อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

สัญญาเลขที่ R2557B030

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

Effects of growth regulators produced by Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) on tissue culture of the herb, *Murdannia loriformis*

คณะผู้วิจัย

1. รศ.ดร.ศิริพรรณ สารินทร์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
   คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
   คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ผศ.ดร.อภิชาติ ชิดบุรี สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร
   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 18 ส.ค. 2559
เลขทะเบียน 17015380
เลขเรียกหนังสือ 2 QK
76
.T5
ศ464ร
2557

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร
ประจำปีงบประมาณ 2557

ชื่อเรื่อง ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

Effects of growth regulators produced by Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) on tissue culture of the herb, *Murdannia loriformis*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง และเพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งโดยวิธีชักนำการเกิดแคลลัส ผลศึกษาพบว่าจากแบคทีเรียกลุ่ม endophytic PPFMs จำนวน 34 ไอโซเลท มีจำนวน 18 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างสาร IAA ได้มากกว่า 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาพการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติม L-tryptophan โดยแบคทีเรียไอโซเลท ED5-9 สามารถสร้างสาร IAA ได้สูงที่สุดเท่ากับ 3.472 ไมโครกรัมต่อ และไม่พบการสร้างไซโตไคนิน และเมื่อนำมาศึกษาผลของปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท ED5-9 ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าแคลลัสสามารถมีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดใหม่ และรากได้ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักที่มี IAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยมีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วน อยู่ในช่วงระหว่าง 1.80 – 2.40 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีจำนวนรากต่อชิ้นส่วน อยู่ในช่วงระหว่าง 7.00 – 8.56 รากต่อชิ้นส่วน เช่นเดียวกันน้ำหนักสดและแห้งของชิ้นส่วนแคลลัส (0.6914 – 0.7520 และ 0.0534 – 0.0661 กรัม ตามลำดับ) ในขณะที่แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่เกิดการชักนำให้มีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดใหม่และราก

ABSTRACT

The objective of this research were to isolate Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) which capable of producing a phytohormone, indole-3-acetic acid (IAA) from medicinal plant leaves of *Murdannia loriformis* and to investigate the potential of bacterial indole acetic acid to enhance growth and development of callus culture of *Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy. There were 18 out of 34 endophytic PPFMs isolates produced IAA more than 2.0 µg/ml when incubation in the medium without L-tryptophan supplement, and which the endophytic PPFMs isolate ED5-9 gave the highest of IAA production of 3.472 µg/ml. The results also showed that after 6 weeks of cultivation with the various concentrations of IAA applied to MS(1962) medium, the callus grown and developed to be the shoots and roots, which had the number of new shoots per explant and the number of roots per explant of 1.80 – 2.40 shoots/explant and 7.00 – 8.56 roots/explant, respectively. While the callus cultured on MS(1962) medium containing with the 1 mg/l of 2,4-D control was unable to induce the growth and development of new shoots and roots.

Executive Summary

โครงการวิจัยเรื่องผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง ได้บรรลุผลสำเร็จดังต่อไปนี้

ผลสำเร็จเบื้องต้น (Preliminary results : P) คือองค์ความรู้เกี่ยวกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด Indole-3-acetic acid (IAA) และไซโตไคนินที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ดัดแปลงและปรับปรุงกระบวนการต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการวิจัย และผลสำเร็จที่ได้เป็นของใหม่และมีความแตกต่างจากที่เคยมีมาแล้ว เนื่องจากยังไม่พบรายงานวิจัยที่เกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียชนิดนี้ในหญ้าปักกิ่ง

ผลสำเร็จกึ่งกลาง (Intermediate results : I) คือข้อมูลของแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมนพืชออกซินชนิด Indole-3-acetic acid (IAA) และไซโตไคนินจากใบพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งจะสามารถนำไปสู่การศึกษาวิจัยที่สูงขึ้น เช่น การศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรีย เพื่อนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรโดยเฉพาะประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป

ผลสำเร็จตามเป้าประสงค์ (Goal results : G) คือข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของฮอร์โมนพืชออกซินชนิด Indole-3-acetic acid (IAA) ที่สร้างโดยแบคทีเรีย จะเป็นประโยชน์ในการนำไปสู่การประยุกต์ใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้แทนสารเคมีสังเคราะห์ในการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่งแบบบชักนำให้เกิดแคลลัส เพื่อการขยายพันธุ์แบบเกษตรอินทรีย์เพื่อนำไปสู่การเป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพ และเป็นข้อมูลในการพัฒนาไปสู่การจัดการคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพต่อไป

บทสรุปผลการวิจัยโดยย่อ

การศึกษาสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดออกซินและไซโตไคนินที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่แยกจากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

แบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง จำนวน 34 ไอโซเลท สามารถสร้างปริมาณ IAA ได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลท ED5-9 สามารถสร้าง IAA ได้ในปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 3.472 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากต้องนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้และเป็นการลดการใช้สารเคมี ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่เจริญในอาหารเหลว LNM ที่ไม่เติม L-tryptophan 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่สามารถสร้าง IAA ได้มากกว่า 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 18 ไอโซเลท ที่ถูกนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดไซโตไคนิน พบว่า แต่ละไอโซเลทมีการสร้างไซโตไคนินในปริมาณที่แตกต่างกัน และไม่พบการสร้างไซโตไคนินจากไอโซเลท ED5-9

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งโดยวิธีชักนำการเกิดแคลลัส การพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส

จากศึกษาพบว่า เมื่อเลี้ยงแคลลัสได้ 2 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน มีร้อยละของการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน อยู่ในช่วงร้อยละ 50 - 100 มีร้อยละของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วงร้อยละ 25 - 50 และพบแบคทีเรียที่สีชมพูจากชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักในปริมาตร 200 ไมโครลิตร/ลิตร โดยมีทั้งชิ้นส่วนแคลลัสที่สามารถรอดชีวิตและเริ่มเกิดอาการสีน้ำตาลบนชิ้นส่วน โดยชิ้นส่วนแคลลัสที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงต่อไปจะมีอาการสีน้ำตาลบนชิ้นส่วน หลังจากเนื้อเยื่อตาย สำหรับการพัฒนาของส่วนของยอดใหม่ และรากที่เกิดจากชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารในแต่ละกรรมวิธี พบว่า ชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่เกิดยอดใหม่และราก ส่วนชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน มีการเกิดยอดใหม่และรากที่ไม่แตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

การนำแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่สร้างฮอร์โมนพืชไปประยุกต์ใช้ ควรมีการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs เพื่อพัฒนาไปสู่วิธีการนำไปใช้เพื่อการปรับปรุงวิธีการปลูกพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งในด้านการเร่งการเจริญเติบโตและส่งเสริม

ความแข็งแรงของต้นกล้าสมุนไพรหญ้าปักกิ่งในช่วงของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์แบบเกษตรอินทรีย์เพื่อนำไปสู่การเป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพต่อไป

ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2557 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่ รวมทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดการวิจัย

รศ.ดร.ศิริพรรณ สารินทร์
ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว
ผศ.ดร.อภิชาติ ชิดบุรี
กรกฎาคม 2558

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3	วิธีดำเนินการวิจัย	16
4	ผลการวิจัย	21
5	บทสรุป	36
	สรุปผลการวิจัย	36
	อภิปรายผลการวิจัย	37
	ข้อเสนอแนะ	41
บรรณานุกรม		42
ภาคผนวก		51

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืชออกซิน	4
2	ปริมาณออกซินที่สร้างได้จากแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*	7
3	ปริมาณ IAA ที่วัดได้จากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน	21
4	ปริมาณไซโตไคนินที่วัดได้จากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่ได้คัดเลือกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน	24
5	ค่า Rf ของสารสกัดจากน้ำหมักของแบคทีเรีย Endophytic PPFMs ที่ได้คัดเลือกเทียบกับสารมาตรฐาน zeatin, zeatin riboside และ kinetine	25
6	ร้อยละการรอดชีวิตและการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์	31
7	ชิ้นส่วนแคลลัสของหญ้าปักกิ่งที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักในปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์	32
8	การเกิดสีน้ำตาล (browning) บนชิ้นส่วนแคลลัสของหญ้าปักกิ่งและการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์	32
9	น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (ข) ของชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์	33
10	การพัฒนายอดใหม่และรากบนชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร (ก) เปรียบเทียบกับน้ำหมัก เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์	35

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	กราฟสารมาตรฐาน kinetine (K), zeatin (Z), zeatin riboside (ZR) และอาหารเลี้ยงเชื้อ LMN (control)	27
2	กราฟสารสกัดตัวอย่างไอโลเลท ED3-7	27
3	การเกิดยอดใหม่ของหญ้าปักกิ่งที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์	28
4	การเกิดยอดใหม่ของหญ้าปักกิ่งที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์	29
5	แคลลัสที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนใบของหญ้าปักกิ่งที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร	30
6	แคลลัสที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนใบของหญ้าปักกิ่งที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับไคเนติน ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์	30
7	การพัฒนายอดใหม่ของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์	34
8	การพัฒนารากของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์	34

บทที่ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในสถานการณ์ปัจจุบันประเทศไทยมีภาวะคุกคามด้านสุขภาพของประชาชนจากการเจ็บป่วยด้วยโรคร้ายหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็ง ส่งผลให้วิธีที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งมีด้วยกันหลายทาง เช่น การแพทย์แผนปัจจุบัน การแพทย์แผนไทย การแพทย์ทางเลือก และการแพทย์เสริมประสาน เป็นต้น การใช้สมุนไพรที่มีสรรพคุณเกี่ยวกับโรคมะเร็งจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการดูแลและประคับประคองผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งให้มีอาการดีขึ้น หญ้าปักกิ่งหรือหญ้าเทวดาหรือเล่งจือเฉ้า เป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยรู้จักมาเป็นเวลานาน ถูกนำมาใช้การรักษาและบรรเทาอาการจากโรคมะเร็ง ทำให้อาการของผู้ป่วยดีขึ้น และมีการนำมาใช้ร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบันเพื่อลดอาการผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัด ซึ่งในการนำหญ้าปักกิ่งมาใช้นั้นต้องเป็นชนิดที่ต้องการเนื่องจากมีลักษณะคล้ายหญ้าชนิดอื่น และต้องมีอายุครบกำหนดเวลาจึงจะมีประโยชน์ทางยา ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สมุนไพรได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ความต้องการผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบจากธรรมชาติจึงมากขึ้นด้วย ส่งผลให้มีความต้องการวัตถุดิบสมุนไพรเป็นจำนวนมาก ซึ่งในอดีตสมุนไพรเก็บได้จากป่าแต่ในปัจจุบันมีป่ามีพื้นที่ลดน้อยลง ประกอบกับการส่งเสริมการปลูกพืชสมุนไพรเพื่อการค้าในเชิงเศรษฐกิจยังมีน้อยทั้งๆ ที่เป็นพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจสูง นอกจากนี้สมุนไพรบางชนิดยังเพาะปลูกได้ยากและใช้เวลานานในการเพาะปลูกจนสามารถเก็บเกี่ยวได้ ทำให้ต้องใช้สารเคมีสังเคราะห์ต่างๆ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชให้ได้ผลผลิตเร็วและป้องกันกำจัดศัตรูพืช แต่เนื่องจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ต่างๆ เป็นข้อกำหนดที่ต้องควบคุมในมาตรฐานคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรซึ่งต้องมีความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเพื่อลดผลกระทบกับทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ลดต้นทุนการผลิต เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในระยะยาว และพัฒนาเทคโนโลยีการเกษตรที่เหมาะสมกับสภาวะและภูมิสังคมของประเทศ การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบจากสมุนไพรตั้งแต่การผลิตที่ทางการเกษตรที่ถูกต้องและเหมาะสมซึ่งส่งเสริมการเจริญของต้นพืชสมุนไพรให้สามารถเจริญเติบโตได้เร็วและให้ผลผลิตที่มีคุณภาพจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในการขยายพันธุ์พืชสมุนไพรสายพันธุ์ดีที่ให้ปริมาณสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในปริมาณที่สูง ให้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาไม่นาน แต่เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ในรูปของฮอร์โมนพืช (plant hormones) ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์เพื่อเพิ่มการเจริญของราก ยอด และกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เช่น ออกซิน (auxin) ไซโตไคนิน (cytokinins) จิบเบอเรลลิน (gibberellins) และกรดแอบไซซิก (abscisic) เป็นต้น แต่สารควบคุมการเจริญเติบโตเหล่านี้เป็นสารเคมี

สังเคราะห์ที่มีราคาแพงซึ่งต้องคำนึงถึงความคุ้มทุนในการผลิตด้วย ดังนั้นการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เป็นสารอินทรีย์ชีวภาพเพื่อลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์จึงเป็นทางเลือกอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจที่จะทำให้เกิดผลดีต่อการเพิ่มปริมาณวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพได้มากยิ่งขึ้น โดยปกติในธรรมชาตินอกจากพืชที่สามารถสร้างฮอร์โมนสำหรับส่งเสริมการเจริญได้แล้ว ยังมีจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชบางชนิดสามารถสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) โดยไม่ก่อโรคกับพืช และสามารถสร้างสารชีวภาพที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่อาศัยร่วมกับพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งและพัฒนาวิธีการนำไปใช้เพื่อการปรับปรุงวิธีการปลูกพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งในด้านการเร่งการเจริญเติบโตและส่งเสริมความแข็งแรงของต้นกล้าสมุนไพรหญ้าปักกิ่งในช่วงของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์แบบเกษตรอินทรีย์ นำไปสู่การเป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพและการเพิ่มขีดความสามารถในการผลิตเภสัชภัณฑ์จากพืชในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs และสารควบคุมเจริญเติบโตสังเคราะห์ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งโดยวิธีชักนำการเกิดแคลลัส

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งจากงานวิจัยเบื้องต้น (ศิริพรรณ สารินทร์ และคณะ, กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีงบประมาณ 2555) เฉพาะสารออกซินในรูปของ indole-3-acetic acid (IAA) และไซโตไคนินในรูปของ zeatin สำหรับการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs และสารควบคุมเจริญเติบโตสังเคราะห์ที่มีต่อลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง ทำโดยใช้แนวทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรด้วยเทคนิคการนำพืชจากธรรมชาติมาทำการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส (callus) จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อนเพื่อทำการขยายพันธุ์พืชสมุนไพร (micropropagation)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulators)

สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นสารเคมีที่สำคัญในการเกษตร เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นมาได้ ซึ่งบางชนิดมีคุณสมบัติเหมือนฮอร์โมนพืช ในประเทศไทยการใช้ฮอร์โมนพืชมีวัตถุประสงค์ในทางการเกษตรเพื่อให้มีผลผลิต เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ และเพื่อความสะดวกในการจัดการฟาร์ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับพืชสมุนไพร ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตถือเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิของพืชสมุนไพรเป็นอย่างยิ่ง

ฮอร์โมนพืช (plant hormones) หรือในบางครั้งอาจใช้คำว่า "phytohormones" เป็นสารอินทรีย์ธรรมชาติความเข้มข้นน้อยๆ ที่ไปมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช โดยไปกระตุ้นให้พืชมีการเจริญเติบโต มีการเปลี่ยนแปลง)differentiation) และมีพัฒนาการ)development) ซึ่งฮอร์โมนพืชอาจมีการสังเคราะห์จากที่หนึ่งแล้วไปออกฤทธิ์ควบคุมยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย ฮอร์โมนพืชชนิดออกซิน (auxin) เป็นฮอร์โมนพืชชนิดแรกที่ค้นพบ ส่วนใหญ่ที่พบในพืชอยู่ในรูปของ indole-3-acetic acid (IAA) นอกจากนี้ยังมีสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA เช่น indoleacetaldehyde ยังมีกิจกรรมของฮอร์โมนพืชออกซิน ในพืชบางชนิดมีสารประกอบที่มีกิจกรรมของฮอร์โมนพืชออกซินอย่างอ่อน เช่น phenylacetic acid และอาจจะพบ IAA อยู่ในรูปที่รวมกับสารอื่น เช่น indoleacetyl aspartate และยังมีฮอร์โมนพืชออกซินอีกหลายชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในทางการเกษตร เช่น indole-3-butyric acid (IBA), napthalene acetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ 4-chloropenoxy acetic acid (4-CPA) การสังเคราะห์ IAA ในพืชจะสังเคราะห์จาก tryptophane หรือ indole ที่บริเวณใบเริ่มเกิด (leaf primordia) ใบอ่อน และเมล็ดที่กำลังพัฒนา (developing seeds) IAA ที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกขนส่งผ่าน vascular cambium ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างท่อลำเลียงน้ำ (xylem) และท่อลำเลียงอาหาร (phloem) แต่ยังคงมีอยู่ในเซลล์ผิวชั้นนอก (epidermal cells) ในการขนส่งไปยังรากอาศัย phloem ฮอร์โมนพืชออกซินจะมีผลต่อพืชโดยการทำให้เซลล์พืชมีการขยายขนาด ลำต้นและกิ่งก้านมีการเจริญ ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์แคมเบียม (cambium) ร่วมกับไซโตไคนิน (cytokinin) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ phloem และ xylem กระตุ้นให้มีการเกิดรากในการปักชำกิ่งและการตอนกิ่ง รวมถึงการพัฒนาของรากแขนงและการเปลี่ยนแปลงของรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดการตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วงและการโค้งงอเข้าหาแสง (tropistic responses) สนับสนุนให้ตายอด (apical bud) เจริญโดยกดไม่ให้ตาข้างเจริญ

