเจริญลงในแนวตั้งทางทะลุลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อและจะสร้าง secondary mycelium หลังจากนั้นจะสร้าง aerial mycelium ชูขึ้นไปเหนือผิวหน้าอาหาร (ภาพที่ 1) (Kalakoutsii and Agre, 1976) ความแตกต่างระหว่าง aerial mycelium เป็นเส้นใยที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และ substrate mycelium เป็นเส้นใยที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน สามารถจำแนกได้ง่ายโดยการส่องดูใต้กล้อง light microscope โดยใช้ชิ้นส่วนของเชื้อวางบน cover slip พบว่า substrate mycelium จะมีลักษณะโปร่งแสงภายใต้ phase-dark ส่วน aerial mycelium จะมีการหักเหของแสงภายใต้ phase-bright แต่มีแอคติโนมัยซีทบางสายพันธุ์ที่ไม่สร้าง aerial mycelium เช่น *Micromonospora* หรือ *Actinoplanes* อาจเป็นเพราะระยะเวลาการเกิด aerial mycelium ในวงจรชีวิตถูกจำกัดทำให้มีการสร้าง aerial mycelium ที่สั้น เช่น ในกรณีของเชื้อ *Sporichthya*



ภาพที่ 1 การพัฒนาของเส้นใยในเชื้อ *Streptomyces*

(A) การงอกของสปอร์ (B) ลักษณะการเกิดของเส้นใยได้ผิวอาหาร (C) ลักษณะการเจริญของโคโลนีและสปอร์บนเส้นใยเหนืออาหาร

ที่มา : Vobis, 1981; Wildermuth, 1970

ลักษณะของโคโลนีอาจจะมีแบบยกตัวขึ้น (raised) หรือแบนเรียบ (flat) บางครั้งอาจจะมีลักษณะคล้ายหนัง (leathery layer) ซึ่งมีตั้งแต่อ่อนนุ่ม และเหนียวไปจนถึงแข็งมาก สีของโคโลนีมีตั้งแต่สีขาว (white), เหลือง (yellow), ส้ม (orange), แดงกุหลาบ (rose), แดง (red), ม่วง (purple), น้ำเงิน (blue), เขียว (green), น้ำตาล (brown) และดำ (black) ผิวหน้าของโคโลนีอาจมีลักษณะ smooth, ridged, wrinkled, granular หรือ squamous ขนาดของโคโลนีขึ้นอยู่กับปีที่ผลิต อายุ และสภาวะการเจริญเติบโต ซึ่งจะมีขนาดต่างๆ ตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลางระดับมิลลิเมตรไปจนถึงเซนติเมตร

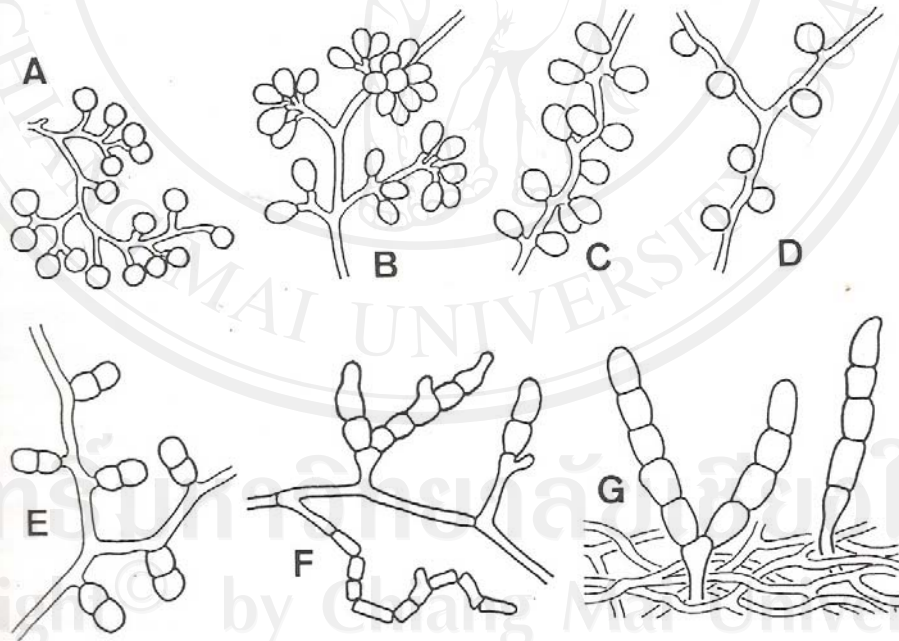
2.2.1.2 ชนิดของการเกิดสปอร์ (sporulation type)

แอกติโนมัยซีทสร้างสปอร์จากโครงสร้างพื้นฐาน 3 แบบ คือ แบบสปอร์เดี่ยว (single spore) แบบเป็นสายโซ่ (chains) หรือ sporangia

1. การสร้างสปอร์เดี่ยว (single spore)

รูปแบบการสร้างสปอร์เดี่ยวนี้นี้เรียกว่า monosporus รูปแบบนี้จะพบเป็นจำนวนมากในกลุ่มเชื้อทั่วไป (ภาพที่ 2) เช่นยีสต์ *Micromonospora* พบว่า sporophores จะเกิดขึ้นบน

substrate mycelium สปอร์จะมีลักษณะอยู่บนกิ่งสั้นๆ และจะเกิดการรวมตัวกันเป็นช่อ โดยการเกิดของ sporulation เริ่มจากเกิดการบวมบริเวณส่วนปลายของ hypha หลังจากนั้นจะมีการสร้าง septum และตามไปด้วยการสร้างผนังของสปอร์ ส่วนยีส *Thermomonospora* จะสร้างสปอร์เดี่ยวบน aerial mycelium ตรงบริเวณปลายของ sporophores มีทั้งที่แบบแตกกิ่ง และไม่แตกกิ่ง การแตกกิ่งซ้ำอีกครั้งจะนำไปสู่การสร้างตัวของกลุ่มสปอร์ การเกิด sporulation อาจเกิดได้ใน substrate hyphae เชื้อที่มีการสร้างสปอร์แบบเดี่ยวอีกชนิดคือยีส *Saccharomonospora* ซึ่งจะพัฒนาและสร้างสปอร์เดี่ยวบน aerial mycelium ส่วน sporophores ไม่มีการแตกกิ่ง และจะสร้าง ovoid spores บริเวณปลายสั้นๆ ของมัน (Cross, 1970 ; McCarthy, 1989a ,b) และยีส *Thermoactinomyces* มีการพิจารณาว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับยีส *Bacillus* มากกว่าแอคติโนมัยซีทชนิดอื่นๆ การเกิดของ hyphae เหมือนกับการเกิดใน sporoactinomycete และยีส *Thermoactinomyces* มีลักษณะเหมือนยีส *Bacillus* คือ จะสร้าง true endospore ที่ทนต่อความร้อนสูง และมีแคลเซียมสูง มีการสร้างสปอร์บน substrate mycelium และ aerial mycelium (Lacey, 1989)



ภาพที่ 2 ลักษณะของสปอร์แบบเดี่ยว (single spore) และสปอร์สายสั้น (short chains)

Monospora : (A) *Micromonospora*, (B) *Thermomonospora*,

(C) *Saccharomonospora*, (D) *Thermoactinomyces*

Dispora : (E) *Microbispora*

Oligosporous : (F) *Nocardia brevicatena*, (G) *Catellatospora*

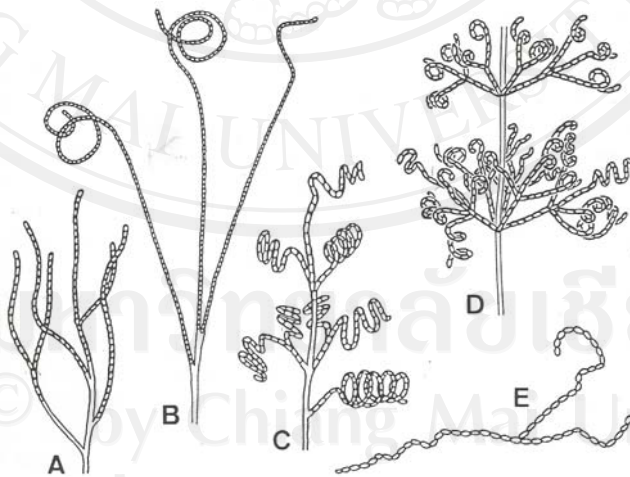
ที่มา : Vobis, 1981; Wildermuth, 1970

2. การสร้างสปอร์แบบสายโซ่ (chain)

รูปแบบการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ เกิดจากเส้นใยของ hyphae โดยจะมีการแบ่งผนังเซลล์ ออกเป็นช่องๆ และแต่ละช่องสามารถเปลี่ยนเป็นรูปไปเป็นสปอร์ได้ การสร้างสปอร์แบบนี้เกิดขึ้น ในกลุ่มแอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่ สปอร์แบบสายโซ่สามารถแบ่งตามลักษณะวิทยา คือ ความยาว หรือจำนวนสปอร์

สายโซ่แบบ *dispora* จะมีสปอร์เป็นคู่ คือ จินัส *Microbispora* เป็นตัวแทนของสปอร์ กลุ่มนี้ ลักษณะของสปอร์คือ สปอร์มีลักษณะทรงกลมรูปไข่ 2 สปอร์ต่อกัน จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่า 2 ไมโครเมตร และจะมีความหนามากกว่า hyphae ของโคโคนี 3-4 เท่า ซึ่งจะอยู่บน aerial mycelium หรืออยู่บน sporophores ที่สั้นๆ (ภาพที่ 2) การสร้างสปอร์จะเริ่มจากการแตก หน่อด้านข้างความยาวของ hypha ทำให้เกิดกิ่งสั้นๆ ด้านข้าง หลังจากนั้นจะเกิดการพองบวมขึ้น และแบ่งตัวออกจากศูนย์กลาง

แอกติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์แบบ *Oligosporous* จะสร้างสปอร์แบบสายโซ่สั้น ซึ่งส่วน ใหญ่แล้วจะมีประมาณ 7 ถึง 20 สปอร์ต่อโซ่อย่างน้อยที่สุดต้องมี 3 สปอร์ แม้ว่าบางสปีชีส์อาจ สร้างสปอร์ได้มากถึง 30 สปอร์ เช่นในสปีชีส์ *Nocardia brevicatena* จะสร้างสปอร์สายโซ่สั้น ตั้งแต่ 2-7 สปอร์ ทั้งใน substrate และ aerial mycelium sporophores และสายโซ่สปอร์จะมีการแตกกิ่งเกิดขึ้นด้วย (ภาพที่ 2) ในสปีชีส์ *Saccharopolyspora rectitrigula* (Korn-Wendisch *et al.*, 1989)



ภาพที่ 3 ลักษณะของสปอร์สายยาว (long chain)

Streptomyces: (A) *Rectiflexibiles* type, (B) *Retinaculiaperti* type,

(B) *Spira* type (D) *Verticillati* type *Nocardiosis*: (E) fragmenting branched aerial hypha

ที่มา : Hutter, 1967

แอกติโนมัยซีทที่มีการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาว (polysporous) จินัส *Streptomyces* เป็นตัวอย่างที่ดีในการศึกษาสปอร์ในกลุ่มนี้ เนื่องจากจะสร้างสปอร์สายโซ่ยาวโดยมีสปอร์มากกว่า 50 สปอร์ (Cross, 1970) โดยจะสร้างสปอร์บน aerial mycelium และสามารถจำแนกลักษณะของสายสปอร์ดังนี้ (ภาพที่ 3)

A. *Rectiflexibiles*: สายโซ่ของสปอร์เป็นแบบเส้นตรง (straight) หรือเป็นแบบโค้งงอ (flexuous) อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

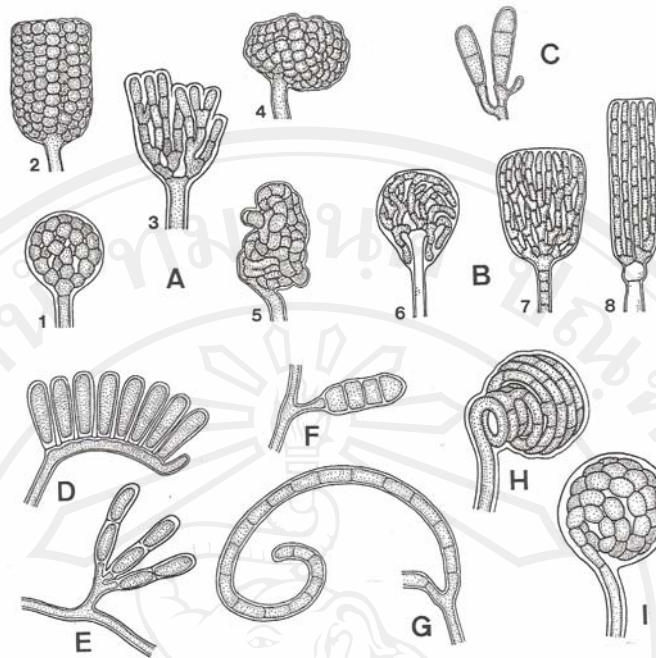
B. *Retinaculiaperti*: สายโซ่จะเป็นห่วง (hooks) แบบห่วงเปิดแบบสั้น หรือม้วนเป็นวงกลมประมาณ 1-3 วง

C. *Spira*: สายโซ่สปอร์แบบเกลียว (spirals) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ a) แบบปิด และเกลียวอัดกันแน่น b) แบบเปิด เกลียวยาวและขยายออก

D. *Verticillati*: สายโซ่สปอร์เป็นแบบเกลียวกันหอย และมีการแตกกิ่งออกมาเหมือนร่ม จินัส *Nocardiopsis* ก็มีการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาว ซึ่งจะมีการสร้าง aerial hyphae เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปเส้นตรง (straight), โค้งงอ (flexuous) หรือ ซิกแซก (zigzag) ชิ้นส่วนของสปอร์ที่สมบูรณ์จะมีความยาวหลายขนาด (Meyer, 1989b)

3. การสร้างสปอร์ภายใน sporangia

มีหลายจินัสที่มีความแตกต่างกันในการสร้างเชื้อหุ้มสปอร์ใน Sporangia ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายถุง และสปอร์จะมีการพัฒนาอยู่รวมกันภายในถุงนี้จนกว่าจะถูกปล่อยออกไป sporangia มีความแปรผันทั้งในเรื่องของขนาดและรูปร่าง ขนาดของ sporangia จะอยู่ระหว่าง 2-50 ไมโครเมตร ซึ่งโดยปกติแล้วมันจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร และรูปร่างจะมีทั้งแบบ cylindrical, clavate, tubular, bottle-shaped, campanulate, digitate, irregular, lobate, umbelliform, pyriform หรือ globose (ภาพที่ 4) การสร้าง sporangia จะสร้างบน aerial mycelium และ substrate mycelium



ภาพที่ 4 ลักษณะการสร้างสปอร์ภายใน sporangia
การสร้าง sporangia จะสร้างบน aerial mycelium

(A) *Actinoplanes* (including *Ampullariella*) : polysporous, 1) globose, 2) cylindrical, 3) lobate, 4) subglobose, 5) irregular; (B) *Pilimelia* : 6) ovoid, 7) campanulate, 8) cylindrical; (C) *Dactylosporangium* : oligosporous, claviform.