(lateral buds) ชะลอการหลุดร่วงของใบ กิ่ง และผล ส่งเสริมการเกิดดอกและทำให้เพิ่มการติดผลผ่านทางเอทิลีน (ethylene) โดยปกติทั่วไปฮอร์โมนพืชออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่ำจะมีผลในการส่งเสริมการเจริญ แต่ถ้าความเข้มข้นที่สูงจะมีผลในการยับยั้งการเจริญซึ่งมักใช้ในการกำจัดวัชพืช (Davies, 2004)

ฮอร์โมนพืชออกซินนอกจากสังเคราะห์จากพืชแล้วยังมีจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชออกซินได้เช่น กลุ่มของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช (plant pathogens) ซึ่งกลุ่มนี้จะสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชออกมามากเกินความต้องการของพืช ทำให้พืชเป็นโรคต่างๆ เช่น เกิดปุ่มปม เกิดรอยไหม้ และเหี่ยวเฉา แต่ฮอร์โมนพืชที่สร้างจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะมาจากกลุ่มจุลินทรีย์บริเวณรากพืช (rhizosphere) จุลินทรีย์พวกที่อาศัยอยู่บนพืช (epiphyte) จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์พืช (endophyte) แบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) และกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่อย่างอิสระ (free-living) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างฮอร์โมนพืชขึ้นมาเพียงพอที่จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ดังตาราง 1

ตาราง 1 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืชออกซิน

Prokaryotes		Eukaryotes	
heterotrophs	phototrophs	algae	fungi
Acetobacter, Achromobacter, Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Aminobacter, Arthrobacter, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Bradyrhizobium, Corynebacterium, Enterobacter, Erwinia, Flavobacterium, Herbaspirillum, Klebsiella, Methylobacterium, Methylovorus, Microbacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Paracoccus, Pseudomonas, Rhizobium, Rhodococcus, Sphingomonas, Streptomyces, Sulfolobus, Xanthomona	*Anabaena, Anabaenopsis, Calothrix, Chlorogloeopsis, Cylindrospermum, Gloeothece, Nostoc, Plectonema, Synechocystis*	*Chlorella, Dunaliella, Fucus*	*Absidia, Actinomucor, Alternaria, Amanita, Aspergillus, Colletotrichum, Fusarium, Hebeloma, Laccaria, Lentinus, Monilia, Paxillus, Penicillium, Phoma, Phymatotrichum, Phytophtora, Pisolithus, Plasmodiophora, Pythium, Rhizoctonia, Rhizopogon, Rhizopus, Saccharomyces, Sclerotium, Taphrina, Ustilago*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Tsavkelova และ คณะ, 2006

แบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) สกุล *Methylobacterium*

แบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างท่อน ขนาด 0.8-1.2 x 1.0-8.0 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลาแบบ monotrichous สามารถเคลื่อนที่ได้ มีการสะสม sudanophilic (poly-β-hydroxybutyrate) ไว้ในเซลล์ ต้องการออกซิเจนในกระบวนการหายใจ (aerobic) โดยใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน พลังงานและอิเล็กตรอน (chemoorganotroph) *Methylobacterium* มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรคาร์บอนของระบบนิเวศในธรรมชาติ สามารถเจริญบนสารประกอบที่มีคาร์บอนอะตอมเดียวเช่น formate, formaldehyde และ methanol ได้ บางชนิดสามารถใช้ methane เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (facultative methylotroph) เช่น *M. organophilum* นอกจากสารประกอบที่มีคาร์บอนอะตอมเดียวแล้ว *Methylobacterium* ส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 95 ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ได้เช่น glycerol, malonate, succinate, fumarate, α-ketoglutarate, DL-lactate, DL-malate, acetate, pyruvate, propylene glycol และ ethanol และบางชนิดสามารถใช้ L-arabinose, D-xylose, D-fucose, D-glucose, D-galactose, D-fructose, L-aspartate, L-glutamate, adipate, pimelate, sebacate, azelate, suberate, D-tartrate, citrate, citraconate, saccharate, monomethylamine, dimethylamine, trimethylamine, trimethylamine-*N*-oxide, ethanolamine, butylamine, formamide, *N*-methylformamide, dimethylglycine, betaine, tetramethylammonium hydroxide (TMAH), *N,N*-dimethylformamide (DMF), chloromethane, dichloromethane propionate, DL-arginine, L-valine, glycine, geraniol, tryptamine, histamine, putrescine, *m*-hydroxybenzoate, testosterone, sarcosine, phenol, thiourea, tetramethylurea, hexane และ benzene ส่วนแหล่งไนโตรเจน *Methylobacterium* สามารถใช้ ammonia, nitrate และ urea ได้ และโดยเฉพาะ *M. thiocyanatum* สามารถใช้ thiocyanate และ cyanate เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญได้ เนื่องจาก *Methylobacterium* สามารถใช้ methanol เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ ดังนั้นในการแยกเชื้อจึงใช้อาหารที่มี methanol เป็นองค์ประกอบโดย *Methylobacterium* จะเจริญและให้โคโลนีสีชมพูอ่อนซึ่งเป็นสารพวกคาร์โรทีนอยด์ (carotenoid) ที่ไม่แพร่ลงในอาหารซึ่งเป็นลักษณะเด่นของแบคทีเรียกลุ่มนี้ การเจริญในอาหารเหลวจะเกิดฝ้าสีชมพูที่ผิวหน้าของอาหาร จึงทำให้เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) โดย *Methylobacterium* จะใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนอะตอมเดียวโดยผ่านทาง serine pathway ในการ

เจริญของ *Methylobacterium* บางชนิดจะถูกกระตุ้นได้ด้วย calcium pantothenate แต่ *Methylobacterium* ส่วนใหญ่จะไม่สามารถย่อย (hydrolyze) สารประกอบ casein, starch, gelatin, cellulose, lecithin และ DNA สามารถสร้างเอนไซม์ urease แต่ไม่สร้างเอนไซม์ β-galactosidase, L-ornithine decarboxylase, L-lysine decarboxylase และ L-arginine dihydrolase ไม่สร้างสารประกอบ indole และ hydrogen sulfide ให้ผลการทดสอบ methyl red และ Voges-Proskauer เป็นลบ ส่วนผลการทดสอบ catalase และ oxidase เป็นบวก บางชนิดสามารถรีดิวซ์ nitrate เป็น nitrite ได้ (Green, 2005; Green, 2006) แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน ฝุ่น น้ำจืด อากาศ ตะกอนทะเลสาบ ปมราก เมล็ดข้าว ใบพืช สภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล และในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม เช่น ครีมทาหน้า การหมัก หรือแม้แต่ในกระบวนการผลิตชีพ

การศึกษาฮอร์โมนพืชออกซินในแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs สกุล *Methylobacterium*

Ivanova, Doronina และ Trotsenko) 2001) พบว่า Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) ชนิด *Methylobacterium mesophilicum* สามารถสร้างฮอร์โมนพืชออกซิน ในส่วนของ IAA ในปริมาณ 3-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่าสร้าง indole-3-pyruvic acid และ indole-3-acetamide โดยผ่าน serine pathway ของกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบคาร์อะตอมเดียว การสร้างฮอร์โมนพืชออกซินของ PPFMs ถูกกระตุ้นโดย L-tryptophan และถูกยับยั้งโดย ammonium ions จากการศึกษา PPFMs ที่ถูกทำให้ขาดความสามารถของเอนไซม์ tryptophan decarboxylase และ tryptophan side-chain oxidase จะพบว่ายังมีเอนไซม์ aminotransferase ทำให้การสร้าง IAA ของ PPFMs เกิดขึ้นโดยผ่าน indole-3-pyruvic acid

Doronina, Ivanova และ Trotsenko (2002) ศึกษาการสร้างฮอร์โมนพืชออกซินจาก L-tryptophan โดยใช้ PPFMs จาก All-Russia Collection of Microorganisms (VKM) มาทำการศึกษาโดยเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น methanol และแหล่งไนโตรเจนเป็น KNO_3 นำน้ำหมักปราศจากเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาผสมกับ Salkowski reagent แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่า PPFMs สามารถสร้างฮอร์โมนพืชออกซินได้ตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1-15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสร้างได้สูงสุดในช่วงก่อนเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (early stationary growth phase) ซึ่งปริมาณฮอร์โมนพืชออกซินที่แบคทีเรียสร้างได้ แสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ปริมาณออกซินที่สร้างได้จากแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*

Methylobacterium	ปริมาณของ IAA) μg/ml)
Methylobacterium organophilum XX VKM B-2066 (= NCIMB 11278)	1.4
M. radiotolerans VKM B-2144 (= JCM 2831)	3.0
M. rhodesianum VKM B-2141 (= JCM 2810)	13.6
M. zatmanii VKM B-2161 (= NCIMB 12243)	6.2
M. extorquens VKM B-2064 (NCIMB 9399)	8.7
M. dichloromethanicum VKM B-2191 (= DSMZ 6343)	5.5
M. rhodinum VKM B-2065 (= ATCC 14821)	14.6

ที่มา: ดัดแปลงจาก Doronina, Ivanova และ Trotsenko, 2002

Omer และ คณะ (2004) ตรวจวิเคราะห์ IAA จากน้ำหมักที่ผ่านการเพาะเลี้ยง PPFMs พบว่ามี 3 ไอโซเลทจากจำนวนทั้งหมด 16 ไอโซเลท ที่ให้ผลบวกจากการวิเคราะห์โดย colorimetric assay และยืนยันการตรวจสอบด้วย high-performance liquid chromatography คู่กับ NMR ในการสร้าง IAA ของ PPFMs ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญโดย L-tryptophan ซึ่งจากผลพิสูจน์ได้ว่า PPFMs สามารถสร้าง IAA ได้

Orf และ คณะ (2005) สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs จากถั่ว 5 ชนิดคือ ถั่วลูกไก่ (chick-pea) ถั่วแขก (common bean) ถั่วปากอ้า (faba bean) ถั่วลิสง (peanut) และ ถั่วเหลือง (soybean) ในประเทศอียิปต์ และจากการศึกษาทางอณูชีววิทยาสามารถจัดจำแนก PPFMs ที่แยกจากถั่วปากอ้าได้เป็น *M. mesophilicum* จากถั่วลิสงได้เป็น *M. fujisawaense* และที่แยกจากถั่วแขก ถั่วลูกไก่และถั่วเหลืองได้เป็น *M. radiotolerans* ซึ่งทั้งหมดสามารถสร้างฮอร์โมนพืชได้

การศึกษาแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในพืช

ในปี ค .ศ.1982 Corpe และ Basile ได้แยกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีชมพูและสามารถใช้ methanol เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยพบมากและบ่อยจากน้ำล้างแทลัส (thalli) ของพืชชั้นต่ำที่ไม่มีท่อลำเลียง (bryophyte) แต่พบได้บ้างเล็กน้อยจากน้ำและดิน และ Corpe (1985) ได้นำใบของพืชสีเขียวที่เก็บจาก พื้นที่ และในเรือนกระจก มาทาบลงบนอาหาร 50methanol-ammonium salts agar พบการเจริญของ PPFMs กระจายอยู่ทั้งบริเวณผิวใบและท้องใบ โดยมีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 0.1 cfu ต่อตารางเซนติเมตรถึงมากกว่า 5 x 10^2 cfu ต่อตารางเซนติเมตร และวิธีนี้สามารถใช้ในการศึกษาปริมาณของ PPFMs บนพื้นผิวของวัสดุต่างๆ เช่น โลหะ ไม้ แก้ว พลาสติก หิน คอนกรีต ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ย 0.14 – 1.9 cfu ต่อตารางเซนติเมตร

ต่อมาในปี ค.ศ 1989 Corpe และ Rheem ได้ศึกษาแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีชมพู หรือ PPFMs จากต้น white clover (*Trifolium repens*) พบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม aerobe ที่ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (heterotroph) และอาศัยอยู่บนผิวใบอ่อนของพืช มีปริมาณเฉลี่ยร้อยละ 36 ของแบคทีเรียพวก heterotroph ต่อตารางเซนติเมตร โดยมีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 3-79 การเจริญของ PPFMs บนสารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอมพบว่าเจริญได้ไม่ดีเหมือนกับ heterotroph อื่น ๆ แต่สามารถเจริญได้ดีบน methanol ซึ่งพบบนใบพืชที่กำลังเจริญ ซึ่ง heterotrph กลุ่มอื่นๆ เจริญได้ไม่ดี จากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (scanning electron microscope; SEM) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ผิวใบพืช (epiphytic bacteria) จะอยู่เป็นจำนวนมากบริเวณใกล้ ๆ กับขอบบริเวณผิวของท้องใบ (abaxial) ในการเจริญของพืชจะมีการปลดปล่อย methanol ออกมา ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (byproduct) ของการย่อยสลายเพคติน (pectin) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชโดยเอนไซม์ pectinmethylesterase (Levy and Staehelin, 1992; Gaffe, Tieman and Handa, 1994) และอาจเกิดจากการย่อยสลายหมู่ methyl ของลิกนิน (lignin) โดยเอนไซม์จากแบคทีเรียและเชื้อรา (Ander, Eriksson and Eriksson, 1985) โดย methanol จะถูกปลดปล่อยจากบริเวณ abaxial มากที่สุด ซึ่งการปลดปล่อย methanol จะผ่านทางปากใบ (stoma) ถ้าปากใบปิดมีผลให้ปริมาณ methanol ลดลง ซึ่งปริมาณการปลดปล่อย mthanol ขึ้นอยู่กับพัฒนาการของใบและจะลดลงตามอายุของใบที่เพิ่มขึ้น (Nemecek-Marshall *et al.*, 1995) โดยใบอ่อนจะมีอัตราการปลดปล่อย methanol อยู่ระหว่าง 0.2 - 3.8 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียสอัตราการปลดปล่อยจะเพิ่มขึ้น 2.3 เท่า และพบว่าอัตราการผลิต methanol ขึ้นกับการเจริญของใบพืช อัตราการผลิต methanol จะลดลงในเวลากลางคืนเนื่องจากการเจริญของใบพืชลดลง ซึ่งแสงอาจมีผลโดยตรงต่อการผลิต methanol ของใบพืช (Harley *et al.*, 2007) methanol ที่ปลดปล่อยออกมาจะเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของ PPFMs จึงทำให้สามารถเจริญอยู่บนผิวใบพืชได้ (Kutschera, 2007)

Chanprame, Todd และ Widholm (1996) ศึกษา PPFMs บนผิวของใบพืช 40 ตัวอย่าง 38 ชนิด และฝักถั่วเหลือง โดยทาบลงบนอาหาร AMS ที่เติม methanol เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีปริมาณอยู่ระหว่าง 0.5 – 69.4 cfu ต่อตารางเซนติเมตรของใบพืช เมื่อนำตัวอย่างใบพืชไปผ่านการล้างฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite ร้อยละ 1.05 และนำไปปั่นให้ละเอียด จะพบ PPFMs เพียง 4 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด และพบว่าถ้ามีการฆ่าเชื้อที่ผิวใบของต้นลำโพงขาว *Datura innoxia* หรือภายในของฝักถั่วเหลืองจะพบ PPFMs ได้น้อย ซึ่งการฆ่าเชื้อที่ผิวใบพืชสามารถกำจัดและลดการปนเปื้อนของ PPFMs ที่พบบนผิวใบพืชก่อนการนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้

สำหรับในการศึกษาแบคทีเรีย PPFMs ในเนื้อเยื่อพืชเมื่อนำไปทำการเพาะเลี้ยงนั้น Widholm (1996) ได้รายงานว่าพบ *Methylobacterium mesophilicum* อาศัยอยู่ที่ผิวใบพืชหลายชนิด และมีรายงานการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อครั้งแรกในถั่วเหลือง (*Glycine max*) บริเวณใบและเมล็ด และยังได้พบ PPFMs ปนเปื้อนบนใบของต้นลำโพงขาว (*Datura innoxia*) แต่หลังจากที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวใบตรวจไม่พบ PPFMs อย่างไรก็ตามปัญหาการปนเปื้อนของ PPFMs ในการเพราะเลี้ยงเนื้อเยื่อถือว่าไม่ใช่ปัญหาที่สำคัญ

Pirttia และ คณะ (2000) ได้แยกแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาของต้นสน (*Pinus sylvestris* L.) และจำแนกได้เป็น *Methylobacterium extorquens* และ *Pseudomonas synxantha* โดยวิธี 16SrRNA in situ hybridization

Romannovskaya และ คณะ (2001) ได้ศึกษาที่มาของ PPFMs ที่เจริญอยู่บนใบพืชโดยใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (Zea mays) เป็นตัวอย่างในการศึกษา และใช้ *M. mesophilicum* APR-8 (pULB113) เป็นแบคทีเรียทดสอบโดยจะเพาะเชื้อลงบนดินสำหรับปลูกและบนใบ พบว่าจำนวนของ *M. mesophilicum* เพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อพืชมีการเจริญ และในระหว่างการงอกของเมล็ดจะไม่พบ *M. mesophilicum* บนใบ ซึ่ง *M. mesophilicum* ที่พบบนใบมาจาก *M. mesophilicum* ที่เพาะลงบนดินสำหรับปลูก ดังนั้นในสภาพธรรมชาติ PPFMs ที่พบบนใบพืชมาจากฝุ่นละอองที่ถูกพัดพาโดยอากาศมาตกลงบนใบพืช

Araujo และ คณะ (2002) ศึกษาแบคทีเรียในเนื้อเยื่อ (endophytic bacteria) ของส้ม (*Citrus sinensis*) โดยการเพาะเลี้ยงและใช้เทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ในการศึกษาชนิดของแบคทีเรีย แบคทีเรียที่เป็นชนิดเด่นถูกนำไปวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบพบว่าเป็น *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp. (*M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans* และ *M. zatmanii*), *Nocardia* sp., *Pantoea agglomerans* และ *Xanthomonas campestris*