การสร้าง sporangia จะสร้างบน substrate mycelium

(D) *Planomonospora* : monospora, clavate; (E) *Planobispora* : disporous, cylindrical; (F) *Planotetraspora* : tetrasporous, cylindrical; (G) *Planopolyspora* : polysporous, tubular; (H) *Spirillospota* : polysporous, globose; (I) *Streptosporangium* : polysporous, spherical

ที่มา : Vobis, 1981; Wildermuth, 1970

4. โครงสร้างในการสืบพันธุ์แบบอื่นๆ

การเกิดของสปอร์บางชนิดยากที่จะจัดจำแนก เนื่องจากมีความแตกต่างในสัณฐานวิทยา ซึ่งกรณีนี้รวมไปถึง hyphae ของจีส Intersporangium ซึ่งจะมีถุง vesicle อยู่ระหว่างกลางและในบริเวณส่วนปลาย ซึ่งแต่ละอันก็จะมีลักษณะ โครงสร้างภายในที่พิเศษเฉพาะในแต่ละอัน (Kalakoutskii, 1989) Thick-walled chlamydospores สามารถพบได้ในเส้นใยของ

Actinosporangium violaceum (Krasil'nikov, 1981) โครงสร้างสปอร์แบบ globose bodies และ spherical พบแค่เพียง 2 จินัส คือ *Dactylosporangium* และ *Catellatospora* (Thiemann *et al.*, 1967a ; Asano *et al.*, 1989) ในจินัส ที่มีการสร้าง sporangia เช่น *Actinoplanes*, *Ampullariella* และ *Pilimelia* เหล่านี้จะสร้าง sporangia ที่ไม่สมบูรณ์ โดย sporogenous hyphae ยังคงจะมีการสร้างตัวอยู่บนบริเวณส่วนปลายของ hyphae แต่พบว่าไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าหาก sporogenous hyphae เป็นแบบ fragment จะทำให้สปอร์จัดเรียงเป็นแถว และสปอร์ที่มีการพัฒนาแบบอิสระนี้จะไม่มีการสร้าง flagella ดังนั้นจึงเรียกว่า conidia ในขณะที่ supporting hyphae จะถูกเรียกว่า conidiophores (Couch, 1963 ; Vobis, 1992) ซึ่งลักษณะที่คล้ายกันนี้จะเกิดในจินัส *Kibdelosporangium* ซึ่งจะมีโครงสร้างเหมือน Sporangium (Shearer *et al.*, 1989)

2.2.2 ลักษณะทางเคมีที่ใช้ในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีท (Chemical grouping of actinomycete)

การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีมีความจำเป็นเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันหรือในกรณีที่ไม่มีการสร้างสปอร์ (Lechevalier อ้างโดย Hasegawa *et al.*, 1983) ได้เสนอการแบ่งกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีท โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ ลักษณะส่วนประกอบของผนังเซลล์ คือ cell wall diaminopimelic acid isomer (A₂pm) และ whole-cell sugar ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางและใช้เป็น taxonomic markers โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อใช้แยกความแตกต่างขององค์ประกอบผนังเซลล์ (cell wall type) คือ LL และ meso isomer ของ diaminopimelic acid (DAP) และความแตกต่างขององค์ประกอบของน้ำตาลที่ผนังเซลล์ (whole cell sugar pattern) เช่น galactose, arabinose, xylose, mannose, glucose, และ ribose เป็นต้น

ตารางที่ 1 รูปแบบขององค์ประกอบของน้ำตาลที่ผนังเซลล์ (whole cell sugar pattern)

Type	Diagnostic
A	galactose, arabinose
B	madurose, no arabinose or xylose
C	none
D	xylose, arabinose

ที่มา : อ้างอิงจาก Lechevalier and Lechevalier (1970)

ตารางที่ 2 การจัดจำแนกและแบ่งกลุ่ม โดยใช้ลักษณะทางเคมี

Genera	A ₂ pm isomer	Whole-cell sugar pattern	Cell Wall Type
<i>Streptomyces</i> <i>Sporichthya</i> <i>Streptoverticillium</i> <i>Microellobospora</i> <i>Nocardioides</i>	LL	No characteristic sugar pattern	I
<i>Actinoplanes</i> <i>Micromonospora</i> <i>Ampullariella</i> <i>Dactylosporangium</i> , <i>Amorphosporangium</i>	meso	D	II
<i>Thermoactinomyces</i> <i>Geodermatophilus</i> <i>Actinobifida</i> <i>Nocardiopsis</i>	meso	C	III
<i>Dermatophilus</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Spirillospora</i> , <i>Nocardiomaduræ type - Actinomadura</i>	meso	B	III
<i>Mycobacterium</i> <i>Thermomonospora</i> <i>Nocardia</i> <i>Pseudocardia</i> <i>Micropolyspora</i>	meso	A	IV

ที่มา : อ้างอิงจาก Microbiologyprocedure (2009)

2.2.3 การผลิตเมลานินของเชื้อแอคติโนมัยซีทอนโคไฟท์

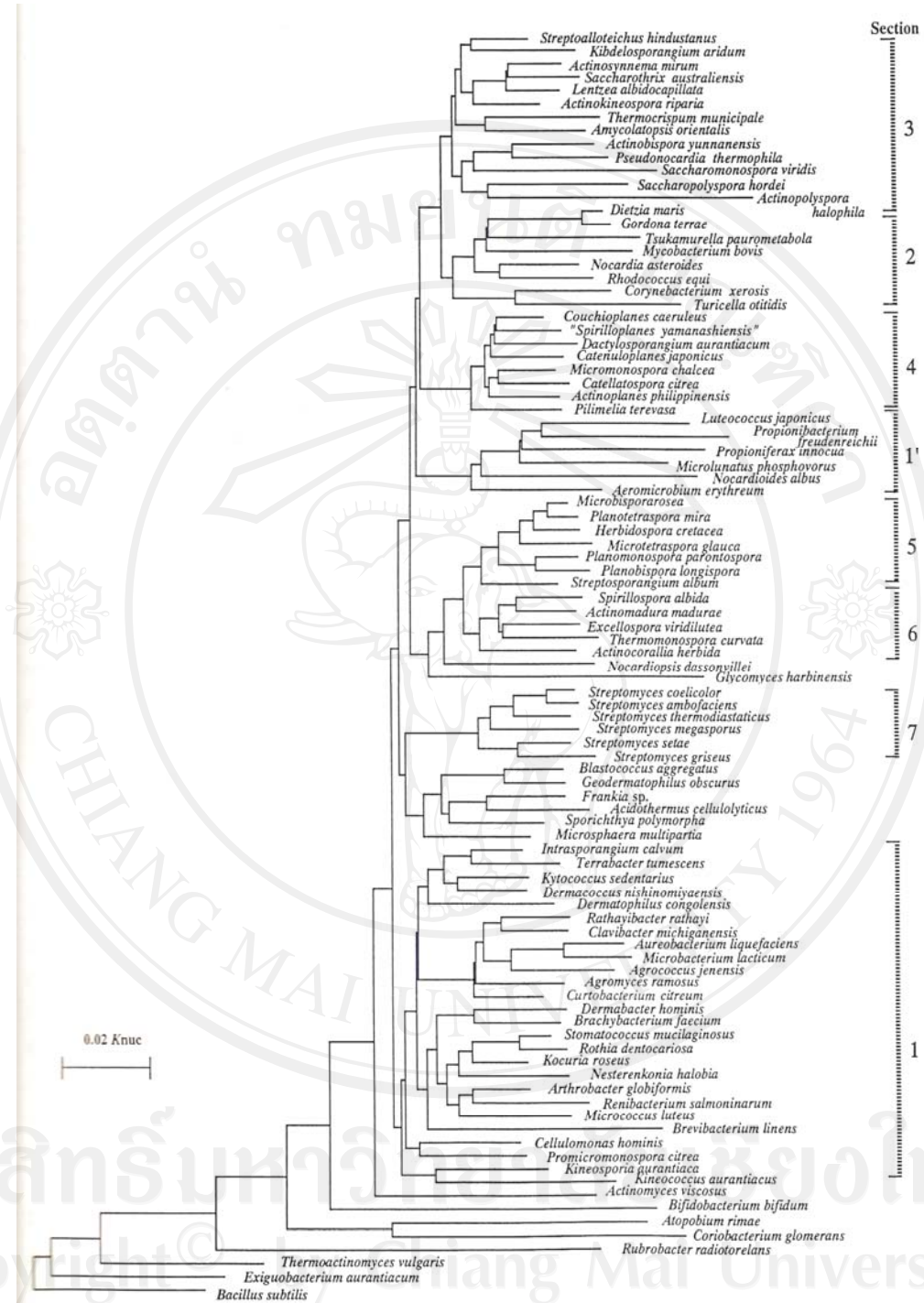
เมลานิน (melanin) หรือ เมลานอยด์ (melanoid) สามารถนำมาใช้ในการศึกษาทางอนุกรมวิธาน (taxonomical) (Zonova, 1965; Aria and Mikami, 1972 อ้างโดย Dastager *et al.*, 2006) สารประกอบเมลานิน มีรูปร่างของโครงสร้างไม่แน่นอน มีสีน้ำตาลดำ และสามารถผลิตได้ด้วยจุลินทรีย์หลากหลายชนิด โดยการ fermentative oxidation และมี radioprotection และ antioxidant properties และสามารถป้องกันเซลล์จาก ultraviolet radiation (Vinarov *et al.*, 2002 อ้างโดย Dastager *et al.*, 2006) เราสามารถใช้ประโยชน์ของเมลานิน ทางด้านยาในเภสัชกรรม และการผลิตเครื่องสำอาง

2.2.4 การจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีทอนโคไฟท์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยใช้เทคนิค 16S rDNA sequencing

DNA sequencing analysis คือ การตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิด (A G C T) ที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึง การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเกิด transversion transition silent หรือ selected ของยีน และยังใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide base (Takamatsu, 1998) การใช้เทคนิค DNA sequencing analysis ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) (นันทนา, 2549)

2.2.5 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแอคติโนมัยซีท (Phylogenetic relationship of actinomycete)

ปัจจุบันได้มีความก้าวหน้าทางเทคนิคชีวโมเลกุล มาช่วยในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทมีความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Micrococcus* และ *Arthrobacter* และในแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ยังไม่สามารถแยกแอคติโนมัยซีทออกจากกิ่งของแบคทีเรียได้ ด้วยเหตุนี้ การศึกษาหาความสัมพันธ์โดยใช้เทคนิค 16S rRNA sequence จึงมีความสำคัญมากที่นำมาใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท Yokota และ คณะ (1997) สามารถจำแนกแอคติโนมัยซีทและแอคติโนมัยซีทที่เรียได้ทั้งหมด 102 จินัส และนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ได้ทั้งหมด 90 จินัส (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแอคทีโนมัยซีท 90 ชนิด โดยใช้เทคนิค 16S rRNA sequence ที่มา : Yokota *et al.*, 1997

2.3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์

การแยกแอคติโนมัยซีทบนอาหารที่จำเพาะผสมร่วมกับสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียบางกลุ่มที่ไม่ต้องการ เพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยซีทซึ่งเจริญเติบโตช้ากว่าที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญออกมา การจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ ลักษณะโคโลนี โดยสามารถสังเกตด้วยตาเปล่า และตรวจดูลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การสร้างสปอร์สามารถจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ในระดับจิ้นส์ ส่วนในการจำแนกในระดับสปีชีส์ ต้องอาศัยการตรวจสอบหลายๆ ด้านประกอบกัน ได้แก่ ชนิดของกรดอะมิโนภายในผนังเซลล์ (DAP) ลักษณะของน้ำตาลใน whole cell hydrolysate และการตรวจสอบในระดับโมเลกุลเป็นต้น (Lechevalier, 1968 อ้างโดย Holt *et al.*, 1994)

เริ่มมีการศึกษาแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ในศตวรรษที่ 19 และพิสูจน์ให้เห็นว่าแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสามารถให้ประโยชน์แก่พืชได้ จากการศึกษาด้านการจำแนกแอคติโนมัยซีทพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในพืชและอยู่ร่วมกับปรสิต (parasites) หรือ saprophytes ส่วนมากจะอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* และ *Microbispora* (Matsukuma *et al.*, 1994; Okazaki *et al.*, 1995; Matsumoto *et al.*, 1998)

Sardi และคณะ (1992) แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากรากพืชจำนวน 28 ชนิด บนอาหาร starch casein medium ที่ผสมสารปฏิชีวนะ nystatin และ cycloheximide พบว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces* มากที่สุด 482 ไอโซเลท รองมาคือ *Nocardia*, *Streptverticillum*, *Micromonospora* และ *Streptosporangium* จำนวน 4, 2, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ Takao *et al.*, (1995) ได้แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากรากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 8 ชนิด บนอาหาร salt agar medium ที่ผสม yeast และผสมสารปฏิชีวนะเช่นเดียวกับ Sardi และคณะ (1992) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้คือ *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Actinoplanes* และ *Thermonospora*

Shimizu และคณะ (2000) แยกแอคติโนมัยซีทจากราก ลำต้น และใบ ของต้น rhododendron บนอาหาร IMA-2 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ amphotericin B, riphampin-vicicillin solution และ heritage (Active in gradient : Azoxystrobin) หลังจากนั้นบ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ พบเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 10 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคของ rhododendron จากการทดลองพบว่า ไอโซเลท R-5 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของโรค *Phytophthora cinnamoni* และ *Pestalotiopsis sydowniana* ดีที่สุด โดยสามารถสร้าง clear zone ซึ่งชี้ให้เห็นว่า

สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเคมีพบว่า ไอโซเลท R-5 จัดอยู่ในจิ้นัส *Streptomyces*

Coombs และ Franco (2003) คัดเลือกแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ จากรากของข้าวสาลี ได้ทั้งหมด 38 สายพันธุ์ พบว่าเป็นกลุ่มของ *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* และ *Nocardia* นอกจากนั้น Okazaki (2003) แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์จากพืชทั่วไปได้ทั้งหมด 246 สายพันธุ์ พบว่าเป็น *Streptomyces*, *Microbispora*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomadura* จำนวน 97, 57, 23, 18 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ Takahashi และ Omura (2003) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์จากใบไม้ร่วง 9 ชนิด ในพืชชั้นสูง พบว่า 32 สายพันธุ์ เป็นกลุ่ม *Streptomyces* 33 สายพันธุ์ เป็นกลุ่มของ *Microbispora* และอื่นๆ อีก 10 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นกลุ่ม rare actinomycete

Hideyuki และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากประเทศอินโดนีเซียและประเทศญี่ปุ่น โดยใช้เทคนิคพื้นฐานทางโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนกคือ 16S rDNA partial sequence homology ใช้เชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 1,128 ไอโซเลท ในแต่ละประเทศ จากการจัดจำแนกเบื้องต้นพบว่า ประเทศอินโดนีเซียสามารถจำแนกได้ 790 ไอโซเลท และสามารถจำแนกได้ 9 families 23 genera 185 species และตัวอย่างแอคติโนมัยซีทจากประเทศญี่ปุ่นจำแนกเบื้องต้นได้ 981 ไอโซเลท จัดจำแนกได้ 9 families 22 genera 207 species

Chitti *et al.* (2004) แยกเชื้อแอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ TT 1-11^T จากพืชในประเทศไทย ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological) ลักษณะทางเคมี (chemotaxonomic) สามารถจัดจำแนกอยู่ในจิ้นัส *Micromonospora* และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ (phylogenetic) โดยใช้ 16S rDNA sequences เพื่อเป็นการยืนยันจากการทดสอบพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *M. coerulea* และ Ying *et al.* (2006) แยกแอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ GY1 ที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยละลาย poly (vinyl alcohol) จากดินบริเวณบริษัทสิ่งทอและโรงงานผลิต PVA ประเทศจีน และจัดจำแนกแอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ GY1 ว่ามีความคล้ายกับ *Streptomyces venezuelae* โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล 16S rDNA sequence และผลตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological) และลักษณะทางกายภาพ (physiological) เช่นเดียวกับ Meguro *et al.* (2006) ได้จำแนก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ MBR-52 ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S-rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *S. ciscaucasicus*. 99.6 เปอร์เซ็นต์ และ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S-76 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces griseorubiginosus*. มากที่สุดถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และมีกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์แบบ LL-DAP

พบสารประกอบน้ำตาล arabinose, galactose, madurose (Cao *et al.*, 2004) และ นันพนา (2549) ได้รายงานว่าการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท (AM 4/6) มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces* sp. CHR28 99 เปอร์เซ็นต์

มีการศึกษาแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากสั้ม พบเชื้อ *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter freundii*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alacliigenes-Moraxella*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* ที่แยกจาก xylem ของรากมะนาว (*Citrus jambhiri*) (Gardner *et al.*, 1982-1985) เช่นเดียวกับ Araujo และ คณะ (2001) แยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากของสั้มพบเชื้อ *Pantoea agglomerans*, *Bacillus pumilus* ในปี 2004 Lacava และคณะ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากสั้มและแบคทีเรีย *Xylella fastidiosa* ที่เป็นสาเหตุของโรค citrus-variegated chlorosis สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟต์ได้ดังนี้ *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium flauumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium*, *M. mesophilicum*, *Nocardia* sp., *Pantoea agglomerans*, *Streptomyces* sp., และ *Xanthomonas campestris* เชื่อดังกล่าวนี้พบแอกติโนมัยซีทสองจีแนส นั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทสามารถเข้าไปอยู่อาศัยภายในในต้นสั้มได้

2.4 ความสำคัญของเชื้อแอกติโนมัยซีท

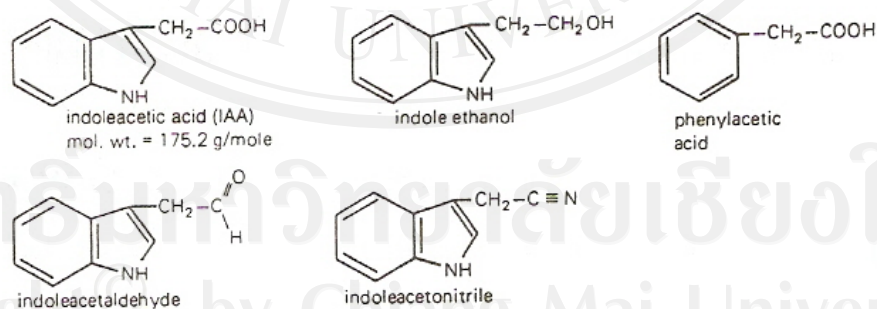
แอกติโนมัยซีท เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์และเกษตรกรรม เนื่องจากสามารถผลิตสาร metabolite และมีความสำคัญทางการเกษตร อุตสาหกรรม อีกทั้งยังมีความสำคัญทางนิเวศวิทยา นอกจากนี้แอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ยังสามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น phytohormone, antibiotics, siderophores และกิจกรรมของแอกติโนมัยซีทที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ nitrogen fixation, nutrient competition และ systemic disease resistance (Benhamou *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2006) แอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์จึงมีความสัมพันธ์กับพืชในระบบนิเวศน์ตามธรรมชาติ เราสามารถคัดเลือกแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่ผลิต bioactive compounds และนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโต และได้มีการจัดจำแนกกลุ่มของการผลิตสาร hormone-like จากแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ เช่น สาร toyocamycin หรือ เรียกอีกอย่างว่า cytokinin-like สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสาร pteridic acid ซึ่งเป็นสาร auxin-like ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากเป็นต้น (Igarashi *et al.*, 2002)

2.4.1 ฮอร์โมนพืช (ชวนพิศ, 2544)

หมายถึง อินทรีย์สาร ที่พืชสร้างขึ้นในบริเวณใด แล้วส่งไปออกฤทธิ์อีกบริเวณหนึ่ง ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชหรืออาจยับยั้งการเจริญเติบโตแล้วแต่ชนิดของฮอร์โมนนั้น ซึ่งฮอร์โมนแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน และมีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกันด้วย ฮอร์โมนในปัจจุบันมีการใช้หลากหลาย ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นการสังเคราะห์ และอีกส่วนหนึ่งพืชจะสร้างขึ้นมาเอง

2.4.1.1 ออกซิน (auxin)