Aken, Yoon และ Schnoor (2004) ได้ทำการแยกแบคทีเรียสีชมพูจากเนื้อเยื่อผสมของลูกผสม poplar (*Populus deltoides* x *nigra* DN34) เมื่อนำไปจำแนกโดยการหาลำดับยีน 16S rDNA พบว่าเป็น *Methylobacterium* sp. Bj001มีความสามารถในการใช้ methanol เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

Omer, Tombolini และ Gerhardson (2004) ศึกษาจำนวนประชากรของ PPFMs ในพืช 2 ชนิดคือ red clover (*Trifolium pratense*) และข้าวสาลีชนิดปลูกข้าวฤดูหนาว (winter wheat; *Triticum aestivum*) จากการแยก PPFMs จากใบพืชทั้งสองชนิดแสดงให้เห็นว่าจำนวนประชากรของ

PPFMs ลดลงจากฤดูใบไม้ผลิจนถึงฤดูร้อน แต่จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในตอนปลายของฤดูเพาะปลูก โดยแยก PPFMs จาก red clover ได้มากกว่าข้าวสาลี ในทางกลับกันในสภาวะเรือนกระจกสามารถแยกจากข้าวสาลีได้มากกว่า red clover ทั้งนี้ขนาดจำนวนประชากรขึ้นกับการปริมาณของเชื้อที่ใส่เข้าไป และพบว่าเชื้อที่เพาะที่เมล็ดจะอพยพไปอยู่บริเวณรากหลังจากงอก

Cervantes-Martinez, Lopez-Diaz และ Rodriguez-Garay (2004) ได้ตรวจหา PPFMs บนใบของต้นอากาเว่ (*Agave tequilana*) โดยใช้วิธี laser-induced fluorescence (LIF) เทียบกับเทคนิคการแยกเชื้อแบบเดิม โดยเทคนิค LIF เป็นเทคนิคที่รวดเร็ว และไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืชเหมือนการศึกษาแบบเดิม สามารถทำการศึกษาได้ทันที (real-time)

Orf และ คณะ (2005) ศึกษาลักษณะของ PPFMs ที่แยกจากพืชชนิดต่างในประเทศอียิปต์ 5 ชนิดคือ ถั่วลูกไก่ (chick-pea) ถั่วแขก (common bean) ถั่วปากอ้า (faba bean) ถั่วลิสง (peanut) และ ถั่วเหลือง (soybean) โดยมีลักษณะทั่วไปคือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ ลักษณะทางสรีรวิทยา ทุกไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหาร peptone medium ได้ ยกเว้น PPFMs ที่แยกจากถั่วปากอ้า ทุกไอโซเลทไวต่อยาปฏิชีวนะ kanamycin แต่ดื้อต่อ erythromycin และทุกไอโซเลทสามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น PPFMs ที่แยกจากถั่วแขกสามารถเจริญที่ความเข้มข้นของ NaCl ร้อยละ 5 จากการศึกษาทางอณูชีววิทยาสามารถจัดจำแนก PPFMs ที่แยกจากถั่วปากอ้าได้เป็น *M. mesophilicum* จากถั่วลิสงได้เป็น *M. fujisawaense* และที่แยกจากถั่วแขก ถั่วลูกไก่และถั่วเหลืองได้เป็น *M. radiotolerans*

Madhaiyan, Poonguzhali, และ Sa (2007) ศึกษาปริมาณประชากร PPFMs ของข้าวในส่วนของใบ ดินบริเวณราก (rhizosphere soil) endophyte ของก้านและราก และ epiphyte ของดอกย่อยและเมล็ด จากระยะต่างๆ คือ ระยะเจริญเป็นต้น (vegetative) ระยะออกรวง (flowering) และระยะเก็บเกี่ยว (harvesting) โดยเก็บตัวอย่างมาจาก 4 ที่คือ Il-mi, Nam-pyeoung, O-dae และ Dong-jin นำไปแยกในอาหาร AMS ที่เติม methanol ร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน จดบันทึกแยกตามระยะดูการกระจายตัวของประชากร PPFMs พบว่าประชากร PPFMs มีการกระจายตัวแตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆ ของข้าวโดยเพิ่มขึ้นจากระยะเจริญเป็นต้นถึงระยะออกรวง และลดลงในระยะเก็บเกี่ยว

Mano และ Morisaki (2008) ได้ศึกษาแบคทีเรีย endophyte ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อข้าว เช่น *Pantoea, Methylobacterium, Azospirillum, Herbaspirillum, Burkholderia* และ *Rhizobium* เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ไม่ได้ทำอันตรายต่อต้นข้าว โดยต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Kaga และ คณะ ได้พิสูจน์สมมติฐานที่ว่าต้นข้าว (*Oryza sativa*) เป็นแหล่งของ endophyte โดยเก็บต้นข้าวจาก Kinuhikari มาแยก endophyte จาก ยอดและรากที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่พื้นผิว นำแบคทีเรียที่แยกได้ไปจำแนกโดยวิธีการหาลำดับ 16S rRNA พบว่าเป็น *Bacillus firmus, B. fusiformis, B. pumilus,*

Caulobacter crescentus, Kocuria palustris, Micrococcus luteus, Me. fujisawaense, Me. Radiotolerans และ *Pantoea ananatis* สามชนิดหลังพบในต้นอ่อนและต้นแก่ของข้าว

Schauer และ Kutschera (2008) ได้ศึกษาและวิเคราะห์แบคทีเรียสีชมพูที่อยู่บนพื้นผิวตามส่วนต่างๆ ของต้นทานตะวัน (*Helianthus annuus*) โดยใช้วิธี surface impression บนอาหาร methanol-ammonium salts agar และวิเคราะห์ด้วย polymerase chain reaction (PCR) พบ *M. mesophilicum, M. extorquens, M. radiotolerans* และ *Methylobacterium* sp. ที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ทั้งในส่วนบริเวณที่ถูกแสงคือ กลีบดอกสีเหลืองและใบ และส่วนบริเวณที่ไม่ถูกแสงคือราก โดย *M. mesophilicum* จะเป็นชนิดที่เด่น (dominant species) ในส่วนบริเวณที่ถูกแสง

Raja, Balachandar และ Sundaram (2008) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ PPFMs ที่แยกได้จากใบฝ้าย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ต้นทานตะวัน ถั่วเหลือง และสะระแหน่ โดยใช้วิธีหาลำดับของยีน 16S ribosomal RNA (rRNA), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ สามารถจำแนกได้เป็น *M. populi, M. thiocyanatum, M. suomiense, M. aminovorans* และ *M. fujisawaense* โดย *M. populi* เป็นชนิดที่เด่น รองลงมาคือ *M. aminovorans* และในต้นทานตะวันมีความหลากหลายมากที่สุด ตามมาด้วย ถั่วเหลือง ฝ้าย และสะระแหน่มีความหลากหลายน้อยสุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของ *Methylobacterium* ขึ้นกับชนิดของพืช

Kumar และ Lee (2009) ศึกษาลักษณะของ PPFMs ที่แยกได้จากใบสะเดา ทั้งหมดจำนวน 20 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทมีโคโลนี กลมสีชมพู ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว โค้งนูน โคโลนีส่วนใหญ่ทึบแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว ตัวเซลล์รูปร่างท่อนติดสีแกรมลบ ภายในเซลล์มี poly-β-hydroxybutyrate ผลการทดสอบทางชีวเคมี ทุกไอโซเลทให้ผล catalase เป็นบวก ส่วนใหญ่ให้ผลการใช้ citrate, urease และ oxidase เป็นบวก แต่ให้ผล amylase เป็นลบ ทุกไอโซเลทสามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหาร ammonium mineral salt (AMS) agar ผสมเมทานอล อาหาร glycerol peptone agar (GPA) และอาหาร tryptic soy agar (TSA) แต่จะมีลักษณะแตกต่างกันไป จากการศึกษาลักษณะของไอโซเลทที่แยกได้จัดอยู่ในสกุล *Methylobacterium*

Knief, Frances และ Vorholt (2010) ศึกษาการแพร่กระจายของ *Methylobacterium* บนพืชตัวอย่างคือ *Arabidopsis thaliana* โดยการแยก *Methylobacterium* จากสถานที่ปลูก *Arabidopsis thaliana* ที่ต่างกัน 5 ที่นำมาจัดกลุ่มโดย automated ribosomal internal spacer analysis (ARISA) และหาลำดับของ 16S rRNA เปรียบเทียบกับข้อมูลการทำ ARISA จากตัวอย่างพืชโดยตรง เพื่อยืนยันผลการแยกเชื้อที่ได้มาจากพืชที่ใช้ในการศึกษา พบว่าในการเจริญของ *Methylobacterium* บนพืชมีความสัมพันธ์กับการวิวัฒนาการซึ่งมีผลต่อลักษณะทางสรีรวิทยาที่เป็น

ปัจจัยสำคัญต่อการเจริญบนพืช มากกว่าสภาพภูมิศาสตร์ หรือชนิดของพืช นอกจากนี้ Knief และ คณะ (2010) ยังได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อโครงสร้างชุมชน (community composition) และขนาดประชากรของ *Methylobacterium* บนต้น *Arabidopsis thaliana* หรือ *Medicago truncatula* และพืชอื่นที่อยู่ในบริเวณจากหลากหลายสถานที่ปลูกเป็นระยะเวลา 2 ปีติดต่อกัน โดยใช้ automated ribosomal internal spacer analysis (ARISA) พบว่าโครงสร้างชุมชนและขนาดประชากรของ *Methylobacterium* ที่ตรวจพบบน *A. thaliana* และพืชอื่นในบริเวณเดียวกันจะคล้ายกัน แต่จะมีความแตกต่างกันเมื่ออยู่คนละพื้นที่ แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างชุมชนและขนาดประชากรของ *Methylobacterium* ขึ้นกับพื้นที่มากกว่าชนิดของพืช

Podolich และ คณะ (2010) ได้ตรวจหา PPFMs สายพันธุ์ใหม่คือ *M. radiotolerans* IMBG290 ที่แยกได้หลังจากการทดลองปลูกต้นมันฝรั่งพร้อมกับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* IMBG163 โดยใช้วิธี in situ hybridization method (ISH/FISH) โดยพบตามใบและลำต้น แต่ไม่พบที่ราก และในต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้ปลูกพร้อมกับ *M. radiotolerans* IMBG290 มีปริมาณ *M. radiotolerans* IMBG290 น้อยกว่าต้นมันฝรั่งที่ปลูกพร้อมกับเชื้อ

จากรายงานการศึกษาเกี่ยว *Methylobacterium* ในพืชชนิดต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น ยังไม่พบว่ามีรายงานที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียกลุ่ม PPFM ในพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

พืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

หญ้าปักกิ่งหรือหญ้าเทวดามีชื่อเป็นภาษาจีนว่า เล่งจือเฉ้า เป็นสมุนไพรมาจากประเทศจีนเมื่อประมาณ 30 ปีมาแล้วและปัจจุบันก็ยังคงนิยมใช้อยู่อย่างแพร่หลาย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Murdannia loriformis* (Hassk) Rolla Rao et Kammathy อยู่ในวงศ์ Commelinaceae เป็นไม้ล้มลุก สูงประมาณ 7-10 เซนติเมตร และอาจสูงได้ถึง 20 เซนติเมตร ใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว ความยาวไม่เกิน 10 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด รวมกันเป็นกระจุกแน่น กลีบดอกมีสีฟ้าปนม่วง ใบประดับกลม ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร ร่วงง่าย เป็นพืชที่ชอบดินร่วนหรือดินปนทราย งอกงามในที่มีแดดรำไร ไม่ต้องการน้ำมาก เพาะปลูกโดยการเพาะชำหรือเพาะเมล็ดปลูกได้ง่ายอาจปลูกแบบพืชคลุมดินใต้ต้นไม้ใหญ่ ปลูกในกระบะหรือกระถาง เป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายและไม่จำเป็นต้องมีเนื้อที่มาก มีสรรพคุณรักษาโรคระบบทางเดินหายใจและกำจัดพิษ จัดเป็นยาเย็นชนิดหนึ่งสำหรับในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2513 ผู้ป่วยโรคมะเร็งที่รับประทานหญ้าปักกิ่งบางรายสามารถยืดชีวิตต่อไปได้ระยะหนึ่ง บางรายใช้ร่วมกับเคมีบำบัดหรือรังสีบำบัดเพื่อลดผลข้างเคียงจากการรักษา (ปัทมา, 2548)

น้ำคั้นสดจากหญ้าปักกิ่ง มีสารอกฤทธิ์ที่สำคัญคือ กลัยโคสฟิงโคไลปิดส์ (Glycosphingolipid) มีชื่อทางเคมีว่า 1-μ-O-D-glycopyranosyl-2-(2'-hydroxy-6'-ene-cosamide)-sphingosine (G1b)

นอกจากนั้น ยังพบสารกลุ่มต่างๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน กลัยโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ และอะกลัยโคน มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งปานกลางต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและลำไส้ใหญ่โดยมีค่า ED_{50}<16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลทางพยาธิวิทยาพบว่าสามารถลดความรุนแรงของการแพร่กระจายของมะเร็งในหนูได้ จึงคาดว่าสารสกัดดังกล่าวอาจใช้ป้องกันการเกิดมะเร็งได้ และมีผลปรับระบบภูมิคุ้มกัน (Jiratchariyakul *et al.*, 1997) สารสกัดหญ้าปักกิ่ง มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของยีนที่เกิดจากสารก่อกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ เช่น AFB1 (Intiyot *et al.*, 2002) มีฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ DT-diaphorase ซึ่งมีบทบาททำลายสารพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (Vinitketkumnuen, *et al.*, 1999)

ปัจจุบันองค์การเภสัชกรรม ได้นำเอาหญ้าปักกิ่งมาพัฒนาเป็นยาเม็ด โดยยาทุก 2 เม็ด มีคุณค่าเท่ากับต้นหญ้าปักกิ่ง จำนวน 3 ต้น โดยกำหนดขนาดรับประทาน ครั้งละ 1-2 เม็ด วันละ 2 ครั้ง ตามน้ำหนักตัวของผู้ป่วย โดยมีระยะเวลาการรับประทานขึ้นอยู่กับจุดประสงค์การใช้ยาดังนี้ (ผ่องพรรณ, มปป) คือ

1. ใช้เพื่อลดผลข้างเคียงจากรังสีบำบัดหรือยาเคมีบำบัดผู้ป่วยมะเร็ง โดยจะรับประทาน 7 วัน และหยุด 4 วัน
2. ใช้เพื่อป้องกันการแพร่กระจายและการกลับเป็นซ้ำอีก หลังจากการรักษาแล้ว โดยรับประทาน 7 วัน และหยุด 4 วัน เช่นนี้ติดต่อกันประมาณ 1 ปี และตรวจมะเร็งปีละ 2 ครั้ง
3. ใช้เพื่อสร้างเสริมภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็ง โดยรับประทาน 7 วัน และหยุด 4 วัน เช่นนี้ติดต่อกันเป็นเวลานานไม่เกิน 6-8 สัปดาห์ โดยใช้เฉพาะช่วงที่มีภูมิคุ้มกันต่ำเช่น ขณะติดเชื้อไวรัส

แบคทีเรียกลุ่ม PPFMs กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช)plant tissue culture) เป็นวิธีหนึ่งทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืช เช่น การผลิตพืชปลอดโรค การปรับปรุงพันธุ์พืช การเก็บรักษาสายพันธุ์พืช การผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช และการศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ของพืช รวมไปถึงการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็วเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาด โดยการนำเอาส่วนหนึ่งส่วนใดของพืช เช่น อวัยวะ (organ) เนื้อเยื่อ (tissue) เซลล์ (cell) หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (protoplast) ของพืช มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (synthetic media) ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) และสภาพแวดล้อมควบคุม (Neumann, Kumar และ Imani, 2009)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่ง โดยเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งมีผลต่อต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ การแบ่งเซลล์ และการขยายขนาดเซลล์ เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดแคลลัส (callus) และพัฒนาเป็น

ต้นพืชที่สมบูรณ์ เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน จิบเบอเรลลิน (gibberellin) และสารชะลอการเจริญเติบโต หากระดับของไซโตไคนินสูงกว่าระดับออกซินจะมีส่วนสำคัญในการชักนำให้เกิดต้น หากระดับออกซินสูงกว่าระดับไซโตไคนินจะมีผลในการชักนำให้เกิดราก (ส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช, มปป) นอกจากนี้ยังต้องเพาะเลี้ยงในสภาพที่ปลอดเชื้อ เพราะองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของทั้งพืชและจุลินทรีย์ การเปื้อนปนของจุลินทรีย์ลงในอาหารทำให้เกิดผลเสียต่อการเจริญเติบโตและรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชเนื่องจาก จุลินทรีย์เจริญเร็วกว่าอาจเจริญปกคลุมพืช และแย่งอาหารจากพืชอาจปลดปล่อยสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อพืช ซึ่งพืชขาดระบบภูมิคุ้มกันที่ใช้ทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อน (ภาควิชาพืชสวน, มปป)

อย่างไรก็ตาม ก็มีแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดที่เป็นประโยชน์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชและสามารถสร้างสารควบคุมการเจริญซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตพืช เช่น ได้มีการนำ IAA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่พบมากในผักเป็ดไทย (*Alternanthera sessilis*) ในอาหาร Czapex medium ที่เติม tryptophan พบว่าสามารถชักนำให้ผักเป็ดไทยเกิดแคลลัสได้ (Subbarayan, Varadharajan and Kalyanaraman, 2010)