เป็นฮอร์โมนตัวแรกที่ค้นพบโดย Charles Darwin ในปี ค.ศ. 1880 ได้พบว่า ในพืชที่ทำให้เกิดการโค้งงอของส่วนยอดต้นพืช เป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ และมีการแบ่งเซลล์ ทำให้ส่วนของพืชมีการเจริญเติบโตและยืดยาวขึ้น ส่วนใหญ่พืชสร้างออกซินอยู่ในรูปของสารเคมี ได้แก่ บริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก และตาที่กำลังเจริญในใบอ่อน และเอ็มบริโอ เมื่อสร้างขึ้นแล้วจะลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืช อย่างมีทิศทาง สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกซินจะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน 2 ประการ คือ มี Unsatuated ring และ Acidic side chain ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของพืชจะกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ซึ่งมีการกระตุ้นให้สังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และโปรตีน นอกจากนี้มีการเร่งการขยายขนาดของเซลล์โดยเฉพาะขนาดของผนังเซลล์และกระตุ้นการสังเคราะห์สารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เพื่อนำไปสร้างผนังเซลล์ใหม่ เท่าที่ยอมรับกันในปัจจุบันออกซินที่เกิดขึ้นในธรรมชาติมีด้วยกัน 3 ชนิด คือ IAA (indole-3-acetic acid) ซึ่งเป็นกลุ่มพบมากที่สุด, 4-chloro IAA (4-chloro-indoleacetic acid), PAA (phenylacetic acid) (ภาพที่ 6)

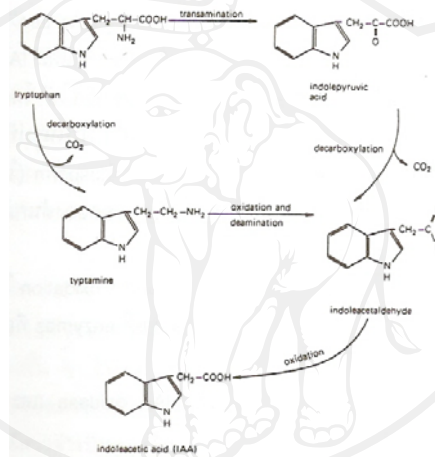


ภาพที่ 6 รูปร่างโมเลกุลของออกซินที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และสารตั้งต้นของออกซิน

ที่มา : นกคด (2536)

ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของพืช

ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยปกติออกซินสามารถเร่งการเจริญเติบโตทุกส่วนของพืช ซึ่งแต่ละส่วนพืชจะมีการตอบสนองต่อออกซินในปริมาณที่เท่ากันแตกต่างกันออกไป เมแทบอลิซึมของออกซิน ออกซินที่พบภายในพืช ส่วนใหญ่จะเป็นสารที่เรียกว่า Indole-3-acetic acid ซึ่งสารดังกล่าวสามารถสกัดได้จากเซลล์ โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อีเธอร์ เอทิลแอลกอฮอล์ และโคโรฟอร์ม เป็นต้น ในการสังเคราะห์ออกซินจะเกิดจากกรดอะมิโนที่ชื่อว่า tryptophan โดยครั้งแรก tryptophan จะเปลี่ยนเป็น indolepyruvate จะเกิดการดึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จาก indolepyruvate ทำให้กลายเป็น indoleacetaldehyde จากนั้นจะถูกออกซิไดซ์ให้เป็น IAA (ภาพที่ 7)

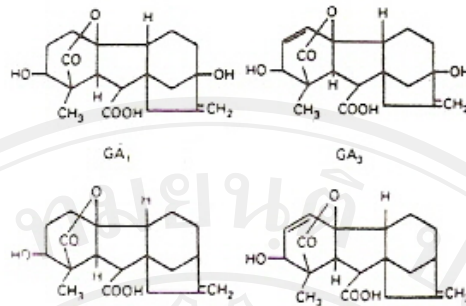


ภาพที่ 7 การสังเคราะห์ออกซิน

ที่มา : นกคณ (2536)

2.4.1.2 จิบเบอเรลลิน (Gibberellins)

ค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1980 โดยชาวญี่ปุ่น เริ่มโดยการสังเกตพบว่าต้นกล้าของข้าวมีลักษณะสูงชะลูดผิดปกติ อ่อนแอ และไม่ออกดอก และตายก่อนเจริญเติบโต ต่อมาในปี ค.ศ. 1926 Kurosawa พบว่าข้าวชนิดนี้เกิดจากเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* เชื้อรานี้จะสร้างสารปลดปล่อยสู่พืชหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสารนี้มีผลกระตุ้นต่อความยาวของลำต้นพืช และในปี ค.ศ. 1935 Yabuta สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าว และให้ชื่อว่า จิบเบอเรลลิน โครงสร้างของจิบเบอเรลลินประกอบด้วยคาร์บอน 19 หรือ 20 อะตอม และมี carboxyl group อย่างน้อยหนึ่งกลุ่มเป็นส่วนประกอบ (ภาพที่ 8) จิบเบอเรลลินใช้ตัวย่อ GA และตามด้วยเลขกำกับ เช่น GA₁, GA₂, GA₃ เป็นต้น



ภาพที่ 8 รูปร่างโมเลกุลของจิบเบอเรลลิน 4 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในพืช
ที่มา : นกคด (2536)

ผลของจิบเบอเรลลินต่อการเจริญเติบโตของพืช

จิบเบอเรลลินกระตุ้นการยืดตัวและการแบ่งเซลล์ของลำต้น ปล้อง ทำให้ลำต้นยืดยาวสูงขึ้น เช่นเดียวกับออกซิน แต่ไปยับยั้งการยืดตัวและการเกิดรากใหม่ ซึ่งตรงข้ามกับออกซิน เมแทบอลิซึมของจิบเบอเรลลิน GA เป็นสาร isoprenoid ในใบพืช GA สามารถเปลี่ยนแปลงเป็น GA ชนิดต่างๆ ใน chloroplasts เมื่อ GA ได้รับการสังเคราะห์ขึ้นมาแล้ว จะสลายตัวอย่างช้าๆ แต่ก็ยังสามารถเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูป conjugates ซึ่งจะไม่สามารถออกฤทธิ์ (active) โดย conjugates เหล่านี้จะถูกสะสมไว้หรือลำเลียงไปที่อื่น เมื่อถึงเวลาและสถานที่ที่เหมาะสมแล้ว จะมีการปลดปล่อยออกมาให้ทำงานได้ conjugates ที่ทราบได้แก่อยู่ในรูป glucosides การลำเลียง GA เกิดขึ้นโดย การแพร่ทาง xylem และ phloem เป็นแบบไม่มีขั้ว

มีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชชนิดต่างๆ เช่น ศึกษาการผลิตสาร auxins และ gibberellin-like จากเชื้อราไมคอร์ไรซา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท ที่แยกมาจากบริเวณ mycorrhizosphere จาก Scots-pine โดยใช้เทคนิค Chromatography และ bioassays (Strzelczyk *et al.*, 1984) Manulis (1994) ได้ศึกษาเชื้อ *Streptomyces* spp. หลายชนิดที่แยกได้จากมันฝรั่งทั้งที่ไม่เป็นโรคและเป็นโรคสแค็บ (scab) ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คือ *S. violaceus*, *S. scabies*, *S. griseus*, *S. exfoliatus*, *S. coelicolor* และ *S. lividans* พบว่ามีความสามารถในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) เมื่อมี L-tryptophane เป็นสารตั้งต้น และยังศึกษาการสังเคราะห์สาร indole-3-acetamide (IAM), indole-3-lactic acid (ILA), indole-3-ethanol (IET) และ indole-3-acetic acid (IAA) จากเชื้อ *S. violaceus* และ *S. exfoliatus* โดยใช้เทคนิค HPLC และ GC-MS และ Igarashi (2002) อ้างโดย Hasegawa (2006) แยกสาร pteridic acid A และ B จากอาหารเหลว fermentation broth ที่ใช้เลี้ยงแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *Streptomyces*

hygroscopicus TP-A045 แยกจากเฟิร์น (*Pteridium aquilinum*) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีฤทธิ์คล้ายสารในกลุ่มออกซิน คือมีผลทำให้เกิดราก adventitious root บริเวณ hypocotyls ของถั่ว kidney beans มีปริมาณรากที่มากแม้ได้รับเพียง 1 nM ของ IAA เท่านั้น

Cao (2004) แยก *Streptomyces* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม endophyte โดยแยกมาจากมะเขือเทศ พบว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S30 มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและสร้างความต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Rhizoctonia solani* ให้กับต้นกล้ามะเขือเทศ นอกจากนี้ Khaled (ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์) แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณรากของต้นถั่วในประเทศ United Arab Emirates ได้ทั้งหมด 75 ไอโซเลท จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดพบว่า *Streptomyces griseoluteus* มีความสามารถในการผลิต putrescine ก่อนข้างสูงในอาหาร decarboxylase agar และพบว่ามีความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตในกลุ่ม auxin [indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-pyruvic acid (IPYA)], gibberellic acid (GA₃) และ cytokinins [isopentenyl adenine (iPa), zeatin (Z)] จากนั้นนำเชื้อ *Streptomyces griseoluteus* ไปเพิ่มปริมาณโดยผสมหัวเชื้อ *Streptomyces griseoluteus* ที่เพาะเลี้ยงในรำข้าวสาลี (wheat bran) ผสมกับดินที่ตากแห้งแล้ว (0.1 กรัม ของ หัวเชื้อ ต่อน้ำหนักดิน 1 กรัม) ใส่รวมกับการปลูกถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ทำในสภาพโรงเรือน) พบว่าเชื้อ *Streptomyces griseoluteus* สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับต้นถั่วโดยมีผลทำให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ปริมาณปมในราก และจำนวนยอดของต้นถั่วเหลือง สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ถึงแม้ว่าการผลิตสาร metabolite ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเกิดภายในเนื้อเยื่อพืช เมื่อไม่นานมานี้ Meguro *et al.* (2006) รายงานว่าชนิดของเชื้อ *Streptomyces* sp. MBR-52 เป็นตัวเร่งในการงอกและการยืดยาวของเซลล์พืช ทำการทดลองโดยนำชิ้นส่วนของราก rhododendron มาเพาะด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วใส่ *Streptomyces* sp. MBR-52 เพาะเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลา 10 วัน ซึ่งเชื่อนี้จะอาศัยอยู่บริเวณรอบๆ ต้นอ่อนหลังจากนั้นย้ายต้นอ่อนของ rhododendron ลงไปปลูกในดินที่ทำการฆ่าเชื้อและไม่ใส่เชื้อ จากการทดลองพบว่าการงอกของรากเมื่อใส่เชื้อ *Streptomyces* sp. MBR-52 จะเจริญดีกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน แสดงว่าเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์นี้มีความสามารถสร้างฮอร์โมนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของราก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอิทธิพลของ phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) ในเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดต่างๆ จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 21 สายพันธุ์ พบว่ามีความสามารถในการผลิตสาร antibiotic 13 สายพันธุ์ และมีความสามารถในการผลิต IAA 12 สายพันธุ์ และยืนยันการกระตุ้นการผลิต IAA ด้วย

เชื้อ *S. purpurascens* NBRC 13077 การผลิตสาร antibiotic และ rhodomycin โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อการแสดงออกของยีน *rdmA*, *rdmB*, *rdmC*, *rdmD* และ *rdmE* ซึ่งยีนเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการสร้าง rhodomycin และเป็นตัวกำหนดการผลิต IAA (Matsukawa *et al.*, 2007)

2.4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการย่อยละลายฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสมีอยู่ในพืช จุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืช โดยมีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตของพืช ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบของ Adenosine triphosphate (ATP), Adenosine diphosphate (ADP), Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), Nucllic acid, Coenzyme และสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์โปรตีนและการถ่ายทอดพลังงานในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ตลอดจนการควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมของพืช (นครินทร์, 2546) เชื้อจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์เปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ โดยสามารถสร้างเอนไซม์ฟอสฟาเตสย่อยละลายฟอสฟอรัสซึ่งพบได้หลายชนิดเช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซีท เป็นต้น ภาวิณี และคณะ (ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์) ได้ศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่เกี่ยวข้องการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์สามารถเปลี่ยนฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่ละลายได้ 16 สายพันธุ์ (28.1%)

2.4.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็นเส้นยาวประกอบด้วยหน่วยน้ำตาลกลูโคส ต่อกันเป็นโพลีเมอร์ โดยส่วนใหญ่สารประกอบอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ จะอยู่ในรูปของเซลลูโลส ซึ่งมีมากที่สุดในพืช เช่น ในเนื้อไม้ประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณ 50% เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสลายเซลลูโลส ไปเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์นี้สามารถผลิตได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด จุลินทรีย์หลายชนิดก็สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และ แอคติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์หลากหลายชนิด เช่น celluloses, hemicellulases, chitinases, amylases และ glucanases (Yuan *et al.*, 1995) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายผนังเซลล์ของพืช ซึ่งมีองค์ประกอบของพวก lignin, cellulose และ hemicellulose (Antai *et al.*, 1996)

2.5 ข้อมูลพื้นฐานการเพาะปลูกส้มของประเทศไทย

ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*) เป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคทั้งภายในประเทศ และส่งออกไปขายยังต่างประเทศ และตลาดยังมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นทั้งในด้านเพื่อการบริโภคสดและในด้านการแปรรูป (กรมวิชาการเกษตร, 2545) ประเทศไทยมีการเพาะปลูกส้มในเกือบทุกจังหวัด มีแหล่งผลิตส้มเขียวหวานที่สำคัญ 5 อันดับแรกคือ เชียงใหม่ เชียงราย กำแพงเพชร สุโขทัย และแพร่ ที่มีพื้นที่เพาะปลูกของจังหวัดเกิน 50,000 ไร่ โดยในปีการเพาะปลูก 2549/2550 มีพื้นที่เก็บเกี่ยวผลผลิตส้มรวมทั้งประเทศ 311,851 ไร่ มีผลผลิตส้มเฉลี่ยต่อไร่เท่ากับ 2,428 กิโลกรัม ได้ผลผลิตรวม 757,328 ตัน โดยมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตตลอดปี แต่จะมีผลผลิตออกสู่ตลาดมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน - กุมภาพันธ์ ผลผลิตส่วนใหญ่ (ร้อยละ 98.50) ใช้ในการบริโภคภายในประเทศ มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ส่งออกไปยังต่างประเทศ (ร้อยละ 1.50) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) การปลูกส้มในเขตอำเภอฝาง อำเภอแม่เมาะ อำเภอไชยปราการ เริ่มแรกปลูกมาตั้งแต่ปี 2486 พันธุ์ส้มที่ปลูกคือ ส้มเขียวหวาน ต่อมาได้ค้นพบส้มพันธุ์ใหม่ คือ ส้มสายน้ำผึ้ง เป็นพันธุ์ส้มในกลุ่มส้มเขียวหวาน ที่ปัจจุบันกำลังได้รับความนิยมอย่างสูง เพราะผลส้มนี้มีคุณภาพและรสชาติที่ดีกว่าส้มเขียวหวานชนิดอื่นๆ ในหลายๆ ด้าน เนื้อแน่น สีน้ำตาลอมเขียว มีกลิ่นหอม มีน้ำส้มในปริมาณมาก รสชาติหวานแหลม อมเปรี้ยวเล็กน้อย