Ali และ Hasnain (2007) ใช้ของเหลว (supernatant) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรีย *Halomonas* sp. RE1 และ *Halomonas* sp. HT1 ที่มีความเข้มข้นของ IAA เท่ากับ 21 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาผสมกับอาหาร Murashige and Skoog (MS) medium และน้ำมะพร้าวความเข้มข้นร้อยละ 10 (10%CW) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกระหล่ำ (*Brassica oleracea* L.) สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ ซึ่งสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับการใช้ฮอร์โมนพืชสังเคราะห์

สำหรับกลุ่มของแบคทีเรีย PPFMs ที่อาศัยร่วมกับใบพืชหลายชนิด และมีความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืชออกซินและนำมาใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น ได้มีการศึกษาโดย Kalyaeva และคณะ (2003) ศึกษา PPFMs ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของข้าวสาลีพันธุ์เบา (*Triticum aestivum*) โดยทำการเพาะ *Methylobacterium* sp. D10 ลงบนเอ็มบริโอที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (immature embryos) พบว่ามีการกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแคลลัส มีการเกิดยอด เกิดใบสีเขียว และมีพัฒนาการของรากเกิดขึ้น

Devi, Sundaram และ Poorniammal (2010) ซึ่งได้ทดลองเพาะแบคทีเรีย PPFMs กับแคลลัสของต้นข้าว พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของแคลลัสได้อย่างรวดเร็ว เพิ่มความสามารถในการสร้างแคลลัสใหม่ ปริมาณคลอโรฟิลล์และโปรตีนละลายได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวควบคุม

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวการประยุกต์ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย PPFMs ซึ่งแยกได้จากพืชชนิดต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น ยังไม่พบว่ามีรายงานที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์แบคทีเรียกลุ่ม PPFM ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs สกุล *Methylobacterium*) Omer *et al.*, 2004)

ใช้ลูปเขี่ยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่เก็บเป็น working stock บนอาหารวุ้นผิวเอียง glycerol-peptone (GP) agar มา 1 ลูปใส่ในอาหารเหลว low nutrient medium (LNM) ปริมาณ 12 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 x 125 มิลลิเมตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา ปรับความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้มีค่าประมาณ 0.5 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter)

1.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เพื่อศึกษาการสร้างฮอร์โมนพืชออกซินชนิด IAA (Glickmann and Dessaux, 1995; Omer *et al.*, 2004; Mandal et al., 2007)

1.2.1 ดูดกล้าเชื้อมาปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว LNM ที่เติมและไม่เติม L-tryptophan 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

1.2.2 เก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตรในวันที่ 0 และ 10 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไปวัดปริมาณของ IAA ส่วนตะกอนเซลล์นำไปละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปวัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

1.2.3 ดูด supernatant ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับ Salkowski's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง ที่

อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณ indole-3-acetic acid (IAA) เทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA

1.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เพื่อศึกษาการสร้างฮอร์โมนพืชไซโตไคนิน (Tien, Gaskins and Hubbell, 1979; Hussain and Hasnain, 2009)

1.3.1 ดูดกล้าเชื้อมาปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว LNM ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

1.3.2 เมื่อครบกำหนดเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บ supernatant มาปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ก่อนนำไปลดปริมาตรของ supernatant ด้วยการระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ ที่ความดัน 72 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้มีปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร

1.3.3 จากนั้นนำไปสกัดด้วยบิวทานอล (butanol) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เทใส่กรวยแยกตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นระหว่าง supernatant และบิวทานอล เก็บชั้นของบิวทานอลไว้ส่วน supernatant ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนของบิวทานอลไประเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ ที่ความดัน 25 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนแห้งและใช้เมทานอลเกรด HPLC ปริมาตร 5 มิลลิลิตรไปละลายออกมา

1.3.4 นำสารละลายเมทานอลที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของไซโตไคนินเทียบกับกราฟมาตรฐาน zeatin

1.3.5 จำแนกชนิดของไซโตไคนินโดยใช้เทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC) โดยนำกระดาษ TLC มาจุดสารละลายตัวอย่างลงไปจุดละ 20 ไมโครลิตร นำไปใส่ลงในโถตัวทำละลายที่ผสมกันระหว่างบิวทานอล กรดอะซิติก และน้ำ ในอัตราส่วน 12:3:5 ในการตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ทำได้โดยนำไปส่องดูภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร วัดระยะทางที่สารตัวอย่างและตัวทำละลายเคลื่อนที่มาคำนวณหาค่า Rf เทียบกับสารมาตรฐาน zaetin, zeatin riboside และ kinetin

2. การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งโดยวิธีชักนำการเกิดแคลลัส

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่ง (Li, Bruneau and Qu, 2006)

2.1.1 นำส่วนไหล (stolon) ของหญ้าปักกิ่ง มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่บริเวณพื้นผิวด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง

2.1.2 ทำการตัดส่วนของยอดอ่อน (young shoot) ใบอ่อน (young leaf) กาบใบอ่อน (young leaf sheath) ข้อ (nodal segment) และราก (root) ให้เป็นแผ่นขนาดประมาณ 0.2 – 0.3 เซนติเมตร

2.1.3 นำชิ้นส่วนของหญ้าปักกิ่งไปวางบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Murashige and Skoog medium หรือ MS(1962) medium ที่เติมซูโครส (sucrose) 30 กรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล (phytagel) 3.2 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตซนิด 2,4-dichlorophenoxyacetic acetic (2,4-D) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.1.4 เมื่อครบกำหนดเวลาย้ายชิ้นส่วนของพืชไปลงในอาหาร MS(1962) medium ที่เติม 2,4-D ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดไคเนติน (kinetin) 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตการเจริญของแคลลัส เป็นเวลาประมาณ 2 อาทิตย์ คำนวณร้อยละของการรอดชีวิต ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

2.1.5 เมื่อครบ 8 สัปดาห์ย้ายแคลลัสไปลงในอาหาร MS(1962) medium ที่เติม 2,4-D 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้มข้น 140 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ สังเกตการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแคลลัส บันทึกน้ำหนักสด นับจำนวนยอดและรากที่เกิดขึ้น

2.2 ผลของปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Methylobacterium* ต่อการชักนำการเกิดแคลลัส (Kalyaeva et al., 2003; Subbarayan, et al., 2010)

2.2.1 นำชิ้นส่วนใบหญ้าปักกิ่งจากข้อ 2.1.2 จำนวน 20 ชิ้นวางบนจานอาหารที่มีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ คือ

- MS(1962) medium ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

- MS(1962) medium ที่ผสมกับ supernatant ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* ที่ผ่านการเลี้ยงตามข้อ 1.3.1 ปริมาตร 50, 100, 150 และ 200 ไมโครลิตร (Ali and Hasnain, 2007)

2.2.2 นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้มข้น 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการเจริญของแคลลัสเป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ คำนวณร้อยละของการรอดชีวิต ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

2.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Methylobacterium* ต่อการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส (Ali and Hasnain, 2007)

2.3.1 นำแคลลัสที่ได้จากข้อ 2.1.2 ที่เพาะบนจานอาหาร MS(1962) medium ที่ผสมฮอร์โมนพืช นำไปวางบนจานอาหารที่มีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ คือ

- MS(1962) medium ที่เติม supernatant ระดับปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.2
- MS(1962) medium ที่เติม supernatant ระดับปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.2 และน้ำมะพร้าวความเข้มข้นร้อยละ โดยปริมาตร 10
- MS(1962) medium ที่เติม 2,4-D 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
- MS medium ที่เติม 2,4-D 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าวความเข้มข้นร้อยละ โดยปริมาตร 10
- MS(1962) medium ที่เติมไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- MS(1962) medium ที่เติมไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าวความเข้มข้นร้อยละ โดยปริมาตร 10
- MS(1962) medium ที่เติมอาหาร LNM
- MS(1962) medium ที่เติมอาหาร LNM และน้ำมะพร้าวความเข้มข้นร้อยละ โดย 10 ปริมาตร
- MS(1962) medium ที่เติมน้ำมะพร้าวความเข้มข้นร้อยละ โดยปริมาตร 10
- MS(1962) medium เพียงอย่างเดียว

2.3.2 นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้มข้น 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแคลลัส บันทึกน้ำหนักสด นับจำนวนยอดและรากที่เกิดขึ้น

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของข้อมูลผลการทดลองที่ได้ โดยนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics รุ่น 19.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Least Significant Difference (LSD)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การศึกษาสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดออกซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่แยกจากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

เมื่อนำ supernatant จากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง จำนวน 34ไอโซเลท ไปหาปริมาณสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด indole-3-acetic acid (IAA) ตามวิธีของ salkowski เทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA พบว่า แบคทีเรียทั้ง 34 ไอโซเลท สามารถสร้างปริมาณ IAA ได้แตกต่างกัน โดยไอโซเลท ED5-9 สามารถสร้าง IAA ได้ในปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 3.472 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ปริมาณ IAA ที่วัดได้จากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

Isolates	ปริมาณ IAA (µg/ml)	Isolates	ปริมาณ IAA (µg/ml)
	no L-tryptophan 0.2 mg/ml		เติม L-tryptophan 0.2 mg/ml
ED5-9	3.472 a	ED2-8	2.569 a
ED4-4	2.639 b	ED2-10	2.500 ab
ED3-1	2.569 bc	ED2-3	2.326 abc
ED1-10	2.569 bc	ED2-6	2.326 abc
ED3-5	2.500 bcd	ED1-9	2.257 abcd
ED5-6	2.500 bcd	ED5-9	2.257 abcd
ED3-2	2.465 bcd	ED2-12	2.188 abcde
ED1-9	2.396 bcde	ED1-10	2.083 abcdef
ED2-6	2.361 bcdef	ED3-1	2.083 abcdef
ED2-8	2.361 bcdef	ED4-4	2.049 abcdef

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0. 05

ตาราง 3 (ต่อ)

Isolates	ปริมาณ IAA (µg/ml)	Isolates	ปริมาณ IAA (µg/ml)
	no L-tryptophan 0.2 mg/ml		เติม L-tryptophan 0.2 mg/ml
ED3-9	2.222 bcdefg	ED4-5	1.979 bcdefg
ED2-11	2.188 bcdefg	ED5-2	1.910 cdefg
ED4-5	2.153 cdefg	ED1-5	1.875 cdefg
ED2-3	2.118 cdefgh	ED2-11	1.701 defgh
ED3-7	2.083 defgh	ED1-2	1.667 efghi
ED1-2	2.049 defghi	ED2-5	1.597 fghi
ED2-5	1.979 efghij	ED5-6	1.528 fghij
ED5-2	1.979 efghij	ED3-9	1.493 ghij
ED5-12	1.910 fghijk	ED3-5	1.458 ghijk
ED2-12	1.875 ghijk	ED3-7	1.215 hijkl
ED2-4	1.875 ghijk	ED5-12	1.181 hijklm
ED5-5	1.840 ghijk	ED3-2	1.146 ijklm
ED2-10	1.667 hijkl	ED2-4	1.042 jklmn
ED1-5	1.597 ijkl	ED2-1	1.007 jklmn
ED1-4	1.563 jkl	ED3-4	0.938 klmn
ED4-3	1.563 jkl	ED3-6	0.938 klmn
ED2-1	1.528 jkl	ED5-5	0.938 klmn
ED3-4	1.458 klm	ED4-3	0.833 lmn
ED4-1	1.389 lm	ED3-8	0.694 lmn
ED3-3	1.319 lmn	ED4-1	0.694 lmn
ED3-6	1.285 lmn	ED2-9	0.694 lmn
ED3-8	1.250 lmn	ED1-4	0.625 mn
ED2-9	1.076 mn	ED3-3	0.625 mn
ED5-3	0.938 n	ED5-3	0.556 n

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0. 05

แต่เนื่องจากต้องนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้และเป็นการลดการใช้สารเคมี ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่เจริญในอาหารเหลว LNM ที่ไม่เติม L-tryptophan 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่สามารถสร้าง IAA ได้มากกว่า 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 18 ไอโซเลท ที่ถูกนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดไซโตไคนินต่อไป

2. การศึกษาสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดไซโตไคนินที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกจากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

เมื่อนำ Endophytic PPFMs ที่สามารถสร้างสารประกอบช่วบส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดออกซินได้มากกว่า 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาศึกษาหาปริมาณสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดไซโตไคนิน โดยนำ supernatant ที่ได้จากการสกัดด้วย butanol ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณไซโคไคนินเบื้องต้น เทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน kinetine ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของไซโคไคนิน พบว่ามีไซโตไคนินในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 4 และไม่พบปริมาณไซโตไคนินจากไอโซเลท ED5-9 ซึ่งเป็นไอโซเลทสามารถสร้าง IAA ได้ในปริมาณสูงที่สุด

ตาราง 4 ปริมาณไซโตไคนินที่วัดได้จากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่ได้คัดเลือก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

Isolates	ปริมาณไซโตไคนิน (µg/ml)	Isolates	ปริมาณไซโตไคนิน (µg/ml)
ED5-6	$1.22^{a} \pm 0.65$	ED3-9	$0.82^{ab} \pm 0.23$
ED4-5	$1.21^{a} \pm 0.62$	ED2-5	$0.76^{ab} \pm 0.16$
ED3-7	$1.18^{a} \pm 0.72$	ED2-6	$0.66^{ab} \pm 0.75$
ED1-2	$1.06^{ab} \pm 0.45$	ED3-2	$0.63^{ab} \pm 0.28$
ED3-5	$1.03^{ab} \pm 0.70$	ED2-3	$0.57^{ab} \pm 0.80$
ED2-11	$1.03^{ab} \pm 0.42$	ED5-9	$0.54^{ab} \pm 0.93$
ED4-4	$1.00^{ab} \pm 0.55$	ED3-1	$0.54^{ab} \pm 0.50$
ED1-9	$0.96^{ab} \pm 0.58$	ED1-10	$0.46^{ab} \pm 0.44$
ED5-2	$0.90^{ab} \pm 0.41$	ED2-8	$0.14^{b} \pm 0.58$

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0. 05

เมื่อนำสารสกัดตัวอย่างจากน้ำหมักของแบคทีเรีย PPFMs ทั้ง 18 ไอโซเลทที่มีปริมาณของไซโตไคนินไปจำแนกชนิดของสารโดยใช้เทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC) โดยวัดระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่และตัวทำละลายเคลื่อนที่ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร เพื่อนำมาคำนวณหาค่า Rf เทียบกับสารมาตรฐาน kinetine, zeatin และ zeatin riboside พบว่า มีค่า Rf ที่ 0.6 ซึ่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ ดังแสดงในตาราง 5

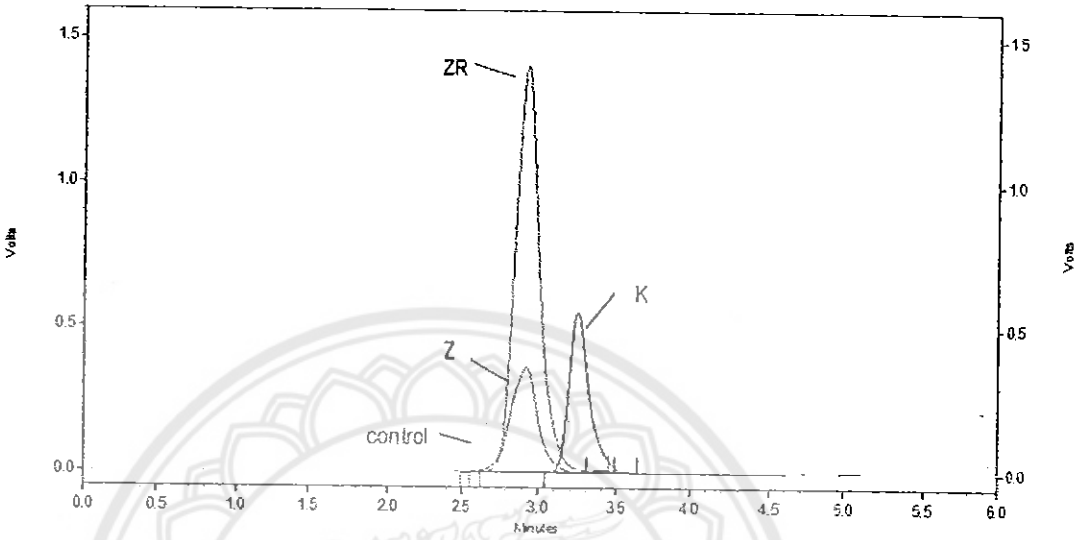
18 ส.ค. 2559

สำนักหอสมุด

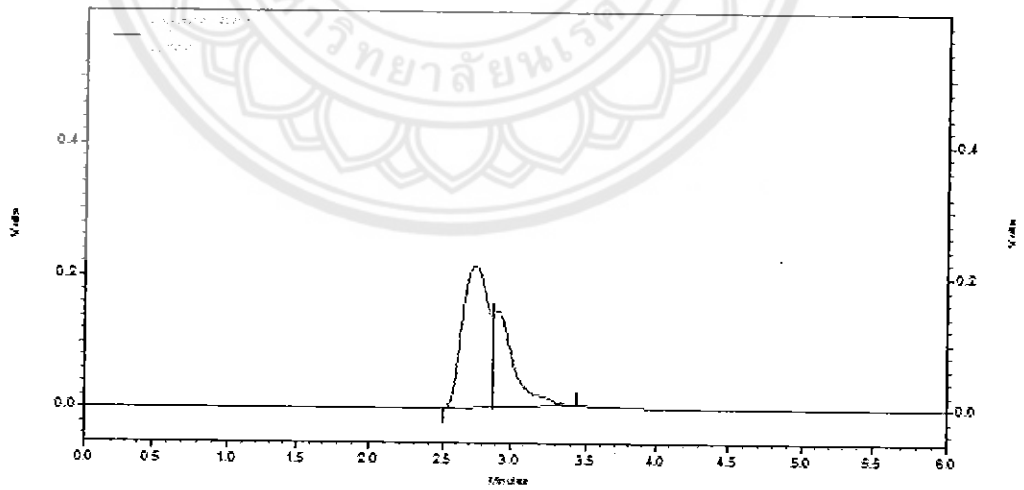
ตาราง 5 ค่า Rf ของสารสกัดจากน้ำหมักของแบคทีเรีย Endophytic PPFMs ที่ได้คัดเลือก เทียบกับสารมาตรฐาน zeatin, zeatin riboside และ kinetine

No.	Sample	ค่า Rf ที่พบ			
	Std. kinetine	-	-	-	0.7
	Std. zeatin	-	-	-	0.8
	Std. zeatin riboside	-	-	-	0.7
1	ED1-2	0.3	0.4	0.6	-
2	ED1-9	0.3	0.4	0.6	-
3	ED1-10	0.3	0.4	0.6	-
4	ED2-3	0.3	0.4	0.6	-
5	ED3-1	0.3	0.4	0.6	-
6	ED2-5	0.3	0.4	0.6	-
7	ED2-6	0.3	0.4	0.6	-
8	ED3-2	0.3	0.4	0.6	-
9	ED2-8	-	0.4	0.6	-
10	ED2-11	-	0.4	0.6	-
11	ED3-5	-	0.4	0.6	-
12	ED3-9	-	0.4	0.6	-
13	ED3-7	0.3	0.4	0.6	-
14	ED4-4	0.3	0.4	0.6	-
15	ED4-5	0.3	0.4	0.6	-
16	ED5-2	0.3	0.4	0.6	-
17	ED5-6	0.2	0.3	0.4	0.6
18	ED5-9	0.2	0.3	0.4	0.6

จากนั้นเมื่อนำสารสกัดตัวอย่างจากน้ำหมักของแบคทีเรีย Endophytic PPFMs จำนวนทั้ง 18 ไอโซเลท ไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไซโตไคนินเพื่อตรวจวิเคราะห์อีกครั้งโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C-18 และใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 มีอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน kinetine, zeatin, zeatin riboside และอาหารเลี้ยงเชื้อ LNM ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 10 µg/ml พบว่าสารมาตรฐาน kinetine มีสัญญาณพีคขึ้นที่เวลา (retention time) ประมาณ 3.235 นาที ส่วน zeatin และ zeatin riboside จะมีสัญญาณพีคที่เวลาเดียวกัน คือประมาณ 2.921 นาที จึงทำให้ไม่สามารถแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันได้ ดังแสดงในภาพ 1 โดย kinetine ที่ระดับความเข้มข้น 50µ g/ml มีความสูงของพีค เท่ากับ 556397 และมีพื้นที่ใต้พีค 5122311 สำหรับ zeatin ที่ระดับความเข้มข้น 50µ g/ml มีความสูงของพีค 363427 และมีพื้นที่ใต้พีค 4307944 และ zeatin riboside ที่ระดับความเข้มข้น 50 µg/ml มีความสูงของพีค 1406057 และมีพื้นที่พีค 14689226 สำหรับผลของสารสกัดจากตัวอย่างน้ำหมักของแบคทีเรีย จำนวนทั้ง 18 ไอโซเลทนั้น จะพบแต่สัญญาณพีคที่เป็นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ LNM ยกเว้นของสารสกัดตัวอย่างจากไอโซเลท ED3-7 จะมีสัญญาณพีคขึ้นที่เวลาประมาณ 2.914 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับเวลาของ zeatin และ zeatin riboside ดังแสดงในภาพ 2 โดยมีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 1436331 เมื่อเทียบกับของสารมาตรฐาน zeatin และ zeatin riboside จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 16.67 และ 4.889 µg/ml ตามลำดับ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น zeatin หรือ zeatin riboside



ภาพ 1 กราฟสารมาตรฐาน kinetine (K), zeatin (Z), zeatin riboside (ZR) และ อาหารเลี้ยงเชื้อ LMN (control)



ภาพ 2 กราฟสารสกัดตัวอย่างไอโซเลท ED3-7

3. การศึกษาผลของปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Methylobacterium* ต่อการชักนำการเกิดแคลลัส

3. 1 การเตรียมเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่งที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดลอง

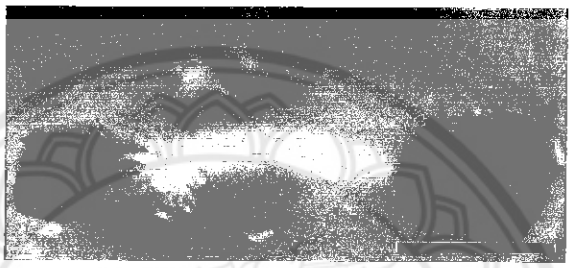
จากทดลองทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดของหญ้าปักกิ่งด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ชิ้นส่วนปลอดจากการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อราและแบคทีเรีย ร้อยละ 70 แต่สำหรับชิ้นที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนสามารถพัฒนาแตกยอดใหม่ได้ เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ มีลักษณะการเจริญเติบโตดังแสดงในภาพ 3 และเมื่อนำชิ้นส่วนยอดใหม่ไปทำการขยายเพิ่มจำนวนยอดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ มีลักษณะการเจริญเติบโตดังแสดงในภาพ 4

ภาพ 3 การเกิดยอดใหม่ของหญ้าปักกิ่งที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)

ภาพ 4 ชิ้นส่วนใบสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัสของยอดหญ้าปักกิ่ง หลังจากที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)

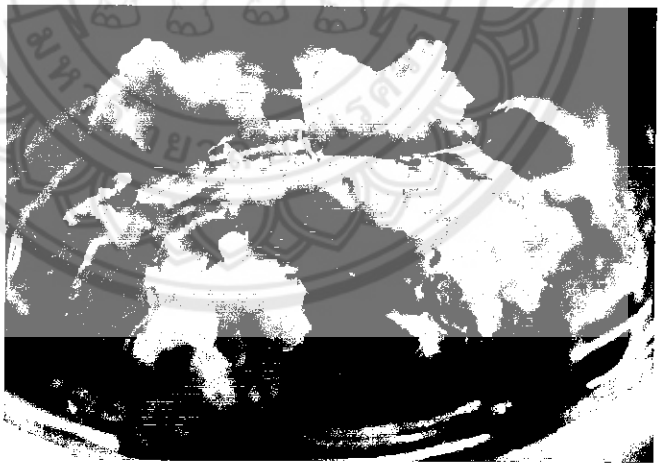
จากนั้นนำชิ้นส่วนใบของหญ้าปักกิ่งไปชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเลี้ยงบนอาหารบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ไม่มีแสง เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีลักษณะการเจริญเติบโตดังแสดงในภาพ 5ก และมีชิ้นส่วนของใบที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ พบว่า เนื้อเยื่อเกิดเป็นอาการสีน้ำตาล (browning) (ภาพ 5ข) และทำการขยายเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสสำหรับงานทดลอง โดยนำก้อนแคลลัสที่ได้เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีลักษณะการเจริญเติบโตดังแสดงในภาพ 6

(ก)



(ข)

ภาพ 5 แคลลัสที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนใบของหญ้าปักกิ่งที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร (ก) และ เกิดสีน้ำตาลบนชิ้นส่วน (ข) เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)



ภาพ 6 แคลลัสที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนใบของหญ้าปักกิ่งที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับไคเนติน ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)

3.2 ผลของปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Methylobacterium* ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงแคลลัสได้ 2 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน มีร้อยละของการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน อยู่ในช่วงร้อยละ 50 - 100 ดังตาราง 6 นอกจากนี้ยังไม่พบการเกิดปนเปื้อนแบคทีเรียบนชิ้นส่วนแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนอาหารบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำหมักที่ปลอดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีลักษณะการเจริญเติบโตดังแสดงในภาพ 7ก สำหรับชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน มีร้อยละของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วงร้อยละ 25 - 50 และพบแบคทีเรียที่สีชมพูจากชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักในปริมาตร 200 ไมโครลิตร/ลิตร โดยมีทั้งชิ้นส่วนแคลลัสที่สามารถรอดชีวิตและเริ่มเกิดอาการสีน้ำตาลบนชิ้นส่วน)ภาพ 7ข (โดยชิ้นส่วนแคลลัสที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงต่อไปจะมีอาการสีน้ำตาลบนชิ้นส่วน หลังจากเนื้อเยื่อตาย ดังภาพ 8

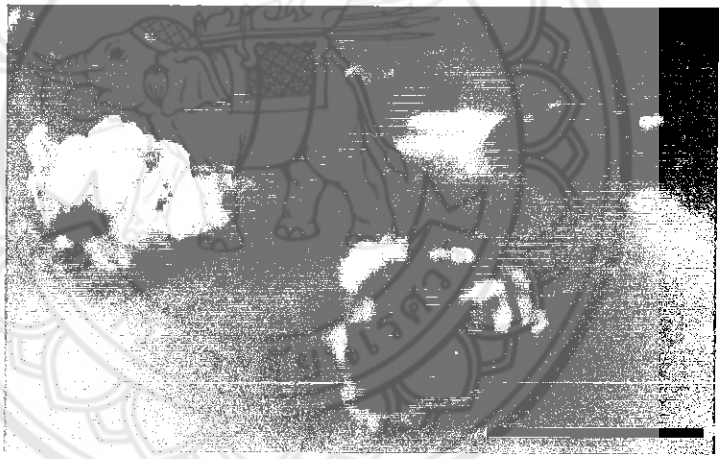
ตาราง 6 ร้อยละการรอดชีวิตและการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์

สิ่งทดลอง	ร้อยละการรอดชีวิตของแคลลัส	ร้อยละของการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย
MS (1962) + 1 มิลลิกรัม/ลิตร 2,4-D	100	-
MS (1962) + 50 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	70	30
MS (1962) + 100 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	50	50
MS (1962) + 150 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	60	40
MS (1962) + 200 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	75	25

หมายเหตุ น้ำหมักที่ทำการศึกษามี IAA ความเข้มข้น 3. 36มิลลิกรัมต่อลิตร, - = ไม่เกิดการปนเปื้อน

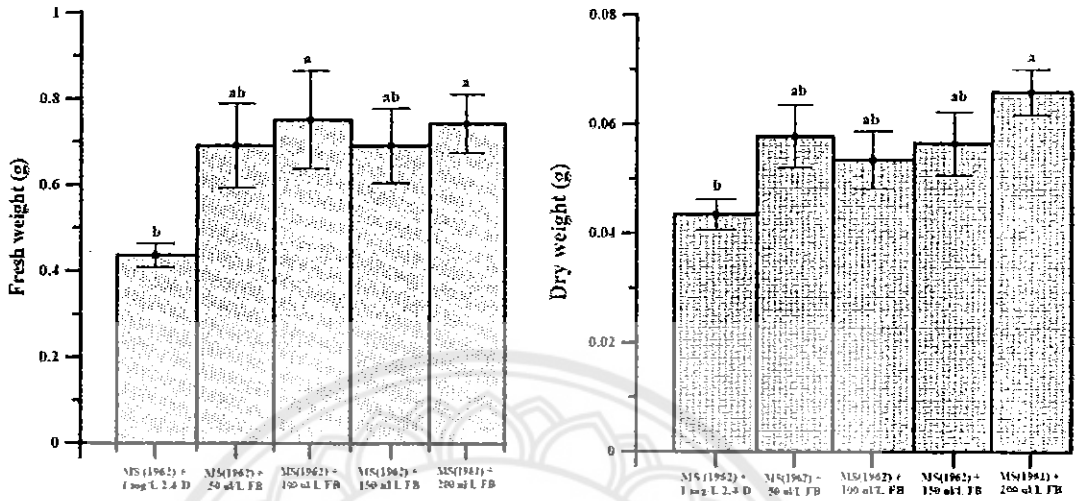
(ก) (ข)

ภาพ 7 ชิ้นส่วนแคลลัสของหญ้าปักกิ่งที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม น้ำหมักในปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อลิตร โดยแคลลัสที่ไม่เกิดการปนเปื้อน (ก) และ เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย (ข) เมื่อเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)



ภาพ 8 การเกิดสีน้ำตาล (browning) บนชิ้นส่วนแคลลัสของหญ้าปักกิ่ง และการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)

สำหรับน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารในแต่ละกรรมวิธี มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักในปริมาตร 50, 100 และ 200 ไมโครลิตร/ลิตร มีน้ำหนักสดมากที่สุด) ภาพ 9ก (ส่วนน้ำหนักแห้งมีมากที่สุดเมื่อเลี้ยงอาหารสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักในปริมาตรต่างๆ ดังภาพ 9ข



(ก) (ข)

ภาพ 9 น้ำหนักสด (ก) และ น้ำหนักแห้ง (ข) ของชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ (Error bar = ± SE)

การพัฒนาของส่วนของยอดใหม่ และรากที่เกิดจากชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารในแต่ละกรรมวิธี พบว่า ชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่เกิดยอดใหม่และราก ส่วนชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน มีการเกิดยอดใหม่และรากที่ไม่แตกต่างกัน ดังตาราง 7 และ 8 โดยมีลักษณะของยอดใหม่และรากที่เกิดขึ้นแสดงดังภาพ 10ก-จ

ตาราง 7 การพัฒนายอดใหม่ของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์

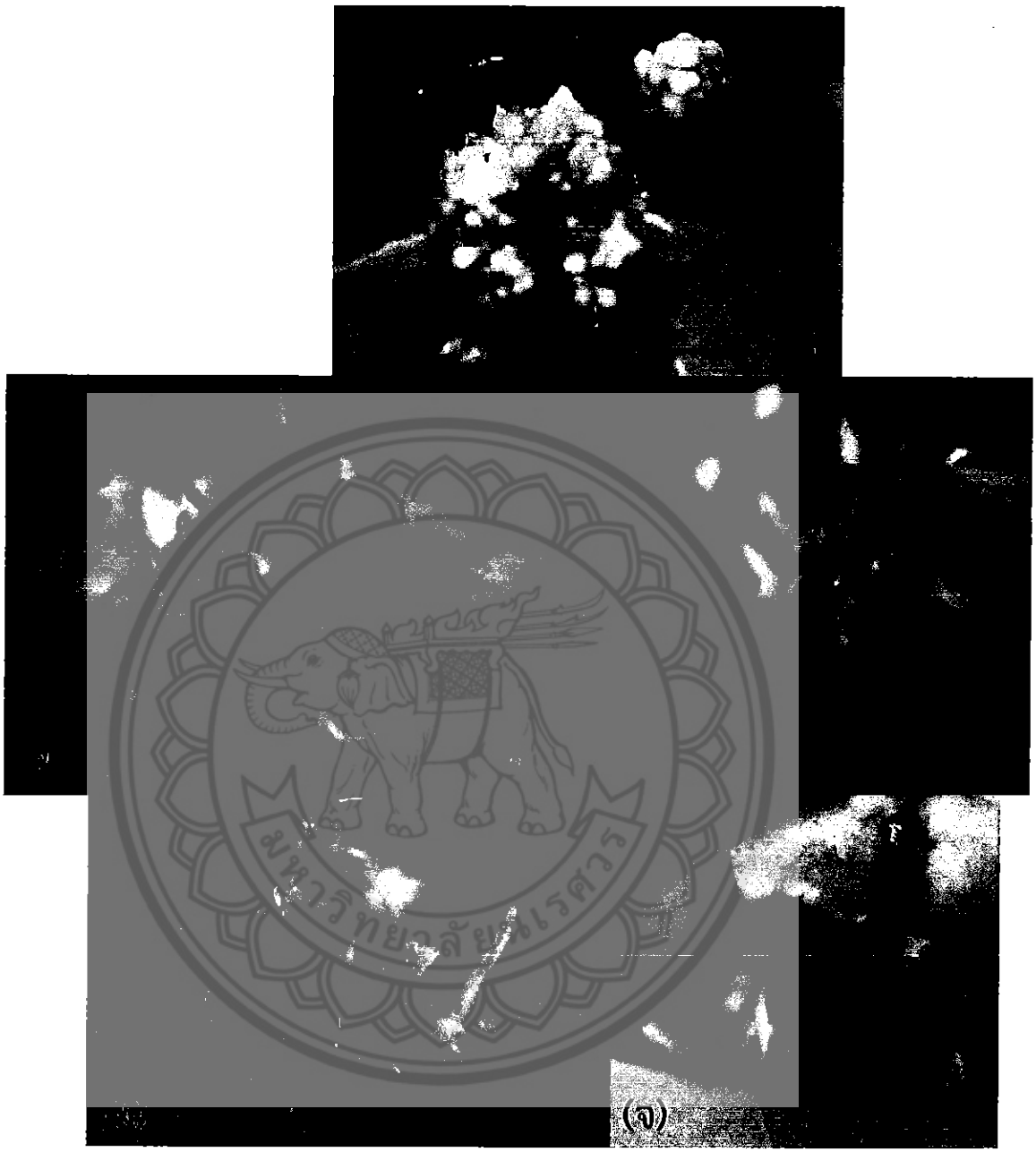
สิ่งทดลอง	ร้อยละของการเกิดยอดใหม่	จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วน	ความยาวของยอดใหม่ (ซม.)
MS (1962) + 1 มิลลิกรัม/ลิตร 2,4-D	-	-	-
MS (1962) + 50 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	42.90 ± 13.70	2.00 ± 0.37	0.58 ± 0.29
MS (1962) + 100 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	70.00 ± 15.30	1.86 ± 0.55	0.27 ± 0.13
MS (1962) + 150 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	41.70 ± 14.90	2.40 ± 0.87	0.38 ± 0.18
MS (1962) + 200 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	29.40 ± 11.40	2.40 ± 0.51	0.40 ± 0.15
$LSD_{0.05}$	ns	ns	ns

หมายเหตุ -= ไม่เกิด, ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, mean ±SE

ตาราง 8 การพัฒนารากของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์

สิ่งทดลอง	ร้อยละของการเกิดราก	จำนวนรากต่อชิ้นส่วน	ความยาวราก (ซม.)
MS (1962) + 1 มิลลิกรัม/ลิตร 2,4-D	-	-	-
MS (1962) + 50 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	92.86 ± 7.14	7.00 ± 1.70	1.12 ± 0.21
MS (1962) + 100 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	100.00 ± 0.00	8.33 ± 2.04	1.56 ± 0.26
MS (1962) + 150 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	100.00 ± 0.00	8.25 ± 1.13	1.46 ± 0.16
MS (1962) + 200 ไมโครลิตร/ลิตร น้ำหมัก	94.12 ± 5.88	8.56 ± 1.43	1.21 ± 0.14
$LSD_{0.05}$		ns	ns

หมายเหตุ -= ไม่เกิด, ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, mean ±SE



ภาพ 10 การพัฒนายอดใหม่และรากบนชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร (ก) เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตร 50 (ข), 100 (ค), 150 (ง) และ 200 (จ) ไมโครลิตร/ลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดออกซินและไซโตไคนินที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่แยกจากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

แบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง จำนวน 34 ไอโซเลท สามารถสร้างปริมาณ IAA ได้แตกต่างกัน โดยไอโซเลท ED5-9 สามารถสร้าง IAA ได้ในปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 3.472 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากต้องนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้และเป็นการลดการใช้สารเคมี ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ที่เจริญในอาหารเหลว LNM ที่ไม่เติม L-tryptophan 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่สามารถสร้าง IAA ได้มากกว่า 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 18 ไอโซเลท ที่ถูกนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดไซโตไคนิน พบว่า แต่ละไอโซเลทมีการสร้างไซโตไคนินในปริมาณที่แตกต่างกัน และไม่พบการสร้างไซโตไคนินจากไอโซเลท ED5-9

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งโดยวิธีชักนำการเกิดแคลลัสการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส

เมื่อนำมาศึกษาผลของปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ไอโซเลท ED5-9 ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า เมื่อเลี้ยงแคลลัสได้ 2 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน มีร้อยละของการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน อยู่ในช่วงร้อยละ 50 - 100 มีร้อยละของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วงร้อยละ 25 - 50 และพบแบคทีเรียที่สีชมพูจากชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักในปริมาตร 200 ไมโครลิตร/ลิตร โดยมีทั้งชิ้นส่วนแคลลัสที่สามารถรอดชีวิตและเริ่มเกิดอาการสีน้ำตาลบนชิ้นส่วน โดยชิ้นส่วนแคลลัสที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงต่อไปจะมีอาการสีน้ำตาลบนชิ้นส่วน หลังจากเนื้อเยื่อตาย สำหรับการพัฒนาของส่วนของยอดใหม่ และรากที่เกิดจากชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารในแต่ละกรรมวิธี พบว่า ชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่เกิดยอดใหม่และราก ส่วนชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำหมักในปริมาตรที่แตกต่างกัน มีการเกิดยอดใหม่และรากที่ไม่แตกต่างกัน

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดออกซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกจากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

ในการทดลองนี้แบคทีเรีย *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่งสามารถสังเคราะห์ IAA ได้โดยใช้ L-tryptophan เป็นสารตั้งต้น ความเข้มข้นของ IAA ที่สังเคราะห์ได้ในกลุ่ม epiphytes มีความเข้มข้นระหว่าง 0.521 – 2.396 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในกลุ่ม endophytes มีความเข้มข้นระหว่าง 0.556 – 2.569 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ในภาวะที่ไม่มี L-tryptophan โดย ในกลุ่ม epiphytes มีความเข้มข้นระหว่าง 0.625 – 2.431 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในกลุ่ม endophytes มีความเข้มข้นระหว่าง 0.938 – 3.472 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการสังเคราะห์ IAA ในภาวะที่ไม่มี L-tryptophan นอกจากแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้ากิ่งในการทดลองนี้แล้ว การศึกษาของ Ahmad, Ahmad และ Khan (2005) ในแบคทีเรีย *Azotobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่แยกได้จากบริเวณรากพืช สามารถสังเคราะห์ IAA ในภาวะที่ไม่มี L-tryptophan ได้เช่นเดียวกัน แต่เมื่อมีปริมาณของ L-tryptophan เพิ่มขึ้นความเข้มข้นของ IAA เพิ่มขึ้นตาม เหมือนกับในการทดลองของ Yasmin และคณะ (2009) ที่ศึกษาในกลุ่มแบคทีเรียรอบรากพืชที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ในทั้งภาวะที่มี L-tryptophan และไม่มี L-tryptophan ได้ โดยความเข้มข้นของ IAA ที่สังเคราะห์ได้อยู่ระหว่าง 4.97 – 46.66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 3.84 – 13.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งในการสังเคราะห์ IAA ในภาวะไม่มี L-tryptophan ของแบคทีเรีย Prinsen และ คณะ (1993) ได้ศึกษาเป็นครั้งแรกในแบคทีเรีย *Azospirillum brasilense* โดยความเข้มข้นของ IAA ทั้งหมดที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะสังเคราะห์ผ่านวิถี indole-3-acetamide ร้อยละ 0.1 วิถีของ tryptophan-dependent ร้อยละ 10 และ วิถี tryptophan-independent ร้อยละ 90 โดยวิถี tryptophan-independent ของการสังเคราะห์ IAA ในภาวะที่ไม่มีกรดอะมิโน L-tryptophan ได้มีการสันนิษฐานว่าเป็นวิถีที่แยกมาจาก indole-3-glycerolphosphate หรือแยกจาก indole ของการสังเคราะห์กรดอะมิโน L-tryptophan โดยยังไม่ทราบวิถีที่แน่ชัด (Muller and Weiler, 2000) ซึ่งจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การสังเคราะห์ IAA ในแบคทีเรียจะมีวิถีหลักในการสังเคราะห์อยู่ 3 วิถี คือ 1) indole-3-pyruvic acid, 2) indole-3-acetamide และ 3) indole-3-acetonitrile (Duca *et al.*, 2014) ในแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากการศึกษาของ Ivanova, Doronina และ Trotsenko (2001) พบว่า *Methylobacterium mesophilicum* VKM B-2143 สามารถสังเคราะห์ IAA เมื่อถูกกระตุ้นด้วย L-tryptophan ในอาหาร ในการศึกษาพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ aminotransferases ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีของ indole-3-pyruvic acid ทำให้เกิดกระบวนการ transamination ของ L-tryptophan เปลี่ยนไปเป็น indole-3-pyruvic acid และในการศึกษานี้ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์

tryptophan decarboxylase and tryptophan side-chain oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยน L-tryptophan ไปเป็น indole-3-acetaldehyde ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า *Methylobacterium mesophilicum* VKM B-2143 สามารถสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถีของ indole-3-pyruvic acid เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ IAA ในพืช โดยใช้กรดอะมิโน L-tryptophan เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ โดย Doronina, Ivanova และ Trotsenko (2002) พบว่าแบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ในความเข้มข้นระหว่าง 1.4 – 14.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดไซโตไคนินที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกจากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง

จากการศึกษาการสังเคราะห์ไซโตไคนินจาก *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกทั้งหมด 18 ไอโซเลท ในการวิเคราะห์หาปริมาณเบื้องต้นของไซโตไคนินที่สังเคราะห์จาก *Methylobacterium* ใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร โดยใช้ kinetin เป็นสารมาตรฐาน ซึ่ง kinetin มีโครงสร้างคล้ายกับ zeatin คือเป็นอนุพันธ์ของ aminopurine พบว่าทั้ง 18 ไอโซเลทสามารถสังเคราะห์ไซโตไคนินได้ ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.14 $\pm$ 0.58 ถึง 1.22 $\pm$ 0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นไซโตไคนินชนิดไหนจึงต้องวิเคราะห์ต่อด้วยรงคเลขผิวบางซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ และพิสูจน์องค์ประกอบของสาร รวมไปถึงความบริสุทธิ์ของสาร ซึ่งอาศัยการเคลื่อนที่ของสารบนวัฏภาคคงที่โดยอาศัยวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับในการพิสูจน์เอกลักษณ์ชนิดของไซโตไคนินที่สร้างโดย *Methylobacterium* เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารหรือค่า Rf กับสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ kinetin, zeatin และ zeatin riboside ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.8, 0.7 และ 0.7 ตามลำดับ โดยค่า Rf ของ zeatin และ zeatin riboside มีค่าใกล้เคียงกับค่า Rf ของทั้ง 18 ไอโซเลทซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.6 ซึ่งคล้ายกับในการทดลองของ Wood และคณะ (1974) ในการศึกษาเปรียบเทียบ cytokinesins 2 ชนิด และ zeatin riboside โดยใช้รงคเลขผิวบางที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น n-butanol-acetic acid- water (4:1:1) มีค่า Rf เท่ากับ 0.62, 0.82 และ 0.70 และเมื่อ zeatin riboside ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก พบว่ามีแถบเกิดขึ้นสองที่โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.27 และ 0.65 ซึ่งก็คือ adenine และ zeatin ส่วนในการศึกษาของ Phillips และ Torrey (1972) ซึ่งใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น n-butanol-acetic acid-water (12:3:5) ค่า Rf ของ zeatin และ zeatin riboside ซ้อนทับกัน โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.60 - 0.75 สำหรับ zeatin และ 0.65 – 0.80 สำหรับ zeatin riboside

เมื่อหาปริมาณของไซโตไคนินที่สังเคราะห์จาก *Methylobacterium* ทั้ง 18 ไอโซเลทด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เทียบกับสารมาตรฐาน kinetin, zeatin และ zeatin riboside จากกราฟมาตรฐานพีคของ zeatin และ zeatin riboside ขึ้นที่เวลา

เดียวกัน เมื่อนำมาเทียบกับสารตัวอย่างทำให้ไม่สามารถแยกสารทั้งสองตัวออกจากกันได้ และในการทดลองไอโซเลท ED3-7 มีพีคขึ้นที่เวลาเดียวกับ zeatin และ zeatin riboside เมื่อคำนวณหาปริมาณเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของสารทั้งสอง จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 16.67 และ 4.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น zeatin หรือ zeatin riboside เช่นเดียวกับการศึกษาในรงคเลขผิวบาง แต่ในการศึกษาของ Hussain และ Hasnain (2009) ที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลร้อยละ 70 เช่นเดียวกัน พบว่าพีคของ zeatin และ zeatin riboside ออกมาที่เวลา 2.55 นาทีและ 3.00 นาที โดยปริมาณของ zeatin และ zeatin riboside ที่ศึกษาใน *Bacillus licheniformis* Am2 พบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 1.09 และ 0.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณของ zeatin จะมากกว่า zeatin riboside ซึ่งตรงกับการศึกษาของ การศึกษาของ Koenig, Morris และ Polacco (2002) ที่ *Methylobacterium* สามารถสังเคราะห์ไซโตไคนินชนิด zeatin มากกว่า zeatin riboside

อย่างไรก็ตามไซโตไคนินซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth substances) ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืชโดยไซโตไคนินที่พบในพืชเป็นชนิด zeatin (Davies, 2004) ยังพบว่าสามารถสังเคราะห์ได้ในแบคทีเรียหลายชนิด แบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่นอกจากจะสังเคราะห์ IAA ได้ ยังสามารถสังเคราะห์ไซโตไคนินได้ จากการศึกษาของ Ivanova และคณะ (2000) พบว่า *M. mesophilicum* VKM B-2143 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนินโดยเทียบกับยีน *tmr* และ *tzs* เมื่อถอดรหัสแล้วเป็นเอนไซม์หลักในการสังเคราะห์ไซโตไคนินใน *Agrobacterium tumefaciens* และเมื่อศึกษาชนิดของไซโตไคนินโดยใช้วิธีรงคเลขผิวบาง (thin-layer chromatrography; TLC) ที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น isopropanol-benzene-ammonia (4:1:1) พบว่าเป็นชนิด zeatin riboside แต่ในการศึกษาของ Koenig, Morris และ Polacco (2002) ที่ทำการศึกษาใน *M. extorquens* และ *Methylobacterium* ที่แยกได้จากพืช 4 ชนิด (Arabidopsis, ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด และ ถั่วเหลือง) พบว่า ไซโตไคนินที่แบคทีเรียสังเคราะห์เป็นชนิด *trans*-zeatin มีความเข้มข้นระหว่าง 38 – 114 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบ zeatin riboside ที่ความเข้มข้นระหว่าง 4 – 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดย *Methylobacterium* สังเคราะห์ *trans*-zeatin โดยผ่านการดัดแปลง tRNA เช่นเดียวกันกับในพืชมากกว่าการสังเคราะห์ขึ้นใหม่ผ่านกระบวน isopentenylation ของ adenosine monophosphate (AMP)

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งโดยวิธีชักนำการเกิดแคลลัสและต่อการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส

จากผลการศึกษาพบว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเติมน้ำหมักจากแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic PPFMs ไอโซเลท ED5-9 มีการปนเปื้อนปนเปื้อนแบคทีเรียระหว่างร้อยละ 25 ถึง 50 หลัง 6 สัปดาห์ และกลุ่มทดลองมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่กลุ่มควบคุมไม่เกิดส่วนยอดและราก ส่วนกลุ่มทดลองที่ต่างความเข้มข้นจำนวนยอดและรากไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแคลลัสเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเติมน้ำหมักปนเปื้อนแบคทีเรียเกิดจากการผลิตแบคทีเรียของ IAA รวมถึงสารอาหาร ฮอร์โมนพืช และไวตามิน (Koenig, Morris, and Polacco, 2002; Gaspar *et al.*, 1996) กลุ่มทดลองอาหารเพาะเลี้ยง MS(1962) เติมน้ำหมักต่างความเข้มข้นของ IAA ความเข้มข้นขั้นต่ำ 0.156 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดยอดและราก (Bonga and Von Aderkas, 1992; Ali and Hasnain, 2007; Parimala, Sundaram, Poorniammal, 2001) ส่วนกลุ่มควบคุมอาหารเพาะเลี้ยงเติม 2,4-D เป็นผลให้แคลลัสพัฒนาต่อเนื่องแต่ไม่เกิดยอดและราก (Gaspar *et al.*, 1996; Long, Morris, and Polacco, 1997) โดยทั่วไป ความเข้มข้นของ IAA ต่อประสิทธิภาพชักนำการเกิดยอดและรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนานาประเภทยังเป็นคำถามเพื่อการศึกษาต่อไป

สำหรับการพัฒนาของแคลลัสหญ้าปักกิ่งหลังจากเลี้ยงได้ 5 สัปดาห์ แล้วพบว่าลักษณะของแคลลัสที่เกิดเป็นรูปแบบคอมแพกแคลลัส (compact callus) มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นก้อน มีการเปลี่ยนแปลงด้วยลักษณะของสีแคลลัส ซึ่งที่มีแคลลัสสีขาว (white callus) เป็นแคลลัสที่อยู่ในระยะของการเพิ่มจำนวน จึงไม่มีรงควัตถุ (pigments) ในก้อนของแคลลัส ประศาสตร์ (2538) ได้กล่าวว่าสีของแคลลัสจะขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของรงควัตถุต่างๆ ภายในเซลล์ แต่ภายในเซลล์ของแคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ มีส่วนน้อยที่พบมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองของแคโรทีนอยด์ และสีแดง หรือสีม่วงของแอนโทไซยานิน สิ่งเหล่านี้สามารถเกิดหรือสร้างขึ้นได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยง และปริมาณมีจำนวนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยแสงที่ให้ แคลลัสที่มีสีเหลืองสามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้ แต่แคลลัสที่มีสีขาวจะตายในที่สุดเนื่องจากไม่สามารถ สังเคราะห์แสงได้ และหากแคลลัสมีสีน้ำตาลหรือดำ ซึ่งเรียกวา necrotic tissue จะเป็นเซลล์ที่ตาย และหากมีการย้ายเนื้อเยื่อแคลลัสควรตัดส่วนเดิมที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำทิ้ง เพราะอาจลามทำให้แคลลัสที่เกิดใหม่และแคลลัสที่อยู่ข้างเคียงที่แข็งแรงตายไปด้วย นอกจากนี้ คำนูณ (2544) กล่าวว่า แคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น อิพิเดอร์มิส คอร์เทกซ์ เนื้อเยื่อลำเลียง ซึ่งแต่ละชั้น ประกอบด้วยเซลล์ชนิดต่างๆ ที่อาจเหมือนหรือแตกต่างกัน ดังนั้นการเจริญของแต่ละชั้นที่มีแตกต่างกนออกไป บางชั้นจะให้แคลลัสที่ดีกว่าอีกชั้นหนึ่ง หรือให้แคลลัสที่มีสีและรูปร่าง

ไม่ เหมือนกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กบชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง และการเกิดสีของแคลลัสก็ไม่ได้ขึ้นอยู่กับสีของชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง กล่าวคือชิ้นส่วนของพืชที่มีสีเขียวเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงอาจให้แคลลัสที่ไม่มีสี ทั้งนี้การเกิดสีของแคลลัสขึ้นอยู่กับสภาวะทางเคมีและกายภาพ

ในส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมีความแตกต่างกันในแต่ละกรรมวิธี อาจเนื่องมากจากความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และองค์ประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ต่างกัน โดย Zaidi *et al.* (2006) พบว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ร่วมกับไซโตไคนินสามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของแคลลัสได้ดีกว่าการใช้สารกลุ่มออกซิน หรือไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับ Rashid *et al.* (2001) การใช้สารกลุ่มไซโตไคนิน (BAP) ในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี แต่ไม่มีการเพิ่มของขนาดหรือน้ำหนักของแคลลัส

สำหรับการพัฒนายอดและรากของชิ้นส่วนแคลลัสในแต่ละกรรมวิธี มีการเปลี่ยนแปลงจากก้อนแคลลัสที่มีการพัฒนายอด และรากฝอย หรือมีขนราก เป็นจำนวนมากสีขาว ลักษณะของการพัฒนาเกิดขึ้นด้วย รังสฤษฎ์ (2540) กล่าวว่า การกำหนดพัฒนาของแคลลัสนั้น การที่เซลล์มีความสามารถแรกเริ่มที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นสิ่งที่จำเป็นอันดับแรก ต้องมีการจัดสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดให้เกิดแคลลัส จากนั้นเซลล์จะมีความสามารถที่จะเปลี่ยนพัฒนาหรือกำหนดพัฒนาการอื่นๆ นอกจากนี้ Torres (1989) พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสามารถช่วยให้เกิดการเปลี่ยนสภาพในเซลล์ หรือยังยั้งไม่ให้เกิดการเปลี่ยนสภาพ แต่ไม่ใช่เป็นตัวกำหนดการเปลี่ยนสภาพภายในเซลล์

ข้อเสนอแนะ

การนำแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่สร้างฮอร์โมนพืชไปประยุกต์ใช้ ควรมีการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs เพื่อพัฒนาไปสู่วิธีการนำไปใช้เพื่อการปรับปรุงวิธีการปลูกพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่งในด้านการเร่งการเจริญเติบโตและส่งเสริมความแข็งแรงของต้นกล้าสมุนไพรหญ้าปักกิ่งในช่วงของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์แบบเกษตรอินทรีย์เพื่อนำไปสู่การเป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพต่อไป

บรรณานุกรม

- คำนูญ กาญจนภูมิ. (2544). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร. 161 หน้า.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. (2538). **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. สำนักพิมพ์โอเดียมสโตร์, กรุงเทพมหานคร. 158 หน้า.
- ปัทมา สุนทรศารทูล. (2548). **เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับหญ้าปักกิ่ง**. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. วันพุธที่ 14 กันยายน 2548. กรุงเทพฯ.
- ผ่องพรรณ ศิริพงษ์. (มปป.). หญ้าเทวดาหรือหญ้าปักกิ่งกับการรักษาโรคมะเร็ง. วันที่ค้นข้อมูล 3 กรกฎาคม 2555 จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ เวปไซต์: http://www.nci.go.th/ knowledge/ downloads/nci01.pdf
- ภาควิชาพืชสวน. (มปป.). **เทคนิคการฆ่าเชื้อ และสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง**. กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. (2540). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 219 หน้า.
- ส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช. (มปป). **ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมการเกษตร.
- Aken, B. V., Yoon, J. M., and Schnoor, J. L. (2004). Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides x nigra* DN34). **Applied and Environmental Microbiology**, 70(1), 508-517.
- Ali, B., and Hasnain, S. (2007). Potential of Bacterial Indoleacetic Acid to Induce Adventitious Shoots in Plant Tissue Culture. **Letters in Applied Microbiology**, 45, 128-133.
- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. (2005). Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, 29(1), 29-34.
- Ahmed, A., and Hasnain, S. (2010). Auxin-Producing *Bacillus* sp.: Auxin Quantification and Effect on the Growth of *Solanum tuberosum*. **Pure and**

Applied Chemistry, 82(1), 313-319. Ander, P., Eriksson, M. E. R., and Eriksson, K. E. (1985). Methanol Production from Lignin-related Substances by *Phanerochaete chrysosporium*. **Physiologia Plantarum**, 65(3), 317-321.

- Araujo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., Jr., Elsas, J. D., Vuurde, J. W. L., and Azevedo, J. L. (2002). Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(10), 4906-4914.
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Amoresano, A.,Carpentieri, A., Pucci, P., and Defez, R. (2006). Indole-3-Acetic Acid Improves *Escherichia coli*'s Defences to Stress. **Archives of Microbiology**, 185(5), 373-382.
- Bonga, J.M., Von Aderkas, P. (1992). In vitro Culture of Tree. Forestry Sciences. Vol 38. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Cervantes-Martinez, J., Lopez-Diaz, S., and Rodriguez-Garay, B. (2004). Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, 166, 889-892.
- Chanprame, S., Todd, J. J., and Widholm, J. M. (1996). Prevention of Pink-Pigmented Methylotrophic Bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) Contamination of Plant Tissue Cultures. **Plant Cell Reports**, 16, 222-225.
- Corpe, W. A. (1985). A Method for Detecting Methylotrophic Bacteria on Solid Surfaces. **Journal of Microbiological Methods**, 3, 215-221.
- Corpe, W. A., and Basile, D. V., (1982). Methanol-Utilizing Bacteria Associated with Green Plant. **Developments in Industiral Microbiology**, 23, 483-494.
- Corpe, W. A., and Rheem, S. (1989). Ecology of the Methylotrophic Bacteria on Living Leaf Surfaces. **FEMS Microbiology Ecology**, 62, 243-250.
- Davies, P. J. (2004). **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action.** Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Devi, R. P., Sundaram, S. P., and Poorniammal, R. (2010). Effect of Facutative Methyltrophs on Tissue Culturing of Rice. **Asian Journal of Bio Science**, 4(2), 207-209.

— Doronina, N. V., Ivanova, E. G., and Trotsenko, Yu. A. (2002). New Evidence for the Ability of Methylobacteria and Methanotrophs to Synthesize Auxins. **Microbiology**, 71(1), 130-132.

— Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., and Glick, B. (2014). Indole-3-AceticAcid in Plant- Microbe Interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, 106(1), 85-125.

— Gaffe, J., Tieman, D. M., and Handa, A. K. (1994). Pectin Methylesterase lsoforms in Tomato *(Lycopersicon esculentum)* Tissues. **Plant Physiology**, 105, 199-203.

— Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C,. Greppin, H., Reid, D.M., and Thorpe, T.A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**; 32(4):272-89.

— Glickmann, E., and Dessaux, Y. (1995). A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(2), 793-796.

— Green, P. N. (2005). *Meththylobacterium*. In G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** (Vol.2, pp.567-571). United States of America: Springer Science_Business Media, Inc.

— Green, P. N. (2006). *Methylobacterium*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer and E. Stackebrandt (Eds.), **The Prokaryotes** (Vol.5, pp.257 -265). Singapore: Springer Science+Business Media, LLC.

— Hussain, A., and Hasnain, S. (2009). Cytokinin Production by some Bacteria: Its Impact on Cell Division in Cucumber Cotyledons. **African Journal of Microbiology Research**, 3(11), 704-712.

— Harley, P., Greenberg, J., Niinemets, U., and Guenther, A. (2007). Environmental Controls Over Methanol Emission from Leaves. **Biogeosciences**, 4, 1083-1099.

— Hornschuh, M., Grotha, R., and Kutschera, U. (2002). Epiphytic Bacteria Associated with the Bryophyte *Funaria hygrometrica*: Effects of *Methylobacterium* Strains on Protonema Development. **Plant Biology**, 4, 682-687.

— Intiyot, Y., Kinouchi, T., Kataoka, K., Arimochi, H., Kuwahara, T., Vinitketkumnuen, U., and Ohnishi, Y. (2002). Antimutagenicity of *Murdanis loriformis* in the Salmonella mutation assay and its inhibitory effects on azoxymethane-induced

DNA methylation and aberrant crypt focus formation in male F344 rats. **Journal of Medical Investigation,** 49(10, 5-14.

- Ivanova, E. G., Doronina, N. V., and Trotsenko, Yu. A. (2001). Aerobic Methylobacteria Are Capable of Synthesizing Auxins. **Microbiology,** 70(4), 452-458.
- Ivanova, E. G., Doronina, N. V., Shepelyakovskaya, A. O., Laman, A. G., Brovko, F. A. and Trotsenko, Yu. A. (2000). Facultative and Obligate Aerobic Methylobacteria Synthesize Cytokinins. **Microbiology,** 69(6), 646-651.
- Jang, S. B., and Lee, A. C. (2008). Phenotypic Characterization of Pink Pigmented Facultative Methylotrophic Bacteria from Soil Exposed to Vehicular Soot. **Philippine Journal of Systematic Biology,** 11(1), 32-39.
- Jiratchariyakul, W., Moomgkarndi, P., Okabe, H., and Frahm, A. W. Investigation of Anticancer components from Murdania loriformis (Hassk) Rolla Rao et Kammathy. Proceeding of the first Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences (Pharma Indochina 1997) Pharmacy in Harmony; 1997 May 20-23; Bangkok, Thailand. Faculty of Pharmacy, Mahidol University. 1997.
- Kaga, H., Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaneko, S., and Morisaki, H. (2009). Rice Seeds as Sources of Endophytic Bacteria. **Microbes and Environmants,** 24(2), 154-162.
- Kalyaeva, M. A., Ivanova, E. G., Doronina, N. V., Zakharchenko, N. S., Trotsenko, Yu. A., and Buryanov, Ya. I. (2003). The Effect of Aerobic Methylotrophic Bacteria on the *In vitro* Morphogenesis of Soft Wheat (*Triticum aestivum*). **Russian Journal of Plant Physiology,** 50(3), 313-317.
- Kim, Y. C., Leveau, J., McSpadden, G. B. B., Pierson, E. A., Pierson, L. S., and Ryu, C. M. (2011). The Multifactorial Basis for Plant Health Promotion by Plant-Associated Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology,** 77(5), 1548-1555.
- Knief, C., Frances, L., and Vorholt, J. A. (2010). Competitiveness of Diverse Methylobacterium Strains in the Phyllosphere of Arabidopsis thaliana and Identification of Representative Models, Including *M. extorquens* PA1. **Microbial Ecology,** 60, 440-452.

— Knief, C., Ramette, A., Frances, L., Alonso-Blanco, C., and Vorholt, J. A. (2010). Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. **The ISME Journal**, 4, 719-728.

— Koenig, R. L., Morris, R. O., and Polacco, J. C. (2002). tRNA is the Source of Low-Level trans-Zeatin Production in *Methylobacterium* spp. **Journal of Bacteriology**, 184(7), 1832-1842.

— Kumar, R., and Lee, A. C. (2009). Isolation and Characterization of Pink-Pigmented, Facultative Methylotrophic (PPFM) Bacteria from Leaves of Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. **Philippine Journal of Systematic Biology**, 3, 8-16.

— Kutschera, U. (2007). Plant-Associated Methylobacteria as Co-Evolved Phytosymbionts. **Plant Signaling and Behavior**, 2(2), 74-78.

— Kutschera, U., and Koopmann, V. (2005). Growth in Liverworts of the Marchantiales is Promoted by Epiphytic Methylobacteria. **Naturwissenschaften**, 92, 347-349.

— Li, R., Bruneau, A.H., and Qu, R. (2006) Improved Plant Regeneration and *in vitro* Somatic Embryogenesis of St Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (walt.) Kuntze]. **Plant Breeding**, 125, 52-56.

— Lo, J. M. L., and Lee, C. (2007). Phenotypic Characterization of Air-Borne Pink Pigmented Facultative Methylotrophic Bacteria from a High Vehicular Traffic Density Environment in Mainila, Philippines. **The Philippine Scientist**, 44, 25-34.

— Long, R., Morris, R., Polacco, J. (1997). Cytokinin production by plant-associated methylotrophic bacteria [Internet]. Abstr No. 1168. **Am Soc Plant Physiol.** [Cited 2013 March 6]. Available from http://abstracts.aspb.org/pb1997/public/P54/1471.shtml

— Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthilkumar, M., Seshadri, S., Chung, H., Yang, J., Sundaram, S., and Sa, T. (2004). Growth Promotion and Induction of Systemic Resistance in Rice Cultivar Co-47 (Oryza sativa L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 45, 315-324.

— Madhaiyan, M., Reddy, B. V. S., Anandham, R., Senthilkumar, M., Poonguzhali, S., Sundaram, S. P., and Sa, T. (2006). Plant Growth–Promoting Methylobacterium

Induces Defense Responses in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Compared with Rot Pathogens. **Current Microbiology**, 53, 270-276.

- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., and Sa, T. (2007). Influence of Plant Species and Environmental Conditions on Epiphytic and Endophytic Pink-Pigmented Facultative Methylotrophic Bacterial Populations Associated with Field-grown Rice Cultivars. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 17(10), 1645-1654.
- Mandal, S. M., Mondal, K. C., Dey, S., and Pati, B. R. (2007). Optimization of cultural and Nutritional Conditions for Indole 3-acetic Acid (IAA) Production by a *Rhizobium* sp. Isolated from Root Nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Research Journal of Microbiology**, 2(3), 239-246.
- Mano, H., and Morisaki, H. (2008). Endophytic Bacteria in the Rice Plnt. **Microbs and Environments**, 23(2), 109-117.
- Muller, A., and Weiler, E. W. (2000). Indolic Constituents and Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in the Wild-Type and a Tryptophan Auxotroph Mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, 211(6), 855–863.
- Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R. C., Franzen, J. J., Wojciechowski, C. L., and Fall, R. (1995). Methanol Emission from Leaves. **Plant Physiology**, 108, 1359-1368.
- Omer, Z. S., Tombolini, R., and Gerhardson, B. (2004). Plant Colonization by Pink-Pigmented Facultative Methylotrophic Bacteria (PPFMs). FEMS **Microbiology Ecology**, 47, 319-326.
- Omer, Z. S., Tombolini, R., Broberg, A., and Gerhardson, B. (2004). Indole-3-acetic acid Production by Pink-Pigmented Facultative Methylotrophic Bacteria. **Plant Growth Regulation**, 43, 93-96.
- Orf, O. M. H., Wedda, E. E. E., Sawsan, F. S., and Abo-Taleb, H. H. (2005). Isolation, Purification and Identification of Some Microorganisms Produce Plant Growth Promoting Substances (Methylotrophic Bacteria). **Arab Universities Journal of Agricutural Sciences**, 13(3), 717-729.
- Pal, K. K. and Gardener, B. M. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, 1-25.
- Parimala, Devi R.P., Sundaram, S.P., and Poorniammal, R. (2010). Effect of facultative methylotrophs on tissue culturing of rice. **Asian J Bio Sci.**, 4(2):207-9.

– Phillips, D. A., and Torrey, J. G. (1972). Studies on Cytokinin Production by Rhizobium. **Plant Physiology**, 49(1), 11-15.

–

– Pirttila, A. M., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllyla, R., and Hohtola, A. (2000). Detection of Intracellular Bacteria in the Buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by In Situ Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(7), 3073-3077.

– Podolich, O. V., Ovcharenko, L. P., Kozyrovska, N. O., and Pirttila, A. M. (2009). Detection of *Methylobacterium radiotolerans* IMBG290 in Potato Plants by *In situ* Hybridization. **Biopolymers and Cell**, 25(2), 115-119.

– Poorniammal, R., Sundaram, S. P., and Kumutha, K. (2009). In Vitro Biocontrol Activity of *Methylobacterium extorquens* Against Fungal Pathogens. **International Journal of Plant Protection**, 2(1), 59-62.

– Poorniammal, R., Sundaram, S. P., and Kumutha, K. (2010). Induce Systemic Resistance by *Methylobacterium extorquens* against *Rhizoctonia solani* in Cotton. **International Journal of Plant Protection**, 2(2), 199-204.

– Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Onckelen, H. V. (1993). *Azospirillum brasilense* Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis: Evidence for a Non-Tryptophan Dependent Pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 6(5), 609-615.

– Raja, P., Balachandar, D., and Sundaram, S. P. (2008). Genetic Diversity and Phylogeny of Pink-Pigmented Facultative Methylotrophic Bacteria Isolated from the Phyllosphere of Tropical Crop Plants. **Biology and Fertility of Soils**, 45, 45-53.

– Rampelotti-Ferreira, F. T., Ferreira, A., Vendramim, J. D., Lacava, P. T., Azevedo, J. L., and Araujo, W. L. (2010). Colonization of Rice and *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera:Noctuidae) Larvae by Genetically Modified Endophytic *Methylobacterium mesophilicum*. **Neotropical Entomology**, 39(2), 308-310.

– Rashid, H., Bokhari, S.Y.A., and A. Quraishi, A. (2001). Callus induction, regeneration and hygromcycin selesction of rice (Super Basmati). **J.Bio.Sci.** 1(12): 1145-1146.

- Romanovskaya, V. A., Stolyar, S. M., Malashenko, Yu. R., and Dodatko, T. N. (2001). The Ways of Plant Colonization by *Methylobacterium* Strains and Properties of These Bacteria. **Microbiology**, 70(2), 221-227.
- Saifullah, and Khan, S. (2011). Callus Induction and Cell Suspension Culture Production of *Catharathus Roseus* for Biotransformation Studies of (-)-Caryophyllene Oxide. **Pakistan Journal of Botany**, 43(1), 467-473.
- Schauer, S., and Kutschera, U. (2008). Methylotrophic Bacteria on The Surfaces of Field-Grown Sunflower Plants: A Biogeographic Perspective. **Theory in Bio**sciences, 127(1), 23-29.
- Siddiqui, Z. A. (2006). PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. Netherlands: Springer.Pigoleva, S. V., Zakharchenko, N. S. Pigolev, A. V., **Trotsenko, Yu.** A., and Buryanov, Ya. I. (2009). The Influence of Colonizing Methylobacteria on Morphogenesis and Resistance of Sugar Beet and White Cabbage Plants to *Erwinia carotovora*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 45 (6), 604-609.
- Singh, A., Van Hamme, J.D., and Ward, O.P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, 25, 99-121.
- Shirokikh, I. G., Shupletsova, O. N., and Shirokikh, A. A. (2007). Assessment of the Effect of Methylotrophic Bacteria on Plant In vitro. **Russian Agricultural Sciences**, 33(5), 308-310.
- Subbarayan, K., Varadharajan, N., and Kalyanaraman, R. (2010). Indole-3-acetic acid from Contaminant Fungus and Potential Application for Cell Cultures of *Alternanthera sessilis*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 1(4), 257-262.
- Sukhawat, S., and Poeaim, A. (2008). Plant Regeneration from Cell Suspension Culture of Nilegrass (*Acroceras macrum*). **Agricultural Science Journal**, 39(3), 556-559.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., and Hubbell, D. H. (1979). Plant Growth Substances by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, 37(5), 1016-1024.

— Torres, K.C. (1989). **Tissue culture techniques for horticultural crops.** Van Nostrand Reinhold, New York. 285 pp.

— Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Yu., Cherdyntseva, T. A., and Netrusov, A. I. (2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 42(2), 117-126.

— Vinitketkumnuen, U., Chewonarin, T., Dhumtanom, P., Lertpraseartsuk, N., Wild, C. P. (1999). Aflatoxin-albumin adduct formation after single and multiple doses of aflatoxin B1 in rats treated with Thai medicinal plants. **Mutation Research.** 48(1), 345-351.

— Waturangi, D. E., and Kusuma, A. (2008). Analysis of Pink Pigmented Facultative Methylotroph Bacteria from Human Environments. Microbiology Indonesia, 2(3), 112-114.

— Widholm, J. M. (1996). The Rare Occurrence of Plant Tissue Culture Contamination by *Methylobacterium mesophilicum*. Plant Cell, **Tissue and Organ Culture**, 45, 201-205.

— Wood, H. N., Rennekamp, M. E., Bowen, D. V., Field, F. H., and Braun, A. (1974). A Comparative Study of Cytokinesins I and II and Zeatin Riboside: A Reply to Carlos Miller. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 71(10), 4140-4143.

— Yasmin, F., Othman, R., Sijam, K., and Saad, M. S. (2009). Characterization of Beneficial Properties of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from Sweet Potato Rhizosphere. **African Journal of Microbiology Research**, 3(11), 815-821

— Zaidi, M.A., Narayanan, M., Sardana, R., Taga, I., Postel, S., John, R., Mcnulty, M., Mottia, Y., Mao, J., Loit, E., and Altosaar, I. (2006). Opitimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. **Agronomy Research** 4(2): 563-575.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีและอาหารเพาะเลี้ยง

1. การเตรียมสารละลาย Salkowski's Reagent

ส่วนประกอบ

$FeCl_3$ 0.5M	2	มิลลิลิตร
Perchloric acid 70%	49	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

การเตรียมสารละลาย Salkowski's Reagent เพื่อใช้ในการตรวจสอบปริมาณ IAA นำส่วนประกอบ $FeCl_3$ 0.5M ผสมกับน้ำกลั่นในตู้ดูดควัน จากนั้นจึงนำ Perchloric acid 70% ผสมลงไปให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บรักษาในขวดสีชาอย่างระมัดระวัง (เนื่องจากมีฤทธิ์ในการกัดกร่อน)

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Low mineral nutrient (LMN) สูตรดัดแปลง

ส่วนประกอบ (ปริมาณที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร)

KH_2PO_4	2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.125	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.002	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
KNO_3	3.03	กรัม
เมทานอล	1%	v/v
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Low mineral nutrient (LMN) สูตรดัดแปลง นำส่วนประกอบข้างต้นละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 5.5 ด้วย NaOH หรือ HCl จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับเมทานอลนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองแบคทีเรีย ใช้แผ่นกรองขนาด 0.1 ไมครอน จากนั้นเติมภายหลังจากอาหารหลักผ่านการฆ่าเชื้อ

3. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Murashige and Skoog (MS, 1962)

2.1 Stock solution A (Macro)

ส่วนประกอบ (ปริมาณที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร)

NH_4NO_3	16.5	มิลลิกรัม
KNO_3	19.0	มิลลิกรัม
$CaCl_2$ $2H_2O$	4.4	มิลลิกรัม
$MgSO_4$. $7H_2O$	3.7	มิลลิกรัม
KH_2 PO_4	1.7	มิลลิกรัม

การเตรียม Stock solution A (Macro) เพื่อใช้ในอาหารสูตร MS นำส่วนประกอบข้างต้นมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหาร MS

2.2 Stock solution B (Micro)

ส่วนประกอบ (ปริมาณที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร)

H_3BO_3	0.62	มิลลิกรัม
FeSO4 . 7H2O	2.785	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$. $7H_2O$	0.86	มิลลิกรัม
KI	0.083	มิลลิกรัม
Na_2MoQ_4 . $2H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
$CoCl_2$. $6H_2O$	0.0025	มิลลิกรัม

การเตรียม Stock solution B (Micro) เพื่อใช้ในอาหารสูตร MS นำส่วนประกอบข้างต้นมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วนั้นเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหาร MS

2.3 Stock solution C (FeEDTA)

ส่วนประกอบ (ปริมาณที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร)

Na2EDTA	3.725	มิลลิกรัม
$MnSO_4$. H_2O	0.69	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$. $7H_2O$	0.86	มิลลิกรัม
KI	0.083	มิลลิกรัม
Na_2MoQ_4 . $2H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
$CoCl_2$. $6H_2O$	0.0025	มิลลิกรัม

การเตรียม Stock solution C (FeEDTA) เพื่อใช้ในอาหารสูตร MS นำส่วนประกอบข้างต้นมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหาร MS

2.4 Stock solution D (Vitamin)

ส่วนประกอบ (ปริมาณที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร)

Glycine	0.2	มิลลิกรัม
Nicotinic acid	0.05	มิลลิกรัม
Pyridixine HCl	0.05	มิลลิกรัม
Thaiamine HCl	0.01	มิลลิกรัม
$Na_2MoQ_4 . 2H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
Myo – inositol	10	มิลลิกรัม

การเตรียม Stock solution D (Vitamin) เพื่อใช้ในอาหารสูตร MS นำส่วนประกอบข้างต้นมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหาร MS

2.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Murashige and Skoog (MS, 1962) สำหรับการขยายพันธุ์ และการทำการทดลอง

ส่วนประกอบ (ปริมาณที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร)

Macro	100	มิลลิลิตร
Micro	10	มิลลิลิตร
Vitamin	10	มิลลิลิตร
FeEDTA	10	มิลลิลิตร
Myo-inosital	0.1	กรัม
Sucrose	30	กรัม
Agar	8	กรัม
**BA	150	มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) นำส่วนประกอบข้างต้นละลายด้วยน้ำกลั่น สำหรับการขยายพันธุ์เนื้อเยื่อระย่อมจะมีการเพิ่มส่วนประกอบ BA แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 5.7±0.2 ด้วย NaOH หรือ HCl จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แต่สำหรับใช้ในงานทดลองจะมีการเพิ่มน้ำหมักจากเชื้อแบคทีเรีย *M. Radiotolerans* ปริมาณแตกต่างกันไปในแต่ละกรรมวิธี

ที่ ศธ ๐๕๙๐.๐๗/๐๗๕๘

มหาวิทยาลัยพะเยา
ตำบลแม่กา อำเภอเมือง
จังหวัดพะเยา ๕๖๐๐๐

๒๙ มิถุนายน ๒๕๕๘

เรื่อง แจ้งการยืนยันการรับบทความลงตีพิมพ์

เรียน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาต ชิดบุรี

ตามที่ ท่านได้ส่งบทความเรื่อง "ประสิทธิผลของน้ำหมักจาก Methylobacterium radiotolerans กลุ่มแยก ED5-9 ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของหญ้าปักกิ่ง" มายังกองบรรณาธิการฯ เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารนเรศวรพะเยา นั้น

บัดนี้ ทางบรรณาธิการวารสารนเรศวรพะเยาจึงขอแจ้งการยืนยันการรับบทความของท่าน และการนำไปลงตีพิมพ์ในวารสารนเรศวรพะเยา ปีที่ ๘ ฉบับที่ ๒ ประจำเดือน พฤษภาคม–สิงหาคม ๒๕๕๘ ทั้งนี้หลังจากได้แก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทบทวน และการกลั่นกรองก่อนตีพิมพ์ของกองบรรณาธิการ

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์นายแพทย์วีระพล จันทร์ดียิ่ง)
บรรณาธิการ
มหาวิทยาลัยพะเยา

กองบรรณาธิการวารสารนเรศวรพะเยา
กองบริหารงานวิจัยและประกันคุณภาพการศึกษา
โทร ๐ ๕๔๔๖ ๖๖๖๖ ต่อ ๑๐๔๘
โทรสาร ๐ ๕๔๔๖ ๖๗๑๔

ต้นฉบับบทความ

ประสิทธิผลของน้ำหมักจาก *Methylobacterium radiotolerans* กลุ่มแยก ED5-9 ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของหญ้าปักกิ่ง

อภิชาติ ชิดบุรี[1]*, ธนวุฒิ พรหมบัญชาชัย[2], นารีลักษณ์ นาแก้ว[2], ศิริพรรณ สารินทร์[2]

Effect of fermentation broth from *Methylobacterium radiotolerans* isolate ED5-9 on callus culture of *Murdannia loriformis*

Aphichat Chidburee[1*], Thanawut Promburnchachai[2], Nareeluk Nakaew[2], Siripun Sarin[2]

[1] Agricultural Technology Research Institute, Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang Province 52000

[2] Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phisanulok Province 65000

Corresponding author, E-mail: chidburee@rmutl.ac.th

Naresuan Phayao J. 2015;8(1):XX-XX

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มุ่งหมายกำหนดหาประสิทธิผลของน้ำหมักจาก *Methylobacterium radiotolerans* ED5-9 ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสหญ้าปักกิ่ง โดยใช้กรดน้ำส้มอินโดล-3 ที่ความเข้มข้น 0.156, 0.312, 0.474 และ 0.632 มิลลิกรัมต่อลิตร หลัง 6 สัปดาห์ไม่พบความแตกต่างของการเจริญพัฒนาเป็นส่วนยอดและราก ส่วนยอดต่อชิ้นส่วนระหว่าง 1.8 ถึง 2.4 จำนวนรากต่อชิ้นระหว่าง 7.0 ถึง 8.5 ดังนั้นการเจริญพัฒนาของแคลลัสไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของน้ำหมัก

คำสำคัญ: เมทิลโลแบคทีเรียม เรดิโอโทเรอราน อีดี 5-9, แคลลัส, หญ้าปักกิ่ง

Abstract

This study aimed to determine the effect of the fermentation broth from *Methylobacterium radiotolerans* ED5-9 on growth and development of callus culture of *Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy. The concentrations of indole-3-acetic-acide (IAA) of 0.156, 0.312, 0.474, and 0.632 mg/L were used. After 6 weeks, there were no differences of shoot and root development. The numbers of shoot were 1.8 to 2.4 per explant, and the numbers of root were 7.0 to 8.5 per explant. Thus, the callus development did not relate to concentration of fermentation broth.

Keywords: *Methylobacterium radiotolerans*, callus, *Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy

---

[1] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง 52000

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

บทนำ

หญ้าปักกิ่ง (*Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy) ใช้บรรเทาอาการของมะเร็งร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบัน [1] เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อขยายพันธุ์สมุนไพรสายพันธุ์ดี เพื่อให้ได้สารทุติยภูมิในกระบวนการสร้างและสลาย (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาปริมาณมากภายในระยะเวลาอันสั้น รวมถึงปราศจากการปนเปื้อนสารเคมี [2] สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) หรือ ฮอร์โมนพืช (plant hormone) เป็นสารเคมีสังเคราะห์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) เช่น Indole-3-acetic acid (IAA) หรือ ออกซิน [3] *Methylobacterium radiotolerans* ไอโซเลท ED5 แยกจากหญ้าปักกิ่งมี IAA อันคุณสมบัติเป็นฮอร์โมนพืช [4 8]

คณะผู้วิจัยมุ่งหมายกำหนดหาประสิทธิผลของน้ำหมัก *M. radiotolerans* ไอโซเลท ED5-9 เป็นส่วนผสมอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสหญ้าปักกิ่ง

วัสดุและวิธีการ

ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ *M. radiotolerans* ไอโซเลท ED5-9 อายุ 3 วัน ร้อยละ 10 ในอาหารเพาะเลี้ยงสารอาหารต่ำ ประกอบด้วย KH_2PO_4 2 กรัม KNO_3 3.03 กรัม $Mg_2SO_4.7H_2O$ 0.125 กรัม NaCl 0.5 กรัม $FeSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัม yeast extract 0.1 กรัมและเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำปริมาตร 1 ลิตร (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มบนเครื่องเขย่า 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แยกแบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บน้ำหมักส่วนใส (supernatant) และระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กรองน้ำหมักเข้มข้นด้วยชุดกรองแบคทีเรียขนาด 0.1 ไมครอน และเก็บน้ำหมักในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เพาะเลี้ยงแคลลัสของหญ้าปักกิ่งแบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มทดลองเติมน้ำหมักที่มี IAA จำนวน 4 ความเข้มข้น 0.156, 0.312, 0.474 และ 0.632 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยง Murashige and Skoog 1962 (MS 1962) ส่วนกลุ่มควบคุมสูตรอาหารเพาะเลี้ยง MS 1963 ที่เติม 1 มิลลิกรัม/ลิตร 2,4-D แต่ไม่เติมน้ำหมัก ส่วนพืชศึกษาใช้แคลลัสเลี้ยงในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแบบกลุ่มควบคุมนาน 4 สัปดาห์ ตัดให้มีขนาด 0.5 คูณ 0.5 เซนติเมตร (น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.2 กรัม) ทดลองที่อุณหภูมิห้องทั้ง 5 กรรมวิธี วิธีละ 10 ซ้ำ ให้แสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน หลัง 6 สัปดาห์บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับส่วนยอดและราก สถิติใช้โปรแกรมประมวลผล Minitab 17 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย lest significant difference – LSD)

ผลการศึกษา

แคลลัสเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเติมน้ำหมักปนเปื้อนแบคทีเรียระหว่างร้อยละ 25 ถึง 50 หลัง 6 สัปดาห์ กลุ่มทดลองน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กลุ่มควบคุมไม่เกิดส่วนยอดและราก ส่วนกลุ่มทดลองที่ต่างความเข้มข้นจำนวนยอดและรากไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนยอดและรากในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองน้ำหมักต่างความเข้มข้นหลัง 6 สัปดาห์

	ยอด	ราก
กลุ่มควบคุม	-	-
กลุ่มทดลอง		
ความเข้มข้น 0.156 มก. ต่อลิตร	2.0	7.0
ความเข้มข้น 0.312 มก. ต่อลิตร	1.6	8.3
ความเข้มข้น 0.474 มก. ต่อลิตร	2.4	8.2
ความเข้มข้น 0.632 มก. ต่อลิตร	2.4	8.5

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

วิจารณ์

แคลลัสเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเติมน้ำหมักปนเปื้อนแบคทีเรียเกิดจากการผลิตแบคทีเรียของ IAA รวมถึงสารอาหาร ฮอร์โมนพืช และไวตามิน [5 9] กลุ่มทดลองสารเพาะเลี้ยง MS 1962 เติมน้ำหมักต่างความเข้มข้นของ IAA ความเข้มข้นขั้นต่ำ 0.156 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำการเกิดยอดและราก [6-8 13-15] ส่วนกลุ่มควบคุมสารเพาะเลี้ยงเติม 2,4-D เป็นผลให้แคลลัสพัฒนาต่อเนื่องแต่ไม่เกิดยอดและราก [9,10 16,17] โดยทั่วไป ความเข้มข้นของ IAA ต่อประสิทธิภาพชักนำการเกิดยอดและรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนานาประเภทยังเป็นคำถามเพื่อการศึกษาต่อ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ผู้สนับสนุนการใช้เครื่องมือและห้องปฏิบัติการดำเนินงานวิจัย และ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรในการสนับสนุนงบประมาณวิจัยประจำปี 2557 ในการดำเนินงานวิจัยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. สุภาภรณ์ ปิติพร, สุดใจ พรหมเกิด. หญ้าปักกิ่ง: สมุนไพรทางเลือกของผู้ป่วยโรคมะเร็ง. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ: แปลนพริ้นติ้ง จำกัด; 2555. หน้า 34-67.
2. สมภพ ประธานธุรารักษ์. วัตถุสมุนไพรที่มีคุณภาพ: กรณีศึกษาชมิ้นชัน. งานเสวนาชมิ้นชันกินทุกวันป้องกันมะเร็ง; 21 พฤษภาคม 2554; ปราจีนบุรี: มูลนิธิโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร; 2554. หน้า 10-24.
3. รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ; สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2554. หน้า 20-32.
4. ศิริพรรณ สารินทร์, ชนวุฒิ พรมบัญชาชัย, นารีลักษณ์ นาแก้ว, อภิชาติ ชิดบุรี. การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม Pink-Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) ที่สามารถผลิต Indole Acetic acid จากหญ้าปักกิ่ง. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร. 2556;21(2):14-24.
5. Koenig RL, Morris RO, Polacco JC. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in Methlobacterium spp. J Bacteriol. 2002;184(7):1832-42.
6. Bonga, JM, Von Aderkas P. In vitro Culture of Tree. Forestry Sciences. Vol 38. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1992.

7. Ali B, Hasnain S. Potential of bacterial indoleacetic acid to induce adventitious shoots in plant tissue culture. Lett Appl Microbiol. 2007;45(2):128-33.
8. Parimala Devi RP, Sundaram SP, Poorniammal R. Effect of facultative methylotrophs on tissue culturing of rice. Asian J Bio Sci. 2010;4(2):207-9.
9. Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 1996;32(4):272-89.
10. Long R, Morris R, Polacco J. Cytokinin production by plant-associated methylotrophic bacteria [Internet]. Abstr No. 1168. Am Soc Plant Physiol; 1997. [Cited 2013 March 6]. Available from http://abstracts.aspb.org/pb1997/public/P54/1471.shtml