2.5.1 ลักษณะโดยทั่วไปของส้ม (กรมวิชาการเกษตร, 2545)

ส้มเป็นไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่มขนาดกลางมีความสูงประมาณ 4 – 8 เมตร ทรงต้นโปร่ง มีการแตกกิ่งก้านแผ่เป็นพุ่ม รัศมีของทรงพุ่มประมาณ 2 - 5 เมตร การจัดเรียงตัวของใบส้มเป็นแบบ phyllotaxy บนแผ่นใบมีต่อมน้ำมัน (oil gland) ดอกส้มเกิดที่ปลายยอดอ่อนหรือที่มุมใบ เป็นดอกเดี่ยว (solitary) หรือช่อดอก (inflorescence) เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ผลส้มคือ ส่วนที่เจริญและพัฒนามาจากส่วนของรังไข่ ส่วนเปลือกชั้นนอกสุด ที่มีสีเขียวหรืออาจเปลี่ยนเป็นสีอื่นเมื่อสุก เปลือกส่วนกลางที่มีลักษณะนุ่ม มีสีขาว อาจเป็นชั้นที่บางมากเช่นที่พบในส้มเขียวหวาน และส่วนในสุดที่เป็นเยื่อหุ้มกลีบ ผนังด้านในของส่วนในสุดนี้จะแบ่งเซลล์และขยายตัวออกกลายเป็นถุง (juice sac) ทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำ น้ำตาล และสารอาหารต่างๆ เมล็ดส้มมีการเจริญและพัฒนาจากไข่ (ovule) รูปร่างคล้ายหยดน้ำ ด้านแหลมเป็นด้านที่รากงอกออกมา และด้านตรงข้ามซึ่งมีลักษณะป้าน เมล็ดประกอบด้วยส่วนสำคัญต่างๆคือ เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ซึ่งมี 2 ชั้น ชั้นนอกมีสีเหลืองฟางข้าว ส่วนชั้นในมีลักษณะเป็นเยื่อบางสีน้ำตาล ดันอ่อนหรือที่เรียกว่า เอ็มบริโอ (embryo) คือ ส่วนที่จะเจริญพัฒนากลายเป็นต้น และส่วนที่สะสมอาหารซึ่งเรียกว่า ใบเลี้ยง (cotyledon) เมื่อเมล็ดเริ่มงอก ส่วนของรากปฐมภูมิ (primary root) จะเจริญ

ออกมาก่อน และมีการพัฒนากลายเป็นรากแก้ว (tap root) โดยปกติจะมีเพียงรากเดียว และมีการแตกแขนงออกไปเรียกว่า รากทุติยภูมิ (secondary root) โดยทั่วไปรากแก้วจะอยู่ในดินระดับค่อนข้างตื้นประมาณ 50 เซนติเมตร

2.5.2 โรคและแมลงศัตรูส้ม

โรคสำคัญของส้มที่เข้าทำลายและพบระบาดในแหล่งปลูกส้มต่างๆ ได้แก่ โรคแคงเกอร์ (citrus canker) โรครากเน่าและโคนเน่า (root rot) โรคใบเปื้อนน้ำหมากหรือโรคมelanose โรคแผลสะเก็ดหรือโรคสเค็บ (scab) โรคผลร่วงหรือโรคขั้วผลเน่า โรคเทริสเตซา (tristeza disease) โรคกรีนนิ่ง (greening disease) และอาการผิดปกติที่เกิดจากการขาดธาตุอาหาร ส่วนแมลงและไรศัตรูส้มที่สำคัญซึ่งทำลายทำให้เกิดความเสียหายแก่การปลูกส้ม ได้แก่ หนอนชอนใบ ส้ม หนอนแก้วส้ม เพลี้ยไฟ ไรแดง และไรสนิม

2.5.3 ปัญหา

ส้มจัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญ จึงได้มีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะในภาคเหนือจังหวัดเชียงใหม่และเชียงรายมีการปลูกส้มเป็นจำนวนมาก ปัญหาที่พบได้แก่การบุกรุกทำลายป่าเพื่อทำสวนส้มจนถึงเขตชุมชน การขาดแคลนน้ำเพราะใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและอุปโภคบริโภคของชุมชน มลพิษทางอากาศ และทางน้ำจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชแก่ชุมชน

ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีและปุ๋ยเป็นจำนวนมาก ปริมาณการใช้สารเคมีในสวนส้มบนพื้นที่ 40,000 ไร่ ประมาณเกือบกว่า 600 ตัน/ปี การใช้สารเคมีปริมาณมากยังทำให้สารเคมีที่ตกค้างในผลส้มส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคในเมืองใหญ่ด้วย ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตส้มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มสารเคมีกำจัดศัตรูพืช 2. กลุ่มอาหารเสริม หรือ ฮอรัโมน 3. กลุ่มสารกำจัดเชื้อรา 4. กลุ่มสารเคมีฆ่าหญ้า 5. กลุ่มปุ๋ยเคมี ข้อมูลจากสถาบันเกษตรกรรมยั่งยืน ระบุว่าสารเคมีในกลุ่มที่อันตรายมากและยังมีการใช้ในกระบวนการผลิตสวนส้มคือกลุ่มสารเคมีกำจัดศัตรูพืช กลุ่มสารเคมีกำจัดศัตรูพืช เช่น ท็อปแลน (ชื่อการค้า) ถือเป็นสารเคมีประเภท 1a (Extremely hazardous) องค์การอนามัยโลก (WHO) จัดให้เป็นกลุ่มสารเคมีที่มีพิษร้ายแรงสูงมาก และอะบาเม็กติน (ชื่อการค้า) เป็นประเภทที่พิษร้ายแรงสูง เป็นต้น บางชนิดมีการตกค้างยาวนาน เช่น ดีดีที มีผลไปถึงผู้บริโภคด้วยเช่นกัน (เบญจา, 2546) ปัจจุบัน ได้มีการนำเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดมาใช้ในการเกษตรช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและสร้างสารที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชและลดปริมาณการใช้สารเคมีเกษตร

ดังนั้นรายงานวิจัยที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนั้น แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าแอกติโนมัยซีทสามารถอาศัยอยู่ร่วมกับพืชได้อย่างสมบูรณ์ตามธรรมชาติแล้ว และยังมีประโยชน์ไม่เป็นอันตราย

ต่อพืชอาศัย เพราะฉะนั้นแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ จึงเป็นจุดที่น่าสนใจและมีความสำคัญสำหรับงานวิจัย ในด้านการศึกษาจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและสร้างสารที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชและลดปริมาณการใช้สารเคมีเกษตร



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved