# ศักยภาพของแบคทีเรียกลุ่ม Pink-Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ธนวุฒิ พรหมบัญชาชัย

สำเนาเล่มแล้ว

8 พ.ค. 59

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มีนาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ เรื่อง "ศักยภาพของแบคทีเรียกลุ่ม Pink-Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ" ของ ธนวุฒิ พรหมบัญชาชัย เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยนเรศวร

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญจนา แซ่เตียว)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพรรณ สารินทร์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ ชิดบุรี)

.....กรรมการ
(ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัลยา ปรีชานุกูล)

.....กรรมการ
(ดร. สุภาพร ภัสสร)

อนุมัติ

.....

(ศาตราจารย์ ดร. รัตนะ บัวสนธ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
25 มีนาคม 2559

# ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพรรณ สารินทร์ ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี และขอกราบขอบพระคุณกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ ชิดบุรี ที่ได้ให้คำแนะนำและดูแลเอาใจใส่ในการทำปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และ ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านทั้งที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง ที่คอยให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ รวมทั้งห้องปฏิบัติการ ขอขอบพระคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา ที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ และห้องปฏิบัติการสำหรับการทำวิทยานิพนธ์

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่คอยให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและผู้ที่สนใจบ้างไม่มากก็น้อย

ธนวุฒิ พรหมบัญชาชัย

| | |
|---|---|
| **ชื่อเรื่อง** | ศักยภาพของแบคทีเรียกลุ่ม Pink-Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ |
| **ผู้วิจัย** | ธนวุฒิ พรหมบัญชาชัย |
| **ประธานที่ปรึกษา** | รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพรรณ สารินทร์ |
| **กรรมการที่ปรึกษา** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ ชิดบุรี<br>ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว |
| **ประเภทสารนิพนธ์** | วิทยานิพนธ์ ปร.ด. สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2558 |
| **คำสำคัญ** | *Methylobacterium* การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หญ้าปักกิ่ง สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช |

## บทคัดย่อ


งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกลุ่ม Pink-Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) สกุล *Methylobacterium* ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในการเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสามารถแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากใบหญ้าปักกิ่งบนอาหาร ammonium mineral salts (AMS) agar ที่เติมเมทานอลร้อยละ 0.5 ได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลท แบ่งเป็น epiphytic *Methylobacterium* จำนวน 40 ไอโซเลทและ endophytic *Methylobacterium* จำนวน 34 ไอโซเลท โดยทุกไอโซเลทที่แยกได้มีโคโลนีมีสีชมพู เซลล์มีรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมลบและพบ poly-β-hydroxybutyrate (PHB) สะสมไว้ภายในเซลล์ ให้ผลการทดสอบ catalase, oxidase, motility เป็นผลบวก และการทดสอบ indole, MR-VP, $H_2S$ การย่อยสลายแป้ง เจลาติน เคซีน และเม็ดเลือดแดง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ ส่วนความสามารถในการใช้ citrate และการสร้างเอนไซม์ urease ให้ผลแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลท

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ทุกไอโซเลทที่แยกได้สามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดออกซินได้ในอาหาร low nutrient medium (LNM) ที่เติมและไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน โดยแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* ไอโซเลท ED5-9 มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ดีที่สุดในอาหาร LNM ที่ไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน มีค่าความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในน้ำหมักคือ 3.47 ± 0.43 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยาแบบ partial 16S rDNA gene sequencing พบว่า ตรงกับ *M. radiotolerans* JCM 2831 (T) โดยมีค่าร้อยละการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (similarity) เท่ากับ 100 หลังจากนั้นศึกษาน้ำหนักของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จำนวน 18 ไอโซเลทที่สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไปมาวิเคราะห์ความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบในกลุ่มไซโตไคนินเบื้องต้นด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร พบว่า ทั้ง 18 ไอโซเลท สามารถสังเคราะห์สารประกอบในกลุ่มไซโตไคนินได้ที่ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.14 $\pm$ 0.58 ถึง 1.22 $\pm$ 0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไอโซเลท ED5-9 มีค่าความเข้มข้นของสารประกอบในกลุ่มไซโตไคนินเท่ากับ 0.54 $\pm$ 0.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารกลุ่มไซโตไคนินในสารสกัดบิวทานอลทั้ง 18 ไอโซเลท ด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง พบว่า มีค่า Rf ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์ จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC มีเพียงไอโซเลท ED3-7 ที่มีพีคปรากฏขึ้นที่เวลาเดียวกับซีเอตินและซีเอตินไรโบไซม์ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นซีเอตินหรือ ซีเอตินไรโบไซม์เช่นเดียวกับการศึกษาในรงคเลขผิวบาง และเมื่อนำ *M. radiotolerans* ED5-9 ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase เป็นเอนไซม์ที่สามารถควบคุมระดับเอทิลีนภายในเนื้อเยื่อพืช พบว่า มีค่าเท่ากับ 365.05 $\pm$ 90.51 นาโนโมลของ $\alpha$–ketobutyrate ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง

นอกจากนี้พบว่า *M. radiotolerans* ED5-9 สามารถเจริญได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร LMN ที่เติมเมทานอลร้อยละ 1 มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมง มีระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัวเท่ากับ 4.26 ชั่วโมง และสามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง แต่สภาวะที่ *M. radiotolerans* ED5-9 สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร LMN ที่เติมเมทานอลร้อยละ 1 มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และใช้โพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อวิเคราะห์สารประกอบ IAA ในน้ำหมักที่สังเคราะห์จาก *M. radiotolerans* ED5-9 ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีพีคปรากฏขึ้นที่เวลาเดียวกันกับสารละลายมาตรฐาน IAA จึงยืนยันได้ว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

จากการศึกษาเพื่อประเมินศักยภาพของ *M. radiotolerans* ED5-9 ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่ง พบว่า น้ำหมักที่มีสารประกอบ IAA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *M. radiotolerans* ED5-9 ที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige and Skoog medium; MS(1962) และตัวเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้สำหรับจุ่มชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งไปในทิศทางเดียวกันและไม่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ กับการใช้สารควบคุมการเจริญของพืชชนิด IAA และเมื่อปริมาณน้ำหมักและระยะเวลาในการจุ่มเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยปริมาณน้ำหมักที่ใช้ในการทดลองมีปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 4 มิลลิลิตรต่อลิตรคิดเป็นความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในอาหารเท่ากับ 0.0134 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 8.00 รากต่อชิ้น และ 1.00 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนระยะเวลาการจุ่มเซลล์ที่ใช้ในการทดลองสูงสุดเท่ากับ 5 นาที มีจำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 12.00 $\pm$ 3.46 รากต่อชิ้น และ 0.71 $\pm$ 0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ

จากผลการศึกษาทั้งหมดทำให้สามารถสรุปได้ว่า *M. radiotolerans* ED5-9 ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่ง โดยเฉพาะมีผลไปกระตุ้นการเจริญในส่วนของรากได้ใกล้เคียงกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA เป็นสารเคมีสังเคราะห์ ดังนั้นจากงานวิจัยนี้ทำให้เห็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

| | |
|---|---|
| Title | POTENTIAL OF PINK-PIGMENTED FACULTATIVE METHYLOTROPHS (PPFMS) TO ENHANCE GROWTH OF *MURDANNIA LORIFORMIS* (HASSK.) R. RAO & KAMMATHY IN TISSUE CULTURE |
| Author | Thanawut Prombunchachai |
| Advisor | Associate Professor Siripun Sarin, Ph.D. |
| Co - Advisor | Assistant Professor Aphichat Chidburee, Ph.D.<br>Nareeluk Nakaew, Ph.D. |
| Academic Paper | Thesis Ph.D. in Microbiology,<br>Naresuan University, 2558 |
| Keywords | *Methylobacterium*, Plant tissue culture, *Murdannia loriformis*<br>Plant growth promoting substances |


## ABSTRACT

The objective of this research was to study the potential of pink-pigmented facultative methylotrophs (PPFMs), which were classified in genus *Methylobactrium*, in stimulating the growth and development of *Murdannia loriformis* in tissue culture. Seventy four isolates of *Methylobacterium* isolated from leaves of *M. loriformis* on ammonium mineral salts (AMS) agar with 0.5% methanol were divided into the epiphytic *Methylobacterium* (40 isolates) and the endophytic *Methylobacterium* (34 isolates). Primary indentification of all isolates showed pink colonies on medium, rod-shaped cells, gram negative and containing poly-β-hydroxybutyrate granule. Biochemical analyses showed that all isolates were positive for catalase and oxidase enzymes and were found to be motile, but they were negative for indole, MR-VP and $H_2S$ test. They did not degrade starch, gelatin, casein and blood. In addition, the result of citrate utilization and urease enzyme activity were varied among isolates.

All isolates were able to produce the plant-growth promoting substance in auxin groups in the low nutrient medium (LNM) both in with or without the L-tryptophan supplement. The endophytic *Methylobacterium* of the isolate ED5-9 was able to produce

the highest IAA compounds in low nutrient medium (LNM) without L-tryptophan supplement. The concentration of IAA compounds in the fermentation broth produced by *Methylobacterium* ED5-9 was 3.47 ± 0.43 µg/ml. *Methylobacterium* ED5-9 was also revealed the results of identification that correspond to *M. radiotolerans* JCM 2831 (T) with percentage of similarity at 100. Subsequently, the fermentation broth of 18 isolates that produced the IAA compound at the concentration of more than 2.00 µg/ml were continued to analyze the amount of cytokinin compound by measuring the absorbance at wavelength 269 nm. The average concentrations of cytokinin compound of 18 isolates were in the range of 0.14 ± 0.58 to 1.22 ± 0.65 µg/ml and that of the isolate ED5-9 was 0.54 ± 0.93 µg/ml. The composition of cytokinin compounds in the butanol extracts were then analyzed by thin layer chromatography technique. The Rf values were compared and found that were closed to the zeatin and zeatin riboside but when analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) there was only the peak of isolate ED3-7 appeared at the same time of zeatin and zeatin riboside. Therefore it could not dicide into zeatin nor zeatin riboside. In addition, the activity of ACC deaminase enzyme that could control the level of ethylene in the plant tissue was studied in *M. radiotolerans* ED5-9. The result revealed that the activity of ACC deaminase enzyme was 365.05 ± 90.51 nmol of α–ketobutyrate/mg protein/hr.

The study of the optimal conditions for the growth of *M. radiotolerans* ED5-9 in the LNM with 1.0% methanol adjusted initial pH to 6.5 and use of ammonium sulfate as nitrogen sources showed the value of specific growth rate of 0.16 / hr, the generation time of 4.26 hr and the IAA concentration of 3.12 µg/ml at 60 hr of incubation time, while the growth of bacteria in the LNM with 1.0% methanol adjusted initial pH to 5.5 and use of potassium nitrate as nitrogen sources could produce the IAA compound in the higher concentration of 3.39 µg/ml at 60 hr. Moreover, when the IAA compound produced from *M. radiotolerans* ED5-9 was compared with the standard solution of IAA by the HPLC technique, these was found that the peak appeared at the same time so that it might confirm to be the same compound.

The study of the effect of *M. radiotolerans* ED5-9 in the tissue culture of *M. loriformis* showed that the fermentation broth with the IAA compound synthesized from *M. radiotolerans* ED5-9 was added with medium for the tissue culture (Murashige and Skoog medium; MS(1962)) as well as bacterial cells which were used for immersion of the explants of *M. loriformis* before to culture on MS(1962) could stimulate the growth and the development of *M. loriformis*. The result showed no statistically differ ($p < 0.05$) for the control using plant growth regulator compounds in group of IAA. The increment of root growth counted by the average value of root number per explants and the root length was correlated to the quantity of the fermentation broth and the duration time for immersion of *M. loriformis* explants in cell suspensions. The highest volume of fermentation broth was at 4 ml/l or at the IAA concentration of 0.0134 µg/ml could promote the average value of root number per explants and root length at 8.00 ± 1.36 roots per explants and 1.00 ± 0.08 cm, respectively. The 5 min was the best immersion time of explants in cell suspensions which could be able to enhance the average value of root number and root length at 12.00 ± 1.06 roots per explants and 0.71 ± 0.04 cm, respectively.

In conclusion, all of the above results showed the capacity of *M. radiotolerans* ED5-9, the fermentation broth with IAA compound and cells of bacteria, to promote growth and development of explants of *M. loriformis* in the plant tissue culture, especially the root growth. This research, therefore, exhibited the advantage of the beneficial bacteria to promote growth of plant which might replace the use of plant growth regulator substances in plant tissue culture.

# สารบัญ


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | **บทนำ** | 1 |
| | ความเป็นมาของปัญหา | 1 |
| | จุดมุ่งหมายของการวิจัย | 3 |
| | สมมติฐานของการวิจัย | 3 |
| | ขอบเขตการวิจัย | 3 |
| | ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 4 |
| 2 | **เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | 5 |
| | ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) | 5 |
| | การศึกษาแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในพืช | 6 |
| | การอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* และพืช | 11 |
| | กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เมื่อเจริญบนเมทานอล | 14 |
| | สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช | 18 |
| | การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) | 44 |
| | หญ้าปักกิ่ง (Ya pakking; Beijing grass) | 51 |

# สารบัญ (ต่อ)


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 3 | **วิธีดำเนินการวิจัย** | 56 |
| | อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง | 56 |
| | อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง | 58 |
| | การแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากใบหญ้าปักกิ่ง | 59 |
| | การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง | 62 |
| | การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้ | 63 |
| | การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก | 64 |
| | การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase | 66 |
| | การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก และการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการสร้างสารประกอบ IAA ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) | 68 |
| | การศึกษาผลความเป็นไปได้ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกที่มีความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่ง | 70 |
| | วิธีวิเคราะห์ข้อมูล | 81 |

# สารบัญ (ต่อ)


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4 | **ผลการวิจัย** | 82 |
| | การคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากใบหญ้าปักกิ่ง | 82 |
| | การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ของแบคทีเรียสกุล*Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง | 83 |
| | การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินหรือสารประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้ | 88 |
| | การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก | 94 |
| | การศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก | 100 |
| | การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก และการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการสร้างสารประกอบ IAA ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) | 100 |
| | การศึกษาผลของสัดส่วนการใช้น้ำหมักในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | 105 |
| | การศึกษาผลของปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีน้ำหมักเป็นส่วนประกอบกับสภาพการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | 128 |
| | การศึกษาผลของสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | 140 |

# สารบัญ (ต่อ)


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 5 | บทสรุป | 160 |
| | สรุปผลการวิจัย | 160 |
| | อภิปรายผลการวิจัย | 165 |
| | ข้อเสนอแนะ | 182 |
| บรรณานุกรม | | 183 |
| ภาคผนวก | | 212 |
| ประวัติผู้วิจัย | | 281 |

# สารบัญตาราง

ตาราง หน้า


1 ปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่พบบนผิวใบพืชชนิดต่าง ๆ..... 7

2 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช..... 18

3 ปริมาณสารประกอบ IAA ที่สังเคราะห์ในแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*..... 27

4 สมุนไพรที่นำมาใช้ศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 54

5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง. 83

6 ผลการจัดกลุ่มของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ตามลักษณะการใช้ citrate และการสร้างเอนไซม์ urease..... 87

7 ปริมาณสารประกอบ IAA ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium*..... 88

8 ปริมาณสารประกอบ IAA ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium*..... 90

9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลท ED5-9 กับ *M. radiotolerans* JCM 2831 (T). 93

10 ปริมาณไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร..... 94

11 ค่า Rf ของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกเทียบกับสารมาตรฐานไคเนติน ซีเอติน และซีเอตินไรโบไซด์..... 97

12 ขนาดความกว้างเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 116

13 น้ำหนักสดเฉลี่ย และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 117

14 จำนวนยอดเฉลี่ย และร้อยละการเกิดยอดเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 119

# สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า


15 จำนวนใบเฉลี่ย และร้อยละการเกิดใบเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 120

16 จำนวนรากเฉลี่ย ร้อยละการเกิดรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 121

17 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 ในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4..... 123

18 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์เฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี..... 125

19 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิเฉลี่ยด้วยวิธีการทางเคมีของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์..... 126

20 ขนาดความกว้างเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์..... 134

21 น้ำหนักสดเฉลี่ย และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์..... 135

22 จำนวนยอดเฉลี่ย และร้อยละการเกิดยอดเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์..... 136

23 จำนวนใบเฉลี่ย และร้อยละการเกิดใบเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์..... 137

24 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์เฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี..... 138

25 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิเฉลี่ยด้วยวิธีการทางเคมีของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์..... 139

26 ขนาดความกว้างเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 140

# สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า


27 น้ำหนักสดเฉลี่ย และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 149

28 จำนวนยอดเฉลี่ย และร้อยละการเกิดยอดเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 151

29 จำนวนใบเฉลี่ย และร้อยละการเกิดใบเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 152

30 จำนวนรากเฉลี่ย ร้อยละการเกิดรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 153

31 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 ในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4..... 155

32 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์เฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี..... 157

33 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิเฉลี่ยด้วยวิธีการทางเคมีของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์..... 158

34 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา..... 233

35 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไคเนตินและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา..... 236

36 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน α-ketobutyrate และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา..... 238

37 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา..... 240

# สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า


38 ค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์..... 243

39 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และค่าร้อยละการยับยั้ง..... 247

40 การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และค่าร้อยละการยับยั้ง..... 249

41 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา..... 251

# สารบัญภาพ

ภาพ หน้า


1 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นผิวใบ และบริเวณปากใบของต้นทานตะวัน..... 12
2 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บนมอส *Funaria hygrometrica*..... 13
3 ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* กับพืช..... 13
4 กระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบคาร์บอนอะตอมเดียวของ *M. extorquens* AM1..... 17
5 indole-3-acetic acid (IAA)..... 20
6 วิถีการสังเคราะห์ IAA ในพืช..... 21
7 วิถีการสังเคราะห์ IAA ในแบคทีเรีย..... 23
8 วิถี indole-3-pyruvic acid (IPA) pathway ในการสังเคราะห์ IAA ของแบคทีเรีย 25
9 วิถี indole-3-pyruvic acid pathway ในการสังเคราะห์ IAA ของพืช..... 26
10 วิถี indole-3-acetaldoxime (IAOX) pathway ในการสังเคราะห์ IAA ของแบคทีเรีย..... 29
11 กลไกการตอบสนองต่อ IAA ในพืช..... 31
12 *trans*-zeatin..... 33
13 การสังเคราะห์ไซโตไคนินโดยเอนไซม์ IPT และ tRNA-IPT..... 34
14 กระบวนการสังเคราะห์ไซโตไคนิน การเปลี่ยนรูป และการย่อยสลาย..... 36
15 กลไกการตอบสนองต่อไซโตไคนินในพืช..... 38
16 วิถีสังเคราะห์เอทิลีนในพืช..... 40
17 กลไกการควบคุมระดับเอทิลีนของพืชโดยเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรีย..... 41
18 การควบคุมระดับเอทิลีนในพืชโดย *Methylobacterium*..... 42
19 โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ ACC deaminase ใน *Ps. putida* UW4..... 43
20 หญ้าปักกิ่งที่นำมาแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*..... 59

# สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า


21 ตัวอย่างหญ้าปักกิ่งหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 71

22 หญ้าปักกิ่งที่ถูกตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร..... 72

23 ลักษณะชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในอาหารเหลวสูตร MS(1962) ในปริมาณต่าง ๆ..... 75

24 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่แช่อยู่ในสารละลายเซลล์ *M. radiotolerans* ED5-9..... 76

25 ลักษณะโคโลนีสีชมพูของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่พบบนอาหารแข็ง AMS ที่มีเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0.5..... 82

26 ลักษณะการติดสีแกรมลบของเซลล์แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 86

27 ลักษณะการสะสม PHB ภายในเซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 86

28 ผล TLC ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานไคเนติน (K) ซีเอติน (Z) และ ซีเอตินไรโบไซด์ (ZR).... 96

29 ผล TLC ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก..... 96

30 ผล TLC ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก..... 96

31 กราฟผล HPLC ของสารละลายมาตรฐานไคเนติน (K), ซีเอติน (Z) และ ซีเอตินไรโบไซด์ (ZR) ..... 98

32 กราฟผล HPLC ของสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานไคเนติน (K), ซีเอติน (Z) และซีเอตินไรโบไซด์ (ZR) ..... 99

33 กราฟผล HPLC ของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลท ED3-7..... 99

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพ | | หน้า |
|---|---|---|
| 34 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ IAA และเวลาของ *M. radiotolerans* ED5-9 ที่เลี้ยงในสภาวะแหล่งไนโตรเจน และค่า pH ที่แตกต่างกัน..... | 102 |
| 35 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและเวลาของ *M. radiotolerans* ED5-9 ที่เลี้ยงในสภาวะแหล่งไนโตรเจน และค่า pH ที่แตกต่างกัน..... | 103 |
| 36 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ปริมาณสารประกอบ IAA และระยะเวลาของ *M. radiotolerans* ED5-9 ในอาหารเหลว LNM ที่เติมแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับค่า pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 6.5..... | 104 |
| 37 | กราฟผล HPLC แสดงการเปรียบเทียบระหว่างสารละลายมาตรฐาน IAA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและน้ำหมักที่มีสารประกอบ IAA จาก *M. radiotolerans* ED5-9 ..... | 105 |
| 38 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์..... | 108 |
| 39 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์..... | 109 |
| 40 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์..... | 110 |
| 41 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... | 111 |
| 42 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเฉลี่ย และน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละกรรมวิธีกับระยะเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ..... | 118 |
| 43 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเฉลี่ยของยอด ใบ และราก รวมทั้งความยาวรากในแต่ละกรรมวิธีกับระยะเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... | 122 |
| 44 | กราฟความสัมพันธ์ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 ในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4..... | 124 |
| 45 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญและปริมาณคลอโรฟิลล์จากการวิเคราะห์ทางเคมีในสัปดาห์ที่ 4..... | 127 |
| 46 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์..... | 131 |
| 47 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์..... | 132 |
| 48 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์..... | 133 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพ | | หน้า |
|---|---|---|
| 49 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ | 144 |
| 50 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ | 145 |
| 51 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ | 146 |
| 52 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ | 147 |
| 53 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเฉลี่ย และน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง ในแต่ละกรรมวิธีกับระยะเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ | 150 |
| 54 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเฉลี่ยของยอด ใบ และราก รวมทั้งความยาวรากในแต่ละกรรมวิธีกับระยะเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ | 154 |
| 55 | กราฟความสัมพันธ์ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 ในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4 | 156 |
| 56 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญและปริมาณคลอโรฟิลล์จากการวิเคราะห์ทางเคมีในสัปดาห์ที่ 4 | 159 |
| 57 | ผลบวกของการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase | 221 |
| 58 | ผลบวกของการทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase | 222 |
| 59 | ผลลบของการทดสอบการสร้าง indole | 223 |
| 60 | ผลการทดสอบ MR-VP | 224 |
| 61 | ผลการทดสอบการใช้ซิเตรต | 225 |
| 62 | ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ | 226 |
| 63 | ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส | 227 |
| 64 | ผลลบของการทดสอบการย่อยแป้ง | 228 |
| 65 | ผลลบของการทดสอบการย่อยเจลาติน | 229 |
| 66 | ผลลบของการทดสอบการย่อยสลายเคซีน | 230 |
| 67 | ผลลบของการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง | 231 |
| 68 | ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลาย IAA | 233 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพ | | หน้า |
|---|---|---|
| 69 | สารละลายมาตรฐาน IAA หลังทำปฏิกิริยากับ salkowski reagent..... | 234 |
| 70 | ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลายไคเนติน..... | 236 |
| 71 | ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลาย α-ketobutyrate..... | 239 |
| 72 | สารละลายมาตรฐาน α-ketobutyrate..... | 239 |
| 73 | ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลาย BSA..... | 240 |
| 74 | สารละลายมาตรฐาน BSA..... | 241 |
| 75 | ผลการคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์ ด้วยโปรแกรม Statistix (SXW)..... | 245 |
| 76 | กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์ ของหญ้าปักกิ่ง..... | 246 |
| 77 | ตัวอย่างกราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้งของ trolox..... | 248 |
| 78 | ตัวอย่างกราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้งของสารสกัดตัวอย่าง..... | 250 |
| 79 | ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลาย gallic acid..... | 252 |
| 80 | กราฟ HPLC ของสารสกัดจากหญ้าปักกิ่ง (Jiratchariyakul, et al., 2006)..... | 253 |
| 81 | กราฟ HPLC ของสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... | 254 |
| 82 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 1 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0034 mg/l))ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 267 |
| 83 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 2 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0067 mg/l))ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 268 |
| 84 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 3 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0134 mg/l))ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 269 |
| 85 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 4 (Agar + $IAA^{FB}$(0.0034 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 270 |
| 86 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + BA(2.00 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 271 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพ | | หน้า |
|---|---|---|
| 87 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 6 (MS(1962) + IAA(2.00 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 272 |
| 88 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 7 (MS(1962) + BA(0.0067 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 273 |
| 89 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 8 (MS(1962) + IAA (0.0067 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 274 |
| 90 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 9 (MS(1962)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง สัปดาห์ที่ 4..... | 275 |
| 91 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 1 (MS(1962)/Cell 1 min) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 276 |
| 92 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 2 (MS(1962)/Cell 3 min) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 277 |
| 93 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 3 (MS(1962)/Cell 5 min) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 278 |
| 94 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 4 (MS(1962 + BA(2.00 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 279 |
| 95 | ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 4 (MS(1962 + IAAA(2.00 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4..... | 280 |

# บทที่ 1

# บทนำ

## ความเป็นมาของปัญหา

เนื่องด้วยกระแสการดูแลสุขภาพและสิ่งแวดล้อมของคนไทยในปัจจุบันที่ต้องการลดปริมาณการใช้ยารักษาโรคและผลิตภัณฑ์ที่มาจากสารเคมีสังเคราะห์ ทำให้คนไทยส่วนใหญ่กลับมาใช้สมุนไพร ที่เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวิตความเป็นอยู่ของคนไทยมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ดังนั้นสมุนไพรจึงเป็นตัวเลือกหนึ่งที่คนไทยนำมาใช้ในการดูแลรักษาสุขภาพ ประกอบกับในหลายท้องที่ของประเทศมีการสืบทอดภูมิปัญญาในการใช้สมุนไพรป้องกันและรักษาโรคมาเป็นเวลานาน จึงทำให้พืชสมุนไพรได้รับความนิยมเป็นอย่างมากอีกครั้ง ปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร และเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ใช้ในชีวิตประจำวันกันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังมีการคิดค้นตำรับยารักษาโรคที่มาจากสมุนไพรกันมากขึ้น มีการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ มากมายในปัจจุบันไม่เว้นแม้กระทั่งโรคมะเร็ง ที่เป็นสาเหตุการตายอับดับหนึ่งของประเทศไทย (ธีรวุฒิ คูหะเปรมมะ, 2556) สมุนไพรหลายชนิดมีสรรพคุณในการรักษาโรคมะเร็งหนึ่งในนั้น คือ หญ้าปักกิ่งหรือหญ้าเทวดา (*Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao and Kammathy) เป็นสมุนไพรที่คนไทยรู้จักมาเป็นเวลานานนิยมนำมาใช้รักษาและบรรเทาอาการจากโรคมะเร็ง ทำให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น มีการนำมาใช้ร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบันเพื่อลดอาการผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัด (สุภาภรณ์ ปิติพร และสุดใจ พรหมเกิด, 2555) การนำสมุนไพรมาใช้ผลิตเป็นยาในการรักษาโรคนั้นต้องใช้ปริมาณวัตถุดิบสมุนไพร ที่มีคุณภาพเป็นจำนวนมาก การเพาะปลูกสมุนไพรส่วนใหญ่ในปัจจุบันปลูกเพื่อใช้เฉพาะในครัวเรือน ส่วนการปลูกในเชิงเศรษฐกิจยังมีน้อยทั้ง ๆ ที่เป็นพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจสูง ทำให้ไม่เพียงพอกับความต้องการในปัจจุบัน ทั้งนี้การผลิตวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพดีต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดที่ต้องควบคุมในมาตรฐานคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรซึ่งต้องมีการคัดเลือกชนิดของสมุนไพรสายพันธุ์ที่เหมาะสม มีการสร้างสารออกฤทธิ์และมีปริมาณตรงตามที่ต้องการ ต้องไม่มีการปนเปื้อนสารเคมีสังเคราะห์ต่าง ๆ มีความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (สมภพ ประธานธุรารักษ์, 2554) ในปัจจุบันทั้งในเอเชียและยุโรปมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) มาใช้ในการขยายพันธุ์ และเก็บรักษาสายพันธุ์สมุนไพรที่มีคุณค่าทางการแพทย์และเภสัชกรรม แทนวิธี

การเพาะปลูกแบบดั้งเดิมที่ใช้เวลานาน ในการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้จำนวนมากเพียงพอต่อความต้องการ และไม่สามารถรักษาสายพันธุ์ผ่านทางเมล็ดได้ นอกจากนี้ยังใช้เก็บรักษาสายพันธุ์สมุนไพรบางชนิดที่เป็นสมุนไพรหายากที่ได้มาจากป่า และเสี่ยงสูญพันธุ์เนื่องจากพื้นที่ป่าถูกทำลายเป็นจำนวนมาก (Nalawade and Tsay, 2004; Debnath, Malik and Bisen, 2006)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปเป็นการเพาะเลี้ยงอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (protoplast) ให้เจริญเติบโตไปเป็นต้นใหม่ ภายใต้การเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมและปลอดเชื้อ การกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) ของชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชเหล่านั้นไปเป็น ราก ยอด ใบ หรือแคลลัส ตลอดจนเจริญเติบโตไปเป็นต้นใหม่ ถูกควบคุมโดยฮอร์โมน (hormone) หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ชนิดออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ (Neumann, Kumar and Imani, 2009) ตามธรรมชาติพืชสามารถสังเคราะห์ออกซินและไซโตไคนินได้เอง นอกจากนี้ยังสามารถพบการสังเคราะห์ออกซิน และไซโตไคนินได้ในแบคทีเรียยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs) เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในพืช มีความสัมพันธ์กับพืชแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) ไม่ก่อโรคกับพืชที่อาศัยร่วมอยู่ด้วย และสามารถสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting substances) ชนิดออกซินและไซโตไคนินออกมาช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่แบคทีเรียเข้าไปอยู่อาศัย ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น มีจำนวนใบและรากเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังมีปริมาณคลอโรฟิลล์สะสมเพิ่มขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ยังสามารถสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ที่สามารถควบคุมระดับของเอทิลีนภายในเนื้อเยื่อพืช ลดผลกระทบจากการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยเอทิลีน ทำให้รากพืชมีความยาวเพิ่มขึ้น และทำให้ต้นกล้าแข็งแรงสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ในดินเค็ม เป็นต้น (Morris and Polacco, 1997; Ivanova, Doronina and Trotsenko, 2001; Madhaiyan, et al., 2006; Hellmuth and Kutschera, 2008; Long, Radha, Savalgi and Alagawadi, 2009; Meenakshi and Savalgi, 2009)

เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมี และเข้าสู่วิถีเกษตรอินทรีย์ ดังนั้นการใช้สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่เป็นสารอินทรีย์ที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่อาศัยร่วมกับสมุนไพร จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้ทดแทนสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ยังสามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการลดผลกระทบจากเอทิลีนที่เกิดขึ้นจาก

เนื้อเยื่อพืชที่เสียหาย ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และยังคาดหวังว่าสามารถช่วยให้ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความแข็งแรงสามารถเจริญในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้มีความสนใจคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่อาศัยร่วมกับสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง ที่มีความสามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและเอนไซม์ ACC deaminase และพัฒนาวิธีการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อการขยายพันธุ์นำไปสู่การเป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพต่อไป

**จุดมุ่งหมายของการวิจัย**

1. เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่มีศักยภาพสามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเอนไซม์ ACC deaminase ที่คัดแยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง
2. เพื่อศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่ได้คัดเลือก
3. เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการใช้น้ำหมัก (fermentation broth) และสารละลายเซลล์จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่ได้คัดเลือก ที่สามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเอนไซม์ ACC deaminase ไปใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่ง

**สมมติฐานของการวิจัย**

แบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้จากใบของหญ้าปักกิ่ง มีความสามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและเอนไซม์ ACC deaminase และนำไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์และการผลิตสารสำคัญได้

**ขอบเขตการวิจัย**

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs จากใบหญ้าปักกิ่งเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ออกซิน ไซโตไคนินและเอนไซม์ ACC deaminase รวมถึงการจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ต่อการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเอนไซม์

ACC deaminase รวมทั้งศึกษาวิธีการไปประยุกต์ใช้ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารสำคัญของหญ้าปักกิ่งด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. ได้ชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่มีศักยภาพสามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ออกซิน ไซโตไคนิน และเอนไซม์ ACC deaminase

2. ได้วิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่มีผลต่อการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

3. ได้วิธีการใช้อย่างเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่งเพื่อการขยายพันธุ์และข้อมูลที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับการผลิตสารสำคัญ

# บทที่ 2

# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

**ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่ม** Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs)

PPFMs เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีการสร้างรงควัตถุสีชมพู ที่เป็นสารจำพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ขึ้นภายในเนื้อโคโลนี ไม่แพร่กระจายลงในอาหาร แบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกจัดอยู่ในสกุล *Methylobacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน มีขนาดเซลล์เท่ากับ 0.8-1.2 x 1.0-8.0 ไมโครเมตร การเรียงตัวของเซลล์อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ บางครั้งอาจมีการจัดเรียงตัวคล้ายดอกกุหลาบ (rosettes) ในช่วงปลายของระยะ stationary เซลล์อาจมีการแตกแขนงหรือมีรูปร่าง ไม่แน่นอน มีการสะสม poly-β-hydroxybutyrate (PHB) และ volutin granules ไว้ในเซลล์ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา (flagella) แต่ก็มีบางชนิดที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ทุกสายพันธุ์ต้องการออกซิเจนในกระบวนการหายใจ (aerobe) โดยใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (electron acceptor) สามารถใช้สารอินทรีย์และสารประกอบที่มีคาร์บอนอะตอมเดียว (C1 compounds) เช่น ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ฟอร์เมท (formate) และเมทานอล (methanol) เป็นแหล่งคาร์บอน พลังงานและอิเล็กตรอน นอกจากนี้มีเพียง *M. organophilum* ชนิดเดียวที่สามารถใช้มีเทน (methane) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ จึงทำให้แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรคาร์บอน ของธรรมชาติ แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไม่เพียงแต่ใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนอะตอมเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน พลังงานและอิเล็กตรอน ส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 95 ยังสามารถใช้กลีเซอรอล (glycerol) มาโลเนต (malonate) ซัคซิเนต (succinate) ฟูมาเรต (fumarate) อัฟฟา-คีโตกลูตาเรต (α-ketoglutarate) ดีแอล-แลคเตต (DL-lactate) ดีแอล-มาเลต (DL-malate) อะซิเตท (acetate) ไพรูเวต (pyruvate) โพรไพลีน ไกลคอล (propylene glycol) และเอทานอล (ethanol) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในส่วนของแหล่งไนโตรเจนแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สามารถใช้แอมโมเนีย (ammonia) ไนเตรต (nitrate) และยูเรีย (urea) เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ *M. thiocyanatum* สามารถใช้ไธโอไซยาเนต (thiocyanate) และไซยาเนต (cyanate) เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญได้ ไม่ต้องการ growth factors สำหรับการเจริญแต่มีบาง สายพันธุ์ต้องการแคลเซียมแพนโททีเนต (calcium pantothenate) ในการเจริญ (Green, 2005)

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มีโคโลนีสีชมพูอ่อนเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง methanol mineral salt agar หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และมีสีชมพูอ่อนหรือสีส้มแดงเมื่อเจริญบนอาหาร glycerol peptone agar เจริญได้ช้าหรืออาจไม่เจริญบนอาหาร nutrient agar เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่ไม่มีการเขย่ามีการเจริญขึ้นเป็นฝ้าหรือมีลักษณะเป็นวงแหวนสีชมพูอ่อนเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยง แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไม่สามารถย่อยสลายหรือไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) เคซีน (casein) แป้ง (starch) เจลลาติน (gelatin) เซลลูโลส (cellulose) เลซิติน (lecithin) และ ดีเอ็นเอ (DNA) แต่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) บางสายพันธุ์สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยไขมันได้บ้างเล็กน้อย แต่ไม่สร้างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) แอล-ออร์นิทีน ดีคาร์บอกซิเลส (L-ornithine decarboxylase) แอล-ไลซีน ดีคาร์บอกซิเลส (L-lysine decarboxylase) และแอล-อาร์จินีน ไดไฮโดรเลส (L-arginine dihydrolase) ไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ($H_2S$) และอินโดล (Indole) ยกเว้น *M. thiocyanatum* ที่สร้างอินโดล ให้ผลการทดสอบออกซิเดส (oxidase) และแคตาเลส (catalase) เป็นบวก MR-VP เป็นลบ บางสายพันธุ์สามารถรีดิวซ์ (reduce) ไนเตรต (nitrate) เป็นไนไตร์ต (nitrite) ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ส่วนใหญ่มีอุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส แต่มีบางชนิดที่เจริญที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า และบางชนิดเจริญ ได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญจะเป็นช่วง pH ที่เป็นกลาง แต่ก็มีบางชนิดที่เจริญได้ที่ pH 4 และที่ pH 10 (Green, 2005)

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สามารถพบแพร่กระจายทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน ฝุ่น น้ำจืด ตะกอนทะเลสาบ (Green, 2006) และบนพื้นผิวของวัสดุต่าง ๆ เช่น โลหะ ไม้ แก้ว พลาสติก หิน คอนกรีต ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ย 0.14 – 1.9 cfu ต่อตารางเซนติเมตร (Corpe, 1985) แต่จะพบเป็นจำนวนมากที่บริเวณใบพืช โดยจะมีปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ประมาณ $10^4$-$10^7$ cfu ต่อกรัมของพืช (Madhaiyan, et al., 2005)

**การศึกษาแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในพืช**

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สามารถพบได้ในพืชหลายชนิดตั้งแต่พืชชั้นต่ำที่ไม่มีท่อลำเลียง (bryophyte) เช่น มอส (*Funaria hygrometrica* L.) และลิเวอร์เวิรต์ (liverworts) ได้แก่ *Marchantia polymorpha* L. และ *Lunularia cruciata* L. (Corpe and Basile, 1982; Hornschuh, Grotha and Kutschera, 2002; Kutschera and Koopmann, 2005) ไปจนถึงพืช

ชั้นสูงหลายชนิดซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันไป จากการศึกษาของ Corpe (1985) โดยใช้วิธีการทาบใบไม้ชนิดต่าง ๆ ลงบนอาหาร methanol-ammonium salts agar พบปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* อยู่ในช่วงระหว่าง 0.1 cfu ต่อตารางเซนติเมตร ถึงมากกว่า $5 \times 10^2$ cfu ต่อตารางเซนติเมตร ต่อมาการศึกษาของ Corpe and Rheem (1989) ได้เปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* กับแบคทีเรียกลุ่ม heterotrophs บริเวณผิวใบอ่อนของต้นไวท์โคลเวอร์ (*Trifolium repens*; white clover) พบว่ามีปริมาณอยู่ระหว่างร้อยละ 3 - 79 ต่อตารางเซนติเมตร หรือคิดเป็นปริมาณร้อยละเฉลี่ย เท่ากับ 36 ต่อตารางเซนติเมตร โดยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สามารถใช้เมทานอลที่มาจากการเจริญของใบพืชได้ดีกว่าสารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอม และในการศึกษาของ Chanprame, Todd and Widholm (1996) โดยใช้วิธีการทาบใบไม้ชนิดต่าง ๆ (ดังตาราง 1) บนอาหาร ammonium mineral salts (AMS) พบว่ามีปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บนพื้นผิวของใบไม้อยู่ระหว่าง 0.5 cfu ต่อตารางเซนติเมตรถึง 69.4 cfu ต่อตารางเซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ภายในเนื้อเยื่อของ *Episcia cupreata* (Hook.) Hants., *Dieffenbachia maculate* Lodd., *Streptocarpus saxorum* Engl. และ *Zebrina pendula* Schnizl หลังจากผ่านการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวและทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) โดยมีปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เท่ากับ 6, 12, 56 และ 240 cfu ต่อ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ

**ตาราง 1 ปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่พบบนผิวใบพืชชนิดต่าง ๆ**

| วงศ์ (Families) | ชนิดของพืช (Species) | ปริมาณ *Methylobacterium* (cfu/cm$^2$) |
|---|---|---|
| Acarthaceae | *Ruellia makoyama* Makoy ex Closon | 0.5 |
| Asteraceae | *Gynura aurantiaca* (B1.) DC. | 69.4 |
| Araceae | *Dieffenbachia maculata* Lodd | 27.0 |
| | *Philodendron scandens* K. Koch & Sello | 1.2 |
| | *Spattiphylum wallisii* Reg. | 4.9 |
| | *Syngonium podophyllum* Schoot | 1.3 |
| Araliaeeae | *Brassaia actinophylla* Endl. | 1.6 |
| | *Fatsiajaponica* (Thumb,) Decne&Planch | 10.0 |
| | *Hedera helix* L. | 3.1 |

ตาราง 1 (ต่อ)

| วงศ์ (Families) | ชนิดของพืช (Species) | ปริมาณ *Methylobacterium* ($cfu/cm^2$) |
|---|---|---|
| Begoniaceae | *Begonia bowerae* Ziesenh. | 1.0 |
| Commelinaceae | *Zebrina pendula* Schnizl | 7.6 |
| Crassulaceae | *Kalanchoe tomentosa Bak.* | 5.2 |
| Euphorbiaceae | *Codiaeum variegatum (L.) B1.* | 1.7 |
| Gesneriaceae | *Columnia microphylla Orst.* | 4.5 |
| | *Episcia cupreata (Hook.) Hanst.* | 2.8 |
| | *Saintpaulia ionantha Wendl.* | 1.8 |
| | *Sinningia speciosa (Lodd.) Hiern* | 3.4 |
| | *Streptocarpus saxorum Engl.* | 44.0 |
| Libiatae | *Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng* | 3.6 |
| | *Plectranthus australis Benth.* | 7.5 |
| Leguminoeeae | *Glycine max* (L.) Merr. cv. Chamberlain | 2.8 |
| | *Glycine max* (L.) Merr. cv. Clark 63 | 1.1 |
| | *Glycine max* (L.) Merr. cv. Jack | 3.0 |
| Liliaceae | *Aloe barbadensis* Mill. | 0.9 |
| | *Chlorophytum comosum* (Thumb.) Jacques. | 6.7 |
| Marantaceae | *Maranta leuconeura* E. Morr. | 1.5 |
| Piperaceae | *Peperomia clusiaefolia* (Jacq.) Hook | 1.9 |
| | *Peperomia orba* Bunting. | 56.4 |
| Polypodiaceae | . *Davalliafejeensis* Hook. | 2.7 |
| | *Nephrolepis exaltta* (L.) Schott. | 4.3 |
| | *Pellaea rotundifolia* (Frost. F.) Hook. | 2.1 |
| | *Pteris cretica L.* | 1.0 |
| Rosaceae | *Fragaria x ananassa* Duchesne | 3.9 |
| Saxifragaceae | *Saxifraga stolonifera* Meerb. | 5.2 |
| Solanaceae | *Nicotiana tabacum* L. | 2.8 |
| Umbelliferae | *Daucus carota* L | 6.2 |

ตาราง 1 (ต่อ)

| วงศ์ (Families) | ชนิดของพืช (Species) | ปริมาณ *Methylobacterium* ($cfu/cm^2$) |
|---|---|---|
| Urticaceae | *Pellionia daveauana* (Cur=.) N.E. Br. | 6.7 |
| | *Pilea microphylla* Liebm. | 5.4 |
| | *Pilea nummularifolia* Wedd. | 7.6 |
| | *Pilea spruceana* Lindl. | 27.2 |

**ที่มา**: ดัดแปลงจาก Chanprame, Todd and Widholm, 1996

**การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มแยก** epiphytic *Methylobacterium*

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* หลายชนิดที่สามารถพบได้บนผิวใบพืช (epiphytes) ยกตัวอย่างเช่น ในการศึกษาของ Orf, et al. (2005) ที่พบ *M. mesophilicum* บนใบถั่วปากอ้า (faba bean) *M. fujisawaense* บนใบถั่วลิสง (peanut) และ *M. radiotolerans* บนใบถั่วเหลือง (soybean) ถั่วลูกไก่ (chick pea) และถั่วแขก (common bean) Schauer and Kutschera (2008) พบ *M. mesophilicum*, *M. extorquens* และ *M. radiotolerans* บนพื้นผิวตามส่วนต่าง ๆ ของต้นทานตะวัน (*Helianthus annuus*) Raja, Balachandar และ Sundaram (2008) พบ *M. populi*, *M. thiocyanatum*, *M. suomiense*, *M. aminovorans* และ *M. fujisawaense* ในฝ้าย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ต้นทานตะวัน ถั่วเหลือง และสะระแหน่

**การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มแยก** endophytic *Methylobacterium*

นอกจากจะพบแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บนผิวใบพืชแล้วยังพบได้ภายในเนื้อเยื่อพืช ยกตัวอย่างเช่น ในการศึกษาของ Pirttia, et al. (2000) พบ *M. extorquens* จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาของต้นสน (*Pinus sylvestris* L.) Araujo, et al. (2002) พบ *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans* และ *M. Zatmanii* ในเนื้อเยื่อของส้ม (*Citrus sinensis*) Aken, Yoon and Schnoor (2004) พบ *Methylobacterium* sp. Bj001 ในเนื้อเยื่อของลูกผสมของต้น poplar (*Populus deltoides* x *nigra* DN34) Mano and Morisaki (2008) และ Kaga, et al. (2009) พบ *M. fujisawaense* และ *M. radiotolerans* ในเนื้อเยื่อต้นข้าว (*Oryza sativa*) บริเวณยอดและรากของข้าวทั้งต้นแก่และต้นอ่อน

**ปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในพืช**

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บางชนิดสามารถพบได้ทั้งบนพื้นผิวและภายในเนื้อเยื่อพืช เช่น *M. mesophilicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense* และ *M. radiotolerans* โดยชนิดและปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่

1. **ฤดูกาล** การศึกษาในต้นเรดโคลเวอร์ (*Trifolium pratense*; red clover) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) ปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ลดลงจากฤดูใบไม้ผลิจนถึงฤดูร้อน แต่ปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในตอนปลายของฤดูเพาะปลูก (Omer, Tombolini and Gerhardson, 2004)

2. **พื้นที่เพาะปลูก** การศึกษาใน *Arabidopsis thaliana* ที่ปลูกต่างพื้นที่มีชนิดและปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* แตกต่างกัน แต่ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* คล้ายกันกับพืชแวดล้อมที่เจริญอยู่ในพื้นที่เดียวกัน (Knief, et al., 2010)

3. **ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการและชนิดของพืช** โดยชนิดและปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มีความหลากหลายแตกต่างกันไปตามการวิวัฒนาการที่มีร่วมกันมาระหว่างตัวแบคทีเรียและชนิดของพืช เป็นผลจากกระบวนการทางสรีรวิทยาระหว่างพืชและแบคทีเรีย (Knief, Frances and Vorholt, 2010) จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในต้นทานตะวัน ถั่วเหลือง และฝ้าย ส่วนสะระแหน่ โดยพบ *M. populi* มากที่สุด รองลงมาคือ *M. aminovorans* และในต้นทานตะวันมีความหลากหลายของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มากที่สุด รองลงมาคือ ถั่วเหลือง และฝ้าย ส่วนสะระแหน่มีความหลากหลายของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* น้อยสุด (Raja, Balachandar and Sundaram, 2008)

4. **ระยะการเจริญเติบโตของพืช** การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในแต่ละช่วงการเจริญของต้นข้าวพบว่าปริมาณของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในระยะที่ข้าวเจริญเป็นต้น (vegetative) ไปจนถึงระยะที่ข้าวออกรวง (flowering) และลดลงในระยะเก็บเกี่ยว (harvesting) (Madhaiyan, Poonguzhali and Sa, 2007)

นอกจากนี้พบว่า บริเวณที่โดนแสงแดดของต้นทานตะวันมีปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มากกว่าในส่วนที่ไม่โดนแสงแดด และพบ *M. mesophilicum* เป็นจำนวนมากในส่วนที่โดนแสงแดด (Schauer and Kutschera, 2008)

**การอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* และพืช**

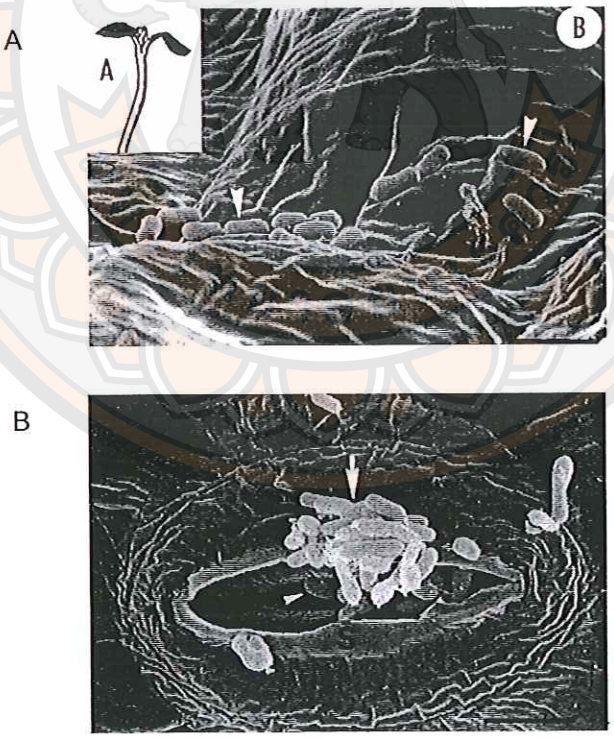
Romannovskaya, et al. (2001) พบว่า แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไม่ได้อาศัยร่วมกับพืชมาตั้งแต่ต้นพืชงอกจากเมล็ด แต่พบแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เมื่อพืชเจริญเติบโตเป็นต้น แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่พบอาศัยบนใบพืชมาจากฝุ่นละอองหรือดินที่มีแบคทีเรียอาศัยอยู่ถูกพัดพามาตกลงบนใบพืช และมีการเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อพืชเจริญเติบโต Omer, Tombolini and Gerhardson (2004) ได้ทดลองเพาะแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ลงบนเมล็ดข้าวสาลี พบว่าหลังจากที่มีการงอกของเมล็ดข้าวสาลี แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เคลื่อนย้ายไปอยู่ที่บริเวณรากของต้นอ่อน

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนใบพืชมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมบนใบพืชที่มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงของอุณหภูมิและความชื้น อีกทั้งอย่างปริมาณสารอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัด นอกจากนี้ยังมีรังสียูวีที่เป็นอันตรายกับเซลล์ของแบคทีเรีย (Wilson, Hirano and Lindow, 1999) แบคทีเรียมีการปรับตัวให้กับสภาพแวดล้อมที่วิกฤตเหล่านั้นโดยอาจมีการสร้างพิไล (pili) หรือแฟลกเจลลาในการยึดเกาะติดกับผิวใบพืช หรือในแบคทีเรียบางชนิดอาจสร้าง extracellular polysaccharide (EPS) ขึ้นมาเพื่อป้องการตัวแบคทีเรียจากการขาดน้ำและยังช่วยในการยึดเกาะผิวใบพืช นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันรังสียูวี ช่วยปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมและช่วยในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Morris, Monier and Jacques, 1997; Gal, et al., 2003) ในการป้องกันรังสียูวี พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีการสร้างรงควัตถุสีชมพูหรือสีส้มขึ้นมาเพื่อป้องกันอันตรายจากรังสียูวีบี (Sundin and Jacobs 1999)

สำหรับการปรับตัวของแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมที่มีระดับความชื้นและปริมาณสารอาหารที่ต่ำ แบคทีเรียอาจไปอาศัยบริเวณปากใบ (stroma) เป็นบริเวณที่มีการปล่อยน้ำและสารอาหารออกมา (Mereier and Lindow, 2000) หรือแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Pseudomonas* spp. มีการสร้างสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ออกมาเพื่อช่วยในการแพร่ผ่านของน้ำและสารอาหารจากคิวติเคิล (cuticle) ที่เคลือบอยู่ที่ผิวของใบพืช (Bunster, Fokkema and Schippers, 1989; Schreiber, et al., 2005) หรือแบคทีเรียที่ผิวใบพืชมีกลไกในการสร้างออกซินหรือ indole-3-acetic acid (IAA) ออกมาช่วยเพิ่มการปริมาณการหลั่งสารอาหารจากพืช (Brandl and Lindow, 1998; Manulis, et al., 1998)

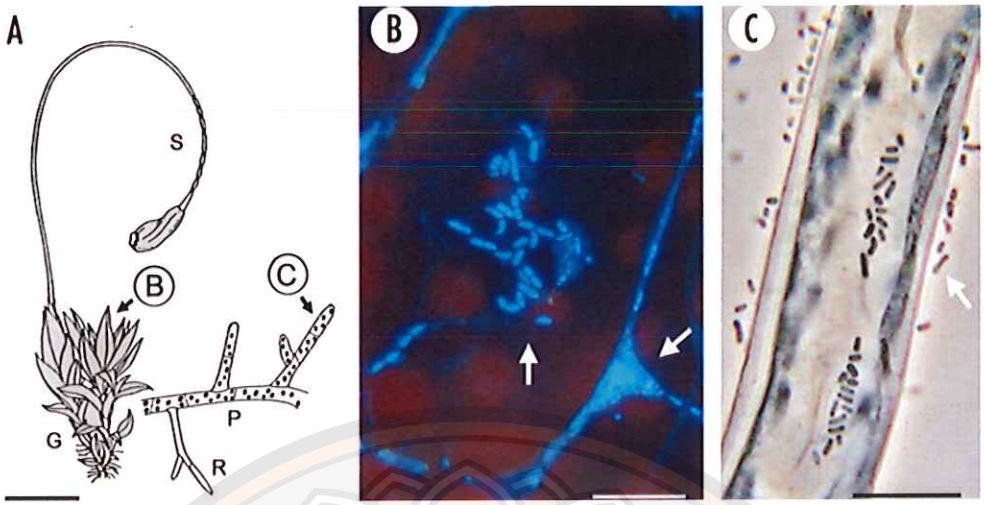
Kutschera (2007) ได้แสดงให้เห็นการอาศัยอยู่ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บนพืชโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (scanning electron microscope; SEM) แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากบริเวณพื้นผิวของใบต้นทานตะวันโดยไม่สร้างความเสียหายให้กับพืชที่อาศัยอยู่ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า มีกลุ่มของ

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่บริเวณปากใบ และมีบางเซลล์ที่เข้าไปอยู่ภายในช่องว่างของปากใบ (ดังภาพ 1) นอกจากนี้ยังได้แสดงการอาศัยอยู่ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บริเวณแผ่นใบของมอส *Funaria hygrometrica* โดยการส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope) พบว่า แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* อาศัยอยู่อย่างอิสระ และบางส่วนเกาะติดกับพื้นผิวของผนังเซลล์ของมอสหลังงอกจากสปอร์ได้ 5 วัน (ดังภาพ 2) จากการอาศัยอยู่ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บนพื้นผิวใบของพืชทำให้มีตั้งสมมุติฐานความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับพืชที่อาศัยร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) โดยเมื่อพืชเจริญเติบโตจะมีการปล่อยของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึม เช่น เมทานอล และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ กรดอะมิโน เป็นต้นแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ใช้ของเสียที่ถูกปล่อยมานี้ในการเจริญ เมื่อแบคทีเรียเจริญมีการปล่อยแอมโมเนียมไอออนกลับออกมาให้พืชไปใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถสร้างฮอร์โมนพืช ได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนินออกมาเป็นสัญญาณไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชต่อไป (ดังภาพ 3)



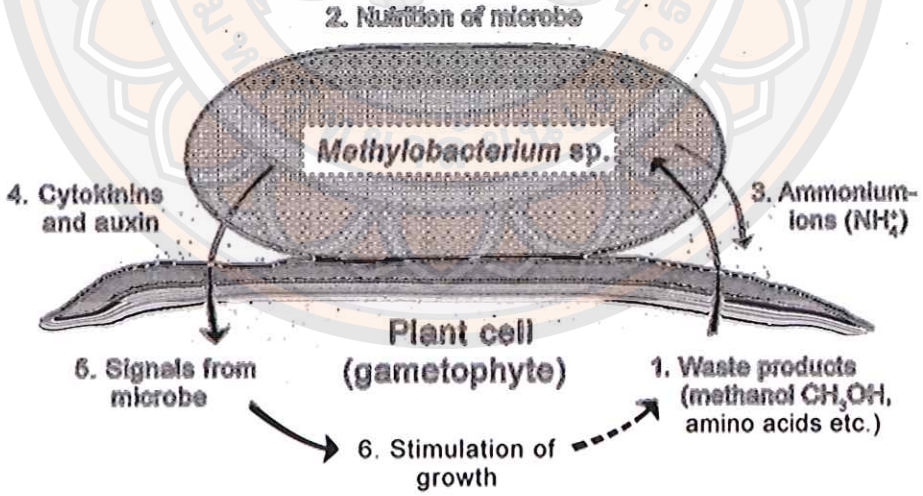

**ภาพ 1 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นผิวใบ (A) และบริเวณปากใบ (B) ของต้นทานตะวัน**

**ที่มา:** Kutschera, 2007




ภาพ 2 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บนมอส *Funaria hygrometrica* (A) ลักษณะต้นมอสที่โตเต็มที่ (B) ภาพจากกล้องฟลูออเรสเซนต์ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บนแผ่นใบของมอส (C) แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* อิสระและบนพื้นผิวของมอสที่งอกจากสปอร์ ได้ 5 วัน

**ที่มา:** Kutschera, 2007




ภาพ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* กับพืช

**ที่มา:** Kutschera, 2007

**กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เมื่อเจริญบนเมทานอล**

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่อาศัยอยู่บริเวณใบพืชใช้เมทานอลที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากการเจริญเติบโตของพืชเป็นแหล่งคาร์บอนพลังงานในการเจริญของแบคทีเรีย โดยเมทานอลที่ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นผลพลอยได้ (by-product) ของการย่อยสลายเพคติน (pectin) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชโดยเอนไซม์ pectinmethylesterase (Gaffe, Tieman and Handa, 1994) หรืออาจเกิดจากการย่อยสลายหมู่เมทิล (methyl) ของลิกนิน (lignin) โดยเอนไซม์จากแบคทีเรียและเชื้อรา (Ander, Eriksson and Eriksson, 1985) เมทานอลที่เกิดขึ้นถูกปลดปล่อยออกมาผ่านทางปากใบ เมื่อปากใบปิดมีผลทำให้ปริมาณเมทานอลลดลง เมทานอลถูกปลดปล่อยจากบริเวณท้องใบมากที่สุด ปริมาณการปลดปล่อยเมทานอลขึ้นอยู่กับพัฒนาการของใบและลดลงตามอายุของใบที่เพิ่มขึ้น (Nemecek-Marshall, et al., 1995) อัตราการปลดปล่อยเมทานอลขึ้นกับการเจริญของใบพืช พบว่า ใบอ่อนมีอัตราการปลดปล่อยเมทานอลอยู่ระหว่าง 0.2 - 3.8 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียสอัตราการปลดปล่อยเพิ่มขึ้น 2.3 เท่า นอกจากนี้อัตราการปลดปล่อยเมทานอลลดลงในเวลากลางคืนเนื่องจากการเจริญของใบพืชลดลง (Harley, et al., 2007)

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มีกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) เพื่อใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ (ดังภาพ 4) ในกรณีที่แบคทีเรียมีความต้องการพลังงานกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอลผ่านเข้าสู่วิถีดิสสิมิเลชั่น (dissimilation pathways) แต่ถ้าแบคทีเรียต้องการสังเคราะห์สารกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอลผ่านเข้าสู่วิถีแอสซิมิเลชั่น (assimilation pathways) (Chistoserdova, 2011) จากการศึกษาใน *M. extorquens* AM1 เมทานอลถูกกระบวนการออกซิเดชั่นเปลี่ยนเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญของกระบวนการเมแทบอลิซึม และเป็นจุดแยกระหว่างกระบวนการออกซิเดชั่นฟอร์มัลดีไฮด์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และพลังงานสำหรับการเจริญ และกระบวนการแอสซิมิเลชั่นสำหรับสังเคราะห์สารต่าง ๆ เพื่อใช้ในการเจริญและสร้างชีวมวล (biomass) (Yurimoto, Kato and Sakai, 2005)

**วิถีดิสสิมิเลชั่น (dissimilation pathways)** (Chistoserdova, et al., 2007)

เป็นวิถีที่แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอลไปเป็นพลังงานสำหรับการเจริญ ประกอบด้วยขั้นตอนพื้นฐาน 3 ขั้นตอน คือ

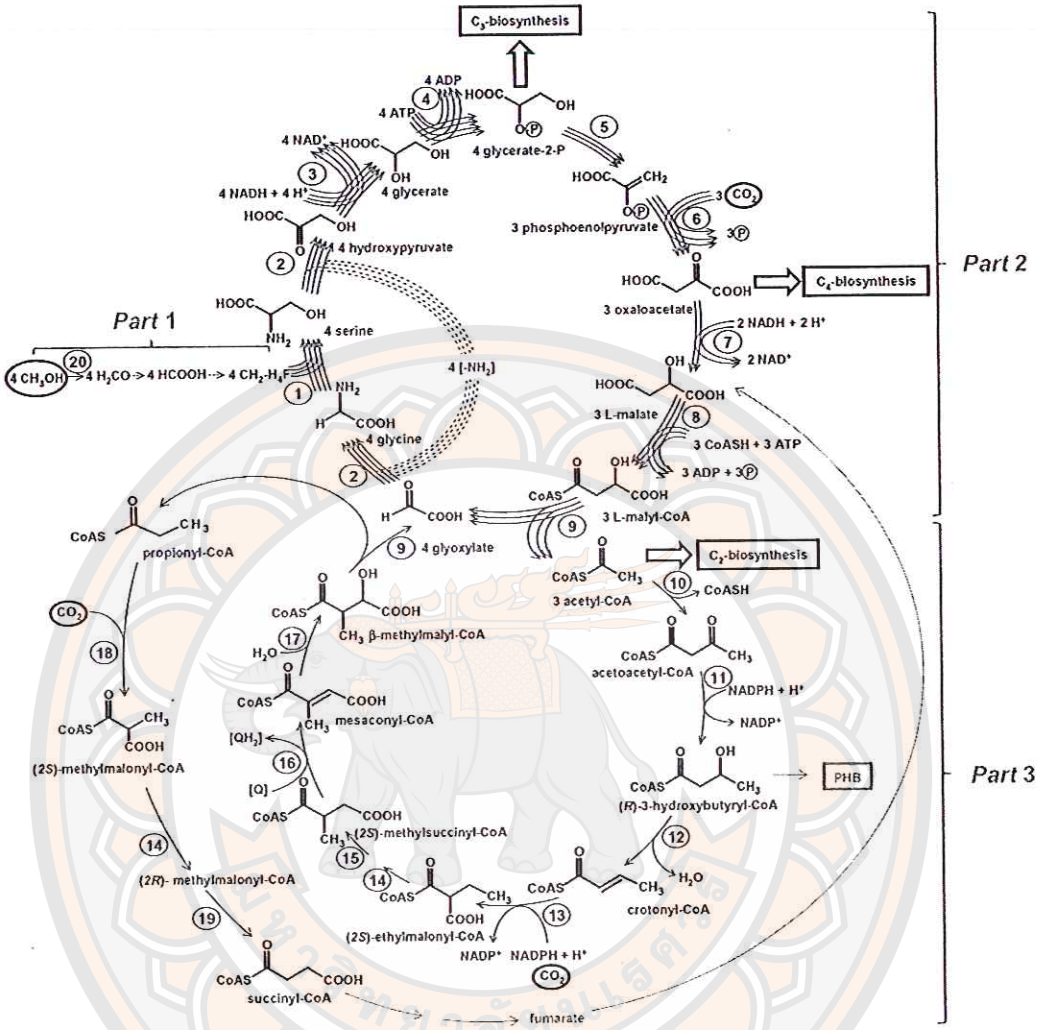
1. **ขั้นแรก** เป็นกระบวนการออกซิเดชั่นสารประกอบคาร์บอนอะตอมเดียว ที่เป็นสารตั้งต้นเช่น เมทานอล หรือเมทิลเอมีน (methylamine) เปลี่ยนไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์
2. **ขั้นที่สอง** เป็นกระบวนการออกซิเดชั่นฟอร์มัลดีไฮด์เปลี่ยนไปเป็นฟอร์เมท
3. **ขั้นที่สาม** เป็นกระบวนการออกซิเดชั่นฟอร์เมทเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และพลังงาน

สำหรับกระบวนการออกซิเดชั่นเมทานอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์เกิดขึ้นบริเวณเพอริพลาสซึม (periplasm) โดยใช้เอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนส (methanol dehydrogenase; MDH) ถูกถอดรหัสจากยีน *maxFI* และใช้ไพโรโลควิโนลีน ควิโนน (pyrroloquinoline quinone; PQQ) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนส่งต่อไปยังไซโตโครม $c_L$ (cytochrome $c_L$) ถูกถอดรหัสจากยีน *maxG* (Anthony, 1982; Amaratunga, et al., 1997) จากนั้นฟอร์มัลดีไฮด์ถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นฟอร์เมทในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ผ่านวิถี tetrahydromethanopterin (tetrahydromethanopterin ($H_4$MPT)-dependent pathway) กระบวนออกซิไดส์ฟอร์มัลดีไฮด์เป็นขั้นตอนสำคัญในการลดความเป็นพิษของฟอร์มัลดีไฮด์ต่อเซลล์แบคทีเรีย โดยฟอร์มัลดีไฮด์จับกับโคแฟกเตอร์ $H_4$MPT ไปเป็น methylene-$H_4$MPT โดยเอนไซม์ formaldehyde-activating enzyme จากนั้นถูกเปลี่ยนไปเป็น methenyl-$H_4$MPT โดยเอนไซม์ methylene-$H_4$MPT dehydrogenase ต่อจากนั้น methenyl-$H_4$MPT ถูกเอนไซม์ methenyl-$H_4$MPT cyclohydrolase เปลี่ยนไปเป็น formyl-$H_4$MPT ถูกเปลี่ยนเป็นฟอร์เมทโดยเอนไซม์ formyltransferase/hydrolase complex (Crowther, Kosaly and Lidstrom, 2008) ฟอร์เมทที่เกิดขึ้นถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์ฟอร์เมทดีไฮโดรจีเนส (formate dehydrogenase; FDH) เป็นการสิ้นสุดวิถีดิสสิมิเลชั่น (Chistoserdova, et al., 2007)

**วิถีแอสซิมิเลชั่น (assimilation pathways)**

เป็นวิถีที่แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอลไปเป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารต่าง ๆ เพื่อใช้ในการเจริญและสร้างชีวมวล โดยแตกต่างจากวิถีดิสสิมิเลชั่นตรงที่เกิดสารตั้งต้นหลายตัว แต่ละตัวเป็นสารตั้งต้นของวิถีต่าง ๆ ได้แก่ ฟอร์มัลดีไฮด์เป็นสารตั้งต้นของวิถี Ribulose-monophophate (ribulose-monophosphate pathways; RuMP), คาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารตั้งต้นของวัฏจักร Calvin-Benson-Bassham

(Calvin-Benson-Bassham cycle, CBB) และ methylene-tetrahydrofolate (Me-THF) เป็นสารตั้งต้นของวัฏจักร serine (serine cycle) วัฏจักรนี้พบในแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* (Chistoserdova, Kalyuzhnaya and Lidstrom, 2005; Chistoserdova, 2011) ในกระบวนการแอสซิมิเลชั่นเริ่มต้นจากฟอร์เมทรวมตัวกับ tetrahydrofolate ($H_4F$) เปลี่ยนเป็น 5-formyl- $H_4F$ ถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็น methylene- $H_4F$ เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์แบคทีเรียโดยผ่านวัฏจักร serine โดย methylene-$H_4F$ รวมกับ glycine เปลี่ยนรูปมาจาก glyoxylate ได้เป็น serine จากนั้น serine ถูกเปลี่ยนเป็น glycerate-2-phosphate, phosphoenolpyruvate (PEP), oxaloacetate และ malyl-CoA ตามลำดับ malyl-CoA ถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น acetyl-CoA เข้าสู่วิถี ethylmalonyl-CoA (ethylmalonyl-CoA pathways) ได้เป็น glyoxylate กลับเข้าสู่วัฏจักร serine ต่อไป (ดังภาพ 4) (Smejkalova, Erb and Fuchs, 2010)




ภาพ 4 กระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบคาร์บอนอะตอมเดียวของ *M. extorquens* AM1

**ที่มา**: Smejkalova, Erb and Fuchs, 2010

**สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช**

สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting substances) เป็นสารในกลุ่มฮอร์โมนพืช (plants hormones) ที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่ไม่ใช่พืช มีฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนพืช มีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของพืช สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้ (นันทนา อังกินันทน์, 2549) เช่นเดียวกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนพืช ในปัจจุบันมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ชนิดออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชและการกำเนิดอวัยวะในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2545) สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชสามารถถูกสังเคราะห์ได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งยูคาริโอตและโปรคาริโอต (ดังตาราง 2) (Tsavkelova, et al., 2006)

**ตาราง 2 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช**

| สารควบคุมการเจริญ | Prokaryotes | | Eukaryotes | |
|---|---|---|---|---|
| | heterotrophs | phototrophs | algae | fungi |
| Auxin | *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, Xanthomonas* | *Anabaena, Anabaenopsis, Calothrix, Chlorogloeopsis, Cylindrospermum, Gloeothece, Nostoc, Plectonema, Synechocystis* | *Chlorella, Dunaliella, Fucus* | *Alternaria, Amanita, Aspergillus, Colletotrichum, Fusarium, Hebeloma, Laccaria, Lentinus, Monilia, Paxillus, Penicillium, Phoma, Phymatotrichum,Phytophtora, Pisolithus, Plasmodiophora, Pythium, Rhizoctonia, Rhizopogon, Rhizopus, Saccharomyces, Sclerotium, Taphrina, Ustilago* |

ตาราง 2 (ต่อ)

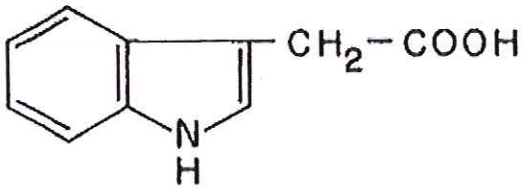
| สารควบคุมการเจริญ | Prokaryotes | | Eukaryotes | |
|---|---|---|---|---|
| | heterotrophs | phototrophs | algae | fungi |
| Cytokinins | *Agrobacterium, Aminobacter, Arthrobacter, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Blastobacter, Escherichia, Erwinia, Hyphomicrobium, Methiloarcula, Methylobacillus, Methylobacter, Methylobacterium, Methylomonas, Methylophylus, Methylosinus, Methylovorus, Paracoccus, Pseudomonas, Rhizobium, Rhodococcus, Streptomyces, Xanthobacter* | *Anabaena, Calothrix, Chlorogloeopsis, Rhodospirillum* | Certain red and brown algae | *Dictiostellium, Fusarium, Paxillus, Phoma, Rhizopogon, Saccharomyces, Schizophyllum, Schizosaccharomyces, Suillus, Taphrina, Trichoderma, Uromyces* |

**ที่มา**: ดัดแปลงจาก Tsavkelova, et al., 2006

จากตาราง 2 แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งชนิดออกซิน และไซโตไคนิน (Ivanova, et al., 2000; Ivanova, Doronina and Trotsenko, 2001) นอกจากนี้สามารถสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase สำหรับควบคุมระดับของเอทิลีน (ethylene) ในพืช (Madhaiyan, et al., 2004)

**สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดออกซิน**

ออกซินเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของออร์โมนพืช มีโครงสร้างเป็นสารประกอบอินโดลที่มีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) เชื่อมกับวงอินโดลที่หมู่เมทิลีน (methylene group) (ดังภาพ 5) ออกซินชนิดที่พบมากที่สุดในพืช คือ indole-3-acetic acid (IAA) ถูกสังเคราะห์ขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอด ใบอ่อน และผลที่กำลังเจริญ สามารถเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ ส่วนใหญ่พบได้ในวาสคิวลาร์แคมเบียม (vascular cambium) และโพรแคมเบียสแตรนด์ (procambial strands) อาจพบในอีพิเดอร์มอลเซลล์ (epidermal cells) การเคลื่อนย้ายไปยังรากอาจผ่านท่อลำเลียงอาหาร (phloem) (Davies, 2004)




**ภาพ 5** indole-3-acetic acid (IAA)

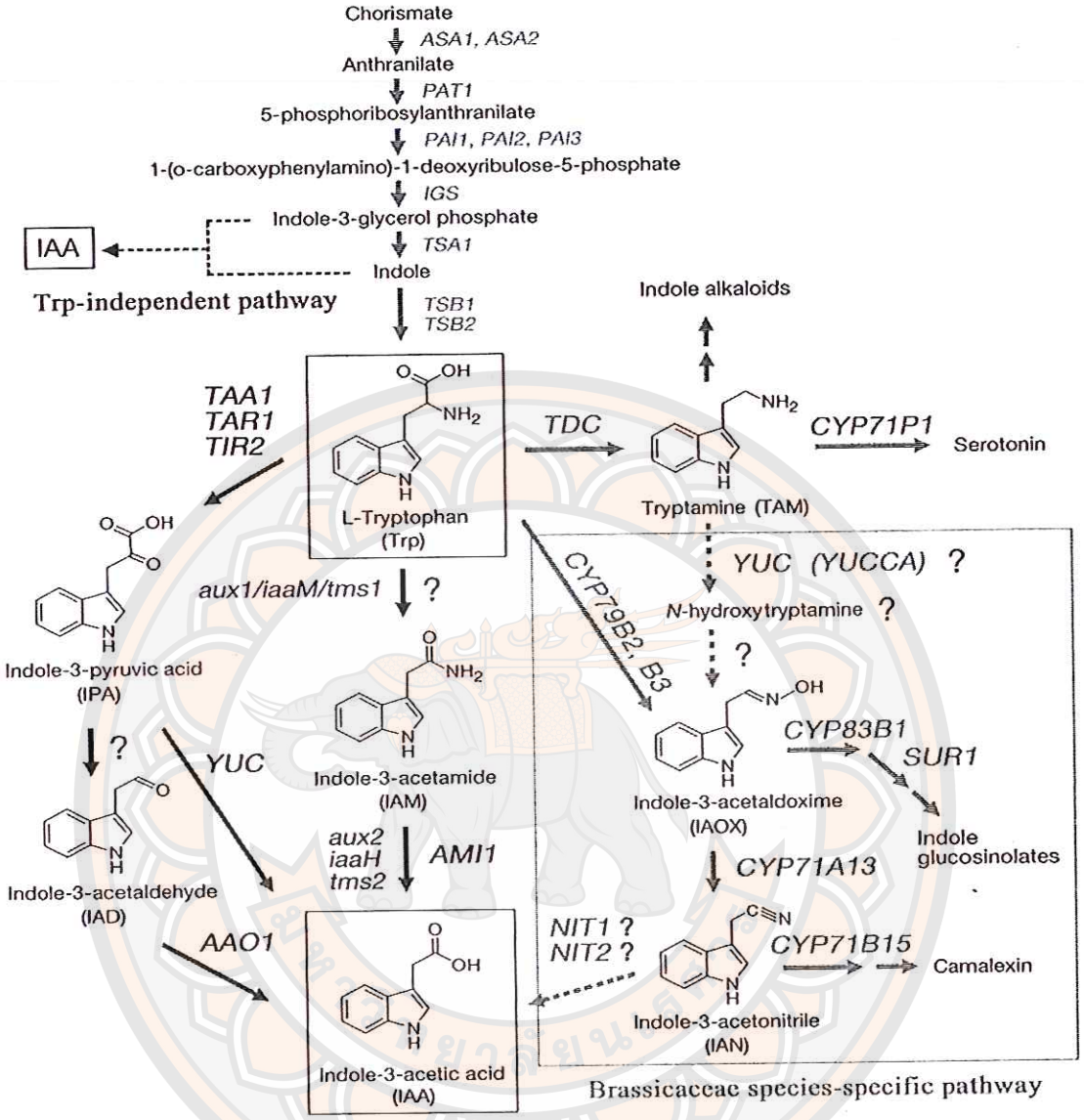
**ที่มา:** Davies, 2004

**ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของพืช**

ออกซินมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยทำให้มีการขยายขนาดของเซลล์ เกิดการเจริญของก้าน กระตุ้นการแบ่งเซลล์ในแคมเบียม (cambium) ร่วมกับไซโตไคนิน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของท่อลำเลียงอาหารและท่อลำเลียงน้ำและแร่ธาตุ (xylem) การเกิดรากบนกิ่งที่ถูกตัดและพัฒนาการของรากแขนง (branch roots) การเปลี่ยนแปลงของรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ออกซินเป็นสารสื่อสัญญาณทำให้เกิดการตอบสนองการโค้งงอของยอดและรากต่อแรงโน้มถ่วงและแสง สนับสนุนให้เกิดตายอด (apical bud) ควบคุมการเจริญของตาข้าง (lateral buds) ลดการเสื่อมสภาพของใบ (leaf senescence) ออกซินอาจยับยั้งหรือส่งเสริมการหลุดร่วงของใบและผลโดยผ่านเอทิลีน (Davies, 2004)

**การสังเคราะห์ IAA**

โดยทั่วไปมีวิถีสังเคราะห์ 2 วิถีหลัก คือ tryptophan (Trp)-dependent pathway เป็นวิถีที่ใช้ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA และ tryptophan (Trp)-independent pathway เป็นวิถีที่ไม่ใช้ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA ทั้งสองวิถีสามารถพบได้ทั้งในพืชและแบคทีเรีย (ดังภาพ 6) สำหรับวิถี Trp-dependent pathway ที่พบในพืชสามารถแบ่งได้ 4 วิถี คือ 1) indole-3-acetamide (IAM) pathway, 2) indole-3-pyruvic acid (IPA) pathway, 3) tryptamine (TAM) pathway และ 4) indole-3-acetaldoxime (IAOx) pathway ทั้งนี้พืชต่างชนิดกันต่างก็เลือกใช้วิถีในการสังเคราะห์ IAA ตามความเหมาะสมกับพืชนั้น ๆ โดยวิถี IPA และ IAM เป็นวิถีสังเคราะห์ IAA หลักที่พบได้ในพืชทั่ว ๆ ไป (Mano and Nemoto, 2012)

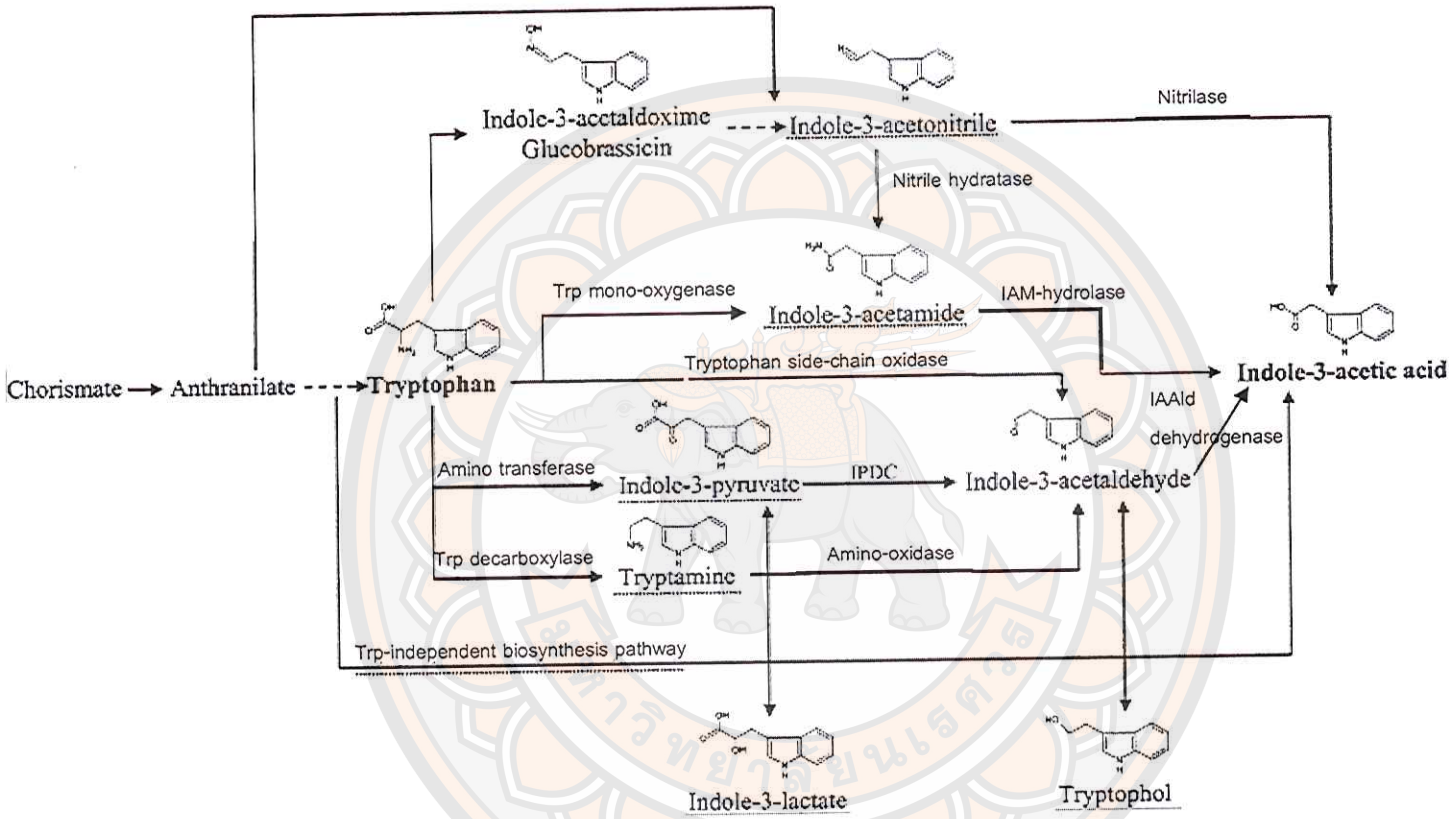



ภาพ 6 วิถีการสังเคราะห์ IAA ในพืช

ที่มา: Mano and Nemoto, 2012

ส่วนในแบคทีเรียจากที่มีการศึกษาสามารถแบ่งย่อยวิถีการสังเคราะห์ IAA ออกได้เป็น 5 วิถี คือ 1) indole-3-acetamide pathway, 2) indole-3-pyruvic acid pathway, 3) tryptamine pathway, 4) tryptophan side-chain oxidase (TSO) pathway และ 5) indole-3-acetonitrile (IAN) pathway (Spaepen, Vanderleyden and Remans, 2007) (ดังภาพ 7) แต่ Duca, et al. (2014) ได้รวมวิถี tryptophan side-chain oxidase pathway ที่พบเฉพาะใน *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (Oberhansli, et al., 1991) เข้ารวมไว้กับวิถี indole-3-pyruvic acid pathway และจัดวิถีการสังเคราะห์ IAA ไว้เหลือเพียง 3 วิถี คือ 1) indole-3-pyruvic acid pathway, 2) indole-3-acetamide pathway และ 3) indole-3-acetaldoxime/indole-3-acetonitrile pathway

การสังเคราะห์ IAA ในวิถี Trp-dependent pathway เริ่มต้นจากทริปโตเฟนที่ถูกสังเคราะห์จาก chorismate ที่ได้มาจากวิถี shikimate pathway โดย chorismate เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่อยู่ในรูปของวงอะโรมาติก (aromatic amino acid) (Herrmann and Weaver; 1999) ในพืชมีการสังเคราะห์ทริปโตเฟนภายในคลอโรพลาสต์ผ่าน indole-3-glycerol phosphate (Radwanski and Last, 1995) การสังเคราะห์ทริปโตเฟนทั้งในพืชและแบคทีเรียเริ่มจาก chorismate เปลี่ยนเป็น anthranilate โดยเอนไซม์ anthranilate synthase (Niyogi and Fink, 1992) จากนั้น anthranilate ถูกเอนไซม์ phosphoribosylanthranilate synthase เปลี่ยนไปเป็น 5-phosphoribosylanthranilate และต่อจากนั้นถูกเปลี่ยนต่อไปโดยเอนไซม์ phosphoribosylanthranilate isomerase จนได้เป็น1-(*O*-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose -5-phosphate ถูกเอนไซม์ indole-3-glycerol phosphate synthase เปลี่ยนเป็น indole-3-glycerol phosphate โดย indole-3-glycerol phosphate เป็นตัวสำคัญที่เข้าสู่วิถี Trp-independent pathway หรือถูกเปลี่ยนต่อเป็นทริปโตเฟนและเข้าสู่วิถี Trp-dependent pathway สำหรับการสังเคราะห์ IAA (Quyang, Shao and Li, 2000) ในการเปลี่ยน indole-3-glycerol phosphate อาศัยเอนไซม์ tryptophan (Trp) synthase ที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) คือ Trp synthase $\alpha$ และ Trp synthase $\beta$ โดยเอนไซม์ Trp synthase $\alpha$ เปลี่ยน indole-3-glycerol phosphate ไปเป็น indole จากนั้นเอนไซม์ Trp synthase $\beta$ เปลี่ยน indole ไปเป็นทริปโตเฟน (Last, et al., 1991) เข้าสู่วิถี Trp-dependent pathway เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA




ภาพ 7 วิถีการสังเคราะห์ IAA ในแบคทีเรีย

**ที่มา:** Spaepen, Vanderleyden and Remans, 2007.

ในวิถี Trp-independent pathway การสังเคราะห์ IAA อาจแยกมาจาก indole-3-glycerol phosphate และ/หรือ indole โดยเอนไซม์ indole synthase ที่มีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ Trp synthase α ทำหน้าที่เปลี่ยน indole-3-glycerol phosphate ไปเป็น indole ถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น IAA (Quyang, Shao and Li, 2000; Zhang, et al., 2008; Wang, et al., 2015)

**วิถี indole-3-acetamide (IAM) pathway**

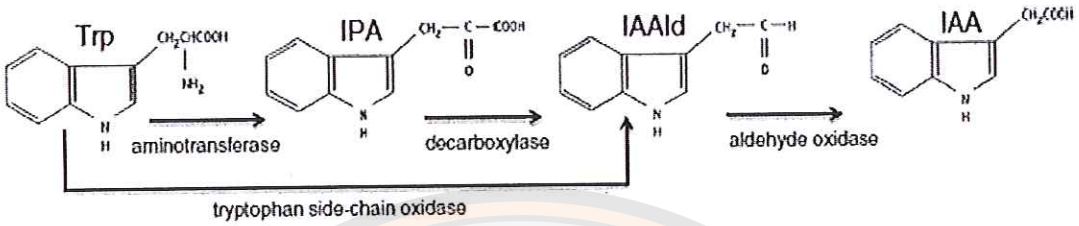
การสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี IAM สามารถพบได้ทั้งในพืชและแบคทีเรีย โดยในพืชพบครั้งแรกที่บริเวณรากขน (hairy roots) ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* ที่เป็นสาเหตุของโรค hairy roots เมื่อนำรากขนไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ผสมฮอร์โมนพืช พบว่า รากขนสามารถเจริญได้ปกติ เป็นเพราะว่า root-inducing (Ri) plasmid ของแบคทีเรียแทรกเข้าไปในสารพันธุกรรม (genome) ของพืช (White and Nester, 1980; Mano, et al., 1986) ในปัจจุบันสามารถพบวิถี IAM ได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่เช่น ส้ม ข้าว ข้าวโพด ใบยาสูบ เป็นต้น (Mano, et al., 2010) ในแบคทีเรียส่วนใหญ่พบในแบคทีเรียที่ก่อโรคกับพืช เช่น *Ag. tumefaciens, Pseudomonas syringae, P. savastanoi, Pantoea agglomerans* นอกจากนี้ยังสามารถพบในพวกแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่น *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* (Sekine, et al., 1989; Clark, et al., 1993; Morris 1995; Theunis, et al., 2004) กระบวนการสังเคราะห์ IAA ด้วยวิถี IAM ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นการเปลี่ยนทริปโตเฟนถูกเอนไซม์ tryptophan-2-monooxygenase เปลี่ยนไปเป็น IAM จากนั้นถูกเอนไซม์ indole-3-acetamide hydrolase เปลี่ยนต่อไปเป็น IAA (Spaepen, Vanderleyden and Remans, 2007; Mano and Nemoto, 2012) (ดังภาพ 7)

**วิถี indole-3-pyruvic acid (IPA) pathway**

วิถี IPA เป็นวิถีหลักในการสังเคราะห์ IAA ในพืช และสามารถพบได้ในกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น *Azospirillum, Bacillus, Bradyrhizobium, Enterobacter cloacae, Paenibacillus* และ *Pseudomonas* นอกจากนี้ยังพบใน *P. Agglomerans* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคพืช (Spaepen, Vanderleyden and Remans, 2007)

การสังเคราะห์ IAA ของแบคทีเรียในวิถี IPA มี 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการเปลี่ยนทริปโตเฟนไปเป็น IPA โดยใช้เอนไซม์ aminotransferase ขั้นต่อมา IPA ถูกเปลี่ยนindole-3-acetaldehyde (IAD) โดยเอนไซม์ indole-3-pyruvate decarboxylase ขั้นนี้เป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยา ขั้นสุดท้าย IAD ถูกเอนไซม์ indole-3-acetaldehyde oxidase เปลี่ยนต่อไปเป็น IAA (Spaepen, Vanderleyden and Remans, 2007) แต่ *P. fluorescens* CHA0 สามารถเปลี่ยน

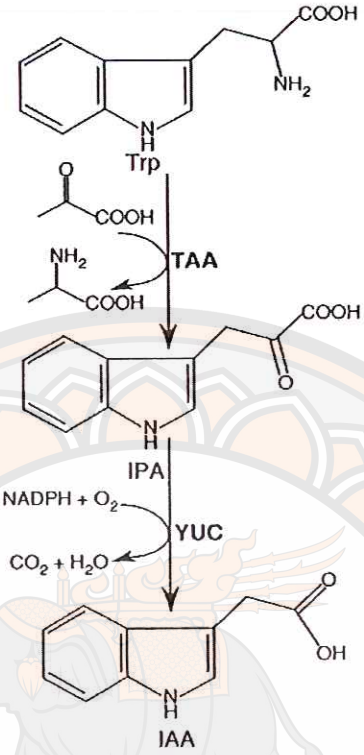
ทริปโตเฟนไปเป็น IAD โดยตรงไม่ผ่าน IPA โดยใช้เอนไซม์ tryptophan side-chain oxidase (Oberhansli, et al., 1991) (ดังภาพ 8)




**ภาพ 8 วิถี indole-3-pyruvic acid (IPA) pathway ในการสังเคราะห์ IAA ของแบคทีเรีย**

**ที่มา:** Patten and Glick, 1996

ในพืชไม่พบเอนไซม์ที่เปลี่ยน IPA ไปเป็น IAD (Mano and Nemoto, 2012) แต่มีเอนไซม์ aldehyde oxidases ที่สามารถเปลี่ยน IAD ไปเป็น IAA (Seo, et al., 1998) ดังนั้นการสังเคราะห์ IAA ในพืชโดยวิถี IPA ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ เริ่มจากทริปโตเฟนถูกเปลี่ยน IPA โดยเอนไซม์ aminotransferase ต่อจากนั้น IPA จะถูกเปลี่ยนไปเป็น IAA โดยเอนไซม์ flavin monooxygenase ที่ถูกถอดรหัสจากยีน *YUC* (*YUCCA* gene) (Zhao, 2012) (ดังภาพ 9)




**ภาพ 9** วิถี indole-3-pyruvic acid pathway ในการสังเคราะห์ IAA ของพืช

**ที่มา:** Zhao, 2012

ในแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี IPA เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นประโยชน์และในพืชทั่ว ๆ ไป โดยกิจกรรมของเอนไซม์ indole-3-pyruvate decarboxylase ถูกแปลรหัสจากยีน *ipdC* เป็นเอนไซม์หลัก (key enzyme) ในวิถี IPA ที่เปลี่ยน IPA ไปเป็น IAD (Fedorov, Doronina and Trotsenko, 2010)

จากการศึกษาของ Ivanova, Doronina and Trotsenko (2001) ใน *M. mesophilicum* VKM B-2143 มีกิจกรรมของเอนไซม์ aminotransferase ที่ทำให้เกิดกระบวนการ transamination ของแอล-ทริปโตเฟนเปลี่ยนไปเป็น IPA และในการศึกษานี้ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ tryptophan decarboxylase และ tryptophan side-chain oxidase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยน L-tryptophan ไปเป็น IAD โดยปริมาณ IAA ที่ผลิตได้ในแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มีความเข้มข้นระหว่าง 1.4 – 14.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังตาราง 3) (Doronina, Ivanova and Trotsenko, 2002)

ตาราง 3 ปริมาณสารประกอบ IAA ที่สังเคราะห์ในแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*

| แบคทีเรียสกุล *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) | 14.5 |

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Doronina, Ivanova and Trotsenko, 2002

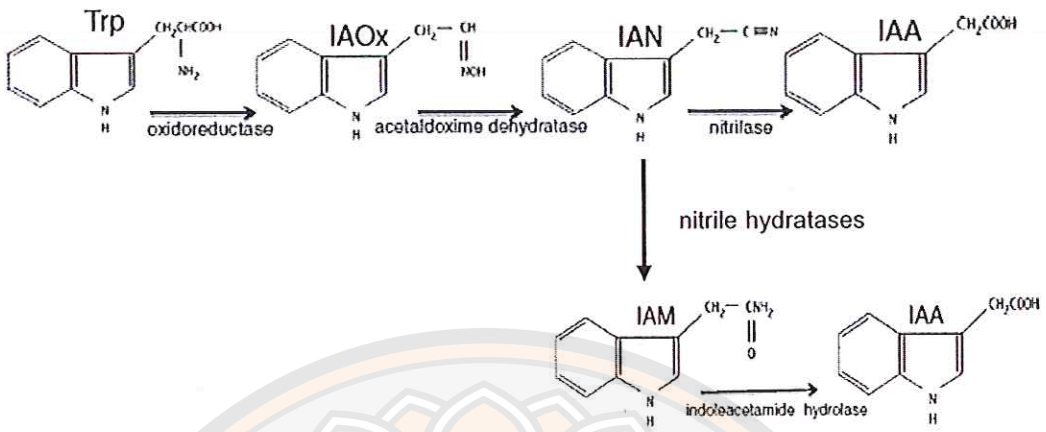
**วิถี tryptamine (TAM) pathway**

วิถี tryptamine (TAM) pathway เป็นวิถีการสังเคราะห์ IAA ที่เปลี่ยนทริปโตเฟนไปเป็น TAM โดยเอนไซม์ tryptophan decarboxylase ซึ่ง TAM เป็น protoalkaloid ในขั้นแรก ๆ ของวิถีการสังเคราะห์ terpenoid indole alkaloid (Di Fiore, et al., 2002) ถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็น *N*-hydroxytryptamine โดยเอนไซม์ flavin monooxygenase-like ที่ถูกถอดรหัสจากยีน *YUC* (*YUCCA* gene) (Zhao, et al., 2001) เมื่อให้มีการแสดงออกของยีน *YUC* เพิ่มขึ้น พบว่า ปริมาณของ IAA เพิ่มขึ้น จึงเป็นเหตุผลสนับสนุนว่าการสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี TAM สามารถพบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดียวและพืชใบเลี้ยงคู่ (Yamamoto, et al., 2007) แต่ในปัจจุบันมีรายงานว่า YUC (YUCCA) ไม่สามารถเปลี่ยน TAM ไปเป็น *N*-hydroxytryptamine ได้ (Tivendale, et al., 2010; Ross, et al., 2011) และจากการศึกษาในต้นถั่ว TAM ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็น IAA ได้ (Tivendale, et al., 2010) ในแบคทีเรียสามารถพบได้ใน *B. cereus* และ *Azospirillum* โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ tryptophan decarboxylase ใน *B. cereus* (Perley and Stowe, 1966) และ *Azospirillum* สามารถเปลี่ยน TAM จากภายนอกไปเป็น IAA (Hartmann, et al., 1983)

**วิถี indole-3-acetaldoxime (IAOX) pathway**

เป็นวิถีสังเคราะห์ IAA ที่พบเฉพาะในพืชตระกูล *Brassicaceae* (Sugawara, et al., 2009) โดยเปลี่ยนทริปโตเฟนไปเป็น IAOX โดยเอนไซม์ cytochrome P450 CYP79B2 และ CYP79B3 (Hull, Vij and Celenza, 2000; Mikkelsen, et al., 2000) IAOX เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของพืช (secondary metabolite) เช่น indole glucosinolate, camalexin และ indole-3-acetonitrile (IAN) (Hansen and Halkier, 2005; de Vos, et al., 2008; Mikkelsen, et al., 2009) สำหรับการสังเคราะห์ IAA ในวิถีนี้ IAOX ถูกเปลี่ยนเป็น IAN โดยเอนไซม์ cytochrome P450 CYP71A13 (Nafisi, et al., 2007; Mikkelsen, et al., 2009) ต่อจากนั้น IAN ถูกเอนไซม์ nitrilase ที่ถูกถอดรหัสจากยีน *NIT* เปลี่ยนไปเป็น IAA (Mano and Nemoto, 2012)

สำหรับแบคทีเรียในขั้นตอนของการเปลี่ยนทริปโตเฟนไปเป็น IAOX ต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มของ oxidoreductase ปัจจุบันยังไม่มีการค้นพบ และขั้นตอนการเปลี่ยน IAOX ไปเป็น IAN โดยเอนไซม์ indoleacetaldoxime dehydratase (ดังภาพ 10) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด แต่ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ใช้ phenylacetaldoxime เป็นสับสเตรตที่มีโครงสร้างคล้ายกับ indoleacetaldoxime (Zhao, 2012) ในขั้นตอนการเปลี่ยน IAN ไปเป็น IAA (ดังภาพ 10) สามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์ nitrilase ได้ในแบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* (Nagasawa, et al., 1990; Kobayashi, et al., 1993) แต่ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Rhodococcus* sp. AK32, *Rhodococcus* sp. NCIMB 11216 และ *Corynebacterium* sp. C5 มียีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์เอนไซม์ nitrilase และเอนไซม์ acetaldoxime dehydratase อยู่ใกล้กัน ส่วน *Bacillus* sp. OxB-1 มียีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์เอนไซม์ nitrilase อยู่เหนือยีนที่สังเคราะห์ phenylacetaldoxime dehydratase (Kato, et al., 2005) แต่ใน *P. syringae* B728a และ DC3000 ยีนที่สังเคราะห์ phenylacetaldoxime dehydratase อยู่เหนือยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ nitrilase (Feil, et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียบางชนิดมีเอนไซม์ nitrile hydratases ที่เปลี่ยน IAN ไปเป็น IAA โดยผ่าน IAM (ดังภาพ 10) พบได้ใน *Ag. tumefaciens* และ *Rhizobium* spp. (Kobayashi, et al., 1995)




**ภาพ 10 วิถี** indole-3-acetaldoxime (IAOX) pathway **ในการสังเคราะห์** IAA **ของแบคทีเรีย**

**ที่มา**: ดัดแปลงจาก Patten and Glick, 1996 และ Prinsen, et al., 1997

**การควบคุมออกซินในพืช**

IAA ที่ถูกสร้างขึ้นในพืชมีกลไกในการควบคุมให้อยู่ในระดับที่สมดุล โดย IAA ที่สังเคราะห์ขึ้นถูกส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชที่มีความต้องการ หรือในพืชที่เจริญเต็มที่เกิดกระบวนการ conjugation เชื่อมกับกรดอะมิโนหรือน้ำตาลโดยเอนไซม์ amido synthases หรือถูกย่อยสลาย (degradation) ด้วยเอนไซม์ amido hydrolases ได้เป็น 2-oxindole-3-acetic acid (oxIAA) หรือ oxIAA-glucose (oxIAA-Glc) (Ostin, et al., 1998; Normanly, 2010) ส่วนในแบคทีเรียบางชนิดเช่น *P. savastanoi* pv. *savastanoi* สามารถเชื่อม IAA กับกรดอะมิโนไลซีน (lysine) เป็น IAA-lysine และ IAA ถูกปลดปล่อยโดยถูกเอนไซม์ในพืชย่อยสลาย แต่ในแบคทีเรียบางชนิดสามารถเปลี่ยน IPA และ IAD ไปเป็น indole-3-lactic acid (ILA) และ indole-3-ethanol หรือ tryptohol เก็บสะสมไว้ (Glass and Kosuge, 1986; Sprunck, Jacobsen and Reinard, 1995)

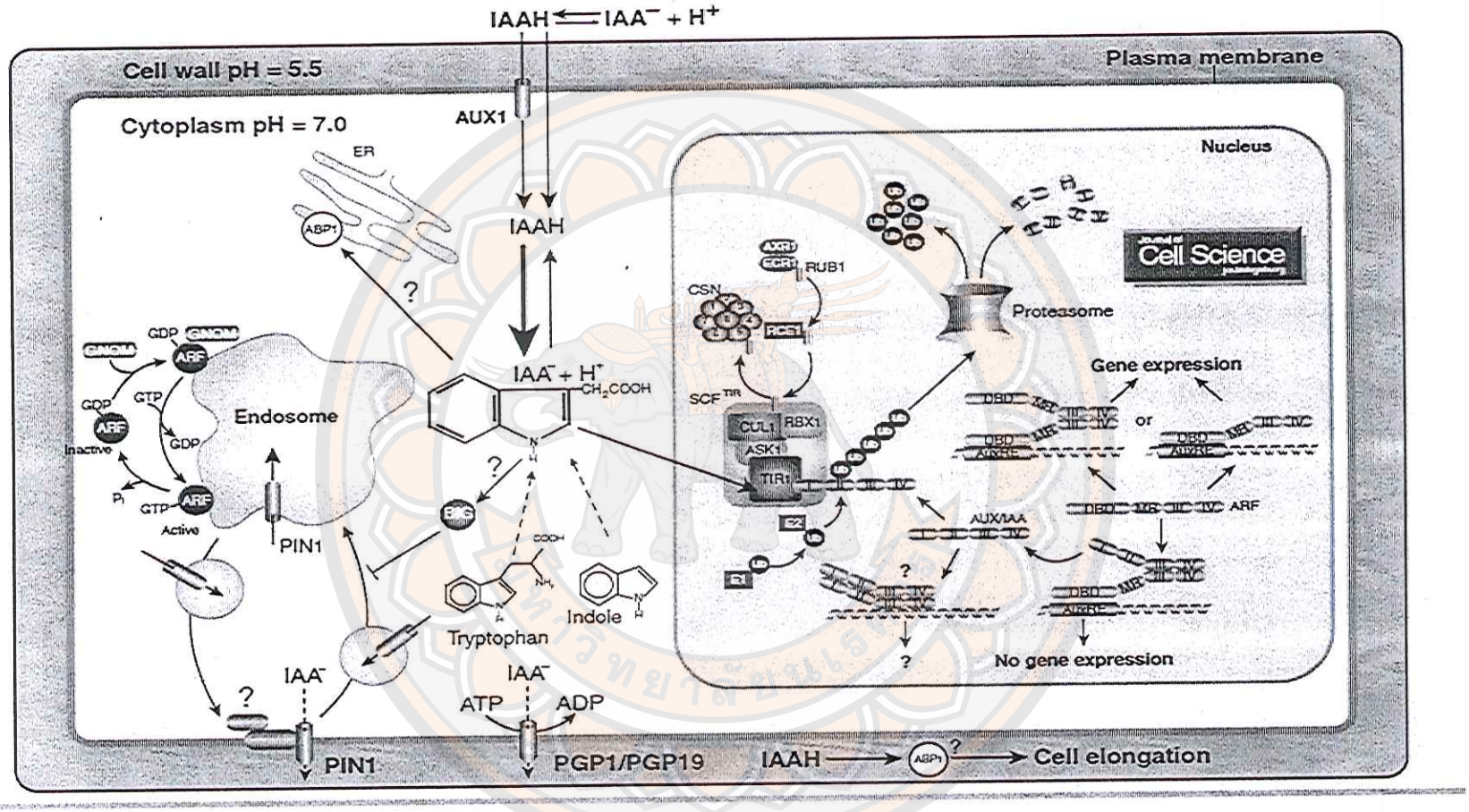
**การขนส่งออกซินในพืช**

IAA ที่ถูกสร้างขึ้นจากบริเวณปลายยอดถูกขนส่งไปสู่รากหรือที่เรียกว่า basipetal เป็นการลำเลียงที่มีทิศทางไปในทางเดียวกัน (polar transport) โดยเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งที่อยู่ถัดไปยังด้านล่าง (symplast) และจากบริเวณฐานรากไปยัง

ปลายรากเรียกว่า acropetal แต่ยัง พบว่า มีการลำเลียงจากปลายรากไปยังฐานรากบ้างเล็กน้อย เกี่ยวข้องกับการสร้างรากแขนง (lateral root) นอกจากนี้มีการลำเลียง IAA จากใบที่เจริญเต็มที่แล้วไปยังส่วนต่าง ๆ โดยผ่าน phloem (Morris, Friml and Zazimalova, 2004) การเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อาศัยกลไก chemiosmotic ซึ่งอาศัยความแตกต่างของโปรตรอน ($H^+$) ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดแรงขับเคลื่อนสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปได้ (Goldsmith, 1977) ที่ผนังเซลล์ที่มีค่าพีเอชประมาณ 5-5.5 IAA ที่มีหมู่คาร์บอกซิลถูกทำให้อยู่ในรูป IAA-H สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ได้โดยการแพร่แบบ passive diffusion หรืออาศัยโปรตีน auxin resistant1 (AUX1) มีคุณสมบัติเป็น premease เป็นตัวพา IAA-H เข้าภายในเซลล์ เมื่อ IAA-H เข้ามาภายในเซลล์ที่มีค่าพีเอช 7 จะทำให้ IAA-H แตกตัวเป็น $IAA^-$ และ $H^+$ ซึ่ง $H^+$ ถูกขับออกจากเซลล์ผ่าน proton pump ออกไปที่ผนังเซลล์ $IAA^-$ ที่ถูกสะสมไว้ภายในเซลล์ถูกส่งผ่านไปยังเซลล์อื่นโดยอาศัยโปรตีน pin-formed (PIN) หรือ P-glycopropetin (PGP) เป็นตัวพาออกจากเซลล์ไปยังผนังเซลล์ นอกจากนี้ยัง auxin binding protein1 (ABP1) ที่สามารถจับกับ IAA ได้ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ (Paciorek and Friml, 2006; Swarup and Peret, 2012; Ljung, 2013)

**กลไกการตอบสนองต่อออกซินในพืช**

IAA เมื่อผ่าน AUX1 เข้ามาในเซลล์กระตุ้นให้เซลล์สร้างโปรตีน auxin/indole-3-acetic acid (AUX/IAA) ซึ่งเป็น repressor ในกรณีที่มีปริมาณ IAA ในเซลล์น้อย โปรตีน AUX/IAA จะจับอยู่กับโปรตีน auxin response facters (ARFs) ที่จับกับ auxin-response elements (AuxREs) ที่มีลำดับเป็น "TGTCTC" ทำหน้าที่เป็น promoter ของ auxin responsive genes ทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีน ถ้าในเซลล์มีปริมาณ IAA เพิ่มขึ้น IAA จะถูกจับด้วยโปรตีน transport inhibitor response 1 (TIR1) และโปรตีน AUX/IAA ในลักษณะคล้ายแซนด์วิช จากนั้นมีการชักนำให้กลุ่มโปรตีน E3 หรือ Skp1-Cullin-F-box (SCF) โดยโครงสร้างของ SCF จะมีโปรตีน Cullin (CUL1) เป็นตัวกลางที่เชื่อมกับโปรตีน F-box ใน Arabidopsis โปรตีน F-box มีชื่อว่า ASK (Arabidopsis SKP1-like) เป็นตัวจับกับโปรตีน TIR1 ส่วนอีกด้านของโปรตีน CUL1 จะเชื่อมกับ ubiquitin E2-interactingproteinRBX1 เป็นตัวรับ ubiquitin จากเอนไซม์ E1 ส่งต่อไปยังโปรตีน E3 นำไปเชื่อมกับโปรตีน AUX/IAA โดยกระบวนการ ubiquitination โปรตีน AUX/IAA ที่ถูกเชื่อมด้วย ubiquitin จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 26S proteasome ทำให้โปรตีน ARFs เป็นอิสระกระตุ้นกระบวนการแสดงออกของ auxin responsive genes มียีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชที่ตอบสนองต่อ IAA (ดังภาพ 11) (Woodward and Bartel, 2005; Quint and Gray, 2006)




ภาพ 11 กลไกการตอบสนองต่อ IAA ในพืช (Paciorek and Friml, 2006)

**ที่มา:** Paciorek and Friml, 2006

**การควบคุมการสังเคราะห์ IAA ในแบคทีเรีย**

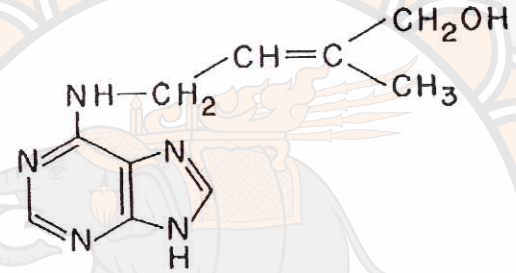
การสังเคราะห์ IAA ในแบคทีเรียมี 2 ปัจจัยที่สำคัญ คือ ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมและปัจจัยด้านพันธุกรรม โดยปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการสังเคราะห์ IAA เช่น ความเป็นกรด แรงดันออสโมติก และภาวะคาร์บอนจำกัด สภาพแวดล้อมเหล่านี้พบได้เมื่อแบคทีเรียเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ใน *Az. brasilense* Sp245 ที่มีการสังเคราะห์ IAA ในวิถี IPA เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ปริมาณ IAA ที่ถูกสังเคราะห์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเกิดจากการแสดงออกของยีน *ipdC* ที่เพิ่มขึ้นอันเป็นผลมาจาก IAA ที่ถูกสร้างขึ้นเกิดกลไกการควบคุมแบบกระตุ้นย้อนกลับ (positive feedback) (Vande Broek, et al., 1999; Somers, et al., 2005) จากการศึกษาบริเวณ promoter ของยีน *ipdC* จะมีบริเวณที่เป็น auxin response element (AuxRE) และบริเวณที่จับกับ RpoN (RpoN binding site) สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ IAA ได้ถึงร้อยละ 50 (Vande Broek, et al., 2005) เมื่อการเจริญของแบคทีเรียอยู่ในภาวะที่เป็นกรดและคาร์บอนจำกัด การสังเคราะห์ IAA ที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากการกระตุ้นของ sigma factor RpoS ที่สร้างขึ้นขึ้นเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase พบได้ใน *En. cloacae and Ps. putida* (Saleh and Glick, 2001; Patten and Glick, 2002) นอกจากนี้เมื่อเพิ่มปริมาณของทริปโตเฟนที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA ส่งต่อการเพิ่มระดับในการสังเคราะห์ IAA มากขึ้น สามารถพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น *Azospirillum, Pa. agglomerans, Ps. putida* และ *Rhizobium* (Prinsen, et al., 1993; Brandl and Lindow, 1996; Patten and Glick, 2002; Theunis, et al., 2004)

Ivanova, Doronina and Trotsenko (2001) พบว่า การสังเคราะห์ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ถูกกระตุ้นโดยการเติมแอล-ทริปโตเฟนในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงและถูกยับยั้งการสังเคราะห์โดยแอมโมเนียม อิออน (ammonium ions) Doronina, Ivanova and Trotsenko (2002) พบว่า จากการเลี้ยง *M. extorquens* ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรต ($KNO_3$) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถวัดปริมาณ IAA ได้เท่ากับ 19 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งโพแทสเซียมไนเตรตสามารถกระตุ้นการสร้าง IAA ได้มากกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเกือบ 5 เท่า

ในส่วนของปัจจัยทางพันธุกรรมขึ้นอยู่กับตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ IAA ซึ่งถ้ายีนอยู่บนพลาสมิด (plasmid) ทำให้มีการสังเคราะห์ IAA ในปริมาณที่มากกว่ายีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม เนื่องจากพลาสมิดมีเป็นจำนวนมากในเซลล์ของแบคทีเรีย (Brandl and Lindow, 1996; Patten and Glick, 1996)

**สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดไซโตไคนิน**

ไซโตไคนินเป็นสารในกลุ่มฮอร์โมนพืชที่มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน (adenine derivatives) ที่มีไนโตรเจนของแขนงข้าง (side chain) จับกับอะดีนีนที่ตำแหน่งที่ 6 ($N^6$) ซึ่งแขนงข้างของไซโตไคนินอาจเป็นสารประกอบในกลุ่มไอโซพรีน (isoprene) หรือสารประกอบอะโรมาติก ไซโตไคนินชนิดที่พบทั่วไปในพืชคือ ทราน-ซีเอติน (*trans*-zeatin; tZ) (ดังภาพ 12) นอกจากนี้ไซโตไคนินยังสามารพบได้ในรูปของไรโบไซม์ (ribosides) และไรโบไทด์ (ribotides) (Sakakibara, 2004) ไซโตไคนินในพืชถูกสังเคราะห์ขึ้นที่บริเวณปลายรากและจากการพัฒนาของต้นกล้า และขนส่งไปยังยอดโดยผ่านทางท่อลำเลียงน้ำและแร่ธาตุ (Davies, 2004)




ภาพ 12 *trans*-zeatin

**ที่มา**: Davies, 2004

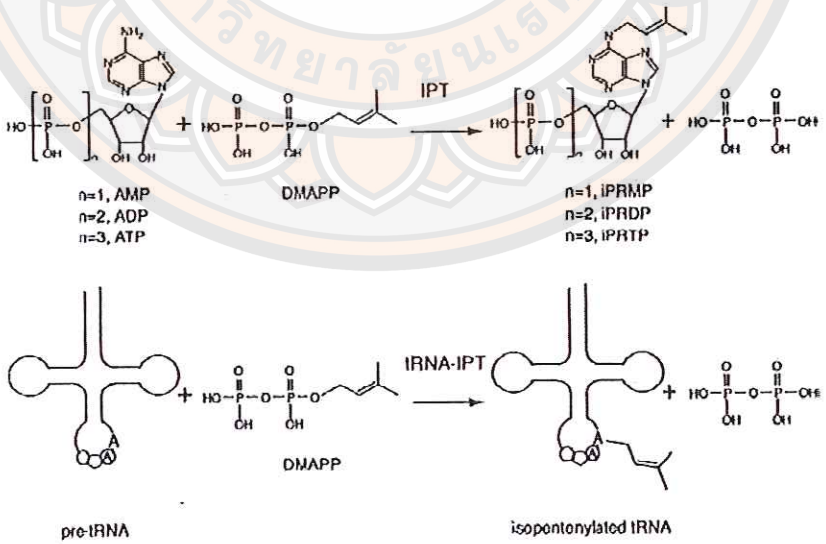
**ผลของไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตของพืช**

ไซโตไคนินมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ การขยายตัวและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืชเช่น การเกิดยอด และการเกิดหน่อในมอส กระตุ้นการเจริญของตาข้างจากการยับยั้งด้วยตายอด ชะลอภาวะเสื่อมถอยของใบ (leaf senescence) โดยลดการสูญเสียคลอโรฟิลล์ RNA โปรตีน และไขมัน กระตุ้นการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ (chloroplasts) ช่วยให้มีการสะสมของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) และส่งเสริมการเปลี่ยนเอทิโอพลาสต์ (etioplasts) ไปเป็นคลอโรพลาสต์ (Davies, 2004)

**การสังเคราะห์ไซโตไคนิน**

วิถีการสังเคราะห์ไซโตไคนินในกลุ่มของไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid cytokinins) มี 2 วิถี ในวิถีแรกเกิดจากการย่อยสลาย tRNA และวิถีที่สองเกิดกระบวนการ isopentenylation ของอะดีนีนอิสระ โดยมีสารตั้งต้นเป็น dimethylallyldiphosphate (DMAPP) และ adenosine

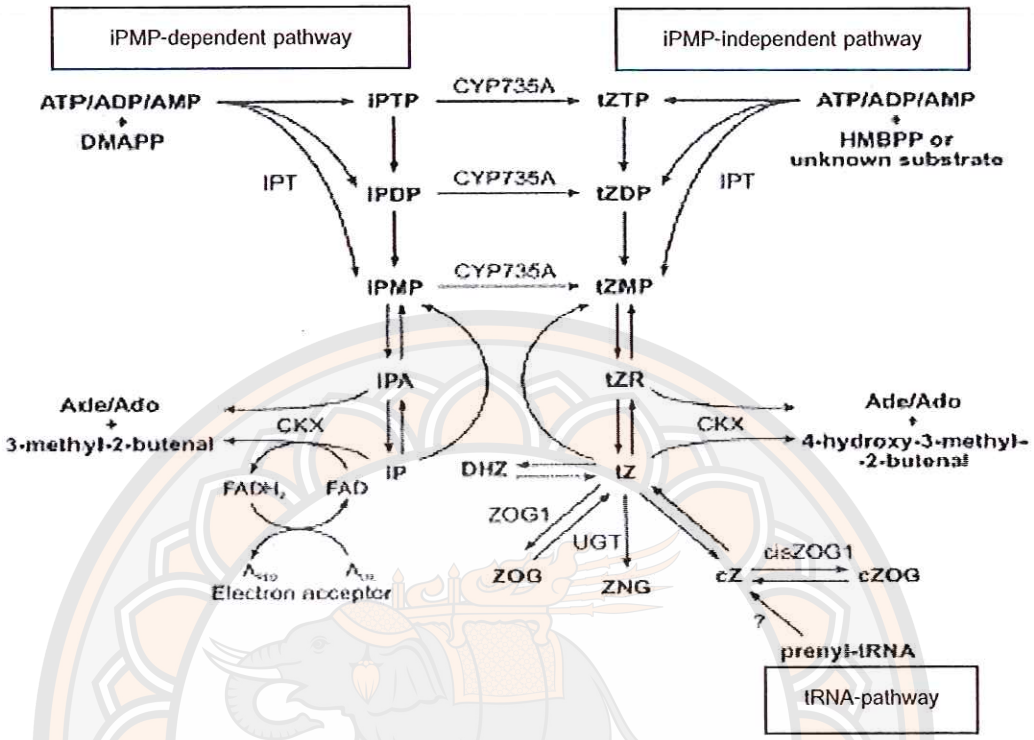
monophosphate (AMP) ซึ่งมีรายงานเป็นครั้งแรกในราเมือก *Dictyostelium discoideum* สารตั้งต้นทั้งสองเกิดกระบวนการ isopentenylation เคลื่อนย้ายหมู่ isopentenyl จาก DMAPP ไปยังตำแหน่ง $N^6$ ของ AMP โดยเอนไซม์ isopentenyltransferase (IPT) ได้เป็น isopentenyladenosine-5'-monophosphate (iPMP) ถูกกระบวนการ hydroxylation ต่อไปเป็นทราน-ซีเอติน ในการสังเคราะห์ทรานซีเอตินถูกควบคุมโดยเอนไซม์ IPT ถูกแปลรหัสจากยีน *IPT* ตอบสนองต่อสภาพแวดล้อม เช่น ปริมาณไนโตรเจน การตัดกิ่งยอด (decapitation) และระยะเวลาที่ได้รับแสง กระบวนการสังเคราะห์ทราน-ซีเอตินโดยผ่าน iPMP เรียกว่า iPMP-dependent pathway ส่วนการสังเคราะห์ทราน-ซีเอตินโดยไม่ผ่าน iPMP หรือ iPMP-independent pathway เป็นการเคลื่อนย้ายแขนงข้างที่ถูกกระบวนการ hydroxylation แล้ว เช่น hydroxymethylbutenyl diphosphate (HMBPP) ไปยัง AMP โดยตรง ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ IPT เช่นเดียวกับในกระบวนการ iPMP-dependent pathway สำหรับการสังเคราะห์ไซโตไคนินจากการย่อยสลาย tRNA จะมี isopentenyladenine (iP) เป็นส่วนประกอบอยู่ที่ปลาย 3' ของลำดับ anticodon โดยเกิดจากกระบวนการ isopentenylation โดยเอนไซม์ tRNA-IPT ไซโตไคนิน ที่ได้จากการย่อยสลาย tRNA ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของซิส-ซีเอติน (*cis*-zeatin) และจะถูกเอนไซม์ zeatin isomerase เปลี่ยนกลับไปมาระหว่างซิส-ซีเอตินและทราน-ซีเอติน (ดังภาพ 13) (Sakakibara, 2004; Heyl, Werner and Schmulling, 2006)




**ภาพ 13 การสังเคราะห์ไซโตไคนินโดยเอนไซม์ IPT และ tRNA-IPT**

**ที่มา**: Sakakibara, 2004; Heyl, Werner and Schmulling, 2006

ทรานซีเอตินสามารถเปลี่ยนไปมาระหว่าง free base (active form), nucleosides (storage form) และ nucleotides ได้โดยทราน-ซีเอตินที่อยู่ในรูป nucleotides คือ *trans*-zeatin riboside-5'-monophosphate (tZMP) ถูก dephosphorylation โดยเอนไซม์ 5'-ribonucleotide phosphohydrolase (5'-nucleotidase) เปลี่ยนเป็น *trans*-zeatin riboside (tZR) ซึ่งถูกเอนไซม์ adenosine nucleosidase กระตุ้นให้เกิดกระบวนการ deribosylation เปลี่ยนเป็นทรานซีเอตินอยู่ในรูปของ free base ในทางกลับกันทราน-ซีเอตินที่อยู่ในรูปของ free base จะถูกเปลี่ยนเป็น tZR โดยเอนไซม์ purine nucleoside phosphorylase และถูกเปลี่ยนต่อเป็น tZMP โดยเอนไซม์ adenosine kinase ในอีกกรณี ทราน-ซีเอตินจะถูกเปลี่ยนเป็น tZMP โดยเอนไซม์ adenine phosphoribosyltransferase นอกจากนี้ ทราน-ซีเอตินอาจเกิดกระบวนการ *N*-Glucosylation เป็นการเติมน้ำตาลกลูโคสจาก uridine diphosphate glucose (UDP-glucose) หรือ thymidine diphosphate glucose (TDP-glucose) ที่ตำแหน่ง 3, 7 และ 9 ของพิวรีน (purine) การเติมกลูโคสเข้าที่ตำแหน่งที่ 7 และ 9 จะทำให้ไซโตไคนินอยู่ในรูปไม่ออกฤทธิ์ (inactive form) ในบางครั้งอาจมีการเติมกลูโคสเข้าที่ไอโซพรีนอยด์ที่เป็นแขนงข้างเปลี่ยนเป็น *O*-β-D-glucopyranosyl โดยเอนไซม์ *O*-glucosyltransferases ดังภาพ 14 ในพืชหลายชนิดเมื่อมีปริมาณไซโตไคนินในเซลล์สูงจะชักนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) เข้าตัดแขนงข้างของไซโตไคนินออก เพื่อรักษาปริมาณของไซโตไคนินให้อยู่ในระดับที่ต้องการ (Sakakibara, 2004)




ภาพ 14 กระบวนการสังเคราะห์ไซโตไคนิน การเปลี่ยนรูป และการย่อยสลาย

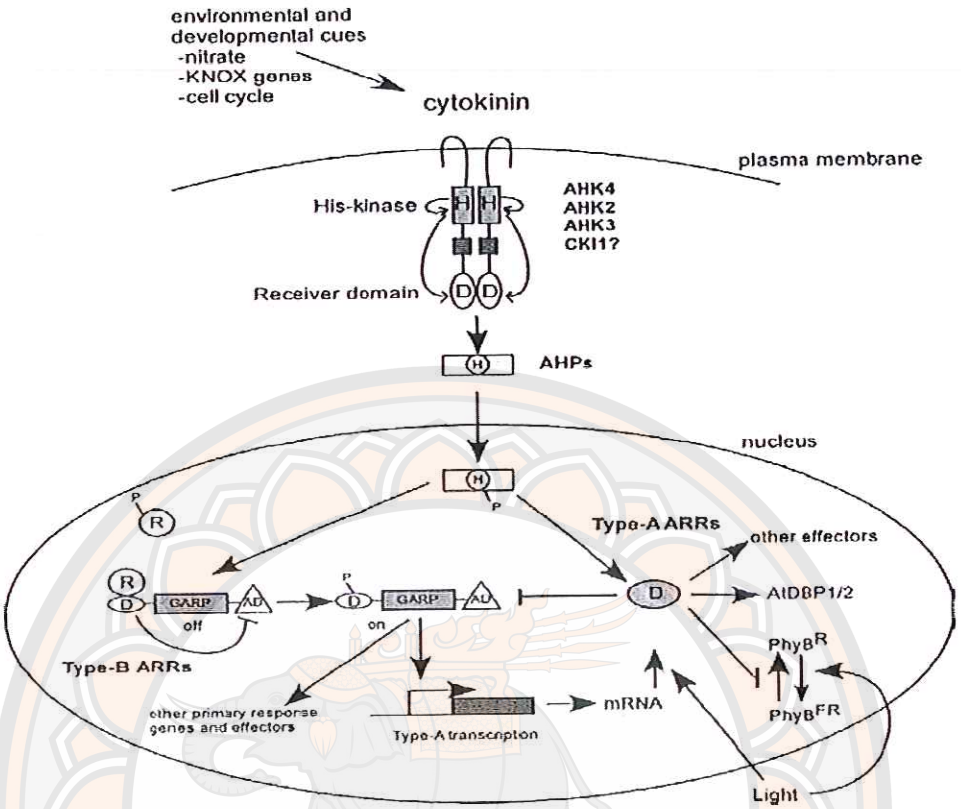
**ที่มา**: Heyl, Werner and Schmulling, 2006

Long, Morris and Polacco (1997) ได้พบว่า *M. extorquens* ที่แยกได้จากพืช สามารถผลิตไซโตไคนินในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยไซโตไนนินที่พบเป็นชนิดซีเอติน และซีเอติน ไรโบไซม์ ซึ่งมีปริมาณ 50-400 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และยังพบอีกว่ามียีนของเอนไซม์ dimethylallyl (DMA) transferases ที่ใช้สังเคราะห์ ไซโตไคนินในขั้นตอนแรก

Koenig, Morris and Polacco (2002) ได้ศึกษาปริมาณของไซโตไคนินชนิดทรานส์ซีเอติน (trans-zeatin) ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม *Methylobacterium* ที่แยกมาจากใบพืช 4 ชนิด คือ *Arabidopsis* ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพดและถั่วเหลือง เทียบกับ *M. extorquens* พบว่ามีปริมาณของไซโตไคนินอยู่ในช่วง 2-111 นาโนกรัมต่อลิตร และยังพบอีกว่าเมื่อมีการเติม tRNA ลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงพบว่าทรานส์-ซีเอตินมาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงของ tRNA โดยเฉพาะอะดีนีนไม่ได้เป็นการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่

**กลไกการตอบสนองต่อไซโตไคนินในพืช**

การตอบสนองต่อไซโตไคนินของพืชใช้ระบบที่เรียกว่า two-component system (TCS) ประกอบด้วย sensor histidine kinase และ response regulator หรือบางครั้งเรียกว่า phosphorelay signaling system เป็นกระบวนการส่งต่อหมู่ฟอสเฟต (phosphoryl group) ใน *Arabidopsis* เป็น multistep phospho-relay system โดยหลังจากไซโตไคนินจับกับตัวรับที่เยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า cyclases/histidine kinases–associated sensory extracellular domain (CHASE domain) ของ hybride histidine kinase receptors พบอยู่ 3 ชนิดใน *Arabidopsis* คือ AHK2, AHK3 และ CRE1/AHK4 เกิดกระบวนการ autophosphorylation โดย receptor kinase และมีการขนส่งหมู่ฟอสเฟตเกิดขึ้นภายในตัวรับสัญญาณ (receptor) จากฮิสทิดีน (histidine) ไปยังแอสพาร์เตส (aspartate) ซึ่งเป็น response regulator domain จากนั้นหมู่ฟอสเฟตถูกส่งผ่านไปยัง histidine phospho-transfer proteins (AHPs) ต่อมา AHPs เคลื่อนจากไซโตลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียสเกิดกระบวนการ phosphorylation เคลื่อนย้ายหมู่ฟอสเฟต ไปยัง A-type response regulators (ARRs) และ B-type ARRs ก่อนที่เกิดกระบวนการ phosphorylation บริเวณที่แอสพาร์เตสของ B-type ARRs ถูกจับด้วย repressor protein ทำให้การทำหน้าที่ของ transcriptional activation domains ของ B-type ARRs ถูกยับยั้ง เมื่อเกิดกระบวนการ phosphorylation เกิดเคลื่อนย้ายหมู่ฟอสเฟตจาก AHPs ไปยัง repressor protein และแอสพาร์เตส ทำให้บริเวณแอสพาร์เตสเป็นอิสระ ทำให้ transcriptional activation domains ทำงานตามปกติไปกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ดังภาพ 15 (Heyl, Werner and Schmulling, 2006; Maxwell and Kieber, 2004)




ภาพ 15 กลไกการตอบสนองต่อไซโตไคนินในพืช

**ที่มา**: Maxwell and Kieber, 2004

**เอนไซม์** 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase

ACC deaminase (EC 3.5.99.7) เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอทิลีนในพืชให้เป็นอัลฟา-คีโตกลูตาเรต ($\alpha$-ketobutyrate) และ แอมโมเนีย (ammonia) เมื่อระดับของ ACC ลดลงส่งผลทำให้ระดับเอทิลีนในพืชลดลงด้วย การที่พืชมีปริมาณเอทิลีนในความเข้มข้นที่สูงทำการเจริญเติบโตของพืชลดลงและอาจตายได้ (Honma and Shimomura, 1978)

เอนไซม์ ACC deaminase สามารถพบได้ในแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (beneficial bacteria) อาทิเช่น แบคทีเรียรอบรากพืช *Ps. putida* GR12-2 และ *Pseudomonas* sp. UW4 (Glick, et al., 1994; Li, et al., 2000) แบคทีเรียที่สามารถสร้างปมรากพืช *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae และ *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Ma, Guined and Glick, 2003; Uchiumi, et al., 2004) แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ภายใน

*Burkholderia phytophirmans* PsJN, *Ps. fluorescens* YsS6 และ *Ps. migulae* 8R6 (Sun, Cheng and Glick, 2009; Ali, Charles and Glick, 2012) แบคทีเรียบนผิวใบพืช *M. radiotolerans* และ *M. fujisawaense* (Madhaiyan, et al., 2006; Chinnadurai, Balachandar and Sundaram, 2009) นอกจากนี้สามารถพบได้ในเชื้อรา เช่น *Trichoderma asperellum* T203 (Viterbo, et al., 2010; Brotman, et al., 2013) พืชที่มีแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ช่วยป้องกันพืชจากการถูกยับยั้งการเจริญอันเป็นผลจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่น น้ำท่วมขัง อุณหภูมิที่สูงเกินไป ความเป็นพิษจากสารอินทรีย์และอนินทรีย์ โรคพืชต่าง ๆ ความแห้งแล้ง และความเค็มของดิน (Saraf, Jha and Patel, 2010)

**บทบาทของเอทิลีนต่อการเจริญเติบโตของพืช**

เอทิลีนไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชตามปกติ แต่ถูกสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียดจากสภาวะแวดล้อมที่พืชได้รับ และทำให้ผลไม้สุก เอทิลีนเมื่อถูกสังเคราะห์ขึ้นแล้วสามารถเคลื่อนที่โดยการแพร่จากบริเวณที่มันถูกสังเคราะห์แล้วไปมีผลกระตุ้นในบริเวณอื่นได้ เอทิลีนมีผลต่อความยาวและความหนาในส่วนของลำต้น กระตุ้นการตอบสนองการป้องกันต่อการบาดเจ็บหรือเชื้อโรค ปลดปล่อยพืชจากระยะพักตัว มีผลต่อการเจริญของรากและยอด มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการสร้างรากพิเศษ (adventitious root) มีผลต่อการหลุดร่วงของใบและผล การเสื่อมสภาพของดอกและใบ การสุกของผลไม้ (Davies, 2004)

**การสังเคราะห์เอทิลีนในพืช** (Saraf, Jha and Patel, 2010)

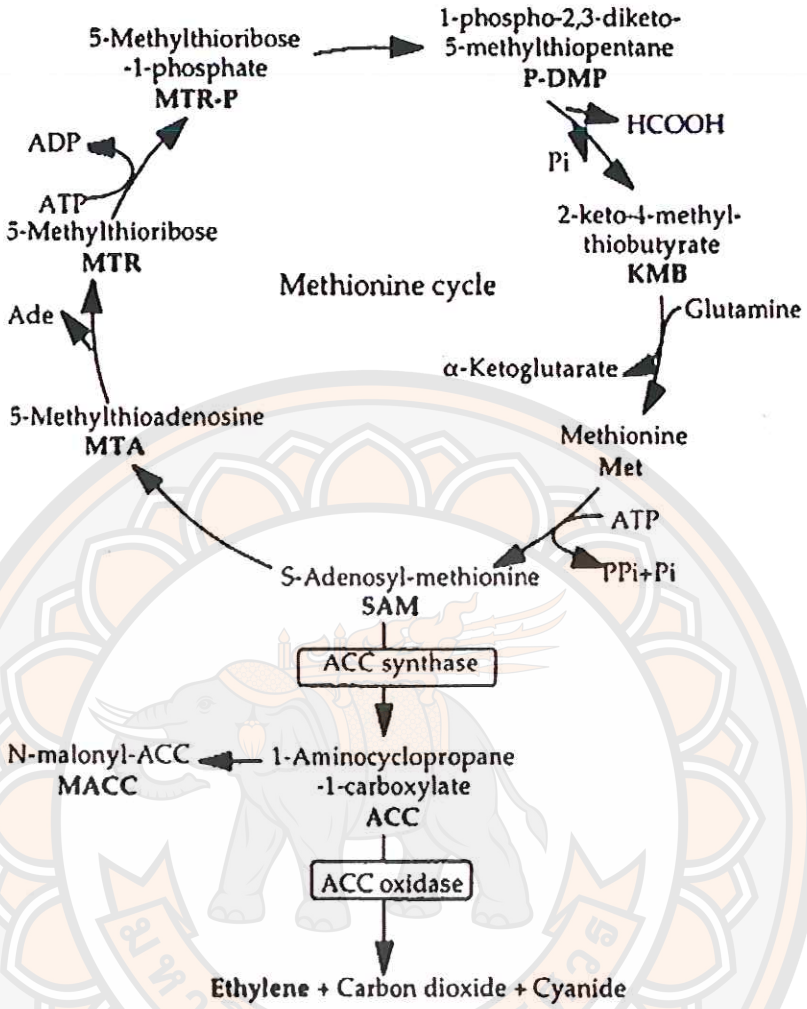
การสังเคราะห์เอทิลีนในพืชมี 3 ขั้นตอนประกอบด้วย

1. **ขั้นแรก** เป็นการเปลี่ยนเมทไธโอนีน (methionine) ไปเป็น S-adenosyl methionine (AdoMet) โดยเอนไซม์ methionine S-adenosyl transferase ซึ่ง AdoMet ถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาต่าง ๆ ของเซลล์เช่น กระบวนการ ethylation และการสังเคราะห์ polyamine

2. **ขั้นที่สอง** เป็นการเปลี่ยน AdoMet ไปเป็น ACC โดยเอนไซม์ ACC synthase ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นจำกัดความเร็วของปฏิกิริยา (rate-limiting step)

3. **ขั้นที่สาม** เป็นการเปลี่ยน ACC ไปเป็นเอทิลีน คาร์บอนไดออกไซด์และไซยาไนด์ (cyanide) โดยเอนไซม์ ACC oxidase (ดังภาพ 16)

ระดับของเอทิลีนในพืชมีผลต่อความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมของพืช และมีผลต่อพัฒนาการของรากและลำต้น โดยระดับเอทิลีนที่พบในพืชมีอยู่ประมาณ 0.5 ไมโครลิตรต่อลิตร และสามารถถูกกระตุ้นการสร้างได้โดยสภาพแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ แสง แรงโน้มถ่วง สารอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ๆ เช่น IAA (Glick, 2005)



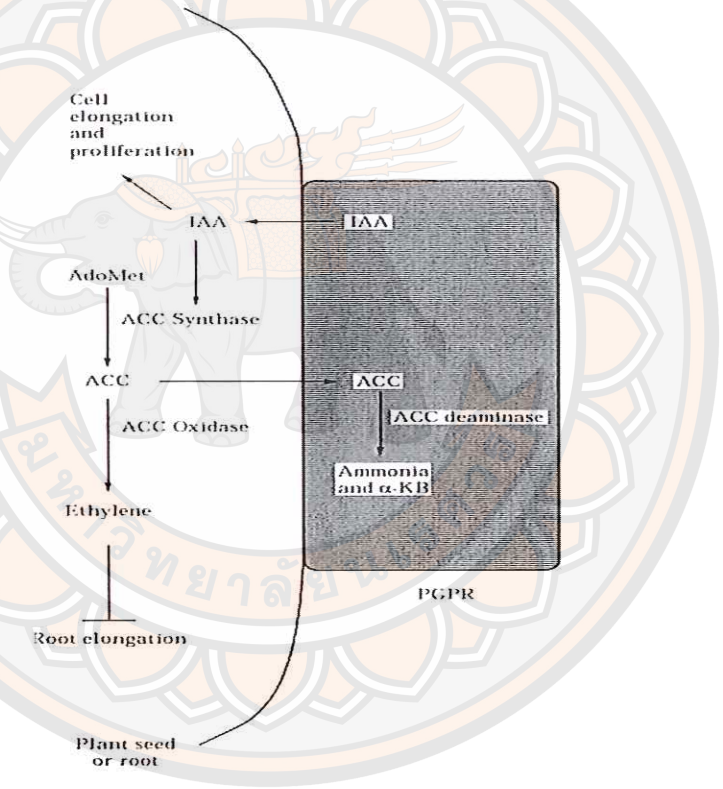

ภาพ 16 วิถีสังเคราะห์เอทิลีนในพืช

**ที่มา**: Saraf, Jha and Patel, 2010

**การควบคุมระดับเอทิลีนโดยเอนไซม์** ACC deaminase

กลไกในการคุมระดับเอทิลีนในพืชเริ่มจาก IAA จากการสังเคราะห์ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพืชนอกจากกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ยังไปชักนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC synthase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้มีการสังเคราะห์ ACC เพิ่มขึ้น กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เอทิลีนเพิ่มขึ้น IAA มีผลทำให้ผนังเซลล์ของพืชมีการคลายตัวยืดหยุ่นขึ้น เซลล์มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น มีการปลดปล่อยสารอาหารออกมากขึ้นรวมทั้ง ACC ที่พืชสร้างขึ้น ACC ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากใบ ราก และเมล็ด (Penrose, et al., 2001) ถูกแบคทีเรียที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อนำเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียและถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ ACC deaminase ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Penrose and

Glick, 2003) ทำให้ระดับ ACC ลดลงมีผลทำให้ระดับเอทิลีนลดลงตามไปด้วย เอทิลีนสามารถถูกสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อภาวะที่ไม่เหมาะสมทั้งทางชีวภาพและกายภาพ เช่น น้ำท่วม ภัยแล้ง การเหี่ยวเฉาของดอกไม้ ความเค็ม โลหะหนัก และโรคพืช โดยภาวะที่ไม่เหมาะสมจะไปชักนำการทำงานของยีนที่สร้างเอนไซม์ ACC synthase และ ACC oxidase ทำให้ระดับเอทิลีนเพิ่มขึ้น มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชทั้งรากและยอด พืชที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียที่สามารถลดระดับเอทิลีนได้ช่วยลดผลจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชโดยเอทิลีนได้ (Glick, Penrose and Li, 1998; Glick, 2014) (ดังภาพ 17)

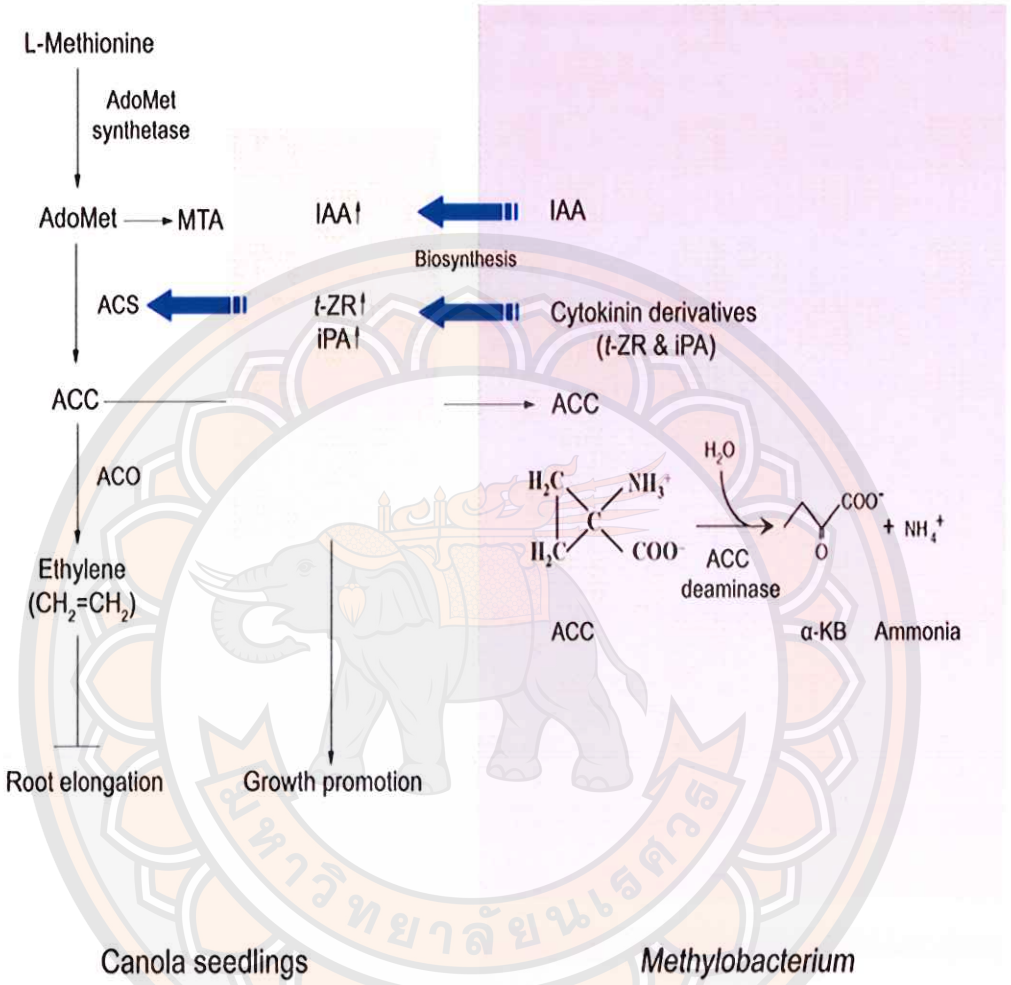



**ภาพ 17 กลไกการควบคุมระดับเอทิลีนของพืชโดยเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรีย**

**ที่มา:** Glick, Penrose and Li, 1998

Madhaiyan, et al. (2006) ได้ศึกษา *M. fujisawaense* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ในการควบคุมระดับเอทิลีนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจาก IAA ที่นอกเหนือจากไปกระตุ้นการเจริญของรากทำให้รากมีการเจริญที่รวดเร็ว แล้วยังไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ACC synthase ในการสังเคราะห์ ACC เป็นสารตั้งต้นที่จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทิลีนโดยเอนไซม์ ACC

oxidase ทำให้ระดับของเอทิลีนเพิ่มขึ้นส่งผลต่อไปให้มีการยับยั้งการเพิ่มความยาวของรากมีผลต่อการดูดซึมธาตุอาหารของพืช (ดังภาพ 18)



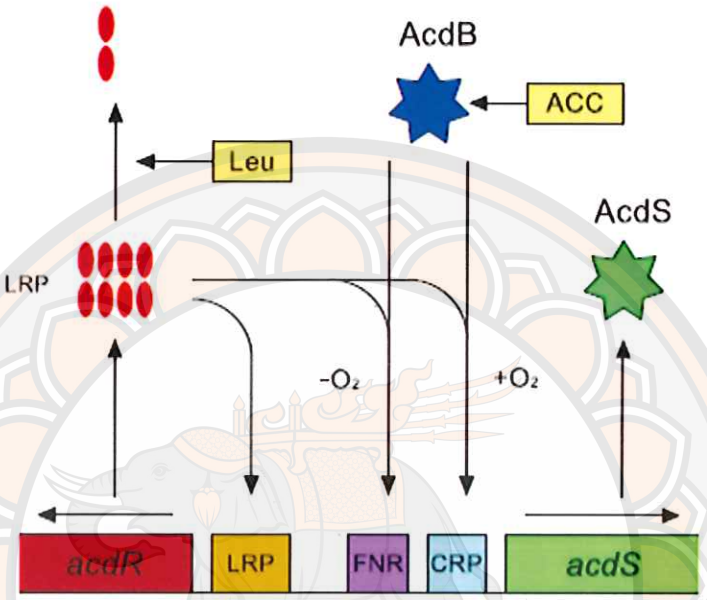

**ภาพ 18 การควบคุมระดับเอทิลีนในพืช โดย *Methylobacterium***

**ที่มา:** Madhaiyan, et al., 2006

**การควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์** ACC deaminase

เอนไซม์ ACC deaminase ถูกถอดรหัสจากยีน *acdS* และต้องการ ACC สำหรับการแสดงออกของยีนและการเจริญของแบคทีเรีย (Jacobson, et al., 1994) จากโครงสร้างของยีน *acdS* ของ *Ps. putida* UW4 ที่บริเวณเหนือยีนขึ้นไปมีส่วนของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วย CRP (cyclic AMP receptor protein) binding site, FNR (fumarate-nitrate reduction regulatory

protein) binding site, Lrp (leucine-responsive regulatory protein) binding site, ACC deaminase regulatory gene (*acdR*) และ promoter ของยีน *acdR* และ *acdS* (Grichko and Glick, 2000; Li and Glick, 2001) (ดังภาพ 19)




**ภาพ 19 โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ ACC deaminase ของ *Ps. putida* UW4**

**ที่มา:** Glick, et al., 2007

ในภาวะที่แบคทีเรียเจริญโดยไม่มี ACC ยีน *acdR* มีการสร้างโปรตีน LRP ออกมา LRP เข้าจับกับบริเวณ LRP box บริเวณนี้จะมี promoter สำหรับการแสดงออกของยีน *acdR* เมื่อถูกโปรตีน LRP เข้าจับทำให้การแสดงออกของยีน *acdR* ถูกยับยั้ง เมื่อแบคทีเรียเจริญในภาวะที่มี ACC โปรตีน LRP เข้าจับกับ ACC ที่จับอยู่กับโปรตีน AcdB กลายเป็น complex (Cheng, et al., 2008) จากนั้น complex เข้าจับกับบริเวณ promoter ของยีน *acdS* ทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC deaminase เมื่อเอนไซม์ ACC deaminase ย่อย ACC ไปเป็น แอมโมเนียและ α-ketobutyrate อาจมีลิวซีน (leucine) เกิดขึ้นจากการย่อยสายของกรดอะมิโน เมื่อมีการสะสมเพิ่มมากขึ้นของลิวซีน จะถูกจับโดยโปรตีน LRP เกิดเป็น dimer ขึ้นทำให้การสังเคราะห์เอมไซม์ ACC deaminase ถูกยับยั้ง การแสดงออกของยีน *acdR* อาจถูกกระตุ้นด้วย promoter ที่อยู่

ใกล้เคียงเช่น CRP ในภาวะการเจริญที่มีออกซิเจน และ FNR ในภาวะการเจริญที่ไม่มีออกซิเจน (Grichko and Glick 2000; Li and Glick, 2001)

**การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture)**

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) เป็นกลวิธีหนึ่งทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืช เช่น การผลิตพืชปลอดโรค การปรับปรุงพันธุ์พืช การเก็บรักษาสายพันธุ์พืช การผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช และการศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ของพืช รวมไปถึงการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็วเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาด โดยการนำเอาส่วนหนึ่งส่วนใดของพืช เช่นอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (protoplast) ของพืช มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมและปลอดเชื้อ (Neumann, Kumar and Imani, 2009) และมีการใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นปัจจัยสำคัญลงในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตนี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชการแบ่งเซลล์ และการขยายขนาดเซลล์ เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดแคลลัส (callus) และพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ โดยเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดออกซินและไซโตไคนิน หากระดับของไซโตไคนินสูงกว่าระดับออกซินมีส่วนสำคัญในการชักนำให้เกิดต้น หากระดับออกซินสูงกว่าระดับไซโตไคนินมีผลในการชักนำให้เกิดราก (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2545)

**อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายรูปแบบ ที่นิยมนำมาใช้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง (semi-solid medium) และอาหารเหลว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช โดยในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งชิ้นส่วนของพืชถูกวางไว้บนผิวหน้าหรือฝังบางส่วนลงในเนื้ออาหาร ในส่วนอาหารเหลวชิ้นส่วนของพืชอาจจมอยู่ในอาหารทั้งหมดหรือจมแค่บางส่วน บางครั้งชิ้นส่วนพืชอาจลอยอยู่ในอาหารเหลว (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2544) ทั้งนี้อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นขั้นพื้นฐานต่อการเจริญเติบโตของพืชปกติตามธรรมชาติทั่วไปซึ่งสามารถจำแนกสารอาหารเหล่านั้นเป็นกลุ่ม ๆ ได้ดังนี้ (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2544; รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2545)

1. สารอนินทรีย์ (inorganic substances) ประกอบด้วย

1.1 สารอนินทรีย์ที่ต้องการในปริมาณมาก (macro-elements/nutrients) ได้แก่ C, H, O, N, P, K, Ca, Mg และ S

1.2 สารอนินทรีย์ที่ต้องการในปริมาณน้อย (micro-elements/nutrients) ได้แก่ Fe, Mn, Cu, Zn, Cl, และ Mo

2. สารอินทรีย์ (organic substances) ประกอบด้วย

2.1 วิตามิน (vitamins) มีหน้าที่เป็นตัวเร่งการทำงานของเอนไซม์ ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ ไทอามีน (thaiamine), กรดนิโคตินิก (nicotinic acid), ไพรีดอกซิน (pyridoxine), อินอซิทอล (inositol), ไบโอติน (biotin), กรดแพนโททินิก (panthothenic acid), กรดโฟลิก (folic acid), โคลีนคลอไรด์ (choline chloride), ไรโบฟลาวิน (riboflavin) และ กรดแอสคอบิก (ascorbic acid)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) มีหน้าที่ในการกระตุ้นการเจริญ การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาการของชิ้นส่วนพืชในการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีความสำคัญคือ สารในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งมักใช้ในปริมาณน้อย ส่วนมากปริมาณที่ใช้อยู่ในช่วง $10^{-5}$ ถึง $10^{-10}$ M การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต้องพิจารณาให้ดี เพราะมีผลไปรบกวนสมดุลของฮอร์โมนภายในชิ้นส่วนพืชทำให้มีผลกระทบต่อการเจริญของชิ้นส่วนพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้ ได้แก่

2.2.1 สารในกลุ่มออกซิน เช่น

1) indole-3-acetic acid (IAA)
2) indole butyric acid (IBA)
3) naphthalene acetic acid (NAA)
4) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
5) 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)

2.2.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น

1) $N_6$-Benzyladenine (BA)
2) kinetine
3) zeatin
4) $N_6$-isopentenyl adenine (2iP)

2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอื่น ๆ เช่น

1) gibeberellic acid (GA)
2) paclobutrazol
3) abscissic acid (ABA)
4) daminozide

5) picloram

3. แหล่งคาร์บอน (carbon sources) เป็นสารประกอบด้วยน้ำตาลต่าง ๆ ได้แก่ กลูโคส (glucose), ซูโครส (sucrose), ฟรักโตส (fructose), แซคคาโรส (saccharose) และแมนนิทอล (mannitol) โดยน้ำตาลซูโครสเป็นที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4. กรดอะมิโน (amino acids) ได้แก่ กลูตามีน (glutamine), แอสพาราจีน (asparagine), ไกลซีน (glycine) และ เคซีน ไฮโดรไลเซต (casein hydrolysate)

5. สารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ กล้วยหอมบด และมอลท์สกัด

ในการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกันไป ถึงแม้จะเป็นสารอาหารอาหารพื้นฐานที่จำเป็นต่อการเจริญแต่ความเข้มข้นที่พืชแต่ละชนิดต้องการ ก็แตกต่างกันไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2545)

**ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นสารในกลุ่มออกซินและไซโคไคนิน ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีผลไปกระตุ้นการแบ่งเซลล์และขยายขนาดของเซลล์ ชักนำให้เกิดแคลลัสและกระตุ้นการเกิดราก ส่วนผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินมีผลไปกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุและพัฒนาการของคลอโพลาสต์ นอกจากนี้ยังชักนำให้มีการเกิดยอดและยับยั้งการเกิดราก (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2544)

ตัวอย่างผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเช่น ในการศึกษาของ Supe, Dhote and Royman (2006) ที่มีการใช้ IAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.2 – 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมในอาหารสูตร MS(1962) ในเพาะเลี้ยง *Withania somnifera* พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ IAA และ IBA เพิ่มขึ้น จำนวนรากเฉลี่ยต่อยอด และร้อยละเฉลี่ยของการเกิดรากเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ในการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี IAA นอกจากจะเกิดรากแล้วยังพบว่ามีก้อนแคลลัสเกิดขึ้นด้วย

Ebrahim, et al. (2007) ได้ใช้ IAA, IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 1.0 – 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรผสมในอาหารสูตร 1/2MS(1962) ในการกระตุ้นการเกิดรากของต้นอ่อน *Coffea arabica* L พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ IAA และ IBA เพิ่มขึ้น จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นและความยาวรากเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้พบว่า มีก้อนแคลลัสเกิดขึ้นด้วย เช่นเดียวกับ Sivanesan และ Jeong (2009) ได้ใช้ IAA, IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 – 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรผสมในอาหารสูตร 1/2MS(1962) ในการกระตุ้นการเกิดรากของต้น *Plumbago zeylanica* L.

ที่เจริญมาจากแคลลัส พบว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ เมื่อความเข้มข้นของ IAA และ IBA เพิ่มขึ้น จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นและความยาวรากเฉลี่ยจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และยังมีก้อนแคลลัสเกิดขึ้นด้วย

Abdelmageed, et al. (2011) ได้ใช้ IAA ความเข้มข้น 1.0 – 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมในอาหารสูตร MS(1962) ในการกระตุ้นการเกิดรากของต้น *Etlingera elatior* ที่ได้จากการเพาะเนื้อเยื่อ พบว่าที่ความเข้มข้นของ IAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยต่อยอดสูงที่สุด และที่ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงที่สุด โดยที่จำนวนรากเฉลี่ยจะเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ IAA เท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนรากเฉลี่ยจะลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ IAA ในขณะที่ความยาวรากเฉลี่ยจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ IAA

Sebastian and Hariharan (2013) ได้ใช้ IAA, IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 – 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรผสมในอาหารสูตร MS(1962) ในการกระตุ้นการเกิดรากของต้น *Heliotropium keralense* ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยรูปแบบของจำนวนรากเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ IAA และ IBA เมื่อความเข้มข้นของ IAA เท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของ IBA เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนรากเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจะสูงที่สุด และเมื่อความเข้มข้นของสารทั้งสองเพิ่มขึ้น จำนวนรากเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น

ส่วนตัวอย่างผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น ในการศึกษาของ Kim, Schumann and Klopfenstein (1997) ที่ผสมสาร thidiazuron และ 6-benzyladenine (BA) ลงในอาหารสูตร MS(1962) เพื่อเพาะเลี้ยงต้นกล้า *Fraxinus pennsylvanica* Marsh ที่มีการตัดเอายอดออก พบว่า ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ของ thidiazuron และ 40 ไมโครโมลาร์ของ BA ทำให้ยอด ที่เกิดขึ้นใหม่มีมวลชีวภาพสูงมากกว่ากลุ่มควบคุม

Jafari, Othman and Khalid (2011) ได้ศึกษาการใช้ benzylaminopurine (BAP) ผสมในอาหารสูตร MS(1962) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของ *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan พบว่า ที่ความเข้มข้น 33 ไมโครโมลาร์ของ BAP ทำให้มีการเกิดยอดเพิ่มมากขึ้น

Hristova, et al. (2013) ได้ศึกษาผลของการใช้ 6-benzylaminopurine ความเข้มข้นแตกต่างกันที่อยู่ในช่วง 0.1 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรผสมในอาหารสูตร MS(1962) เพื่อการเพาะเลี้ยง *Artemisia Chamaemelifolia* Vill พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ 6-benzylaminopurine เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นการเกิดยอดเพิ่มขึ้นแต่ยอดที่เกิดขึ้นมีขนาดแคระแกร็น และทุกความเข้มข้นของ

6-benzylaminopurine ยับยั้งการเกิดราก ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.6 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุดแต่จะมีอาการฉ่ำน้ำ ความเข้มข้นที่ทำให้ *Artemisia Chamaemelifolia* Vill มากกว่าร้อยละ 50 เกิดยอดใหม่มากกว่า 10 ยอดต่อชิ้นคือ ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.3 และ 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chandel and Pandey (2014) ได้ใช้ $N^6$-benzylaminopurine ผสมในอาหารสูตร MS(1962) เพื่อเพาะเลี้ยง *Phaseolus vulgaris* พบว่าที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ *P. vulgaris* เกิดยอดเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาการของแคลลัสหรือชิ้นส่วนของพืชไปเป็นยอดหรือราก ยังขึ้นอยู่กับสมดุลของอัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินในเนื้อเยื่อพืช ถ้ามีปริมาณออกซินสูงกว่าไซโตไคนิน ชักนำให้มีการเกิดรากมากกว่าเกิดยอด แต่ถ้ามีปริมาณไซโตไคนินมากกว่าออกซินชักนำให้เกิดยอดมากกว่าเกิดราก ตามทฤษฎีการควบคุมของฮอร์โมนของ Skoog–Miller (Shirokikh, Shupletsova and Shirokikh, 2007) ดังเช่นการศึกษาของ Gopitha, Bhavani และ Senthilmanickam (2010) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอ้อยที่สามารถเกิดยอดได้ดีบนอาหาร MS(1962) ผสม 6-benzylaminopurine ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ indole-3-butyric acid ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัม ในขณะที่อาหาร MS(1962) ผสม 1-naphthaleneacetic acid ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครสร้อยละ 5 สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาของ North and Ndakidemi (2012) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Streptocarpus rexii* Lindl ที่สามารถเกิดยอดได้ดีบนอาหาร MS(1962) ผสม6-benzylaminopurine ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ indole-3-acetic acid ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหาร MS(1962) ผสม indole-3-acetic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นการเกิดรากใน *Streptocarpus rexii* Lindl. ได้ดีที่สุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 6-benzylaminopurine ร้อยละการเกิดรากจะลดลง

นอกจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ได้จากการสังเคราะห์มีผลต่อการเจริญของชิ้นส่วนพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ยังมีสารอินทรีย์ธรรมชาติที่ได้จากจุลินทรีย์ที่เป็นสารในกลุ่มของสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนพืช ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของชิ้นส่วนพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกด้วย

**การใช้จุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

แบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดที่แยกได้จากพืชมีความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน ได้รับความสนใจและถูกนำมาศึกษาเพื่อใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและพัฒนาของชิ้นส่วนพืชในการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Kalyaeva, et al. (2001) ได้ศึกษาแบคทีเรียในกลุ่มของ aerobic methylotrophic bacteria พบว่า *Methylovorus mays* มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเกิดรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L., cv. Nevskii) และลินนิน (*Linum usitatissimum* L., cv. Belinka)

Ali and Hasnain (2007) ได้ศึกษาการใช้น้ำหมักของแบคทีเรีย *Halomonas* sp. RE1 และ *Halomonas* sp. HT1 ที่มีความสามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน โดยมีความเข้มข้นของสารประกอบ IAA เท่ากับ 21 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้น้ำหมักของแบคทีเรียผสมกับอาหาร MS(1962) เพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ของกระหล่ำดอก (*Brassica oleracea* L.) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า สามารถชักนำการเกิดยอดใหม่ของ *B. oleracea* ได้ดี และสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสังเคราะห์

Azlin, et al. (2007) ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Acetobacter diazotrophicus* R12 และ *Azospilillum brasilense* Sp7 ที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจน ในการส่งเสริมการเจริญของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าแบคทีเรียทั้งสองมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญและชักนำการเกิดรากจากยอดของปาล์มน้ำมัน

Subbarayan, Varadharajan and Kalyanaraman (2010) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่แยกได้จากการปนเปื้อนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักเป็ดไทย (*Alternanthera sessilis*) พบว่าสามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินในอาหารเหลว czapex medium ที่เติมทริปโตเฟน โดยมีความเข้มข้นของสารประกอบ IAA เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทดลองนำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรามาผสมกับอาหาร MS(1962) เพื่อใช้ในการชักนำการเกิดแคลลัสใน *A. sessilis* พบว่าสามารถชักนำให้ *A. sessilis* เกิดแคลลัสได้

Hadiwiyono and Widono (2012) ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นกล้วย และมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและเป็นปรปักษ์กับแบคทีเรียที่ก่อโรค blood disease bacterium (BDB) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) เพื่อใช้ในการผลิตต้นกล้าที่มีคุณภาพดีด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย

Janarthine and Eganathan (2012) ได้ศึกษาแบคทีเรีย *Sporosarcina aquimarina* SjAM16103 ที่แยกจากเนื้อเยื่อของแสมทะเล (*Avicennia marina*) และมีความสามารถในการสังเคราะห์สร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน โดยมีความเข้มข้น

ของสารประกอบ IAA เท่ากับ 2.37 ไมโครโมลลาร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำแบคทีเรียไปเพาะลงบนชิ้นส่วนของพืช 4 ชนิด คือ พรมมิ (*Bacopa monnieri*) หญ้าฟาน (*Eupatorium triplinerve*) ตาตุ่มทะเล (*Excoecaria agallocha*) และแสมทะเล (*Avicennia marina*) ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า แบคทีเรียสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของชิ้นส่วนพืช โดยชักนำการเกิดรากและรากขนเมื่อเทียบกับชิ้นส่วนของพืชกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เพาะเชื้อ

**แบคทีเรียสกุล *Metylobacterium* กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เป็นแบคทีเรียอีกหนึ่งสกุลที่ถูกพบอาศัยร่วมกับพืชโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับพืชที่อาศัยอยู่ และมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมีการศึกษาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของชิ้นส่วนพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Kalyaeva, et al. (2003) ในแบคทีเรียกลุ่ม aerobic methylotrophic bacteria ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) พบว่า *Methylobacterium* sp. D10 และ *Methylophilus glucoseoxidans* สามารถกระตุ้นการเกิดแคลลัสและยอดได้ อีกทั้งยังส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ที่มีใบสีเขียวสดและมีระบบรากที่ดี

Shirokikh, Shupletsova and Shirokikh (2007) ได้ศึกษาแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากธรรมชาติต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวบาร์เลย์ มันฝรั่ง และสตรอเบอร์รี่ พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้ชิ้นส่วนข้าวบาร์เลย์ มันฝรั่ง และสตรอเบอร์รี่เกิดรากและยอดได้

Devi, Sundaram and Poorniammal (2010) ได้ศึกษาแบคทีเรียในกลุ่ม facultative methylotrophs ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อแคลลัส และมีความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าว พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้และ *Methylobacterium extorquens* AM1 สามารถชักนำให้แคลลัสของข้าวมีขนาดเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังทำให้มีปริมาณคลอโรฟิล์และปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม

**หญ้าปักกิ่ง** (Ya pakking; Beijing grass)

หญ้าปักกิ่ง หรือหญ้าเทวดา (angle grass) มีชื่อเป็นภาษาจีนว่า เล่งจือเซ่า เป็นสมุนไพรจีนที่เข้ามาแพร่หลายในประเทศไทย มีการนำต้นพันธุ์มาจากบริเวณสิบสองปันนาทางตอนใต้ของมณฑลยูนนาน ประเทศจีน ปัจจุบันนิยมนำมาใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งปอด เป็นต้น จากรายงานการใช้หญ้าปักกิ่ง ในผู้ป่วยหลายรายพบว่าทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตขึ้น (สุภาภรณ์ ปิติพร และสุดใจ พรหมเกิด, 2555)

หญ้าปักกิ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao and Kammathy มีลักษณะคล้ายหญ้ามาเลเซีย อยู่ในวงศ์ผักปลาบ (Commelinaceae) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้ล้มลุกที่มีลำต้นกลม สีเขียว มีความสูงประมาณ 10 เซนติเมตร ลักษณะของใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ใบที่โคนต้นเป็นรูปขอบขนาน มีความกว้าง 1.5 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร ใบที่ปลายยอดมีขนาดเล็กและสั้นกว่าใบที่โคนต้น ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบ สีเขียว ก้านใบเป็นกาบหุ้มลำต้น ออกดอกที่ปลายยอดเป็นช่อ สีฟ้าหรือสีม่วงอ่อน กลีบดอกบางมี 4 กลีบ โคนกลีบเรียว มีใบประดับย่อยค่อนข้างกลม สีเขียวอ่อน ผล เป็นผลแห้งแตกออกได้ (ศูนย์พัฒนาการแพทย์แผนไทย, 2549)

**คุณสมบัติของหญ้าปักกิ่ง**

จากความนิยมนำหญ้าปักกิ่งมาใช้ในการรักษามะเร็งและได้ผลดี จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าทางวิทยาศาสตร์และมีหลายผลงานที่สนับสนุนผลของการรักษาด้วยหญ้าปักกิ่ง จากการศึกษาโดยใช้สารสกัดหญ้าปักกิ่งด้วยเอทานอล (ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 80 สามารถกระตุ้นให้เกิดอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ (aflatoxin B1-albumin adduct) เร็วขึ้นถึง 3 เท่าในหนูขาวที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (aflatoxin B1) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดอุบัติการเกิดมะเร็งตับในคนและสัตว์ทดลอง โดยการเกิดอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์จะสัมพันธ์กับระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-ดีเอ็นเอแอดดักส์ (aflatoxin B1-DNA adduct) ที่ทำให้เกิดความผิดปกติของดีเอ็นเอนำไปสู่โอกาสการเกิดมะเร็งตับ การเกิดอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ที่เร็วขึ้นในหนูทดลองที่ได้รับหญ้าปักกิ่งอาจเป็นกระบวนการลดปริมาณของอะฟลาทอกซิน-8,9-อีพอกไซด์ (aflatoxin-8,9-epoxide) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในตับที่สามารถไปจับกับโมเลกุลของดีเอ็นเอทำให้เกิดความผิดปกติ (ธีระ ซีโวนรินทร์, อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ และคริสโตเฟอร์ ไวล์ด, 2541) นอกจากนี้ยังสามารถลดการเกิดดีเอ็นเอแอดดักส์ (DNA adduct) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอโซซีมีเทน (azoxymethane) เป็นสารก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้เล็กน้อย และมีฤทธิ์อย่างอ่อนในการป้องกันการเกิดแอเบอแรนต์ คริปต์โฟไซ (aberrant cryptfoci) เป็นรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ (เยาวเรศ อินทิยศ และคณะ, 2542) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 5 ชนิด คือ Promyelocytic leukemia (HL60), T-cell leukemia (Molt 4), B-cell leukemia (Daudi), Monocytic leukemia (U937) และ Erythroleukemia (K562) (สาครพรประเสริฐ, ขนิษฐา พันธุรี และอุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, 2544) เมื่อนำผงสมุนไพรหญ้าปักกิ่งมาสกัดหาสารออกฤทธิ์ด้วยเอทานอล และแยกส่วนด้วยคอลัมน์ Diaion HP20 พบสารออกฤทธิ์

สำคัญในการต้านเซลล์มะเร็งในกลุ่มไกลโคสฟิงโกลิพิด (glycosphingolipid) คือ 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-6'-ene-cosamide)-sphingosine มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และเซลล์มะเร็งลำไส้ของคน (SW620) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเพียง 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์มะเร็งตายประมาณร้อยละ 50 (Jiratchariyakul, et al., 1998) จากการศึกษาความเป็นพิษของหญ้าปักกิ่งโดยใช้น้ำคั้นจากหญ้าปักกิ่งสดพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต เคมีเลือด และพยาธิสภาพของอวัยวะสำคัญ ทั้งแบบเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรังในหนูขาว (พิมลวรรณ ทัพยุทธพิจารณ์, วัลลา วามนัฐจินดาและพรรณี พิเดช, 2534; พิมลวรรณ ทัพยุทธพิจารณ์, เพียงจิต สัตตบุศย์ และพรรณี พิเดช, 2534)

**วิธีการนำหญ้าปักกิ่งมารับประทาน**

วิธีการนำหญ้าปักกิ่งมาใช้เริ่มแรกจะใช้วิธีตุ๋น ใช้หญ้าปักกิ่งประมาณ 10 ต้น เติมน้ำให้ท่วม ใช้เวลาตุ๋นให้เปื่อยประมาณ 8 ชั่วโมง เนื่องจากวิธีนี้ใช้เวลานานต่อมาจึงใช้วิธีตำคั้นใช้หญ้าปักกิ่งประมาณ 3 ต้น ตำให้ละเอียดในครก แล้วเติมน้ำต้มสุก 2 ช้อนโต๊ะ นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง เอาน้ำคั้นมาดื่ม สำหรับผู้ที่ไม่มีเวลาจะใช้วิธีปั่นดื่ม ใช้หญ้าปักกิ่งประมาณ 6-7 ต้น ใส่น้ำครึ่งแก้ว ปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ กรองกากออก นำน้ำที่ได้ไปดื่ม ซึ่งการจัดส่งหญ้าปักกิ่งสดผ่านทางพัสดุไปให้ผู้รับ ทำให้หญ้าปักกิ่งเฉาและเน่าบางส่วนทำให้ไม่สะดวกทั้งผู้จัดส่งและผู้รับ จึงได้มีการพัฒนาเป็นยาลูกกลอน ปัจจุบันวิทยาการได้ก้าวหน้าไปมากทางโรงพยาบาลอภัยภูเบศรได้นำหญ้าปักกิ่งไปอบแห้งแล้วบรรจุเป็นแคปซูลจัดจำหน่าย (สุภาภรณ์ ปิติพร และสุดใจ พรหมเกิด, 2555)

**การเพาะปลูกหญ้าปักกิ่ง**

หญ้าปักกิ่งเป็นพืชที่ชอบดินปนทราย ชอบน้ำแต่ไม่ชอบน้ำขัง และชอบแดดรำไร ในการปลูกหญ้าปักกิ่งไม่ควรใส่ปุ๋ยเคมีและยาฆ่าแมลง การปลูกสามารถทำได้ 2 วิธี วิธีแรกใช้ไหลหรือต้นแยกที่มาจากต้นอื่นที่มีอายุไม่ต่ำกว่า 3 เดือนขึ้นไป วิธีที่สองจะใช้วิธีการเพาะเมล็ด หญ้าปักกิ่งที่เพาะด้วยต้นจะออกดอกเมื่อมีอายุประมาณ 3 เดือน แต่ถ้าเพาะด้วยเมล็ดจะออกดอกเมื่อมีอายุประมาณ 5 เดือน เมื่อดอกแก่จัดจนแห้งให้ขยี้เอาเมล็ดโรยลงในดินที่เตรียมไว้ ใช้เวลาประมาณ 12 ถึง 15 วัน เมล็ดจะงอก ในการนำหญ้าปักกิ่งไปใช้ควรรอประมาณ 3-4 เดือนให้ออกดอกก่อนและเพื่อให้หญ้าปักกิ่งสามารถแตกกอใหม่ การตัดไปใช้ควรตัดให้เหลือข้อหน้าดินไว้เพื่อให้หญ้าปักกิ่งแตกกอใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (สุภาภรณ์ ปิติพร และสุดใจ พรหมเกิด, 2555) จะเห็นได้ว่าต้องใช้ระยะเวลาพอสมควรในการขยายพันธุ์ ดังนั้นในปัจจุบันมีเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่นิยมใช้ในการเพิ่มปริมาณของต้นพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก ในระยะเวลาอันสั้นและใช้พื้นที่ไม่มาก ซึ่ง Scaramuzzi, Apollonio and D'Emerico (2000) และ Mahesh, et al. (2012) ได้ใช้เทคนิค

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการขยายพันธุ์พืชในวงศ์ผักปลาบ คือ หญ้าไผ่น้ำ (*Tradescantia fluminensis* var. *foliis variegates*) หัวใจม่วง (*Tradescantia pallida*) และ *Commelina ensifolia*

**เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับสมุนไพร**

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่สามารถขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ขยายพันธุ์และเก็บรักษาสายพันธุ์สมุนไพรหลายชนิดที่มีคุณค่าทางการแพทย์และผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม และยังถูกนำมาใช้ในการขยายพันธุ์และเก็บรักษาสายพันธุ์สมุนไพรบางชนิดที่หายากต้องได้มาจากป่า ที่ได้ผลกระทบจากการเจริญของชุมชนเมืองและความต้องการพื้นที่ทำการเกษตรทำให้มีการบุกรุกและทำลายแหล่งที่อยู่ของสมุนไพร ทำให้มีความเสี่ยงสูญพันธุ์ และด้วยวิธีดั้งเดิมนั้นต้องอาศัยการออกผลใช้เวลานานและอัตราการติดผลต่ำ การงอกของต้นอ่อนจากเมล็ดเกิดขึ้นได้น้อย ใช้เวลานานถึงจะได้สมุนไพรจำนวนมากตามความต้องการ และในบางครั้งไม่สามารถรักษาสายพันธุ์ที่มีคุณภาพผ่านทางเมล็ดได้ จึงทำให้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นที่นิยมแพร่หลายทั้งในเอเชียและยุโรป (Nalawade and Tsay, 2004; Debnath, Malik and Bisen, 2006)

นอกจากจะใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์และเก็บรักษาสายพันธุ์พืชสมุนไพรแล้ว ยังมีการใช้เทคนิคนี้ในการเพาะเลี้ยงสมุนไพรเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ต่าง ๆ เช่น แอลคาลอยด์ (alkaloid) เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ฟีนอลลิก (phenolic) สเตียรอยด์ (steroid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติทางเภสัชกรรมในการนำไปผลิตเป็นยารักษาโรค การได้มาของสารทุติยภูมิเพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อการใช้ในการผลิตยา จำเป็นต้องใช้สมุนไพรเป็นจำนวนมหาศาล การเพาะปลูกปกติต้องใช้เนื้อที่ ระยะเวลา การบำรุงรักษา และการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม จึงทำให้ได้สารทุติยภูมิเพียงพอต่อความต้องการ แตกต่างกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้เนื้อที่ไม่มาก และไม่ถูกรบกวนจากปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม และสภาพภูมิอากาศ สามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้สามารถเก็บเกี่ยวได้ตลอดเวลา อีกทั้งผลผลิตที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างรุ่นการผลิต (วราภรณ์ ภูตะลุม, 2551) มีสมุนไพรหลายชนิดได้ถูกนำมาศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้รวบรวมไว้ ดังตาราง 4

ตาราง 4 สมุนไพรที่นำมาใช้ศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

| สมุนไพร | สารทุติยภูมิ | ชิ้นส่วนที่ศึกษา | อ้างอิง |
|---|---|---|---|
| *Allium ampeloprasum* L. | essential oils | callus and leaf | Monemi, et al., 2014 |
| *Aloe barbadensis* | anthraquinone | callus | Supe, 2013 |
| *Artemisia* sp. | sesquiterpene lactones, Artemisinin and arglabin | shoot and callus | Grech-Baran and Pietrosiuk, 2012 |
| *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturpfl. | alpinetin, pinocembrin, cardamonin, pinostrobin and panduratin | callus | Yusuf, Annuar and Khalid, 2013 |
| *Catharanthus roseus* (L.) G. Don | alkaloids | callus | Verma, Singh and Singh, 2012 |
| *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad | quercetin | callus | Meena, Meena and Patni, 2014 |
| *Eurycoma longifolia* Jack | canthin-6-one alkaloid and 4H-imidazol-4-one alkaloid | callus | Galih and Esyanti, 2014 |
| *Ferula gummosa* | essential oils | callus and seedlings | Nematolahi, Mortazaeinezhad and Radnezhad, 2015 |
| *Glossogyne tenuifolia* Cassini | oleanolic acid and luteolin | shoot and root | Chen, et al., 2014 |
| *Gymnema sylvestre R.Br* | gymnemic acids and gymnemagenin | callus | Gopi and Vatsala, 2006 |
| *Hypericum perforatum* L. | hypericin | shoots | Savio, Astarita and Santarem, 2011 |
| *Mentha piperita* | essential oils | shoot | Santoro, et al., 2013 |
| *Mitragyna speciosa* | mitragynine | callus | Zuldin, et al., 2013 |

ตาราง 4 (ต่อ)

| สมุนไพร | สารทุติยภูมิ | ชิ้นส่วนที่ศึกษา | อ้างอิง |
|---|---|---|---|
| *Momordica charantia* L. | alpha-eleostearic acid | callus | Ali and Tariq, 2013 |
| *Phyllanthus niruri* Linn. | phyllanthin | callus | Prashanth, et al., 2012 |
| *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth | alkaloids | callus and hairy roots | Shetty, et al., 2014 |
| *Ricinus communis* L. cv. Shabje | ricin | callus | Rahman and Bari, 2012 |
| *Saintpaulia ionantha* Wendl. | cyanidin | callus | Al-Sane, et al., 2005 |
| *Solenostemma argel* | alkaloids, cardinolides and flavonoids | callus | El Tigani and Ahmed, 2009 |
| *Thymus vulgaris* L. | flavonoids | shoots | Karalija and Paric, 2011 |
| *Withania somnifera* L. Dunal | withanolides | callus | Sivanandhan, et al., 2004 |
| *Zingiber officinale* Rosc. | gingerol and zingiberene | callus | Anasori and Asghari, 2008 |

# บทที่ 3

# วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็นหัวข้อดังต่อไปนี้

1. การแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากใบหญ้าปักกิ่ง

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง

3. การศึกษาความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้

4. การศึกษาความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก

5. การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก และการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการสร้างสารประกอบ IAA ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

7. การศึกษาผลความเป็นไปได้ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกที่มีความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่ง

**อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง**

1. หลอดทดลองขนาด 13 x 100, 16 x 150 และ 25 x 150 มิลลิลเมตร
2. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 x 150 และ 20 x 125 มิลลิลเมตร
3. ฟลาสก์ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
4. ขวดสีชาขนาด 1,000 มิลลิลิตร
5. จานเพาะเชื้อขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร
6. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาด 120 มิลลิลิตร (4 ออนซ์)
7. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50 และ 1,000 มิลลิลิตร

8. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
9. กรวยแยก (separatory funnel)
10. ชุดกรองแบคทีเรีย (millipore filter)
11. ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
12. แผ่น TLC 60F-254 (Merck) และ TLC tank
13. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)
14. เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง (balance : Sartorius LC 6200 S )
15. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (balance : Sartorius AC 210S)
16. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave : Sturdy SA-300VL)
17. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow : Faster BH-EN2004S)
18. ตู้บ่มเชื้อ (incubator : Shellab 1565)
19. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker : New Brunswick 4340)
20. เครื่องเขย่า (shaker : Gallenkamp)
21. ตู้อบลมร้อน (hot air oven : Memmert INE400)
22. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (freezer)
23. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer: Pharmacia Biotech Novaspec II)
24. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter : Eutech)
25. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge: Beckman J2-MC)
26. เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro centrifuge : Denville 260D)
27. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator : Buchi Rotavapor R-205)
28. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
29. เครื่องวัดคลอโรฟิลล์ (chlorophyll meter : Konica Minolta SPAD-502)
30. เครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC: Shimadzu LC-10AD)

**อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

1. ammonium mineral salts (AMS) agar
2. glycerol-peptone (GP) agar
3. tryptic soy agar (TSA)
4. nutrient agar (NA)
5. low nutrient medium (LNM)
6. DF salts minimal medium
7. Murashige and Skoog medium; MS(1962)
8. แอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan)
9. ไซโคลเฮกซิไมด์ (cycloheximide)
10. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite)
11. salkowski reagent
12. เมทานอล (methanol)
13. เมทานอล (methanol) เกรด HPLC
14. เอทิลอะซิเตท (ethylacetate)
15. บิวทานอล (butanol)
16. โทลูอีน (toluene)
17. กรดอะซิติก (acetic acid)
18. กรดอินโดล-3-อะซิติก (indole-3-acetic acid; IAA)
19. ซีเอติน (zeatin)
20. ซีเอตินไรโบไซด์ (zeatin riboside)
21. ไคเนติน (kinetin)
22. เบนซิลอะดีนีน (benzyladenine; BA)
23. อัลฟา-คีโตบิวทีริก (α-ketobutyric acid)
24. กรดแกลลิค (gallic acid)
25. กรด 1-อะมิโนไซโคลโพรเพน-1-คาร์บอกซิลิก (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ACC)
26. แมกนีเซียม ซัลเฟต เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ (30 mM magnesium sulfate)
27. ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6)
28. กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.56 โมลาร์ (0.56 M HCl)

29. 2,4-ไดไนโตรฟีนีลไฮดราซีน (2,4-dinitrophenylhydrazine reagent)
30. ไดเมทิลฟอร์มาร์ไมด์ (N,N-dimethylformamide; DMF)
31. 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-dipheyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)
32. ฟอลิน-ซิโอแคลตูรีเอเจนต์ (folin-ciocalteu reagent)
33. โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate)

**การแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากใบหญ้าปักกิ่ง** (ดัดแปลงจาก Corpe, 1985; Madhaiyan, Poonguzhali and Sa, 2007)

**1. การเก็บตัวอย่างใบหญ้าปักกิ่ง**

1.1 หญ้าปักกิ่งที่นำมาใช้ในการทดลองเก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลกที่มีลักษณะการปลูกแบบปลูกไว้ใช้เองในครัวเรือน โดยมีลักษณะของใบ เป็นใบเดี่ยว สีเขียวเรียงสลับกัน ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบ ใบที่โคนต้นขอบขนานเป็นกาบหุ้มลำต้น ใบที่ปลายยอดมีขนาดเล็กสั้นกว่าใบที่โคนต้น (ดังภาพ 20) และได้รับการยืนยันสายพันธุ์เทียบกับหญ้าปักกิ่งจากโรงพยาบาลบางระกำ อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก ที่มีการส่งเสริมให้ชาวบ้านปลูกเพื่อใช้ผลิตยาสมุนไพร และหญ้าปักกิ่งจากจังหวัดลำปาง ด้วยวิธี amplified fragment length polymorphism (AFLP) โดยห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยมีค่าร้อยละการเปรียบเทียบความตรงกันของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 98.61



**ภาพ 20 หญ้าปักกิ่งที่นำมาแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium***

1.2 การเก็บตัวอย่างใบหญ้าปักกิ่ง เลือกใบหญ้าปักกิ่งจากยอดที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ไม่มีรอยด่างหรือรอยกัดแทะของแมลงหรือหนอน นับใบจากยอดบนสุดลงมา 5 ใบ ใช้กรรไกรตัดและเก็บใส่ในถุงพลาสติกให้เรียบร้อย นำไปทำการแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ทั้ง epiphytic และ endophytic *Methylobacterium* ในห้องปฏิบัติการต่อไป

2. **การแยก** epiphytic *Methylobacterium*

2.1 นำใบหญ้าปักกิ่งมาล้างน้ำประปาให้สะอาด ใช้กรรไกรตัดใบหญ้าปักกิ่งไม้ให้มีขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร

2.2 ชั่งใบหญ้าปักกิ่ง 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ที่ใส่ใบหญ้าปักกิ่ง นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.3 เมื่อครบกำหนดเวลานำน้ำกลั่นในฟลาสก์มาเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilutions) ให้มีระดับการเจือจางที่ $10^{-1}$ ถึง $10^{-3}$ นำไปทำการ spread plate ที่ระดับความเจืองจางละ 3 ซ้ำ บนจานอาหาร ammonium mineral salts (AMS) agar ที่เติมเมทานอลลงไปให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร (v/v) และเติมไซโคลเฮกซิไมด์ (cycloheximide) 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

2.4 นำจานอาหารที่ผ่านการ spread plate แล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตโคโลนีสีชมพูที่เจริญขึ้นบนอาหาร นับจำนวนโคโลนีสีชมพู คำนวณหาค่า colony-forming unit (cfu) ต่อกรัมของใบหญ้าปักกิ่ง

2.5 เลือกโคโลนีสีชมพูที่มีความแตกต่างกันมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยการ cross streak บนจานอาหาร glycerol-peptone (GP) agar ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว

2.6 เก็บโคโลนีเดี่ยวใส่ลงในอาหารเหลว GP ผสมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 - 15 นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง (freezer) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลลเซียส เพื่อเก็บเป็นเชื้อต้นตอ (stock) และเก็บบนอาหารวุ้นผิวเอียง GP เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับใช้งาน (working stock) ในการทดลองต่อไป

3. **การแยก** endophytic *Methylobacterium*

3.1 ชั่งใบหญ้าปักกิ่งที่ตัดเป็นชิ้นแล้วจากข้อ 2.1 มา 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.2 นำใบหญ้าปักกิ่งที่อยู่ในฟลาสก์ไปทำการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของใบหญ้าปักกิ่งด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยเทลงไปให้ท่วมใบหญ้าปักกิ่งเขย่าเบา ๆ ประมาณ 1-2 นาทีแล้วเทเอทานอลออก จากนั้นเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ให้ท่วมใบหญ้าปักกิ่งเขย่าเบา ๆ ประมาณ 5 นาทีแล้วเทโซเดียมไฮโปคลอไรท์ออก

3.3 เมื่อฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของใบหญ้าปักกิ่งเสร็จให้ล้างใบหญ้าปักกิ่งที่อยู่ในฟลาสก์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง นำน้ำกลั่นที่ใช้ล้างใบหญ้าปักกิ่งครั้งสุดท้ายไปทำการ spread plate บนจานอาหาร tryptic soy agar (TSA) และ AMS agar เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของใบหญ้าปักกิ่ง

3.4 นำจานอาหาร TSA และ AMS agar ที่ผ่านการ spread plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเกิดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด โดยบนอาหาร AMS agar จะต้องไม่พบโคโลนีสีชมพู

3.5 นำใบหญ้าปักกิ่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวและล้างทำความสะอาดแล้วบดให้ละเอียดด้วยทรายละเอียดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่บรรจุในถุงพลาสติกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3.6 เทน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตรลงในถุงพลาสติกที่มีใบหญ้าปักกิ่งบดละเอียด ผสมน้ำกลั่นกับใบหญ้าปักกิ่งบดละเอียดในถุงพลาสติกให้เข้ากัน

3.7 ดูดน้ำกลั่นที่ผสมกับใบหญ้าปักกิ่งบดละเอียดมาเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า ให้มีระดับการเจือจางที่ $10^{-1}$ ถึง $10^{-3}$ นำไปทำการ spread plate ที่ระดับความเจืองจางละ 3 ซ้ำ บนจานอาหาร AMS agar ที่เติมเมทานอลลงไปให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร (v/v) และเติมไซโคลเฮกซิไมด์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

3.8 นำจานอาหารที่ผ่านการ spread plate แล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตโคโลนีสีชมพูที่เจริญขึ้นบนอาหาร นับจำนวนโคโลนีสีชมพู คำนวณหาค่า cfu ต่อกรัมของใบหญ้าปักกิ่ง

3.9 เลือกโคโลนีสีชมพูที่มีความแตกต่างกันมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยการ cross streak บนจานอาหาร GP agar ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว

3.10 เก็บโคโลนีเดี่ยวใส่ลงในอาหารเหลว GP ผสมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10-15 นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลลเซียส เพื่อเก็บเป็นเชื้อต้นตอ และเก็บบนอาหารวุ้นผิวเอียง GP เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับใช้งานในการทดลองต่อไป

**การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง** (Lo and Lee, 2007)

1. นำแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่งทั้ง epiphytic และ endophytic *Methylobacterium* ที่เก็บเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับใช้งาน มาทำการ cross streak ลงบนจานอาหาร GP agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญขึ้นบนอาหาร วัดขนาดเฉลี่ยของโคโลนี บันทึกลักณะรูปร่าง สีการส่องผ่านของแสง ความนูน ขอบ และเนื้อสัมผัสของโคโลนี

2. เลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญขึ้นบนอาหาร GP agar มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ โดยดูการติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ การสร้าง poly-β-hydroxybutyrate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังวิธีการในภาคผนวก ข

3. ศึกษาลักษณะทางชีวเคมี เช่น การสร้างเอนไซม์ catalase, oxidase และ urease การทดสอบ MR-VP การทดสอบการใช้ citrate (citrate utilization) การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือด (blood hemolysis) การย่อยสลายแป้ง (starch hydrolysis) การย่อยสลาย casein (casein hydrolysis) และการย่อยสลาย gelatin (gelatin hydrolysis) การทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ($H_2S$) อินโดล (indole) และการเคลื่อนที่ (motility) ในอาหาร SIM medium อ่านผลการทดสอบทั้งหมดหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังวิธีการในภาคผนวก ข

4. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาโดยทดสอบความสามารถในการทนต่อความเค็มและการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยวิธีการขีดแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* แบบซิกแซกบนจานอาหาร nutrient agar (NA) สำหรับการทดสอบความสามารถในการทนต่อความเค็มจะผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหาร NA ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 3 และ 4 สังเกตการเจริญโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ส่วนการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ จะนำจานอาหาร NA ที่มีการขีดเชื้อแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเป็นเวลา 7 วัน โดยจะมีการให้ระดับการเจริญของแบคทีเรียแบ่งเป็นไม่เจริญ (-) เจริญ (+) เจริญดี (++) และเจริญดีมาก (+++)

**การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้**

1. **การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียสกุล** Methylobacterium (ดัดแปลงจาก Omer, et al., 2004)

1.1 ใช้ลูปเขี่ยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากกล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับใช้งาน จำนวน 1 ลูปใส่ลงในอาหารเหลว low nutrient medium (LNM) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 x 125 มิลลิเมตร หรือใส่ลงในอาหารเหลว LNM ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.2 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับความขุ่นของเชื้อด้วยอาหารเหลว LNM ปราศจากเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter)

2. **การศึกษาการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้** (ดัดแปลงจาก Omer, et al., 2004; Mandal, et al., 2007)

2.1 **การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างสารประกอบ** IAA

2.1.1 ดูดกล้าเชื้อแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้มาปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว LNM ที่เติมและไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีปริมาณอาหารเหลว LNM 9 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร

2.1.2 เมื่อลงเชื้อเสร็จแล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2.1.3 เก็บตัวอย่างอาหารเหลว LNM จากการเพาะเลี้ยงปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในวันแรกที่ลงเชื้อและวันที่ 5 ของการทดลอง ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) นำไปวัดปริมาณของ IAA ด้วยวิธีของ salkowski

2.2 **การวัดปริมาณ IAA ด้วยวิธีของ salkowski** (ดัดแปลงจาก Glickmann and Dessaux, 1995)

2.2.1 ดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่ได้จากการจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้ ผสมกับ salkowski reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.2.2 เมื่อครบกำหนดเวลานำสารละลายผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยใช้แบลงค์ (blank) เป็นอาหารเหลว LNM ผสมกับ salkowski reagent คำนวณหาปริมาณ IAA เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย IAA ดังวิธีการในภาคผนวก ค

2.2.3 คัดเลือกไอโซเลทของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ปริมาณสารประกอบ IAA ที่ดีที่สุดไปทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยาแบบ partial 16S rDNA gene sequencing โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กรุงเทพฯ

**การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก** (ดัดแปลงจาก Tien, Gaskins and Hubbell, 1979; Hussain and Hasnain, 2009)

1. **การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกเพื่อศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน**

1.1 ดูดกล้าเชื้อแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตร ใส่ลงในอาหารเหลว LNM ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

1.2 เมื่อครบกำหนดเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 นำน้ำหมัก (fermentation broth) ที่ได้มาปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ก่อนนำไปลดปริมาตรของน้ำหมักให้มีปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 72 มิลลิบาร์ อัตราการหมุน 50 รอบต่อนาที ก่อนนำไปสกัดต่อไป

**2. การสกัดไซโคไคนินจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก**

2.1 นำน้ำหมักที่ได้ผ่านการลดปริมาตร ไปสกัดด้วยบิวทานอล (butanol) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที

2.2 เทใส่กรวยแยกตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำหมักและบิวทานอลเก็บส่วนชั้นของบิวทานอลไว้ ส่วนน้ำหมักทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง

2.3 นำส่วนของบิวทานอลเทรวมกัน นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 25 มิลลิบาร์ อัตราการหมุน 50 รอบต่อนาที

2.4 ละลายสารสกัดที่ได้ด้วยเมทานอลเกรด HPLC ปริมาตร 5 มิลลิลิตรนำไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดของรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของไซโตไคนินเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายซีเอติน ดังวิธีการในภาคผนวก ค

**3. การวิเคราะห์ชนิดของไซโตไคนินในสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกโดยใช้เทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)**

3.1 นำสารสกัดไซโตไคนินที่ผ่านการกรองแล้วมาจุดลงบนแผ่น TLC จุดละ 20 ไมโครลิตร ใช้ไดร์เป่าผมเป่าให้แห้ง

3.2 นำไปใส่ลงในโถที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายบิวทานอล กรดอะซิติก (acetic acid) และน้ำ ในอัตราส่วน 12:3:5 โดยปริมาตร สังเกตการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายบนแผ่น TLC นำแผ่น TLC ออกจากโถก่อนถึงขอบบนสุดประมาณ 1 เซนติเมตร

3.3 นำแผ่น TLC มาผึ่งให้ตัวทำละลายระเหยออกจนแห้ง ตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ทำได้โดยนำไปส่องดูภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร วัดระยะทางที่สารตัวอย่างและตัวทำละลายเคลื่อนที่มาคำนวณหา ค่า Rf เทียบกับสารมาตรฐานซีเอติน ซีเอตินไรโบไซด์ และไคเนติน

**4. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไซโตไคนินโดยใช้เครื่อง HPLC**

นำสารสกัดไซโตไคนินที่ผ่านการกรองแล้วจากข้อ 2 ไปหาปริมาณของไซโตไคนินด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C-18 (prodigy 5U OD53 100A) ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล และน้ำในอัตราส่วน 70:30 โดยปริมาตร มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ UV detector ในการตรวจ

วัดสัญญาณที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 269 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานซีเอตินซีเอตินไรโบไซด์และไคเนติน

**การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกในการสร้างเอนไซม์** ACC deaminase

1. **การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์** ACC deaminase (ดัดแปลงจาก Penrose and Glick, 2003)

1.1 ดูดกล้าเชื้อของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกที่เลี้ยงในอาหาร LNM มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว GP ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 x 125 มิลลิเมตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

1.2 เมื่อครบกำหนดเวลา นำอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง

1.3 ล้างตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว DF salts minimal medium (Dworkin and Foster 1958) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง เทส่วนใสทิ้ง

1.4 ละลายตะกอนเซลล์ที่ล้างแล้วในอาหารเหลว DF salts minimal medium ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร และหยดสารละลาย ACC ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 45 ไมโครลิตร ลงไปในอาหาร จะทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย ACC เท่ากับ 3.0 มิลลิโมลาร์

1.5 จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase

1.6 ทำการเก็บเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ pH 7.6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ตะกอนเซลล์สามารถนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

2. **การวัดกิจกรรมของ** ACC deaminase (Penrose and Glick, 2003)

2.1 ละลายตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้ข้อ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ pH 7.6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วย้ายลงหลอดไมโครเซนตริฟิวก์

ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.2 ละลายตะกอนเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ pH 7.6 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติมสารละลายโทลูอีน (tolulene) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที แบ่งเก็บสารละลายเซลล์ในโทลูอีน (toluenzied cell) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry ในภาคผนวก ค (Lowry and Rosebrough, 1951)

2.3 นำตัวอย่างที่เหลือทั้งหมดมาทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยใช้สารละลายเซลล์ในโทลูอีนปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ACC ความเข้มข้น 0.5 โมลลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2.4 จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.56 โมลลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสไว้สำหรับหากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase

2.5 ในการหากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase จะดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.56 โมลลาร์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และ 2,4-dinitrophenylhydrazine reagent ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

2.6 นำสารผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของ α-ketobutyrate โดยกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เท่ากับปริมาณนาโนโมลลาร์ของ α-ketobutyrate ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ดังวิธีการในภาคผนวก ค

**การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก และการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการสร้างสารประกอบ IAA ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

**1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก**

1.1 นำแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารประกอบ IAA ใน 2 ปัจจัย คือ แหล่งไนโตรเจน และค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการศึกษาในแต่ละปัจจัยดังนี้

1.1.1 ปัจจัยที่ 1 ค่า pH ของอาหารเลี้ยง มี 5 ระดับ คือ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0

1.1.2 ปัจจัยที่ 2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน มี 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.14 กรัมต่อลิตร

1.2 ดูดกล้าเชื้อที่เตรียมจากแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LNM ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยอาหารเหลว LNM ที่ใช้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และกลุ่มสองเติมโพแทสเซียมไนเตรต 3.03 กรัมต่อลิตร ทั้งสองกลุ่มจะถูกนำไปปรับค่า pH เริ่มต้นด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีค่า pH เท่ากับ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0

1.3 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยเริ่มเก็บตั้งแต่ชั่วโมงที่เริ่มลงเชื้อ

1.4 นำตัวอย่างที่เก็บมาแบ่งไปวัดการเจริญแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเวลา คำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate; μ) และระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัว (generation time; g) ตัวอย่างส่วนที่เหลือนำไปหาปริมาณ IAA ด้วยวิธีของ salkowski เลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ให้ประสิทธิภาพในการเจริญและสร้างสารประกอบ IAA ได้ดีที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการผลิตน้ำหมักสำหรับใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2. การวิเคราะห์สารประกอบ IAA ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.1 ดูดกล้าเชื้อแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตร ใส่ลงในอาหารเหลว LNM ที่มีแหล่งไนโตรเจนและปรับค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมตามการศึกษาในข้อ 1 ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2 นำฟลาสก์ที่ลงเชื้อแล้วไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาตามการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 1

2.3 เมื่อครบกำหนดเวลานำอาหารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไปทำการวัดปริมาณของ IAA ด้วยวิธีของ salkowski และนำไปสกัดสารประกอบ IAA ต่อไป

2.4 นำส่วนใสหรือน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกมาลดปริมาตรลงให้เหลือประมาณ 50 มิลลิลิตรด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 72 มิลลิบาร์ อัตราการหมุน 50 รอบต่อนาที แบ่งน้ำหมักไปวัดปริมาณของ IAA ด้วยวิธีของ salkowski

2.5 แบ่งน้ำหมักที่ถูกลดปริมาตรไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดของรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร และนำไปยืนยันการสร้างสารประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C-18 (prodigy 5U OD53 100A) ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นสารละลายเมทานอล น้ำและกรดอะซิติกในอัตราส่วน 40 : 60 : 1 มีอัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ UV detector ในการตรวจวัดสัญญาณที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 220 นาโนเมตรเทียบกับสารมาตรฐาน IAA (Ali and Hasnain, 2001)

**การศึกษาผลความเป็นไปได้ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกที่มีความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่ง**

**1. การเตรียมน้ำหมักและตัวเซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

1.1 ดูดกล้าเชื้อของแบคทีเรียกลุ่ม *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกมาร้อยละ 5 โดยปริมาตรใส่ลงในอาหาร LNM ตามสูตรที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารประกอบ IAA ให้มีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ถ้าต้องการปริมาณน้ำหมักจำนวนมากอาจเพิ่มจำนวนฟลาสก์ตามปริมาณที่ต้องการ

1.2 นำฟลาสก์ที่ลงเชื้อแล้วไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาตามที่ได้จากการศึกษาความเหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารประกอบ IAA

1.3 เมื่อครบกำหนดเวลานำอาหารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสและแบ่งนำไปวัดปริมาณของ IAA ด้วยวิธีของ salkowski ส่วนตัวเซลล์นำไปล้างด้วยสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลลาร์ ล้างเซลล์ซ้ำ 2 ครั้ง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองถัดไป

1.4 นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาลดปริมาตรลงให้เหลือประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรรวมของน้ำหมักที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 72 มิลลิบาร์ อัตราการหมุน 50 รอบต่อนาที

1.5 นำน้ำหมักที่ผ่านการลดปริมาตรไปกรองผ่านชุดกรองแบคทีเรีย ที่มีรูของกระดาษกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เพื่อเป็นการกำจัดแบคทีเรียในน้ำหมัก แบ่งน้ำหมักไปวัดปริมาณของ IAA ด้วยวิธีของ salkowski และเก็บน้ำหมักใสในขวดสีชาที่ปราศจากเชื้อเก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสำหรับนำไปใช้ต่อไป

**2. การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่งสำหรับงานทดลอง**

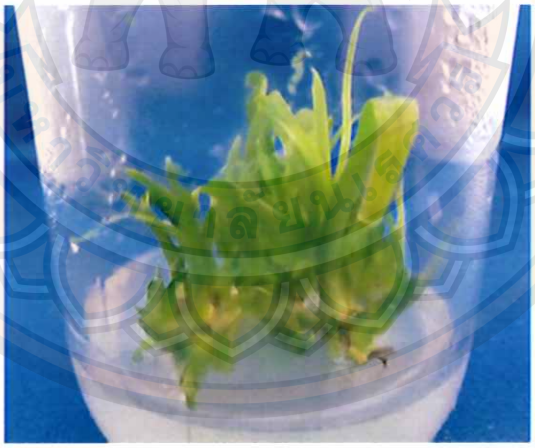
2.1 นำไหล (stolon) ของหญ้าปักกิ่ง มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่บริเวณพื้นผิวด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยโซเดียม ไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง

2.2 ทำการตัดส่วนของปลายยอด (shoot tip) ของไหลหญ้าปักกิ่งให้มีขนาดประมาณ 2 x 3 เซนติเมตร

2.3 นำชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าปักกิ่งไปเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS(1962)) (Murashige and Skoog, 1962) แล้วนำไปไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (growth chamber) ที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และมีความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่นที่พืชใช้สังเคราะห์แสง (photosynthetic active radiation; PAR) 42 ไมโครโมลลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) เพื่อชักนำให้เกิดยอดใหม่

2.4 หลังจากได้หญ้าปักกิ่งใหม่ที่ปลอดจากจุลินทรีย์ (clean culture) ต่อจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณหญ้าปักกิ่งใหม่ โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนให้เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.5 เมื่อเพิ่มจำนวนหญ้าปักกิ่งที่ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้จำนวนเพียงพอตามความต้องการ ซึ่งหญ้าปักกิ่งที่ได้จะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาสร้างยอดและใบเป็นจำนวนมาก (ดังภาพ 21)



**ภาพ 21 ตัวอย่างหญ้าปักกิ่งหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์**

2.6 นำหญ้าปักกิ่งมาตัดใบและยอดทิ้งจนเหลือเป็นชิ้นที่มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร (ดังภาพ 22) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป




**ภาพ 22 หญ้าปักกิ่งที่ถูกตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร**

**3. การศึกษาผลของสัดส่วนการใช้น้ำหมักในอาหารเลี้ยงเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

3.1 นำน้ำหมักที่ผลิตได้ในข้อ 1 ที่ผ่านการวัดปริมาณสารประกอบ IAA เริ่มต้น กรองผ่านชุดกรองแบคทีเรียอีกครั้งก่อนนำมาใช้

3.2 นำอาหารสูตร MS(1962) และอาหารวุ้น ที่เตรียมตามในภาคผนวก ก ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว รอจนกว่าอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสหรือพอมือจับได้ หลังจากนั้น ดูดน้ำหมักที่ได้เตรียมไว้ข้างต้นใส่ลงในอาหารที่เตรียมไว้ตามแต่ละกรรมวิธี โดยมีกรรมวิธีที่ใช้สำหรับการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติมน้ำหมักปริมาตร 4 มิลลิลิตรต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 อาหารวุ้นที่เติมน้ำหมักเพียงอย่างเดียว 2 มิลลิลิตรต่อลิตร (check treatment)

กรรมวิธีที่ 5 อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (check treatment)

กรรมวิธีที่ 6 อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (check treatment)

กรรมวิธีที่ 7 อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม BA ความเข้มข้นตามความเข้มข้นของน้ำหมักในกรรมวิธีที่ 2 (check treatment)

กรรมวิธีที่ 8 อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม IAA ความเข้มข้นตามความเข้มข้นของน้ำหมักในกรรมวิธีที่ 2 (check treatment)

กรรมวิธีที่ 9 อาหารวุ้นสูตร MS (1962)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD; Completely Ramdomized Design) มีทั้งหมด 9 กรรมวิธี ๆ ละ 50 ซ้ำ

3.3 หลังจากดูดน้ำหมักใส่ลงในอาหารตามแต่ละกรรมวิธีแล้ว แบ่งอาหารบรรจุใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ปราศจากเชื้อขนาด 120 มิลลิลิตร ขวดละประมาณ 20 มิลลิลิตร วางตั้งไว้เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเชื้อรา

3.4 นำชิ้นส่วนของหญ้าปักกิ่งที่ผ่านการขยายให้เพียงพอต่อการทดลองจากข้อ 2 และทำการตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ใส่ลงในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมไว้ตามแต่ละกรรมวิธี โดยใช้ชิ้นส่วน 1 ชิ้นต่อขวด

3.5 นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใส่ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งแล้วไปวางไว้บนชั้นที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และมีความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่นที่พืชใช้สังเคราะห์แสง 42 ไมโครโมลลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.6 สุ่มเก็บตัวอย่างออกมาบันทึกข้อมูล 5 ซ้ำต่อสัปดาห์ ในแต่สัปดาห์บันทึกข้อมูลดังนี้

3.6.1 ร้อยละของการเกิดยอดใหม่

3.6.2 จำนวนยอดใหม่เฉลี่ยต่อชิ้นส่วน

3.6.3 ร้อยละของการเกิดใบใหม่

3.6.4 จำนวนใบใหม่เฉลี่ยต่อชิ้นส่วน

3.6.5 ร้อยละการเกิดราก

3.6.6 จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น

3.6.7 ความยาวรากเฉลี่ย (เซนติเมตร)

3.6.7 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วน (กรัม)

3.6.8 ร้อยละการเกิดแคลลัส

3.6.9 คุณภาพสีของแคลลัส (ให้เป็นคะแนน) โดยให้

0 = สีเขียวอ่อน, 1 = สีเขียวปานกลาง, 2 = สีเขียวเข้ม

3.6.10 ลักษณะอื่นที่สังเกต (เช่น สีของเนื้อเยื่อ)

3.7 ในสัปดาห์สุดท้ายของการเก็บข้อมูล นำตัวอย่างหญ้าปักกิ่งที่ได้จากการเลี้ยงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ สารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compounds) และสารสำคัญในกลุ่มไกลโคสฟิงโกลิปิด (glycosphingolipid) ตามวิธีการในขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งด้วยวิธีการทางเคมี สำหรับปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 จะเริ่มวัดตั้งแต่ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีขนาดของใบที่ใหญ่พอจะวัดได้

**4. การศึกษาผลของปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีน้ำหมักเป็นส่วนประกอบกับสภาพการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

4.1 นำอาหารเหลวสูตร MS (1962) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาเติมน้ำหมักในปริมาตรที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสาระสำคัญของหญ้าปักกิ่งจากการศึกษาในการทดลองก่อนหน้านี้

4.2 หลังจากเติมน้ำหมักลงในอาหารเหลวสูตร MS(1962) แล้วนำไปบรรจุในฟลาสก์ปราศจากเชื้อขนาด 100 มิลลิลิตร ในปริมาณที่แตกต่างกัน และนำไปเลี้ยงในสภาพที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ปัจจัย สำหรับการศึกษา ดังนี้

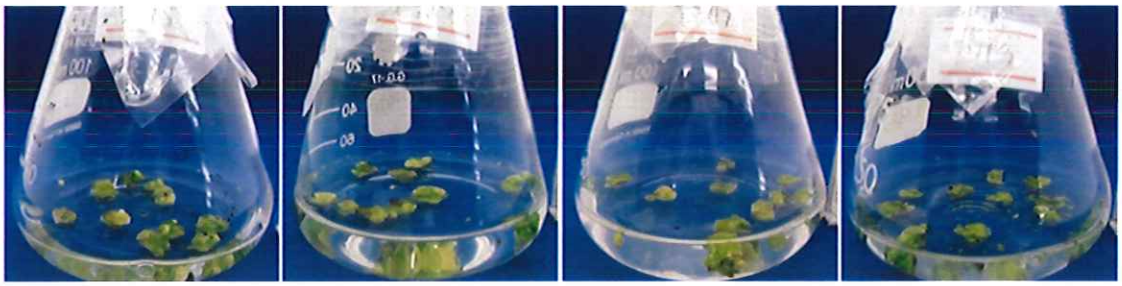
4.2.1 ปัจจัยที่ 1 ปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยง มี 3 ระดับ คือ 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตรต่อชิ้นส่วน โดยเป็นสูตรอาหารที่มีการเติมน้ำหมักได้จากข้อ 2

4.2.2 ปัจจัยที่ 2 สภาพที่เลี้ยง มี 2 ระดับ คือ บนเครื่องเขย่า กับ บนชั้นเลี้ยงปกติ

โดยวางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) (3 X 2) มีทั้งหมด 6 กรรมวิธี ๆ ละ 20 ซ้ำ และเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในอาหารเหลว MS(1962) ที่ไม่เติมน้ำหมักในปริมาณอาหาร 1.5 มิลลิลิตรต่อชิ้นส่วน ในสภาพบนชั้นเลี้ยงปกติและบนเครื่องเขย่าเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม

4.3 ใช้ชิ้นส่วนของหญ้าปักกิ่งที่ผ่านการขยายให้เพียงพอต่อการทดลองจากข้อ 2 ทำการตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ใช้ชิ้นส่วน 10 ชิ้นต่อกรรมวิธี

4.4 เมื่อนำชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งใส่ลงในอาหารที่ใช้ในการทดลองในแต่ละกรรมวิธีเสร็จแล้ว (ดังภาพ 23) แบ่งนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่ากับบนชั้นเลี้ยงปกติ ในสภาพอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และมีความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่นที่พืชใช้สังเคราะห์แสง 42 ไมโครโมลลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์



| 1 มิลลิลิตรต่อชิ้น (MS(1962) ผสมน้ำหมัก) | 1.5 มิลลิลิตรต่อชิ้น (MS(1962) ผสมน้ำหมัก) | 2 มิลลิลิตรต่อชิ้น (MS(1962) ผสมน้ำหมัก) | 1.5 มิลลิลิตรต่อชิ้น (MS(1962) ไม่ผสมน้ำหมัก) |
|---|---|---|---|

**ภาพ 23 ลักษณะชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในอาหารเหลวสูตร MS(1962) ในปริมาณต่าง ๆ**

4.5 สุ่มเก็บตัวอย่างออกมาบันทึกข้อมูลกรรมวิธีละ 3 ซ้ำต่อสัปดาห์ ในแต่ละซ้ำสุ่มเก็บตัวอย่างหญ้าปักกิ่งออกมา 3 ชิ้นเพื่อบันทึกข้อมูล ในแต่ละสัปดาห์ทำการบันทึกข้อมูลเหมือนกับในการทดลองข้อ 3

**5. การศึกษาผลของสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

5.1 นำเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกจากการเพาะเลี้ยงในข้อ 1 มาทำให้เป็นสารละลายด้วยสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 30 มิลลิโมลลาร์

5.2 นำสารละลายเซลล์ที่ได้ไปนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) และปรับความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียในสารละลายเท่ากับ $10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 30 มิลลิโมลลาร์

5.3 แช่ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ได้มีการขยายให้เพียงพอต่อการทดลองจากข้อ 2 ที่ถูกตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แช่ลงไปในสารละลายเซลล์ที่ผ่านการปรับความเข้มข้น (ดังภาพ 24) ในระยะเวลาการแช่ชิ้นส่วนของหญ้าปักกิ่งที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 1, 3 และ 5 นาที (ดัดแปลงจาก Shirokikh, Shupletsova and Shirokikh, 2007)



**ภาพ 24 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่แช่อยู่ในสารละลายเซลล์ *M. radiotolerans* ED5-9**

5.4 นำชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ผ่านการแช่สารละลายเซลล์ไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS(1962) และชิ้นส่วนของหญ้าปักกิ่งที่ไม่ได้แช่ในสารละลายเซลล์แบคทีเรียนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS(1962) ที่เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มีทั้งหมด 5 กรรมวิธี ๆ ละ 20 ซ้ำ โดยใช้ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งจำนวน 3 ชิ้นส่วนต่อกรรมวิธี

5.5 นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการใส่ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งแล้วไปวางไว้บนชั้นที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และมีความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่นที่พืชใช้สังเคราะห์แสง 42 ไมโครโมลลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

5.6 สุ่มเก็บตัวอย่างออกมาบันทึกข้อมูล 3 ซ้ำต่อสัปดาห์ โดยบันทึกข้อมูลของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งทั้ง 3 ชิ้นในขวด ทำการบันทึกข้อมูลในแต่ละสัปดาห์เหมือนกับในการทดลองข้อ 3

6. การวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งโดยวิธีทางเคมี

6.1 การหาปริมาณสารไกลโคสฟิงโกลิปิด (ดัดแปลงจาก Jiratchariyakul, et al., 2006 และ Pongsathorn, et al., 2012)

6.1.1 นำหญ้าปักกิ่งสดในแต่ละกรรมวิธีจากการทดลองข้างต้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์มาอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนหญ้าปักกิ่งแห้งสนิท แล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียด

6.1.2 ชั่งผงหญ้าปักกิ่งมา 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร จากนั้นเติมเมทานอลลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทส่วนของเมทานอลเก็บไว้ ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง

6.1.3 นำส่วนของเมทานอลเทรวมกัน นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 337 มิลลิบาร์ อัตราการหมุน 50 รอบต่อนาที ละลายสารสกัดที่ได้ด้วยเมทานอลเกรด HPLC ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

6.1.4 นำสารละลายเมทานอลที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดของรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปหาปริมาณของสารไกลโคสฟิงโกลิปิดด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C-18 (prodigy 5U OD53 100A) ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ UV detector ในการตรวจวัดสัญญาณที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 210 นาโนเมตร เทียบกับข้อมูลของ Jiratchariyakul, et al. (2006) ดังวิธีการในภาคผนวก ค

6.2 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

6.2.1 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์โดยวิธีของ Lichtenthaler และ Wellburn (ดัดแปลงจาก Lichtenthaler and Wellburn, 1985)

1) เตรียมสารละลายเมทานอลจากหญ้าปักกิ่งสดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากแต่ละกรรมวิธี ในแต่ละการทดลอง โดยมีการชั่งตัวอย่างหญ้าปักกิ่งดังนี้

1.1) การทดลองผลของสัดส่วนการใช้น้ำหมักในอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่ง ชั่งตัวอย่างหญ้าปักกิ่งประมาณ 0.1 กรัม

1.2) การทดลองผลของปริมาณอาหารเลี้ยงโดยมีน้ำหมักเป็นส่วนประกอบกับสภาพเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่ง ชั่งตัวอย่างหญ้าปักกิ่งประมาณ 1.0 กรัม

1.3) การทดลองผลของสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* ต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่ง ชั่งตัวอย่างหญ้าปักกิ่งประมาณ 0.5 กรัม

ทั้งนี้น้ำหนักของหญ้าปักกิ่งที่ใช้ขึ้นกับปริมาณของหญ้าปักกิ่งที่เพาะเลี้ยงได้ในแต่ละการทดลอง ซึ่งต้องจดบันทึกไว้สำหรับใช้ในการคำนวณต่อไป

2) นำตัวอย่างหญ้าปักกิ่งที่ชั่งไว้มาบดให้ละเอียดในโกร่ง โดยค่อย ๆ เติมเมทานอลลงไปเล็กน้อย หลังจากบดละเอียดดีแล้ว ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ให้เป็น 50 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) กรองเอาเศษตะกอนของหญ้าปักกิ่งออกทิ้งไป

3) นำสารละลายเมทานอลที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 653 และ 666 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และปริมาณคาโรทีนอยด์ ตามสมการดังนี้

$$Chl_a = 15.65A_{666} - 7.340A_{653}$$

$$Chl_b = 27.05A_{653} - 11.21A_{666}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 2.860Chl_a - 129.2Chl_b)/245$$

เมื่อ

$Chl_a$ = ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ

$Chl_b$ = ปริมาณคลอโรฟิลล์บี

$C_{x+c}$ = ปริมาณคาโรทีนอยด์

$A_{470}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร

$A_{653}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 653 นาโนเมตร

$A_{666}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 666 นาโนเมตร

6.2.2 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์โดยใช้เครื่อง chlorophyll meter (SPAD-502) (ดัดแปลงจาก Rodriguez and Miller, 2000; Moran and Porath, 1980)

1) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีความเขียวของใบหญ้าปักกิ่งที่วัดจากเครื่อง SPAD-502 กับปริมาณคลอโรฟิลล์ เพื่อใช้เป็นมาตรฐานสำหรับ ใช้ในการคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบหญ้าปักกิ่งจากการวัดด้วยเครื่อง SPAD-502

2) ในการสร้างกราฟความสัมพันธ์สามารถทำได้โดยเลือกใบหญ้าปักกิ่งจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเขียวแตกต่างกันไปมาตัดให้มีขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร และเลือกชิ้นใบหญ้าปักกิ่งที่มีความเขียวใกล้เคียงกันจำนวน 5 ชิ้นมาวัดค่าดัชนี ความเขียวด้วยเครื่อง chlorophyll meter (SPAD-502) คำนวณหาค่าเฉลี่ย

3) นำชิ้นใบหญ้าปักกิ่งที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 แล้วแช่ลงในไดเมทิลฟอร์มาร์ไมด์ (N,N-dimethylformamide; DMF) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรในหลอดทึบแสง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) เมื่อครบกำหนดเวลานำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตร ใช้เมทิลฟอร์มาร์ไมด์เป็นแบลงค์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม ตามสมการดังนี้ (Moran, 1982)

$Chl_a = (-2.99A_{647} + 12.64A_{664}*vol/(X*area*100)$

$Chl_b = (23.26A_{647} - 5.60A_{664}*vol/(X*area*100)$

$Chl_{total} = (20.27A_{647} + 7.04A_{664}*vol/(X*area*100)$

เมื่อ

$Chl_a$ = ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (กรัมต่อตารางเมตร)

$Chl_b$ = ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (กรัมต่อตารางเมตร)

$Chl_{total}$ = ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (กรัมต่อตารางเมตร)

$A_{647}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 นาโนเมตร

$A_{664}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร

Vol = ปริมาณของไดเมทิลฟอร์มาร์ไมด์ที่ใช้สกัด (มิลลิลิตร)

X = สัดส่วนการเจือจาง

area = พื้นที่ของชิ้นใบพืช (ตารางเซนติเมตร)

100 = นำมาคูณกับพื้นที่เพื่อปรับหน่วยให้เป็น (ตารางเมตร)

5) นำค่าดัชนีความเขียวที่วัดจากเครื่อง SPAD-502 กับปริมาณคลอโรฟิลล์ที่คำนวณได้จากสูตรมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ คำนวณหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์

6) เมื่อได้สมการความสัมพันธ์แล้ว ใช้เครื่อง SPAD-502 วัดค่าดัชนีความเขียวจากตัวอย่างใบหญ้าปักกิ่งจากการทดลองที่เก็บมาในแต่ละกรรมวิธี นำค่าดัชนีความเขียวที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และปริมาณคลอโรฟิลล์รวมจากสมการความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ได้ข้างต้น ดังวิธีการในภาคผนวก ค

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

6.3.1 นำสารละลายเมทานอลของหญ้าปักกิ่งจากข้อ 5.2.1 มา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-dipheyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที

6.3.2 เมื่อครบกำหนดเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นแบลงค์ เทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เมทานอลแทนสารละลายเมทานอลของหญ้าปักกิ่ง

6.3.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$$

เมื่อ

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

$A_{sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

6.3.4 จากนั้นคำนวณหาค่า IC50 (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล DPPH ได้ที่ร้อยละ 50) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับปริมาณของสารสกัด ดังวิธีการในภาคผนวก ค

6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลโดยวิธี Folin- ciocalteu method (ดัดแปลงจาก Singleton and Rossi, 1965)

6.4.1 ดูดสารละลายเมทานอลของหญ้าปักกิ่งจากข้อ 6.2.1 มา 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตรให้เข้ากัน จากนั้นเติมฟอลิน-ซิโอแคลตูรีเอเจนต์ (folin-ciocalteu reagent) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที

6.4.2 เมื่อครบกำหนดเวลาเติมโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ความเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 90 นาที

6.4.3 เมื่อครบกำหนดเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิค (gallic acid) ดังวิธีการในภาคผนวก ค

**วิธีวิเคราะห์ข้อมูล**

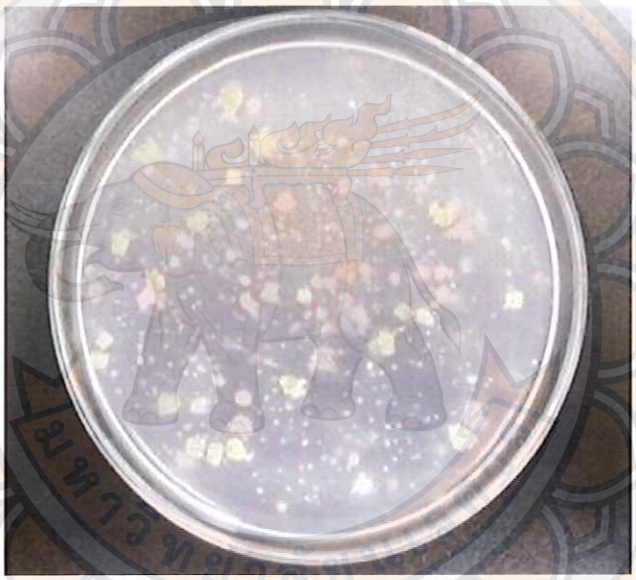
ใช้โปรแกรม SPSS v.17.0 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของข้อมูลผลการทดลองที่ได้ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลต่าง ๆ โดยใช้ค่าสถิต ANOVA และข้อมูลร้อยละแปลงเป็น arcsine ก่อนวิเคราะห์

# บทที่ 4

# ผลการวิจัย

**การคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากใบหญ้าปักกิ่ง**

เมื่อนำใบหญ้าปักกิ่งมาแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จะปรากฏโคโลนีสีชมพูเจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง AMS ที่มีเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0.5 หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ดังภาพ 25)



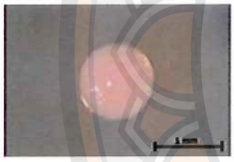
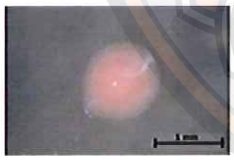
**ภาพ 25 ลักษณะโคโลนีสีชมพูของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่พบบนอาหารแข็ง AMS ที่มีเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0.5**

เมื่อนับจำนวนโคโลนีสีชมพูมาคำนวณหาค่า cfu ต่อกรัมของใบหญ้าปักกิ่ง พบว่าแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Metylobacterium* มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $6.08 \times 10^5$ cfu ต่อกรัมของใบหญ้าปักกิ่ง และแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $2.50 \times 10^3$ cfu ต่อกรัมของใบหญ้าปักกิ่ง และสามารถแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลทแบ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* จำนวน 40 ไอโซเลท และแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* จำนวน 34 ไอโซเลท โดยไอโซเลททั้งหมดถูกนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีต่อไป

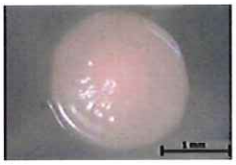
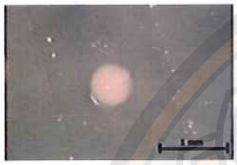
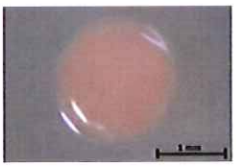
**การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ทั้ง 74 ไอโซเลท แบ่งเป็น epiphytic *Metylobacterium* จำนวน 40 ไอโซเลท และ endophytic *Methylobacterium* จำนวน 34 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงบนจานอาหารแข็ง GP เป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการสังเกตลักษณะโคโลนี พบว่า โคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดจะมีสีชมพู แต่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันไป สามารถจัดแบ่งกลุ่มตามลักษณะโคโลนีได้ 12 กลุ่ม (A-L) ตามตาราง 5 และเมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์พบว่าเซลล์แบคทีเรียทั้ง 74 ไอโซเลทมีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ และสร้าง PHB ดังภาพ 26 และ 27

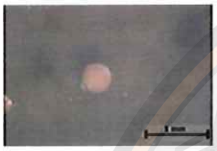
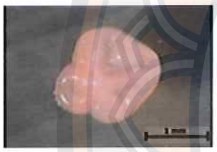
**ตาราง 5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสกุล Methylobacterium ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง**

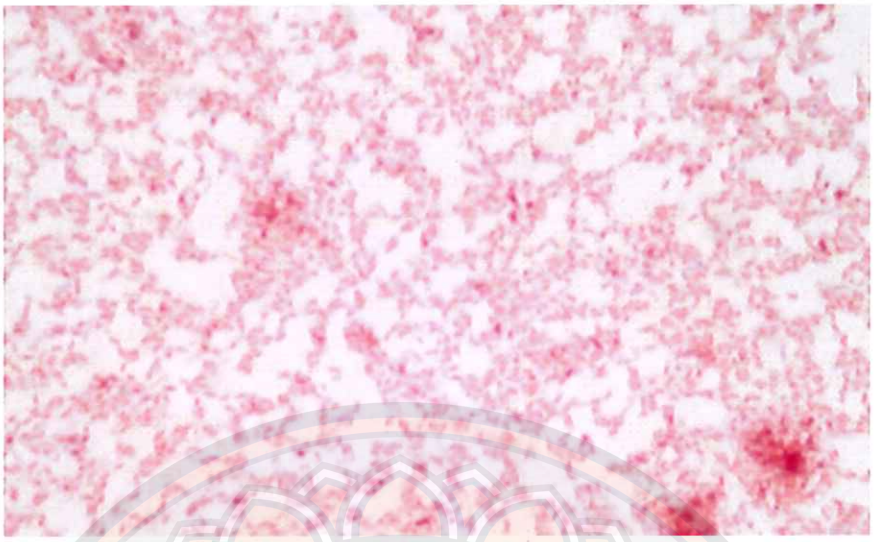
| กลุ่ม | ลักษณะของโคโลนี | ไอโซเลท | รวม |
|---|---|---|---|
| A  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหารและนูนเป็นปุ่มตรงกลาง ผิวหน้าโคโลนีมีสันนูนเป็นรัศมีออกจากศูนย์กลาง ขอบเรียบทึบแสง เนื้อในโคโลนีเละคล้ายเนยเหลว | EP1-1, EP1-3, EP1-11, EP3-3, EP4-11, EP5-6, ED2-9, ED5-2 | 8 |
| B  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีและขอบเรียบ โปร่งแสง เนื้อในโคโลนีเละคล้ายเนยเหลว | EP1-2, EP1-5, EP1-7, EP1-10, EP2-3, EP2-4, EP2-5, EP2-6, EP3-1, EP3-4, EP3-9, EP3-10, EP3-11, EP4-7, EP4-8, EP4-9, EP4-10, EP5-4, EP5-5, ED1-2, ED1-4, ED1-5, ED1-9, ED1-10, ED2-5, ED2-6, ED2-8, ED2-11, ED3-2, ED3-3, ED3-6, ED3-7, ED4-3, ED4-4, ED4-5, ED5-12 | 36 |

ตาราง 5 (ต่อ)

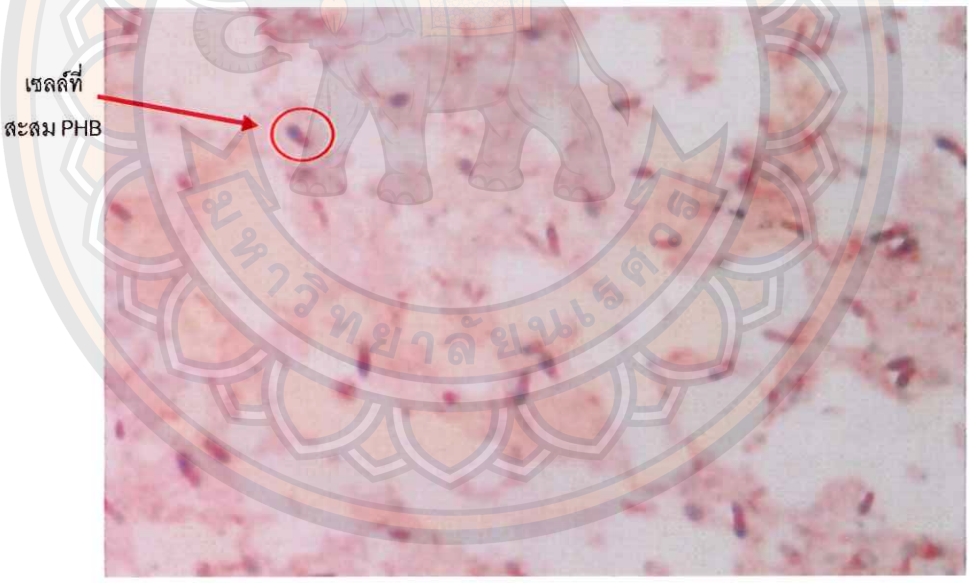
| กลุ่ม | ลักษณะของโคโลนี | ไอโซเลท | รวม |
|---|---|---|---|
| C  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหารและนูนเป็นปุ่มตรงกลาง ผิวหน้าโคโลนีเกลี้ยงแต่เป็นคลื่นที่ไม่แน่นอน ขอบเรียบ โปร่งแสง เนื้อในโคโลนีและคล้ายเนยเหลว | EP3-7, ED2-3, ED2-4, ED3-1, ED3-5, ED3-9, ED5-6, ED5-9 | 8 |
| D  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีและขอบเรียบ ทึบแสง เนื้อในโคโลนีและคล้ายเนยเหลว | EP1-9, EP4-6, ED2-10, ED4-1 | 4 |
| E  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีและขอบเรียบ โปร่งแสง เนื้อในโคโลนีและคล้ายเนยเหลว | EP1-4 | 1 |
| F  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น ขอบเรียบ โปร่งแสง เนื้อในโคโลนีและคล้ายเนยเหลว | EP1-8, ED3-8 | 2 |
| G  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนบนจะแบนราบ ผิวหน้าโคโลนีและขอบเรียบ โปร่งแสง เนื้อในโคโลนีและคล้ายเนยเหลว | EP2-1 | 1 |
| H  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร รูปร่างไม่แน่นอน นูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีย่นหยักพับไปมา ขอบเป็นคลื่นที่โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย ทึบแสง เนื้อในโคโลนีแห้งแข็ง เปราะแตกง่าย | EP4-1, EP4-3, ED5-3 | 3 |

ตาราง 5 (ต่อ)

| กลุ่ม | ลักษณะของโคโลนี | ไอโซเลท | รวม |
|---|---|---|---|
| I  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีและขอบเรียบ โปร่งแสง เนื้อในโคโลนีเละคล้ายเนยเหลว | EP4-2, EP5-2, EP5-7, EP5-10, EP5-11 | 5 |
| J  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีย่น ขอบเรียบ ทึบแสง เนื้อในโคโลนีเละคล้ายเนยเหลว | EP4-5, ED2-1 | 2 |
| K  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร รูปร่างไม่แน่นอน นูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีย่น ขอบเรียบ ทึบแสง เนื้อในโคโลนีเละคล้ายเนยเหลว | ED3-4 | 1 |
| L  | โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหารแต่ส่วนบนจะแบนราบ ผิวหน้าโคโลนีและขอบเรียบ โปร่งแสง เนื้อในโคโลนีเละคล้ายเนยเหลว | EP5-8,ED2-12, ED5-5 | 3 |



ภาพ 26 ลักษณะการติดสีแกรมลบของเซลล์แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์




ภาพ 27 ลักษณะการสะสม PHB ภายในเซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เมื่อศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ทั้ง 74 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนอาหาร NA ที่ไม่มีความเข้มข้นของเกลือ และเมื่อศึกษาลักษณะทางชีวเคมีพบว่า แบคทีเรียทั้งหมดให้ผลการทดสอบ catalase, oxidase, motility เป็นผลบวก และผลการสอบ indole, MR-VP, $H_2S$, การย่อยสลายแป้ง เจลาติน เคซีน และเม็ดเลือดแดง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ แต่จะพบความแตกต่างของการใช้ citrate และการสร้างเอนไซม์ urease ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม ดังตาราง 6

**ตาราง 6 ผลการจัดกลุ่มของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ตามลักษณะการใช้ citrate และการสร้างเอนไซม์ urease**

| การทดสอบทางชีวเคมี | ไอโซเลท |
|---|---|
| Citrate (-), Urease (+) | EP1-1, EP1-3, EP1-4, EP1-8, EP1-9, EP1-11, EP2-1, EP2-5, EP3-1, EP4-2, EP4-5, EP4-7, EP4-10, EP4-11, EP5-2, EP5-5, EP5-6, EP5-7, EP5-10, EP5-11, ED2-1, ED3-8 |
| Citrate (-), Urease (-) | EP5-8 |
| Citrate (+), Urease (+) | EP1-2, EP1-5, EP1-7, EP1-10, EP2-3, EP2-4, EP2-6, EP3-3, EP3-4, EP3-7, EP3-9, EP3-10, EP3-11, EP4-1, EP4-3, EP4-6, EP4-8, EP4-9, EP5-4, ED1-4, ED1-9, ED1-10, ED2-3, ED2-4, ED2-5, ED2-6, ED2-8, ED2-9, ED2-10, ED2-11, ED3-1, ED3-2, ED3-3, ED3-4, ED3-5, ED3-6, ED3-7, ED3-9, ED4-1, ED4-4, ED4-5, ED5-2, ED5-3, ED5-5, ED5-6, ED5-9, ED5-12 |
| Citrate (+), Urease (-) | ED1-2, ED1-5, ED2-12, ED4-3 |

จากผลการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีชมพูที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่ง ในเบื้องต้นเมื่อทำการเทียบกับลักษณะของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในหนังสือ Bergey's manual of systematic bacteriology (Garrity, Bell and Lilburn, 2005) พบว่า มีลักษณะใกล้เคียงกัน ดังนั้นแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีชมพูที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่งจึงเป็นแบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* โดยได้นำเชื้อแต่ละไอโซเลทที่แยกได้ ไปศึกษาความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชในกลุ่มของออกซินหรือ IAA ในการทดลองต่อไป

**การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินหรือสารประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้**

เมื่อนำไอโซเลทั้งหมดของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้ทั้ง epiphytic และ endophytic *Methylobacterium* มาศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ในอาหารเหลว LNM ทั้งที่เติมแอล-ทริปโตเฟนและที่ไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ IAA โดยวิธีของ salkowski ให้สารประกอบที่มีสีชมพูของ tris-(indole-3-aceto) iron (III) complex (Kamnev et al., 2001) เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณปริมาณสารประกอบ IAA เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารประกอบ IAA และนำไปทดสอบทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics V.17.0 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่า มีค่าดังในตาราง 7 และ 8

**ตาราง 7 ปริมาณสารประกอบ IAA ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium***

| ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่เติม L-tryptophan | | ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติม L-tryptophan | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | EP4-9 | 2.43 | a | 1 | EP2-3 | 2.40 | a |
| 2 | EP1-5 | 2.26 | ab | 2 | EP4-9 | 2.12 | a |
| 3 | EP4-8 | 2.12 | ab | 3 | EP3-9 | 1.67 | b |
| 4 | EP3-9 | 1.91 | bc | 4 | EP3-7 | 1.60 | bc |
| 5 | EP3-10 | 1.88 | bc | 5 | EP4-8 | 1.49 | bcd |
| 6 | EP2-3 | 1.63 | cd | 6 | EP3-10 | 1.35 | bcde |
| 7 | EP1-8 | 1.60 | cde | 7 | EP3-11 | 1.32 | bcde |
| 8 | EP3-11 | 1.60 | cde | 8 | EP1-5 | 1.29 | cdef |
| 9 | EP1-2 | 1.53 | cdef | 9 | EP3-4 | 1.22 | defg |
| 10 | EP1-7 | 1.46 | cdefg | 10 | EP4-1 | 1.15 | defgh |

ตาราง 7 (ต่อ)

| ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่เติม L-tryptophan | | ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติม L-tryptophan | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 11 | EP1-10 | 1.35 | defgh | 11 | EP4-7 | 1.11 | efghi |
| 12 | EP3-7 | 1.25 | defghi | 12 | EP2-4 | 1.08 | efghij |
| 13 | EP3-4 | 1.22 | defghij | 13 | EP4-3 | 1.08 | efghij |
| 14 | EP4-6 | 1.22 | defghij | 14 | EP1-2 | 1.01 | efghijk |
| 15 | EP4-7 | 1.22 | defghij | 15 | EP4-5 | 1.01 | efghijk |
| 16 | EP4-5 | 1.18 | defghij | 16 | EP4-6 | 1.01 | efghijk |
| 17 | EP5-4 | 1.18 | defghij | 17 | EP1-7 | 0.94 | fghijkl |
| 18 | EP5-11 | 1.15 | defghijk | 18 | EP1-8 | 0.94 | ghijkl |
| 19 | EP4-1 | 1.15 | defghijk | 19 | EP1-4 | 0.90 | ghijklm |
| 20 | EP4-2 | 1.11 | defghijk | 20 | EP1-10 | 0.87 | ghijklm |
| 21 | EP4-10 | 1.11 | defghijk | 21 | EP5-2 | 0.87 | ghijklm |
| 22 | EP2-6 | 1.08 | efghijk | 22 | EP4-11 | 0.80 | hijklm |
| 23 | EP4-3 | 1.04 | fghijk | 23 | EP4-2 | 0.76 | hijklm |
| 24 | EP4-11 | 1.04 | fghijk | 24 | EP4-10 | 0.76 | hijklm |
| 25 | EP5-2 | 1.04 | fghijk | 25 | EP2-6 | 0.73 | ijklm |
| 26 | EP5-8 | 1.03 | fghijk | 26 | EP5-6 | 0.73 | ijklm |
| 27 | EP5-5 | 1.01 | fghijk | 27 | EP5-11 | 0.73 | ijklm |
| 28 | EP2-4 | 0.94 | ghijk | 28 | EP1-11 | 0.69 | jklm |
| 29 | EP5-10 | 0.90 | hijk | 29 | EP3-3 | 0.69 | jklm |
| 30 | EP1-9 | 0.87 | hijk | 30 | EP5-7 | 0.69 | jklm |
| 31 | EP5-6 | 0.87 | hijk | 31 | EP5-8 | 0.69 | jklm |
| 32 | EP3-1 | 0.83 | hijk | 32 | EP5-4 | 0.69 | jklm |
| 33 | EP1-4 | 0.80 | ijk | 33 | EP1-1 | 0.66 | klm |

ตาราง 7 (ต่อ)

| ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่เติม L-tryptophan | | ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติม L-tryptophan | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 34 | EP1-11 | 0.80 | ijk | 34 | EP5-10 | 0.66 | klm |
| 35 | EP2-1 | 0.80 | ijk | 35 | EP1-9 | 0.63 | klm |
| 36 | EP3-3 | 0.80 | ijk | 36 | EP1-3 | 0.59 | lm |
| 37 | EP5-7 | 0.76 | ijk | 37 | EP2-1 | 0.59 | lm |
| 38 | EP1-1 | 0.69 | jk | 38 | EP5-5 | 0.59 | lm |
| 39 | EP1-3 | 0.69 | jk | 39 | EP2-5 | 0.56 | lm |
| 40 | EP2-5 | 0.63 | k | 40 | EP3-1 | 0.52 | m |

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ตาราง 8 ปริมาณสารประกอบ IAA ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium*

| ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่เติม L-tryptophan | | ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติม L-tryptophan | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ED5-9 | 3.47 | a | 1 | ED2-8 | 2.57 | a |
| 2 | ED4-4 | 2.64 | b | 2 | ED2-10 | 2.50 | ab |
| 3 | ED3-1 | 2.57 | bc | 3 | ED2-3 | 2.33 | abc |
| 4 | ED1-10 | 2.57 | bc | 4 | ED2-6 | 2.33 | abc |
| 5 | ED3-5 | 2.50 | bcd | 5 | ED1-9 | 2.26 | abcd |
| 6 | ED5-6 | 2.50 | bcd | 6 | ED5-9 | 2.26 | abcd |
| 7 | ED3-2 | 2.47 | bcd | 7 | ED2-12 | 2.19 | abcde |
| 8 | ED1-9 | 2.40 | bcde | 8 | ED1-10 | 2.08 | abcdef |

ตาราง 8 (ต่อ)

| ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่เติม L-tryptophan | | ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติม L-tryptophan | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | ED2-6 | 2.36 | bcdef | 9 | ED3-1 | 2.08 | abcdef |
| 10 | ED2-8 | 2.36 | bcdef | 10 | ED4-4 | 2.05 | abcdef |
| 11 | ED3-9 | 2.22 | bcdefg | 11 | ED4-5 | 1.98 | bcdefg |
| 12 | ED2-11 | 2.19 | bcdefg | 12 | ED5-2 | 1.91 | cdefg |
| 13 | ED4-5 | 2.15 | cdefg | 13 | ED1-5 | 1.88 | cdefg |
| 14 | ED2-3 | 2.12 | cdefgh | 14 | ED2-11 | 1.70 | defgh |
| 15 | ED3-7 | 2.08 | defgh | 15 | ED1-2 | 1.67 | efghi |
| 16 | ED1-2 | 2.05 | defghi | 16 | ED2-5 | 1.60 | fghi |
| 17 | ED2-5 | 1.98 | efghij | 17 | ED5-6 | 1.53 | fghij |
| 18 | ED5-2 | 1.98 | efghij | 18 | ED3-9 | 1.49 | ghij |
| 19 | ED5-12 | 1.91 | fghijk | 19 | ED3-5 | 1.46 | ghijk |
| 20 | ED2-12 | 1.88 | ghijk | 20 | ED3-7 | 1.22 | hijkl |
| 21 | ED2-4 | 1.88 | ghijk | 21 | ED5-12 | 1.18 | hijklm |
| 22 | ED5-5 | 1.84 | ghijk | 22 | ED3-2 | 1.15 | ijklm |
| 23 | ED2-10 | 1.67 | hijkl | 23 | ED2-4 | 1.04 | jklmn |
| 24 | ED1-5 | 1.60 | ijkl | 24 | ED2-1 | 1.01 | jklmn |
| 25 | ED1-4 | 1.56 | jkl | 25 | ED3-4 | 0.94 | klmn |
| 26 | ED4-3 | 1.56 | jkl | 26 | ED3-6 | 0.94 | klmn |
| 27 | ED2-1 | 1.53 | jkl | 27 | ED5-5 | 0.94 | klmn |
| 28 | ED3-4 | 1.46 | klm | 28 | ED4-3 | 0.83 | lmn |
| 29 | ED4-1 | 1.39 | lm | 29 | ED3-8 | 0.69 | lmn |
| 30 | ED3-3 | 1.32 | lmn | 30 | ED4-1 | 0.69 | lmn |
| 31 | ED3-6 | 1.29 | lmn | 31 | ED2-9 | 0.69 | lmn |

ตาราง 8 (ต่อ)

| ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่เติม L-tryptophan | ลำดับที่ | ไอโซเลท | ปริมาณ IAA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติม L-tryptophan |
|---|---|---|---|---|---|
| 32 | ED3-8 | 1.25 lmn | 32 | ED1-4 | 0.63 mn |
| 33 | ED2-9 | 1.08 mn | 33 | ED3-3 | 0.63 mn |
| 34 | ED5-3 | 0.94 n | 34 | ED5-3 | 0.56 n |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

จากผลการทดลองในตาราง 7 และ 8 พบว่า แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่งสามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ความเข้มข้นที่แตกต่างกันไปในอาหารเหลว LNM ทั้งที่เติมและไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน แต่ที่น่าสนใจทั้งแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic และ endophytic *Methylobacterium* ในบางไอโซเลทสามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ในอาหาร LNM ที่ไม่เติมแอล-ทริปโตเฟนมากกว่าอาหาร LNM ที่เติมแอล-ทริปโตเฟน โดยไอโซเลท ED5-9 ในแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* สามารถสร้างสารประกอบ IAA ที่มีค่าความเข้มข้นสูงที่สุดในอาหาร LNM ที่ไม่เติมแอล-ทริปโตเฟนได้ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 3.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าในอาหาร LNM ที่เติมแอล-ทริปโตเฟนถึงร้อยละ 53

ดังนั้นจึงได้คัดเลือกไอโซเลท ED5-9 ที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ดีที่สุดส่งไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยา โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนบนยีน 16S rDNA (partial 16S rDNA gene sequencing) ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กรุงเทพฯ พบว่า ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของไอโซเลท ED5-9 กับของแบคทีเรียสายพันธุ์ *M. radiotolerans* JCM 2831 (T) ในฐานข้อมูลของ NCBI มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยค่าร้อยละการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (similarity) เท่ากับ 100 (ดังตาราง 9)

ตาราง 9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลท ED5-9 กับ *M. radiotolerans* JCM 2831 (T)

| รหัสตัวอย่าง | ไอโซเลท ED5-9 | *M. radiotolerans* JCM 2831 (T) Accession: CP001001 |
|---|---|---|
| ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5->3) | GCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGCCCTTC<br>GGGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGC<br>CTTCTGGTTCGGAATAACCCTGGGAAACTAGGGCTAATACCGG<br>ATACGCCCTTTTGGGGAAAGGTTTACTGCCGGAAGATCGGCCC<br>GCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGC<br>GACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG<br>GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG<br>GGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCG<br>CGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTATCCG<br>GGACGATAATGACGGTACCGGAGGAATAAGCCCCGGCTAACT<br>TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGC<br>TCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCGTTTTAA<br>GTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATGGCCTTC<br>GATACTGGGACGCTTGAGTATGGTAGAGGTTGGTGGAACTGC<br>GAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCGGT<br>GGCGAAGGCGGC | AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCAGGCT<br>TAACACATGCAAGTCGAGCGGGCCCTTCGGGGTCAGCGGC<br>GGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCTTCTGGTTCGG<br>AATAACCCTGGGAAAGTAGGGCTAATACCGGATACGCCGTTT<br>TGGGGAAAGGTTTACTGCCGGAAGATCGGCCCGCGTCTGAT<br>TAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCA<br>GTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG<br>ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA<br>TTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGA<br>GTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTATCCGGGAC<br>GATAATGACGGTACCGGAGGAATAAGCCCCGGCTAACTTCG<br>TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCT<br>CGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCGTTTTAA<br>GTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATGGCCTT<br>CGATACTGGGACGCTTGAGTATGGTAGAGGTTGGTGGAACT<br>GCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACC<br>GGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACCATCACTGACGCTGAG<br>GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT<br>AGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGCTGTTGGGGTGCT<br>TGCACCGCAGTAGCGCAGCTAACGCTTTGAGCATTCCGCCT<br>GGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACG<br>GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG<br>CAACGCGCAGAACCTTACCATCCTTTGACATGGCGTGTTACC<br>CAGAGAGATCTGGGGTCCCCTTCGGGGGCGCGCACACAGG<br>TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT<br>TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAT<br>CATTCAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGATAAGCC<br>GCGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTA<br>CGGGATGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTG<br>GGAGGCGAAGGAGCGATCTGGAGCAAATCCCCAAAAGCCG<br>TCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGC<br>GGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA<br>CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA<br>GTTGGTCTTACCCGACGGCGCTGCGCCAACCGCAAGGAGG<br>CAGGCGACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGT<br>AACAAGGTA |

นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* ที่มีความสามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ในปริมาณตั้งแต่ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป จำนวนทั้งหมด 18 ไอโซเลท คือ ED1-2, ED1-9, ED1-10, ED2-3, ED2-5, ED2-6, ED2-8, ED2-11, ED3-1, ED3-2, ED3-5, ED3-7, ED3-9, ED4-4, ED4-5, ED5-2, ED5-6 และ ED5-9

ไปศึกษาความสามารถสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินต่อไป

**การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก**

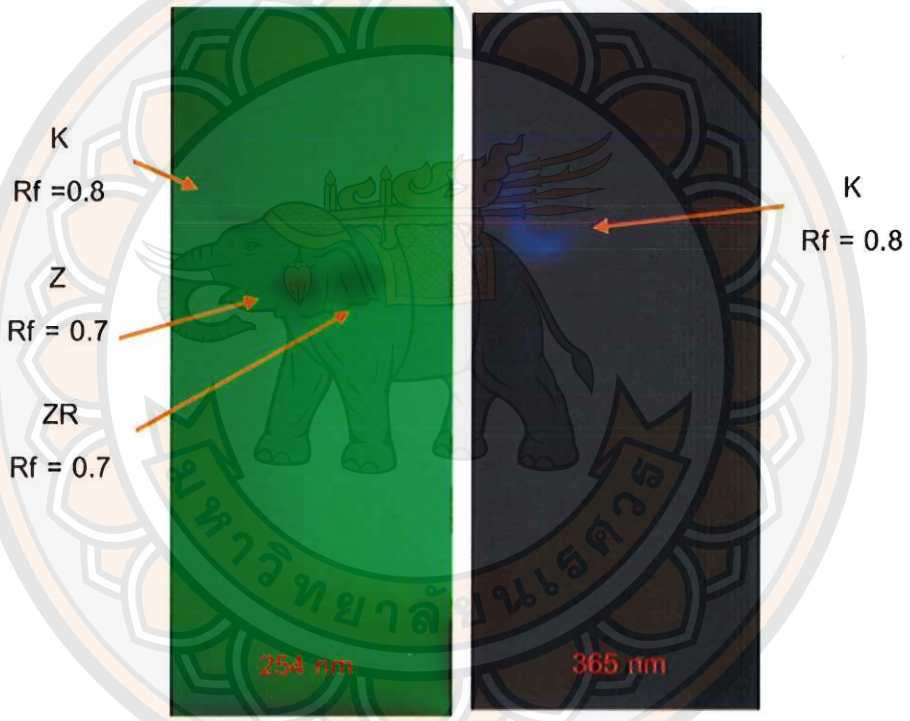
เมื่อนำสารสกัดไซโตไคนินที่สกัดได้จากน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกทั้ง 18 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ปริมาณไซโตไคนินเบื้องต้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร เทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานไคเนติน พบว่าแบคทีเรียสุกล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกทั้ง 18 ไอโซเลทมีปริมาณไซโตไคนินอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.14 ± 0.58 ถึง 1.22 ± 0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในตาราง 10 แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นไซโตไคนินชนิดไหนจึงต้องวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค TLC

**ตาราง 10 ปริมาณไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร**

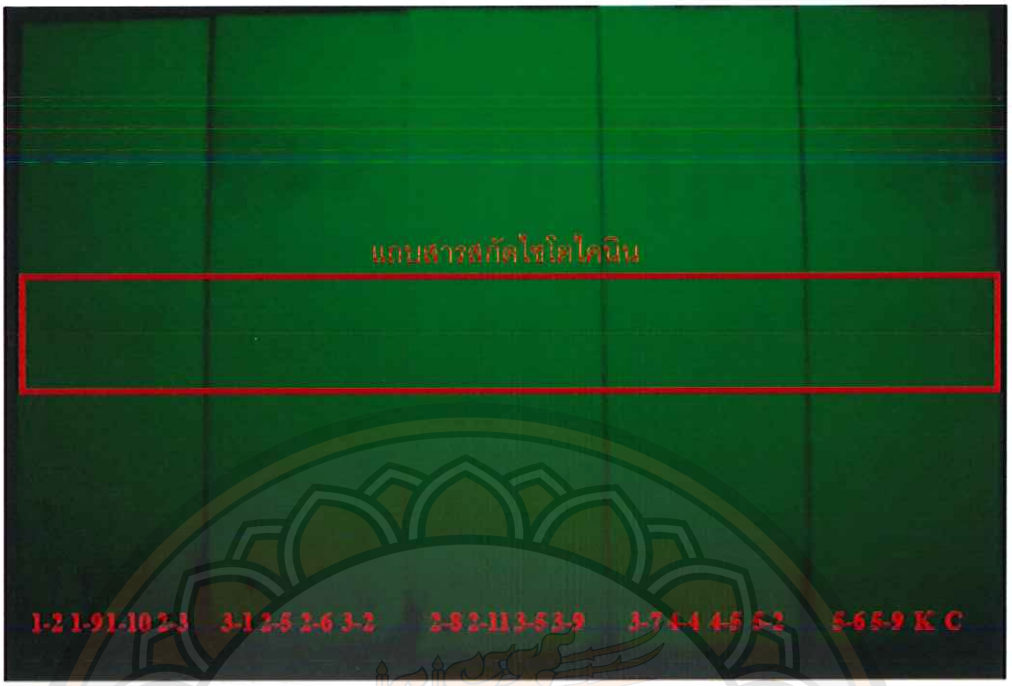
| ไอโซเลท | ปริมาณไซโตไคนิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ไอโซเลท | ปริมาณไซโตไคนิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|
| ED5-6 | $1.22^{a} \pm 0.65$ | ED3-9 | $0.82^{ab} \pm 0.23$ |
| ED4-5 | $1.21^{a} \pm 0.62$ | ED2-5 | $0.76^{ab} \pm 0.16$ |
| ED3-7 | $1.18^{a} \pm 0.72$ | ED2-6 | $0.66^{ab} \pm 0.75$ |
| 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:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($X \pm SD$)

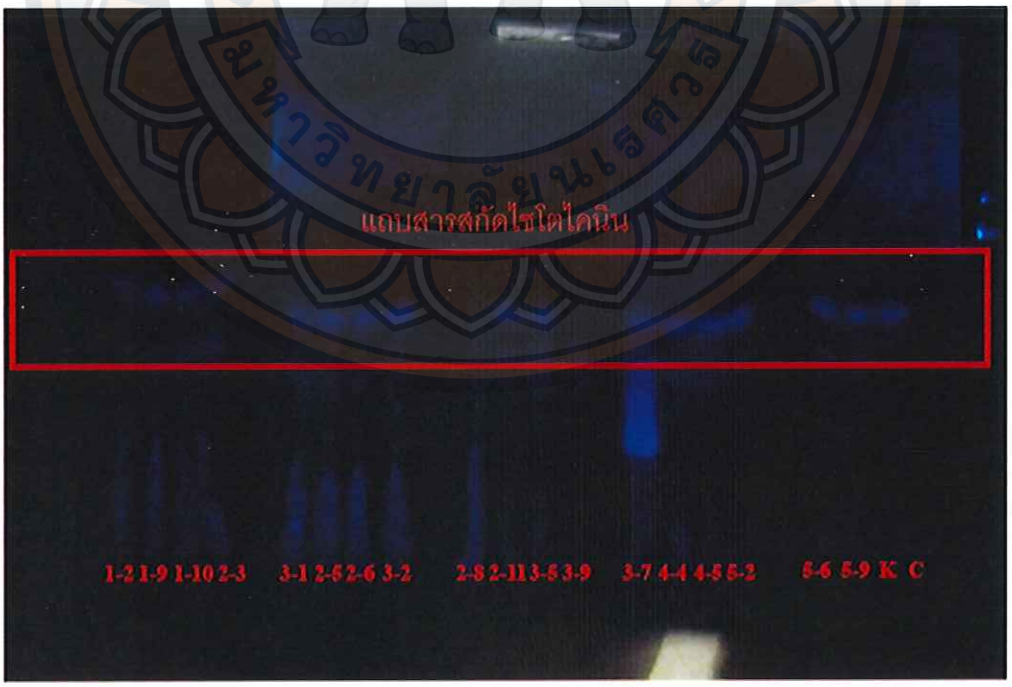
จากการศึกษาชนิดไซโตไคนินของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกทั้ง 18 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค TLC เมื่อตรวจวัดระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ดังภาพ 28, 29 และ 30 เมื่อคำนวณค่า Rf ของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เทียบกับ ค่า Rf ของสารละลายมาตรฐานไคเนติน ซีเอติน และ ซีเอตินไรโบไซด์ พบว่าที่ค่า Rf เท่ากับ 0.6ของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ทั้ง 18 ไอโซเลท มีค่าใกล้เคียงกับค่า Rf ของซีเอติน และซีเอตินไรโบไซด์ที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.7 ดังแสดงในตาราง 11




**ภาพ 28 ผล TLC ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานไคเนติน (K) ซีเอติน (Z) และ ซีเอตินไรโบไซด์ (ZR)**




ภาพ 29 ผล TLC ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรของสารสกัดไซโตไคนิน ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก

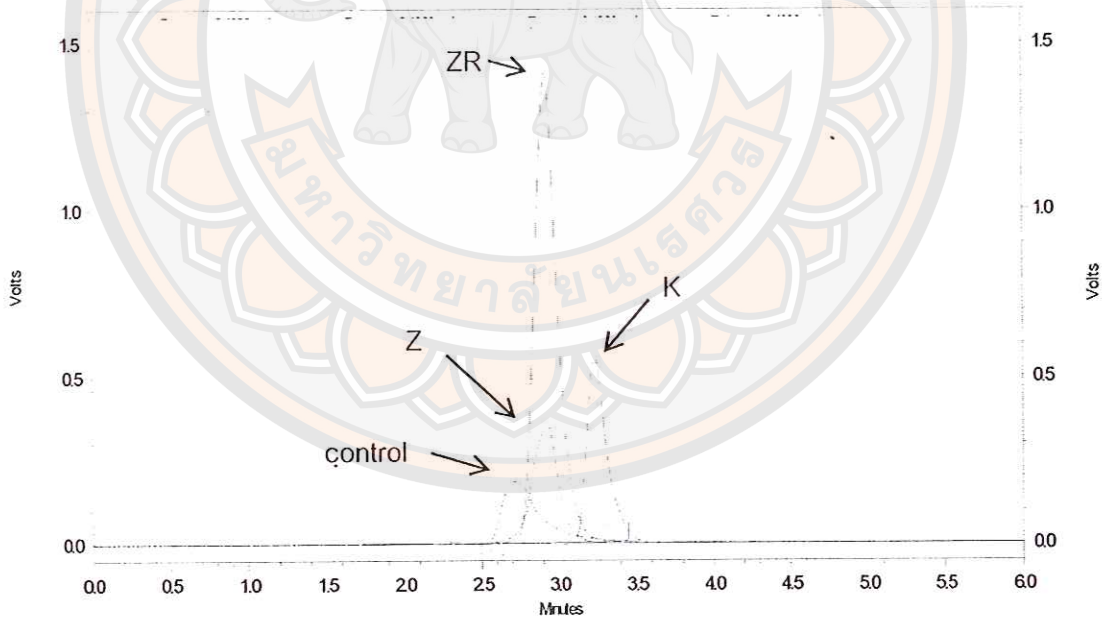



ภาพ 30 ผล TLC ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรของสารสกัดไซโตไคนิน ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก

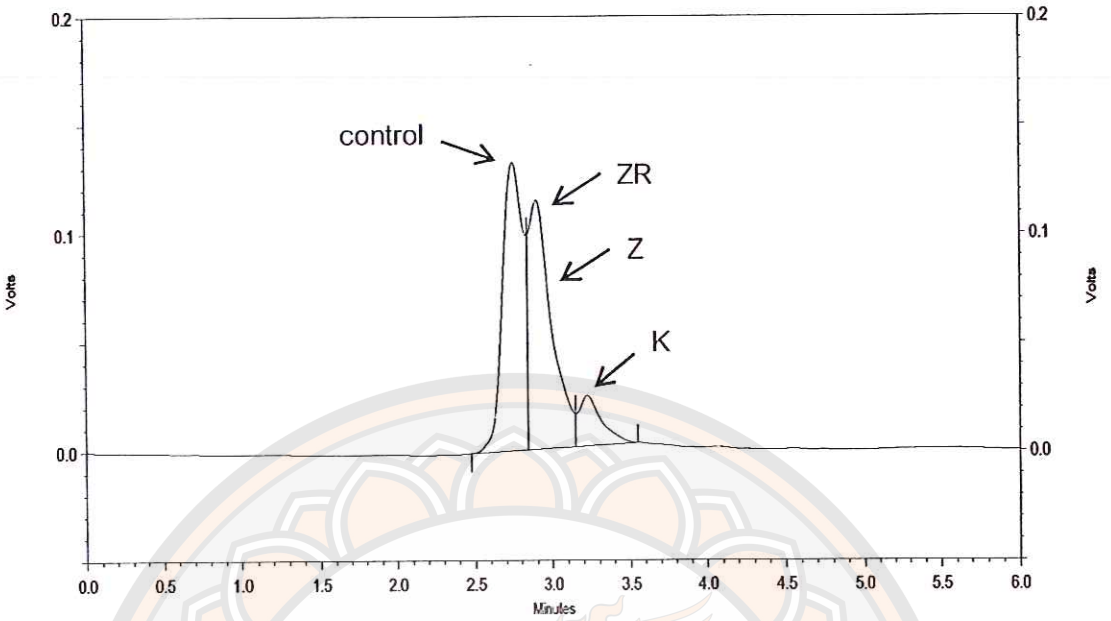
ตาราง 11 ค่า Rf ของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกเทียบกับสารมาตรฐานไคเนติน ซีเอติน และซีเอตินไรโบไซด์

| ลำดับที่ | สารสกัดตัวอย่าง | ค่า Rf | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | band 1 | band 2 | band 3 | band 4 |
| | Std. kinetine | - | - | - | 0.8 |
| | Std. zeatin | - | - | - | 0.7 |
| | 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 |

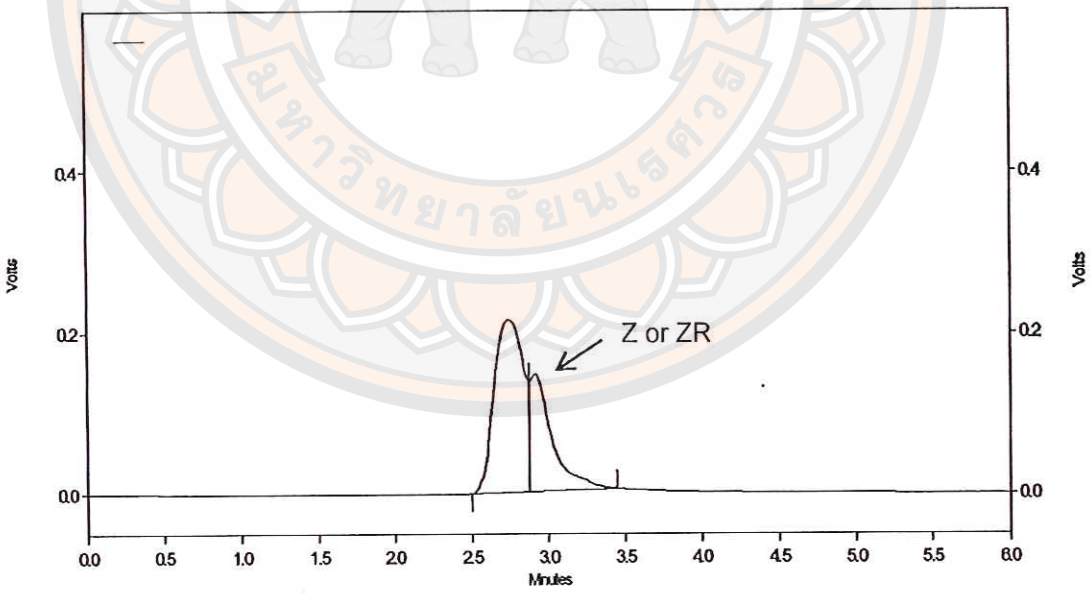
เมื่อนำสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกทั้ง 18 ไอโซเลทไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เทียบกับสารละลายมาตรฐานไคเนติน ซีเอติน และซีเอตินไรโบไซด์ โดยสารทั้งสามมีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากกราฟมาตรฐานของซีเอตินและซีเอตินไรโบไซด์ปรากฏพีคขึ้นที่เวลาเดียวกันคือ 2.921นาที โดยมีความสูงของพีคเท่ากับ 363427 และมีพื้นที่เท่ากับ 4307944 และซีเอตินไรโบไซด์มีความสูงของพีคเท่ากับ 1406057 และมีพื้นที่เท่ากับ 14689226 ส่วนไคเนตินปรากฏพีคขึ้นที่เวลา 3.235 นาที มีความสูงของพีคเท่ากับ 556397 และมีพื้นที่เท่ากับ 5122311 ดังภาพ 31 แต่เมื่อนำสารละลายมาตรฐานผสมเข้าด้วยกันจะทำให้ได้กราฟดังภาพ 32 และจากการเปรียบเทียบของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกทั้ง 18 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท ED3-7 ปรากฏพีคขึ้นที่เวลาเดียวกับซีเอติน และซีเอตินไรโบไซด์ ดังภาพ 33 เมื่อคำนวณหาปริมาณเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของซีเอติน และซีเอตินไรโบไซด์จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 16.67 และ 4.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นซีเอติน หรือซีเอตินไรโบไซด์




**ภาพ 31 กราฟผล HPLC ของสารละลายมาตรฐานไคเนติน (K), ซีเอติน (Z) และซีเอตินไรโบไซด์ (ZR)**




ภาพ 32 กราฟผล HPLC ของสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานไคเนติน (K), ซีเอติน (Z) และซีเอตินไรโบไซด์ (ZR)




ภาพ 33 กราฟผล HPLC ของสารสกัดไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลท ED3-7

**การศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก**

เมื่อนำ *M. radiotolerans* ED5-9 ที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ดีที่สุดมาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC deminase พบว่าสามารถวัดปริมาณของ α-ketobutyrate ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารตั้งต้น ACC ด้วยเอนไซม์ ACC deminase จากการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่สร้างจาก *M. radiotolerans* ED5-9 มีค่าเท่ากับ 365.05 ± 90.51 นาโนโมลของ α –ketobutyrate ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง

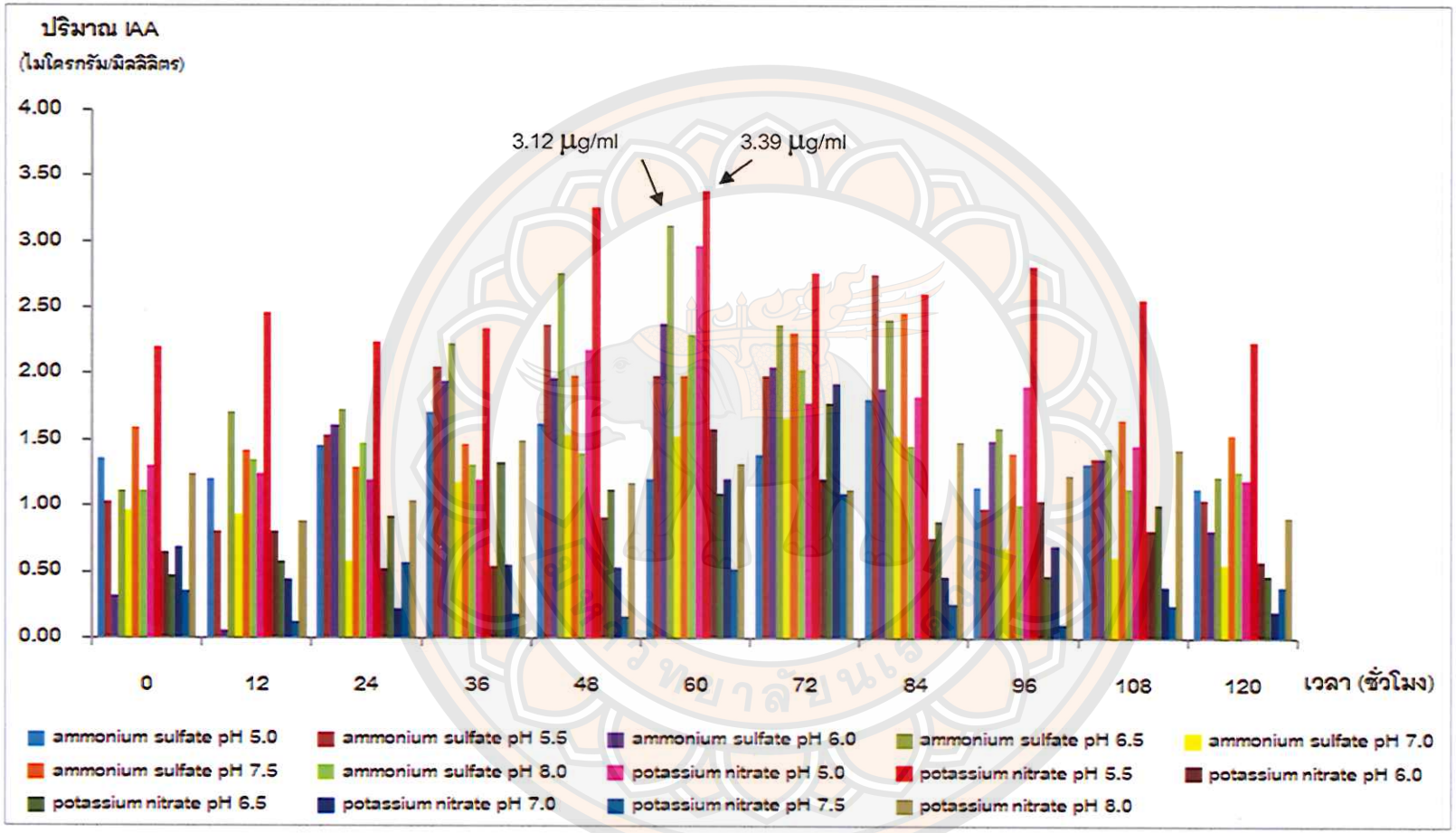
**การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก และการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการสร้างสารประกอบ IAA ด้วยเครื่อง** High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการเพาะเลี้ยง *M. radiotolerans* ED5-9 ในอาหารเหลว LNM ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ในแต่ละแหล่งไนโตรเจน พบว่า *M. radiotolerans* ED5-9 สามารถเจริญและสร้างสารประกอบ IAA ในปริมาณที่แตกต่างกันไปในสภาวะที่ถูกกำหนด (ดังภาพ 34 และภาพ 35) โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ของ *M. radiotolerans* ED5-9 คือ ในสภาวะอาหารเหลว LNM ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนและปรับค่า pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 5.5 ให้ปริมาณสารประกอบ IAA เมื่อเทียบกับทุกสภาวะมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 3.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 60 แต่ *M. radiotolerans* ED5-9 เจริญได้ไม่ดี มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.13 ต่อชั่วโมงและมีระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัวเท่ากับ 5.27 ชั่วโมง ในขณะที่สภาวะอาหารเหลว LNM ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและปรับค่า pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 6.5 สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ปริมาณ เท่ากับ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 60 เมื่อนำค่าปริมาณสารประกอบ IAA ที่สังเคราะห์ได้ในทั้งสองสภาวะไปเปรียบเทียบความแตกต่างกัน พบว่า ทั้งสองสภาวะให้ปริมาณสารประกอบ IAA ที่ไม่มีความแตกต่างกัน แต่สภาวะอาหารเหลว LNM ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและปรับค่า pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 6.5 ในสภาวะนี้ *M. radiotolerans* ED5-9 สามารถเจริญได้ดีให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมงและมีระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัวเท่ากับ 4.26 ชั่วโมง ดังนั้นถ้าต้องการเลี้ยง *M. radiotolerans* ED5-9 เพื่อให้สังเคราะห์สารประกอบ IAA ควรเลือกเลี้ยงในอาหาร LNM ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนและปรับค่า pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 5.5 แต่สำหรับการศึกษาครั้งนี้ต้องการเซลล์ของ *M. radiotolerans*

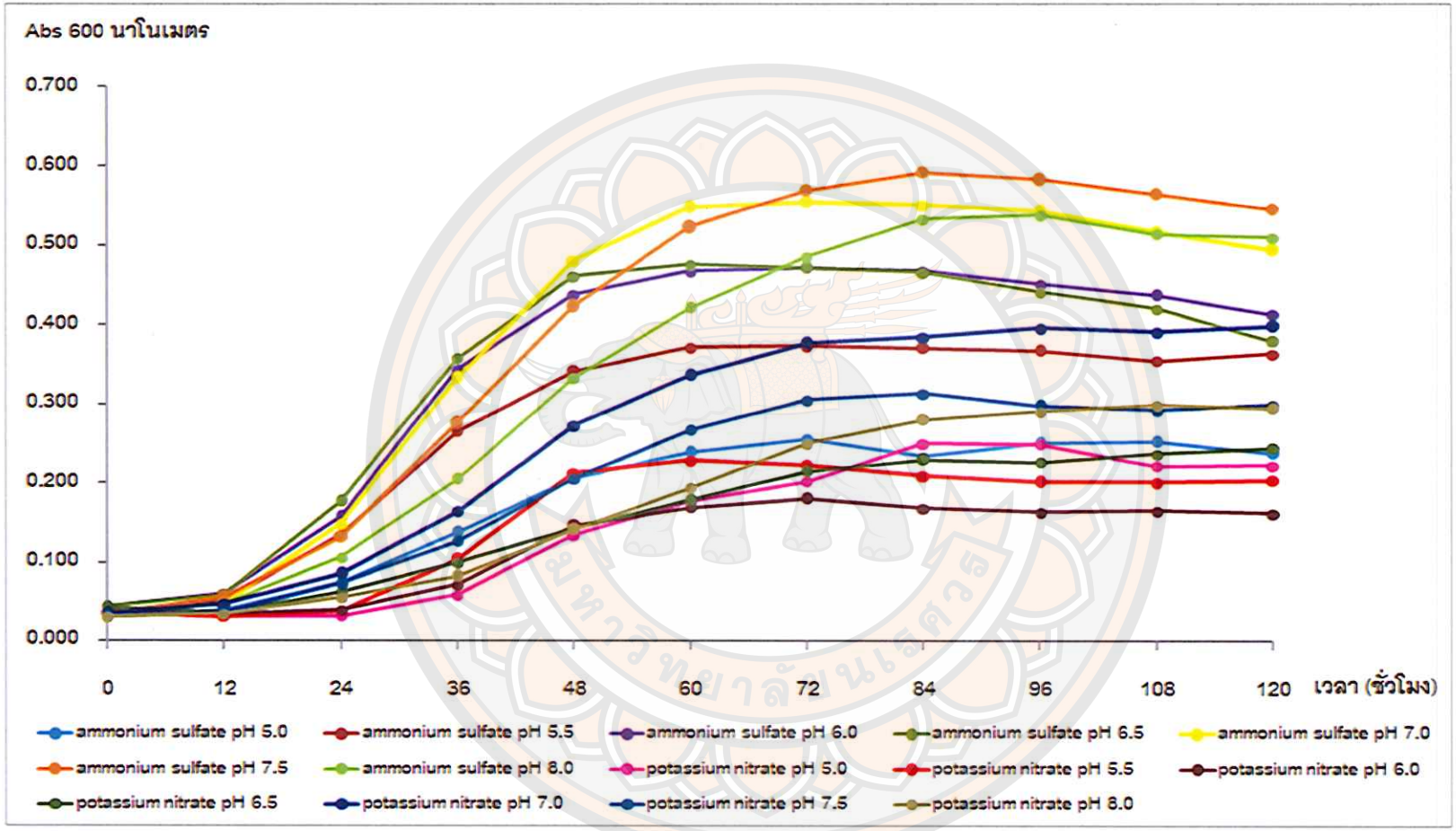
ED5-9 เพื่อนำไปใช้ในการศึกษา ผลของสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นจึงเลือกสภาวะอาหารเหลว LNM ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและปรับค่า pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 6.5 สำหรับเลี้ยง *M. radiotolerans* ED5-9 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและปริมาณสารประกอบ IAA ของ *M. radiotolerans* ED5-9 จะเห็นแนวโน้มของปริมาณสารประกอบ IAA จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรีย และมีปริมาณสูงสุดเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 60 ต่อจากนั้นเมื่อการเจริญเริ่มคงที่และค่อย ๆ ลดลง ปริมาณของสารประกอบ IAA มีแนวโน้มที่ค่อย ๆ ลดลงเช่นเดียวกัน (ดังภาพ 36)

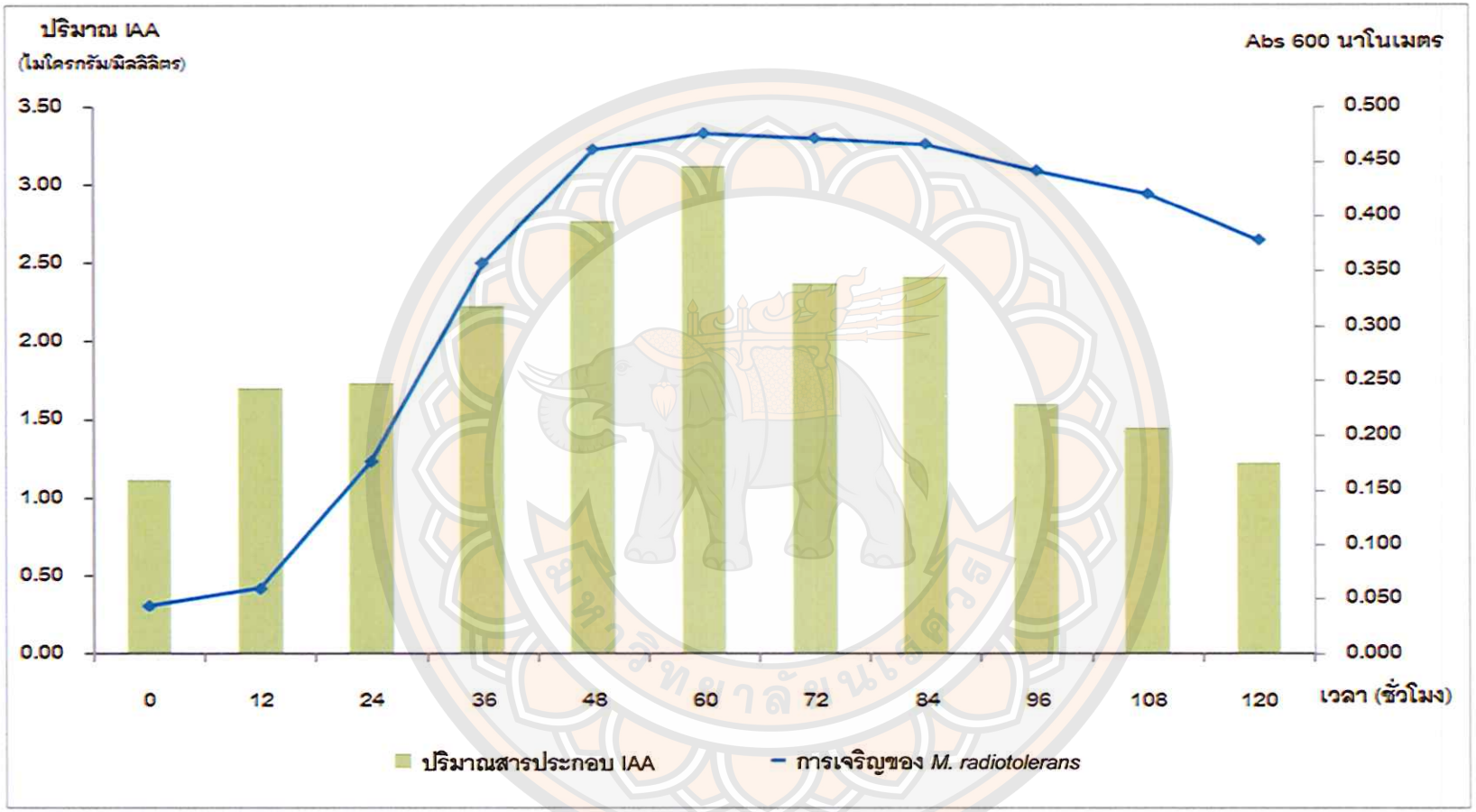
หลังจากเพาะเลี้ยง *M. radiotolerans* ED5-9 ตามสภาวะที่ได้เลือก คือ ในอาหารเหลว LNM ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและมี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง หลังจากปั่นแยกเซลล์ออกและนำน้ำหมักไปศึกษาปริมาณของสารประกอบ IAA ด้วยวิธีของ salkowski พบว่ามีปริมาณของสารประกอบ IAA เท่ากับ 2.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อน้ำหมักถูกลดปริมาตรลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรน้ำหมักทั้งหมดหรือประมาณ 50 มิลลิลิตร วัดปริมาณของสารประกอบ IAA ได้เท่ากับ 3.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นประมาณ 0.28 เท่า ต่อจากนั้นนำน้ำหมักที่ถูกลดปริมาตรไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อยืนยันการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ของ *M. radiotolerans* ED5-9 เทียบกับสารละลายมาตรฐานของ IAA พบว่าเมื่อฉีดน้ำหมักที่ถูกลดปริมาตรเข้าเครื่อง HPLC จะมีพีคขึ้นที่เวลา 13.116 นาทีและมีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 312,865 เมื่อนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐานของ IAA ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีพีคขึ้นที่เวลา 13.527 นาทีและมีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 1,435,486 ดังจะเห็นได้ว่าพีคจากสารทั้งสองขึ้นที่เวลาใกล้เคียงกันน่าจะเป็นสารตัวเดียวกันคือสารประกอบ IAA และเมื่อคำนวณปริมาณของสารประกอบ IAA โดยอาศัยเทียบกับพื้นที่ใต้พีค จะได้ปริมาณสารประกอบ IAA ในน้ำหมักหลังจากลดปริมาตรมีค่าเท่ากับ 2.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *M. radiotolerans* ED5-9 สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ (ดังภาพ 37)



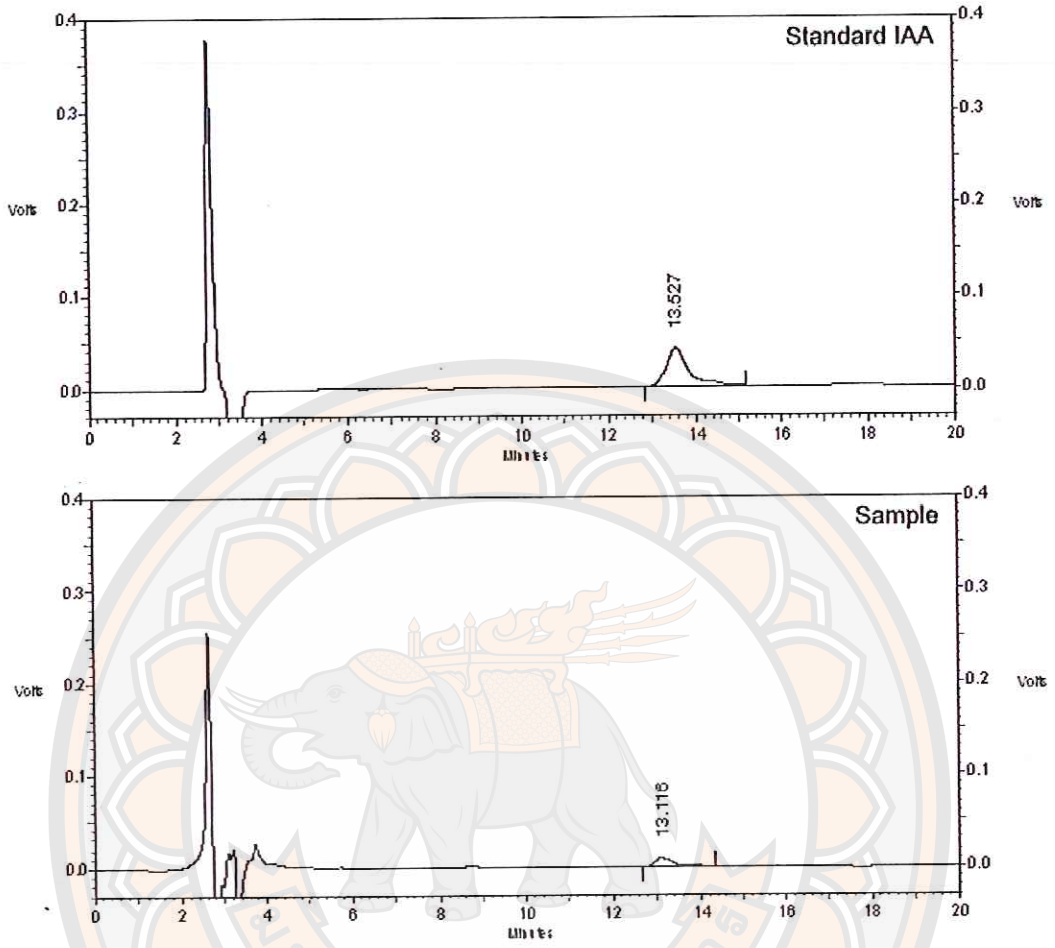

ภาพ 34 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ IAA และเวลา ของ *M. radiotolerans* ED5-9 ที่เลี้ยงในสภาวะแหล่งไนโตรเจนและค่า pH ที่แตกต่างกัน




ภาพ 35 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและเวลา ของ *M. radiotolerans* ED5-9 ที่เลี้ยงในสภาวะ แหล่งไนโตรเจน และค่า pH ที่แตกต่างกัน




ภาพ 36 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ปริมาณสารประกอบ IAA และระยะเวลาของ *M. radiotolerans* ED5-9 ในอาหารเหลว LNM ที่เติมแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับค่า pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 6.5




ภาพ 37 กราฟผล HPLC แสดงการเปรียบเทียบระหว่างสารละลายมาตรฐาน IAA ความเข้มข้น10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและน้ำหมักที่มีสารประกอบ IAA จาก *M. radiotolerans* ED5-9

**การศึกษาผลของสัดส่วนการใช้น้ำหมักในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

การทดลองนี้ใช้น้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่ผลิตจาก *M. radiotolerans* ED5-9 โดยมีค่าความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในน้ำหมักเท่ากับ 3.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมลงในอาหาร MS(1962) ในปริมาณต่าง ๆ เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งเทียบกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA และ IAA โดยการทดลองนี้แบ่งออกได้ 9 กรรมวิธี ดังต่อไปนี้คือ

1. กรรมวิธีที่ 1 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0034 mg/l)) ผสมน้ำหมักลงไปในอาหาร MS(1962) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คิดเป็น ความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในอาหารเท่ากับ 0.0034 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. กรรมวิธีที่ 2 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0067 mg/l)) ผสมน้ำหมักลงไปในอาหาร MS(1962) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร คิดเป็น ความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในอาหารเท่ากับ 0.0067 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. กรรมวิธีที่ 3 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0134 mg/l)) ผสมน้ำหมักลงไปในอาหาร MS(1962) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร คิดเป็น ความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในอาหารเท่ากับ 0.0134 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. กรรมวิธีที่ 4 (Agar + $IAA^{FB}$ (0.0034 mg/l)) ผสมน้ำหมักลงไปในอาหารวุ้นปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อลิตร คิดเป็น ความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในอาหารเท่ากับ 0.0067 มิลลิกรัมต่อลิตร

5. กรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + BA (2.00 mg/l)) อาหาร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

6. กรรมวิธีที่ 6 (MS(1962) + IAA (2.00 mg/l)) อาหาร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

7. กรรมวิธีที่ 7 (MS(1962) + BA (0.0067 mg/l)) อาหาร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA ความเข้มข้น 0.0067 มิลลิกรัมต่อลิตร

8. กรรมวิธีที่ 8 (MS(1962) + IAA (0.0067 mg/l)) อาหาร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ความเข้มข้น 0.0067 มิลลิกรัมต่อลิตร

9. กรรมวิธีที่ 9 (MS(1962)) อาหาร MS(1962) ไม่ผสมน้ำหมักและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

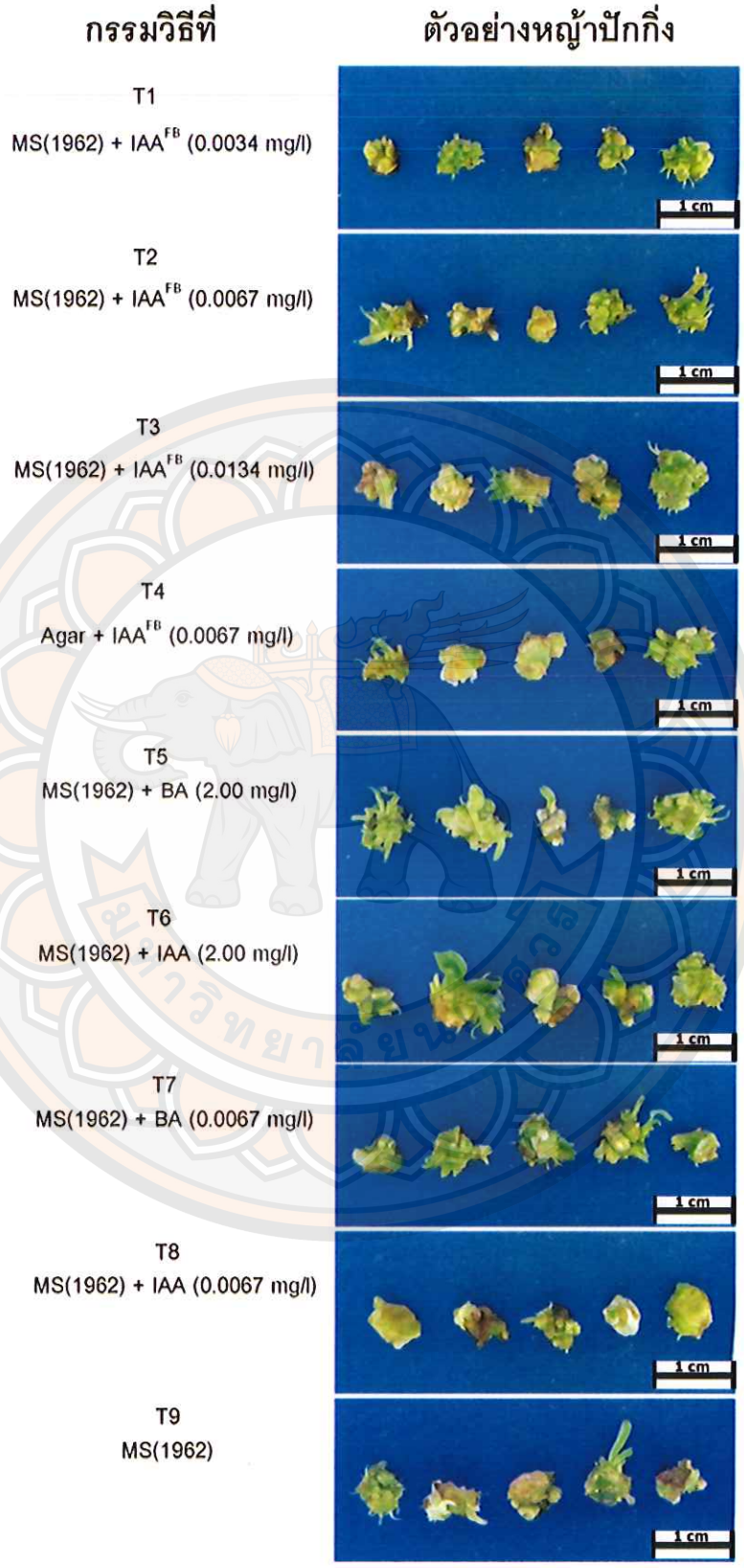
จากการสังเกตการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งของทั้ง 9 กรรมวิธี ในแต่ละสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เพาะเลี้ยงในทั้ง 9 กรรมวิธี มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ โดยชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีการเจริญเติบโตและพัฒนาจากที่มีลักษณะเป็นก้อนแคลลัสที่อัดกันแน่นไม่มียอด ใบ และราก ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งเริ่มมีการเจริญขยายขนาดเกิดยอด ใบ และราก อีกทั้งยังมีการพัฒนาขนาดและความยาวของยอด ใบ และราก รวมทั้งชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งยังมีสีเขียวที่เข้มขึ้น การเจริญที่เกิดขึ้นของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีความแตกต่างกันไปในแต่ละกรรมวิธีที่ใช้ทดสอบ

ในสัปดาห์แรกของทุกกรรมวิธี จากการสังเกตชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง มีสีเขียวอ่อน มีการเจริญเติบโตขยายขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย มียอดและใบเกิดขึ้นเล็กน้อย โดยยอดและใบที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กมาก ไม่พบการเกิดรากในทุกกรรมวิธี (ดังภาพ 38)

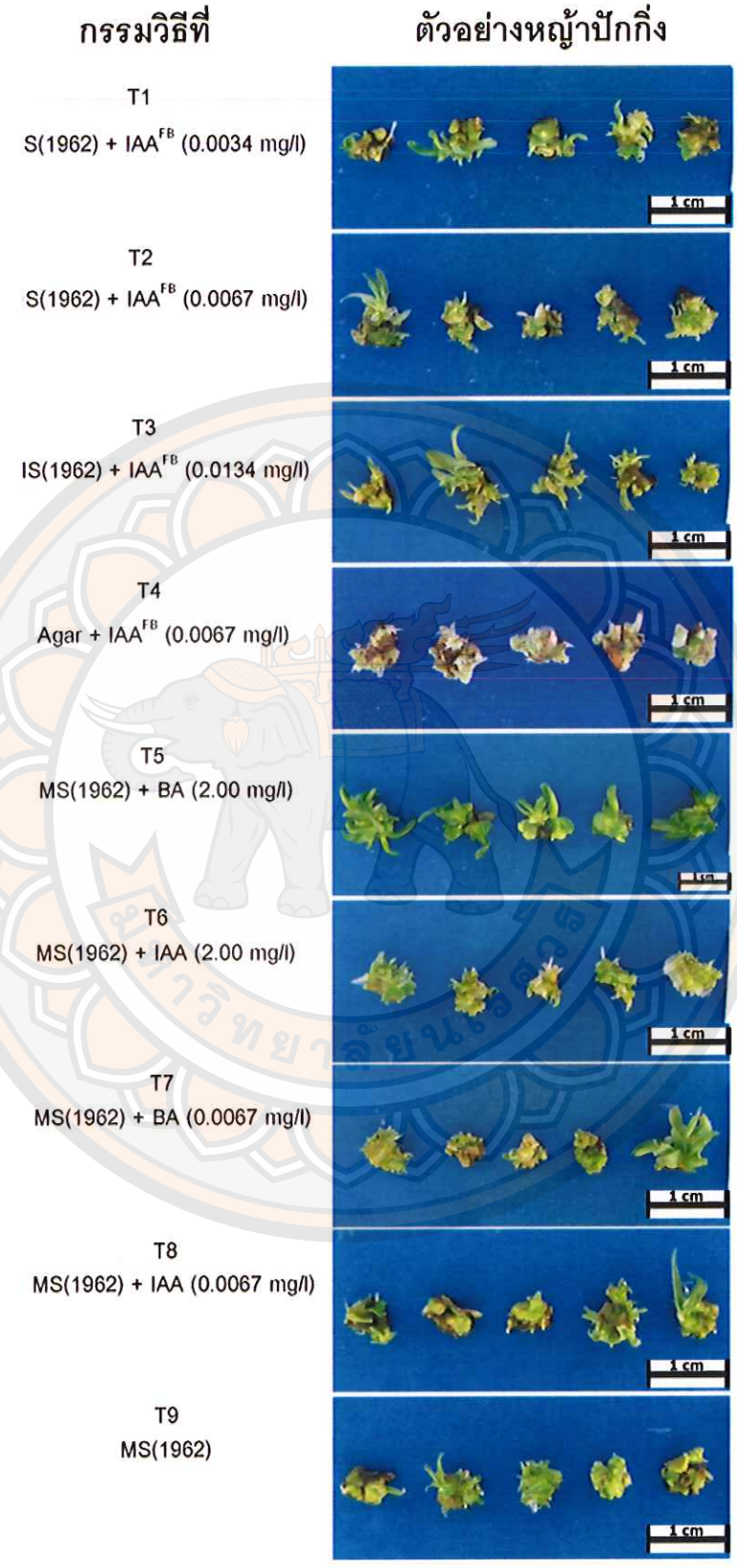
ในสัปดาห์ที่ 2 จากการสังเกตชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง มีสีเขียวเข้มขึ้นยกเว้นในกรรมวิธีที่ 4 การเจริญขยายขนาดเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 1 เล็กน้อย จำนวนยอดและใบมีเพิ่มมากขึ้น ขนาดของใบมีขนาดใหญ่กว่าในสัปดาห์แรก พบการเกิดรากในกรรมวิธีที่ 6 (MS(1962) + IAA (2.00 mg/l)) และกรรมวิธีที่ 3 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0134 mg/l)) (ดังภาพ 39)

ในสัปดาห์ที่ 3 จากการสังเกตชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง มีสีเขียวเข้มมากขึ้น และมีขนาดเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + BA (2.00 mg/l)) มีขนาดเพิ่มขึ้นมากที่สุด มีจำนวนของยอดและใบมากที่สุด อีกทั้งมีขนาดของใบใหญ่ที่สุด นอกจากนี้ พบการเกิดรากในกรรมวิธีที่ 1, 2, 3 และ 4 ที่มีการผสมน้ำหมักที่มีสารประกอบ IAA จาก *M. radiotolerans* ED5-9 และในกรรมวิธีที่ 6 และ 8 ที่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA (ดังภาพ 40)

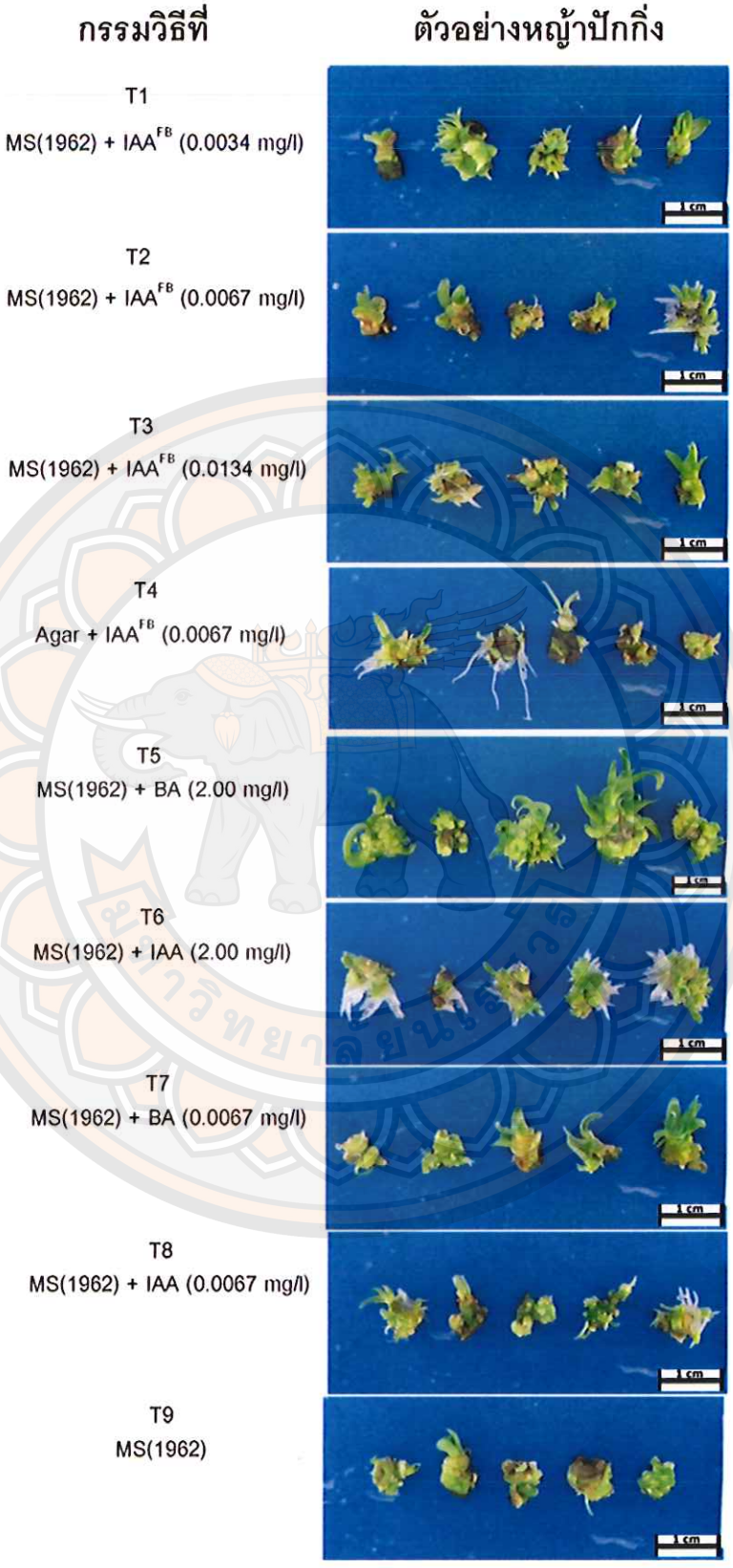
ในสัปดาห์ที่ 4 จากการสังเกตชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง มีการเจริญเพิ่มขึ้นในทุกกรรมวิธี โดยกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + BA (2.00 mg/l)) ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีการเจริญดีที่สุด ดังเห็นได้จากขนาดของยอดและใบที่เจริญเห็นได้ชัดเจน อีกทั้งยังมีจำนวนของยอดและใบที่มากกว่าในทุกกรรมวิธี แต่ในกรรมวิธีที่ 5 นี้ไม่พบการเกิดราก เช่นเดียวกันกับกรรมวิธีที่ 7 (MS(1962) + BA (0.0067 mg/l)) และกรรมวิธีที่ 9 (MS(1962)) (ดังภาพ 41)



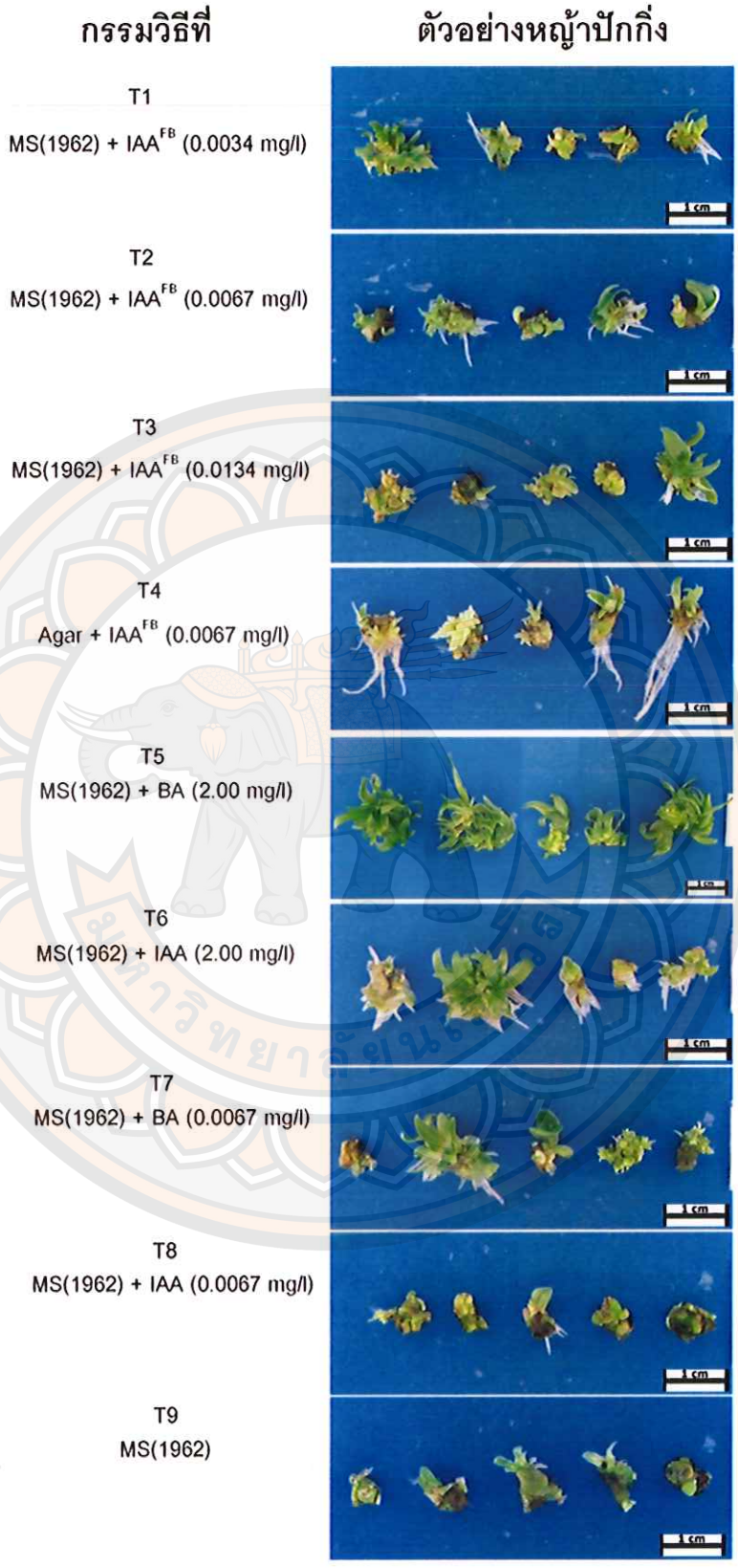

ภาพ 38 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์




ภาพ 39 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์




ภาพ 40 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์




ภาพ 41 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เมื่อนำชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เพาะเลี้ยงในทั้ง 9 กรรมวิธี มาจดบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ ขนาดของชิ้นส่วน น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง จำนวนของยอด ใบ และรากที่เกิดขึ้น ความยาวของราก ในทุกสัปดาห์ นอกจากนี้ในสัปดาห์ที่ 3 ได้มีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยเครื่อง SPAD-502 และในสัปดาห์ที่ 4 ได้วิเคราะห์สารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งด้วยวิธีการทางเคมี โดยมีค่าแตกต่างกันไปในแต่ละกรรมวิธี

สัปดาห์ที่ 1 ขนาดความกว้างเฉลี่ยและความยาวเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันมาก และในกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + BA (2.00 mg/l)) มีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.2735 ± 0.1069 กรัม พบการเกิดยอดในทุกกรรมวิธียกเว้นกรรมวิธีที่ 3 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0134 mg/l)) และกรรมวิธีที่ 8 (MS(1962) + IAA (0.0067 mg/l)) โดยกรรมวิธีที่ 5 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.75 ± 1.26 ยอดต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 80 ไม่พบการเกิดใบและรากในทุกกรรมวิธี (ดังตาราง 12 - 14 และภาพ 42 – 43)

สัปดาห์ที่ 2 ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น โดยกรรมวิธีที่ 5 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.4618 ± 0.0931 และ 0.0301 ± 0.0048 กรัม ตามลำดับ พบการเกิดยอดและใบ ในทุกกรรมวิธียกเว้นกรรมวิธีที่ 4 (Agar + $IAA^{FB}$ (0.0034 mg/l)) และกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + BA (2.00 mg/l)) มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 5.80 ± 1.64 ยอดต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 100 และกรรมวิธีที่ 7 (MS(1962) + BA (0.0067 mg/l)) มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 10.00 ใบต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดใบเท่ากับ 20 แต่กรรมวิธีที่ 5 มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 6.80 ± 3.03 ใบต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดใบเท่ากับ 100 ซึ่งจำนวนใบในทั้งสองกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 และในสัปดาห์นี้พบชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีการเกิดรากในกรรมวิธีที่ 3 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0134 mg/l)) และกรรมวิธีที่ 6 (MS(1962) + IAA (2.00 mg/l)) โดยมีจำนวนรากเท่ากับ 4.00 และ 9.00 ± 4.24 รากต่อชิ้น แต่กรรมวิธีที่ 6 มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 80 มากกว่ากรรมวิธีที่ 3 ที่มีร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 20 ส่วนความยาวรากใน กรรมวิธีที่ 3 มีความยาวเท่ากับ 0.60 เซนติเมตร ยาวมากกว่ากรรมวิธีที่ 6 ที่รากยาว 0.45 ± 0.13 เซนติเมตร (ดังตาราง 12 - 16 และภาพ 42 – 43)

สัปดาห์ที่ 3 ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งค่อนข้างสมบูรณ์มีการเกิดยอด ใบ และราก ในเกือบทุกกรรมวิธี ยกเว้นกรรมวิธีที่ 9 (MS(1962)) ไม่พบการเจริญของใบและราก และกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + BA (2.00 mg/l)) และกรรมวิธีที่ 7 (MS(1962) + BA (0.0067 mg/l)) ที่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA ไม่พบการงอกของรากเช่นเดียวกัน ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง

ในกรรมวิธีที่ 5 มีการเจริญเติบโตมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ มีขนาดความกว้างและความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 1.50 ± 0.50 และ 2.50 ± 1.06 เซนติเมตร ตามลำดับ มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 0.8293 ± 0.5238 และ 0.0494 ± 0.0270 กรัม ตามลำดับ มีจำนวนยอดและใบเฉลี่ยต่อชิ้นสูงสุดเท่ากับ 6.50 ± 2.52 ยอดต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 80 และ 3.50 ± 2.12 ใบต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดใบเท่ากับ 40 ตามลำดับ แต่ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 6 (MS(1962) + IAA (2.00 mg/l)) มีจำนวนรากเฉลี่ยต่อชิ้นสูงสุดเท่ากับ 17.40 ± 11.87 รากต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 100 มีความยาวของรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.84 ± 0.22 เซนติเมตร น้อยกว่ากรรมวิธีที่ 2 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0067 mg/l)) ที่ให้ความยาวของรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.50 เซนติเมตร จากข้อมูลพบว่าชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เกิดรากจะอยู่ในกรรมวิธีที่มีฤทธิ์ของสารประกอบ IAA เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA และกรรมวิธีที่ใช้เพียงแต่อาหาร MS(1962) อย่างเดียว และจากการสังเกตกรรมวิธีที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช IAA จะให้จำนวนรากที่มากกว่ากรรมวิธีที่ใช้น้ำหมักที่ผลิตจาก *M. radiotolerans* ED5-9 ที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA แต่ความยาวของรากกลับสั้นกว่าในแต่ละกรรมวิธีที่เกิดราก ทั้งจำนวนรากและความยาวของรากไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ที่น่าสนใจในกรรมวิธีที่ 4 (Agar + $IAA^{FB}$ (0.0034 mg/l)) ให้จำนวนรากถึง 10.00 ± 5.66 รากต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 40 และความยาวรากเท่ากับ 1.25 ± 0.64 เซนติเมตร ซึ่งเป็นอันดับที่สองจากกรรมวิธีทั้งหมด ในสัปดาห์นี้ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 1, 2, 3, 5 และ 7 มีใบที่มีขนาดให้สามารถใช้เครื่อง SPAD-502 วัดปริมาณคลอโรฟิลล์จากใบได้ โดยกรรมวิธีที่ 5 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 1.114 ± 0.255, 0.356 ± 0.081 และ 1.461 ± 0.334 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ (ดังตาราง 12 - 17 และภาพ 42 – 44)

สัปดาห์ที่ 4 ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในทุกกรรมวิธี มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นมีการเกิดยอด ใบและราก ยกเว้นกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + BA (2.00 mg/l)) และกรรมวิธีที่ 9 (MS(1962)) ที่ไม่พบการงอกของรากออกจากชิ้นส่วน กรรมวิธีที่ 5 ให้ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีขนาดความกว้างและความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 2.90 ± 1.02 และ 4.00 ± 0.94 เซนติเมตร มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่า 1.4618 ± 0.9312 กรัมและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 0.879 ± 0.0467 กรัม จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 11.00 ± 6.67 ยอดต่อชิ้น จำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 17.40 ± 9.94 ใบต่อชิ้น นอกจากนี้ยังมีปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวม เท่ากับ 1.482 ± 0.240, 0.473 ± 0.077 และ 1.944 ± 0.315 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ ในขณะที่

กรรมวิธีที่ 6 (MS(1962) + IAA (2.00 mg/l)) ให้จำนวนของรากมากที่สุดเท่ากับ 14.00 ± 9.72 รากต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 100 แต่มีความยาวรากเท่ากับ 1.06 ± 0.41 เซนติเมตร น้อยกว่าความยาวรากในกรรมวิธีที่ 4 (Agar + $IAA^{FB}$ (0.0034 mg/l)) ที่มีความยาวรากมากที่สุด เท่ากับ 2.10 ± 0.66 เซนติเมตร ทั้งนี้จำนวนรากและความยาวรากในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 เมื่อนำตัวอย่างชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งจากทุกกรรมวิธีไปวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิโดยวิธีการทางเคมี พบว่า กรรมวิธีที่ 5 มีปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี สูงที่สุด เท่ากับ 1,135.90 ± 457.65 และ 638.22 ± 322.63 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีปริมาณสารสำคัญ 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-Z-6'-enecosamide)sphingosine สูงที่สุด เท่ากับ 0.49 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่วิเคราะห์ได้จากหญ้าปักกิ่งในแต่ละกรรมวิธีเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดด้วยเมทานอล ปริมาณสารสำคัญมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เพิ่มขึ้น (ดังตาราง 12 - 19 และภาพ 42 – 45)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเฉพาะกรรมวิธีที่ผสมน้ำหมักที่มีสารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA จาก *M. radiotolerans* ED5-9 และกรรมวิธีที่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA พบมีการสร้างยอดตั้งแต่ในสัปดาห์แรกยกเว้นกรรมวิธีที่ 3 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0134 mg/l)) และกรรมวิธีที่ 8 (MS(1962) + IAA (0.0067 mg/l)) เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ จำนวนยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 โดยกรรมวิธีที่ 2 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0067 mg/l)) มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 3.00 ± 1.73 ใบต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดใบ เท่ากับ 20 ในสัปดาห์ที่ 2 นอกจากพบการเกิดยอด ยังพบการเจริญของใบและการงอกของราก โดยกรรมวิธีที่ 3 ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ผสมน้ำหมักในปริมาณสูงที่สุดในการทดลอง มีจำนวนยอดและใบเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 3.80 ± 1.64 ยอดต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดยอด เท่ากับ 100 และ 5.67 ± 3.79 ใบต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดใบ เท่ากับ 60 ทั้งจำนวนยอดและใบเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ในขณะที่การเกิดรากพบในกรรมวิธีที่ 3 และ กรรมวิธีที่ 6 (MS(1962) + IAA (2.00 mg/l)) โดยในกรรมวิธีที่ 6 มีรากเกิดขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 9.00 ± 4.24 รากต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดราก เท่ากับ 80 มากกว่ากรรมวิธีที่ 3 ที่มีรากเกิดขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 4.00 รากต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดราก เท่ากับ 20 ในขณะที่ความยาวของรากที่วัดได้ในกรรมวิธีที่ 3 มีความยาวรากเฉลี่ย เท่ากับ 0.60 เซนติเมตรมากกว่าความยาวรากเฉลี่ยในกรรมวิธีที่ 6 ที่มีความยาวรากเฉลี่ย

เท่ากับ 0.45 ± 0.13 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 3 จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเปลี่ยนไปเป็นกรรมวิธีที่ 6 ที่มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 4.00 ± 0.82 ยอดต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดยอด เท่ากับ 80 จากการสังเกตกรรมวิธีที่ 1 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0034 mg/l)) ที่ผสมน้ำหมักน้อยที่สุดกลับมีจำนวนยอดมากกว่ากรรมวิธีที่ 3 ที่ผสมน้ำหมักมากกว่า ตรงกันข้ามกับในสัปดาห์ที่ 2 เช่นเดียวกันกับจำนวนใบเฉลี่ย กรรมวิธีที่ 1 มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 3.00 ใบต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดใบ เท่ากับ 20 ในทางกลับกันกับจำนวนรากเฉลี่ยที่จะมีจำนวนรากเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสารประกอบ IAA เพิ่มขึ้น โดยกรรมวิธีที่ 6 มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 17.40 ± 11.87 รากต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดราก เท่ากับ 100 มีความยาวราก เท่ากับ 0.84 ± 0.22 เซนติเมตร และกรรมวิธีที่ผสมน้ำหมักในปริมาณมากจะให้จำนวนรากเฉลี่ยที่มากกว่ากรรมวิธีที่ผสมน้ำหมักในปริมาณน้อยกว่า ในสัปดาห์ที่ 4 แนวโน้มการเจริญจะเหมือนกับสัปดาห์ที่ 3 กรรมวิธีที่ 6 ยังคงมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 3.50 ± 3.11 ยอดต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดยอด เท่ากับ 80 และกรรมวิธีที่ 1 ที่ผสมน้ำหมักน้อยที่สุดกลับมีจำนวนยอดมากกว่ากรรมวิธีที่ 3 ที่ผสมน้ำหมักมากกว่าเช่นเดียวกันกับจำนวนใบเฉลี่ย โดยกรรมวิธีที่ 1 มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 8.00 ± 7.07 ใบต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดใบ เท่ากับ 40 ส่วนจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดยังคงเป็นของกรรมวิธีที่ 6 ที่มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 14.00 ± 9.72 รากต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดราก เท่ากับ 100 และกรรมวิธีที่ผสมน้ำหมักในปริมาณมากกว่าจะให้จำนวนรากเฉลี่ยที่มากกว่ากรรมวิธีที่ผสมน้ำหมักในปริมาณน้อยกว่า (ดังตาราง 14 - 16 และภาพ 43)

ตาราง 12 ขนาดความกว้างเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ย ของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | ความกว้าง (เซนติเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ความยาว (เซนติเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.76±0.15 | 0.92$^{b}$±0.13 | 0.62$^{c}$±0.22 | 0.92$^{b}$±0.22 | 0.92±0.13 | 1.36$^{b}$±0.42 | 1.14$^{bc}$±0.22 | 1.16$^{bc}$±0.59 |
| 2 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0067 mg/l)) | 0.66±0.15 | 0.82$^{b}$±0.22 | 0.88$^{bc}$±0.11 | 0.96$^{b}$±0.09 | 1.00±0.32 | 1.24$^{b}$±0.51 | 1.20$^{bc}$±0.27 | 1.50$^{bc}$±0.35 |
| 3 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0134 mg/l)) | 0.76±0.17 | 0.94$^{b}$±0.13 | 0.86$^{bc}$±0.13 | 0.94$^{b}$±0.13 | 0.88±0.18 | 1.58$^{b}$±0.53 | 1.32$^{bc}$±0.20 | 1.50$^{bc}$±0.60 |
| 4 (Agar+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.80±0.14 | 0.80$^{b}$±0.16 | 0.72$^{bc}$±0.26 | 0.90$^{b}$±0.10 | 0.88±0.11 | 1.08$^{b}$±0.11 | 1.12$^{bc}$±0.50 | 1.20$^{bc}$±0.19 |
| 5 (MS(1962)+BA(2.00 mg/l)) | 0.86±0.19 | 1.52$^{a}$±0.48 | 1.50$^{a}$±0.50 | 2.90$^{a}$±1.02 | 1.22±0.18 | 2.44$^{a}$±0.59 | 2.50$^{a}$±1.06 | 4.00$^{a}$±0.94 |
| 6 (MS(1962)+IAA(2.00 mg/l)) | 0.88±0.13 | 0.88$^{b}$±0.16 | 0.90$^{bc}$±0.22 | 1.16$^{b}$±0.78 | 1.00±0.35 | 1.40$^{b}$±0.42 | 1.46$^{b}$±0.43 | 1.70$^{bc}$±0.91 |
| 7 (MS(1962)+BA(0.0067 mg/l)) | 0.84±0.13 | 0.96$^{b}$±0.33 | 0.86$^{bc}$±0.13 | 1.02$^{b}$±0.29 | 1.06±0.26 | 1.20$^{b}$±0.45 | 1.30$^{bc}$±0.27 | 1.80$^{b}$±0.76 |
| 8 (MS(1962)+IAA(0.0067 mg/l)) | 0.64±0.09 | 0.84$^{b}$±0.15 | 0.94$^{b}$±0.09 | 0.70$^{b}$±0.14 | 0.82±0.16 | 1.34$^{b}$±0.42 | 1.44$^{bc}$±0.38 | 0.98$^{bc}$±0.04 |
| 9 (MS(1962)) | 0.70±0.07 | 0.82$^{b}$±0.20 | 0.64$^{c}$±0.11 | 0.88$^{b}$±0.11 | 1.08±0.24 | 1.14$^{b}$±0.25 | 0.86$^{c}$±0.13 | 1.52$^{c}$±0.48 |
| $LSD_{0.05}$ | ns | 2.03 | 2.03 | 2.03 | ns | 2.03 | 2.03 | 2.03 |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

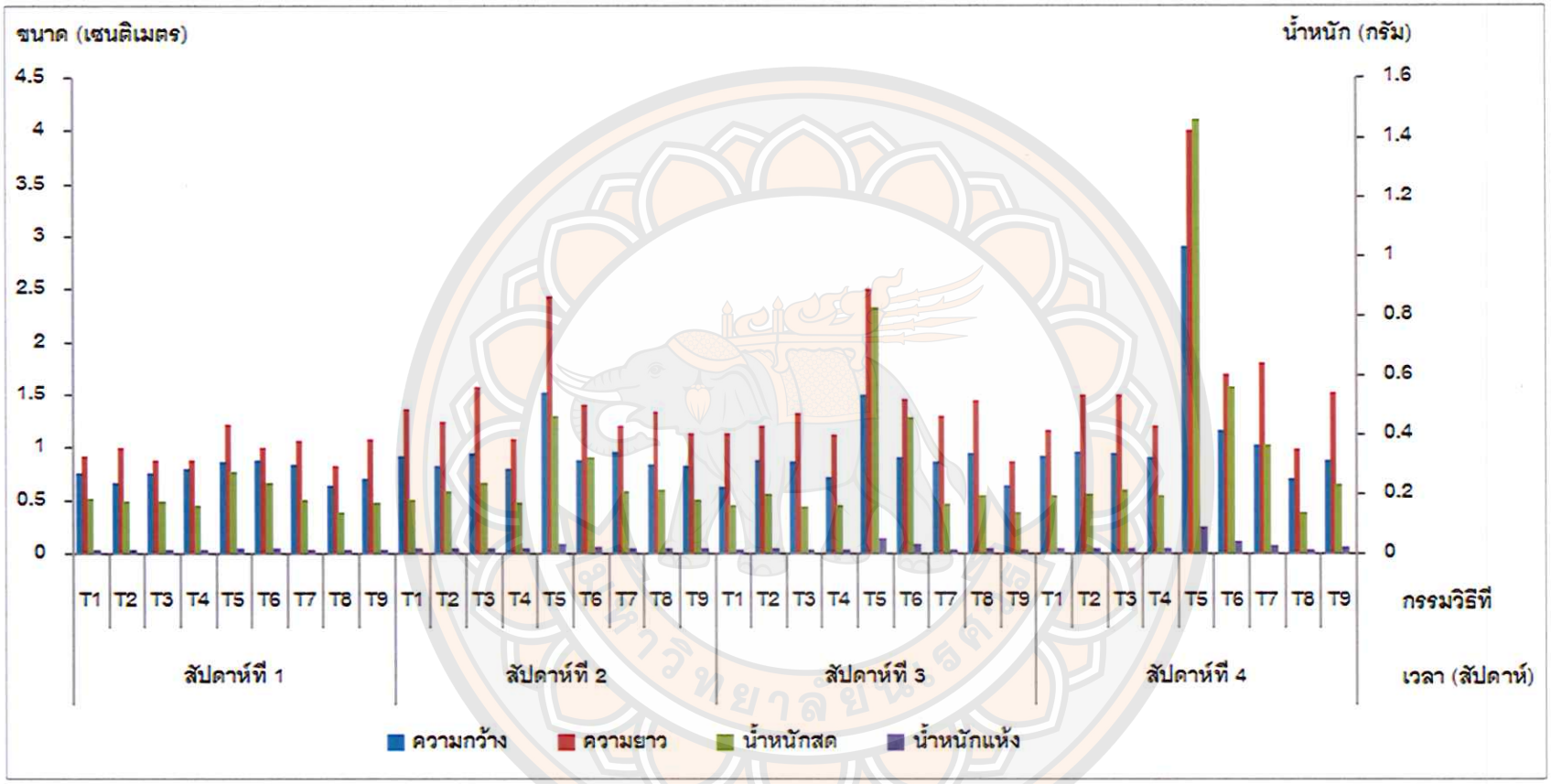
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (X ± SD); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง 13 น้ำหนักสดเฉลี่ย และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | น้ำหนักสด (กรัม) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | น้ำหนักแห้ง (กรัม) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.1861$^{bc}$±0.0310 | 0.1775$^{c}$±0.0322 | 0.1618$^{c}$±0.0831 | 0.1942$^{b}$±0.0936 | 0.0134±0.0022 | 0.0147$^{c}$±0.0040 | 0.0141$^{c}$±0.0071 | 0.0169$^{bc}$±0.0082 |
| 2 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0067 mg/l)) | 0.1723$^{bc}$±0.0333 | 0.2056$^{c}$±0.0697 | 0.1981$^{c}$±0.1145 | 0.1958$^{b}$±0.0511 | 0.0122±0.0019 | 0.0170$^{c}$±0.0050 | 0.0164$^{c}$±0.0089 | 0.0169$^{bc}$±0.0034 |
| 3 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0134 mg/l)) | 0.1740$^{bc}$±0.0660 | 0.2369$^{bc}$±0.801 | 0.1570$^{c}$±0.0261 | 0.2137$^{b}$±0.1063 | 0.0113±0.0034 | 0.0190$^{bc}$±0.0056 | 0.0125$^{c}$±0.0025 | 0.0179$^{bc}$±0.0087 |
| 4 (Agar+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.1603$^{c}$±0.0468 | 0.1703$^{c}$±0.0228 | 0.1613$^{c}$±0.0357 | 0.1943$^{b}$±0.0361 | 0.0120±0.0026 | 0.0164$^{c}$±0.0018 | 0.0123$^{c}$±0.0062 | 0.0172$^{bc}$±0.0053 |
| 5 (MS(1962)+BA(2.00 mg/l)) | 0.2735$^{a}$±0.1069 | 0.4618$^{a}$±0.0931 | 0.8293$^{a}$±0.5238 | 1.4618$^{a}$±0.9312 | 0.0179±0.0053 | 0.0301$^{a}$±0.0048 | 0.0494$^{a}$±0.0270 | 0.0879$^{a}$±0.0467 |
| 6 (MS(1962)+IAA(2.00 mg/l)) | 0.2341$^{b}$±0.0873 | 0.3227$^{b}$±0.1606 | 0.4574$^{b}$±0.2481 | 0.5618$^{b}$±0.4732 | 0.0165±0.0067 | 0.0238$^{ab}$±0.0107 | 0.0335$^{b}$±0.0168 | 0.0386$^{b}$±0.0297 |
| 7 (MS(1962)+BA(0.0067 mg/l)) | 0.1784$^{c}$±0.0569 | 0.2085$^{c}$±0.0617 | 0.1655$^{b}$±0.0582 | 0.3654$^{b}$±0.2918 | 0.0135±0.0045 | 0.0171$^{bc}$±0.0039 | 0.0143$^{c}$±0.0045 | 0.0281$^{bc}$±0.0177 |
| 8 (MS(1962)+IAA(0.0067 mg/l)) | 0.1381$^{c}$±0.0400 | 0.2140$^{c}$±0.0450 | 0.1923$^{b}$±0.0391 | 0.1370$^{b}$±0.0415 | 0.0108±0.0031 | 0.0180$^{bc}$±0.0041 | 0.0169$^{c}$±0.0021 | 0.0128$^{c}$±0.0039 |
| 9 (MS(1962)) | 0.1711$^{c}$±0.0240 | 0.1797$^{c}$±0.0223 | 0.1342$^{b}$±0.0244 | 0.2291$^{b}$±0.0737 | 0.0137±0.0022 | 0.0153$^{c}$±0.0011 | 0.0117$^{c}$±0.0024 | 0.0200$^{bc}$±0.0069 |
| $LSD_{0.05}$ | 2.03 | 2.03 | 2.03 | 2.03 | ns | 2.03 | 2.03 | 2.03 |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (X ± SD); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ




ภาพ 42 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเฉลี่ย และน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละกรรมวิธีกับระยะเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 14 จำนวนยอดเฉลี่ย และร้อยละการเกิดยอดเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้น) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ร้อยละการเกิดยอด ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 2.00 | 2.20$^{bc}$±1.30 | 2.75$^{bc}$±2.36 | 3.40$^{b}$±2.30 | 20.00 | 100.00$^{a}$ | 80.00 | 100.00 |
| 2 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0067 mg/l)) | 3.00 | 2.20$^{bc}$±1.10 | 2.50$^{bc}$±1.29 | 2.60$^{b}$±1.14 | 20.00 | 100.00$^{a}$ | 80.00 | 100.00 |
| 3 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0134 mg/l)) | 0.00 | 3.80$^{b}$±1.64 | 2.40$^{bc}$±0.89 | 2.50$^{b}$±1.73 | 0.00 | 100.00$^{a}$ | 100.00 | 80.00 |
| 4 (Agar+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 2.00 | 0.00 | 1.75$^{c}$±1.50 | 3.25$^{b}$±0.96 | 40.00 | 0.00$^{b}$ | 80.00 | 80.00 |
| 5 (MS(1962)+BA(2.00 mg/l)) | 2.75±1.26 | 5.80$^{a}$±1.64 | 6.50$^{a}$±2.52 | 11.00$^{a}$±6.67 | 80.00 | 100.00$^{a}$ | 80.00 | 100.00 |
| 6 (MS(1962)+IAA(2.00 mg/l)) | 2.00±1.41 | 1.75$^{c}$±0.96 | 4.00$^{b}$±0.82 | 3.50$^{b}$±3.11 | 40.00 | 80.00$^{a}$ | 80.00 | 80.00 |
| 7 (MS(1962)+BA(0.0067 mg/l)) | 2.00±1.41 | 1.67$^{c}$±1.15 | 2.40$^{bc}$±1.67 | 3.60$^{b}$±3.13 | 40.00 | 60.00$^{a}$ | 100.00 | 100.00 |
| 8 (MS(1962)+IAA(0.0067 mg/l)) | 0.00 | 2.50$^{bc}$±1.91 | 2.50$^{bc}$±1.00 | 1.00$^{b}$ | 0.00 | 80.00$^{a}$ | 80.00 | 40.00 |
| 9 (MS(1962)) | 1.00 | 2.00$^{bc}$±1.00 | 1.00$^{c}$ | 2.00$^{b}$±1.00 | 20.00 | 60.00$^{a}$ | 20.00 | 60.00 |
| $LSD_{0.05}$ | ns | 2.06 | 2.06 | 2.05 | ns | 2.03 | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง 15 จำนวนใบเฉลี่ย และร้อยละการเกิดใบเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | จำนวนใบ (ใบต่อชิ้น) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ร้อยละการเกิดใบ ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.00 | 3.50±3.54 | 3.00 | 8.00±7.07 | 0.00 | 40.00$^{bc}$ | 20.00$^{cd}$ | 40.00 |
| 2 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0067 mg/l)) | 0.00 | 4.00 | 2.25±1.89 | 3.00±1.73 | 0.00 | 20.00$^{bc}$ | 80.00$^{ab}$ | 60.00 |
| 3 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0134 mg/l)) | 0.00 | 5.67±3.79 | 2.20±0.84 | 4.33±4.93 | 0.00 | 60.00$^{ab}$ | 100.00$^{a}$ | 60.00 |
| 4 (Agar+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.00 | 0.00 | 3.00±1.41 | 4.33±2.08 | 0.00 | 0.00$^{c}$ | 40.00$^{bcd}$ | 60.00 |
| 5 (MS(1962)+BA(2.00 mg/l)) | 0.00 | 6.80±3.03 | 3.50±2.12 | 17.40±9.94 | 0.00 | 100.00$^{a}$ | 40.00$^{bcd}$ | 100.00 |
| 6 (MS(1962)+IAA(2.00 mg/l)) | 0.00 | 6.00 | 1.00 | 8.33±11.85 | 0.00 | 20.00$^{bc}$ | 20.00$^{cd}$ | 60.00 |
| 7 (MS(1962)+BA(0.0067 mg/l)) | 0.00 | 10.00 | 4.00±2.00 | 8.00±8.49 | 0.00 | 20.00$^{bc}$ | 60.00$^{abc}$ | 40.00 |
| 8 (MS(1962)+IAA(0.0067 mg/l)) | 0.00 | 3.00±1.41 | 1.00 | 2.00 | 0.00 | 40.00$^{bc}$ | 40.00$^{bcd}$ | 20.00 |
| 9 (MS(1962)) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.33±0.58 | 0.00 | 0.00$^{c}$ | 0.00$^{d}$ | 60.00 |
| $LSD_{0.05}$ | - | ns | ns | ns | - | 2.03 | 2.03 | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

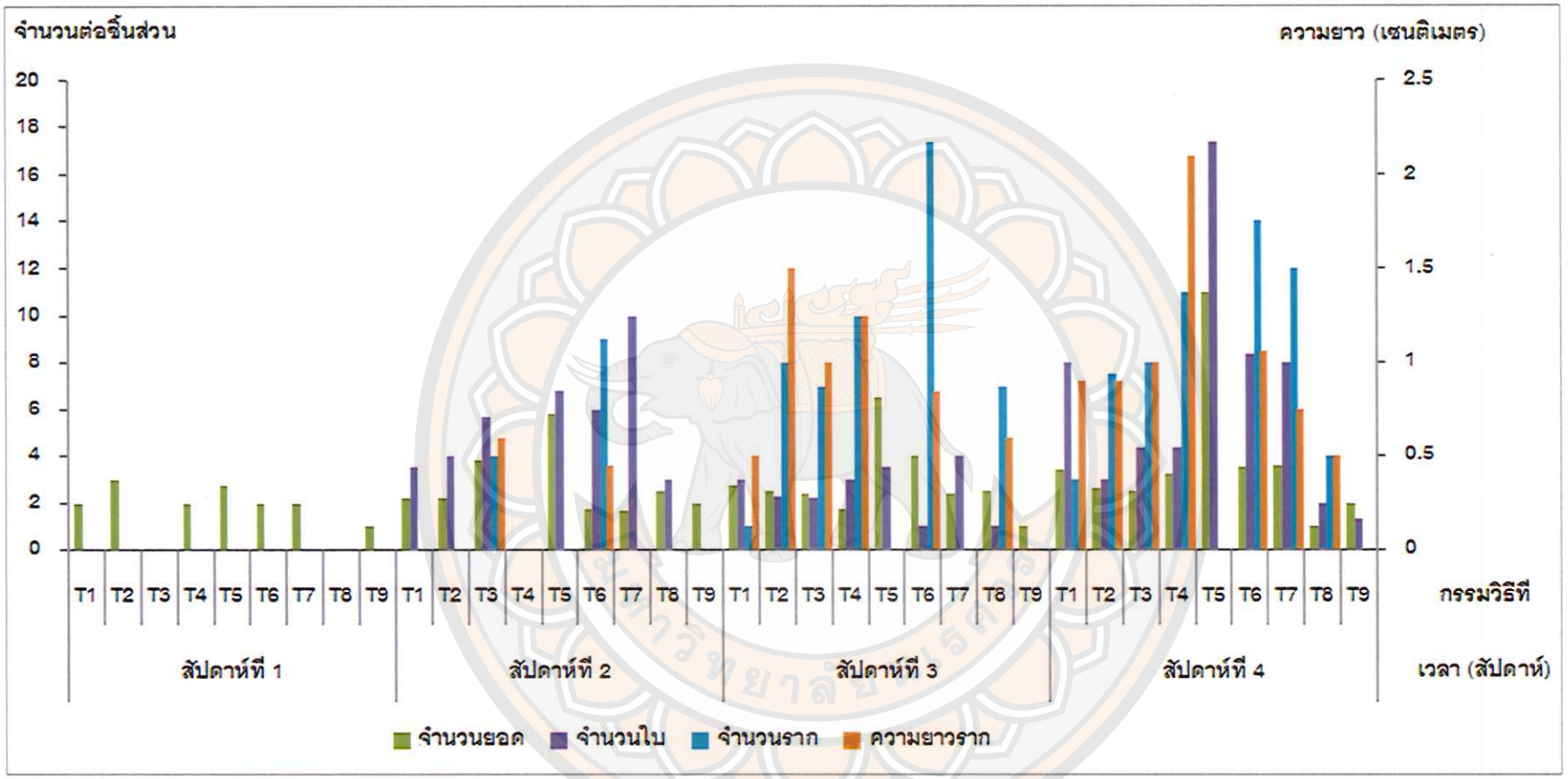
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; - = ไม่ได้ทำการคำนวณ

ตาราง 16 จำนวนรากเฉลี่ย ร้อยละการเกิดรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | จำนวนราก (รากต่อชิ้น) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ร้อยละการเกิดราก ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ความยาวราก (เซนติเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.00 | 0.00 | 1.00 | 3.00±1.41 | 0.00 | 0.00$^{b}$ | 20.00$^{b}$ | 40.00$^{bc}$ | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 0.90±0.14 |
| 2 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0067 mg/l)) | 0.00 | 0.00 | 8.00 | 7.50±0.71 | 0.00 | 0.00$^{b}$ | 20.00$^{b}$ | 40.00$^{bc}$ | 0.00 | 0.00 | 1.50 | 0.90±0.14 |
| 3 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0134 mg/l)) | 0.00 | 4.00 | 7.00 | 8.00 | 0.00 | 20.00$^{b}$ | 20.00$^{b}$ | 20.00$^{bc}$ | 0.00 | 0.60 | 1.00 | 1.00 |
| 4 (Agar+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.00 | 0.00 | 10.00±5.66 | 11.00±4.58 | 0.00 | 0.00$^{b}$ | 40.00$^{b}$ | 60.00$^{ab}$ | 0.00 | 0.00 | 1.25±0.64 | 2.10±0.66 |
| 5 (MS(1962)+BA(2.00 mg/l)) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00$^{b}$ | 0.00$^{b}$ | 0.00$^{c}$ | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 6 (MS(1962)+IAA(2.00 mg/l)) | 0.00 | 9.00±4.24 | 17.40±11.87 | 14.00±9.72 | 0.00 | 80.00$^{a}$ | 100.00$^{a}$ | 100.00$^{a}$ | 0.00 | 0.45±0.13 | 0.84±0.22 | 1.06±0.41 |
| 7 (MS(1962)+BA(0.0067 mg/l)) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 12.00±12.73 | 0.00 | 0.00$^{b}$ | 0.00$^{b}$ | 40.00$^{bc}$ | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.75±0.64 |
| 8 (MS(1962)+IAA(0.0067 mg/l)) | 0.00 | 0.00 | 7.00±5.66 | 4.00 | 0.00 | 0.00$^{b}$ | 40.00$^{b}$ | 20.00$^{bc}$ | 0.00 | 0.00 | 0.60 | 0.50 |
| 9 (MS(1962)) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00$^{b}$ | 0.00$^{b}$ | 0.00$^{c}$ | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| $LSD_{0.05}$ | - | - | ns | ns | - | 2.03 | 2.03 | 2.03 | - | - | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; - = ไม่ได้ทำการคำนวณ



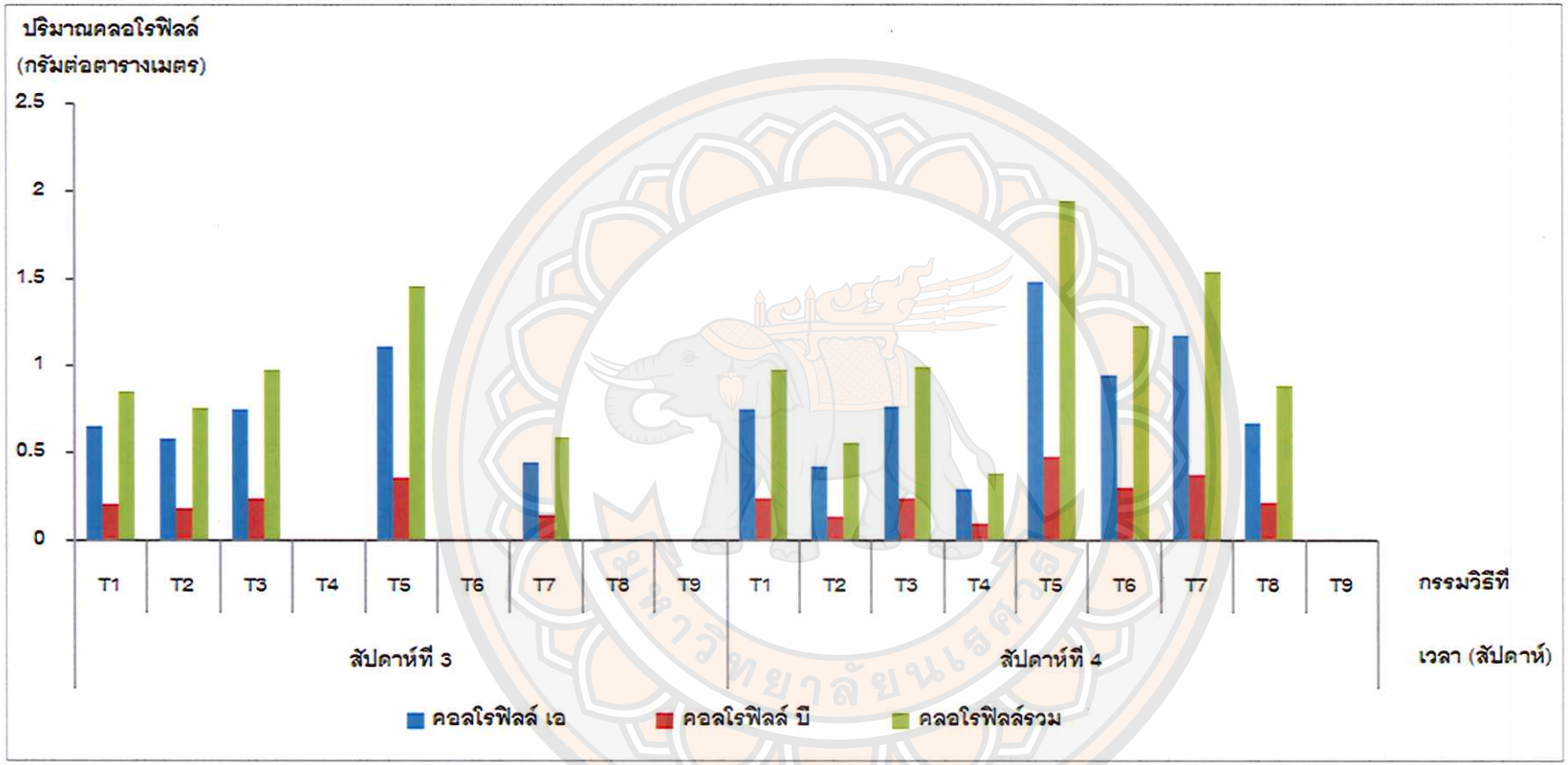

ภาพ 43 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเฉลี่ยของยอด ใบ และราก รวมทั้งความยาวรากเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีกับระยะเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 17 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 ในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4

| กรรมวิธีที่ (n=5) | ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (กรัมต่อตารางเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (กรัมต่อตารางเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (กรัมต่อตารางเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 |
| 1 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.649 | $0.745^{cd}$ | 0.207 | $0.238^{cd}$ | 0.851 | $0.977^{cd}$ |
| 2 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0067 mg/l)) | 0.577±0.649 | $0.422^{de}$±0.225 | 0.184±0.207 | $0.135^{de}$±0.072 | 0.757±0.851 | $0.553^{de}$±0.294 |
| 3 (MS(1962)+IAA$^{FB}$(0.0134 mg/l)) | 0.747±0.246 | $0.758^{cd}$±0.236 | 0.239±0.078 | $0.242^{cd}$±0.075 | 0.980±0.322 | $0.994^{cd}$±0.309 |
| 4 (Agar+IAA$^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.000 | $0.292^{e}$±0.114 | 0.000 | $0.093^{e}$±0.036 | 0.000 | $0.383^{e}$±0.150 |
| 5 (MS(1962)+BA(2.00 mg/l)) | 1.114±0.255 | $1.482^{a}$±0.240 | 0.356±0.081 | $0.473^{a}$±0.077 | 1.461±0.334 | $1.944^{a}$±0.315 |
| 6 (MS(1962)+IAA(2.00 mg/l)) | 0.000 | $0.941^{bc}$±0.368 | 0.000 | $0.301^{bc}$±0.117 | 0.000 | $1.234^{bc}$±0.482 |
| 7 (MS(1962)+BA(0.0067 mg/l)) | 0.446±0.133 | $1.173^{ab}$±0.418 | 0.142±0.042 | $0.375^{ab}$±0.133 | 0.584±0.174 | $1.539^{ab}$±0.548 |
| 8 (MS(1962)+IAA(0.0067 mg/l)) | 0.000 | $0.670^{cde}$ | 0.000 | $0.214^{cde}$ | 0.000 | $0.879^{cde}$ |
| 9 (MS(1962)) | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| $LSD_{0.05}$ | ns | 2.20 | ns | 2.20 | ns | 2.20 |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; - = ไม่ได้ทำการคำนวณ




ภาพ 44 กราฟปริมาณคลอโรฟิลล์เฉลี่ยที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 ในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4

ตาราง 18 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์เฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี

| กรรมวิธีที่ (n=5) | ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม) | ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม) | แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม) |
|---|---|---|---|
| 1 (MS(1962)+$IAA^{FB}$(0.0034 mg/l)) | $620.48^{bc} \pm 107.58$ | $333.70 \pm 189.45$ | $121.21 \pm 76.79$ |
| 2 (MS(1962)+$IAA^{FB}$(0.0067 mg/l)) | $513.47^{c} \pm 46.76$ | $476.60 \pm 104.99$ | $114.15 \pm 34.09$ |
| 3 (MS(1962)+$IAA^{FB}$(0.0134 mg/l)) | $522.75^{c} \pm 103.73$ | $418.61 \pm 310.38$ | $101.17 \pm 94.85$ |
| 4 (Agar+$IAA^{FB}$(0.0034 mg/l)) | $443.03^{c} \pm 205.05$ | $635.83 \pm 127.15$ | $21.86 \pm 103.46$ |
| 5 (MS(1962)+BA(2.00 mg/l)) | $1,135.90^{a} \pm 457.65$ | $638.22 \pm 322.63$ | $189.93 \pm 74.74$ |
| 6 (MS(1962)+IAA(2.00 mg/l)) | $775.09^{abc} \pm 262.25$ | $401.80 \pm 163.01$ | $157.67 \pm 86.66$ |
| 7 (MS(1962)+BA(0.0067 mg/l)) | $620.44^{bc} \pm 95.65$ | $596.25 \pm 336.01$ | $98.57 \pm 85.97$ |
| 8 (MS(1962)+IAA(0.0067 mg/l)) | $648.22^{bc} \pm 227.24$ | $470.43 \pm 412.52$ | $158.12 \pm 37.06$ |
| 9 (MS(1962)) | $912.16^{ab} \pm 84.72$ | $855.77 \pm 370.57$ | $133.61 \pm 55.72$ |
| $LSD_{0.05}$ | 2.10 | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

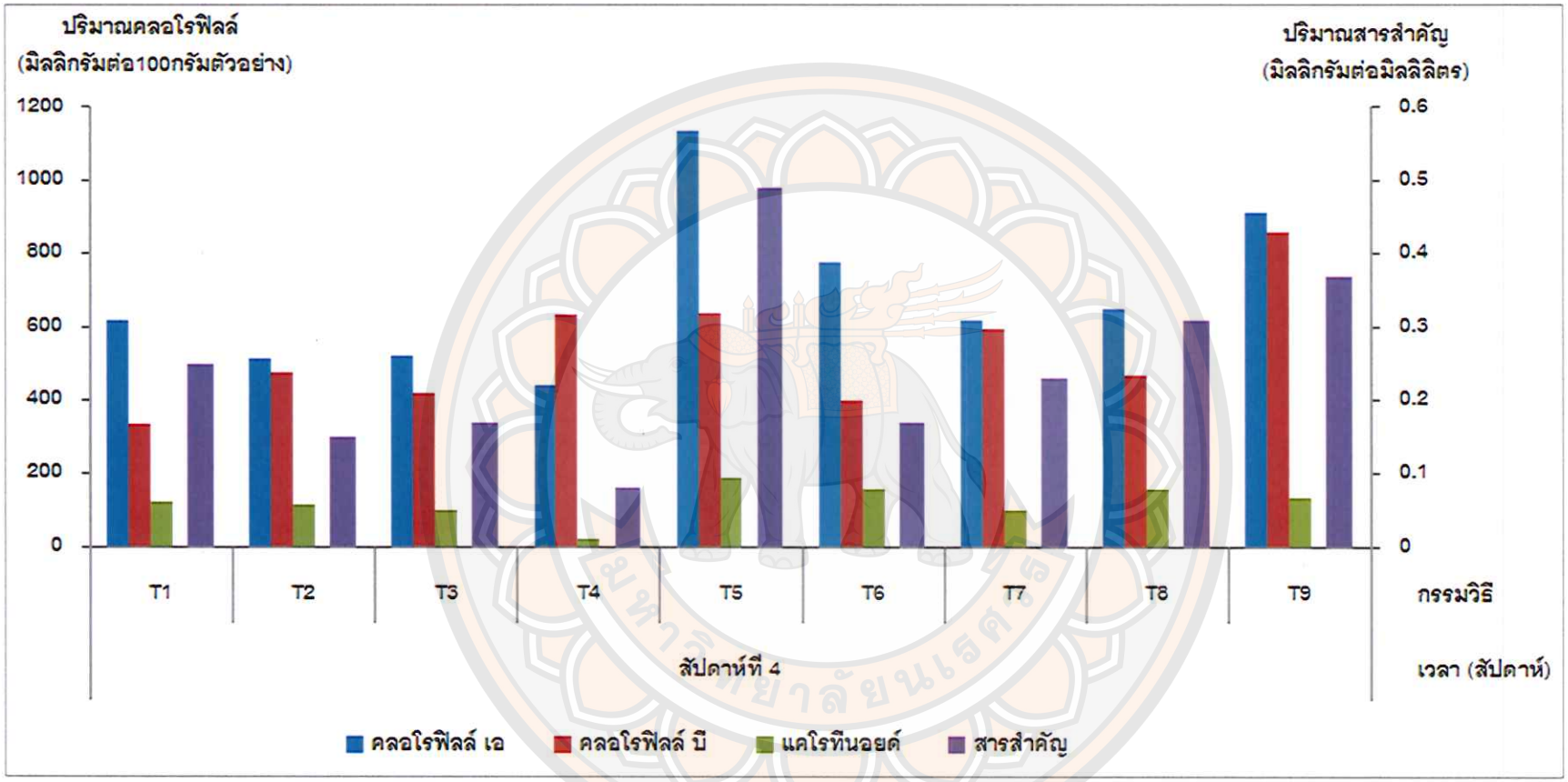
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิเฉลี่ยด้วยวิธีการทางเคมีของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | สารประกอบฟีนอลรวม (กรัมต่อกรัมตัวอย่าง) | สารต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง) | ค่า $IC_{50}$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | สารสำคัญ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| 1 (MS(1962)+$IAA^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.89 ± 0.15 | $4.00^{bc}$ | 2.72 ± 0.98 | $0.25^{bc}$ ± 0.07 |
| 2 (MS(1962)+$IAA^{FB}$(0.0067 mg/l)) | 0.29 ± 0.12 | $3.77^{c}$ | 2.78 ± 0.06 | $0.15^{cd}$ ± 0.01 |
| 3 (MS(1962)+$IAA^{FB}$(0.0134 mg/l)) | 0.11 ± 0.07 | $4.04^{bc}$ ± 0.41 | 2.30 ± 0.64 | $0.17^{cd}$ ± 0.01 |
| 4 (Agar+$IAA^{FB}$(0.0034 mg/l)) | 0.86 ± 0.11 | $4.14^{bc}$ ± 0.52 | 3.74 ± 1.16 | $0.08^{d}$ ± 0.02 |
| 5 (MS(1962)+BA(2.00 mg/l)) | 0.02 ± 0.04 | $3.80^{c}$ ± 0.41 | 4.22 ± 1.36 | $0.49^{a}$ ± 0.04 |
| 6 (MS(1962)+IAA(2.00 mg/l)) | 0.19 ± 0.32 | $4.05^{bc}$ ± 0.51 | 2.56 ± 0.46 | $0.17^{cd}$ ± 0.02 |
| 7 (MS(1962)+BA(0.0067 mg/l)) | 0.55 ± 0.05 | $4.17^{bc}$ ± 0.15 | 2.90 ± 0.36 | $0.23^{bcd}$ ± 0.02 |
| 8 (MS(1962)+IAA(0.0067 mg/l)) | 0.45 ± 0.14 | $4.83^{a}$ ± 0.54 | 2.67 ± 0.52 | $0.31^{bc}$ ± 0.22 |
| 9 (MS(1962)) | 0.22 ± 0.07 | $4.58^{ab}$ ± 0.33 | 2.81 ± 0.50 | $0.37^{ab}$ ± 0.15 |
| $LSD_{0.05}$ | ns | 2.10 | ns | 2.11 |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X}$ ± SD); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ




ภาพ 45 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญและปริมาณคลอโรฟิลล์จากการวิเคราะห์ทางเคมีในสัปดาห์ที่ 4

**การศึกษาผลของปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีน้ำหมักเป็นส่วนประกอบกับสภาพการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในอาหารเหลวสูตร MS(1962) ผสมกับน้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่ผลิตจาก *M. radiotolerans* ED5-9 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อสิตรหรือมีความเข้มข้นของสารประกอบ IAA เท่ากับ 0.0067 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ส่งเสริมการเจริญของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งและให้จำนวนยอด ใบ และราก อยู่ในระดับปานกลางระหว่างมากที่สุดและน้อยที่สุด จากนั้นนำไปเลี้ยงบนชั้นเลี้ยงปกติและบนเครื่องเขย่า เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอาหารเหลวที่ใช้ต่อชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งและสภาพการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง โดยหญ้าปักกิ่งจะมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไปในแต่ละสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีด้วยกันทั้งหมด 8 กรรมวิธี คือ

1. กรรมวิธีที่ 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) ใช้อาหารเหลวสูตร MS(1962) ผสมน้ำหมักจากแบคทีเรียเป็นอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อชิ้น และเพาะเลี้ยงบนชั้นปกติ
2. กรรมวิธีที่ 2 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-เขย่า)ใช้อาหารเหลวสูตร MS(1962) ผสมน้ำหมักจากแบคทีเรียเป็นอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อชิ้น และเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า
3. กรรมวิธีที่ 3 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) ใช้อาหารเหลวสูตร MS(1962) ผสมน้ำหมักจากแบคทีเรียเป็นอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อชิ้น และเพาะเลี้ยงบนชั้นปกติ
4. กรรมวิธีที่ 4 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) ใช้อาหารเหลวสูตร MS(1962) ผสม น้ำหมักจากแบคทีเรียเป็นอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อชิ้น และเพาะเลี้ยงบน เครื่องเขย่า
5. กรรมวิธีที่ 5 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-ตั้ง) ใช้อาหารเหลวสูตร MS(1962) ผสมน้ำหมักจากแบคทีเรียเป็นอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อชิ้น และเพาะเลี้ยงบนชั้นปกติ
6. กรรมวิธีที่ 6 ((MS(1962).+ FB) 2 ml/ชิ้น-เขย่า) ใช้อาหารเหลวสูตร MS(1962) ผสมน้ำหมักจากแบคทีเรียเป็นอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อชิ้น และเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า
7. กรรมวิธีที่ 7 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) ใช้อาหารเหลวสูตร MS(1962) ไม่ผสมน้ำหมักจากแบคทีเรียเป็นอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อชิ้น และเพาะเลี้ยงบนชั้นปกติ

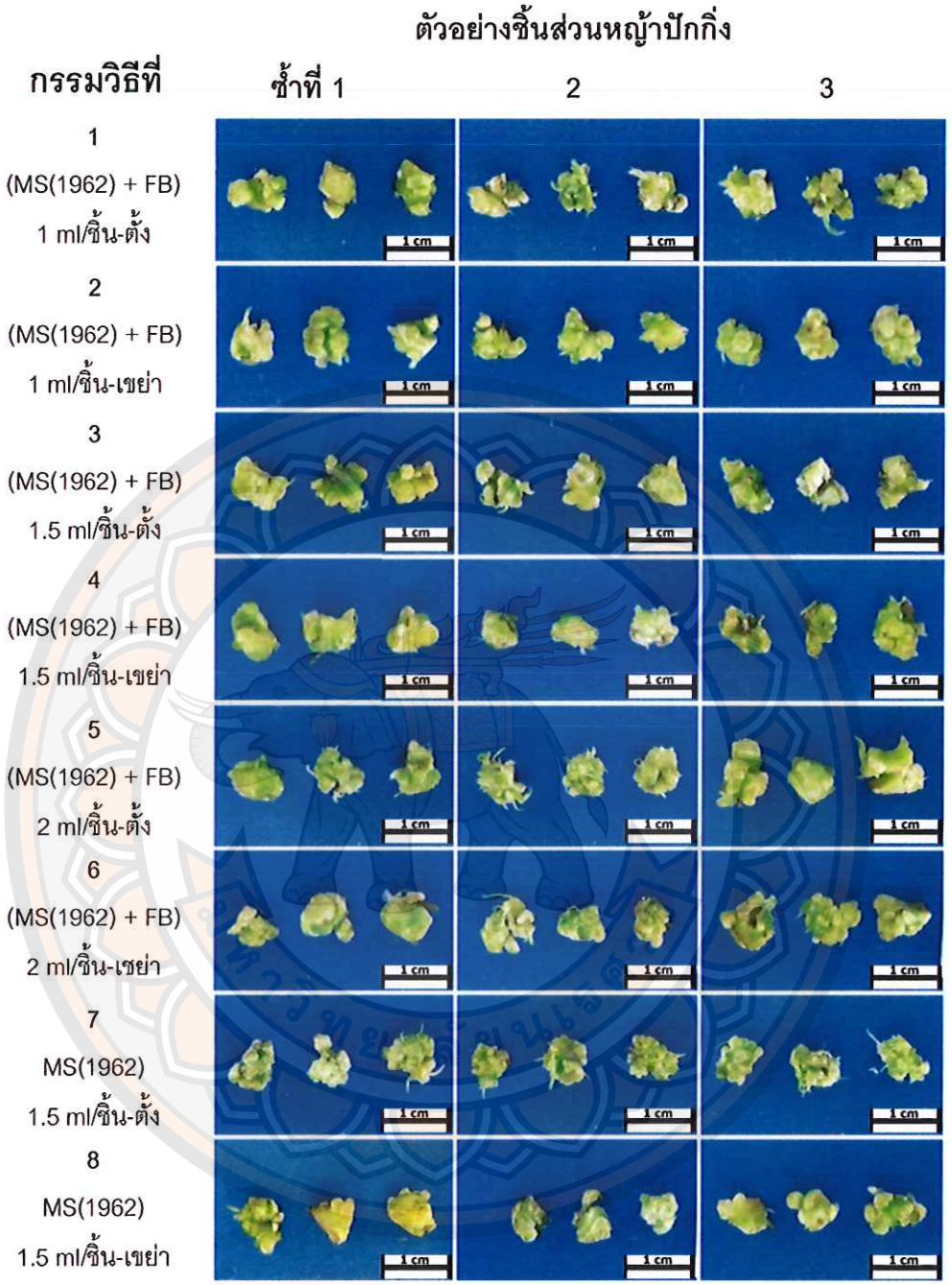
8. กรรมวิธีที่ 8 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) ใช้อาหารเหลวสูตร MS(1962) ไม่ผสมน้ำหมักจากแบคทีเรียเป็นอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อชิ้น และเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า

จากการสังเกตชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละกรรมวิธีมีการเจริญขึ้นเล็กน้อย ไม่พบการเกิดยอด ใบและราก เมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างออกมาเพื่อบันทึกผลการเจริญ พบการเกิดยอดเพียง 1 ยอดในกรรมวิธีที่ 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) และในแต่ละกรรมวิธีไม่พบการเกิดใบ และราก (ดังภาพ 46) เมื่อนำมาวัดขนาดพบว่าความกว้างของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 โดยกรรมวิธีที่ 3 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) มีความกว้างเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.97 ± 0.03 เซนติเมตร และในกรรมวิธีที่ใช้อาหาร MS(1962) ผสมน้ำหมักที่เพาะเลี้ยงในสภาพตั้งบนชั้นจะมีการเจริญของความกว้างดีกว่ากรรมวิธีที่ใช้อาหาร MS(1962) ไม่ผสมน้ำหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (ดังตาราง 20)

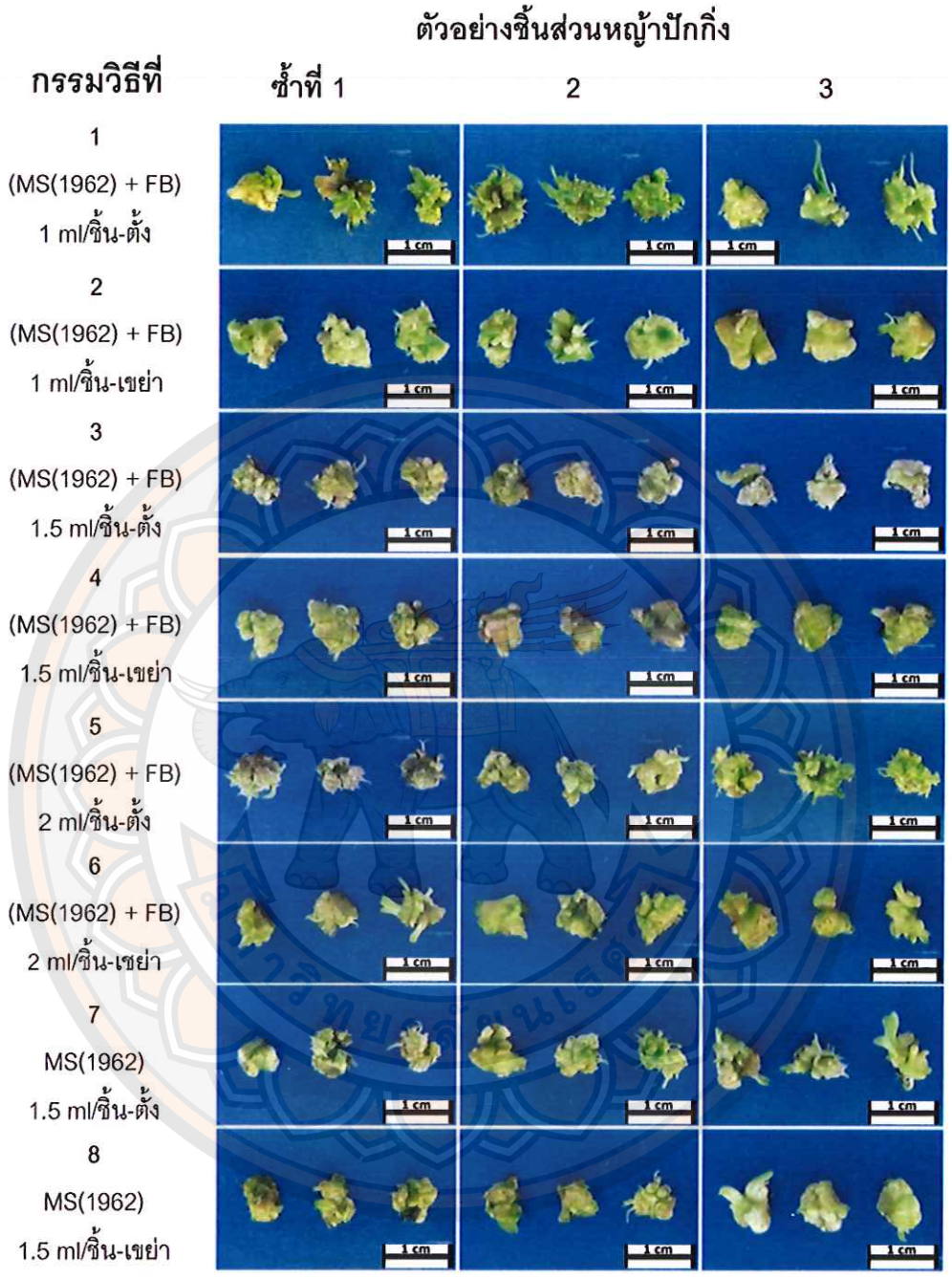
สัปดาห์ที่ 2 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ของทั้งขนาดและน้ำหนัก และมียอดเกิดขึ้นทุกกรรมวิธียกเว้นกรรมวิธีที่ 4 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) (ดังภาพ 47) และในกรรมวิธีที่ 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.39 ± 0.92 ยอดต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดยอด เท่ากับ 88.89 และกรรมวิธีที่ 1 เป็นกรรมวิธีเดียวที่มีใบเกิดขึ้น มีจำนวนใบเฉลี่ย เท่ากับ 1.83 ± 1.04 ใบต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดใบเท่ากับ 44.44 (ดังตาราง 22-23)

สัปดาห์ที่ 3 เป็นสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ของทั้งขนาดและน้ำหนัก พบการเกิดยอดในทุกกรรมวิธีแต่ไม่พบการเกิดใบและราก (ดังภาพ 48) ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) มีขนาดเฉลี่ยและน้ำหนักเฉลี่ยดีที่สุด โดยมีความกว้างและความยาวเฉลี่ย เท่ากับ 0.99 ± 0.08 และ 1.29 ± 0.10 เซนติเมตร มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ย เท่ากับ 0.2562 ± 0.0168 และ 0.0215 ± 0.014 กรัม นอกจากนี้ยังมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 2.89 ± 1.84 ยอดต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 77.78 (ดังตาราง 20-22) เมื่อนำชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งไปวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิด้วยวิธีการทางเคมี พบว่า กรรมวิธีที่ 1 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ เฉลี่ยมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 มีค่าเท่ากับ 218.46 ± 23.81 มิลลิกรัมต่อ100 กรัมตัวอย่าง และให้ค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์เฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 124.08 ± 4.77 และ 52.10 ± 7.82 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง นอกจากนี้

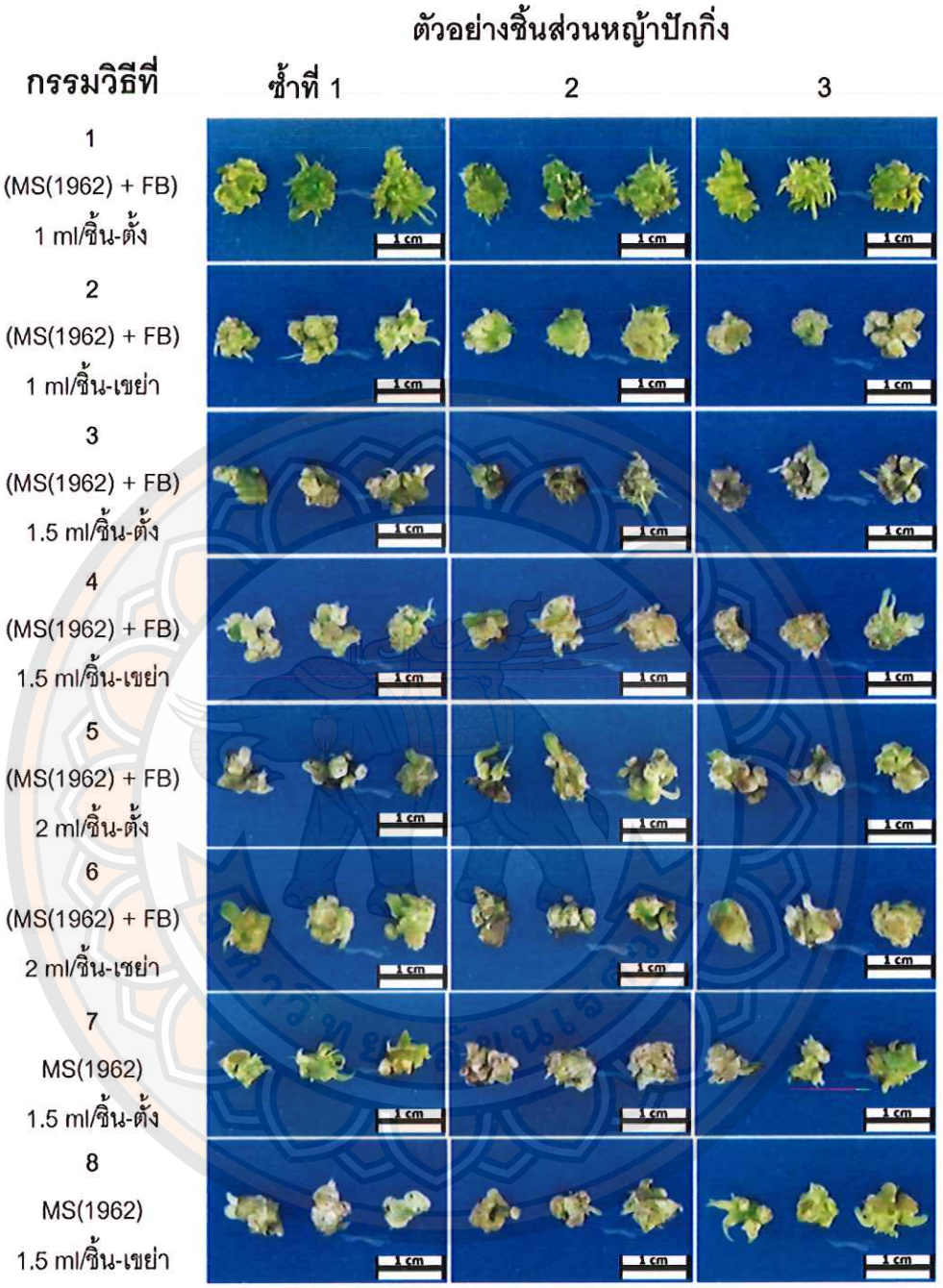
ยังให้ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 0.37 ± 0.12 กรัมต่อกรัมตัวอย่าง ในขณะที่ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมีปริมาณเฉลี่ยสูงสุดอยู่ในกรรมวิธีที่ 5 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-ตั้ง) และกรรมวิธีที่ 8 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) มีค่าเท่ากับ 0.76 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ในส่วนของปริมาณสารสำคัญมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในกรรมวิธีที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.21 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังตาราง 24-25) จากผลในสัปดาห์ที่ 3 จะสังเกตได้ว่าปริมาณอาหารและสภาพการเพาะเลี้ยง รวมถึงน้ำหมักที่ผสมลงในอาหารไม่มีผลชัดเจนต่อขนาดและน้ำหนักของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง รวมไปถึง การการเกิดยอด ใบและรากของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง เช่นเดียวกับผลจากการวิเคราะห์ทางเคมีได้แก่ ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี แคโรทีนอยด์ สารประกอบฟีนอลรวม สารต้านอนุมูลอิสระ และสารสำคัญ เนื่องจากค่าที่ได้ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ในขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นเพียงแนวโน้มว่าถ้าเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในอาหารที่ผสมน้ำหมัก และใช้ปริมาณอาหาร 1.0 มิลลิลิตรต่อชิ้น ในสภาพการเพาะเลี้ยงที่ตั้งไว้บนชั้นจะให้การเจริญที่ดีกว่าในทุกกรรมวิธี




**ภาพ 46 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์**




**ภาพ 47 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์**




**ภาพ 48 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์**

ตาราง 20 ขนาดความกว้างเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ | ความกว้าง (เซนติเมตร) | | | ความยาว (เซนติเมตร) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) | $0.93^{a} \pm 0.13$ | $0.91 \pm 0.10$ | $0.99 \pm 0.08$ | $0.97 \pm 0.09$ | $1.39 \pm 0.05$ | $1.29 \pm 0.10$ |
| 2 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-เขย่า) | $0.76^{b} \pm 0.05$ | $0.77 \pm 0.12$ | $0.84 \pm 0.04$ | $0.90 \pm 0.06$ | $0.99 \pm 0.02$ | $1.01 \pm 0.05$ |
| 3 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | $0.97^{a} \pm 0.03$ | $0.70 \pm 0.06$ | $0.88 \pm 0.13$ | $0.97 \pm 0.03$ | $0.99 \pm 0.05$ | $1.11 \pm 0.20$ |
| 4 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | $0.60^{c} \pm 0.06$ | $0.77 \pm 0.07$ | $0.82 \pm 0.07$ | $0.84 \pm 0.11$ | $0.87 \pm 0.03$ | $1.04 \pm 0.12$ |
| 5 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-ตั้ง) | $0.91^{a} \pm 0.02$ | $0.82 \pm 0.16$ | $0.86 \pm 0.02$ | $0.91 \pm 0.02$ | $1.00 \pm 0.21$ | $1.09 \pm 0.13$ |
| 6 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-เขย่า) | $0.74^{b} \pm 0.04$ | $0.68 \pm 0.11$ | $0.89 \pm 0.08$ | $0.90 \pm 0.12$ | $0.89 \pm 0.08$ | $1.14 \pm 0.08$ |
| 7 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | $0.77^{b} \pm 0.07$ | $0.78 \pm 0.07$ | $0.94 \pm 0.05$ | $0.86 \pm 0.05$ | $1.13 \pm 0.18$ | $1.26 \pm 0.21$ |
| 8 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | $0.64^{bc} \pm 0.04$ | $0.72 \pm 0.05$ | $0.93 \pm 0.18$ | $0.84 \pm 0.08$ | $0.90 \pm 0.10$ | $1.19 \pm 0.12$ |
| $LSD_{0.05}$ | 2.12 | ns | ns | ns | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง 21 น้ำหนักสดเฉลี่ย และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ | น้ำหนักสด (กรัม) | | | น้ำหนักแห้ง (กรัม) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.1283 ± 0.0207 | 0.2286 ± 0.0396 | 0.2562 ± 0.0168 | 0.0106 ± 0.0020 | 0.0195 ± 0.0035 | 0.0215 ± 0.0014 |
| 2 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.1525 ± 0.0004 | 0.1604 ± 0.0220 | 0.0202 ± 0.0463 | 0.0083 ± 0.0073 | 0.0156 ± 0.0021 | 0.0183 ± 0.0029 |
| 3 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.1427 ± 0.0144 | 0.1370 ± 0.0179 | 0.1806 ± 0.0498 | 0.0127 ± 0.0004 | 0.0104 ± 0.0018 | 0.0130 ± 0.0044 |
| 4 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.1113 ± 0.0394 | 0.1323 ± 0.0177 | 0.2099 ± 0.0269 | 0.0096 ± 0.0030 | 0.0113 ± 0.0008 | 0.0204 ± 0.0021 |
| 5 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.1408 ± 0.0140 | 0.1836 ± 0.0557 | 0.1820 ± 0.0290 | 0.0117 ± 0.0013 | 0.0145 ± 0.0063 | 0.0162 ± 0.0039 |
| 6 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.1563 ± 0.0274 | 0.1085 ± 0.0123 | 0.2057 ± 0.0354 | 0.0127 ± 0.0024 | 0.0105 ± 0.0010 | 0.0201 ± 0.0027 |
| 7 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.1326 ± 0.0044 | 0.1521 ± 0.0242 | 0.2121 ± 0.0424 | 0.0105 ± 0.0004 | 0.0121 ± 0.0011 | 0.0189 ± 0.0037 |
| 8 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.1282 ± 0.0102 | 0.1270 ± 0.0305 | 0.2122 ± 0.0326 | 0.0121 ± 0.0007 | 0.0119 ± 0.0026 | 0.0197 ± 0.0027 |
| $LSD_{0.05}$ | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง 22 จำนวนยอดเฉลี่ย และร้อยละการเกิดยอดเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ | จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้น) | | | ร้อยละการเกิดยอด | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 1.00 | 2.39 ± 0.92 | 2.89 ± 1.84 | 33.33 | 88.89 | 77.78 |
| 2 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.00 | 2.00 ± 1.00 | 1.00 | 0.00 | 33.33 | 11.11 |
| 3 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.00 | 1.00 | 1.25 | 0.00 | 11.11 | 33.33 |
| 4 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.00 | 0.00 | 1.67 ± 1.15 | 0.00 | 0.00 | 44.44 |
| 5 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.00 | 3.00 ± 1.41 | 1.17 ± 0.24 | 0.00 | 22.22 | 55.56 |
| 6 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.00 | 1.67 ± 0.58 | 1.11 ± 0.19 | 0.00 | 33.33 | 55.56 |
| 7 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.00 | 1.67 | 2.00 ± 0.94 | 0.00 | 33.33 | 66.67 |
| 8 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.00 | 1.17 ± 0.29 | 1.44 ± 0.77 | 0.00 | 44.44 | 66.67 |
| $LSD_{0.05}$ | - | 2.03 | 2.03 | - | 2.03 | 2.03 |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; - = ไม่ได้ทำการคำนวณ

ตาราง 23 จำนวนใบเฉลี่ย และร้อยละการเกิดใบเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ | จำนวนใบ (ใบต่อชิ้น) | | | ร้อยละการเกิดใบ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.00 | 1.83 ± 1.04 | 0.00 | 0.00 | 44.44 | 0.00 |
| 2 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 3 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 4 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 5 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 6 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 7 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 8 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| $LSD_{0.05}$ | - | - | - | - | - | - |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; - = ไม่ได้ทำการคำนวณ

ตาราง 24 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์เฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี

| กรรมวิธีที่ (n=5) | ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม) | ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม) | แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม) |
|---|---|---|---|
| 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) | $218.46^{a} \pm 23.81$ | $124.08 \pm 4.77$ | $52.10 \pm 7.82$ |
| 2 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-เขย่า) | $86.50^{d} \pm 9.80$ | $97.41 \pm 14.32$ | $13.38 \pm 6.95$ |
| 3 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | $138.89^{bc} \pm 51.98$ | $79.06 \pm 61.10$ | $38.30 \pm 20.66$ |
| 4 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | $83.22^{d} \pm 1.79$ | $92.83 \pm 21.93$ | $19.99 \pm 8.95$ |
| 5 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-ตั้ง) | $111.82^{cd} \pm 21.59$ | $105.29 \pm 14.44$ | $23.97 \pm 5.36$ |
| 6 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-เขย่า) | $93.17^{d} \pm 9.50$ | $107.04 \pm 6.35$ | $21.19 \pm 1.95$ |
| 7 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | $162.89^{b} \pm 31.63$ | $132.23 \pm 60.60$ | $34.18 \pm 20.65$ |
| 8 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | $91.85^{d} \pm 9.90$ | $114.94 \pm 10.74$ | $12.18 \pm 6.24$ |
| $LSD_{0.05}$ | 2.12 | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง 25 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิเฉลี่ยด้วยวิธีการทางเคมีของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | สารประกอบฟีนอลรวม (กรัมต่อกรัมตัวอย่าง) | สารต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง) | ค่า $IC_{50}$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | สารสำคัญ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| 1 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.37 ± 0.12 | $0.50^{c}$ | 20.63 ± 2.86 | 0.11 ± 0.04 |
| 2 ((MS(1962) + FB) 1 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.32 ± 0.10 | $0.51^{c}$ | 21.63 ± 1.59 | 0.19 ± 0.06 |
| 3 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.36 ± 0.11 | $0.74^{ab}$ ± 0.01 | 18.03 ± 5.61 | 0.15 ± 0.02 |
| 4 ((MS(1962) + FB) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.34 ± 0.11 | $0.74^{ab}$ ± 0.02 | 16.73 ± 1.83 | 0.12 ± 0.04 |
| 5 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.32 ± 0.11 | $0.76^{a}$ | 16.14 ± 2.40 | 0.21 ± 0.02 |
| 6 ((MS(1962) + FB) 2 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.30 ± 0.08 | $0.73^{b}$ ± 0.02 | 20.12 ± 5.08 | 0.11 ± 0.01 |
| 7 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-ตั้ง) | 0.25 ± 0.03 | $0.74^{ab}$ ± 0.02 | 12.13 ± 2.53 | 0.00 |
| 8 (MS(1962) 1.5 ml/ชิ้น-เขย่า) | 0.24 ± 0.03 | $0.76^{a}$ ± 0.01 | 13.86 ± 10.23 | 0.11 ± 0.02 |
| $LSD_{0.05}$ | ns | 2.10 | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

**การศึกษาผลของสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของเซลล์ *M. radiotolerans* ED5-9 ที่มีความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA และเอนไซม์ ACC deaminase ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยจุ่มชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เตรียมไว้ในสารละลายเซลล์แบคทีเรียเป็นระยะเวลาแตกต่างกัน ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS(1962) ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กรรมวิธี คือ

1. กรรมวิธีที่ 1 (MS(1962)/Cell 1 min) จุ่มชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในสารละลายเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 1 นาทีก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่ไม่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2. กรรมวิธีที่ 2 (MS(1962)/Cell 3 min) จุ่มชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในสารละลายเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 3 นาทีก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่ไม่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3. กรรมวิธีที่ 3 (MS(1962)/Cell 5 min) จุ่มชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในสารละลายเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 5 นาทีก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่ไม่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

4. กรรมวิธีที่ 4 (MS(1962) + BA(2 mg/l)) ไม่จุ่มชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในสารละลายเซลล์แบคทีเรียและเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่ผสมสารควบคุมการเจริญของพืชชนิด BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

5. กรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + IAA(2 mg/l)) ไม่จุ่มชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในสารละลายเซลล์แบคทีเรียและเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่ผสมสารควบคุมการเจริญของพืชชนิด IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการสังเกตการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละกรรมวิธี พบว่า ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีการเจริญเติบโตและพัฒนาเปลี่ยนแปลง เกิดยอด ใบ และราก ที่แตกต่างกัน โดยในสัปดาห์ที่ 1 ชิ้นส่วนของหญ้าปักกิ่งของทุกกรรมวิธีมีสีเขียวสด มีการเจริญขยายขนาดเล็กน้อย พบการเกิดยอดและใบที่มีขนาดเล็กมาก แต่ไม่พบการเกิดราก (ดังภาพ 49) เมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างมาวัดขนาดและชั่งน้ำหนัก พบว่ากรรมวิธีที่ 4 (MS(1962) + BA(2 mg/l)) มีขนาดความกว้างและความยาวเฉลี่ยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 เท่ากับ 0.87 ± 0.07 และ 1.17 ± 0.11 เซนติเมตร และมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 0.2688 ± 0.0310 และ 0.0164 ± 0.0021 กรัม (ตาราง 26-27 และภาพ 53)

สัปดาห์ที่ 2 ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีสีเขียวเข้มข้น และพบการเกิดยอดและใบในทุกกรรมวิธี ส่วนการเกิดรากพบในกรรมวิธีที่ 2 (MS(1962)/Cell 3 min) และกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + IAA (2 mg/l)) (ดังภาพ 50) เมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างมาวัดขนาดและชั่งน้ำหนัก พบว่ากรรมวิธีที่ 4 (MS(1962) + BA(2 mg/l)) ยังคงมีขนาดความกว้างและความยาวเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.07 ± 0.13 และ 2.10 ± 0.36 เซนติเมตร โดยมีความยาวเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 และมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 0.5253 ± 0.0905 และ 0.0318 ± 0.0052 กรัม โดยน้ำหนักสดเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (ดังตาราง 26-27 และภาพ 53) นอกจากนี้ในกรรมวิธีที่ 4 ยังให้จำนวนยอดและใบเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.78 ± 2.67 ยอดต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 88.89 และ 9.33 ± 3.06 ใบต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดใบเท่ากับ 66.67 จำนวนยอดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ส่วนกรรมวิธีที่ 5 มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 12.00 ± 8.49 รากต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 22.22 (ดังตาราง 28-30 และภาพ 54)

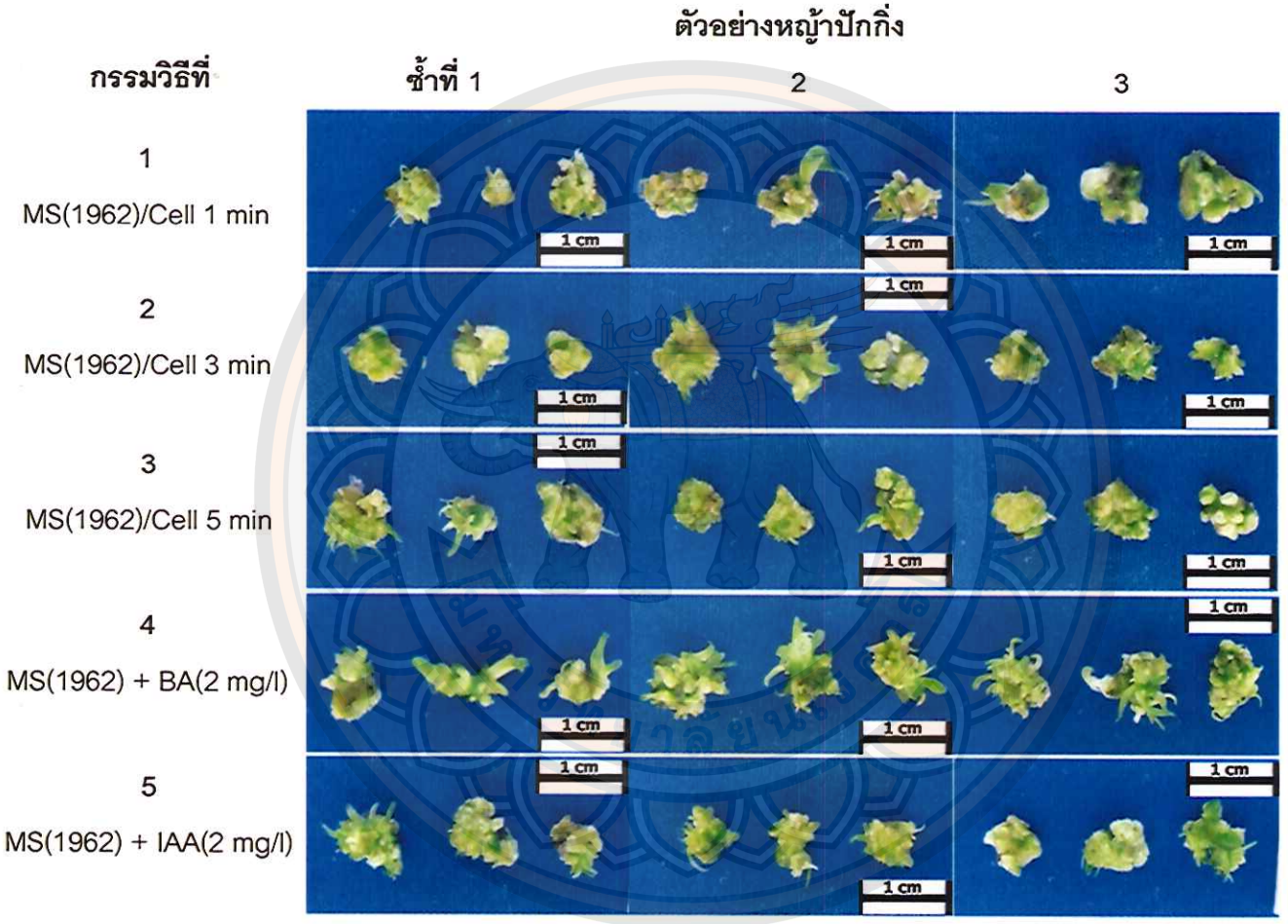
สัปดาห์ที่ 3 ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีสีเขียวเข้มข้น และพบการเกิดยอดและใบในทุกกรรมวิธี โดยกรรมวิธีที่ 4 (MS(1962) + BA(2 mg/l)) มีการเจริญของยอดและใบดีที่สุด ส่วนการเกิดรากพบในกรรมวิธีที่ 2 (MS(1962)/Cell 3 min) กรรมวิธีที่ 3 (MS(1962)/Cell 5 min) และกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + IAA(2 mg/l)) (ดังภาพ 51) เมื่อเก็บตัวอย่างมาวัดขนาดและชั่งน้ำหนัก พบว่ากรรมวิธีที่ 4 ยังคงมีขนาดความกว้างและความยาวเฉลี่ยสูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 เท่ากับ 1.57 ± 0.23 และ 2.57 ± 0.66 เซนติเมตร และมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 เท่ากับ 0.6612 ± 0.0924 และ 0.0416 ± 0.0041 กรัม (ดังตาราง 26-27) นอกจากนี้ในกรรมวิธีที่ 4 ยังให้จำนวนยอดและใบเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.45 ± 1.07 ยอดต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 100 และ 6.05 ± 1.58 ใบต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดใบเท่ากับ 88.89 ส่วนกรรมวิธีที่มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ กรรมวิธีที่ 5 มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 10.50 ± 3.12 รากต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 77.78 และมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.48 ± 0.11 เซนติเมตร (ดังตาราง 28-30 และภาพ 54) ในสัปดาห์ที่ 3 ใบของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีขนาดที่สามารถใช้เครื่อง SPAD-502 วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ได้ โดยกรรมวิธีที่ 4 มีปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมสูงสุด เท่ากับ 1.070 ± 0.030, 0.342 ± 0.009 และ 1.403 ± 0.039 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ โดยปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วัดได้ของกรรมวิธีที่ 4 และกรรมวิธีที่ 1

ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (ดังตาราง 31 และภาพ 55)

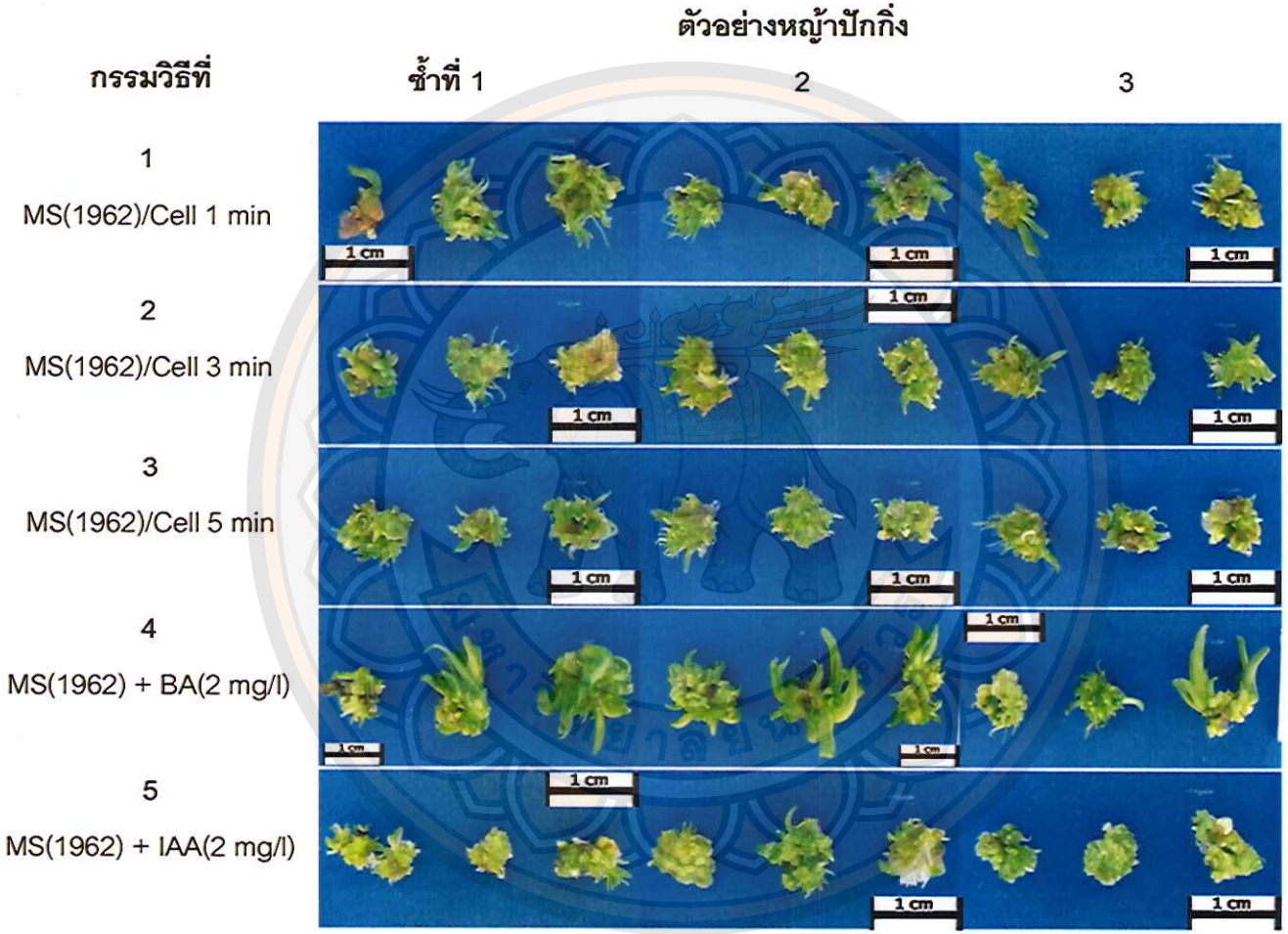
สัปดาห์ที่ 4 ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในทุกกรรมวิธีมีการเจริญเติบโตเกิดยอดและใบ โดยกรรมวิธีที่ 4 (MS(1962) + BA(2 mg/l)) มีการเจริญเติบโตของยอดและใบดีที่สุดแต่ไม่พบการเกิดรากในกรรมวิธีนี้ ในขณะที่อีก 4 กรรมวิธีที่เหลือพบการเกิดราก (ดังภาพ 52) เมื่อเก็บตัวอย่างมาวัดขนาดและชั่งน้ำหนัก พบว่ากรรมวิธีที่ 4 ยังคงมีมีขนาดความกว้างและความยาวเฉลี่ยสูงที่สุดอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 2.10 ± 0.69 และ 3.77 ± 1.25 เซนติเมตร และมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุด โดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 เท่ากับ 0.9497 ± 0.3843 และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.0590 ± 0.0203 กรัม นอกจากนี้ในกรรมวิธีที่ 4 ยังให้จำนวนยอดและใบเฉลี่ยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05เท่ากับ 9.39 ± 4.10 ยอดต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 88.89 และ 17.17 ± 8.69 ใบต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดใบเท่ากับ 88.89 ส่วนกรรมวิธีที่มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ กรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + IAA(2 mg/l)) มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 13.67 ± 6.11 รากต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 100.00 และมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.64 ± 0.05 เซนติเมตร แต่กรรมวิธีที่ 3 (MS(1962)/Cell 5 min) มีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 0.71 ± 0.26 เซนติเมตร (ดังตาราง 28-30 และภาพ 54) เมื่อวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยเครื่อง SPAD-502 พบว่ากรรมวิธีที่ 4 มีปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมสูงสุดเท่ากับ 1.153 ± 0.045, 0.368 ± 0.014 และ 1.513 ± 0.058 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ (ดังตาราง 31 และภาพ 55) เมื่อนำชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งไปวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิด้วยวิธีการทางเคมี พบว่ากรรมวิธีที่ 4 ให้ปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณสารสำคัญสูงสุดเท่ากับ 640.95 ± 1.44 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างและ 0.70 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรรมวิธีที่ 2 (MS(1962)/Cell 3 min) ให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด เท่ากับ 366.92 ± 0.52 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และ 0.93 ± 0.10 กรัมต่อกรัมตัวอย่าง กรรมวิธีที่ 3 ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 111.08 ± 0.45 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง (ดังตาราง 32-33 และภาพ 56)

เมื่อพิจารณาดูจากข้อมูลที่ได้ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 4 (MS(1962) + BA(2 mg/l)) มีการเจริญเติบโตและการพัฒนาดีที่สุด มีจำนวนยอดและใบสูงสุด แต่ไม่พบการเกิดราก ในขณะที่อีก 4 กรรมวิธีการเจริญเติบโตและการพัฒนาของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

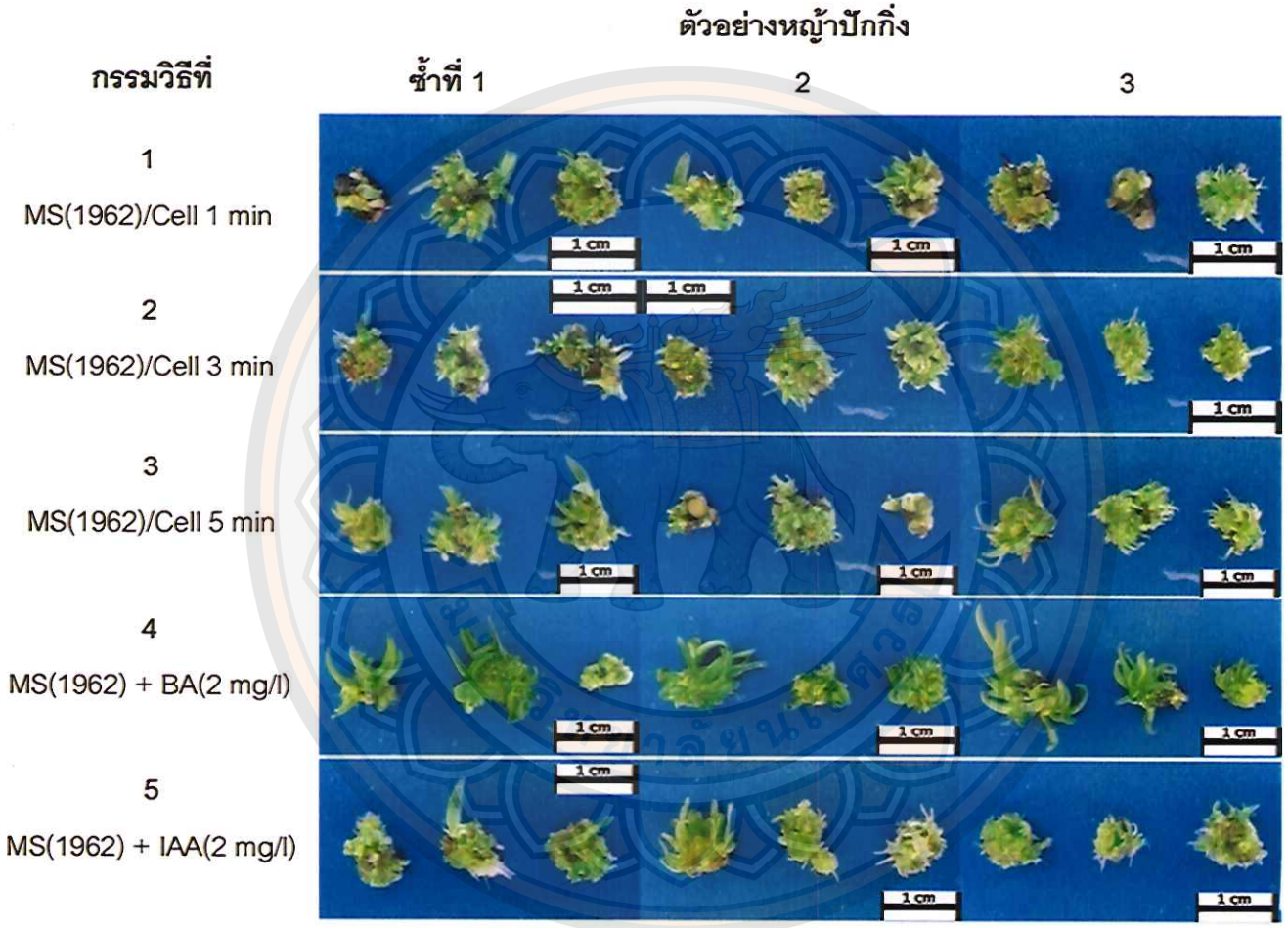
ถ้าพิจารณาเฉพาะกลุ่มของกรรมวิธีที่ใช้ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มเซลล์แบคทีเรียเทียบกับกรรมวิธีที่ 5 ที่ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งไม่จุ่มเซลล์แบคทีเรียและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่จุ่มเซลล์แบคทีเรียค่อนข้างที่จะมีการเจริญของยอดและใบที่ดีกว่าชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 5 โดยกรรมวิธีที่ 3 (MS(1962)/Cell 5 min) มีจำนวนยอดเฉลี่ย เท่ากับ 6.00 ± 1.00 ยอดต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดยอดเท่ากับ 100.00 และกรรมวิธีที่ 1 (MS(1962)/Cell 1 min) มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 5.94 ± 1.23 ใบต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดใบเท่ากับ 66.67 ขณะที่กรรมวิธีที่ 5 มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.11 ± 1.39 ยอดต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดยอด เท่ากับ 100.00 และจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 4.00 ± 2.83 ใบต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดใบเท่ากับ 44.44 แต่ในกรรมวิธีที่ 5 มีจำนวนรากสูงที่สุดเท่ากับ 13.67 ± 6.11 รากต่อชิ้น ที่ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 100.00 และมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.64 ± 0.05 เซนติเมตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ 3 ที่มีจำนวนรากเฉลี่ย เท่ากับ 12.00 ± 3.43 รากต่อชิ้นที่ร้อยละการเกิดรากเท่ากับ 77.78 และมีความยาวรากเฉลี่ย เท่ากับ 0.71 ± 0.26 เซนติเมตร ซึ่งชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์ *M. radiotolerans* ED5-9 มีการเจริญเติบโตและพัฒนาใกล้เคียงกับการเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA



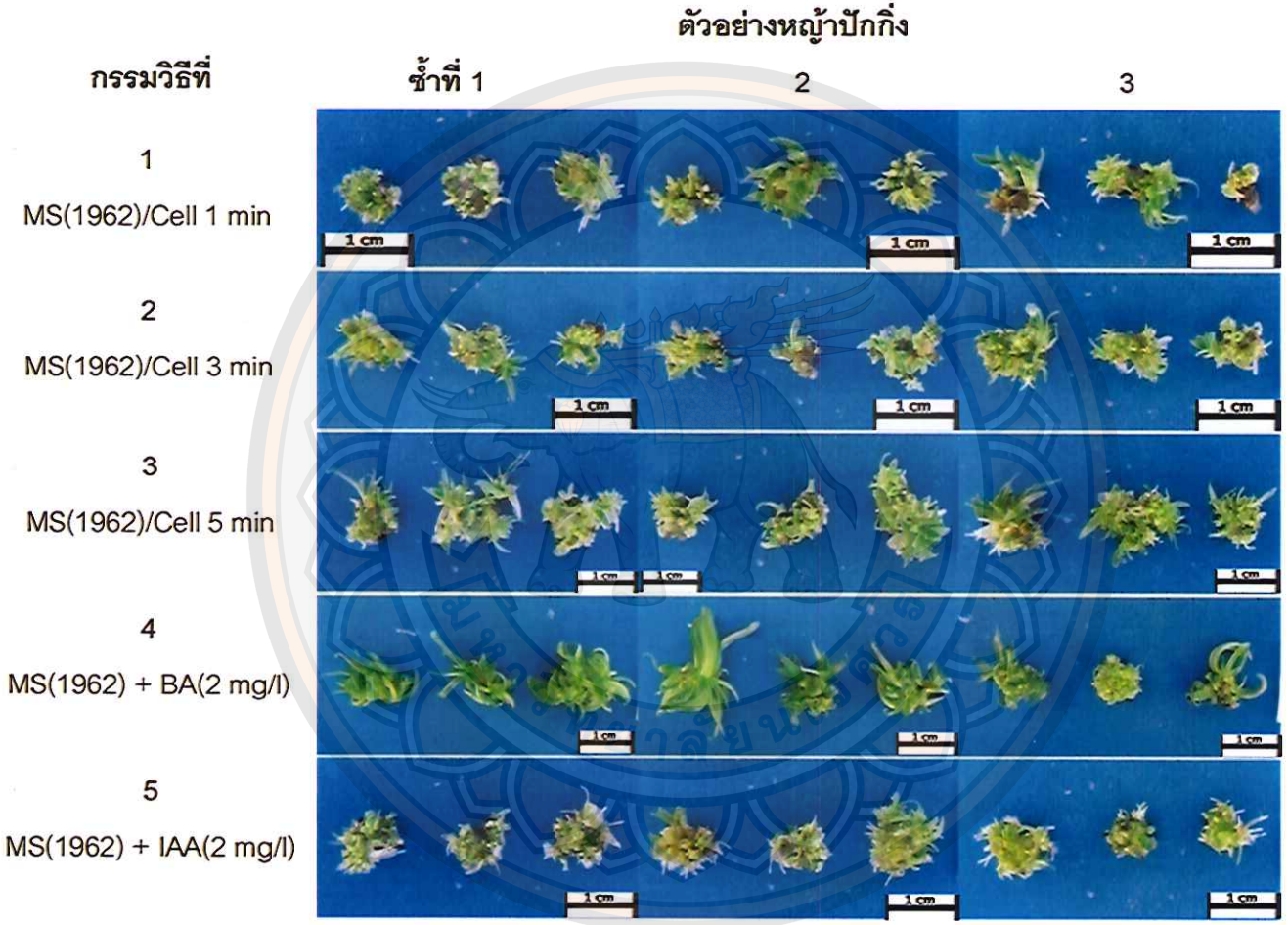

ภาพ 49 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์




ภาพ 50 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์




ภาพ 51 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์




ภาพ 52 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 26 ขนาดความกว้างเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=3) | ความกว้าง (เซนติเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ความยาว (เซนติเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 MS(1962)/Cell 1 min | $0.70^{b} \pm 0.07$ | $0.93 \pm 0.06$ | $0.93^{b} \pm 0.04$ | $1.17^{b} \pm 0.15$ | $0.87^{b} \pm 0.12$ | $1.50^{b} \pm 0.26$ | $1.33^{b} \pm 0.19$ | $1.70^{b} \pm 0.46$ |
| 2 MS(1962)/Cell 3 min | $0.63^{b} \pm 0.07$ | $0.93 \pm 0.11$ | $1.00^{b}$ | $1.17^{b} \pm 0.06$ | $0.77^{b} \pm 0.17$ | $1.30^{b} \pm 0.26$ | $1.43^{b} \pm 0.22$ | $2.00^{b} \pm 0.24$ |
| 3 MS(1962)/Cell 5 min | $0.67^{b} \pm 0.07$ | $1.03 \pm 0.16$ | $0.93^{b} \pm 0.12$ | $1.37^{b} \pm 0.34$ | $0.80^{b} \pm 0.04$ | $1.37^{b} \pm 0.15$ | $1.27^{b} \pm 0.24$ | $2.23^{b} \pm 0.25$ |
| 4 MS(1962) + BA(2 mg/l) | $0.87^{a} \pm 0.07$ | $1.07 \pm 0.13$ | $1.57^{a} \pm 0.23$ | $2.10^{a} \pm 0.69$ | $1.17^{a} \pm 0.11$ | $2.10^{a} \pm 0.36$ | $2.57^{a} \pm 0.66$ | $3.77^{a} \pm 1.25$ |
| 5 MS(1962) + IAA(2 mg/l) | $0.73^{b} \pm 0.08$ | $0.90 \pm 0.16$ | $0.93^{b} \pm 0.04$ | $1.13^{b} \pm 0.10$ | $0.93^{b} \pm 0.06$ | $1.07^{b} \pm 0.21$ | $1.27^{b} \pm 0.10$ | $1.50^{b} \pm 0.32$ |
| $LSD_{0.05}$ | 2.23 | ns | 2.23 | 2.23 | 2.23 | 2.23 | 2.23 | 2.23 |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

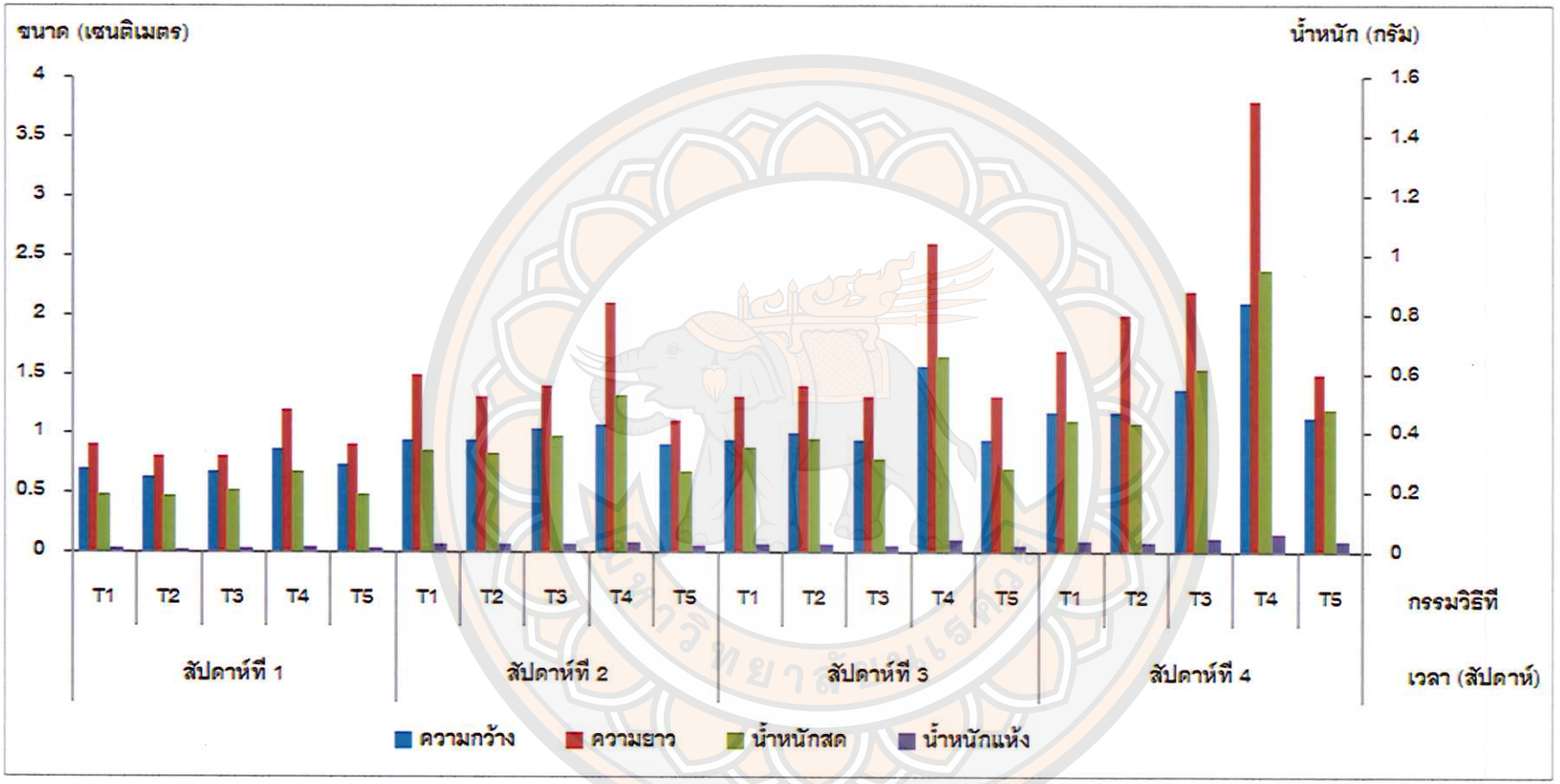
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง 27 น้ำหนักสดเฉลี่ย และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=3) | น้ำหนักสด (กรัม) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | น้ำหนักแห้ง (กรัม) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 MS(1962)/Cell 1 min | 0.1924±0.0323 | 0.3407$^{b}$±0.1138 | 0.3524$^{bc}$±0.0033 | 0.4417$^{b}$±0.1152 | 0.0134±0.0032 | 0.0260±0.0071 | 0.0276$^{b}$±0.0005 | 0.0355±0.0101 |
| 2 MS(1962)/Cell 3 min | 0.1863±0.0319 | 0.3322$^{b}$±0.0620 | 0.3770$^{b}$±0.0416 | 0.4307$^{b}$±0.1086 | 0.0097±0.0055 | 0.0249±0.0036 | 0.0278$^{b}$±0.0011 | 0.0306±0.0051 |
| 3 MS(1962)/Cell 5 min | 0.2092±0.0551 | 0.3896$^{ab}$±0.0781 | 0.3124$^{bc}$±0.0534 | 0.6168$^{ab}$±0.0515 | 0.0144±0.0042 | 0.0270±0.0057 | 0.0240$^{bc}$±0.0044 | 0.0460±0.0054 |
| 4 MS(1962) + BA(2 mg/l) | 0.2688±0.0310 | 0.5253$^{a}$±0.0905 | 0.6612$^{a}$±0.0924 | 0.9497$^{a}$±0.3843 | 0.0164±0.0021 | 0.0318±0.0052 | 0.0416$^{a}$±0.0041 | 0.0590±0.0203 |
| 5 MS(1962) + IAA(2 mg/l) | 0.1910±0.0267 | 0.2705$^{b}$±0.0632 | 0.2805$^{c}$±0.0073 | 0.4771$^{b}$±0.0721 | 0.0133±0.0019 | 0.0201±0.0045 | 0.0207$^{c}$±0.0005 | 0.0365±0.0044 |
| $LSD_{0.05}$ | ns | 2.23 | 2.23 | 2.23 | ns | ns | 2.23 | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ




ภาพ 53 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเฉลี่ย และน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละกรรมวิธีกับระยะเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 28 จำนวนยอดเฉลี่ย และร้อยละการเกิดยอดเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้น) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ร้อยละการเกิดยอด ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 MS(1962)/Cell 1 min | 0.00 | $4.95^{ab} \pm 0.63$ | $3.17 \pm 1.18$ | $4.22^{b} \pm 2.12$ | 0.00 | $88.89^{a}$ | 66.67 | 88.89 |
| 2 MS(1962)/Cell 3 min | 0.00 | $2.94^{bc} \pm 1.23$ | $3.89 \pm 0.19$ | $3.89^{b} \pm 0.51$ | 0.00 | $88.89^{a}$ | 77.78 | 100.00 |
| 3 MS(1962)/Cell 5 min | 0.00 | $3.50^{bc} \pm 1.09$ | $2.44 \pm 1.26$ | $6.00^{ab} \pm 1.00$ | 0.00 | $88.89^{a}$ | 77.78 | 100.00 |
| 4 MS(1962) + BA(2 mg/l) | 0.00 | $6.78^{a} \pm 2.67$ | $6.45 \pm 1.07$ | $9.39^{a} \pm 4.10$ | 0.00 | $88.89^{a}$ | 100.00 | 88.89 |
| 5 MS(1962) + IAA(2 mg/l) | 0.00 | $2.00^{c}$ | $3.33 \pm 2.84$ | $3.11^{b} \pm 1.39$ | 0.00 | $33.33^{b}$ | 66.67 | 100.00 |
| $LSD_{0.05}$ | - | 2.26 | ns | 2.23 | - | 2.23 | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; - = ไม่ได้ทำการคำนวณ

ตาราง 29 จำนวนใบเฉลี่ย และร้อยละการเกิดใบเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | จำนวนใบ (ใบต่อชิ้น) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ร้อยละการเกิดใบ ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 MS(1962)/Cell 1 min | 0.00 | 2.25 ± 1.06 | 1.50 ± 0.71 | $5.94^{b}$ ± 1.23 | 0.00 | 44.45 | 22.22 | 66.67 |
| 2 MS(1962)/Cell 3 min | 0.00 | 2.50 | 4.25 ± 3.18 | $4.28^{b}$ ± 2.10 | 0.00 | 22.22 | 33.33 | 77.78 |
| 3 MS(1962)/Cell 5 min | 0.00 | 2.00 | 2.67 | $5.89^{b}$ ± 0.84 | 0.00 | 33.33 | 33.33 | 88.89 |
| 4 MS(1962) + BA(2 mg/l) | 0.00 | 9.33 ± 3.06 | 6.05 ± 1.58 | $17.17^{a}$ ± 8.69 | 0.00 | 66.67 | 88.89 | 88.89 |
| 5 MS(1962) + IAA(2 mg/l) | 0.00 | 2.00 | 3.67 ± 2.31 | $4.00^{b}$ ± 2.83 | 0.00 | 11.11 | 44.44 | 44.44 |
| $LSD_{0.05}$ | - | ns | ns | 2.26 | - | ns | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

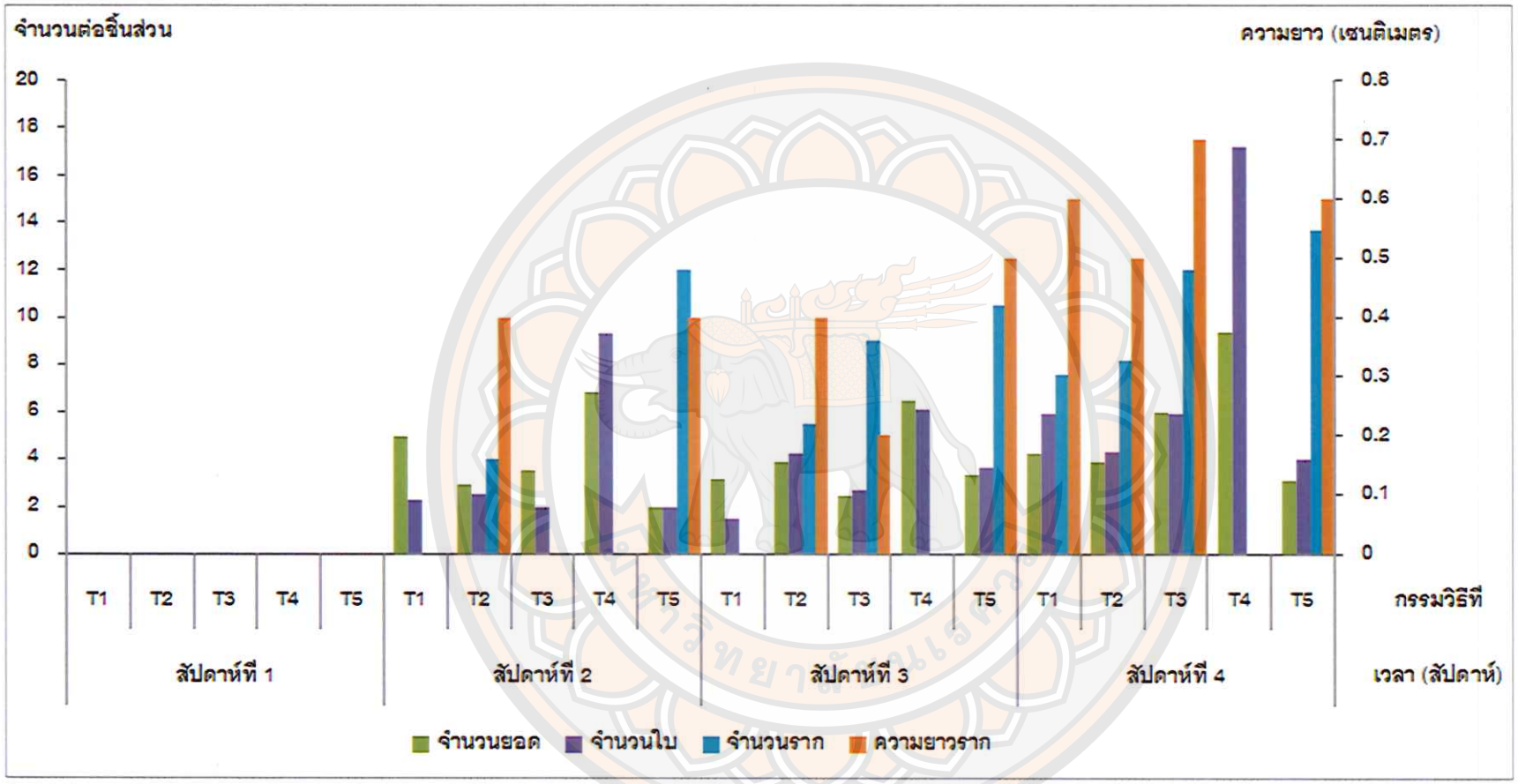
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X}$ ± SD); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; - = ไม่ได้ทำการคำนวณ

ตาราง 30 จำนวนรากเฉลี่ย ร้อยละการเกิดรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในแต่ละสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | จำนวนราก (รากต่อชิ้น) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ร้อยละการเกิดราก ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | | ความยาวราก (เซนติเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 MS(1962)/Cell 1 min | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 7.56±0.96 | 0.00 | 0.00 | 0.00$^{b}$ | 55.55$^{b}$ | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.64±0.05 |
| 2 MS(1962)/Cell 3 min | 0.00 | 4.00 | 5.50±3.50 | 8.17±2.02 | 0.00 | 11.11 | 55.56$^{a}$ | 77.78$^{ab}$ | 0.00 | 0.40 | 0.38±0.14 | 0.46±0.14 |
| 3 MS(1962)/Cell 5 min | 0.00 | 0.00 | 9.00 | 12.00± 3.46 | 0.00 | 0.00 | 11.11$^{b}$ | 77.78$^{ab}$ | 0.00 | 0.00 | 0.20 | 0.71±0.26 |
| 4 MS(1962) + BA(2 mg/l) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00$^{b}$ | 0.00$^{c}$ | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 5 MS(1962) + IAA(2 mg/l) | 0.00 | 12.00±8.49 | 10.50±3.12 | 13.67±6.11 | 0.00 | 22.22 | 77.78$^{a}$ | 100.00$^{a}$ | 0.00 | 0.40±0.14 | 0.48±0.11 | 0.64±0.05 |
| $LSD_{0.05}$ | - | - | ns | ns | - | ns | 2.23 | 2.23 | - | - | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; - = ไม่ได้ทำการคำนวณ



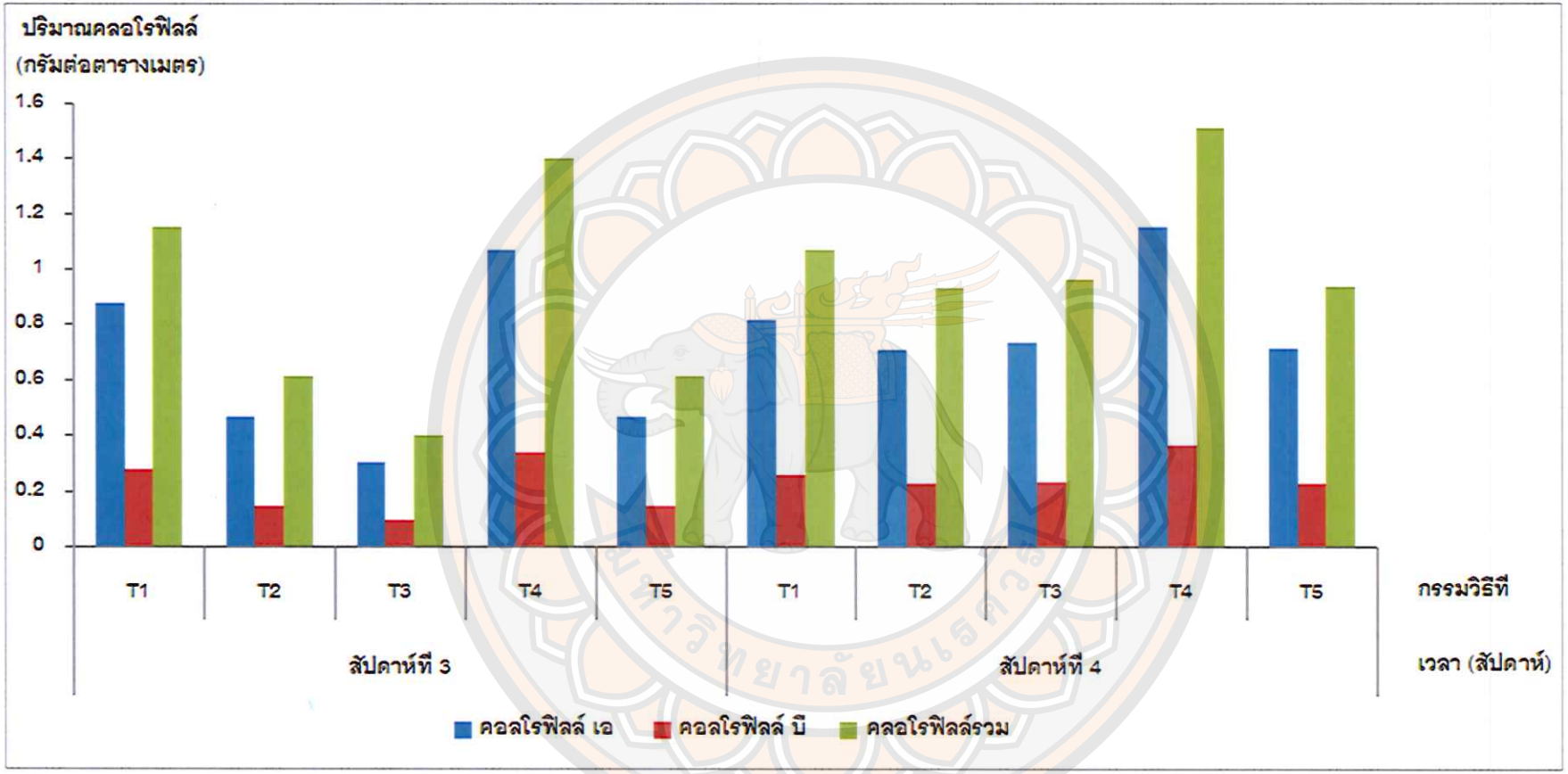

ภาพ 54 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเฉลี่ยของยอด ใบ และราก รวมทั้งความยาวรากในแต่ละกรรมวิธีกับระยะเวลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 31 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 ในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4

| กรรมวิธีที่ (n=5) | ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (กรัมต่อตารางเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (กรัมต่อตารางเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | | ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (กรัมต่อตารางเมตร) ระยะเวลา (สัปดาห์ที่) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 |
| 1 MS(1962)/Cell 1 min | $0.880^{a} \pm 0.388$ | $0.818 \pm 0.118$ | $0.281 \pm 0.124$ | $0.261 \pm 0.038$ | $1.154 \pm 0.508$ | $1.072 \pm 0.154$ |
| 2 MS(1962)/Cell 3 min | $0.468^{b} \pm 0.119$ | 0.711 | $0.149 \pm 0.038$ | 0.227 | $0.614 \pm 0.156$ | 0.933 |
| 3 MS(1962)/Cell 5 min | $0.306^{b}$ | $0.738 \pm 0.551$ | 0.098 | $0.236 \pm 0.176$ | 0.402 | $0.967 \pm 0.722$ |
| 4 MS(1962) + BA(2 mg/l) | $1.070^{a} \pm 0.030$ | $1.153 \pm 0.045$ | $0.342 \pm 0.009$ | $0.368 \pm 0.014$ | $1.403 \pm 0.039$ | $1.513 \pm 0.058$ |
| 5 MS(1962) + IAA(2 mg/l) | $0.468^{b} \pm 0.068$ | 0.718 | $0.149 \pm 0.022$ | 0.229 | $0.614 \pm 0.090$ | 0.942 |
| $LSD_{0.05}$ | 2.57 | ns | 2.57 | ns | 2.57 | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; - = ไม่ได้ทำการคำนวณ




ภาพ 55 กราฟปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วัดด้วยเครื่อง SPAD-502 ในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4

ตาราง 32 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์เฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี

| กรรมวิธีที่ (n=5) | ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม) | ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม) | แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม) |
|---|---|---|---|
| 1 MS(1962)/Cell 1 min | 544.58 ± 1.80 | 439.63 ± 1.02 | 84.12 ± 0.40 |
| 2 MS(1962)/Cell 3 min | 488.24 ± 0.51 | 366.93 ± 0.52 | 88.90 ± 0.08 |
| 3 MS(1962)/Cell 5 min | 536.82 ± 1.07 | 337.44 ± 1.05 | 111.08 ± 0.45 |
| 4 MS(1962) + BA(2 mg/l) | 640.95 ± 1.44 | 422.23 ± 1.13 | 107.78 ± 0.17 |
| 5 MS(1962) + IAA(2 mg/l) | 428.78 ± 0.73 | 306.60 ± 1.74 | 82.82 ± 0.26 |
| $LSD_{0.05}$ | ns | ns | ns |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

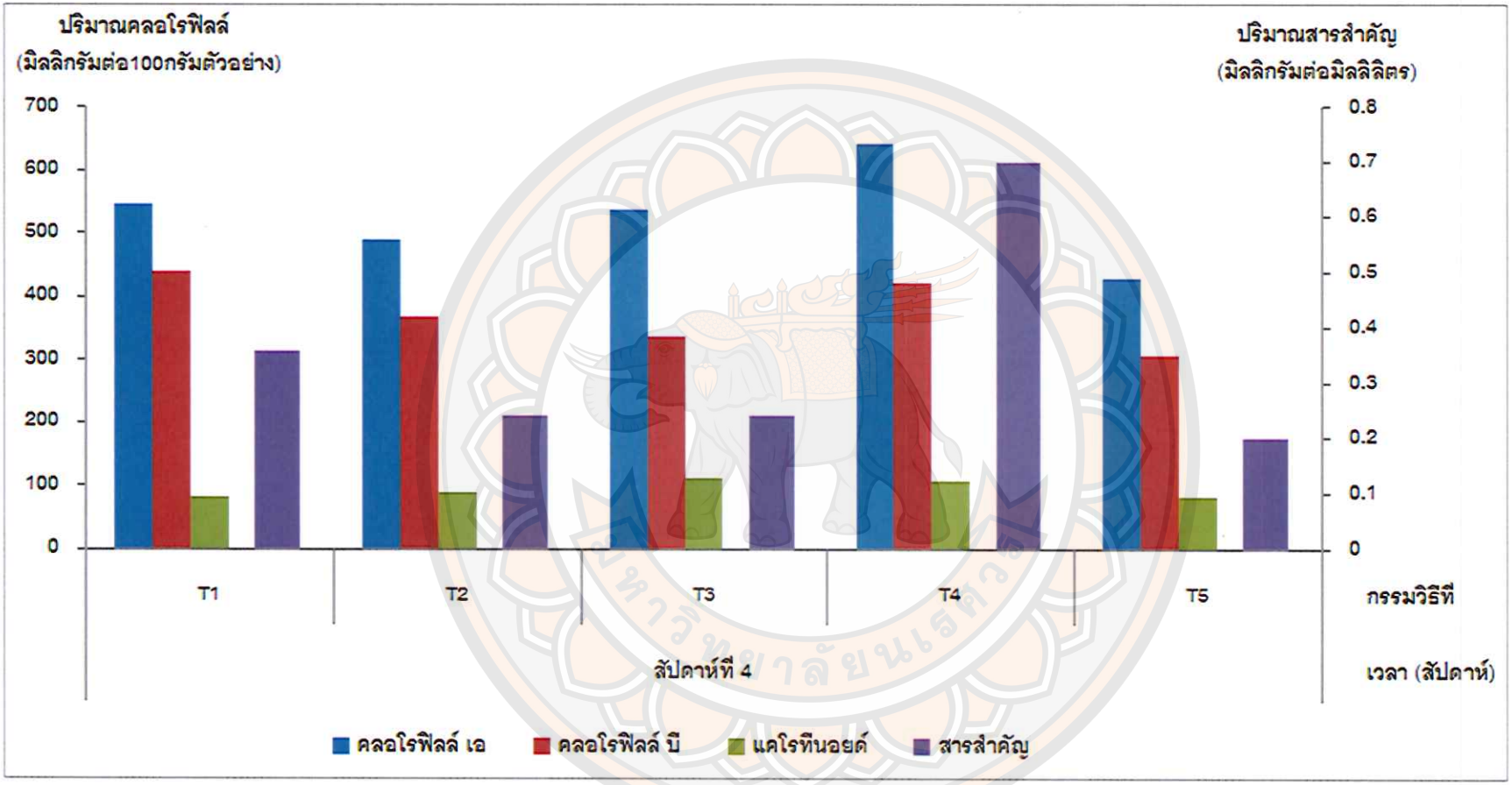
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง 33 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิเฉลี่ยด้วยวิธีการทางเคมีของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

| กรรมวิธีที่ (n=5) | สารประกอบฟีนอลรวม (กรัมต่อกรัมตัวอย่าง) | สารต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง) | ค่า $IC_{50}$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | สารสำคัญ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| 1 MS(1962)/Cell 1 min | $0.71^{ab} \pm 0.17$ | $1.45 \pm 0.13$ | $9.68 \pm 4.66$ | $0.36^{b} \pm 0.09$ |
| 2 MS(1962)/Cell 3 min | $0.93^{a} \pm 0.10$ | $1.49 \pm 0.02$ | $8.17 \pm 0.18$ | $0.24^{c} \pm 0.04$ |
| 3 MS(1962)/Cell 5 min | $0.68^{ab} \pm 0.23$ | $1.48 \pm 0.05$ | $7.22 \pm 1.37$ | $0.24^{c} \pm 0.06$ |
| 4 MS(1962) + BA(2 mg/l) | $0.53^{b} \pm 0.09$ | $1.44 \pm 0.04$ | $8.25 \pm 2.95$ | $0.70^{a} \pm 0.06$ |
| 5 MS(1962) + IAA(2 mg/l) | $0.53^{b} \pm 0.10$ | $1.47 \pm 0.02$ | $6.62 \pm 0.71$ | $0.20^{c} \pm 0.03$ |
| $LSD_{0.05}$ | 2.228 | ns | ns | 2.23 |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์แสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$); ns (non-significant) = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ




ภาพ 56 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญและปริมาณคลอโรฟิลล์จากการวิเคราะห์ทางเคมีในสัปดาห์ที่ 4

# บทที่ 5

# บทสรุป

## สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาในแต่ละการทดลองสามารถสรุปได้ ดังนี้

1. **การแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากใบหญ้าปักกิ่ง**

ปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* กลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* และกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* มีปริมาณเท่ากับ $6.08 \times 10^5$ และ $2.50 \times 10^3$ cfu ต่อกรัมของใบหญ้าปักกิ่ง ตามลำดับ และสามารถแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากใบของหญ้าปักกิ่งได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลท แบ่งเป็น epiphytic *Methylobacterium* จำนวน 40 ไอโซเลทและ endophytic *Methylobacterium* จำนวน 34 ไอโซเลท

2. **การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบพืชปักกิ่ง**

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลทมีโคโลนีมีสีชมพูติดสีแกรมลบและสร้าง PHB สะสมไว้ภายในเซลล์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 12 กลุ่ม เมื่อทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนอาหารที่ไม่มีความเข้มข้นของเกลือ ให้ผลการทดสอบ catalase, oxidase, motility เป็นผลบวก และผลการสอบ indole, MR-VP, $H_2S$, การย่อยสลายแป้ง เจลาติน เคซีน และเม็ดเลือดแดง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ ส่วนความสามารถในการใช้ citrate และการสร้างเอนไซม์ urease ให้ผลการทดสอบที่สามารถแบ่งกลุ่มได้ 4 กลุ่ม คือ citrate (+) urease (+) จำนวน 47 ไอโซเลท citrate (+) urease (-) จำนวน 4 ไอโซเลท citrate (-) urease (+) จำนวน 22 ไอโซเลท และ citrate (-) urease (-) จำนวน 1 ไอโซเลท ทั้งนี้จะพบโคโลนีกลุ่ม A, B, C และ D ที่ให้ผลการทดสอบ citrate (+) urease (+) ได้เป็นส่วนใหญ่ทั้งในแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* และ endophytic *Methylobacterium*

**3. การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้**

แบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* และแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ในอาหาร LNM ที่เติมและไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ IAA ในน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* จำนวน 40 ไอโซเลทในอาหาร LNM ทั้งที่เติมและไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน พบว่ามีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.52 - 2.40 และ 0.63 – 2.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารประกอบ IAA ในน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* จำนวน 34 ไอโซเลทในอาหาร LNM ทั้งที่เติมและไม่เติมแอล-ทริปโตเฟนมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.56 - 2.57 และ 0.94 – 3.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในน้ำหมักจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* ไอโซเลท ED5-9 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ดีที่สุด โดยมีความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในน้ำหมักเท่ากับ 3.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป และเมื่อนำไอโซเลท ED5-9 ส่งไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยา โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนบนยีน 16S rDNA ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กรุงเทพฯ พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *M. radiotolerans* JCM 2831 (T) โดยมีค่าร้อยละการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 100

**4. การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก**

จากการนำน้ำหมักของแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* ที่มีความสามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไปทั้งหมด 18 ไอโซเลท คือ ED1-2, ED1-9, ED1-10, ED2-3, ED2-5, ED2-6, ED2-8, ED2-11, ED3-1, ED3-2, ED3-5, ED3-7, ED3-9, ED4-4, ED4-5, ED5-2, ED5-6 และ ED5-9 มาทำการวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของไซโตไคนินระหว่าง 0.14 $\pm$ 0.58 ถึง 1.22 $\pm$ 0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำน้ำหมักไปวิเคราะห์ต่อด้วยรงคเลขผิวบาง พบว่าค่า Rf ของทั้ง 18 ไอโซเลทมีค่าใกล้เคียงกับค่า Rf ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ ไคเนติน ซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์ ต่อจากนั้นเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าไอโซเลท ED3-7 ปรากฏพีคขึ้นที่เวลาใกล้เคียงกับซีเอติน

และซีเอตินไรโบไซม์ เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของ ซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์ พบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 16.67 และ 4.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์ สำหรับน้ำหมักจาก *M. radiotolerans* ED5-9 จากการวิเคราะห์เบื้องต้นโดยใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้นของไซโตไคนินเท่ากับ 0.54 ± 0.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค HPLC

5. **การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกในการสร้างเอนไซม์** ACC deaminase

จากการนำเซลล์ของ *M. radiotolerans* ED5-9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว DF salts minimal medium ที่มี 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) เป็นสารตั้งต้นในการชักนำให้แบคทีเรียสังเคราะห์เอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยวัดปริมาณของ อัลฟ่า-คีโตกลูตาเรตที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ ACC deaminase ทำปฏิกิริยากับ ACC พบว่า *M. radiotolerans* ED5-9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เท่ากับ 365.05 ± 90.51 นาโนโมลลาร์ของ α –ketobutyrate ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง

6. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก**

สภาวะที่ *M. radiotolerans* ED5-9 สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ดีที่สุด คือ ในอาหารเหลว LNM ที่เติมเมทานอลร้อยละ 1 มีการปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และใช้โพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน *M. radiotolerans* ED5-9 สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA มีความเข้มข้นของสารประกอบ IAA เท่ากับ 3.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง และมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.13 ต่อชั่วโมง และมีระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัวเท่ากับ 5.27 ชั่วโมง โดยปริมาณสารประกอบ IAA มีแนวโน้มค่อย ๆ เพิ่มขึ้น และสูงสุดเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase และมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

**7. การศึกษาผลของสัดส่วนการใช้น้ำหมักในอาหารเลี้ยงเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

น้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่ผลิตจาก *M. radiotolerans* ED5-9 เมื่อผสมลงในอาหารสูตร MS(1962) มีผลทำให้ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีการเจริญเกิดรากอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับอาหารสูตร MS(1962) ที่ไม่ผสมน้ำหมักและชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นผสมน้ำหมักยังให้จำนวนเฉลี่ยของยอด ใบ และรากไม่แตกต่างกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA และบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมน้ำหมัก เมื่อปริมาณของน้ำหมักที่ผสมในอาหารสูตร MS(1962) เพิ่มขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA เพิ่มขึ้น จำนวนรากเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งและความยาวรากเฉลี่ยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่จำนวนยอดและใบเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งมีแนวโน้มลดลง ในการทดลองนี้ความเข้มข้นของสารประกอบ IAA หลังจากผสมน้ำหมักในอาหาร MS(1962) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.0134 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.50 $\pm$ 1.73 ยอดต่อชิ้น จำนวนใบเฉลี่ย 4.33 $\pm$ 4.93 ใบต่อชิ้น จำนวนรากเฉลี่ย 8.00 รากต่อชิ้นและความยาวรากเฉลี่ย 1.00 เซนติเมตร นอกจากนี้ปริมาณสารทุติยภูมิที่วัดได้จากชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมน้ำหมักที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีปริมาณที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 กับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งบนอาหาร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด IAA

**8. การศึกษาผลของปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีน้ำหมักเป็นส่วนประกอบกับสภาพการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งและการสร้างสารสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอาหารเหลวสูตร MS(1962) ผสมน้ำหมักจาก *M. radiotolerans* ED5-9 เป็นอาหารเพาะเลี้ยงกับสภาพการเพาะเลี้ยงมีผลต่อจำนวนยอดเฉลี่ย ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณเฉลี่ยของสารต้านอนุมูลอิสระของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ที่สภาพการเพาะเลี้ยงที่ตั้งไว้บนชั้นเมื่อปริมาณอาหารต่อชิ้นส่วนเพิ่มขึ้นจำนวนยอดเฉลี่ยและปริมาณคลอโรฟิลล์ เอจะลดลง ในทางตรงข้ามปริมาณเฉลี่ยของสารต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้น

**9. การศึกษาผลของสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

สารละลายเซลล์ *M. radiotolerans* ED5-9 ที่มีความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA และเอนไซม์ ACC deaminase ส่งผลต่อชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) โดยให้จำนวนเฉลี่ยของยอด ใบ และราก ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 กับจำนวนเฉลี่ยของยอด ใบ และรากของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนรากเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการจุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียเพิ่มขึ้น ที่ระยะเวลาการจุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 5 นาที ให้จำนวนรากเฉลี่ย เท่ากับ 12.00 ± 3.46 รากต่อชิ้น ใกล้เคียงกับจำนวนรากเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่ให้จำนวนรากเฉลี่ย เท่ากับ 13.67 ± 6.11 รากต่อชิ้น นอกจากนี้ความยาวรากของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 5 นาที มีความยาวรากเฉลี่ย เท่ากับ 0.71 ± 0.26 เซนติเมตร มากกว่าความยาวรากเฉลี่ยของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ที่มีความยาวรากเฉลี่ย เท่ากับ 0.64 ± 0.05 เซนติเมตร สำหรับปริมาณเฉลี่ยของสารทุติยภูมิที่วัดได้มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ระหว่างชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียและชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ยกเว้นปริมาณเฉลี่ยของสารประกอบฟีนอลรวมในชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียมีปริมาณมากกว่าในชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ในส่วนปริมาณเฉลี่ยของสารสำคัญ 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-Z-6'-enecosamide) sphingosine มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ

จากการทดลองทั้งหมดดังกล่าวข้างต้นสรุปได้ว่า สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs จากใบหญ้าปักกิ่งได้ โดย *M. radiotolerans* ED5-9 ที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ได้ดีที่สุดในสภาวะที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LNM ผสมเมทานอลร้อยละ 1 มีการปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และใช้โพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และ *M. radiotolerans* ED5-9 ยังสามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ได้ จากผลการใช้น้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *M. radiotolerans* ED5-9 ที่มีสารประกอบ IAA ผสมลงในอาหาร MS(1962) ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง สามารถ

กระตุ้นการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง โดยเฉพาะการเจริญของรากที่ใกล้เคียงกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA และในส่วนของการใช้สารละลายเซลล์ของ *M. radiotolerans* ED5-9 ในการจุ่มชิ้นส่วนของหญ้าปักกิ่งก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช สารละลายเซลล์ของแบคทีเรียสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งให้มีการพัฒนาเกิดยอด ใบ และรากได้ดีในจำนวนและขนาดที่ใกล้เคียงกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA โดยเฉพาะรากนอกจากจะมีจำนวนที่ใกล้เคียงแล้วยังมีความยาวที่มากกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA จากผลของน้ำหมักและตัวเซลล์ของ *M. radiotolerans* ED5-9 ที่เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์และอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัย ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ จึงเป็นที่น่าสนใจส่งเสริมในการนำไปใช้แทนสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมี และลดการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจต่อประเทศ

**อภิปรายผลการวิจัย**

1. **การแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากใบหญ้าปักกิ่ง**

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สามารถแยกจากบริเวณผิวใบและภายในเนื้อเยื่อของใบหญ้าปักกิ่งได้บนอาหาร AMS ที่มีการเติมเมทานอลเป็นองค์ประกอบ โดยสังเกตจากโคโลนีที่มีสีชมพูซึ่งเป็นสารจำพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ที่เป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สร้างขึ้นเพื่อป้องกันเซลล์จากรังสียูวี บี (Sundin and Jacobs 1999) จากจำนวนโคโลนีสีชมพูที่นับได้สามารถคำนวณปริมาณเฉลี่ยของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* กลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* และกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* ได้เท่ากับ $6.08 \times 10^5$ cfu ต่อกรัมของใบหญ้าปักกิ่ง และ $2.50 \times 10^3$ cfu ต่อกรัมของใบหญ้าปักกิ่งตามลำดับ และสามารถคัดแยกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันโดยในแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* สามารถแยกได้จำนวน 40 ไอโซเลท ส่วนแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* สามารถคัดแยกได้จำนวน 34 ไอโซเลท รวมจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่คัดแยกได้จากใบของหญ้าปักกิ่งทั้งหมด 74 ไอโซเลท จะเห็นได้ว่าบริเวณผิวใบจะมีปริมาณแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มากกว่าภายในเนื้อเยื่อของใบหญ้าปักกิ่ง โดยทั่วไปแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สามารถพบได้บริเวณใบพืช โดยใช้เมทานอลที่ถูกปลดปล่อยผ่านทางปากใบเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ เมทานอลที่ถูก

ปลดปล่อยออกมาเป็นผลพลอยได้ของการย่อยสลายเพคติน (pectin) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชโดยเอนไซม์ pectinmethylesterase ในกระบวนการเจริญเติบโตของพืช (Gaffe, Tieman and Handa, 1994) ใบอ่อนจะมีอัตราการปลดปล่อยเมทานอลอยู่ระหว่าง 0.2 - 3.8 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง และอัตราการปลดปล่อยเมทานอลจะลดลงตามอายุของใบที่เพิ่มขึ้น (Nemecek-Marshall, et al., 1995; Harley, et al., 2007) ปริมาณเมทานอลที่พืชปลดปล่อยออกมามีผลต่อปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่บริเวณใบพืช จากการศึกษาของ Madhaiyan, et al. (2006) ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการฉีดพ่นเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ลงบนใบพืชจะทำให้ปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เพิ่มขึ้นเป็น 1 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีดพ่นเมทานอล ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่ต้องเลือกแยกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากบริเวณใบอ่อนหรือยอดอ่อนของพืช และด้วยสภาพแวดล้อมบริเวณใบพืชที่มีสัมผัสกับรังสียูวีที่เป็นอันตรายกับเซลล์ของแบคทีเรีย และมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความชื้นอย่างรุนแรง ประกอบกับปริมาณสารอาหารบริเวณใบพืชที่มีอยู่อย่างจำกัด (Wilson, Hirano and Lindow, 1999) แบคทีเรียจึงมีการสร้างรงควัตถุสีชมพูหรือสีส้มขึ้นมาเพื่อป้องกันอันตรายจากรังสียูวีบี (Sundin and Jacobs 1999) เช่นเดียวกับแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่สร้างสารจำพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ที่มีสีชมพูเพื่อป้องกันเซลล์จากรังสียูวี นอกจากนี้แบคทีเรียบางส่วนอาจจะมีการเคลื่อนที่เข้าไปเจริญในบริเวณปากใบ เป็นแหล่งที่มีการปล่อยน้ำและสารอาหาร (Mereier and Lindow, 2000) จึงทำให้สามารถพบแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ภายในเนื้อเยื่อของใบหญ้าปักกิ่งได้ ซึ่งภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในการทดลองของ Kutschera (2007) ได้แสดงให้เห็นการอาศัยอยู่ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่บริเวณพื้นผิวใบและที่บริเวณช่องว่างภายในปากใบของต้นทานตะวัน ที่บริเวณพื้นผิวใบจะมีปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มากกว่าที่บริเวณช่องว่างภายในปากใบปริมาณแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ของใบหญ้าปักกิ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chanprame, Todd and Widholm (1996) แสดงให้เห็นว่าสามารถพบแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ได้ทั้งบนผิวใบและภายในเนื้อเยื่อของใบ *Zebrina pendula* Schnizl ที่อยู่ในวงศ์ Commelinaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับหญ้าปักกิ่ง แต่มีปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แตกต่างกันโดยมีปริมาณของ epiphytic *Methylobacterium* เท่ากับ 4.6 cfu ต่อตารางเซนติเมตร และปริมาณของ endophytic *Methylobacterium* เท่ากับ 240 cfu ต่อ 0.5 มิลลิลิตร และในการศึกษาของ Madhaiyan, et al. (2005) และ Mizuno, et al. (2012) ได้แสดงปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ของใบพืชหลายชนิด เช่น อ้อย, *Solanum*

*melongena*, *Perilla frutescens viridis*, *Capsicum annuum*, *Cucurbita moschata*, *Momordica charantia*, *Abelmoschus esulentus* และ *Solanum lycopersicum* ที่มีค่าอยู่ระหว่าง $10^4 - 10^7$ cfu ต่อกรัมของใบพืช ดังนั้นจะเห็นได้ว่านอกจากปริมาณเมทานอลที่มีผลต่อปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* บริเวณใบพืชแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศที่พืชเจริญ ได้แก่ ฤดูกาล อุณหภูมิ ปริมาณรังสียูวี และปริมาณความชื้นในอากาศ (Omer, Tombolini and Gerhardson, 2004)

**2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบพืชปักกิ่ง**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่งทุกไอโซเลทของทั้งแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* และแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* มีโคโลนีมีสีชมพู ติดสีแกรมลบและสร้าง PHB สะสมไว้ภายในเซลล์ เมื่อพิจารณาจากลักษณะของโคโลนี เช่น รูปร่าง ขอบและผิวหน้าของโคโลนี เนื้อสัมผัสและการส่องผ่านของแสงสามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะโคโลนีออกได้ 12 กลุ่ม คือ A – K โดยแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* มีสมาชิกอยู่ในกลุ่ม B มากที่สุด จำนวน 19 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 47.50 รองลงมาอยู่ในกลุ่ม A จำนวน 6 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 15.00 กลุ่ม I จำนวน 5 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 12.50 กลุ่ม H จำนวน 3 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 7.50 กลุ่ม D จำนวน 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 5.00 และกลุ่ม C, E, F, G, J จำนวนกลุ่มละ 1 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 2.50 แต่ไม่พบโคโลนีในกลุ่ม K และ L ในส่วนแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* มีสมาชิกอยู่ในกลุ่ม B มากที่สุด จำนวน 17 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 50.00 รองลงมาอยู่ในกลุ่ม C จำนวน 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 20.59 กลุ่ม A , D, H จำนวนกลุ่มละ 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 5.88 กลุ่ม F, J, K, L จำนวนกลุ่มละ 1 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 2.94 แต่ไม่พบโคโลนีในกลุ่ม E, G และ I ดังจะเห็นได้ว่าแต่ละกลุ่มโคโลนีของแบคทีเรียสามารถพบได้ทั้งในแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* และแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* อาจแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* อาจจะมีการผ่านเข้าออกระหว่างบริเวณ ผิวใบพืชและภายในเนื้อเยื่อพืชผ่านทางปากใบ ดังจะเห็นได้จากภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในการทดลองของ Kutschera (2007) ที่แสดงให้เห็นการอยู่ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่บริเวณพื้นผิวบริเวณของปากใบและมีบางส่วนอยู่ที่บริเวณช่องว่างภายในปากใบของต้นทานตะวัน นอกจากนี้ลักษณะผิวสัมผัสของโคโลนีส่วนใหญ่ที่มีลักษณะคล้ายเนยเหลวเป็นเมือกเยิ้มอาจเกิดจากการที่แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สร้าง extracellular polysaccharide ขึ้นมาเพื่อป้องการตัวแบคทีเรีย

จากการขาดน้ำและยังช่วยในการยึดเกาะผิวใบพืช นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันรังสียูวีช่วยปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมและช่วยในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Morris, Monier and Jacques, 1997; Gal, et al., 2003)

เมื่อทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยา แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่งทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนอาหาร NA ปกติที่ไม่มีความเข้มข้นของเกลือ ในขณะที่ผลการทดสอบทางชีวเคมี ให้ผลการทดสอบ catalase, oxidase, motility เป็นผลบวก และผลการสอบ indole, MR-VP, $H_2S$, การย่อยสลายแป้ง เจลาติน เคซีน และเม็ดเลือดแดง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ ส่วนการทดสอบการใช้ citrate และการสร้างเอนไซม์ urease ให้ผลการทดสอบแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลทซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม คือ citrate (+) urease (+), citrate (+) urease (-), citrate (-) urease (+) และ citrate (-) urease (-) โดยแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* มีจำนวนไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบ citrate (-) urease (+) มากที่สุด มีจำนวน 20 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 50.00 รองลงมา citrate (+) urease (+) จำนวน 19 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 47.50 และ citrate (-) urease (-) จำนวน 1 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 2.50 ไม่พบไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบ citrate (+) urease (-) ในส่วนแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* มีจำนวนไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบ citrate (+) urease (+) มากที่สุด มีจำนวน 28 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 82.35 รองลงมา citrate (+) urease (-) จำนวน 4 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 11.76 และ citrate (-) urease (+) จำนวน 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 5.88 ไม่พบไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบ citrate (-) urease (-) เมื่อนำผลของลักษณะโคโลนีมาพิจารณาประกอบกับผลการทดสอบการใช้ citrate และการสร้างเอนไซม์ urease จะพบว่า แบคทีเรียสกุล *Methylobactreium* ในกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* ที่ให้ผลการทดสอบ citrate (-) urease (+) จำนวน 20 ไอโซเลท ประกอบด้วยโคโลนีกลุ่ม A, B, I จำนวนกลุ่มละ 5 ไอโซเลท และกลุ่ม D, E, F, G, J จำนวนกลุ่มละ 1 ไอโซเลท ผลการทดสอบ citrate (+) urease (+) จำนวน 19 ไอโซเลท ประกอบด้วยโคโลนีกลุ่ม B มากที่สุด จำนวน 14 ไอโซเลท กลุ่ม H จำนวน 2 ไอโซเลท และกลุ่ม A, C, D จำนวนกลุ่มละ 1 ไอโซเลท ผลการทดสอบ citrate (-) urease (-) จำนวน 1 ไอโซเลท อยู่ในโคโลนีกลุ่ม H ในส่วนแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* ที่ให้ผลการทดสอบ citrate (+) urease (+) จำนวน 28 ไอโซเลท ประกอบด้วยโคโลนีกลุ่ม B มากที่สุด จำนวน 14 ไอโซเลท กลุ่ม C จำนวน 7 ไอโซเลท กลุ่ม A, D, H จำนวนกลุ่มละ 2 ไอโซเลท และกลุ่ม K จำนวน 1 ไอโซเลท ผลการทดสอบ citrate (-) urease (+) จำนวน 2 ไอโซเลท ประกอบด้วยโคโลนีกลุ่ม F, J จำนวนกลุ่มละ 1 ไอโซเลท

ผลการทดสอบ citrate (+) urease (-) จำนวน 4 ไอโซเลท ประกอบด้วยโคโลนีกลุ่ม B จำนวน 3 ไอโซเลท และกลุ่ม L จำนวน 1 ไอโซเลท จากการสังเกตจะพบโคโลนีกลุ่ม A, B, C และ D ที่ให้ผลการทดสอบ citrate (+) urease (+) ได้เป็นส่วนใหญ่ทั้งในแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* และ endophytic *Methylobacterium* ในแบคทีเรียกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* ไม่พบแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบ citrate (+) urease (-) ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* ไม่พบแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบ citrate (-) urease (-) แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* นอกจากใช้เมทานอลที่เป็นสารประกอบคาร์บอนอะตอมเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้แล้วยังสามารถใช้น้ำตาลและกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้อีกด้วย (Lindow and Brandl, 2003) โดยปกติเมทานอลที่เป็นผลพลอยได้จากการเจริญเติบโตของพืชจะถูกปล่อยออกมาผ่านทางปากใบเมื่อปากใบเปิดในตอนเช้า จึงทำให้มีปริมาณเมทานอลอยู่ในระดับที่สูง เมทานอลที่ปลดปล่อยออกมาจะแพร่กระจายและถูกใช้โดยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่อยู่บริเวณผิวใบ เมื่อเข้าสู่เวลากลางคืนเป็นเวลาที่ปากใบปิดทำให้มีปริมาณเมทานอลลดลง จึงทำให้แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* มีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดได้ในเวลาที่เมทานอลมีปริมาณไม่เพียงพอ โดยให้สามารถไปใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นได้ที่นอกเหนือจาก เมทานอล เช่น ซัคซิเนต (Sy, et al., 2005; Abanda-Nkpwatt, et al., 2006; Huve, et al., 2007) ในการเจริญโดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จะมีวิถีของกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็น คือ tetrahydromethanopterin-dependent oxidation, serine cycle และ ethylmalonyl-CoA แต่เมื่อแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ใช้กรดอินทรีย์ในการเจริญ จะมีวิถีของกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็น คือ tricarboxylic acid (TCA cycle) และ pyruvate dehydrogenase (Van Dien, et al., 2003; Peyraud, et al., 2011; Schneider, et al., 2012) ดังนั้นจึงทำให้สามารถพบแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่ให้ผลการใช้ citrate (+) ได้ทั้งภายในและภายนอกใบพืช

จากผลลักษณะโคโลนี การทดสอบทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีเบื้องต้นสอดคล้องกับลักษณะของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ตามในหนังสือ Bergey's manual of systematic bacteriology (Garrity, Bell and Lilburn, 2005) โดยมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันดังนี้ คือ มีโคโลนี สีชมพูที่เป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เมื่อเจริญบนอาหารที่มีเมทานอลเป็นส่วนประกอบ แสดงว่าสามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนอะตอมเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เซลล์ย้อมติดสีแกรมลบ และสร้าง PHB สามารถเคลื่อนที่ได้ ให้ผลการทดสอบ catalase และ oxidase เป็นบวก MR-VP

เป็นลบ ไม่สามารถย่อยสลายหรือไฮโดรไลซ์เคซีน แป้ง และเจลลาติน ไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ และ indole นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar and Lee (2009) ที่ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโคโลนีสีชมพู ที่แยกได้จากใบสะเดาจำนวน 20 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทมีโคโลนีกลมสีชมพู ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว โค้งนูน โคโลนีส่วนใหญ่ทึบแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว ตัวเซลล์รูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ ภายในเซลล์มีการสะสม PHB เมื่อนำทุกไอโซเลทไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมี พบว่าไอโซเลททั้งหมดให้ผลการทดสอบ catalase เป็นบวก และไอโซเลทส่วนใหญ่ให้ผลการทดสอบ oxidase การใช้ citrate และการสร้างเอนไซม์ urease เป็นบวก แต่ให้ผลการทดสอบเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยสลายแป้งเป็นลบทุกไอโซเลท สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหาร AMS ผสมเมทานอล อาหาร GP agar และอาหาร TSA จากการศึกษาได้สรุปว่าแบคทีเรียโคโลนีสีชมพูที่แยกได้จัดอยู่ในแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium*

**3. การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้**

แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ทุกไอโซเลทที่แยกได้ทั้งกลุ่มแยก epiphytic *Methylobacterium* และกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* สามารถสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินหรือ IAA ในอาหารเหลว LNM ทั้งที่เติมและไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ทั้งในพืชและแบคทีเรียจะมีวิถีสังเคราะห์อยู่ 2 วิถีหลัก คือ Trp-dependent pathway เป็นวิถีที่ใช้แอล-ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ IAA และ Trp-independent pathway เป็นวิถีที่ใช้ที่ไม่ใช้แอล-ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แต่อาจสังเคราะห์ IAA ผ่านทางสารประกอบอินโดล (Mano and Nemoto, 2012) ในการทดลองของ Omer, et al. (2004) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้จาก *Trifolium repens* และ *T. pretence* สามารถสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินหรือ IAA ได้ในอาหารที่เติมและไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน แม้กระทั่งการศึกษาของ Yim, et al. (2010) แสดงให้เห็นว่า *M. oryzae* CBMB20 และ CBMB110 สามารถสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินหรือ IAA ได้ในอาหารที่เติมและไม่เติมแอล-ทริปโตเฟนได้เช่นเดียวกัน สำหรับวิถีการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในวิถี Trp-dependent pathway จากการศึกษาของ Ivanova, Doronina and Trotsenko (2001) ใน *M. mesophilicum* VKM B-2143 พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ aminotransferase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแอล-ทริปโตเฟนไปเปลี่ยน indole-3-pyruvic acid (IPA) และในการศึกษานี้ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ tryptophan decarboxylase และ tryptophan side-chain oxidase ต่อมา Fedorov, Doronina and

Trotsenko (2010) พบกิจกรรมของเอนไซม์ indole-3-pyruvate decarboxylase ที่ถูกแปลรหัสจากยีน *ipdC* เป็นเอนไซม์หลัก (key enzyme) ในวิถี IPA ที่เปลี่ยน IPA ไปเป็น indole-3-acetaldehyde (IAD) ดังนั้นแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี IPA โดยใช้แอล-ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ซึ่งวิถีการสังเคราะห์นี้เป็นวิถีที่พบทั่วไปในพืชและแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นประโยชน์ที่ไม่ก่อโรคหรือสร้างความเสียหายให้กับพืช (Spaepen, Vanderleyden and Remans, 2007) สำหรับการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ในวิถี Trp-independent pathway ที่มีการศึกษาใน *Az. brasilense* พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์สารประกอบ IAA โดยใช้สารประกอบอินโดลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น indole-3-acetonitrile (IAN) และถูกเอนไซม์ nitrilase เปลี่ยนต่อไปเป็น IAA (Prinsen, et al., 1993; Zakharova, et al., 1999; Cecagno, Fritsch and Schrank, 2015)

จากความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้คัดเลือกแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* กลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* ไอโซเลท ED5-9 มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ดีที่สุดในอาหารเหลว LNM ที่ไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน โดยมีความเข้มข้นของสารประกอบ IAA เท่ากับ 3.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไอโซเลท ED5-9 ส่งไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยาแบบ partial 16S rDNA gene sequencing ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กรุงเทพฯ พบว่ามีความเหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *M. radiotolerans* JCM 2831 (T) สอดคล้องกับการศึกษาของ Mano and Morisaki (2008) และ Kaga, et al. (2009) ที่พบ *M. radiotolerans* ในเนื้อเยื่อของต้นข้าว (*Oryza sativa*) บริเวณยอดทั้งต้นอ่อนและต้นแก่ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ที่ผลิตได้จาก *M. radiotolerans* ED5-9 สอดคล้องกับการศึกษาของ Doronina, Ivanova and Trotsenko (2002) ที่ศึกษาความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ที่สังเคราะห์จาก *M. radiotolerans* VKM B-2144 (= JCM 2831) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

**4. การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกในการสร้างเอนไซม์** ACC deaminase

*M. radiotolerans* ED5-9 ที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เท่ากับ 365.05 $\pm$ 90.51 นาโนโมลลาร์ของ $\alpha$ –ketobutyrate ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์ ACC deaminase สามารถพบได้ในแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นประโยชน์ต่อพืชเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมระดับของเอทิลีน โดยการเปลี่ยน ACC ที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอทิลีนให้เป็นอัลฟา-คีโตกลูตาเรต และแอมโมเนีย การที่พืชมีเอทิลีนในความเข้มข้นที่สูงจะทำการเจริญเติบโตของพืชลดลงและอาจตายได้ (Honma and Shimomura, 1978) นอกจากนี้

แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เมื่ออาศัยร่วมกับพืชจะช่วยให้พืชสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่น น้ำท่วมขัง อุณหภูมิที่สูงเกินไป ความเป็นพิษจากสารอินทรีย์และอนินทรีย์ โรคพืชต่าง ๆ ความแห้งแล้ง และความเค็มของดิน (Saraf, Jha and Patel, 2010) สอดคล้องกับการศึกษาของ Chinnadurai, Balachandar and Sundarm (2009) ใน *M. radiotolerans* COLR1 ที่แยกได้จากใบข้าวมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เท่ากับ 339.39 $\pm$ 5.53 นาโนโมลลาร์ของ $\alpha$ –ketobutyrate ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง

**5. การศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์สารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก**

เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มแยก endophytic *Methylobacterium* ที่มีความสามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไปทั้งหมด 18 ไอโซเลท คือ ED1-2, ED1-9, ED1-10, ED2-3, ED2-5, ED2-6, ED2-8, ED2-11, ED3-1, ED3-2, ED3-5, ED3-7, ED3-9, ED4-4, ED4-5, ED5-2, ED5-6 และ ED5-9 มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญชนิดไซโตไคนินเบื้องต้นด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตร โดยใช้ไคเนตินเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งไคเนตินมีโครงสร้างคล้ายกับซีเอตินที่เป็นอนุพันธ์ของ aminopurine พบว่าทั้ง 18 ไอโซเลทสามารถสังเคราะห์ไซโตไคนินได้ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.14 $\pm$ 0.58 ถึง 1.22 $\pm$ 0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมานำน้ำหมักที่ผ่านการสกัดด้วยบิวทานอลไปตรวจเอกลักษณ์ และพิสูจน์องค์ประกอบของสาร รวมไปถึงความบริสุทธิ์ของสารด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง ซึ่งอาศัยการเคลื่อนที่ของสารบนวัฏภาคคงที่โดยอาศัยวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารหรือค่า Rf ของทั้ง 18 ไอโซเลทซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.6 มีค่าใกล้เคียงกับค่า Rf ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ ไคเนติน ซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.8, 0.7 และ 0.7 ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Wood, et al. (1974) ในการศึกษาเปรียบเทียบ cytokinesins 2 ชนิด และซีเอตินไรโบไซม์โดยใช้รงคเลขผิวบางที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น n-butanol : acetic acid : water (4:1:1) มีค่า Rf เท่ากับ 0.62, 0.82 และ 0.70 และเมื่อซีเอตินไรโบไซม์ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกพบว่ามีแถบเกิดขึ้นสองที่โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.27 และ 0.65 ซึ่งก็คืออะดีนีน และซีเอติน ส่วนในการศึกษาของ Phillips and Torrey (1972) ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น n-butanol : acetic acid : water (12:3:5) ค่า Rf ของซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์ซ้อนทับกัน โดยมีค่า Rf ของซีเอติน เท่ากับ 0.60 - 0.75 และซีเอตินไรโบไซม์ เท่ากับ 0.65 – 0.80 และเมื่อนำน้ำหมักที่ผ่านการสกัดด้วยบิวทานอลไปหาปริมาณไซโตไคนินด้วยเทคนิค HPLC เทียบกับสารละลายมาตรฐานไคเนติน ซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์ จากกราฟมาตรฐานปรากฏพีคของสารละลาย

มาตรฐานซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์ขึ้นที่เวลาเดียวกัน เมื่อนำมาเทียบกับสารตัวอย่างทำให้ไม่สามารถแยกสารทั้งสองตัวออกจากกันได้ และในการทดลองไอโซเลท ED3-7 มีพีคปรากฏขึ้นที่เวลาเดียวกับซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของสารทั้งสอง จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 16.67 และ 4.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์เช่นเดียวกับการศึกษาในรงคเลขผิวบาง แต่ในการศึกษาของ Hussain and Hasnain (2009) ที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลร้อยละ 70 เช่นเดียวกัน พบว่าพีคของซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์ที่สังเคราะห์จาก *B. licheniformis* Am2 ปรากฏออกมาที่เวลาใกล้เคียงกัน คือ เวลา 2.55 นาทีและ 3.00 นาที โดยปริมาณของซีเอติน และซีเอตินไรโบไซม์มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.09 และ 0.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Koenig, Morris and Polacco (2002) ที่ทำการศึกษาใน *M. extorquens* และ *Methylobacterium* ที่แยกได้จากพืช 4 ชนิด คือ *Arabidopsis*, ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด และถั่วเหลือง พบว่า ไซโตไคนินที่แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สังเคราะห์เป็นชนิดทราน-ซีเอติน มีความเข้มข้นระหว่าง 38 – 114 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบซีเอตินไรโบไซม์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 4 – 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สามารถสังเคราะห์ไซโตไคนินชนิดซีเอตินได้มากกว่าซีเอตินไรโบไซม์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Meena, et al. (2012) ใน *Methylobacterium* sp. ที่แยกจากใบพืช เช่น อ้อย ถั่วมะแฮ มัสตาร์ด มันฝรั่ง และหัวไชเท้า สามารถสังเคราะห์ไซโตไคนินอยู่ในช่วงระหว่าง 1.09 – 9.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในกระบวนการสังเคราะห์ไซโตไคนินของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากการศึกษาของ Ivanova, et al. (2000) ใน *M. mesophilicum* VKM B-2143 พบว่า มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนินโดยเทียบเคียงกับยีน *tmr* และ *tzs* เมื่อถอดรหัสแล้วเป็นเอนไซม์หลักในการสังเคราะห์ไซโตไคนินเช่นเดียวกับใน *Ag. tumefaciens* โดยแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* สังเคราะห์ทราน-ซีเอตินโดยผ่านการดัดแปลง tRNA เช่นเดียวกับในพืชมากกว่าการสังเคราะห์ขึ้นใหม่ผ่านกระบวน isopentenylation ของ adenosine monophosphate (AMP)

**6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารประกอบ IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลทที่ได้คัดเลือก**

*M. radiotolerans* ED5-9 ที่เจริญในอาหาร LNM ที่เติมเมทานอลร้อยละ 1 ที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และใช้โพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 3.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณสารประกอบ IAA มีแนวโน้มค่อย ๆ เพิ่มขึ้น และสูงสุดเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase และมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาผ่านไป สอดคล้องกับการศึกษาของ Ivanova, Doronina and

Trotsenko (2001) ที่ใช้โพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแอมโมเนียมซัลเฟตในการเพาะเลี้ยง *M. mesophilicum* ทำให้มีการสังเคราะห์สารประกอบ IAA เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะแอมโมเนียม ไอออน ไปรบกวนกระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่อะมิโนของทริปโตเฟนในกระบวนการสังเคราะห์ อินโดล เช่นเดียวกับการศึกษาของ Shokri and Emtiazi (2010) ที่โพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสำหรับการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ใน *Agrobacterium, Paenibacillus, Rhizobium, Klebsiella oxytoca,* และ *Azotobacter* โดยให้ปริมาณสารประกอบ IAA สูงสุดในชั่วโมงที่ 72 ในระยะ stationary phase หลังจากนั้นสารประกอบ IAA จะมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาผ่านไป อาจเป็นเพราะโดนย่อยสลายโดยเอนไซม์ IAA oxidase และเอนไซม์ peroxidase เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sridevi and Mallaiah (2008) ใน *Rhizobium* ที่แยกจาก *Sesbania* เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ใช้โพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ในระยะ stationary phase และมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาผ่านไป คล้ายกับการศึกษาใน *Rhizobium* ที่แยกจาก *Cajanus cajan* ของ Datta and Basu (2000)

ในส่วนของค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ขึ้นอยู่กับแบคทีเรียแต่ละชนิด และแหล่งที่ใช้แยกแบคทีเรียมาศึกษา จากการศึกษาของ Jasim, et al. (2014) ใน *Kl. pneumonia* และ *Ent. cloacae* ที่แยกจากเนื้อเยื่อของ *Piper nigrum* ที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้สูงสุดที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Acuna, et al. (2011) ในแบคทีเรียรอบรากพืช *Paenibacillus* spp. SPT-03 สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้สูงสุดที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 และจะมีปริมาณลดลงถึงร้อยละ 42 เมื่อค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ตรงข้ามกับ *Bacillus* spp. MQH-19 สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้สูงสุดที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 และจะมีปริมาณลดลงถึงร้อยละ 62 เมื่อค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 ในขณะที่การศึกษาของ Mandal, et al. (2007) ใน *Rhizobium* sp. ที่แยกจากปมรากของ *Vigna mungo* (L.) Hepper สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้สูงสุดที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.2 ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ในระบบ และความสามารถในการละลายของสารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งส่วนใหญ่แล้วค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมกับการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ของแบคทีเรียจะค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อยจนถึงด่างเล็กน้อย เช่นใน *Acetobacter diazotrophicus* L1 สามารถสังเคราะห์สารประกอบ IAA ได้สูงสุดที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 (Patil, et al., 2011) *Pantoea agglomerans* PVM ที่ค่า pH

เริ่มต้นเท่ากับ 7 (Apine and Jadhav, 2011) และ *Ps. putida* UB1 ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 (Bharucha and Patel, 2013)

ชนิดของสารประกอบ IAA ในน้ำหมักที่ผลิตจาก *M. radiotolerans* ED5-9 ในอาหาร LNM ที่ไม่เติมแอล-ทริปโตเฟน ถูกยืนยันด้วยเทคนิค HPLC โดยการเทียบกันระหว่างพีคของสารประกอบ IAA ที่ได้จากน้ำหมักและสารละลายมาตรฐาน IAA ที่ปรากฏขึ้นที่เวลาใกล้เคียงกัน ที่เวลาประมาณนาทีที่ 13 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ivanova, Doronina and Trotsenko (2001) ที่มีการพิสูจน์สารประกอบ IAA ที่สังเคราะห์โดย *M. mesophilicum* ด้วยเทคนิค HPLC เช่นเดียวกับ Ali and Hasnain (2007) ที่พิสูจน์สารประกอบ IAA ในน้ำหมักที่ผลิตได้จาก *Halomonas* sp. RE1 และ HT1 โดยการเทียบกันระหว่างพีคของสารประกอบ IAA ที่ได้จากน้ำหมักและสารละลายมาตรฐาน IAA ที่ปรากฏขึ้นที่เวลาใกล้เคียงกัน และการศึกษาของ Jasim, et al. (2014) ที่พิสูจน์การสร้างสารประกอบ IAA ด้วยเทคนิค HPLC ใน *Pseudomonas* sp. ZoB2 ที่แยกได้จากภายในเนื้อเยื่อไรโซม (rhizome) ของ *Zingiber officinale*

**7. การศึกษาผลของสัดส่วนการใช้น้ำหมักในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่นำมาใช้ในการทดลองมีลักษณะที่เรียกว่า compact callus ซึ่งเป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่น และมีการพัฒนาเจริญไปเป็นยอดและใบจำนวนมาก เมื่อนำมาใช้ในการทดลองจึงต้องตัดยอดและใบออก และแบ่งชิ้นส่วนให้มีขนาดใกล้เคียงกัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS(1962) ผสมน้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญชนิด IAA ที่ผลิตจาก *M. radiotolerans* ED5-9 เทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA การเจริญของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 5 และ 7 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.0067 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า มีการเจริญของยอดและใบ แต่ไม่พบการเจริญของราก อาจเนื่องมาจากผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของไซโตไคนินที่มีผลในการควบคุมการแบ่งเซลล์ การขยายตัวและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืช เช่น การเกิดยอดและการเกิดหน่อ กระตุ้นการเจริญของตาข้าง กระตุ้นการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ (chloroplasts) ช่วยให้มีการสะสมของคลอโรฟิลล์ (Davies, 2004) สอดคล้องกับการศึกษาที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA กระตุ้นให้มีการเกิดยอดใน *Fraxinus pennsylvanica* Marsh., *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan, *Artemisia Chamaemelifolia* Vill., *Phaseolus*

*vulgaris*, *Etlingera elatior* และ เป็นต้น (Kim, Schumann and Klopfenstein, 1997; Jafari, Othman and Khalid, 2011; Hristova, et al., 2013; Chandel and Pandey, 2014; Muangkaewngam, 2014) ในขณะที่กรรมวิธีที่ 6 และ 8 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ความเข้มข้น 2.00 และ 0.0067 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีการเจริญของรากที่ดี แต่ยอดและใบมีการเจริญเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของออกซินที่มีผลต่อการขยายขนาดของเซลล์พืชและการเจริญของก้าน กระตุ้นการเกิดรากของกิ่งที่ถูกตัด และการเกิดรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Davies, 2004) สอดคล้องกับการศึกษาที่ใช้ IAA ในการกระตุ้นการเกิดรากใน *Withania somnifera*, *Coffea arabica* L., *Plumbago zeylanica* L., *Etlingera elatior*, *Ananas comosus* L., *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast, *Heliotropium keralense* และ Zea mays เป็นต้น (Supe, Dhote and Royman, 2006; Ebrahim, et al., 2007; Sivanesan and Jeong, 2009; Abdelmageed, et al., 2011; Hamad, Taha and Mohajer, 2013; Aslam, Mujib and Sharma, 2013; Sebastian and Hariharan, 2013; Martinez-de la Cruz, et al., 2015) สำหรับการเจริญของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 1, 2 และ 3 บนอาหาร MS(1962) และกรรมวิธีที่ 4 บนอาหารวุ้น โดยทั้ง 4 กรรมวิธีผสมน้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA พบว่ามีการเจริญของยอด ใบ และราก ใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ 6 ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 แต่ในกรรมวิธีที่ 9 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS(1962) ที่ไม่มีการผสมทั้งน้ำหมักและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช พบว่า มีการเจริญของยอดและใบ แต่ไม่มีการเจริญของราก ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าน้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ส่งผลต่อการเจริญของรากของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Ali and Hasnain (2007) ที่ใช้น้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่ผลิตจาก *Halomonas desiderata* RE1 ผสมกับอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS(1962) สามารถกระตุ้นการเกิดรากจากการตัดชำ *Vigna radiate* ได้ 16.50 $\pm$ 0.7 รากต่อกิ่งและมีความยาวรากเท่ากับ 5.4 $\pm$ 0.3 มิลลิเมตร ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ตัดชำกิ่งในอาหาร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญชนิดเติบโตของพืช IAA ที่ให้จำนวนรากเท่ากับ 18.25 $\pm$ 1.0 รากต่อกิ่งและมีความยาวรากเท่ากับ 4.2 $\pm$ 0.1 มิลลิเมตร และจากการศึกษาของ Tsavkelova, et al. (2007) น้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA จากแบคทีเรียสามารถกระตุ้นการเกิดรากจากการตัดชำของ *Phaseolus vulgaris* โดยมีจำนวน

และความยาวของรากใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA จากการศึกษาของ Ali and Hasnain (2007) น้ำหมักจากแบคทีเรียยังสามารถเพิ่มความยาวยอด กระตุ้นการเกิดยอดใหม่ และชักนำให้เกิดแคลลัสของ *Brassica oleracea* L. เช่นเดียวกับ El-Mahrouk and Belal (2007) ที่พบว่าสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่สังเคราะห์จาก *Azotobacter* sp. A1 มีประสิทธิภาพชักนำการเกิดแคลลัส และการเจริญเป็นต้นใหม่ของ *Dieffenbachia maculate cv. Marianne* นอกจากนี้การศึกษาของ Sasirekha, Shivakumar and Sullia (2012) ได้ใช้น้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่ผลิตจาก *Ps. Aeruginosa* ไปกระตุ้นการงอกของเมล็ด และการเจริญเติบโตของต้นกล้าของ *Vigna unguiculata* C-152 พบว่าสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดได้ถึงร้อยละ 100 มีความยาวของรากและชีวมวลเพิ่มขึ้น และมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นเมื่อดูจากค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นกล้า (seedling vigor index) เทียบกับตัวควบคุม เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Harikrishnan, Shanmugaiah and Balasubramanian (2014) ได้ใช้น้ำหมักจาก *Streptomyces* sp. VSMGT1014 ไปกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของข้าว

ในส่วนการศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิ ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวมแคโรทีนอยด์ สารประกอบฟีนอลรวม สารต้านอนุมูลอิสระ และสาร 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-Z-6'-enecosamide)sphingosine เป็นสาระสำคัญที่พบได้ในหญ้าปักกิ่งมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง จากการทดลองที่ใช้น้ำหมักของ *M. radiotolerans* ED5-9 พบว่าชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งจากการเพาะเลี้ยงในทุกกรรมวิธีสามารถผลิตสารทุติยภูมิดังกล่าวข้างต้นได้โดยชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งจากกรรมวิธีที่ 5 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนิด BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้จำนวนของยอดและใบสูงที่สุดในบรรดา 9 กรรมวิธี มีปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม แคโรทีนอยด์ และสาร 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-Z-6'-enecosamide)sphingosine สูงที่สุดตามไปด้วย ในส่วนกรรมวิธี 1, 2, 3 และ 4 ที่ใช้น้ำหมักของ *M. radiotolerans* ED5-9 ผสมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง พบว่าชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งจากกรรมวิธีที่ 1 ที่ผสมน้ำหมัก 1 มิลลิลิตรต่อลิตร หรือมีปริมาณสารประกอบ IAA เท่ากับ 0.0034 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีนี้ผสมน้ำหมักน้อยที่สุด ในบรรดา 4 กรรมวิธี แต่มีจำนวนยอดและใบเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 3.40 ± 2.30 ยอดต่อชิ้นและ 8.00 ± 7.07 ใบต่อชิ้น ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์จากวิธีการสกัด สารประกอบฟีนอลรวม และสารสำคัญสูงตามไปด้วย โดยค่าปริมาณของสาร 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-Z-6'-enecosamide)sphingosine

มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ ที่วิเคราะห์ได้จากวิธีการสกัด สอดคล้องกับการศึกษาของ Bharucha, Patel and Trivedi (2013) นอกจากน้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่สังเคราะห์จาก *P. putida* UB1 จะมีผลต่อความยาวของยอดและราก ยังมีผลต่อจำนวนใบและจำนวนราก รวมถึงยังมีผลต่อการสะสมปริมาณคลอโรฟิลล์ใน *Brassica nigra* มีค่าใกล้เคียงการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

**8. การศึกษาผลของปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีน้ำหมักเป็นส่วนประกอบกับสภาพการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอาหารเหลวสูตร MS(1962) ผสมน้ำหมักที่มีสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญชนิด IAA ที่ผลิตจาก *M. radiotolerans* ED5-9 และสภาพการเพาะเลี้ยงที่ตั้งไว้บนชั้นเพาะเลี้ยงกับสภาพการเขย่า พบว่าปริมาณอาหารและสภาพการเพาะเลี้ยงไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง แต่ในสภาพการเพาะเลี้ยงที่ตั้งไว้บนชั้นต่อปริมาณอาหารมีผลต่อจำนวนเฉลี่ยของยอด ปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ เอและปริมาณเฉลี่ยของสารต้านอนุมูลอิสระของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยที่สภาพการเพาะเลี้ยงที่ตั้งไว้บนชั้นเมื่อปริมาณอาหารต่อชิ้นส่วนเพิ่มขึ้น จำนวนยอดเฉลี่ยและปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ เอจะลดลง ในทางตรงข้ามปริมาณเฉลี่ยของสารต้านอนุมูลอิสระ จะเพิ่มขึ้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวปริมาตรที่เหมาะสมจะทำให้ชิ้นส่วนของพืชสามารถสัมผัสกับอาหารได้ทั่วถึง เพิ่มการดูดซึมน้ำและสารอาหาร ทำให้ชิ้นส่วนของพืชสามารถเกิดยอดและรากได้ในปริมาณที่มากกว่าเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง อีกทั้งมีการสะสมคลอโรฟิลล์ในปริมาณที่มากกว่าอีกด้วย แต่ถ้ามีปริมาตรอาหารที่มากเกินจะทำให้ชิ้นส่วนของพืชได้รับออกซิเจนลดลงเกิดอาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) และตายได้ (Mehta, Ram and Bhattacharya, 2014) สอดคล้องกับการศึกษาของ Sandal, Bhattacharya and Ahuja (2001) พบว่า สภาพการเพาะเลี้ยงที่ตั้งไว้ต่อปริมาณอาหาร 20 มิลลิลิตรเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของชา แต่เมื่อปริมาณอาหารเพิ่มขึ้นจะมีการชักนำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mehta, Ram and Bhattacharya (2014) ในการเพาะเลี้ยง rootstock ของแอปเปิล พบว่าที่ปริมาณอาหาร 20 มิลลิลิตร เป็นปริมาณเหมาะสมที่สามารถส่งเสริมการเจริญของชิ้นส่วนได้ดีที่สุด

**9. การศึกษาผลของสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

จากการศึกษาการใช้แบคทีเรีย *M. radiotolerans* ED5-9 ที่มีความสามารถในการสร้างสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA และเอนไซม์ ACC deaminase ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่ง พบว่าชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียแล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีการเจริญเติบโตไปในทิศทางเดียวกับชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA โดยเฉพาะการเจริญของราก พบว่า ชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 5 นาทีมีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 12.00 ± 3.46 รากต่อชิ้น ใกล้เคียงกับชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 13.67 ± 6.11 รากต่อชิ้น นอกจากนี้ความยาวรากของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 5 นาที มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.71 ± 0.26 เซนติเมตร มีความยาวมากกว่าชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ที่มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.64 ± 0.05 เซนติเมตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Kalyaeva, et al. (2003) ที่ *Methylobacterium* sp. D10 สามารถกระตุ้นชิ้นส่วนของข้าวสาลีให้มีการเกิดยอดและพัฒนาเจริญเป็นต้นใหม่ นอกจากนี้ต้นใหม่ที่ได้ยังมีสีเขียวสดและมีระบบรากที่ดี Shirokikh, Shupletsova and Shirokikh (2007) ยังพบว่า *Methylobacterium* สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวบาร์เลย์ ทำให้แคลลัสมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 331 $\pm$ 25.2 มิลลิกรัมเพิ่มจากกลุ่มควบคุมที่มีน้ำหนัก 207 $\pm$ 25.2 มิลลิกรัม และให้จำนวนเฉลี่ยของยอดและรากได้มากถึง 2.3 $\pm$ 0.33 ยอดต่อแคลลัสและ 15.3 $\pm$ 2.83 รากต่อแคลลัส ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมจำนวนเฉลี่ยของยอดและรากเท่ากับ 1.8 $\pm$ 0.27 ยอดต่อแคลลัสและ 8.3 $\pm$ 2.67 รากต่อแคลลัส ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Devi, Sundaram and Poorniammal (2009) ที่พบว่า *Methylobacterium* สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดต้นใหม่ได้สูงสุดที่ร้อยละ 73.4 และ 87.6 ตามลำดับ สารละลายเซลล์ *Methylobacterium* ที่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์สารประกอบ IAA ไปรบกวนสมดุลของอัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินในเนื้อเยื่อ ซึ่ง Kalyaeva, et al. (2001) ได้แสดงให้เห็นว่า methylotrophic bacteria สามารถกระตุ้นให้ต้นยาสูบที่ทำให้สูญเสียการเกิดรากสามารถกลับมาเกิดรากใหม่ได้ การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาการของแคลลัสหรือชิ้นส่วนของพืชไปเป็นยอดหรือรากขึ้นอยู่กับสมดุลของอัตราส่วนระหว่างออกซินและ ไซโตไคนินในเนื้อเยื่อ ถ้ามีปริมาณออกซินสูงกว่าไซโตไคนิน จะชักนำให้มีการเกิดราก

มากกว่าเกิดยอด แต่ถ้ามีปริมาณไซโตไคนินมากกว่าออกซินจะชักนำให้เกิดยอดมากกว่าเกิดราก เป็นไปตามทฤษฎีการควบคุมของฮอร์โมนของ Skoog–Miller (Shirokikh, Shupletsova and Shirokikh, 2007) ดังเช่นการศึกษาของ Gopitha, Bhavani and Senthilmanickam (2010) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอ้อยที่สามารถเกิดยอดได้ดีบนอาหาร MS(1962) ผสม 6-benzylaminopurine (BAP) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ indole-3-butyric acid (IBA) 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนอาหารสูตร MS(1962) ผสม 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครสร้อยละ 5 สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาของ North and Ndakidemi (2012) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Streptocarpus rexii* Lindl. ที่สามารถเกิดยอดได้ดีบนอาหารสูตร MS(1962) ผสม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารสูตร MS(1962) ผสม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ร้อยละการเกิดรากจะลดลง

ในส่วนความยาวรากของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียมีความยาวมากกว่าชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แต่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA อาจเป็นเพราะว่าเอนไซม์ ACC deaminase ที่ *M. radiotolerans* ED5-9 สร้างขึ้น จากการศึกษาของ Madhaiyan, et al. (2006) ใน *M. fujisawaense* แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ ACC deaminase ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมีผลต่อระดับของเอทิลีนในเนื้อเยื่อและส่งเสริมความยาวรากในต้นกล้าของ *Brassica campestris* เนื่องจากเอนไซม์ ACC deaminase ไปลดระดับของ ACC ที่เป็นสารตั้งต้นของเอทิลีน หลังจากที่ IAA ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ACC synthase ในการสังเคราะห์ ACC และไปลดกิจกรรมของเอนไซม์ ACC oxidase ทำให้ ACC เปลี่ยนไปเป็นเอทิลีนลดลง เป็นการป้องกันการยับยั้งการเจริญของรากโดยเอทิลีน นอกจากนี้การศึกษาของ Chinnadurai, Balachandar and Sundaram (2009) แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของ *M. radiotolerans* COLR1 ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ต่อการเพิ่มความยาวเฉลี่ยของรากและยอด โดยในข้าวมีความยาวเฉลี่ยของยอดและรากเท่ากับ 9.85 $\pm$ 0.18 เซนติเมตรและ 16.25 $\pm$ 0.44 เซนติเมตร ตามลำดับ เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมที่มีความยาวเฉลี่ยของยอดและรากเท่ากับ 3.69 $\pm$ 1.05 เซนติเมตรและ 4.89 $\pm$ 1.20 เซนติเมตร ตามลำดับ ในส่วนของมะเขือเทศมีความยาวเฉลี่ยของยอดและรากเท่ากับ 4.82 $\pm$ 0.13 เซนติเมตรและ 6.50 $\pm$ 0.16 เซนติเมตร ตามลำดับ เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมที่มีความยาวเฉลี่ยของยอดและรากเท่ากับ 3.87 $\pm$ 0.44 เซนติเมตรและ 5.60 $\pm$ 0.64 เซนติเมตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับใน *M. oryzae* CBMB20, *Methylobacterium* sp. WP1 และ *Ps. fluorescens* Pf1

ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่มีผลต่อความยาวเฉลี่ยของยอดและราก ในข้าวและมะเขือเทศไปในทิศทางเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิโดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลรวม และสาร 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-Z-6'-enecosamide)sphingosine มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 3 นาที มีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 0.93 ± 0.38 กรัมต่อกรัมตัวอย่าง มากกว่าชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีปริมาณเฉลี่ย เท่ากับ 0.53 ± 0.38 กรัมต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งสารประกอบฟีนอลช่วยป้องกันพืชจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและการรุกรานจากจุลินทรีย์โรคพืช (Jones, 1984) การสะสมของสารประกอบฟีนอลรวมที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นเพราะการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในวิถี phenylpropanoid ซึ่งเป็นวิถีในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น กรดซินนามิก (cinnamic acid), กรดคูมาริก (coumaric acid), กรดเฟอรูลิก (ferulic acid), กรดคาเฟอิก (caffeic acid), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), แทนนิน (tannins) และ ลิกนิน (lignin) เป็นต้น (Hahlbrock and Sheel, 1989) สอดคล้องกับการศึกษาของ Singh, Sarma and Singh (2003) ในการใช้ *Ps. fluorescens* Pf4 และ *Ps. aeruginosa* Pag ซึ่งเป็นแบคทีเรียรอบรากพืชที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ฉีดพ่นบนใบของ *Cicer arietinum* สามารถชักนำให้มีการสะสมสารประกอบฟีนอลรวมเพิ่มขึ้นมากกว่าตัวควบคุม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Basha, et al. (2006) ที่ใช้ *Ps. fluorescens* Pf4 และ *Ps. aeruginosa* Pag ฉีดพ่นบนใบของ *C. arietinum* ที่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน

ในขณะที่ปริมาณสาร 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-Z-6'-enecosamide) sphingosine ของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ไม่จุ่มสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA มีปริมาณเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 0.70 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่าปริมาณของสาร 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-Z-6'-enecosamide)sphingosine มีแนวโน้มตามปริมาณเฉลี่ยของคลอโรฟิลล์ เอ ที่ได้จากวิธีการสกัด เมื่อปริมาณเฉลี่ยคลอโรฟิลล์ เอเพิ่มขึ้นปริมาณของสาร 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-Z-6'-enecosamide)sphingosine เพิ่มขึ้นตามไปด้วย เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ จากความสัมพันธ์ระหว่างคอลโรฟิลล์ เอและปริมาณสารสำคัญสอดคล้องกับการศึกษาของ Karalija and Paric (2011) ใน *Thymus vulgaris* L. ที่ปริมาณของ anthocynins เป็นสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นตามปริมาณของคลอโรฟิลล์ ในขณะที่ปริมาณของฟลาโวนอยด์

ลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Danova, et al. (2009) ใน *Pulsatilla* sp. ที่สังเกตเห็นความสัมพันธ์ของปริมาณ anthocynins สารประกอบฟีนอลรวม และฟลาโวนอยด์ เพิ่มขึ้นตามปริมาณของคลอโรฟิลล์

**ข้อเสนอแนะ**

จากการศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ทำให้ได้ข้อมูลและแนวทางในการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จากการทดลอง พบว่า ทั้งน้ำหมักที่มีสารประกอบ IAA และตัวเซลล์ของแบคทีเรีย มีผลต่อการกระตุ้นการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการเจริญเกิดยอด ใบ และเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญของรากที่ไม่มีความแตกต่างกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด IAA ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การผลิตน้ำหมักที่มีสารประกอบ IAA และตัวเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลอง ต้องเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียผลิตสารประกอบ IAA และตัวเซลล์แบคทีเรียได้ปริมาณมาก ดังนั้นควรมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารประกอบ IAA เพิ่มเติมจากในการศึกษานี้ที่ศึกษาเพียงค่า pH และแหล่งไนโตรเจน อาจต้องศึกษาบางสภาวะเพิ่มเติม เช่น อุณหภูมิ อัตราการเขย่า ปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เป็นต้น นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารประกอบ IAA ในน้ำหมักยังสามารถทำให้เพิ่มขึ้นได้ โดยนำน้ำหมักไปลดปริมาตรหรือนำไปทำระเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) หรืออาจนำน้ำหมักไปสกัดแยกเฉพาะสารประกอบ IAA ด้วยตัวทำละลายก่อนทำให้แห้ง เพื่อสะดวกสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป และที่น่าสนใจการใช้น้ำหมักผสมกับอาหารวุ้น สามารถกระตุ้นการเจริญของรากของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ดีกว่าการใช้น้ำหมักผสมกับอาหารสูตร MS(1962) จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับการกระตุ้นการเกิดรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไม่จำกัดเพียงแต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่งเท่านั้น อาจศึกษาการนำไปใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชชนิดอื่น ๆ หรืออาจศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นให้เกิดรากในกิ่งตอนหรือการปักชำ รวมทั้งยังอาจศึกษาเกี่ยวกับความแข็งแรงของต้นกล้าหลังจากได้รับแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในการเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้



# บรรณานุกรม

# บรรณานุกรม


คำนูญ กาญจนภูมิ. (2544). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีรวุฒิ คูหะเปรมะ. (2556). การจัดทำแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ. **วารสารโรคมะเร็ง**, 33(1), 1-3.

ธีระ ซีโวนรินทร์, อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ และ คริสโตเฟอร์ ไวล์ด. (2541). ผลของสารสกัดจากตะไคร้และหญ้าปักกิ่งต่อระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ ในหนูขาวที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง. **เชียงใหม่เวชสาร**, 37(1-2), 11-19.

นันทนา อังกินันทน์. (2549). **ฮอร์โมนพืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิมลวรรณ ทัพยุทธพิจารณ์, เพียงจิต สัตตบุศย์ และพรรณี พิเดช. (2534). พิษกึ่งเรื้อรังของหญ้าปักกิ่งในหนูขาว. **สารศิริราช**, 43(8), 529-533.

พิมลวรรณ ทัพยุทธพิจารณ์, วัลลา วามนัฐจินดา และพรรณี พิเดช. (2534). การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของหญ้าปักกิ่งในหนูขาว. **สารศิริราช**, 43(8), 458-462.

เยาวเรศ อินทิยศ, ทาเคมิ คิโนะอุจิ, อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ และ โยชินาริ โอนิชิ. (2542). ผลของสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งต่อการเกิด Aberrant Crypt Foci และ DNA Adduct ในลำไส้ใหญ่ของหนูขาว. **เชียงใหม่เวชสาร**, 38(1-2), 1-6.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. (2545). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค** (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราภรณ์ ภูตะลุม. (2551). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศูนย์พัฒนาการแพทย์แผนไทย. (2549). **พฤกษาชาติสมุนไพร**. กรุงเทพฯ: สามเจริญพาณิชย์.

สมภพ ประธานธุรารักษ์ (ผู้บรรยาย). (21 พฤษภาคม 2554). วัตถุสมุนไพรที่มีคุณภาพ: กรณีศึกษาขมิ้นชัน. ใน **งานเสวนาขมิ้นชันกินทุกวันป้องกันมะเร็ง**. ปราจีนบุรี: มูลนิธิโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร.

สาคร พรประเสริฐ, ขนิษฐา พันธุรี และอุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ. (2544). ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์และความเป็นพิษของหญ้าปักกิ่งต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว. **เชียงใหม่เวชสาร**, 40(4), 195-203.

สุภาภรณ์ ปิติพร และสุดใจ พรหมเกิด. (2555). **หญ้าปักกิ่ง : สมุนไพรทางเลือกของผู้ป่วยโรคมะเร็ง** (พิมพ์ครั้งที่ 6). กรุงเทพฯ: แปลนพริ้นติ้ง.

Abanda-Nkpwatt, D., Musch, M., Tschiersch, J., Boettner, M. and Schwab, W. (2006) Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of Experimental Botany**, 57(5), 4025–4032.

Abdelmageed, A. H. A., Faridah, Q. Z., Norhana, F. M. A., Julia, A. A. and Kadir, M. A. (2011). Micropropagation of *Etlingera elatior* (Zingiberaceae) by using axillary bud explants. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5(18), 4465-4469.

Acuna, J. J., Jorquera, M. A., Martinez, O. A., Menezes-Blackburn, D., Fernandez, M. T., Marschner, P., et al. (2011). Indole Acetic Acid and Phytase Activity Produced by Rhizosphere Bacilli as Affect by pH and Metals. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 11(3), 1-12.

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). Efficacy of Bacterial Auxin on In vitro Growth of *Brassica oleracea* L. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23(6), 779-784.

Ali, B. and Hasnain, S. (2007). Potential of Bacterial Indole Acetic Acid to Induce Adventitious Shoots in Plant Tissue Culture. **Letters in Applied Microbiology**, 45(2), 128-133.

Ali, S. and Tariq, A. (2013). Analysis of Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Momordica charantia* cv. Jaunpuri. **BIOLOGIA (PAKISTAN)**, 59 (1), 23-32.

Ali, S., Charles, T. C. and Glick, B. R. (2012). Delay of Flower Senescence by Bacterial Endophytes Expressing 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Deaminase. **Journal of Applied Microbiology**, 113(5), 1139-1144.

Al-Sane, K. O., Shibli, R. A., Freihat, N. M. and Hammouri, M. K. (2005). Cell Suspension Culture and Secondary Metabolites Production in African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, 1(1), 84-92.

Amaratunga, K., Goodwin, P. M., O'Connor, D. and Anthony, C. (1997). The Methanol Oxidation Genes *maxFJGIR(S)ACKLD* in *Methylobacterium extorquens*. **FEMS Microbiology Letters**, 146(1), 31-38.

Anasori, P. and Asghari, G. (2008). Effects of Light and Differentiation on Gingerol and Zingiberene Production in Callus Culture of *Zingiber officinale* Rosc. **Research in Pharmaceutical Sciences**, 3(1): 59-63.

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.

Anthony, C. (1982). The bacteria oxidation of methane, methanol, formaldehyde and formate. In C. Anthony (Ed.), **The Biochemistry of Methylotrophs** (pp.152-194). New York: Academic Press.

Apine, O. A. and Jadhav, J. P. (2011). Optimization of Medium for Indole-3-Acetic Acid Production Using *Pantoea agglomerans* strain PVM. **Journal of Applied Microbiology**, 110(5), 1235-1244.

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.

Aslam, J., Mujib, A. and Sharma, M. P. (2013). *In vitro* micropropagation of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast: An important indoor ornamental plant. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 20(1), 63–68.

Azlin, C. O., Amir, H. G., Keng, C. L. and Zamzuri, I. (2007). Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Root Formation and Growth of Tissue Cultured Oil Plam (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Biotechnology**, 6(4), 549-554.

Basha, S. A., Sarma, B. K., Singh, D. P. and Singh, U. P. (2006). Differential Methods of Inoculation of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Induce Synthesis of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Phenolic Compounds Differentially in Chickpea. **Folia Microbiology**, 51(5), 463-468.

Bharucha, U. and Patel, K. (2013). Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). **Agricultural Research**, 2(3), 215-221.

Brandl, M. T. and Lindow, S. E. (1997). Environmental Signals Modulate the Expression of an Indole-3-Acetic Acid Biosynthetic Gene in *Erwinia herbicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 10(4), 499-505.

Brandl, M. T. and Lindow, S. E. (1998). Contribution of Indole-3-acetic Acid Production to the Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(9), 3256–3263.

Brandl, M. T. and Lindow, S. E. (1996). Cloning and Characterization of a Locus Encoding an Indolepyruvate Decarboxylase Involved in Indole-3-acetic Acid Synthesis in *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, 62(11), 4121-4128.

Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A. and Willmitzer, L. (2013). Trichoderma-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. **PLOS Pathogens**, 9(1), e1003221.

Bunster, L., Fokkema, N. J. and Schippers, B. (1989). Effect of Surface-active *Pseudomonas* spp. on Leaf Wettability. **Applied and Environmental Microbiology**, 55, 1340–1345.

Cecagno, R., Fritsch, T. E. and Schrank, I. S. (2015). The Plant Growth-Promoting Bacteria *Azospirillum amazonense*: Genomic Versatility and Phytohormone Pathway. **Biomed Research International**, 2015(1), Article ID 898592.

Chandel, S. C. R. and Pandey, S. K. (2014). Effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate in *In-vitro* plant regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 3(12), 801-806.

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(3-4), 222-225.

Chen, C. C., Chang, H. C., Kuo, C. L., Agrawal, D. C., Wu, C. R. and Tsay, H. S. (2014). *In vitro* Propagation and Analysis of Secondary Metabolites in *Glossogyne tenuifolia* (Hsiang-Ju) - a Medicinal Plant Native to Taiwan. **Botanical Studies**, 55, 45.

Cheng, Z., Duncker, B. P., McConkey, B. J. and Glick, B. R. (2008). Transcriptional Regulation of ACC Deaminase Gene Expression in *Pseudomonas putida* UW4. **Canadian Journal of Microbiology**, 54(2), 125-136.

Chinnadurai, C., Balachandar, D. and Sundaram, S. P. (2009). Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producing methylobacteria from phyllosphere of rice and their role in ethylene regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25(8), 1403–1411.

Chistoserdova, L. (2011). Modularity of Methylotrophy, Revisited. **Environmental Microbiology**, 13(10), 2603-2622.

Chistoserdova, L., Crowther, G. J., Vorholt, J. A., Skovran, E., Portais, J. C. and Lidstrom, M. E. (2007). Identification of a Fourth Formate Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 and Confirmation of the Essential Role of Formate Oxidation in Methylotrophy. **Journal of Bacteriology**, 189(24), 9076-9081.

Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M. G. and Lidstrom, M. E. (2005). C1-Transfer Modules: from Genomics to Ecology. **ASM News**, 71(11), 521-528.

Corpe, W. A. (1985). A Method for Detecting Methylotrophic Bacteria on Solid Surfaces. **Journal of Microbiological Methods**, 3(3-4), 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(4), 243-250.

Crowther, G. J., Kosaly, G. and Lidstrom, M. E. (2008) Formate as the Main Branch Point for Methylotrophic Metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1. **Journal of Bacteriology**, 190(14), 5057-5062.

Danova, K., Bertoli, A., Pistelli, L., Dimitrov, D. and Pistelli, L. (2009). In vitro Culture of Balkan Endemic and Rare Pulsatilla Species for Conservational Purposes and Secondary Metabolites Production. **Botanica Serbica**, 33(2), 157-162.

Datta, C. and Basu, P. S. (2000). Indole Acetic Acid Production by *Rhizobium* Species from Root Nodules of a Leguminous Shrubm *Cajanus cajan*. **Microbiological Research**, 155(2), 123-127.

Davies, P. J. (2004). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Function. In P. J. Davies (Ed.), **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action** (pp.1-15). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

De Vos, M., Kriksunov, K. L. and Jander, G. (2008). Indole-3-Acetonitrile Production from Indole Glucosinolates Deters Oviposition by *Pieris rapae*. **Plant Physiology**, 146(1), 916-926.

Debnath, M., Malik, C. P. and Bisen, P. S. (2006). Micropropagation: A Tool for the Production of High Quality Plant-based Medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 7(1), 33-49.

Devi, R. P., Sundaram, S. P. and Poorniammal, R. (2010). Effect of Facultative Methyltrophs on Tissue Culturing of Rice. **Asian Journal of Bio Science**, 4(2), 207-209.

Di Fiore, S., Li, Q., Leech, M. J., Schuster, F., Emans, N., Fischer, R. and Schillberg, S. (2002). Targeting Tryptophan Decarboxylase to Selected Subcellular Compartments of Tobacco Plants Affects Enzyme Stability and *in vivo* Function and Leads to a Lesion-mimic Phenotype. **Plant Physiology**, 129(3), 1160-1169.

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-Acetic Acid in Plant- Microbe Interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, 106(1), 85-125.

Dworkin, M. and Foster, J. W. (1958). Experiments with Some Microorganisms Which Utilize Ethane and Hydrogen. **Journal of Bacteriology**, 75(5), 592-603.

Ebrahim, N., Shibli, R., Makhadmeh, I., Shatnawi, M. and Abu-Ein, A. (2007). *In vitro* Propagation and *In vivo* Acclimatization of Three Coffee Cultivars (*Coffea arabica* L.) From Yemen. **World Applied Sciences Journal**, 2(2), 142-150.

El Tigani, S. and Ahmed, S. S. (2009). *Solenostemma argel* Tissue Culture for Production of Secondary Metabolites. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 7(1), 19-23.

El-Mahrouk, M. E. and Belal, E. B. A. (2007). Production of Indole Acetic Acid (Bioauxin) from *Azotobacter* sp. Isolate and Its Effect on Callus Induction of *Dieffenbachia maculate cv. Marianne*. **Acta Biologica Szegdiensis**, 51(1), 53-59.

Fedorov, D. N., Doronina, N. V., and Trotsenko, Yu. A. (2010). Cloning and Charecterization of Indolepyruvate decarboxylase from *Methylobacterium extorquens* AM1. **Biochemistry (Moscow)**, 75(12), 1435-1443.

Frebort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frebortova, J. and Galuszka, P. (2011). Evolution of Cytokinin Biosynthesis and Degradation, **Journal of Experimental Botany**, 62(8), 2431-2452.

Gaffe, J., Tieman, D. M. and Handa, A. K. (1994). Pectin Methylesterase Isoforms in Tomato *(Lycopersicon esculentum)* Tissues. **Plant Physiology**, 105(1), 199-203.

Gal, M., Preston, G. M., Massey, R. C., Spiers, A. J. and Rainey, P. B. (2003). Genes Encoding a Cellulosic Polymer Contribute Toward the Ecological Success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on Plant Surfaces. **Molecular Ecology**, 12(11), 3109–3121.

Galih, P. R. and Esyanti, R. R. (2014). Effect of Immobilization on Cell Growth and Alkaloid Contents in Cell-Aggregate Culture of *Eurycoma longifolia* Jack. **International Journal of Chemical, Environmental and Biological Sciences (IJCEBS)**, 2(2), 90-93.

Glass, N. L. and Kosuge, T. (1986). Cloning of the Gene for Indoleacetic Acid-Lysine Synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp *savastonoi*. **Journal of Bacteriology**, 166(2), 598-603.

Glick, B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, 251(1), 1–7.

Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC Deaminase can Promote Plant Growth and Help to Feed the World. **Microbiological Research**, 169(1), 30-39.

Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J. and Duan, J. (2007). Promotion of Plant Growth by ACC Deaminase-producing Soil Bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, 119(3), 329-339.

Glick, B. R., Jacobson, C. B., Schwarze, M. M. K. and Pasternak, J. J. (1994). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Deaminase Mutants of the Plant Growth Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not Stimulate Canola Root Elongation. **Canadian Journal of Microbiology**, 40(11), 911-915.

Glick, B. R., Penrose, D. M. and Li, J. (1998). A Model for the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, 190(1), 63–68.

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.

Goldsmith, M. H. M. (1977). The Polar Transport of Auxin. **Annual Review of Plant Physiology**, 28(1), 439-478.

Gopi, C. and Vatsala, T. M. (2006). *In vitro* Studies on Effects of Plant Growth Regulators on Callus and Suspension Culture Biomass Yield from *Gymnema sylvestre R.Br.* **African Journal of Biotechnology**, 5(12), 1215-1219.

Gopitha, K., Bhavani, A. L. and Senthilmanickam, J. (2010). Effect of the Different Auxins and Cytokinins in Callus Induction, Shoot, Root Regeneration in Sugarcane. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 1(3), 1-7.

Grech-Baran, M. and Pietrosiuk, A. (2012). *Artemisia* Species *in vitro* Cultures for Production of Biologically Active Secondary Metabolites. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, 93(4), 371-380.

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.

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.

Grichko, V. P. and Glick, B. R. (2000). Identification of DNA Sequences that Regulate the Expression of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Deaminase Gene. **Canadian Journal of Microbiology**. 46(12), 1159-1165.

Hadiwiyono and Widono, S. (2012). Endophytic Bacillus: the Potentiality of Antagonism to Wilt Pathogen and Promoting Growth to Micro-Plantlet of Banana in Vitro. **Biomirror**, 3(6), 1-4.

Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1989). Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 40(1), 347-369.

Hamad, A. H. M., Taha, R. M. and Mohajer, S. (2013). *In vitro* induction and proliferation of adventitious roots in pineapple (*Ananas comosus* L.) cultivars of smooth cayenne and morris. **Australian Journal of Crop Science**, 7(7), 1038-1045.

Hansen, B. G. and Halkier, B. A. (2005). New Insight into the Biosynthesis and Regulation of Indole Compounds in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, 221(5), 603-606.

Harikrishnan, H., Shanmugaiah V. and Balasubramanian, N. (2014). Optimization for Production of Indole Acetic Acid (IAA) by Plant Growth Promoting *Streptomyces* sp VSMGT1014 Isolated from Rice Rhizosphere. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 3(8), 158-171.

Harley, P., Greenberg, J., Niinemets, U. and Guenther, A. (2007). Environmental Controls Over Methanol Emission from Leaves. **Biogeosciences**, 4(6), 1083-1099.

Hartmann, A., Singh, M. and Klingmuller, W. (1983). Iaolation and Characterization of *Azospirillum* Mutants Excreting High Amounts of Indoleacetic Acid. **Canadian Journal of Microbiology**, 29(8), 916-923.

Hellmuth, J. and Kutschera, U. (2008). The Effect of Growth-promoting Methylobacteria on Seedling Development in *Ginkgo biloba* L. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, 82(1), 26-29.

Heyl, A., Werner, T. and Schmulling, T. (2006). Cytokinin Metabolism and Signal Transduction. In P. Hedden, and S. G. Thomas (Eds.), **Plant Hormone Signaling** (pp.93-123). Blackwell Publishing.

Honma, M. and Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, 42(10), 1825-1831.

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(6), 682-687.

Hristova, L., Damyanava, E., Doichinova, Z. and Kapchina-Toteva, V. (2013). Effect of 6-Benzylaminopurine on Micropropagation of *Artemisia Chamaemelifolia* Vill. (*Asteraceae*). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 19(2), 57–60.

Hull, A. K., Vij, R. and Celenza, J. L. (2002). *Arabidopsis* Cytochrome P450s that Catalyze the First Step of Tryptophan-dependent Indole-3-acetic Acid Biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 97(5), 2379–2384.

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.

Huve, K., Christ, M. M., Kleist, E., Uerlings, R., Niinemets, U., Walter, A. and Wildt, J. (2007) Simultaneous growth and emission measurements demonstrate an interactive control of methanol release by leaf expansion and stomata. **Journal of Experimental Botany**, 58(7), 1783–1793.

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, Y. A. (2000). Facultative and Obligate Aerobic Methylobacteria Synthesize Cytokinins. **Microbiology**, 69(6), 646-651.

Jacobson, C. B., Pasternak, J. J. and Glick, B. R. (1994). Partial Purification and Characterization of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Deaminase from the Plant Growth Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Canadian Journal of Microbiology**, 40(12), 1019-1025.

Jafari, N., Othman. R. Y. and Khalid, N. (2011). Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on *in vitro* shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. **African Journal of Biotechnology**, 10(13), 2446-2450.

Janarthine, S. R. S. and Eganathan, P. (2012). Plant Growth Promoting of Endophytic *Sporosarcina aquimarina* SjAM16103 Isolated from the Pneumatophores of *Avicennia marina* L. **International Journal of Microbiology**, Article ID 532060.

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.

Jasim, B., Jimtha, C., Shimil, V., Jyothis, M. and Radhakrishnan, E. K. (2014). Studies on the Factors Modulating Indole-3-Acetic Acid Production in Endophytic Bacterial Isolates from *Piper nigrum* and Molecular Analysis of *ipdc* Gene. **Journal of Applied Microbiology**, 117(3), 786-799.

Jasim, B., Joseph, A. A., John, C. J., Mathew, J. and Radhakrishnam, E. K. (2014). Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria from the Rhizome of *Zingiber officinale*. **3 Biotech**, 4(2), 197-204.

Jiratchariyakul, W., Okabe, H., Moongkarndi, P. and Frahm, A. W. (1998). Cytotoxic Glycosphingolipid from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao & Kam. **Thai Journal of Phytopharmacy**, 5(1), 10-20.

Jiratchariyakul, W., Vongsakul , M., Sunthornsuk, L., Moongkarndi, P., Narintorn, A., Somanabandhu, A., et al. (2006). Immunomodulatory Effect and Quantitation of Cytotoxic Glycosphingolipid from *Murdannia loriformis*. **Journal of Natural Medicines**, 60(3), 210-216.

Jones, D. H. (1984). Phenylalanine Ammonia Lyase: Regulation of Its Induction and Its Role in Plant Development. **Phytochemistry**, 23(7), 1349-1359.

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.

Kalyaeva, M. A., Zacharchenko, N. S., Doronina, N. V., Rukavtsova, E. B., Ivanova, E. G., Alekseeva, V. V., et al. (2001). Plant Growth and Morphogenesis in vitro Is Promoted by Associative Methylotrophic Bacteria. **Russian Journal of Plant Physiology**, 48(4), 596-599.

Karalija, E. and Paric, A. (2011). The Effect of BA and IBA on the Secondary Metabolite Production by Shoot Culture of Thymus vulgaris L. **Biologica Nyssana**, 2(1), 29-35.

Karalija, E. and Paric, A. (2011). The Effect of BA and IBA on the Secondary Metabolite Production by Shoot Culture of *Thymus vulgaris* L. **Biologica Nyssana**, 2(1), 29-35.

Kato, Y., Yoshida, S. and Asano, Y. (2005). Polymerase Chain Reaction for Identification of Aldoxime Dehydratase in Aldoxime- or Nitrile-degrading Microorganisms. **FEMS Microbiology Letter**, 246(2), 243-249.

Kim, M-S., Schumann, C. M. and Klopfenstein, N. B. (1997). Effects of thidiazuron and benzyladenine on axillary shoot proliferation of three green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) clones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 48(1), 45–52.

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(2), 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(6), 719-728.

Kobayashi, M., Izui, H., Nagasawa, T. and Yamada, H. (1993). Nitrilase in Biosynthesis of the Plant Hormone Indole-3-acetic Acid from Indole-3-acetonitrile: Cloning of the *Alcaligenes* gene and Site-directed Mutagenesis of Cysteine Residues. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 90(1), 247-251.

Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M. and Shimizu, S. (1995). Occurrence of Enzymes Involved in Biosynthesis of Indole-3-acetic acid from Indole-3-Acetonitrile in Plant-associated Bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 92(3), 714-718.

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(1), 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(7), 347-349.

Last, R. L., Bissinger, P. H., Mahoney, D. J., Radwanski, E. R. and Fink, G. R. (1991). Tryptophan Mutants in *Arabidopsis*: the Consequences of Duplicated Tryptophan Synthase Beta Genes. **Plant Cell**, 3(4), 345-358.

Li, J. and Glick, B. R. (2001). Transcriptional Regulation of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase Gene (*acdS*). **Canadian Journal** of Microbiology, 47(4), 359-367.

Li, J., Ovakim, D. H., Charles, T. C. and Glick, B. R. (2000). An ACC Deaminase Minus Mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no Longer Promotes Root Elongation. **Current Microbiology**, 41(2), 101-105.

Lindow, S. E. and Brandl, M. T. (2003) Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(4), 1875–1883.

Ljung, K. (2013). Auxin Metabolism and Homeostasis During Plant Development. **Development**, 140(5), 943-950.

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. and Polacco, J. (1997). **Cytokinin Production by Plant-associated Methylotrophic Bacteria**, Retrieved March 6, 2013, from http://abstracts.aspb.org/pb1997/public/P54/1471.shtml.

Ma, W., Guinel, F. C. and Glick, B. R. (2003). *Rhizobium leguminosarum* Biovar viciae 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Promotes Nodulation of Pea Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(8), 4396-4402.

Madhaiyan, M., Poongnzhali, S., Senthilkumar, M., Seshadri, S., Chung, H., Yang, j., et al. (2004). Growth Promotion and Induction of Systemic Resistance in Rice Cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei**, 45(1), 315-324.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S. and Sa, T. (2007). Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase Containing *Methylobacterium oryzae* and Interactions with Auxin and ACC regulation of Ethylene in Canola (*Brassica campestris*). **Planta**, 226(4), 867-876.

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.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, H. S., Hari, K., Sundaram, S. P. and Sa, T. M. (2005). Pink-pigmented Facultative Methylotrophic Bacteria Accelerate Germination, Growth and Yield of Sugarcane Clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, 41(5), 350-358.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Ryu, J. and Sa, T. (2006). Regulation of Ethylene Levels in Canola (*Brassica campestris*) by 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase-Containing *Methylobacterium fujisawaense*. **Planta**, 224(2), 268–278.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthilkumar, M., Seshadri. S., Chung, H., Yang, J., et al. (2004). Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (Oryza sativa L.) by *Methylobacterium* sp. **Botanical Bulletin- Academia Sinica**, 45(4), 315-324.

Mahesh, R., Muthuchelian, K., Maridass, M. and Raju, G. (2012). *In Vitro* Propagation of Commelina ensifolia R. Br. **Botanical Report**, 1(1), 10-13.

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 PInt. **Microbs and Environments**, 23(2), 109-117.

Mano, Y. and Nemoto, K. (2012). The Pathway of Auxin Biosynthesis in Plants. **Journal of Experimental Botany**, 63(8), 2853-2872.

Mano, Y., Nabeshima, S., Matsui, C. and Ohkawa, H. (1986). Production of Tropane Alkaloids by Hairy Root Cultures of *Scopolia japonica*. **Agricultural and Biological Chemistry**, 50(11), 2715-2722.

Mano, Y., Nemoto, K., Suzuki, M., Seki, H., Fujii, I. and Muranaka, T. (2010). The AMI1 Gene Family: Indole-3-acetamide Hydrolase Functions in Auxin Biosynthesis in Plants. **Journal of Experimental Botany**, 61(1), 25-32.

Manulis, S., Haviv-Chesner, A., Brandl, M. T., Lindow, S. E. and Barash, I. (1998). Differential Involvement of Indole-3-acetic Acid Biosynthetic Pathways in Pathogenicity and Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 11, 634–642.

Martinez-de la Cruz, E., Garcia-Ramirez, E., Vazquez-Ramos, J. M., Reyes de la Cruz, H. and Lopez-Bucio, J. (2015). Auxins differentially regulate root system architecture and cell cycle protein levels in maize seedlings. **Journal of Plant Physiology**, 176(1), 147–156.

Maxwell, B. B. and Kieber, J. J. (2004). Cytokinin Signal Transduction. In P. J. Davies (Ed.), **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action** (pp.321-349). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Meena, K. K., Kumar, M., Kalyuzhnaya, M. G., Yandigeri, M. S., Singh, D. P., Saxena, A. K. et al. (2012). Epiphytic Pink-pigmented Methylotrophic Bacteria Enhance Germination and Seedling Growth of Wheat (*Triticum aestivum*) by Producing Phytohormone. **Antonie van Leeuwenhoek**, 101(4), 777-786.

Meena, M. C., Meena, R. K. and Patni, V. (2014). Effect of Elicitor on Quercetin Production in Cell Cultures of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad . **The Pharma Innovation – Journal**, 3(2), 18-23.

Meenakshi, B. C. and Savalgi, V. P. (2009). Effect of Co-inoculation of Methylobacterium and B. japonicum on Plant Growth Dry Matter Content and Enzyme Activities in Soybean. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, 22(2), 344-348.

Mehta, M., Ram, R. and Bhattacharya, A. (2014). A Simple and Cost Effective Liquid Culture System for the Micropropagation of Two Commercially Important Apple Rootstocks. **Indian Journal of Experimental Biology**, 52(7), 748-754.

Mercier, J. and Lindow, S. E. (2000). Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 369–374.

Mikkelsen, M. D., Fuller, V. L., Hansen, B. G., Nafisi, M., Olsen, C. E., Nielsen, H. B. and Halkier, B. A. (2009). Controlled Indole-3-acetaldoxime Production through Ethanol-induced Expression of CYP79B2. **Planta**, 229(6), 1209-1217.

Mikkelsen, M. D., Hansen, C. H., Wittstock, U. and Halkier, B. A. (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* Catalyzes the Conversion of Tryptophan to Indole-3-acetaldoxime, a Precursor of Indole Glucosinolates and Indole-3-acetic Acid. **Journal of Biological Chemistry**, 275(43), 33712-33717.

Mizuno, M., Yurimoto, H., Yoshida, N., Iguchi, H. and Sakai, Y. (2012). Distribution of Pink-Pigmented Facultative Methylotrophs on Leaves of Vegetables. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry**, 76(3), 578-580.

Monemi, M. B., Kazemitabar, S. K., Khaniki, G. B., Yasari, E., Sohrevardi, F. and Pourbagher, R. (2014). Tissue Culture Study of The Medicinal Plant Leek (*Allium ampeloprasum* L.). **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, 3(2), 1-8.

Morris, C. E., Monier, J. M. and Jacques, M. A. (1997). Methods for Observing Microbial Biofilms Directly on Leaf Surfaces and Recovering them for Isolation of Culturable Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology,** 63, 1570–1576.

Morris, D. A., Friml, J. and Zazimalova, E. (2004). The Functioning of Hormones in Plant Growth and Development. In P. J. Davies (Ed.), **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action** (pp.437-470). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Muangkaewngam, A. (2014). Effect of Plant Growth Regulators on *In Vitro* Culture of Torch Ginger (*Etlingera elatior*). **Songklanakarin Journal of Plant Science,** 1(1), 10-13.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. **Physiologia Plantarum,** 15(3), 473-497.

Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C. J., Glawischnig, E., Olsen, C. E., Halkier, B. A. and Glazebrook, J. (2007). *Arabidopsis* Cytochrome P450 monooxygenase 71A13 Catalyzes the Conversion of Indole-3-acetaldoxime in Camalexin Synthesis. **Plant Cell,** 19(6), 2039-2052.

Nagasawa, T., Mauger, J. and Yamada, H. (1990). A novel Nitrilase, Arylacetonitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3. Purification and Characterization. **European Journal of Biochemistry,** 194(3), 765-772.

Nalawade, S. M. and Tsay, H. S. (2004). *In Vitro* Propagation of Some Important Chinese Medicinal Plants and Their Substainable Usage. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant,** 40(2), 143-154.

Nematolahi, O., Mortazaeinezhad, F. and Radnezhad, H. (2015). Evaluation of Secondary Metabolites Contents in Different Explants of Galbanum Medicinal Plant *in vitro* Culture. **Biological Forum – An International Journal,** 7(2), 86-93.

Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R. C., Franzen, J. J., Wojciechowski, C. L. and Fall, R. (1995). Methanol Emission from Leaves. **Plant Physiology,** 108(4), 1359-1368.

Neumann, K. H., Kumar, A. and Imani, J. (2009). **Plant Cell and Tissue Culture- A Tool in Biotechnology: Basics and Application.** Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Niyoki, K. K. and Fink, G. R. (1992). Two Anthranilate Synthase Genes in Arabidopsis: Defense-related Regulation of the Tryptophan Pathway. **Plant Cell,** 4(6), 721-733.

Normanly, J. (2010). Approaching Cellular and Molecular Resolution of Auxin Biosynthesis and Metabolism. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,** 2(1), a001594.

North, J. J. and Ndakidemi, P. A. (2012). Evaluation of Different Ratios of Auxin and Cytokinin for the In vitro Propagation of Streptocarpus rexii Lindl. **International Journal of The Physical Sciences,** 7(7), 1083-1087.

Oberhansli, T., Dfago, G. and Haas, D. (1991). Indole-3-acetic Acid (IAA) Synthesis in the Biocontrol Strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: Role of Tryptophan Side Chain Oxidase. **Journal of General Microbiology,** 137(10), 2273-2279.

Omer, Z. S., Tombolini, R. and Gerhardson, B. (2004). Plant Colonization by Pink-Pigmented Facultative Methylotrophic Bacteria (PPFMs). **FEMS Microbiology Ecology,** 47(3), 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(1), 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.

Ostin, A., Kowalyczk, M., Bhalerao, R. P. and Sandberg, G. (1998). Metabolism of Indole-3-acetic Acid in Arabidopsis. **Plant Physiology,** 118(1), 285-296.

Ouyang, J., Shao, X. and Li, J. (2000). Indole-3-glycerol Phosphate, A Branchpoint of Indole-3-acetic Acid Biosynthesis from the Tryptophan Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, 24(3), 327-333.

Paciorek, T. and Friml, J. (2006). Auxin Signaling. **Journal of Cell Science**, 119(7), 1199-1202.

Patil, N. B., Gajbhiye, M., Ahiwale, S. S., Gunjal, A. B. and Kapadnis, B. P. (2011). Optimization of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production by Acetobacter diazotrophicus L1 Isolated from Sugarcane. **International Journal of Environmental Sciences**, 2(1), 307-314.

Patten, C. L. and Glick, B. R. (1996). Bacterial Biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, 42(3), 207-220.

Patten, C. L. and Glick, B. R. (2002). Regulation of Indoleacetic Acid Production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by Tryptophan and the Stationary-phase Sigma Factor RpoS. **Canadian Journal of Microbiology**, 48(7), 635-642.

Penrose, D. M. and Glick, B. R. (2003). Methods for Isolating and Characterizing ACC Deaminase-containing Plant Growth-promoting Rhizobacteria. **Physiologica Plantarum**, 118(1), 10-15.

Penrose, D. M., Moffatt, B. A. and Glick, B. R. (2001). Determination of 1-Aminocycopropane-1-carboxylic Acid (ACC) to Assess the Effects of ACC Deaminase-Containing Bacteria on Roots of Canola Seedlings. **Canadian Journal of Microbiology**. 47(1), 77-80.

Perley, J. E. and Stowe, B. B. (1966). On the Ability of *Taphrina deformans* to Produce Indole Acetic Acid from Tryptophan by Way of Tryptamine. **Plant Physiology**, 41(2):234-237.

Peyraud, R., Schneider, K., Kiefer, P., Massou, S., Vorholt, J. A. and Portais, J. C. (2011) Genomescale reconstruction and system level investigation of the metabolic network of *Methylobacterium extorquens* AM1. **BMC Systems Biology**, 5;189.

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.

Pollmann, S., Düchting, P. and Weiler, E. W. (2009). Tryptophan-dependent Indole-3-acetic Acid Biosynthesis by 'IAA-synthase' Proceeds via Indole-3-acetamide. **Phytochemistry**, 70(4), 523-531.

Prashanth, K. S., Mandahasan, A., Vijaya, K. S., Dhirendra, B. S., Shreedhara, C. S. and Manjunath, S. M. (2012). Production of Secondary Plant Metabolite Phyllanthin in *Phyllanthus niruri* Linn. by Leaf Tissue Culture. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, 3(2), 752-761.

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

Prinsen, E., Van Dongen, W., Esmans, E. L. and Van Onckelen, H. A. (1997). HPLC Linked Electrospray Tandem Mass Spectrometry: A Rapid and Reliable Method to Analyse Indole-3-Acetic Acid Metabolism in Bacteria. **Journal of Mass Spectrometry**, 32(1), 12-22.

Quint, M. and Gray, W. M. (2006). Auxin Signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, 9(5), 448-453.

Radha, T. K., Savalgi, V. P. and Alagawadi, A. R. (2009). Effect of Methylotrophs on Growth and Yield of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, 22(1), 118-121.

Radwanski, E. R. and Last, R. L. (1995). Tryptophan Biosynthesis and Metabolism: Biochemical and Molecular Genetics. **The Plant Cell**, 7(7), 921-934.

Rahman, M. A. and Bari, M. A. (2012). Callus Induction and Cell Culture of Castor (*Ricinus communis* L. cv. Shabje). **Journal of *Biological* Sciences**, 20, 161-169.

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(1), 45-53.

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.

Ross, J. J., Tivendale, N. D., Reid, J. B., Davies, N. W., Molesworth, P. P., Lowe, E. K., Smith, J. A. and Davidson, S. E. (2011). Reassessing the Role of YUCCAs in Auxin Biosynthesis. **Plant Signaling and Behavior**, 6(3), 437-439.

Sakakibara, H. (2004). Cytokinin Biosynthesis and Metabolism. In P. J. Davies (Ed.), **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action** (pp.95-114). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Saleh, S. S. and Glick, B. R. (2001). Involvement of *gacS* and *rpoS* in Enhancement of the Plant Growth-promoting Capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. **Canadian Journal of Microbiology**, 47(8), 698-705.

Sandal, I., Bhattacharya, A. and Ahuja, P. S. (2001). An Efficient Liquid Culture System for Tea Shoot Proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 65(1), 75-80.

Santoro, M. V., Nievas, F., Zygadlo, J., Giordano, W. and Banchio, E., (2013). Effects of Growth Regulators on Biomass and the Production of Secondary Metabolites in Peppermint (*Mentha piperita*) Micropropagated *in Vitro*. **American Journal of Plant Sciences**, 4, 49-55.

Saraf, M., Jha, C. K. and Patel, D. (2010). The Role of ACC Deaminase Producing PGPR in Sustainable Agriculture. In D. K. Maheshwari (Ed.), **Plant Growth and Health Promoting Bacteria** (PP.365-385). New York: Springer Heidelberg Dordrecht.

Sasirekha, B., Shivakumar, S. and Sullia, S. B. (2012). Statistical Optimization for Improved Indole-3-acetic Acid (iaa) Production by *Pseudomonas aeruginosa* and Demonstration of Enhanced Plant Growth Promotion. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 12(4), 863-873.

Savio, L. E. B., Astarita, L. V. and Santarem, E. R. (2011). Secondary Metabolism in Micropropagated *Hypericum perforatum* L. Grown in Non-Aerated Liquid Medium. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, DOI 10.1007/s11240-011-0058-9.

Scarmuzzi, F., Apollonio, G. and D'emerico, S. (2000). *In Vitro* Propagation of Two Species of Commelinaceae from Bud Cultures and Repeated Subcultures on a Growth Regulator-Free Medium. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 36(5), 379-382.

Schauer, S. and Kutschera, U. (2008). Methylotrophic Bacteria on The Surfaces of Field-Grown Sunflower Plants: A Biogeographic Perspective. **Theory in Biosciences**, 127(1), 23-29.

Schneider, K., Peyraud, R., Kiefer, P., Christen, P., Delmotte, N., Massou, S., Portais, J. C. and Vorholt, J. A. (2012) The ethylmalonyl-CoA pathway is used in place of the glyoxylate cycle by Methylobacterium extorquens AM1 during growth on acetate. **Journal of Biology Chemistry**, 287(1), 757–766.

Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G. and Kroppenstedt, R. M. (2005). Plant–microbe interactions: Identification of Epiphytic Bacteria and their Ability to Alter Leaf Surface Permeability. **New Phytol**, 166, 589–594.

Sebastian, D. P. and Hariharan, M. (2013). Micropropagation of *Heliotropium keralense* - a globally endangered and endemic medicinal plant through indirect organogenesis from roots. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2(7), 56-62.

Seo, M., Akaba, S., Oritani, T., Delarue, M., Bellini, C., Caboche, M. and Koshiba, T. (1998). Higher Activity of an Aldehyde Oxidase in the Auxin-overproducing Superroot1 Mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 116(2), 687-693.

Shetty, M. R., Harisha, G. A., Jayanth, Y. and Kumar, H. G. A. (2014). Production of Secondary Metabolites from *in vitro* Cultures of *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. **International Journal of Scientific Research Engineering & Technology (IJSRET)**, 2(12), 844-852.

Shirokikh, I. G., Shupletsova, O. N. and Shirokikh, A. A. (2007). Assessment of the Effect of Methylotrophic Bacteria on Plants *In vitro*. **Russian Agricultural Sciences**, 33(5), 308–310.

Shokri, D. and Emtiazi, G. (2010). Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production in Symbiotic and Non-Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria and its Optimization by Taguchi Design. **Current Microbiology**, 61(3), 217-225.

Singh, U. P., Sarma, B. K. and Singh, D. P. (2003). Effect of Plant Grpwth-Promoting Rhizobacteria and Culture Filtrate of *Sclerotium rolfsii* on Phenolic and Salicylic Acid Contents in Chickpea (*Cicer arietinum*). **Current Microbiology**, 46(2), 131-140.

Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A. and Manickavasagam, M. (2004). Enhanced Biosynthesis of Withanolides by Elicitation and Precursor Feeding in Cell Suspension Culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in Shake-Flask Culture and Bioreactor. **PLOS ONE**, 9(8), e104005.

Sivanesan, I. and Jeong, B. R. (2009). Micropropagation of *Plumbago zeylanica* L. **African Journal of Biotechnology**, 8(16), 3761-3768.

Smejkalova, H., Erb, T. J. and Fuchs, G. (2010). Methanol Assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1: Demonstration of All Enzymes and Their Regulation. **PLoS ONE**, 5(10), e13001.

Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M. and Vanderleyden, J. (2005). *Azospirillum brasilense*.Produces the Auxin-like Phenylacetic Acid by Using the Key Enzyme for Indole-3-acetic Acid Biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(4), 1803-1810.

Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. (2007). Indole-3-Acetic Acid in Microbial and Microorganism-Plant Signaling. **FEMS Microbology Reviews**, 31(4), 425-448.

Sprunck, S., Jacobsen, H. J. and Reinard, T. (1995). Indole-3-Lactic Acid is a Weak Auxin Analogue but not an Anti-Auxin. **Journal of Plant Growth Regulation**, 14(4), 191-197.

Sridevi, M. and Mallaiah, K. V. (2008). Production of Indole-3-Acetic Acid by *Rhizobium* Isolates from *Sesbania* Species. **Plant Sciences Research,** 1(1), 13-16.

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.

Sun, Y., Cheng, Z. and Glick, B. R. (2009). The Presence of a 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase Deletion Mutation Alters the Physiology of the Endophytic Plant Growth-promoting Bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **FEMS Microbiology Letter,** 296(1), 131-136.

Sundin, G. W. and Jacobs, J. L. (1999). Ultraviolet Radiation (UVR) Sensitivity Analysis and UVR Survival Strategies of a Bacterial Community from the Phyllosphere of Fieldgrown Peanut (*Arachis hypogeae* L.). **Microbial Ecology,** 38(1), 27–38.

Supe, U., Dhote, F. and Royman, M. G. (2006). *In vitro* Plant Regeneration of Withania somnifera. **Plant Tissue Culture and Biotechnology,** 16(2), 111-115.

Supe, W. (2013). Analysis of Anthraquinone by Callus Tissue of *Aloe barbadensis*. **Recent Research in Science and Technology** , 5(2), 54-56.

Swarup, R. and Peret, B. (2012). AUX/LAX Family of Auxin Influx Carriers - an Overview. **Frontiers in Plant Science,** doi: 10.3389/fpls.2012.00225.

Sy, A., Timmers, A. C., Knief, C. and Vorholt, J. A. (2005) Methylotrophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. **Applied and Environmental Microbiology,** 71(11), 7245–7252.

Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W. J. and Prinsen, E. (2004). Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 Modulate Expression of the y4wEFG Locus that is Required for Indole-3-acetic acid Synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** 17(10), 1153-1161.

Tien, T. M., Gaskins, M. H. and Hubbell, D. H. (1979). Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, 37(5), 1016-1024.

Tivendale, N. D., Davies, N. W., Molesworth, P. P., Davidson, S. E., Smith, J. A., Lowe, E. K., Reid, J. B. and Ross, J. J. (2010). Reassessing the Role of *N*-hydroxytryptamine in Auxin Biosynthesis. **Plant Physiology**, 154(4), 1957-1965.

Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G. and Netrusov, A. I. (2007). Bacteria Associated with Orchid Roots and Microbial Production of Auxin. **Microbiological Research**, 162(1), 69-76.

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.

Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., et al. (2004). Expression Islands Clustered on the Symbiosis Island of the *Mesorhizobium loti* Genome. **Journal of Bacteriology**, 186(8), 2439-2448.

Van Dien, S. J., Okubo, Y., Hough, M. T., Korotkova, N., Taitano, T. and Lindow, S. E. (2003) Reconstruction of C(3) and C(4) metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. **Microbiology**, 149(Pt3), 601–609.

Vande Broek, A., Gysegom, P., Ona, O., Hendrickx, N., Prinsen, E., Van Impe, J. and Vanderleyden, J. (2005). Transcriptional Analysis of the *Azospirillum brasilense* Indole-3-pyruvate Decarboxylase Gene and Identification of a Cis-acting Sequence Involved in Auxin Responsive Expression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 18(4), 311-323.

Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K. and Vanderleyden, J. (1999). Auxins Upregulate Expression of the Indole-3-pyruvate Decarboxylase Gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, 181(4), 1338-1342.

Verma, A. K., Singh, R. R. and Singh, S. (2012). Improved Alkaloid Content in Callus Culture of *Catharanthus roseus*. **Botanica Serbica,** 36(2), 123-130.

Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L. and Chet, I. (2010). Characterization of ACC Deaminase from the Biocontrol and Plant Growth-promoting Agent *Trichoderma asperellum* T203. **FEMS Microbiology Letter,** 305(1), 42-48.

Wang, B., Chu, J., Yu, T., Xu, Q., Sun, X., Yuan, J., et al. (2015). Tryptophan–independent Auxin Biosynthesis Contributes to Early Embryogenesis in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** 112(15), 4821-4826.

White, F. F. and Nester, E. W. (1980). Hairy Root: Plasmid Encodes Virulence Traits in *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of Bacteriology,** 141(3), 1134-1141.

Wilson, M., Hirano, S. S. and Lindow, S. E. (1999). Location and Survival of Leaf-associated Bacteria in Relation to Pathogenicity and Potential for Growth within the Leaf. **Applied and Environmental Microbiology,** 65,1435–1443.

Woodward, A. W. and Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, Action, and Interaction. **Annals of Botany,** 95(5), 707-735.

Yamamoto, Y., Kamiya, N., Morinaka, Y., Matsuoka, M. and Sazuka, T. (2007). Auxin Biosynthesis by the YUCCA Genes in Rice. **Plant Physiology,** 143(3), 1362-1371.

Yurimoto, H., Kato, N. and Sakai, Y. (2005). Assimilation, Dissimilation, and Detoxification of Formaldehyde, a Central Metabolic Intermediate of Methylotrophic Metabolism. **The Chemical Record,** 5(6), 367-375.

Yusuf, N. A., Annuar, M. S. M. and Khalid, N. (2013). Existence of Bioactive Flavonoids in Rhizomes and Plant Cell Cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturpfl. **Australian Journal of Corp Science,** 7(6), 730-734.

Zakharova, E. A., Shcherbakov, A. A., Brudnik, VV., Skripko, N. G., Bulkhin, NSh. and Ignatov, VV. (1999). Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry,** 259(3), 572-576.

Zhang, R., Wang, B., Ouyang, J., Li, J. and Wang, Y. (2008). *Arabidopsis* Indole Synthase, a Homolog of Tryptophan Synthase Alpha, is an Enzyme Involved in the Trp-independent Indole-containing Metabolite Biosynthesis. **Journal of Integrative Plant Biology**, 50(9), 1070–1077.

Zhao, Y. (2012). Auxin Biosynthesis: A Simple Two-Step Pathway Converts Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid in Plants. **Molecular Plant**, 5(2), 334-338.

Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D. and Chory, J. (2001). A Role for Flavin Monooxygenase-like Enzymes in Auxin Biosynthesis. **Science**, 291(5502), 306-309.

Zuldin, N. M. M., Said, I. Md., Noor, N. M., Zainal, Z., Kiat, C. J. and Ismail, I. (2013). Induction and Analysis of the Alkaloid Mitragynine Content of a *Mitragyna speciosa* Suspension Culture System upon Elicitation and Precursor Feeding. **The ScientificWorld Journal**, Article ID 209434.

## ภาคผนวก ก สูตรอาหารเพาะเลี้ยงและวิธีการเตรียม

1. อาหารสูตร ammonium mineral salts (AMS) agar

| | | |
|---|---|---|
| $MgSO_4.7H_2O$ | 1.0 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 0.7 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 0.54 | กรัม |
| $NH_4Cl$ | 0.5 | กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 4.0 | มิลลิกรัม |
| $H_3BO_4$ | 0.3 | มิลลิกรัม |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0.2 | มิลลิกรัม |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 0.1 | มิลลิกรัม |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.06 | มิลลิกรัม |
| $MnCl_2.4H_2O$ | 0.03 | มิลลิกรัม |
| $NiCl_2.4H_2O$ | 0.02 | มิลลิกรัม |
| $CuCl_2.2H_2O$ | 0.01 | มิลลิกรัม. |
| Methanol | 0.5 | เปอร์เซ็นต์ |
| Agar | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |
| pH 5.8 | | |

ละลายส่วนประกอบตามสูตรที่ละชนิดในน้ำกลั่น ยกเว้นเมทานอล ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ให้มีค่าประมาณ 5.8 แล้วค่อยเติมวุ้นลงไป จากนั้นนำไปต้มจนเดือด แบ่งใส่ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนเมทานอลนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดของรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเสร็จแล้ว นำมาตั้งพักไว้ให้อาหารมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสหรือพอมือจับได้ เติมเมทานอลลงไปให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปเทลงบนจานเพาะเชื้อ

2. **อาหารสูตร** glycerol-peptone (GP) agar

| | | |
|---|---|---|
| Glycerol | 10.0 | กรัม |
| Peptone | 10.0 | กรัม |
| Agar | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |
| pH 7.0 | | |

ละลายส่วนประกอบตามสูตรทีละชนิดในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ให้มีค่าประมาณ 7.0 แล้วค่อยเติมวุ้นลงไป จากนั้นนำไปต้มจนเดือด แบ่งใส่ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. **อาหารสูตร** tryptic soy agar (TSA)

| | | |
|---|---|---|
| Trytone | 17.0 | กรัม |
| K2HPO4 | 2.5 | กรัม |
| NaCl | 5.0 | กรัม |
| Glucose | 2.5 | กรัม |
| Agar | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |
| pH 7.3 | | |

ละลายส่วนประกอบตามสูตรทีละชนิดในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ให้มีค่าประมาณ 7.3 แล้วค่อยเติมวุ้นลงไป จากนั้นนำไปต้มจนเดือด แบ่งใส่ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารสูตร nutrient agar (NA)

| | | |
|---|---|---|
| Beef extract | 3.0 | กรัม |
| Peptone | 5.0 | กรัม |
| Agar | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |
| pH 6.8 - 7.0 | | |

ละลายส่วนประกอบตามสูตรที่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ให้มีค่าประมาณ 6.8 - 7.0 แล้วค่อยเติมวุ้นลงไป จากนั้นนำไปต้มจนเดือด แบ่งใส่ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารสูตร low nutrient medium (LNM)

| | | |
|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 2.0 | กรัม |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2.0 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.125 | กรัม |
| NaCl | 0.5 | กรัม |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 0.002 | กรัม |
| Yeast extract | 0.1 | กรัม |
| Methanol | 1.0 | เปอร์เซ็นต์ |
| L-tryptophan | 0.2 | มิลลิกรัม |
| Agar | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |
| pH 6.8 - 7.0 | | |

ละลายส่วนประกอบตามสูตรที่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ให้มีค่าประมาณ 6.8 - 7.0 แล้วค่อยเติมวุ้นลงไป จากนั้นนำไปต้มจนเดือด แบ่งใส่ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสังเคราะห์สารประกอบ IAA จะใช้ $KNO_3$ 3.03 กรัม เทียบกับ $(NH_4)_2SO_4$

6. **อาหารสูตร** DF salts minimal medium

| | | |
|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 4.0 | กรัม |
| $Na_2HPO_4$ | 6.0 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2.0 | กรัม |
| Glucose | 2.0 | กรัม |
| Gluconic acid | 2.0 | กรัม |
| Citric acid | 2.0 | กรัม |

trace elements ความเข้มข้น x 1000 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

| | | |
|---|---|---|
| $FeSO_4.7H_2O$ | 1.0 | กรัม |
| $H_3BO_3$ | 10.0 | มิลลิกรัม |
| $MnSO_4.H_2O$ | 11.19 | มิลลิกรัม |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 124.6 | มิลลิกรัม |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 78.22 | มิลลิกรัม |
| $MoO_3$ | 10.0 | มิลลิกรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

pH 7.2

ละลายส่วนประกอบหลักและ trace elements ตามสูตรทีละชนิดในน้ำกลั่น จากนั้นดูดสารละลาย trace elements ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงไปในสารละลายส่วนประกอบหลัก คนให้เข้ากัน ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ให้มีค่าประมาณ 7.2 แบ่งใส่ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. **อาหารสูตร** Murashige and Skoog basal medium; MS(1962)

อาหารจะแบ่งส่วนประกอบออกเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) 4 ส่วน เมื่อเวลาเตรียมใช้งานจะแบ่งสารละลายเข้มข้นออกมาตามปริมาตรที่ต้องการดังสูตรอาหารข้างล่าง

สารละลายเข้มข้น A ความเข้มข้น x10 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

| | | |
|---|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 16.5 | กรัม |
| $KNO_3$ | 19.0 | กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 4.4 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 3.7 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 1.7 | กรัม |

สารละลายเข้มข้น B ความเข้มข้น x100 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

| | | |
|---|---|---|
| $H_3BO_3$ | 0.62 | กรัม |
| $MnSO_4.H_2O$ | 0.69 | กรัม |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 0.86 | กรัม |
| KI | 0.083 | กรัม |
| $NaMoO_4.2H_2O$ | 0.025 | กรัม |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0.0025 | กรัม |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0.0025 | กรัม |

สารละลายเข้มข้น C ความเข้มข้น x100 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2EDTA$ | 3.725 | กรัม |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 2.785 | กรัม |

สารละลายเข้มข้น D ความเข้มข้น x100 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

| | | |
|---|---|---|
| Glycine | 0.2 | กรัม |
| Nicotinic acid | 0.05 | กรัม |
| Pyridixine HCl | 0.05 | กรัม |
| Thiamine HCl | 0.01 | กรัม |
| Myo-inositol | 0.1 | กรัม |
| Sucrose | 30.0 | กรัม |
| Agar | 8.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

pH 5.7

<u>สารความคุมการเจริญเติบโตของพืช</u>

- IAA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
- BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบของอาหารในแต่ละส่วนตามสูตรที่ละชนิดในน้ำกลั่นดังที่ได้กำหนดไว้ในแต่ละส่วน จากนั้นดูดสารละลายเข้มข้น A ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารละลายเข้มข้น B, C และ D มาอย่างละ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในภาชนะใหม่ ถัดมาชั่ง myo-inositol และ sucrose ใส่ผสมลงไป ละลายให้เข้ากัน ต่อจากนั้นอาจจะผสมสารควบคุมการเจริญของพืช IAA หรือ BA ที่เตรียมไว้ ตามที่ต้องการในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ให้มีค่าประมาณ 5.7 แล้วค่อยเติมวุ้นลงไป จากนั้นนำไปต้มจนเดือด แบ่งใส่ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. **อาหารวุ้น**

| | | |
|---|---|---|
| Sucrose | 30.0 | กรัม |
| Agar | 8.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |
| pH 5.7 | | |

ละลาย sucrose ในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ให้มีค่าประมาณ 5.7 แล้วค่อยเติมวุ้นลงไป จากนั้นนำไปต้มจนเดือด แบ่งใส่ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการแปลผล

### 1. การย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining)

เป็นการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียตามโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถจำแนกแบคทีเรียได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria)จะติดสีม่วงหรือน้ำเงินของ crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bateria) จะติดสีแดงของ safranin-O

**วิธีทดสอบ**

1. นำเชื้อแบคทีเรียมาเกลี่ยให้กระจายบนสไลด์ที่ผ่านการล้างทำความสะอาด ทิ้งให้แห้งและตรึงด้วยความร้อน

2. หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเทสีส่วนเกินทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ

3. หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อทิ้งไว้นาน 1 นาที จากนั้นเทสารละลายไอโอดีนส่วนเกินทิ้ง

4. หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ จากนั้นเอียงสไลด์แล้วค่อยๆ หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการชะสีย้อมบนรอยเกลี่ยเชื้อ จนกระทั่งไม่มีสีออกมาแต่อย่าให้เกิน 20 วินาที

5. ย้อมทับด้วย safranin-O ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีส่วนเกินทิ้งล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ ซับให้แห้งด้วยกระดาษชำระ

6. นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์

**การแปลผล**

- แบคทีเรียแกรมบวก : เซลล์แบคทีเรียติดสีม่วงหรือสีน้ำเงิน
- แบคทีเรียแกรมลบ : เซลล์แบคทีเรียติดสีแดง

### 2. การย้อมสี poly-β-hydroxybutyrate (PHB)

PHB เป็นก้อนพอลิเมอร์ของกรดไขมันที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเมื่อปริมาณของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และออกซิเจน มีปริมาณจำกัด แต่ในขณะที่ปริมาณของแหล่งคาร์บอนมีปริมาณมากเกินพอ และเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์บริเวณไซโตพลาสซึม เป็นเสมือนแหล่งพลังงานสำรองของเซลล์ เมื่อเซลล์ตายจะถูกปลดปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อม

**วิธีการทดสอบ**

1. นำเชื้อแบคทีเรียมาเกลี่ยให้กระจายบนสไลด์ที่ผ่านการล้างทำความสะอาด ทิ้งให้แห้งและตรึงด้วยความร้อน

2. หยดสี sudan black B ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 10 นาที ระวังอย่าให้สีย้อมแห้ง จากนั้นเทสีส่วนเกินทิ้งแล้วซับสีออกให้หมดด้วยกระดาษชำระ

3. หยด xylene ล้างสีส่วนเกินออก แล้วซับให้แห้ง

4. จากนั้นหยดสี safranin-O ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้นาน 10 – 15 วินาที และล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ ทันที ซับให้แห้งด้วยกระดาษชำระ

5. นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการติดสีม่วงดำของก้อน PHB ภายในไซโตพลาสซึม

**การแปลผล**

- สร้าง PHB : มีก้อนสีม่วงดำภายในไซโตพลาสซึม
- ไม่สร้าง PHB : ไม่มีก้อนสีม่วงดำภายในไซตพลาสซึม

3. **การทดสอบการสร้างเอนไซม์** catalase

เอนไซม์ catalase เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ให้เป็นน้ำและก๊าซออกซิเจน

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + O_2$$

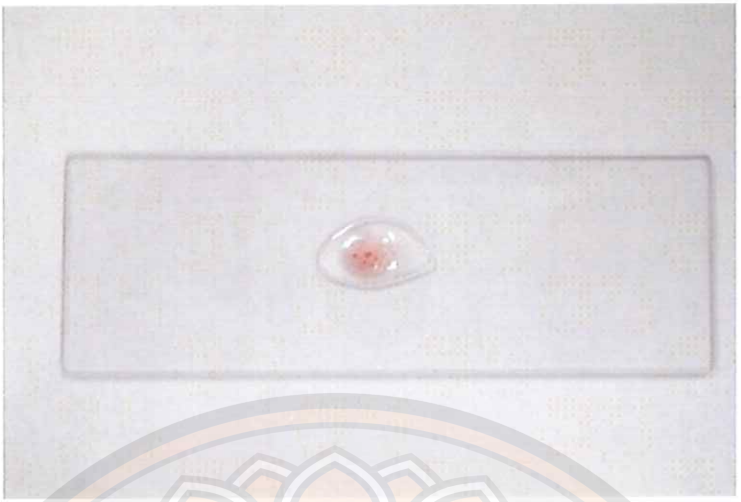
**วิธีทดสอบ**

1. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบป้ายบนสไดล์

2. หยด 3% $H_2O_2$ ลงไปบนเชื้อสังเกตการเกิดฟองก๊าซ

**การแปลผล**

- ผลบวก : เกิดฟองแก๊ส
- ผลลบ : ไม่เกิดฟองแก๊ส



**ภาพ 57 ผลบวกของการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase**

**4. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase**

เอนไซม์ oxidase หรือ cytochrome *C* oxidase เป็นเอนไซม์ที่สัมพันธ์กับระดับ cytochrome ในกระบวนการขนส่งอิล็กตรอนของแบคทีเรียกลุ่ม aerobe และกลุ่ม facultative anaerobe สำหรับพวก obligate anaerobe จะไม่มี cytochrome oxidase system จึงไม่สามารถเจริญในที่มีออกซิเจน

$$\text{cytochrome } c + O_2 \xrightarrow{\text{cytochrome oxidase}} \text{cytochrome } c + H_2O$$

$$\underset{\text{(ไม่มีสี)}}{\text{cytochrome } c + \text{oxidase reagent}} \longrightarrow \underset{\text{(สีม่วง)}}{\text{cytochrome } c + \text{oxidase reagent}}$$

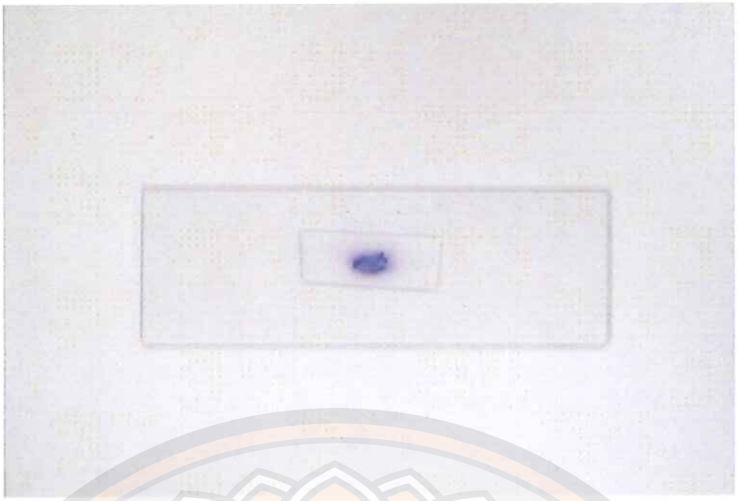
**วิธีทดสอบ**

1. หยด oxidase reagent ลงบนกระดาษกรอง

2. จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบลงบนกระดาษกรองที่หยดน้ำยาแล้ว สังเกตการเกิดเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

**การแปลผล**

- ผลบวก : เกิดสีน้ำเงินภายใน 2 นาที
- ผลลบ : ไม่เกิดสีน้ำเงิน



**ภาพ 58 ผลบวกของการทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase**

**5. การทดสอบการสร้าง indole**

indole เป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ tryptophanse ไปย่อยกรดอะมิโน tryptophan ในอาหารทดสอบที่มี tryptophan ซึ่งในการทดสอบนิยมใช้อาหาร tryptone broth ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย การตรวจสอบการสร้าง indole สามารถตรวจสอบได้โดยใช้ Kovacs's reagent ซึ่งมี para-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบ indole จะปรากฏเป็นวงแหวนสีแดงอยู่ด้านบนของอาหาร

$$\text{tryptophan} \xrightarrow{\text{tryptophanse}} NH_3 + \text{pyruvic acid} + \text{indole}$$

$$\text{indole} + \underset{\text{(Kovacs's reagent)}}{\text{para-dimethylaminobenzaldehyde}} \longrightarrow \text{Rosindole dye (สีแดง)}$$

**วิธีทดสอบ**

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบนำมา stab ลงไปตรงๆ ในหลอดอาหาร SIM medium ประมาณ 2 ใน 3 ของหลอด

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหาร และดูการเคลื่อนที่ของเชื้อออกจากรอย stab

3. เมื่อครบเวลา หยด Kovacs's reagent ลงไปประมาณ 2-3 หยด สังเกตการเกิดวงสีแดงบนผิวอาหาร

**การแปลผล**

- ผลบวก : เกิดวงสีแดงที่ด้านบนของอาหาร
- ผลลบ : ไม่เกิดสี ถ้าเป็นสีส้มจัดเป็น variable เนื่องจาก tryptophane ถูกออกซิไดส์ไปเป็น Skatole (methyl indole)



**ภาพ 59 ผลลบของการทดสอบการสร้าง indole**

6. **การทดสอบ MR-VP**

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส และรูปแบบของแบคทีเรียในการหมักน้ำตาลกลูโคส เมื่อเกิดกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสจะเกิดการสร้างกรดออกมา และสามารถเปลี่ยนแปลงกรดที่สะสมอยู่ให้กลายเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง (neutral product) โดยการทดสอบ MR ที่มี methyl red เป็นอินดิเคเตอร์ ถ้าแบคทีเรียมีการสร้างกรดออกมาจะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นสีแดง แต่ถ้าสามารถเปลี่ยนแปลงกรดที่สะสมอยู่ให้กลายเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นกลางจะทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส่วนการทดสอบ VP เป็นการทดสอบหา acetoin (acetylmethylcarbinol) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นกลางซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากกรด pyruvic ซึ่งสามารถตรวจสอบโดยการเติม KOH และ alpha-naphthol ซึ่งจะให้สีชมพูหรือแดง

MR-test

Glucose ⟶ pyruvic acid (1 day)

pyruvic acid ⟶ lactic, acetic, and formic acids (2–5 days)

many acids (pH 4.2) + added methyl red = **red color**

VP-test

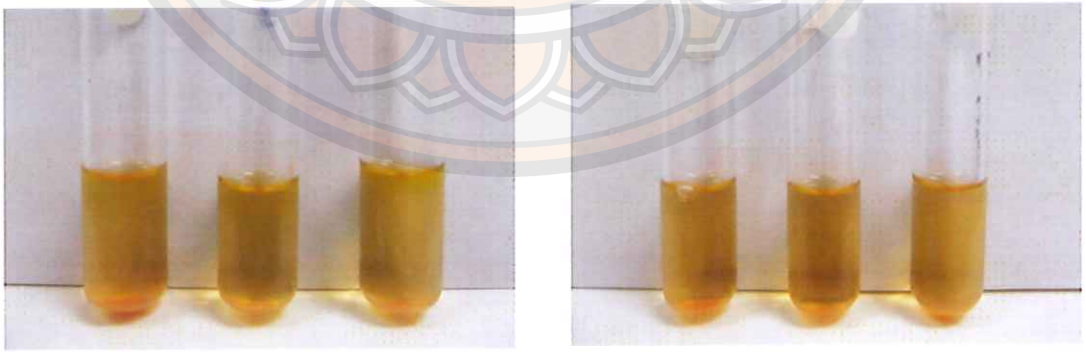
acetoin + alpha-naphthol + KOH ⟶ Diacetyl + Guanidine group ⟶ pink-red product

**วิธีทดสอบ**

1. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบถ่ายเชื้อลงในอาหาร MR-VP broth เชื้อละ 2 หลอด
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. ทดสอบการสร้างกรดโดยหยด methyl red solution ลงในอาหารหนึ่งหลอดสังเกตการเปลี่ยนสี
4. ทดสอบ VP โดยหยดสารละลาย alpha-naphtol solution 2-3 หยดลงในอาหารอีกหลอดที่เหลือ ตามด้วย 40% KOH 1-2 หยด เขย่าให้เข้ากัน อ่านผลใน 15 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลง

**การแปลผล**

| MR test | VP test |
|---|---|
| - ผลบวก : สีแดงสด | - ผลบวก : สีแดงเชอร์รี่ภายใน 15 นาที |
| - ผลลบ : สีเหลืองหรือส้ม | - ผลลบ : สีเหลือง |



**ผลลบของการทดสอบ MR** **ผลลบของการทดสอบ VP**

**ภาพ 60 ผลการทดสอบ MR-VP**

**7. การทดสอบการใช้ซิเตรต** (citrate utilization)

เป็นการทดสอบการใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน สามารถทำการทดสอบได้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร simmon's citrate agar ซึ่งมี citrate เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ถ้าเชื้อมีการใช้ซิเตรต จะปล่อย alkaline product ออกมาทำให้พีเอชของอาหารสูงขึ้นจึงไปเปลี่ยนสีของ bromthymol-blue indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

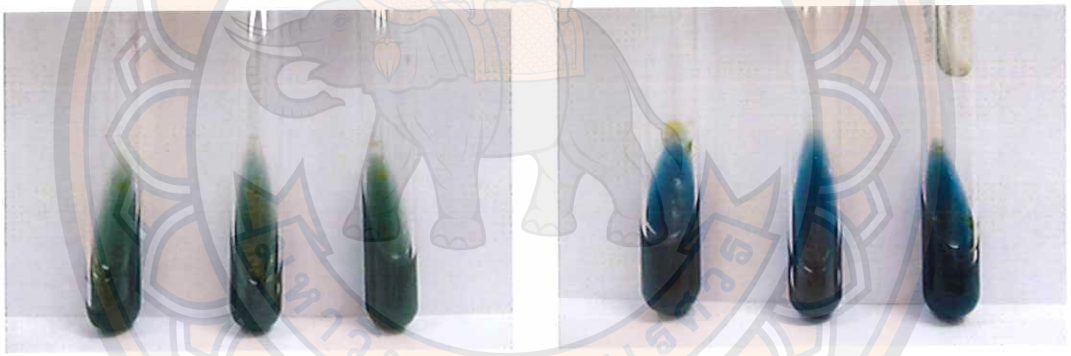
**วิธีทดสอบ**

1. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบขีดซิกแซกลงบนผิวหน้าอาหาร

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร

**การแปลผล**

- ผลบวก : อาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน
- ผลลบ : อาหารไม่เปลี่ยนสี



**ผลลบของการทดสอบการใช้ซิเตรต** **ผลบวกของการทดสอบการใช้ซิเตรต**

**ภาพ 61 ผลการทดสอบการใช้ซิเตรต**

**8. การทดสอบการเคลื่อนที่** (motility test)

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่มีแฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ออกจากบริเวณเดิมไปเจริญยังบริเวณใหม่

**วิธีทดสอบ**

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบแทงลงในอาหาร SIM medium

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงสังเกตการเกิดตะกอนสีดำในอาหาร

**การแปลผล**

- ผลบวก : มีการเจริญออกจากบริเวณที่ลงเชื้อ หรืออาหารมีความขุ่นมากกว่าเดิม

- ผลลบ : เห็นการเจริญชัดเจนบริเวณที่ลงเชื้อ และไม่มีการเจริญออกจากบริเวณที่ลงเชื้อ



**ภาพ 62 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่**

**9. การทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ($H_2S$)**

เป็นการทดสอบการสร้าง $H_2S$ ของแบคทีเรียจากสารอินทรีย์ โดยใช้เอนไซม์ cysteine desulfhydrase ย่อย cysteine ที่มีอยู่ใน peptone หรือสร้างจากการรีดิวซ์สารอนินทรีย์ซัลเฟอร์ที่มีอยู่ในอาหาร

**วิธีทดสอบ**

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบแทงลงในอาหาร SIM medium

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงสังเกตการเกิดตะกอนสีดำในอาหาร

**การแปลผล**

- ผลบวก : มีตะกอนสีดำเกิดขึ้นในอาหาร

- ผลลบ : ไม่มีตะกอนสีดำเกิดขึ้นในอาหาร

**10. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease)**

เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสของแบคทีเรียในการย่อยยูเรีย (urea) ได้เป็นแอมโมเนีย ซึ่งทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่างจึงเปลี่ยนสีของ phenol red ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์จากสีเหลืองเป็นสีแดงหรือชมพู

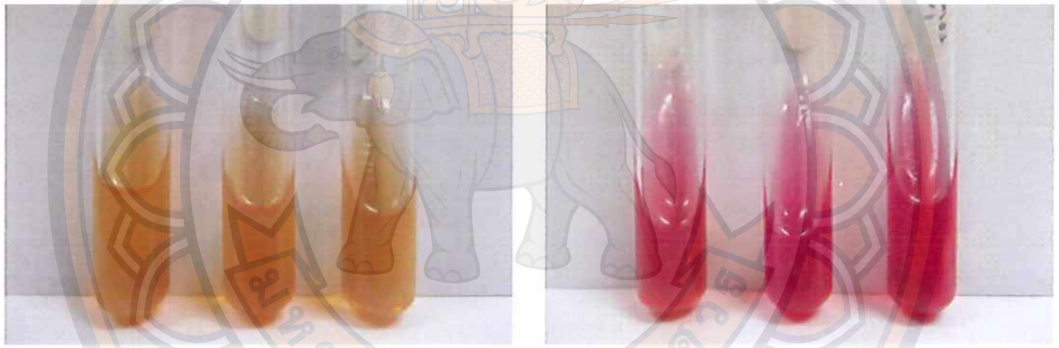
**วิธีทดสอบ**

1. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบขีดซิกแซกบนผิวหน้าอาหารวุ้นผิวเอียงของ urea agar

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีชมพู

**การแปลผล**

- ผลบวก : อาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพู
- ผลลบ : อาหารไม่เปลี่ยนเป็นสีชมพู



**ผลลบของการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส** **ผลบวกของการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส**

**ภาพ 63 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส**

**11. การทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis test)**

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้แป้ง ที่มีโครงสร้างประกอบไปด้วย amylose และ amylopectin ส่วนประกอบทั้งสองนี้ประกอบด้วยน้ำตาล D-glucose ต่อกันเป็นสายยาว และจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ $\alpha$- amylase ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้สารละลายไอโอดีน ซึ่งจะเกิดตะกอนสีน้ำเงิน เมื่อแป้งถูกย่อยจะได้น้ำตาลกลูโคสรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรีย แป้งที่ถูกย่อยแล้วจะไม่มีสีเมื่อหยดสารละลายไอโอดีน

**วิธีทดสอบ**

1. แบ่งจานอาหาร starch agar ออกเป็น 4 ส่วนโดยเขียนชื่อแบคทีเรียทดสอบลงบนก้นจานเพาะเชื้อ

2. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบขีดเป็นเส้นบนผิวหน้าอาหาร

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยดน้ำยาไอโอดีนลงบนผิวหน้าอาหาร สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ รอยขีดเชื้อ

**การแปลผล**

- ผลบวก : เกิดโซนใสรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ
- ผลลบ : ไม่เกิดโซนใสรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ



**ภาพ 64 ผลลบของการทดสอบการย่อยแป้ง**

**12. การทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis test)**

เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ gelatinase ในการย่อยเจลาตินที่เป็นโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีคุณสมบัติเป็น insoluble protein แต่สามารถเปลี่ยนเป็น soluble protein ได้ด้วยการต้ม เมื่อเจลาตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ gelatinase จะทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเจล ซึ่งจะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ

**วิธีทดสอบ**

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบแทงลงในอาหารที่มีเจลาตินร้อยละ 12

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. นำหลอดอาหารไปบ่มไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที สังเกตการแข็งตัวของอาหารหลังเอาหลอดอาหารออกจากตู้เย็น

**การแปลผล**

- ผลบวก : อาหารเหลวหลังเอาหลอดอาหารออกจากตู้เย็น
- ผลลบ : อาหารยังคงแข็งอยู่หลังเอาหลอดอาหารออกจากตู้เย็น



**หลอดอาหารก่อนนำไปแช่ตู้เย็น** **หลอดอาหารหลังนำออกจากตู้เย็น**

**ภาพ 65 ผลลบของการทดสอบการย่อยเจลาติน**

**13. การทดสอบการย่อยสลายเคซีน (casein hydrolysis test)**

เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ caseinase ของแบคทีเรียในการย่อยเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนม

**วิธีทดสอบ**

1. แบ่งจานอาหาร skim milk agar ร้อยละ 12 ออกเป็น 4 ส่วนโดยเขียนชื่อแบคทีเรียทดสอบลงบนก้นจานเพาะเชื้อ

2. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อทดสอบขีดเป็นเส้นบนผิวหน้าอาหาร

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตุโซนใสที่เกิดขึ้นรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ

**การแปลผล**

- ผลบวก : เกิดโซนใสรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ
- ผลลบ : ไม่เกิดโซนใสรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ



**ภาพ 66 ผลลบของการทดสอบการย่อยสลายเคซีน**

14. **การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง** (blood hemolysis)

เป็นการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร blood agar ซึ่งการย่อยสลายเม็ดเลือดของแบคทีเรียมีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบคือ

- ย่อยสลายได้สมบูรณ์หรือ $\beta$-hemolysis จะเกิดโซนใสรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ
- ย่อยสลายได้ไม่สมบูรณ์หรือ $\alpha$-hemolysis จะเกิดโซนสีเขียวรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ
- ไม่เกิดการย่อยสลายของเม็ดเลือดแดงหรือ $\gamma$-hemolysis ไม่เกิดโซนรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ

**การแปลผล**

- ผลบวก : เกิดโซนใสหรือสีเขียวรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ
- ผลลบ : ไม่เกิดโซนใสรอบบริเวณที่แบคทีเรียเจริญ



ภาพ 67 ผลลบของการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

## ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางเคมีและกราฟมาตรฐาน

### 1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ IAA

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

ชั่งสาร indole-3-acetic acid 0.1 กรัมละลายในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

**การเตรียมสาร salkowski reagent ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร**

ชั่ง $FeCl_3$ 4.5 กรัมละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมกรด $H_2SO_4$ ความเข้มข้น 10.8 โมลาร์ โดยดูดสารละลาย $H_2SO_4$ ปริมาตร 110.11 มิลลิลิตรใส่ลงในน้ำกลั่น 789.89 มิลลิลิตร ถัดมาเทสารละลาย $FeCl_3$ ที่เตรียมไว้ลงในสารละลายกรด $H_2SO_4$ คนให้เข้ากัน เทใส่ขวดสีชาตั้งพักไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

**การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ IAA ในน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *Methylobacterium***

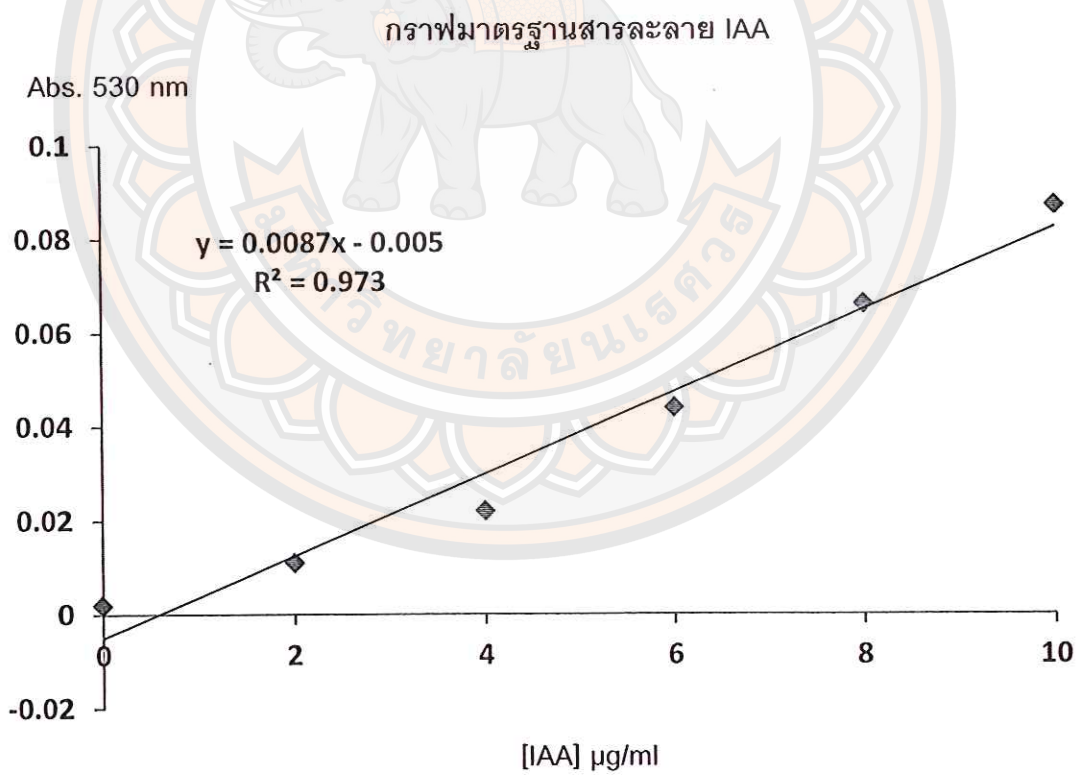
นำน้ำหมักที่ได้ผ่านการปั่นแยกเอาเซลล์ของแบคทีเรียออกแล้วมา 1 มิลลิลิตรผสมกับ salkowski reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาให้รีบนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโมเมตร โดยใช้น้ำหมักเป็นแบลงค์ นำค่าการดูดกลืนที่แสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบ IAA เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย IAA

**การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย IAA**

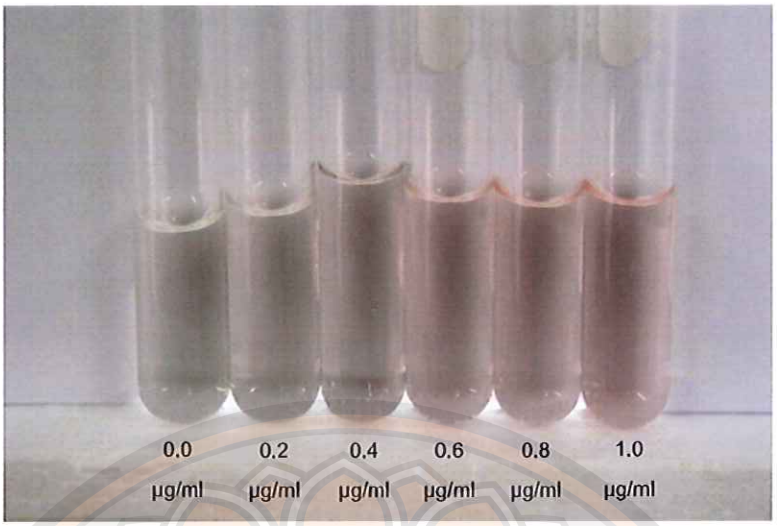
เตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากสารละลายมาตรฐาน IAA ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐาน IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ตามตาราง 27 ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ IAA โดยจะมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรดังตาราง 27 และภาพ 72 เมื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย IAA จะได้ดังภาพที่ 71

ตาราง 34 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา

| ความเข้มข้น IAA (µg/ml) | IAA conc. 100 µg/ml (µl) | น้ำกลั่น (ml) | ค่าการดูดกลืนแสง 530 นาโนเมตร |
|---|---|---|---|
| 0.0 | 0 | 10 | 0.002 |
| 2.0 | 200 | 9.8 | 0.011 |
| 4.0 | 400 | 9.6 | 0.022 |
| 6.0 | 600 | 9.4 | 0.044 |
| 8.0 | 800 | 9.2 | 0.066 |
| 10.0 | 1000 | 9.0 | 0.087 |




ภาพ 68 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลาย IAA




**ภาพ 69 สารละลายมาตรฐาน IAA หลังทำปฏิกิริยากับ salkowski reagent**

**ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารประกอบ IAA ในน้ำหมัก**

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่างน้ำหมักของแบคทีเรีย ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย IAA ในภาพ 71 ที่มีสมการเส้นตรงของสารละลาย IAA มาตรฐานเท่ากับ

$$Y = 0.008X - 0.005$$

โดย Y = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้

X = ปริมาณสารประกอบ IAA ในน้ำหมัก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

<u>ยกตัวอย่างเช่น</u> เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.021 นำไปแทนในค่า Y จะได้

แทนค่า $0.021 = 0.008X - 0.005$

$X = (0.021 + 0.005) / 0.008$

$X = 3.25$

เพราะฉะนั้นปริมาณสารประกอบ IAA ในน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 3.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซโตไคนิน

**การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีเอตินความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

ดูดน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดสารซีเอติน ที่มีปริมาณของสารซีเอตินเท่ากับ 5 มิลลิกรัม เขย่าจนสารละลาย

**การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีเอตินไรโบไซด์ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

ดูดน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดสารซีเอตินไรโบไซด์ ที่มีปริมาณของสารซีเอตินไรโบไซด์เท่ากับ 1 มิลลิกรัม เขย่าจนสารละลาย

**การเตรียมสารละลายมาตรฐานไคเนตินความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

ชั่งสารไคเนติน 0.1 กรัมละลายใน NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

**การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซโตไคนินในน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *Methylobacterium***

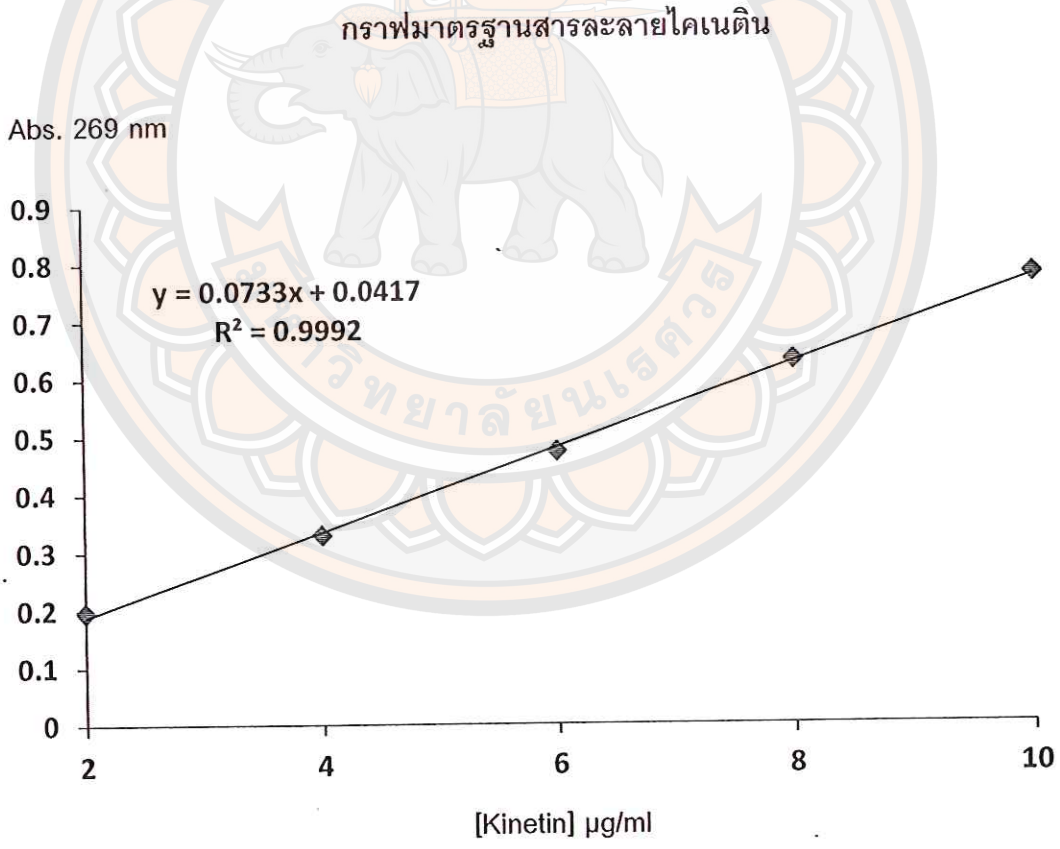
นำน้ำหมักที่ได้ผ่านการปั่นแยกเอาเซลล์ของแบคทีเรียออกแล้วมา 2 มิลลิลิตรไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 269 นาโมเมตร โดยใช้น้ำหมักเป็นแบลงค์ นำค่าการดูดกลืนที่แสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบไซโตไคนินเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไคเนติน

**การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายไคเนติน**

เตรียมสารละลายมาตรฐานไคเนตินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากสารละลายมาตรฐานไคเนตินความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานไคเนตินความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ตามตาราง 28 ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบไซโตไคนินโดยจะมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตรดังตาราง 28 เมื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายไคเนตินจะได้ดังภาพที่ 73

ตาราง 35 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไคเนตินและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา

| ความเข้มข้นไคเนติน (µg/ml) | ไคเนติน conc. 100 µg/ml (µl) | น้ำกลั่น (ml) | ค่าการดูดกลืนแสง 269 นาโนเมตร |
|---|---|---|---|
| 2.0 | 200 | 9.8 | 0.196 |
| 4.0 | 400 | 9.6 | 0.329 |
| 6.0 | 600 | 9.4 | 0.473 |
| 8.0 | 800 | 9.2 | 0.630 |
| 10.0 | 1000 | 9.0 | 0.778 |




ภาพ 70 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลายไคเนติน

**ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารประกอบไซโตไคนินในน้ำหมัก**

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่างน้ำหมักของแบคทีเรีย ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไคเนตินในภาพ 72 ที่มีสมการเส้นตรงของสารละลายไคเนตินมาตรฐานเท่ากับ

$$Y = 0.073X + 0.041$$

โดย Y = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้

X = ปริมาณสารประกอบไซโตไคนินในน้ำหมัก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

<u>ยกตัวอย่างเช่น</u> เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 269 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.081 นำไปแทนในค่า Y จะได้

แทนค่า $0.081 = 0.073X + 0.041$

$X = (0.081 - 0.041) / 0.073$

$X = 0.54$

เพราะฉะนั้นปริมาณสารประกอบไซโตไคนินในน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. **การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์** ACC daminase

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน α-ketobutyrate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์**

ชั่งสาร α-ketobutyrate 1.02 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน α-ketobutyrate ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์**

ดูดสารละลายมาตรฐาน α-ketobutyrate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

**การเตรียมสารสำหรับวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ** Lowry

- <u>solution A</u> : $Na_2CO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 2 เตรียมโดยชั่ง $Na_2CO_3$ 2 กรัมละลายใน NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มัลปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- <u>solution B</u> : $CuSO_4.5H_2O$ ความเข้มข้นร้อยละ 1 เตรียมโดยชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 1 กรัมละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- <u>solution C</u> : Na-K tartrate ความเข้มข้นร้อยละ 2 เตรียมโดยชั่ง Na-K tartrate 2 กรัมละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลายทั้งสามผสมเข้าด้วยกันในอัตราส่วน solution A : B : C เท่ากับ 100 : 1 : 1

- Folin reagent เตรียมผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1

**การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (bovine serum albumin : BSA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

ชั่ง BSA 0.01 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

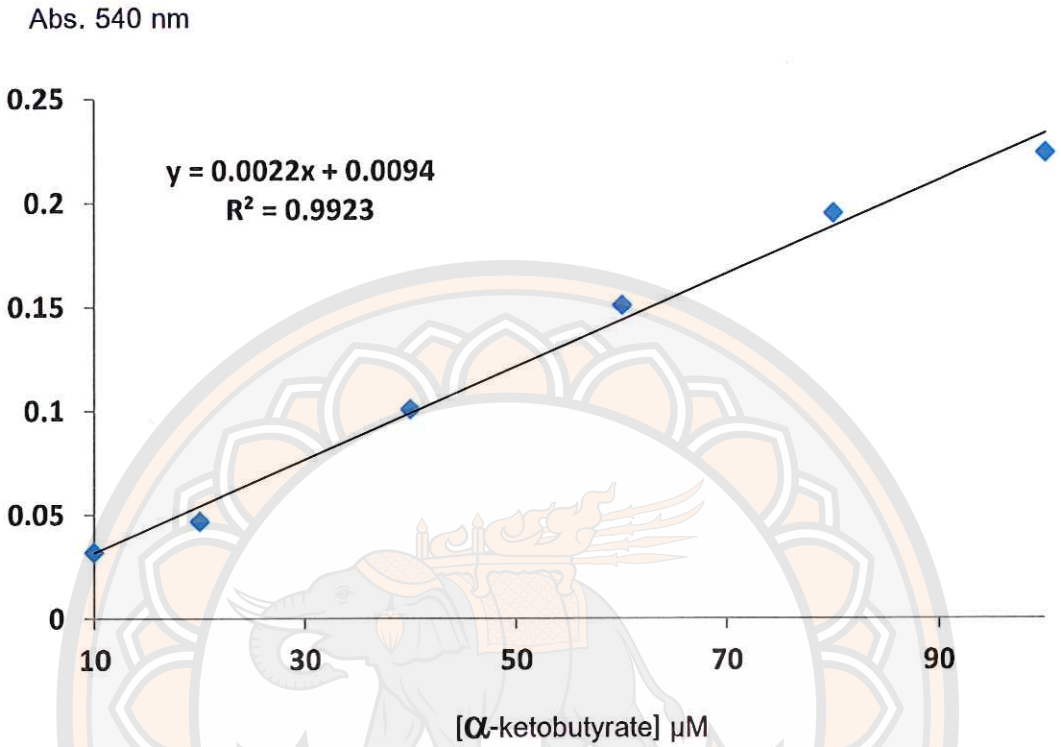
**การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย α-ketobutyrate**

นำสารละลายมาตรฐาน α-ketobutyrate ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ตามตาราง 29 ไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร α-ketobutyrate โดยจะมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรดังตาราง 29 และภาพ 75 เมื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายไคเนตินจะได้ดังภาพที่ 74

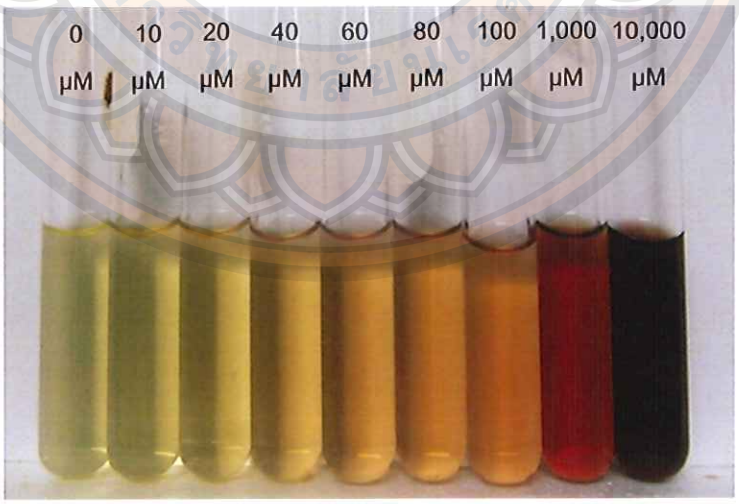
**ตาราง 36 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน α-ketobutyrate และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา**

| ความเข้มข้น α-ketobutyrate (μM) | α-ketobutyrate conc. 100 μM (μl) | น้ำกลั่น (ml) | ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร |
|---|---|---|---|
| 10 | 1 | 9 | 0.032 |
| 20 | 2 | 8 | 0.047 |
| 40 | 4 | 6 | 0.101 |
| 60 | 6 | 4 | 0.151 |
| 80 | 8 | 2 | 0.195 |
| 100 | 10 | 0 | 0.224 |

กราฟมาตรฐานสารละลาย α-ketobutyrate




ภาพ 71 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลาย α-ketobutyrate



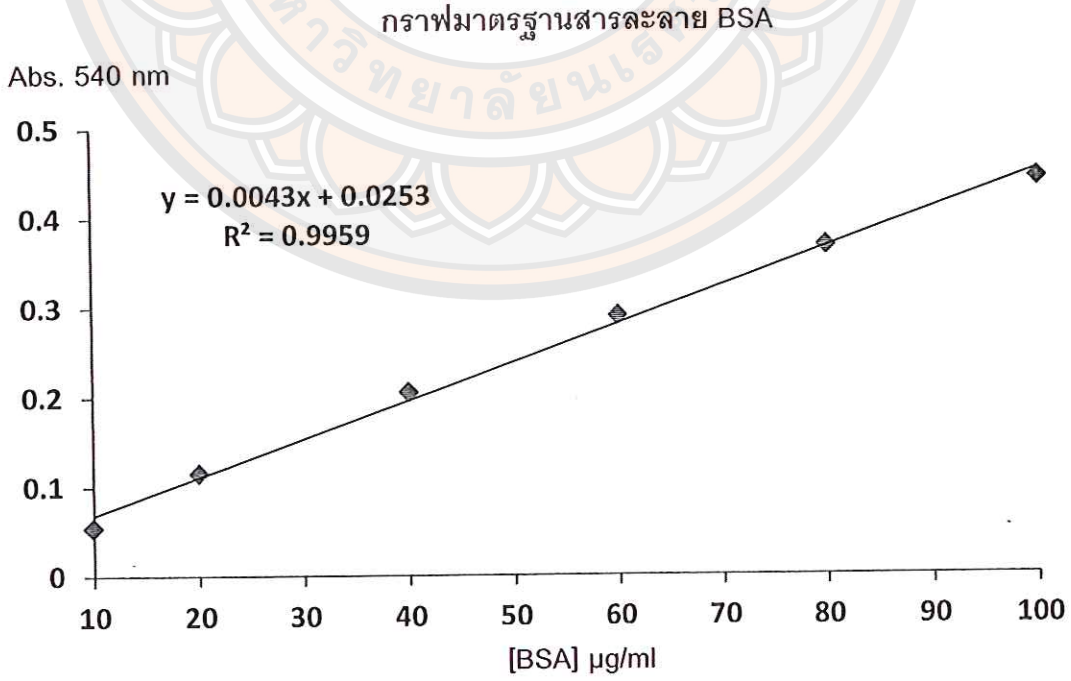

ภาพ 72 สารละลายมาตรฐาน α-ketobutyrate

**การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน**

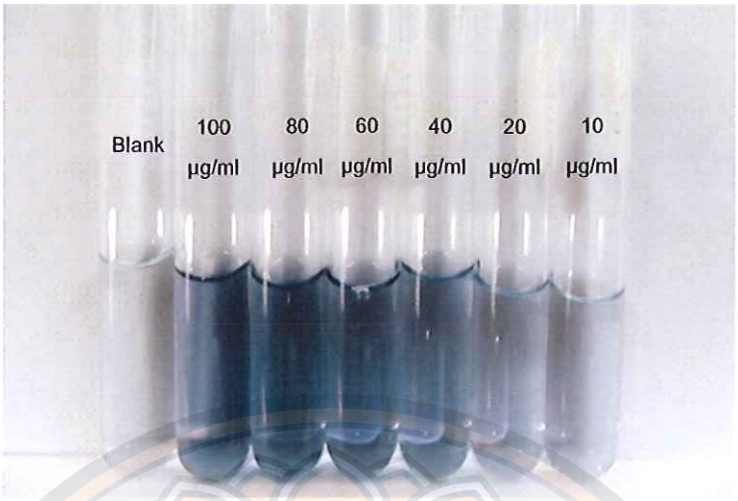
นำสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ตามตาราง 30 ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยจะมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรดังตาราง 30 และภาพ 77 เมื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนจะได้ดังภาพที่ 76

ตาราง 37 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา

| ความเข้มข้น BSA (µg/ml) | BSA conc. 100 µg/ml (ml) | น้ำกลั่น (ml) | ค่าการดูดกลืนแสง 750 นาโนเมตร |
|---|---|---|---|
| 10 | 0.2 | 1.8 | 0.054 |
| 20 | 0.4 | 1.6 | 0.115 |
| 40 | 0.8 | 1.2 | 0.205 |
| 60 | 1.2 | 0.8 | 0.290 |
| 80 | 1.6 | 0.4 | 0.368 |
| 100 | 2.0 | 0 | 0.443 |




ภาพ 73 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลาย BSA




**ภาพ 74 สารละลายมาตรฐาน BSA**

**ตัวอย่างการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์** ACC deaminase

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย α-ketobutyrate ในภาพ 74 ที่มีสมการเส้นตรงของสารละลาย α-ketobutyrate มาตรฐานเท่ากับ

$$Y = 0.002X + 0.009$$

โดย Y = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้

X = ปริมาณสาร α-ketobutyrate (ไมโครโมลาร์)

<u>ยกตัวอย่างเช่น</u> เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.347 นำไปแทนในค่า Y จะได้

แทนค่า $0.347 = 0.002X + 0.009$

เพราะฉะนั้น $X = (0.347 - 0.009) / 0.002$

$X = 169$

ปริมาณสาร α-ketobutyrate มีค่าเท่ากับ 169 ไมโครโมลาร์ เนื่องจากใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 15 นาที ฉะนั้นจะมีปริมาณสาร α-ketobutyrate มีค่าเท่ากับ 169 ไมโครโมลาร์ต่อ 15 นาที ต้องการทำให้อยู่ในหน่วย นาโนโมลต่อชั่วโมงต่อมิลลิลิตร (nmol/hr/ml) ทำได้โดย

nmol/hr/ml = ((169*1000*60)/15)/1000

= 676 nmol/hr/ml

เมื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรโดยแทนค่าในสมการเส้นตรงของปริมาณโปรตีนจะได้เท่ากับ

$$Y = 0.004X + 0.025$$

โดย Y = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้

X = ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

แทนค่า $Abs_{750}$ nM 1.520 = 0.004X + 0.025

เพราะฉะนั้น X = (1.520 - 0.025) /0.004

X = 373.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เนื่องจากมีสารละลายทั้งหมด 5 มิลลิลิตร ฉะนั้นจึงมีปริมาณโปรตีนในสารละลายเท่ากับ 1,868.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อแปลงเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะได้เท่ากับ 1.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำปริมาณ α-ketobutyrate ที่ได้มาคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในหน่วยของนาโนโมลต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีนจะได้เท่ากับ 363 นาโนโมลต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีน

**4. การทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์**

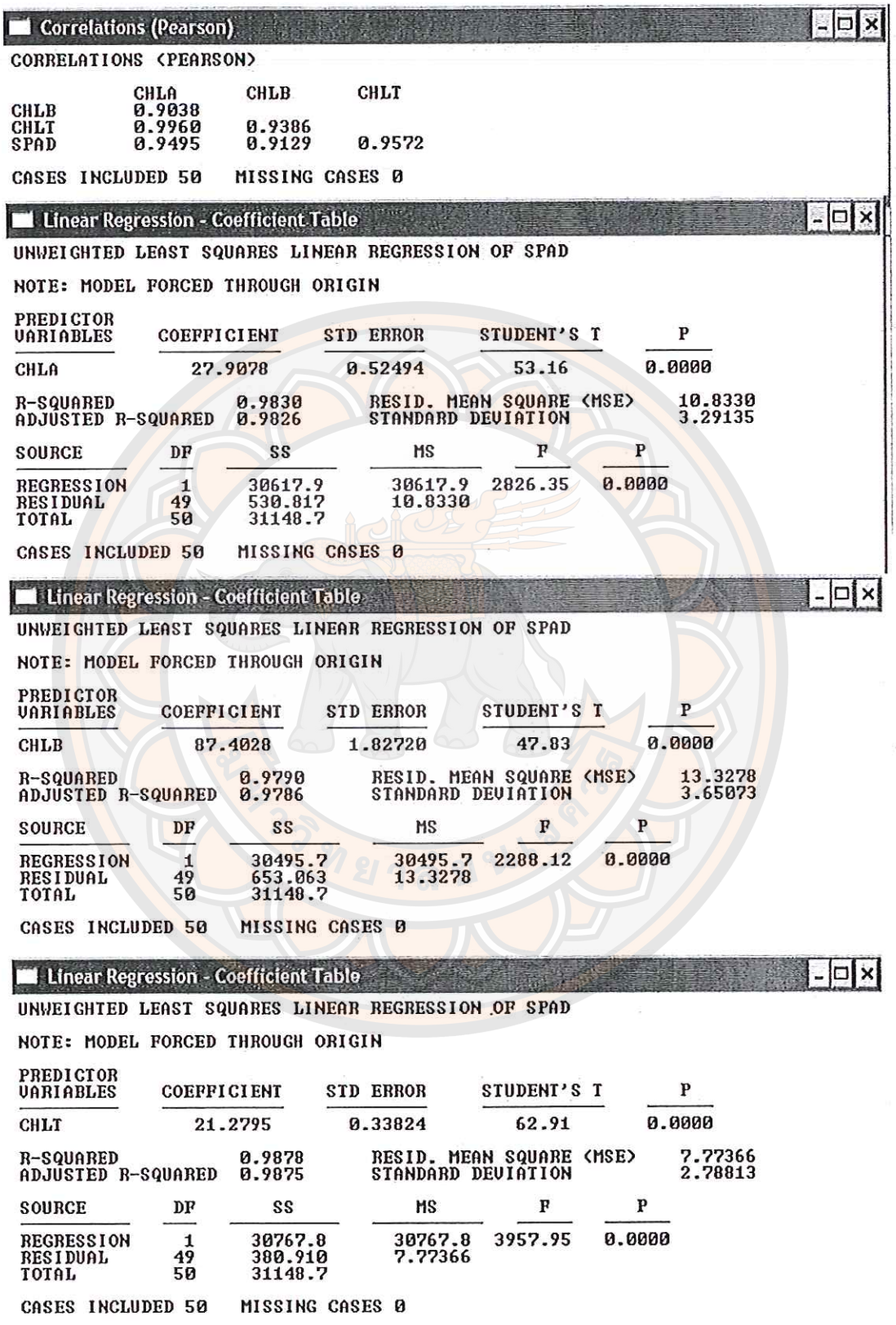
นำค่าดัชนีความเขียวที่วัดได้จากเครื่อง SPAD-502 กับปริมาณคลอโรฟิลล์ที่คำนวณได้จากการแทนค่าสูตรด้วยค่าการดูดกลืนแสงมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ปริมาณตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ซึ่งให้ค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์ดังตาราง 31 และสามารถนำมาเขียนกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรงเพื่อหาปริมาณคลอฟิลล์ได้ดังภาพ 78 และ 79

ตาราง 38 ค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์

| ตัวอย่าง | ค่าดัชนีความเขียว | ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ; ChlA (กรัม/ตารางเมตร) | ปริมาณคลอโรฟิลล์บี; ChlB (กรัม/ตารางเมตร) | ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม; ChlT (กรัม/ตารางเมตร) | อัตราส่วนระหว่าง ChlA:ChlB |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 10.5 ± 0.4 | 0.321 | 0.118 | 0.438 | 2.723 |
| 2 | 11.6 ± 0.2 | 0.355 | 0.120 | 0.475 | 2.950 |
| 3 | 12.4 ± 1.1 | 0.461 | 0.168 | 0.629 | 2.747 |
| 4 | 13.1 ± 0.5 | 0.415 | 0.143 | 0.557 | 2.905 |
| 5 | 13.7 ± 0.2 | 0.331 | 0.113 | 0.444 | 2.920 |
| 6 | 14.1 ± 2.4 | 0.517 | 0.188 | 0.706 | 2.746 |
| 7 | 14.4 ± 0.2 | 0.575 | 0.212 | 0.787 | 2.716 |
| 8 | 14.4 ± 0.3 | 0.478 | 0.171 | 0.649 | 2.795 |
| 9 | 14.5 ± 0.4 | 0.509 | 0.182 | 0.690 | 2.800 |
| 10 | 15.2 ± 0.1 | 0.588 | 0.217 | 0.805 | 2.714 |
| 11 | 15.6 ± 0.3 | 0.386 | 0.127 | 0.513 | 3.033 |
| 12 | 16.1 ± 0.1 | 0.570 | 0.183 | 0.752 | 3.116 |
| 13 | 16.7 ± 0.1 | 0.568 | 0.198 | 0.765 | 2.872 |
| 14 | 17.0 ± 0.1 | 0.546 | 0.186 | 0.732 | 2.935 |
| 15 | 17.3 ± 0.1 | 0.520 | 0.184 | 0.704 | 2.829 |
| 16 | 17.5 ± 0.6 | 0.691 | 0.266 | 0.957 | 2.595 |
| 17 | 17.6 ± 0.1 | 0.633 | 0.211 | 0.844 | 2.999 |
| 18 | 18.1 ± 2.0 | 0.630 | 0.244 | 0.874 | 2.588 |
| 19 | 19.1 ± 0.7 | 0.685 | 0.247 | 0.933 | 2.770 |
| 20 | 19.1 ± 0.2 | 0.744 | 0.267 | 1.011 | 2.785 |
| 21 | 19.2 ± 2.9 | 0.634 | 0.228 | 0.862 | 2.785 |
| 22 | 19.3 ± 0.2 | 0.621 | 0.230 | 0.851 | 2.695 |
| 23 | 20.5 ± 0.7 | 0.783 | 0.306 | 1.089 | 2.557 |
| 24 | 21.3 ± 0.7 | 0.774 | 0.296 | 1.070 | 2.620 |
| 25 | 21.6 ± 0.2 | 0.914 | 0.290 | 1.204 | 3.156 |
| 26 | 21.9 ± 0.8 | 0.825 | 0.301 | 1.126 | 2.740 |

ตาราง 31 (ต่อ)

| ตัวอย่าง | ค่าดัชนีความเขียว | ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ; ChlA (กรัม/ตารางเมตร) | ปริมาณคลอโรฟิลล์บี; ChlB (กรัม/ตารางเมตร) | ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม; ChlT (กรัม/ตารางเมตร) | อัตราส่วนระหว่าง ChlA:ChlB |
|---|---|---|---|---|---|
| 27 | 22.8 ± 0.5 | 0.640 | 0.229 | 0.869 | 2.797 |
| 28 | 22.8 ± 0.9 | 0.876 | 0.325 | 1.200 | 2.698 |
| 29 | 22.9 ± 0.3 | 0.773 | 0.201 | 0.975 | 3.839 |
| 30 | 24.0 ± 0.4 | 0.828 | 0.233 | 1.061 | 3.552 |
| 31 | 24.9 ± 0.7 | 0.806 | 0.303 | 1.109 | 2.662 |
| 32 | 25.4 ± 0.2 | 1.027 | 0.303 | 1.330 | 3.390 |
| 33 | 25.9 ± 0.3 | 1.006 | 0.274 | 1.280 | 3.676 |
| 34 | 26.5 ± 1.4 | 0.943 | 0.347 | 1.290 | 2.717 |
| 35 | 26.6 ± 0.2 | 0.722 | 0.259 | 0.981 | 2.785 |
| 36 | 26.7 ± 1.1 | 0.918 | 0.334 | 1.252 | 2.752 |
| 37 | 27.1 ± 0.2 | 0.999 | 0.228 | 1.227 | 4.383 |
| 38 | 28.7 ± 0.4 | 0.773 | 0.289 | 1.062 | 2.675 |
| 39 | 28.9 ± 0.6 | 0.880 | 0.319 | 1.199 | 2.759 |
| 40 | 29.5 ± 0.2 | 1.096 | 0.315 | 1.411 | 3.486 |
| 41 | 30.7 ± 0.9 | 0.883 | 0.328 | 1.211 | 2.688 |
| 42 | 31.4 ± 0.3 | 1.054 | 0.288 | 1.342 | 3.664 |
| 43 | 33.0 ± 0.7 | 1.035 | 0.377 | 1.412 | 2.746 |
| 44 | 33.2 ± 1.3 | 1.157 | 0.421 | 1.578 | 2.748 |
| 45 | 35.2 ± 0.6 | 1.095 | 0.410 | 1.505 | 2.674 |
| 46 | 36.0 ± 0.2 | 1.459 | 0.343 | 1.802 | 4.247 |
| 47 | 37.5 ± 0.4 | 1.458 | 0.407 | 1.865 | 3.584 |
| 48 | 39.7 ± 1.1 | 1.333 | 0.238 | 1.571 | 5.609 |
| 49 | 42.2 ± 1.0 | 1.424 | 0.380 | 1.804 | 3.745 |
| 50 | 53.4 ± 1.3 | 2.337 | 0.548 | 2.884 | 4.266 |



Correlations (Pearson)

CORRELATIONS (PEARSON)

| | CHLA | CHLB | CHLT |
|---|---|---|---|
| CHLB | 0.9038 | | |
| CHLT | 0.9960 | 0.9386 | |
| SPAD | 0.9495 | 0.9129 | 0.9572 |

CASES INCLUDED 50 MISSING CASES 0

Linear Regression - Coefficient Table

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF SPAD

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

| PREDICTOR VARIABLES | COEFFICIENT | STD ERROR | STUDENT'S T | P |
|---|---|---|---|---|
| CHLA | 27.9078 | 0.52494 | 53.16 | 0.0000 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| R-SQUARED | 0.9830 | RESID. MEAN SQUARE (MSE) | 10.8330 |
| ADJUSTED R-SQUARED | 0.9826 | STANDARD DEVIATION | 3.29135 |

| SOURCE | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| REGRESSION | 1 | 30617.9 | 30617.9 | 2826.35 | 0.0000 |
| RESIDUAL | 49 | 530.817 | 10.8330 | | |
| TOTAL | 50 | 31148.7 | | | |

CASES INCLUDED 50 MISSING CASES 0

Linear Regression - Coefficient Table

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF SPAD

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

| PREDICTOR VARIABLES | COEFFICIENT | STD ERROR | STUDENT'S T | P |
|---|---|---|---|---|
| CHLB | 87.4028 | 1.82720 | 47.83 | 0.0000 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| R-SQUARED | 0.9790 | RESID. MEAN SQUARE (MSE) | 13.3278 |
| ADJUSTED R-SQUARED | 0.9786 | STANDARD DEVIATION | 3.65073 |

| SOURCE | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| REGRESSION | 1 | 30495.7 | 30495.7 | 2288.12 | 0.0000 |
| RESIDUAL | 49 | 653.063 | 13.3278 | | |
| TOTAL | 50 | 31148.7 | | | |

CASES INCLUDED 50 MISSING CASES 0

Linear Regression - Coefficient Table

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF SPAD

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

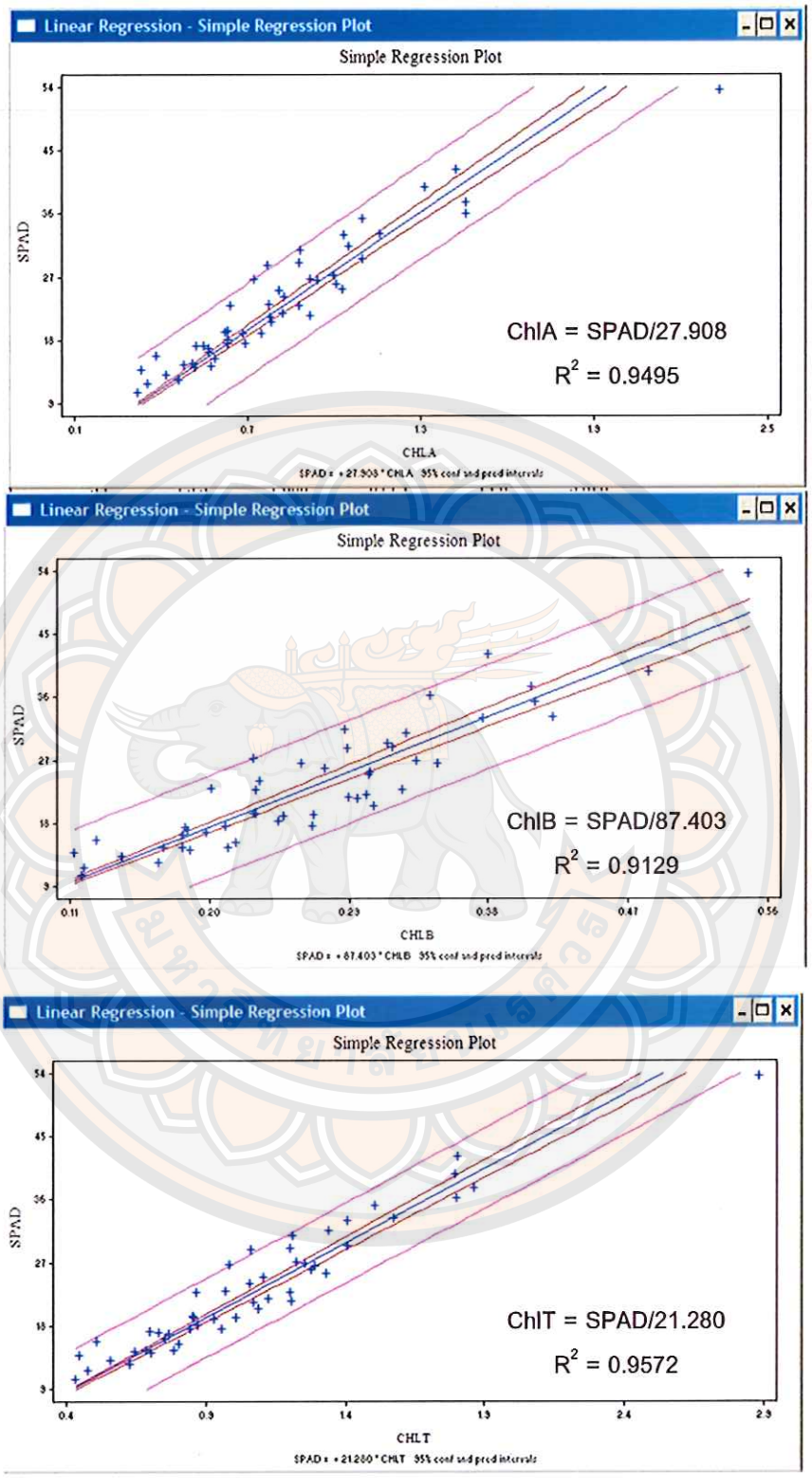
| PREDICTOR VARIABLES | COEFFICIENT | STD ERROR | STUDENT'S T | P |
|---|---|---|---|---|
| CHLT | 21.2795 | 0.33824 | 62.91 | 0.0000 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| R-SQUARED | 0.9878 | RESID. MEAN SQUARE (MSE) | 7.77366 |
| ADJUSTED R-SQUARED | 0.9875 | STANDARD DEVIATION | 2.78813 |

| SOURCE | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| REGRESSION | 1 | 30767.8 | 30767.8 | 3957.95 | 0.0000 |
| RESIDUAL | 49 | 380.910 | 7.77366 | | |
| TOTAL | 50 | 31148.7 | | | |

CASES INCLUDED 50 MISSING CASES 0

ภาพ 75 ผลการคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยโปรแกรม Statistix (SXW)




ภาพ 76 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีความเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์ของหญ้าปักกิ่ง

4. **การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ**

จากการทดลองสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากหญ้าปักกิ่ง โดยการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารละลายมาตรฐาน trolox ซึ่งเป็นสารอนาล๊อกกับวิตามินอี ซึ่งจะดูความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ถ้า DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สีม่วงของ DPPH จางลงจนเป็นสีเหลือง นอกจากนี้ยังสามารถรายงานผลเป็นแบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่งหรือค่า IC50 (IC50, 50 % of inhibitory concentration) ถ้าค่า IC50 มีค่าต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

$$DPPH^* + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^*$$

**วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์**

ชั่ง trolox 0.0250 ละลายในเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

**วิธีเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.06 มิลลิโมลาร์**

ชั่ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 0.002364 กรัมละลานในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร

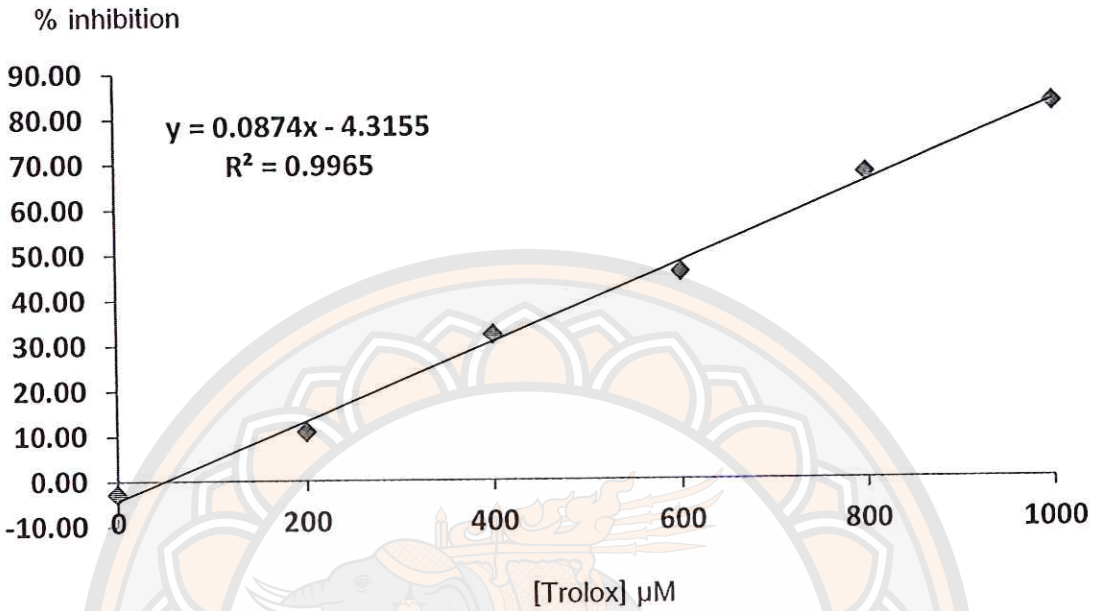
**การทำกราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้ง**

นำสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ตามตาราง 32 ไปวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยจะมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรและค่าร้อยละการยับยั้งดังตาราง 32 เมื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของร้อยละการยับยั้งดังภาพที่ 80

**ตาราง 39 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และค่าร้อยละการยับยั้ง**

| ความเข้มข้น trolox (µM) | trolox conc. 1000 µM (µl) | เมทานอล (ml) | ค่าการดูดกลืนแสง 517 นาโนเมตร | Abs 517 nm of DPPH | % inhibition |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 10 | 0.750 | 0.729 | -2.88 |
| 200 | 200 | 9.8 | 0.650 | | 10.88 |
| 400 | 400 | 9.6 | 0.494 | | 32.19 |
| 600 | 600 | 9.4 | 0.395 | | 45.82 |
| 800 | 800 | 9.2 | 0.237 | | 67.54 |
| 1000 | 1000 | 9.0 | 0.126 | | 82.76 |

กราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้ง trolox




ภาพ 77 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้งของ trolox

**ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของหญ้าปักกิ่งเทียบกับสารละลายมาตรฐาน trolox**

สารสกัดเมทานอลของหญ้าปักกิ่งน้ำหนัก 0.16 กรัมปริมาตร 50 มิลลิลิตรเมื่อนำมาหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH เริ่มต้นได้เท่ากับ 0.660 และค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างได้เท่ากับ 0.629 เมื่อคำนวณร้อยละการยับยั้งจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$$

เมื่อ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

$A_{sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

ฉะนั้นเมื่อแทนค่าในสูตร [(0.660 – 0.629)/0.660] x100 จะได้ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดตัวอย่างจะเท่ากับ 4.70

เมื่อได้ค่าร้อยละการยับยั้งแล้ว นำไปคำนวณเทียบกับสารละลายมาตรฐาน trolox โดยแทนค่าในสมการเส้นตรง

$$Y = 0.087X - 4.315$$

โดย Y = ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดตัวอย่าง

X = ปริมาณ trolox (ไมโครโมลาร์)

เมื่อแทนค่าจะได้ $4.70 = 0.087X - 4.315$

$X = (4.70 + 4.315) / 0.087$

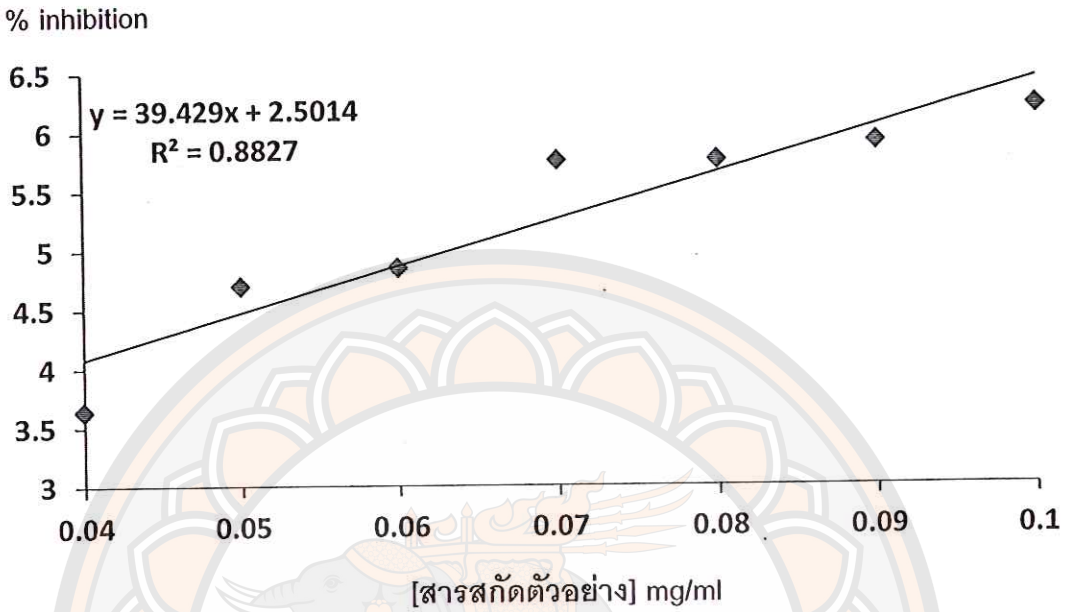
$X = 54.29$ ไมโครโมลาร์

เพราะฉะนั้นสารสกัดตัวอย่างมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 54.29 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน trolox เมื่อคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่อน้ำหนักตัวอย่างจะได้เท่ากับ 4.24 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง จากนั้นหาค่า IC50 โดยนำสารสกัดตัวอย่างในปริมาตรต่าง ๆ ตามตาราง 33 มาทำการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและร้อยละการยับยั้งเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของร้อยละการยับยั้งของสารสกัดตัวอย่างเพื่อหาค่า IC50 ดังภาพ 81

**ตาราง 40 การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และค่าร้อยละการยับยั้ง**

| ปริมาตรสารสกัดตัวอย่าง (ml) | ปริมาณตัวอย่างในสารสกัด (mg/ml) | ค่าการดูดกลืนแสง 517 นาโนเมตร | Abs 517 nm of DPPH | % inhibition |
|---|---|---|---|---|
| 0.04 | 0.128 | 0.636 | 0.660 | 3.64 |
| 0.05 | 0.160 | 0.629 | | 4.70 |
| 0.06 | 0.192 | 0.628 | | 4.85 |
| 0.07 | 0.224 | 0.622 | | 5.76 |
| 0.08 | 0.256 | 0.622 | | 5.76 |
| 0.09 | 0.288 | 0.621 | | 5.91 |
| 0.10 | 0.320 | 0.619 | | 6.21 |

กราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้งของสารสกัดตัวอย่าง




ภาพ 78 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้งของสารสกัดตัวอย่าง

จากกราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้งของสารสกัดตัวอย่างจะได้สมการเส้นตรง

$$Y = 39.42X + 2.501$$

โดย Y = ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดตัวอย่าง

X = ปริมาณสารสกัดตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

เมื่อแทนค่าจะได้ $50 = 39.42X - 2.501$

$X = (50 + 2.501) / 39.42$

$X = 1.33$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้นความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่งหรือค่า IC50 มีค่าเท่ากับ 1.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5. **การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม**

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร**

ชั่งสาร gallic acid 0.05 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**การเตรียมสารละลาย $Na_2CO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 7**

ชั่งสาร $Na_2CO_3$ 7 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร100 มิลลิลิตร

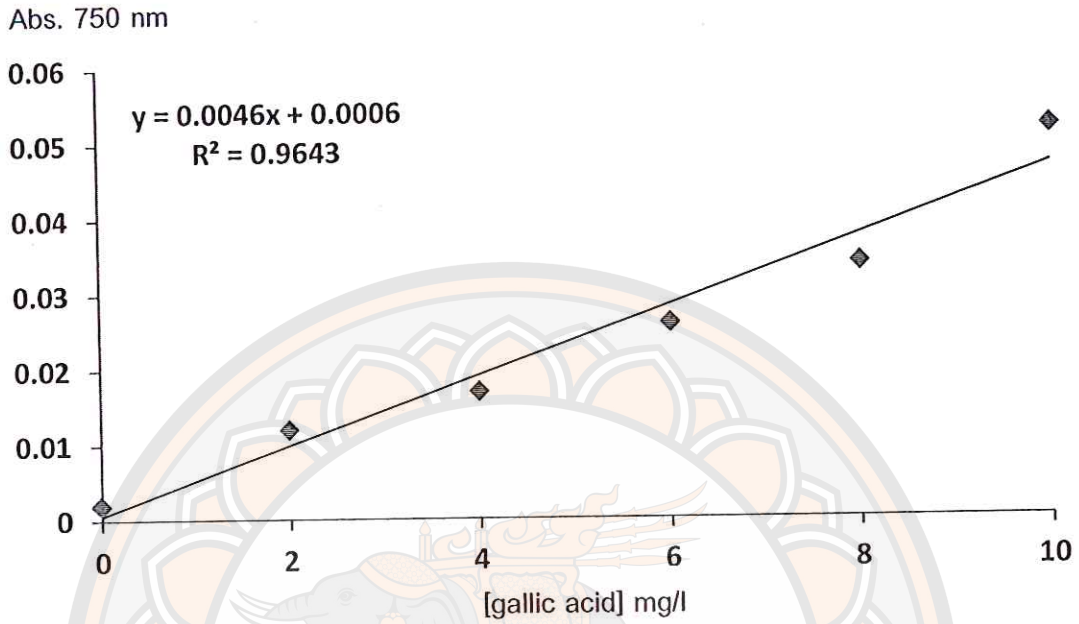
**การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid**

นำสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ตามตาราง 34 ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม โดยจะมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรดังตาราง 34 เมื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid ดังภาพ 82

**ตาราง 41 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา**

| ความเข้มข้น gallic acid (mg/l) | gallic acid conc. 500 mg/l (µl) | น้ำกลั่น (ml) | ค่าการดูดกลืนแสง 750 นาโนเมตร |
|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 10 | 0.002 |
| 2 | 40 | 9.96 | 0.012 |
| 4 | 80 | 9.92 | 0.017 |
| 6 | 120 | 9.88 | 0.026 |
| 8 | 160 | 9.84 | 0.034 |
| 10 | 200 | 9.80 | 0.052 |

กราฟมาตรฐานสารละลาย gallic acid




ภาพ 79 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสารละลาย gallic acid

**ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม**

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้หลังจากทำปฏิกิริยา ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic ในภาพ 82 ที่มีสมการเส้นตรงของสารละลาย gallic มาตรฐานเท่ากับ

$$Y = 0.004X$$

โดย Y = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้

X = ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)

<u>ยกตัวอย่างเช่น</u> เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.018 นำไปแทนในค่า Y จะได้

แทนค่า $0.018 = 0.004X$

$X = (0.018) / 0.004$

$X = 4.5$

เพราะฉะนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

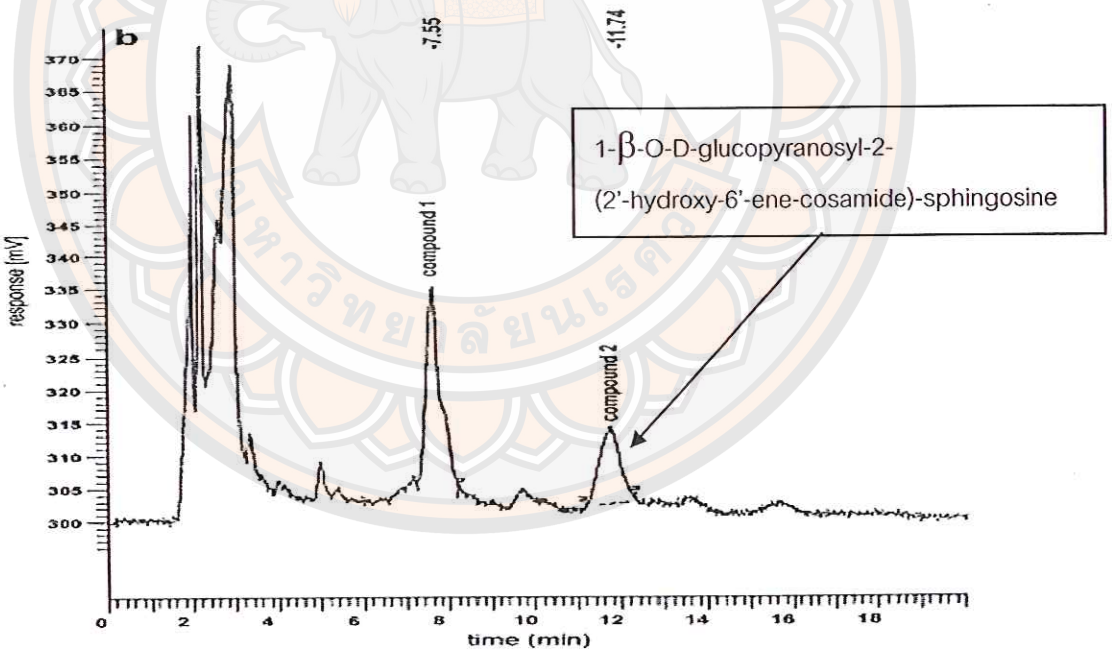
6. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ 1-β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-6'-ene-cosamide)-sphingosine

จากงานวิจัยของ Jiratchariyakul, et al. (2006) ที่ได้ทำการศึกษาหาสาร 1 -β-O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-6'-ene-cosamide)-sphingosine ในสารสกัดหญ้าปักกิ่งด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งปรากฏพีคของสารสำคัญขึ้นที่เวลาประมาณ 11.74 นาที ดังภาพ 83 และมีสมการเส้นตรงของพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ

$$Y = 623990X + 30819$$

โดย Y = พื้นที่ใต้กราฟของสารสำคัญที่วัดได้

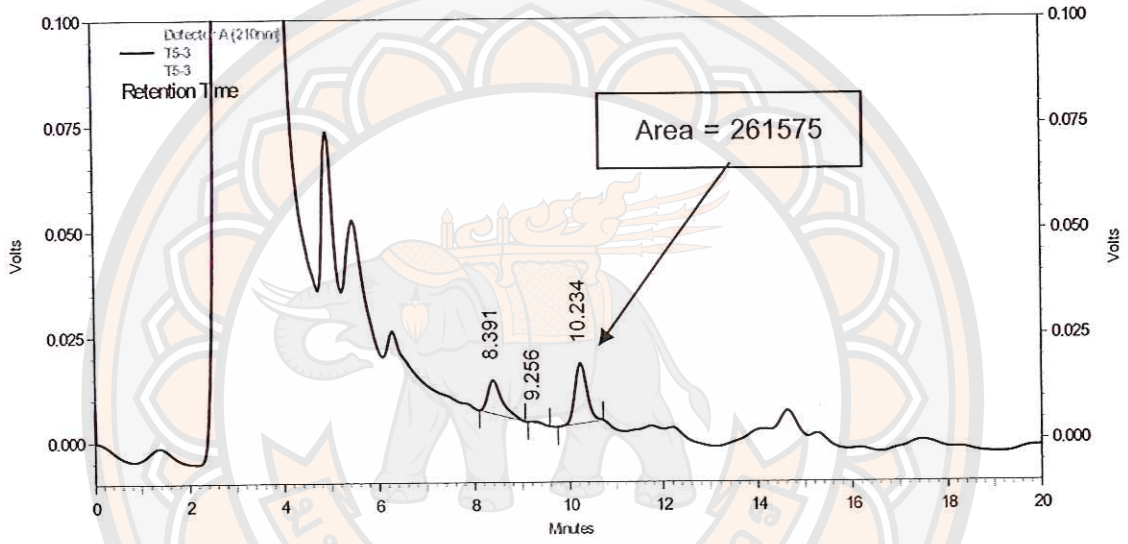
X = ปริมาณสารสำคัญ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)




ภาพ 83 กราฟ HPLC ของสารสกัดจากหญ้าปักกิ่ง

**ที่มา**: Jiratchariyakul, et al., 2006

จากผลการวิเคราะห์สารสกัดตัวอย่างหญ้าปักกิ่งที่ได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง HPLC ปรากฏพีคขึ้นเวลาประมาณ 10.234 นาที ดังภาพ 84 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Jiratchariyakul, et al. (2006) ดังนั้นจึงได้ใช้สมการเส้นตรงที่ได้จาก Jiratchariyakul, et al. (2006) ในการคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ




**ภาพ 81 กราฟ HPLC ของสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

จากภาพ 84 พีคที่ปรากฏที่เวลา 10.234 มีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 261575เมื่อนำไปแทนค่าในสมการเส้นตรงจะได้

แทนค่า 261575 = 623990X + 30819

X = (261575 - 30819) /623990

X = 0.36

เพราะฉะนั้นปริมาณสารสำคัญของตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

# ภาคผนวก ง ข้อมูลผลการทดสอบ

## 1. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ไอโซเลท ED5-9

BIOTEC Culture Collection (BCC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
113 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Klong Nung
Klong Luang, Pathum Thani, 12120, Thailand
Tel. +66-2-564-6700 ext 3338 Fax. +66-2-564-6707

BIOTEC
A member of NSTDA

**รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์**

**IDENTIFICATION'S REPORT**

| | |
|---|---|
| ชื่อผู้รับบริการ / Customer's name: รศ.ดร. ศิริพรรณ สารินทร์ | เลขที่ / No. : B2013-26 |
| หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address: ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา | วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date : 25-Jan-13 |
| คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยบูรพา 99 หมู่ 9 ต. ท่าโขลง อ. เมือง จ.พิษณุโลก 65000 | วันที่รายงานผล/ Report date: 27-Feb-13 |

☑ ผู้รับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/The customer sent pure isolate for identification

☐ ผู้รับบริการส่งเป็นตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ และให้คัดเลือกมาจำแนกชนิด/The customer sent specimen for isolation and chose isolate(s) identification

| ลำดับที่ No. | รหัสตัวอย่าง Sample Code | วิธีการจำแนกชนิด Method of identification | ผลการจำแนกชนิด Identify as | % ความเหมือน % similarity | หมายเหตุ Note |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ED5-9 | Partial 16S rDNA sequencing | *Methylobacterium radiotolerans* | 100.00% | |
| | | | | | |

โปรดทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○ ที่ต้องการ

เอกสารแนบ / Attachment: ① วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method ② ลำดับนิวคลีโอไทด์ / nucleotide sequence (s)
③ ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity ④ ภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ / Phylogenetic relationship
⑤ เอกสารแนบอื่นๆ / other document

ผู้จัดทำรายงาน Report by: _____ (ดร. ภัทรพร รัตนวารี)

ผู้ตรวจรายงาน Approve by: _____ (ดร. ภัทรพร รัตนวารี)

Disclaimer
เอกสารรายงานการทดสอบนี้เป็นผลจากการทดสอบสำหรับตัวอย่างที่ได้รับมาเท่านั้น ไม่สามารถใช้อ้างอิงถึงสินค้าอื่นๆ ที่ไม่ได้ทำการทดสอบได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อความเสียหายใดๆ ที่เกิดจากข้อมูลจากการทดสอบ และไม่ยอมรับว่าศูนย์ฯ ไม่ได้ก่อความรับผิดชอบใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ สถานที่ สัญลักษณ์ของศูนย์ฯ ในการอ้างอิงใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน

The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

BIOTEC
a member of NSTDA

BIOTEC Culture Collection (BCC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
113 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Khlong Nueng,
Khlong Luang, Pathum Thani, 12120, Thailand
Tel: +66-2-564-6700 ext 3336 Fax: +66-2-564-6707

**เอกสารแนบ / Attached document 1**

**วิธีการจำแนกชนิด / Method of identification**

16S rDNA sequencing

1. *PCR amplification of 16S rDNA*

DNA templates for PCR amplification were prepared by using "Genomic DNA mini kit (Blood/culture cell)" (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan). DNA coding for 16S rRNA regions was amplified by means of PCR with *Taq* polymerase, as described by Kawasaki et al. (1993), Yamada et al. (2000) and Katsura et al. (2001). A PCR product for sequencing 16S rDNA regions was prepared by using the following two primers, 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3', positions 9-27 on 16S rDNA by the *E. coli* numbering system; Brosius et al., 1981) and 1500R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3', position 1509-1492 on 16S rDNA by the *E. coli* numbering system; Brosius et al., 1981). The PCR amplification was carried out with DNA Engine Dyad® Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories). One hundred µl of a reaction mixture contained 15-20 ng of template DNA, 2.0 µmoles each of the two primers, 2.5 units of *Taq* polymerase, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP and 10 µl of 10x*Taq* buffer, pH 8.8, containing $(NH_4)_2SO_4$, which was comprised of 750 mM Tris-HCl, 200 mM $(NH_4)_2SO_4$ and 0.1% Tween 20. The PCR amplification was programmed to carry out an initial denaturation step at 94°C for 3 min, 25 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min and elongation at 72°C for 2 min, followed by a final amplification step at 72°C for 3 min. The PCR product was analyzed by 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis and purified with a QIAquick® PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). The purified PCR product was stored at -20°C for further step.

2. *Direct sequencing of 16S rDNA*

Direct sequencing of the single-banded and purified PCR products (ca. 1500 bases, on 16S rDNA by the *E. coli* numbering system; Brosius et al., 1981) was carried out. Sequencing of the purified PCR products was carried out with an ABI PRISM® BigDye™ Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (version 3.1, Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') and 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') for partial sequencing, and additional 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3') and 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') for full length sequencing were used for sequencing of 16S rDNA. Ten µl of a sequencing reaction mixture contained 5–20 ng of template DNAs, 2.0 µl of BigDye™ terminator ready reaction mixture, 5–20 ng of DNA template, 1.6 pmole of sequencing primer, 1.5 µl of 5xBigDye™ sequencing buffer and delonized water. The PCR reactions were carried out as follows: an initial denaturation step at 96°C for 30 sec, 25 cycles of denaturation at 96°C for 10 sec, annealing at 50°C for 5 sec and elongation at 60°C for 4 min. Eighty µl of freshly prepared ethanol/acetate solution was added to the sequencing reaction mixture in 1.5 ml microcentrifuge tube, and mixed well with a brief vortex. The mixture was left to stand at room temperature for 15 min and centrifuged at the maximum speed or 14,500 rpm for 20 min at room temperature. The ethanol solution was immediately removed carefully from the tube with an aspirator equipped with a fine tip. The resulting DNA pellets were washed by adding 250 µl of 70% ethanol to the tube, and vortexed briefly. The precipitated DNA was collected by centrifugation for 5 min at the maximum speed. The remaining ethanol was carefully removed from the tube with an aspirator equipped with a fine tip. The DNA obtained was dried in a heat box at 90°C for 1 min, and the dried DNA was stored at either 4°C or -20°C. The DNA pellets were suspended in 20 µl of a terminator sequencing reagent, mixed on a vortex and spun down. The double-stranded DNA was completely separated by heating at 95°C for 2 min, and immediately placed on ice, until ready to load on instrument. The DNA sequencing was performed on an ABI Prism® 3730XL DNA Sequence (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

3. *Sequence analyses*

The nucleotide sequences obtained from all primers were assembled using Cap contig assembly program, an accessory application in BioEdit (Biological sequence alignment editor) Program (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html). The identification of phylogenetic neighbors was initially carried out by the BLASTN (Altschul et al. 1997) program against the database containing type strains with validly published prokaryotic names (Kim et al. 2012). The top thirty sequences with the highest scores were then selected for the calculation of pairwise sequence similarity using global alignment algorithm (Myer & Miller, 1988), which was implemented at the EzTaxon-e server (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/; Kim et al., 2012).

**References**


- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaeffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. and Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148, 107-127.
- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 559-563.
- Kawasaki, H., Hoshino, Y., Hirata, A. and Yamasato, K. (1993). Is intracytoplasmic membrane structure a generic criterion? It does not coincide with phylogenetic interrelationships among photosynthetic purple non-sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 160, 358-362.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol 62, 716–721.
- Myers, E. W. & Miller, W. (1988). Optimal alignments in linear space. Comput Appl Biosci 4, 11-17.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., and Komagata, K. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 823-829.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7, 203-214.

BIOTEC
a member of NSTDA

BIOTEC Culture Collection (BCC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
113 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Khlong Nueng
Khlong Luang, Pathum Thani, 12120, Thailand
Tel. +66-2-564-6700 ext 3536 Fax: +66-2-564-6707

**เอกสารแนบ / Attached document 2**

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ / Nucleotide sequence(s)**

| ลำดับที่ No. | รหัสตัวอย่าง Sample No. | บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide region of | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3') Nucleotide sequence (5' -> 3') |
|---|---|---|---|
| 1 | ED5-9 | 16S rDNA | >ED5-9<br>GCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGGCCTTCGGGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGAAC<br>GTGCCTTCTGGTTCGGAATAACGCTCGGAAACTAGGGCTAATACCGGATACGCCCTTTTGCGGAAAGGTTTACTGCCGG<br>AAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA<br>TGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCA<br>AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGACGGT<br>ACCGGAGGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACT<br>GGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATGGCCTTCGATACT<br>GGGAGCTTGAGTATGTAGAGGTTGCGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCGGT<br>GGCGAAGGCGGC |

BIOTEC
a member of NSTDA

BIOTEC Culture Collection (BCC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
113 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Khlong Nueng
Khlong Luang, Pathum Thani, 12120, Thailand
Tel. +66-2-564-6700 ext 3536 Fax: +66-2-564-6707

**เอกสารแนบ / Attached document 3**

**ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Comparison of nucleotide sequences with reference strain(s)**

**% Similarity of 16S rDNA compare with closely related species**

Strain: ED5-9

| Rank | Name | Strain | Authors | Accession | Pairwise Similarity | Diff/Total nt |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Methylobacterium radiotolerans* | JCM 2831(T) | (Ito and Enda 1971) Green and Bousfield 1983 | CP001001 | 100 | 0/644 |
| 2 | *Methylobacterium longum* | 440(T) | Kriel et al. 2012 | LN568949 | 99.69 | 2/644 |
| 3 | *Methylobacterium tardum* | RB67(T) | Kato et al. 2008 | AB252208 | 99.53 | 3/644 |
| 4 | *Methylobacterium oryzae* | CBMB20(T) | Madhaiyan et al. 2007 | AY836345 | 99.38 | 4/644 |
| 5 | *Methylobacterium fujisawaense* | DSM 5686(T) | Green et al. 1988 | AB175624 | 99.38 | 4/644 |
| 6 | *Methylobacterium phyllosphaerae* | CBMB27(T) | Madhaiyan et al. 2009 | FJ126746 | 99.19 | 5/618 |
| 7 | *Methylobacterium aerolatum* | 5415S-11(T) | Woon et al. 2008 | FJ174498 | 98.67 | 8/603 |
| 8 | *Methylobacterium persicinum* | 002-165(T) | Kato et al. 2008 | AB252202 | 98.6 | 9/644 |
| 9 | *Methylobacterium brachiatum* | RG021(T) | Kato et al. 2008 | AB175640 | 98.29 | 11/643 |
| 10 | *Methylobacterium mesophilicum* | JCM 2827(T) | (Austin and Goodfellow 1979) Green and Bousfi | D32225 | 97.98 | 13/644 |
| 11 | *Methylobacterium komagatae* | 002-079(T) | Kato et al. 2008 | AB252201 | 97.52 | 16/644 |
| 12 | *Methylobacterium durhamense* (invalid name) | SM08-7(T) | Lee et al. 2009 | FJ155589 | 97.05 | 19/644 |
| 13 | *Methylobacterium goyangi* | 002-074(T) | Kato et al. 2008 | AB252200 | 96.58 | 22/644 |
| 14 | *Methylobacterium hispanicum* | GP34(T) | Gallego et al. 2005 | AJ555304 | 96.43 | 23/644 |

## 2. ผลการเปรียบเทียบสายพันธุ์หญ้าปักกิ่ง

*DNA Technology Laboratory , Kasetsart University*
1 Moo 6 Malaiman Road, Kamphaengsaen, NakornPathom 73140 Thailand
Tel/Fax 66-34-355-192, 98 / 66-34-355-195-6 E-mail :service@dnatec.kps.ku.ac.th
ห้องปฏิบัติการ ดีเอ็นเอ เทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 1 หมู่ 6 ถ.มาลัยแมน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3435-5192, 98 / 0-3435-5195-6

# Test report

Report No. 581330-1/1

ประเภทการวิเคราะห์ : การตรวจสอบเอกลักษณ์พันธุกรรม
ชื่อลูกค้า : นายธนวุฒิ พรหมบัญชาชัย
ที่อยู่ : เลขที่ 309/8 หมู่ 7 ต.ท่าไหธี อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์/โทรสาร : 08-6929-5034
ชนิดตัวอย่าง : หญ้าปักกิ่ง จำนวนตัวอย่าง : 3 ตัวอย่าง
เลขที่ตัวอย่าง : 58-1330-BAF16, -BAF18
วิธีการทดสอบ : AFLP รายละเอียดการทดสอบ : 10 primers
วันรับตัวอย่าง : 27 มกราคม 2558 วันเริ่ม/สิ้นสุดการวิเคราะห์ : 28 มกราคม 2558 / 21 พฤษภาคม 2558

ผลการวิเคราะห์ :

ตามที่ท่านได้ส่งตัวอย่างหญ้าปักกิ่ง จำนวน 3 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์พันธุกรรมของตัวอย่างดังกล่าว โดยใช้ AFLP marker จำนวน 10 คู่ primers บัดนี้ทางห้องปฏิบัติการฯ ได้ทำการตรวจสอบเสร็จสิ้นแล้ว จึงขอส่งผลการตรวจสอบเอกลักษณ์พันธุกรรมของตัวอย่างดังกล่าวมาพร้อมกับ test report นี้

สิ่งที่แนบมาด้วย : - CD-ROM จำนวน 1 แผ่น

These results relate only to the sample(s) tested
And do not guarantee the bulk of the material to be of equal quality

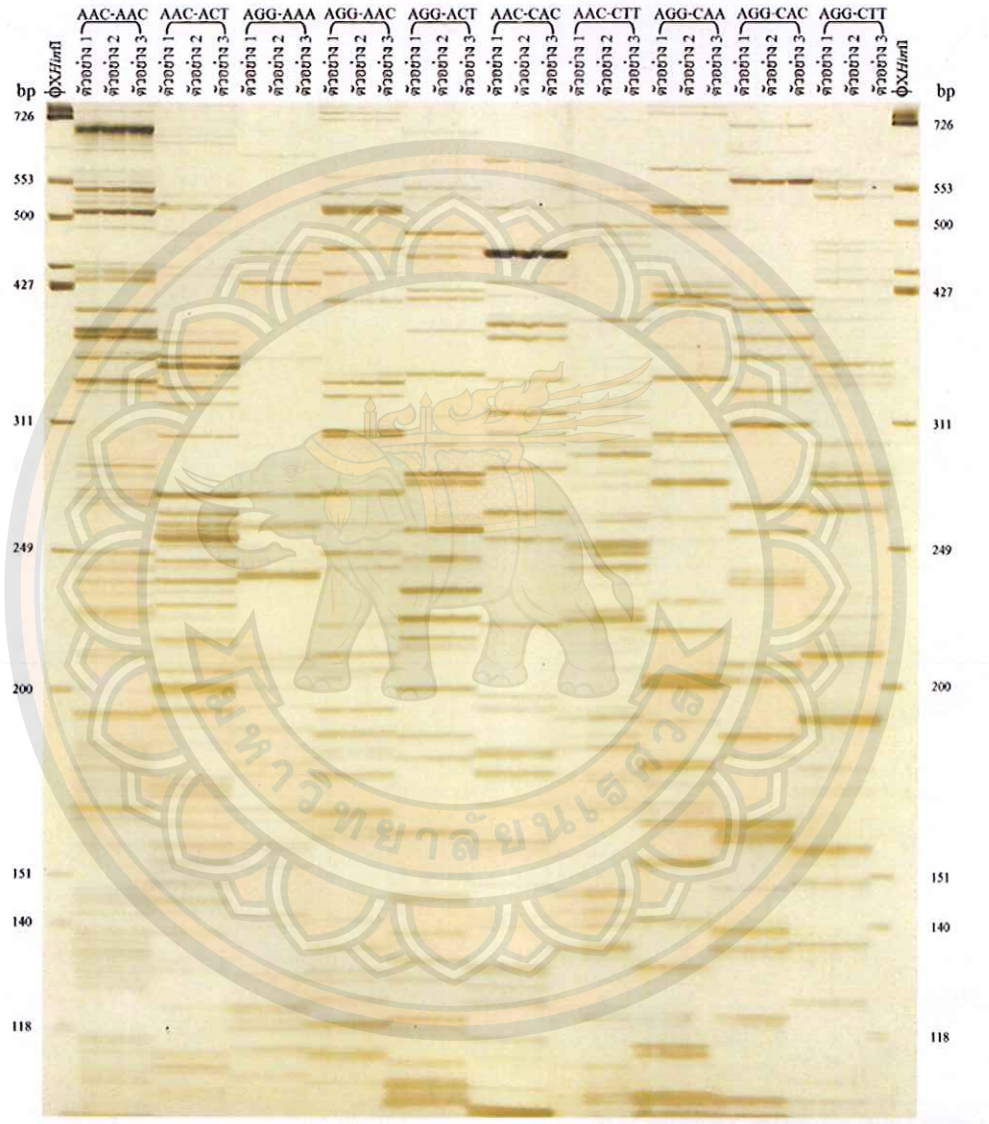
All persons in the DNA Technology Laboratory will not reveal, copy and publish any sample received , data analysis, results and reports to national and international journal or third party without any agreement with the customer.

| ผู้จัดทำ | ผู้ตรวจ | ผู้อนุมัติ |
|---|---|---|
| (นางสาว สกุณา พิมพิสาร)<br>ลูกค้าสัมพันธ์<br>วันที่ 22 MAY 2015 | (นาง ขันติพร นาถวรานันต์)<br>ผู้จัดการวิชาการ<br>วันที่ 22 MAY 2015 | (รศ. ดร. อภิชาติ วรรณวิจิตร)<br>ผู้อำนวยการ<br>วันที่ 22 MAY 2015 |

*DNA Technology Laboratory , Kasetsart University*
1 Moo 6 Malaiman Road, Kamphaengsaen, NakornPathom 73140 Thailand
Tel/Fax 66-34-355-192, 98 / 66-34-355-195-6 E-Mail: service@dnatec.kps.ku.ac.th
ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 1 หมู่ 6 ถ.มาลัยแมน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3435-5192, 98 / 0-3435-5195-6

# ภาพเอกลักษณ์พันธุกรรมของหญ้าปักกิ่ง

**Att. Report 581330-1**

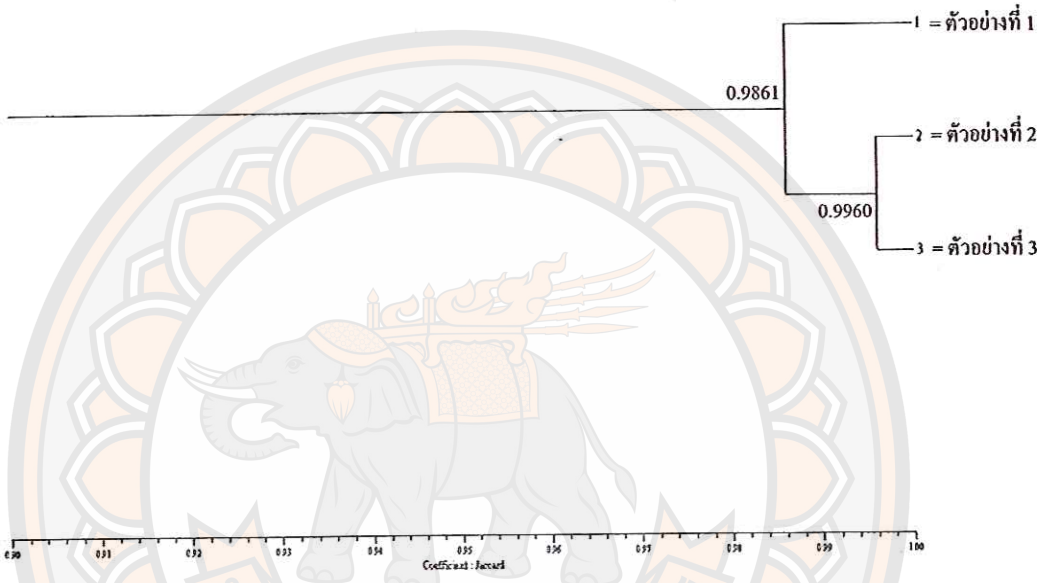



**Approved by**
Director
Date 22 MAY 2015

*DNA Technology Laboratory , Kasetsart University*
1 Moo 6 Malaiman Road, Kamphaengsaen, NakornPathom 73140 Thailand
Tel/Fax 66-34-355-192, 98 / 66-34-355-195-6 E-Mail: servicc@dnatec.kps.ku.ac.th
ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 1 หมู่ 6 ถ.มาลัยแมน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3435-5192, 98 / 0-3435-5195-6

# ภาพ Phylogenetic tree ของหญ้าปักกิ่ง

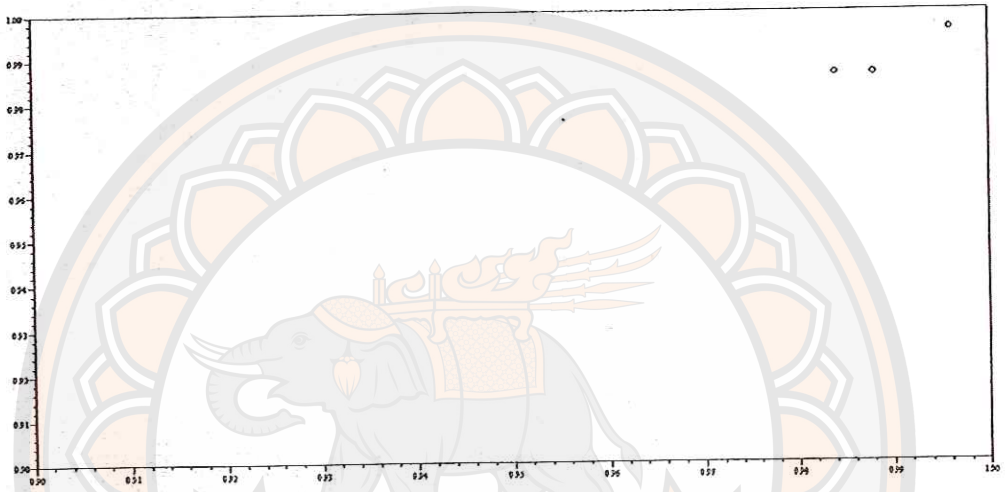
**Att. Report 581330-2**




Approved by
Director
Date 22 MAY 2015

**DNA Technology Laboratory , Kasetsart University**
1 Moo 6 Malaiman Road, Kamphaengsaen, NakornPathom 73140 Thailand
Tel/Fax 66-34-355-192, 98 / 66-34-355-195-6 E-Mail: service@dnatec.kps.ku.ac.th
ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 1 หมู่ 6 ถ.มาลัยแมน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3435-5192, 98 / 0-3435-5195-6

**Att. Report 581330-3**



ภาพแสดงการกระจายของข้อมูลตัวอย่างหญ้าปักกิ่ง จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งมีค่า cophenetic correlation (r) = 0.9447

ตารางแสดงค่า similarity ของตัวอย่างหญ้าปักกิ่ง จำนวน 3 ตัวอย่าง

| sample | ตัวอย่างที่ 1 | ตัวอย่างที่ 2 | ตัวอย่างที่ 3 |
|---|---|---|---|
| ตัวอย่างที่ 1 | 1.0000 | | |
| ตัวอย่างที่ 2 | 0.9880 | 1.0000 | |
| ตัวอย่างที่ 3 | 0.9841 | 0.9960 | 1.0000 |

**Approved by**
Director
Date 27 MAY 2015

*DNA Technology Laboratory , Kasetsart University*
1 Moo 6 Malaiman Road, Kamphaengsaen, NakornPathom 73140 Thailand
Tel/Fax 66-34-355-192, 98 / 66-34-355-195-6 E-mail :service@dnatec.kps.ku.ac.th
ห้องปฏิบัติการ ดีเอ็นเอ เทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 1 หมู่ 6 ถ.มาลัยแมน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3435-5192, 98 / 0-3435-5195-6

**AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

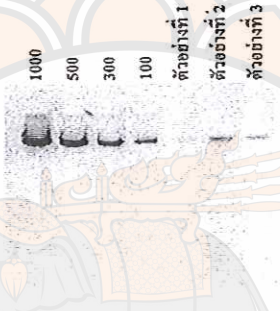
**วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างหญ้าปักกิ่ง**

1. ตัดตัวอย่างใบหญ้าเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งสำหรับบดตัวอย่าง เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่างและบดให้ละเอียด แล้วตักใส่หลอด 1.5 ml ประมาณครึ่งหลอด
2. เติม Extraction buffer (100 mM Tris-Cl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0.625% 2-Mercaptoethanol, 3% PVPP) 700 ul ลงในหลอดตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันดี incubate ที่ 65 °C นาน ประมาณ 1-2 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลา นำหลอดออกจากตู้ incubator เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ul ผสมเบาๆ นาน 20 นาที
4. Centrifuge 14,000 rpm นาน 20 นาที ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่
5. เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ul ผสมเบาๆ นาน 20 นาที
6. Centrifuge 14,000 rpm นาน 20 นาที ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่
7. เติม 95% EtOH ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรส่วนใส ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน
8. Centrifuge 14,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง
9. เติม 70% EtOH ปริมาตร 500 ul กลับหลอดขึ้นลงอย่างเบาๆ และ Centrifuge 14,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำ 2 ซ้ำ)ลงอย่างเบาๆ และ Centrifuge 14,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำ 2 ซ้ำ)
10. ตากตะกอนให้แห้ง ที่ 65 °C แล้วเติม 1X TE buffer ปริมาตร 100 ul นำไป incubate ที่ 65 °C นาน 1 ชั่วโมง หรือจะกว่าตะกอนจะละลายหมด
11. เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C จนถึงเวลาใช้งาน

*DNA Technology Laboratory , Kasetsart University*
1 Moo 6 Malaiman Road, Kamphaengsaen, NakornPathom 73140 Thailand
Tel/Fax 66-34-355-192, 98 / 66-34-355-195-6 E-mail :service@dnatec.kps.ku.ac.th
ห้องปฏิบัติการ ดีเอ็นเอ เทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 1 หมู่ 6 ถ.มาลัยแมน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3435-5192, 98 / 0-3435-5195-6

**การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างหญ้าปักกิ่ง**

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้ 1% Agarose Gel Electrophoresis และย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนแผ่น agarose gel โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพ



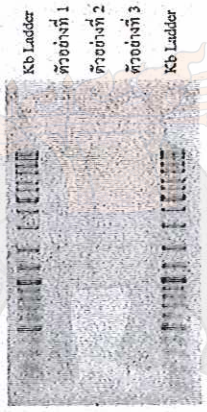

ภาพที่ 1 : การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอหญ้าปักกิ่ง จำนวน 3 ตัวอย่าง

*DNA Technology Laboratory , Kasetsart University*
1 Moo 6 Malaiman Road, Kamphaengsaen, NakornPathom 73140 Thailand
Tel/Fax 66-34-355-192, 98 / 66-34-355-195-6 E-mail :service@dnatec.kps.ku.ac.th
ห้องปฏิบัติการ ดีเอ็นเอ เทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 1 หมู่ 6 ถ.มาลัยแมน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3435-5192, 98 / 0-3435-5195-6

**การเตรียม ดีเอ็นเอต้นแบบ**

**Digestion & Ligation :** ทำการตัดสายดีเอ็นเอและต่อ adaptor ในขั้นตอนเดียว

ในปริมาตรทั้งหมด 30 ul ประกอบด้วย genomic DNA ของตัวอย่างหญ้าปักกิ่ง ประมาณ 100 ng, 1X T4 ligase buffer, 50 mM NaCl, 0.05 mg/ml BSA, 10U EcoRI (10U/ul, Fermentus), 5U MseI (10U/ul, BioLab), 2.6U T4 DNA Ligase (3U/ul, Promega), 10 pmol EcoRI-adapter, 100 pmol MseI-adapter นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน แบ่ง DNA ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาแล้ว จำนวน 10 ul ไปตรวจดูว่ามีการตัดที่สมบูรณ์หรือไม่โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis




ภาพที่ 2 : การตรวจสอบสภาพการตัดดีเอ็นเอของตัวอย่างหญ้าปักกิ่งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อพบว่า DNA มีการตัดที่สมบูรณ์ ให้นำ DNA ดังกล่าวมาเจือจางด้วย $dH_2O$ ประมาณ 10 เท่า เพื่อใช้เป็น ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้ คู่ primer ต่างๆ หากยังไม่ได้ใช้งาน ให้เก็บ DNA ดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C

*DNA Technology Laboratory , Kasetsart University*
1 Moo 6 Malaiman Road, Kamphaengsaen, NakornPathom 73140 Thailand
Tel/Fax 66-34-355-192, 98 / 66-34-355-195-6 E-mail :service@dnatec.kps.ku.ac.th
ห้องปฏิบัติการ ดีเอ็นเอ เทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 1 หมู่ 6 ถ.มาลัยแมน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3435-5192, 98 / 0-3435-5195-6

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ

1. Preselective : ทำการคัดเลือกชิ้นส่วนDNA โดยใช้ primer ที่มีเบสคัดเลือกจำนวน 1-1 base

นำ DNA template มาทำการเพิ่มปริมาณ โดยมี PCR condition ดังนี้ : ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการนั้น จะประกอบไปด้วย DNA ที่เจือจางแล้ว 3 ul, primer (forward&reward) สายละ 0.25 uM, 1X Taq buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 uM dNTPs, และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.3 unit ในปริมาตรทั้งหมด 10 ul

เมื่อผสมองค์ประกอบต่างๆเข้าด้วยกันแล้ว จึงนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem))ซึ่งมีอุณหภูมิต่างๆดังนี้คือ

| | | |
|---|---|---|
| 50 °C | 5 นาที | |
| 94 °C | 3 นาที | |
| 94 °C | 30 วินาที | ] 24 รอบ |
| 56 °C | 1 นาที | |
| 72 °C | 1 นาที | |
| 72 °C | 5 นาที | |

เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR ให้นำ PCR product ที่ได้มาเจือจางด้วย $dH_2O$ 10 เท่า แล้วจึงเก็บไว้เป็น DNA template สำหรับขั้นตอนต่อไป

2. Selective : ทำการคัดเลือกชิ้นส่วน DNA โดยใช้ primer ที่มีเบสคัดเลือกจำนวน 3-3 base โดยใช้จำนวน primer ทั้งหมด 10 คู่

ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการนั้นจะประกอบไปด้วย DNA ที่เจือจางแล้ว(จากขั้นตอนที่ 1) ปริมาตร 2 ul, primer (forward&reward) สายละ 0.25 uM, 1X Taq buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 uM dNTPs, และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.3 unit ในปริมาตรทั้งหมด 10 ul เมื่อผสมองค์ประกอบต่างๆเข้าด้วยกันแล้ว จึงนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem))ซึ่งมีอุณหภูมิต่างๆดังนี้คือ

*DNA Technology Laboratory , Kasetsart University*
1 Moo 6 Malaiman Road, Kamphaengsaen, NakornPathom 73140 Thailand
Tel/Fax 66-34-355-192, 98 / 66-34-355-195-6 E-mail :service@dnatec.kps.ku.ac.th
ห้องปฏิบัติการ ดีเอ็นเอ เทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 1 หมู่ 6 ถ.มาลัยแมน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3435-5192, 98 / 0-3435-5195-6

| | | |
|---|---|---|
| 94 °C | 30 วินาที | 9 รอบ โดยลด Annealing Temperature ลง 1 °C ทุกรอบ |
| 65 °C** | 30 วินาที | |
| 72 °C | 1 นาที | |
| 94 °C | 30 วินาที | 30 รอบ |
| 56 °C | 30 วินาที | |
| 72 °C | 1 นาที | |
| 4 °C | hold | |

หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา หยุดปฏิกิริยาด้วย 5 ul Loading buffer (10 mM EDTA (pH 8.0), 98% formamide, Bromophenol Blue & Xylenecyanol)

ตรวจสอบผลการทำ PCR โดยใช้ 4.5 % Polyacrylamide Gel Electrophoresis : silver staining

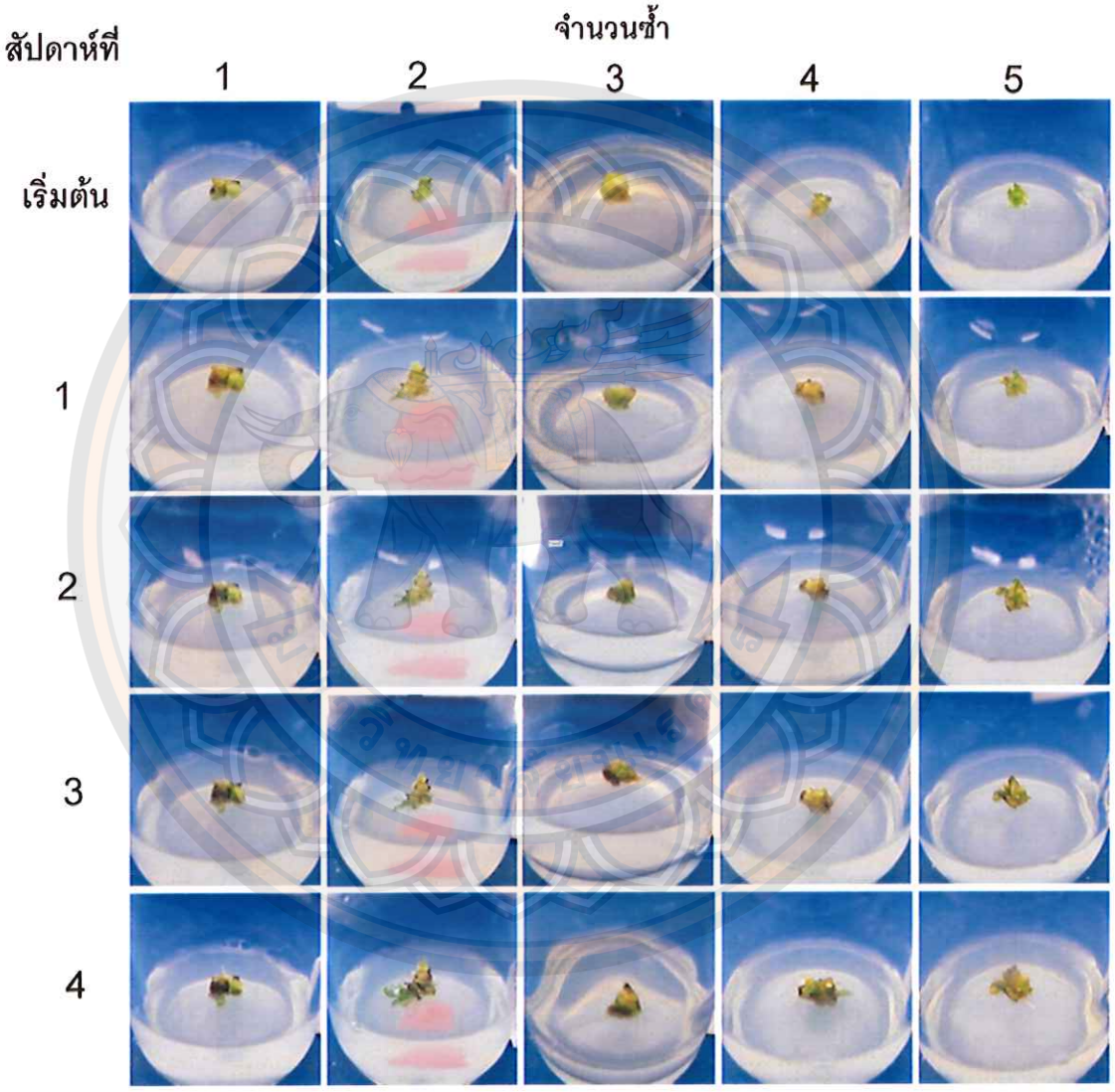
การวิเคราะห์ผล

ทำการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแผ่นเจล เปรียบเทียบกันระหว่างตัวอย่างหญ้าปักกิ่ง จำนวน 3 ตัวอย่าง ในตำแหน่งเดียวกัน ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้คะแนน 1 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้คะแนน 0 โดยจะเลือกให้คะแนนเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่เห็นชัดเจน

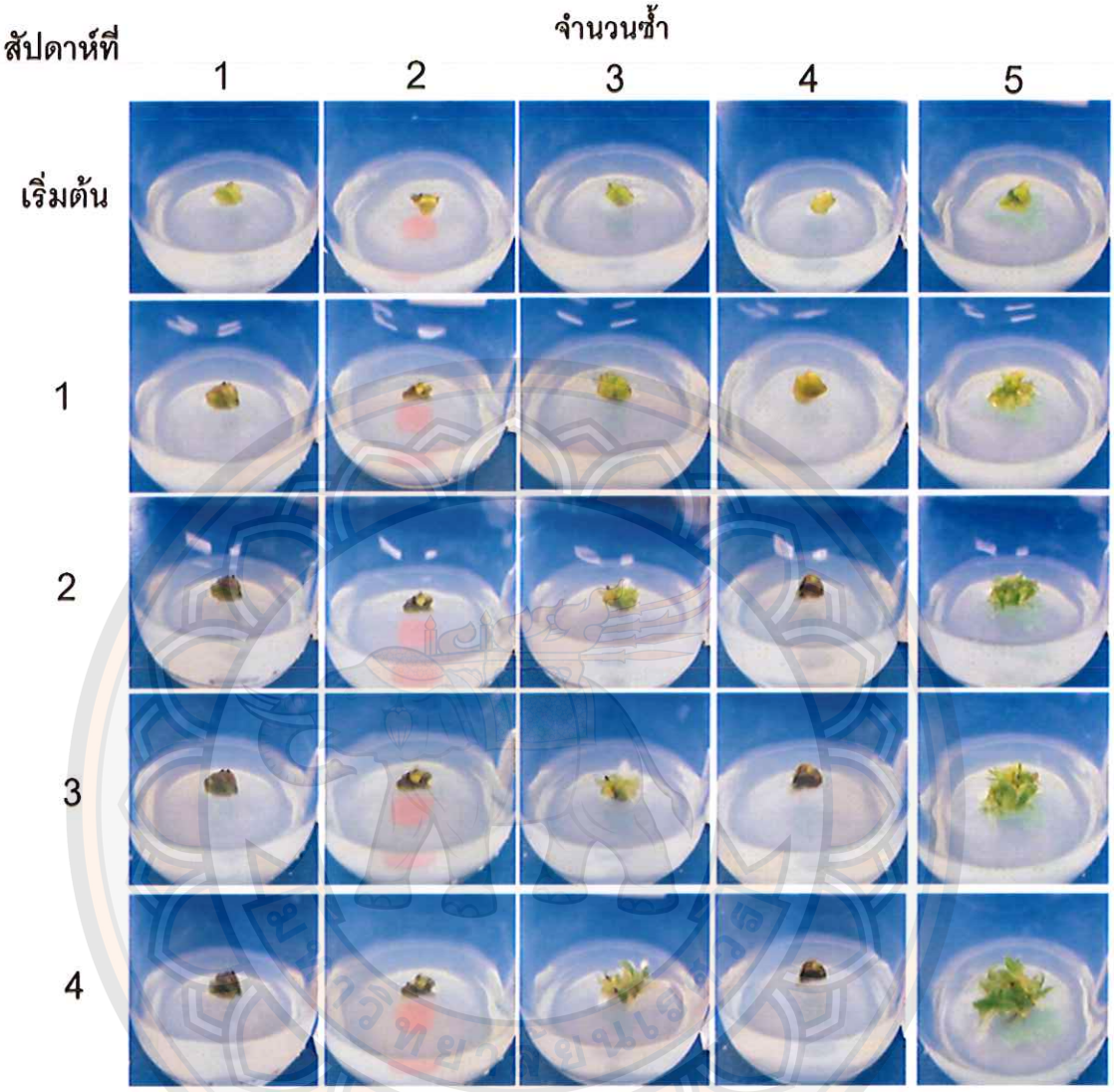
นำผลการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างหญ้าปักกิ่ง โดยใช้ program NTSYSpc for Windows Version 2.02j รายงานผลเป็น Phylogenetic tree

ภาคผนวก จ ภาพลักษณะชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่ได้จากการทดลอง.

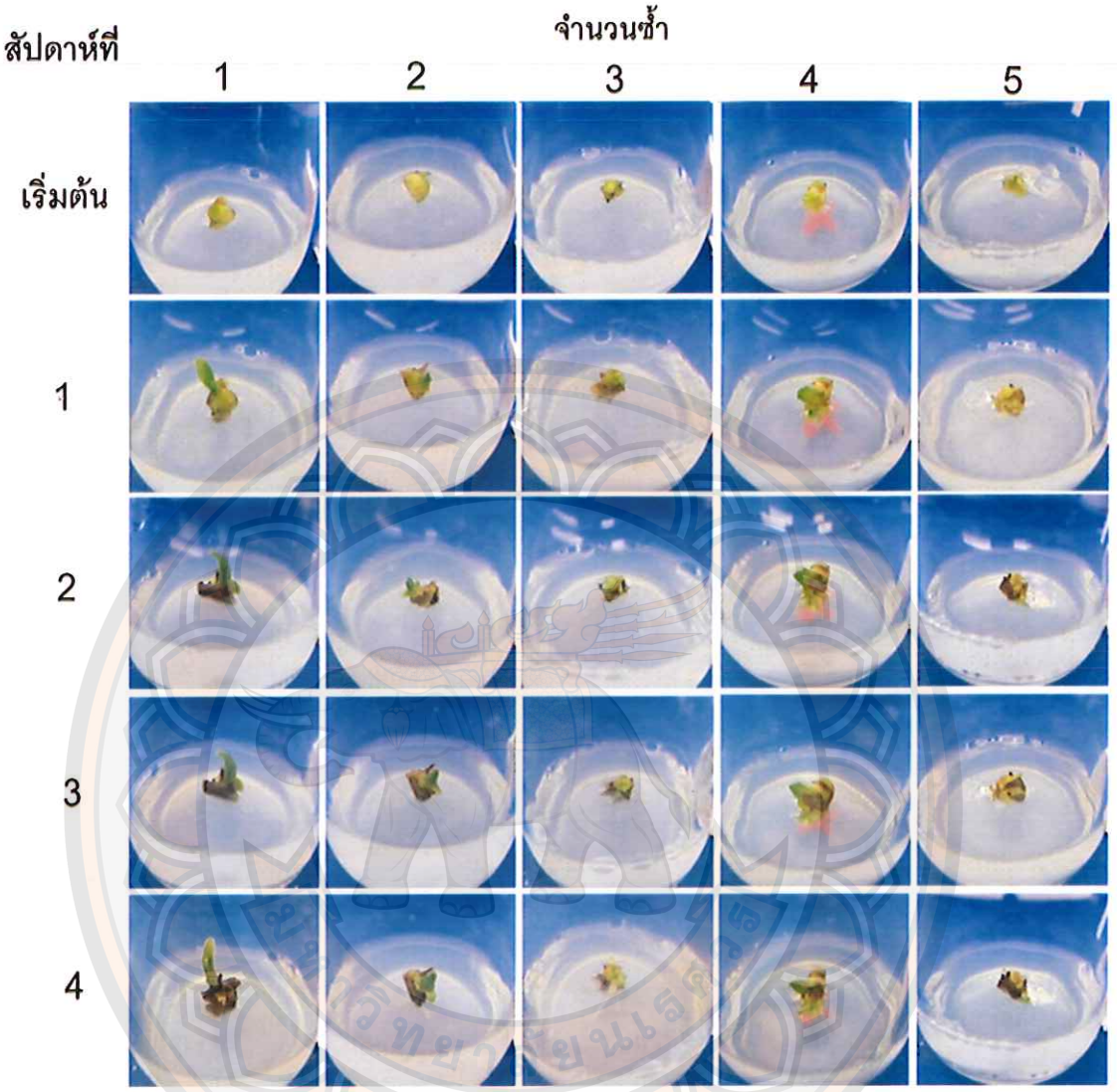
1. ลักษณะชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เจริญในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการศึกษาผลของสัดส่วนการใช้น้ำหมักในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



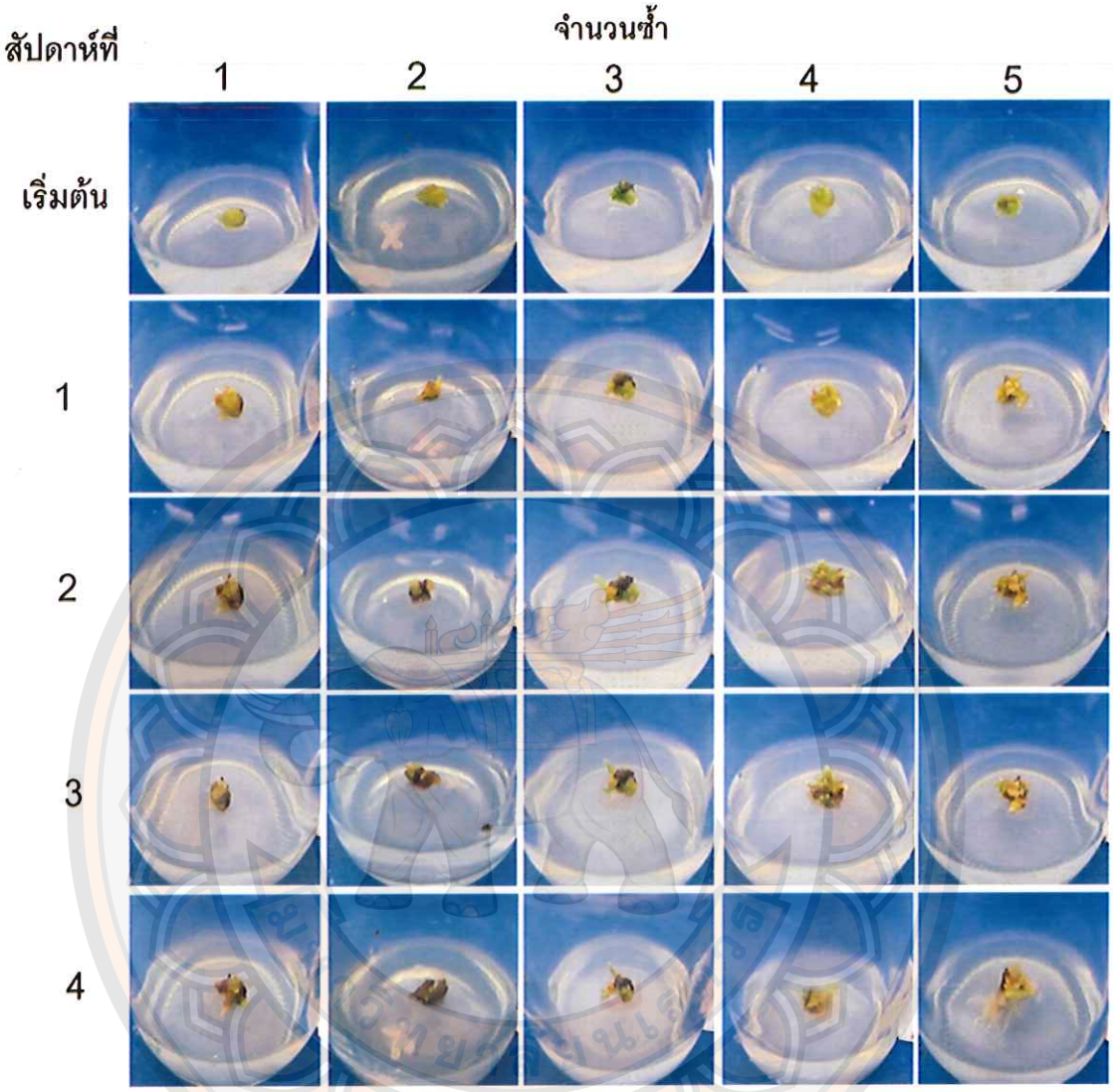

ภาพ 82 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 1 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0034 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4



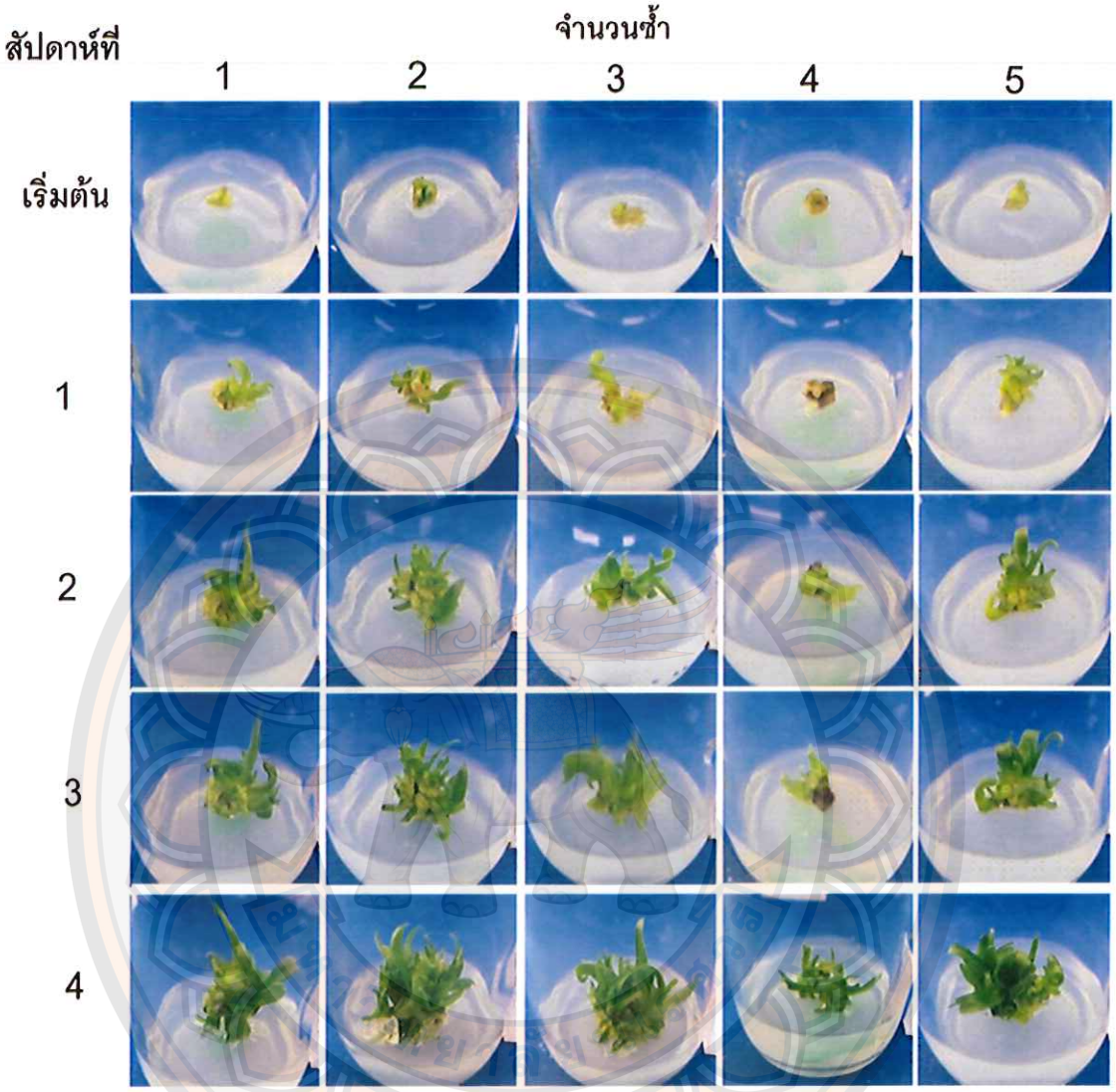

ภาพ 83 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 2 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0067 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4



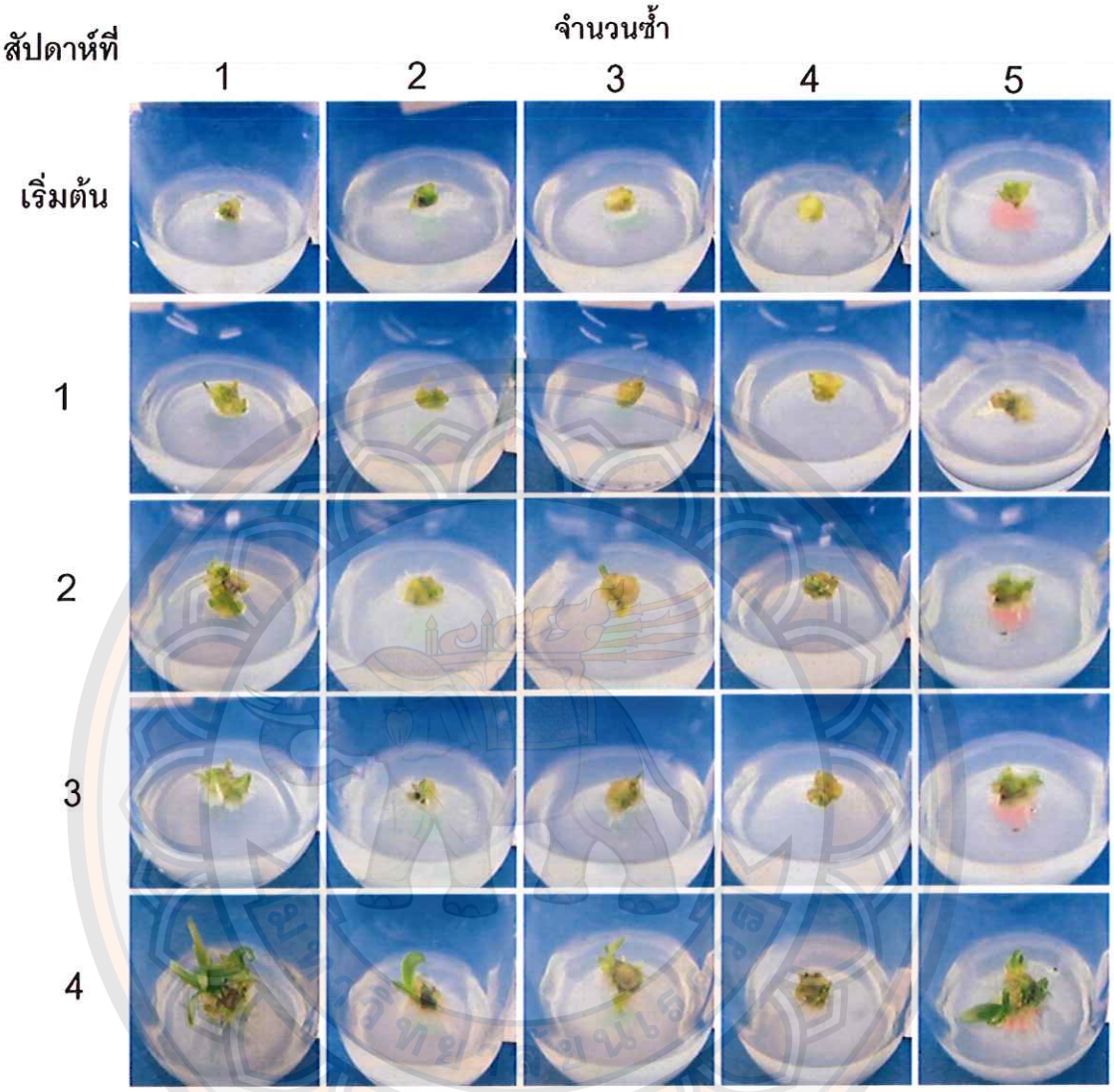

ภาพ 84 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 3 (MS(1962) + $IAA^{FB}$ (0.0134 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4



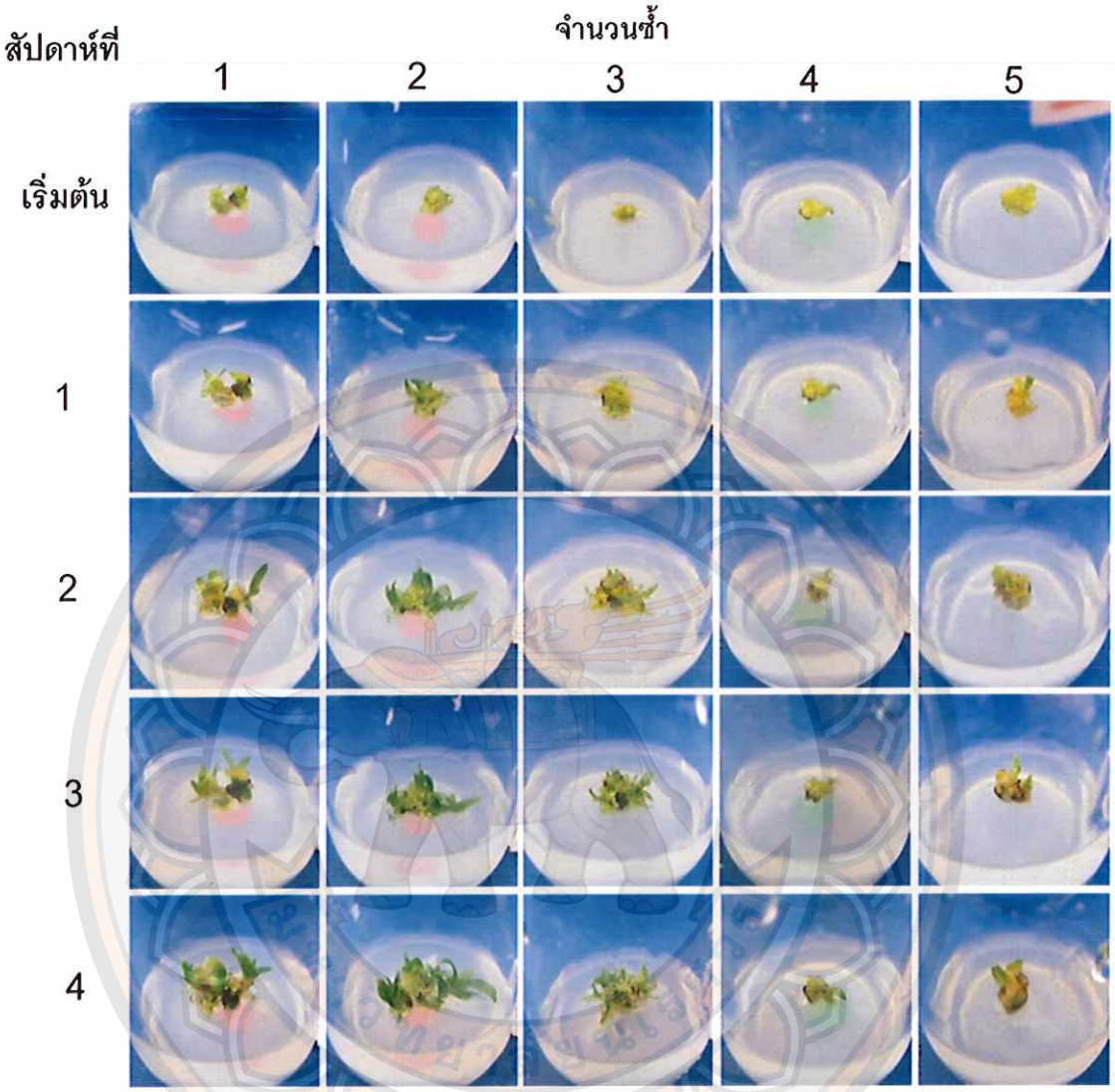

ภาพ 85 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 4 (Agar + $IAA^{FB}$ (0.0034 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4



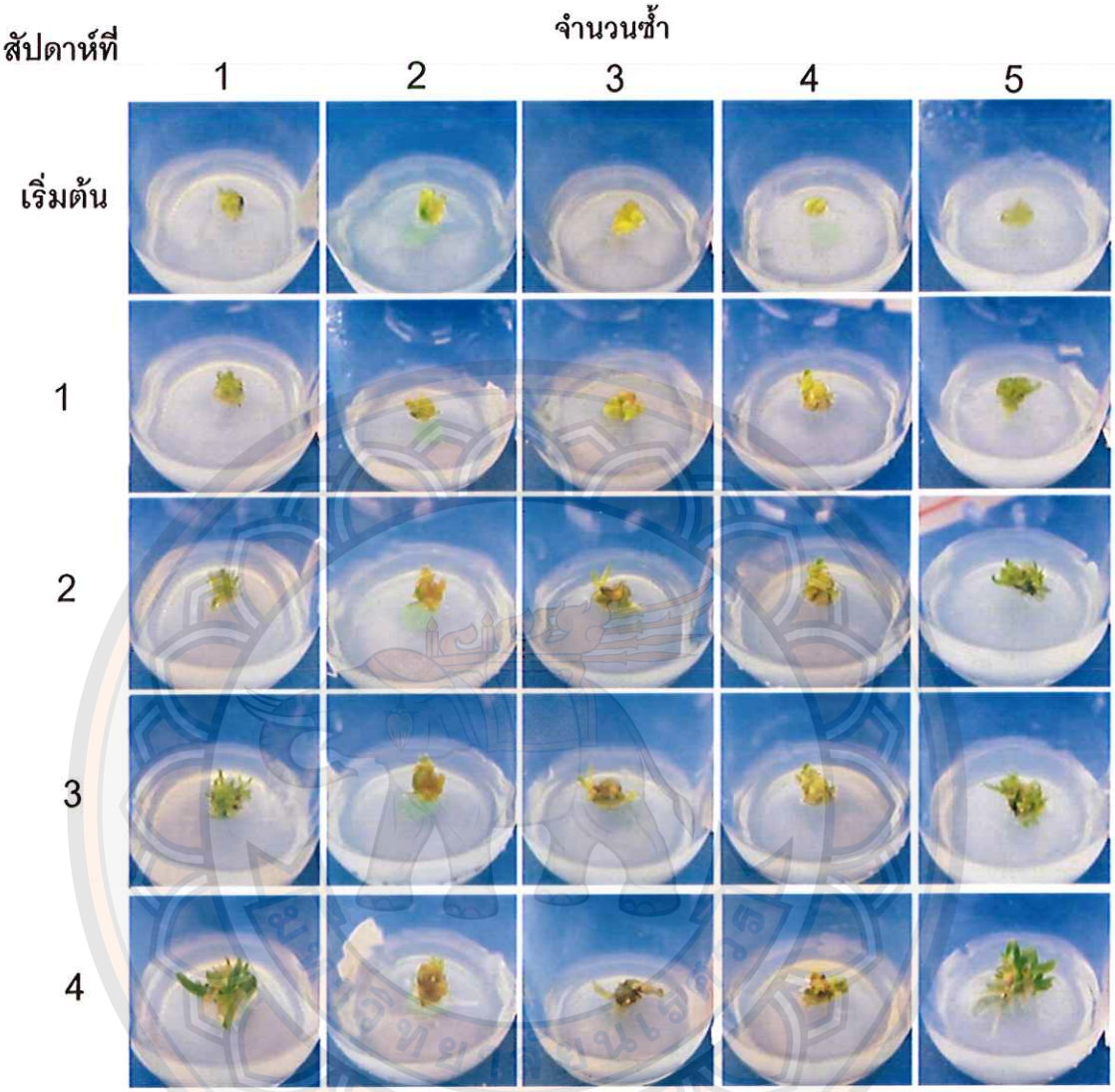

ภาพ 86 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 5 (MS(1962) + BA (2.00 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4



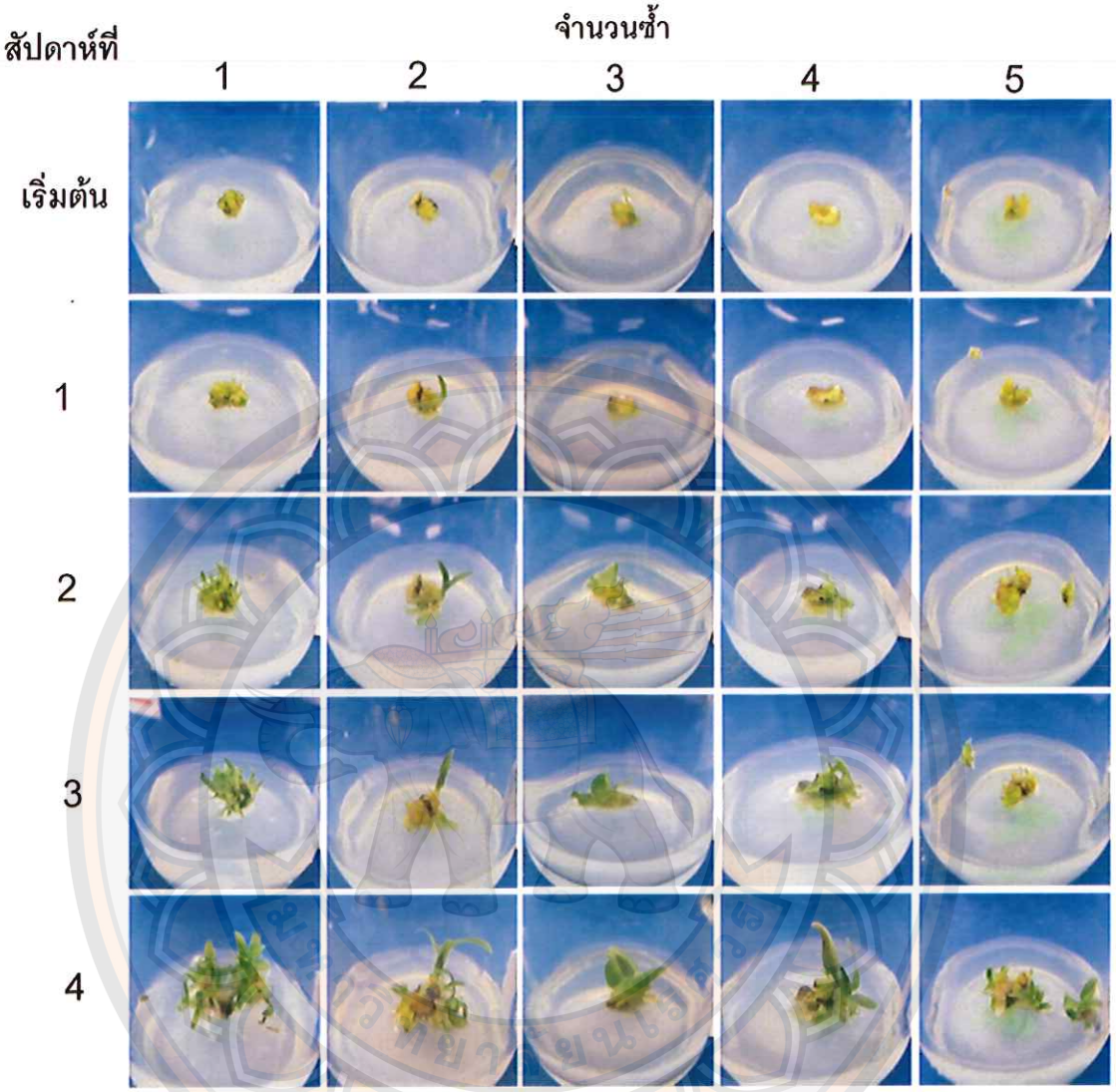

ภาพ 87 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 6 (MS(1962) + IAA (2.00 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4




ภาพ 88 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 7 (MS(1962) + BA (0.0067 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4

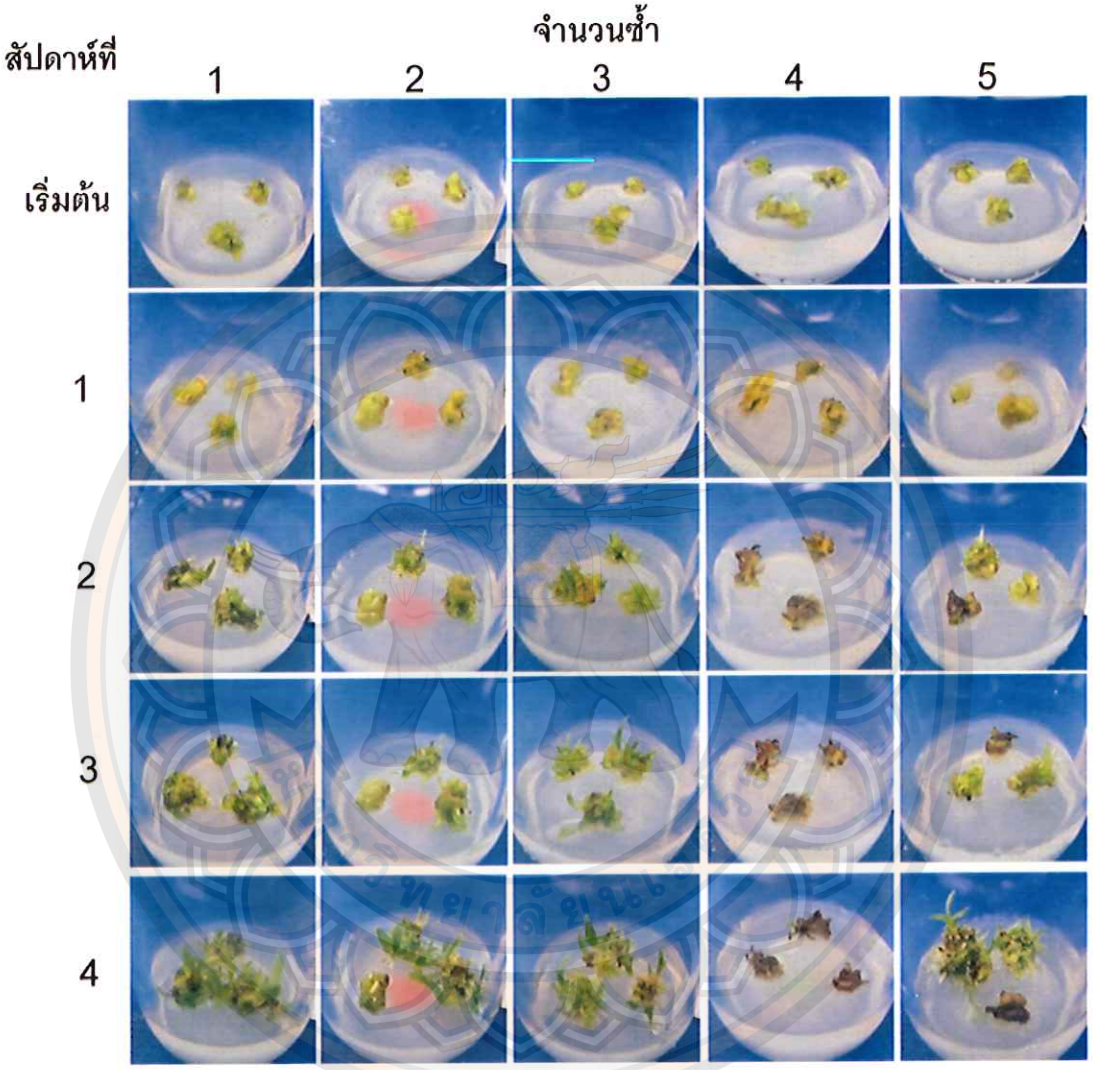



ภาพ 89 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 8 (MS(1962) + IAA (0.0067 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4

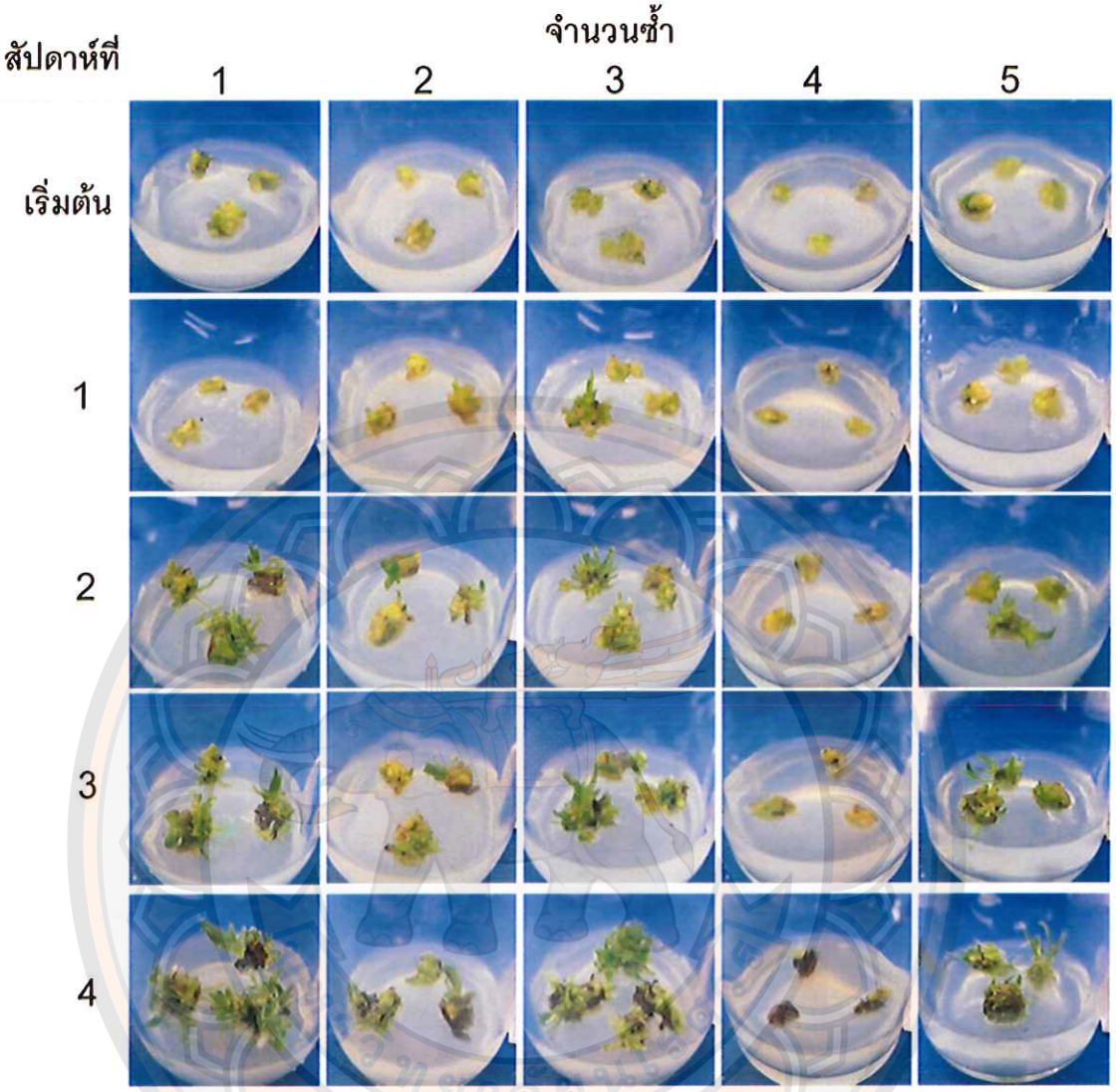



ภาพ 90 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 9 (MS(1962))
ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4

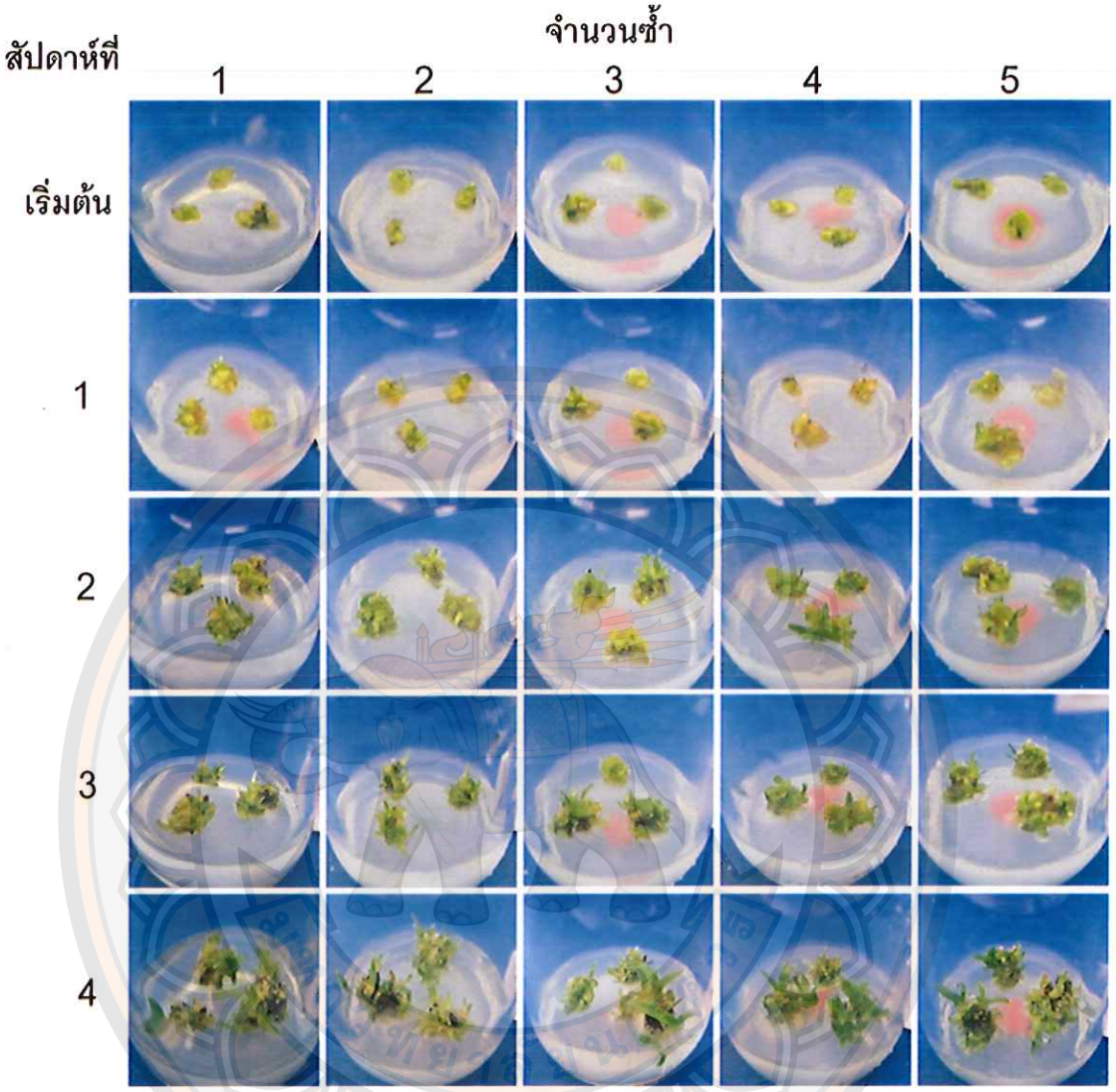
2. ลักษณะชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งที่เจริญในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการศึกษาผลของสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* ที่ได้คัดเลือกต่อการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



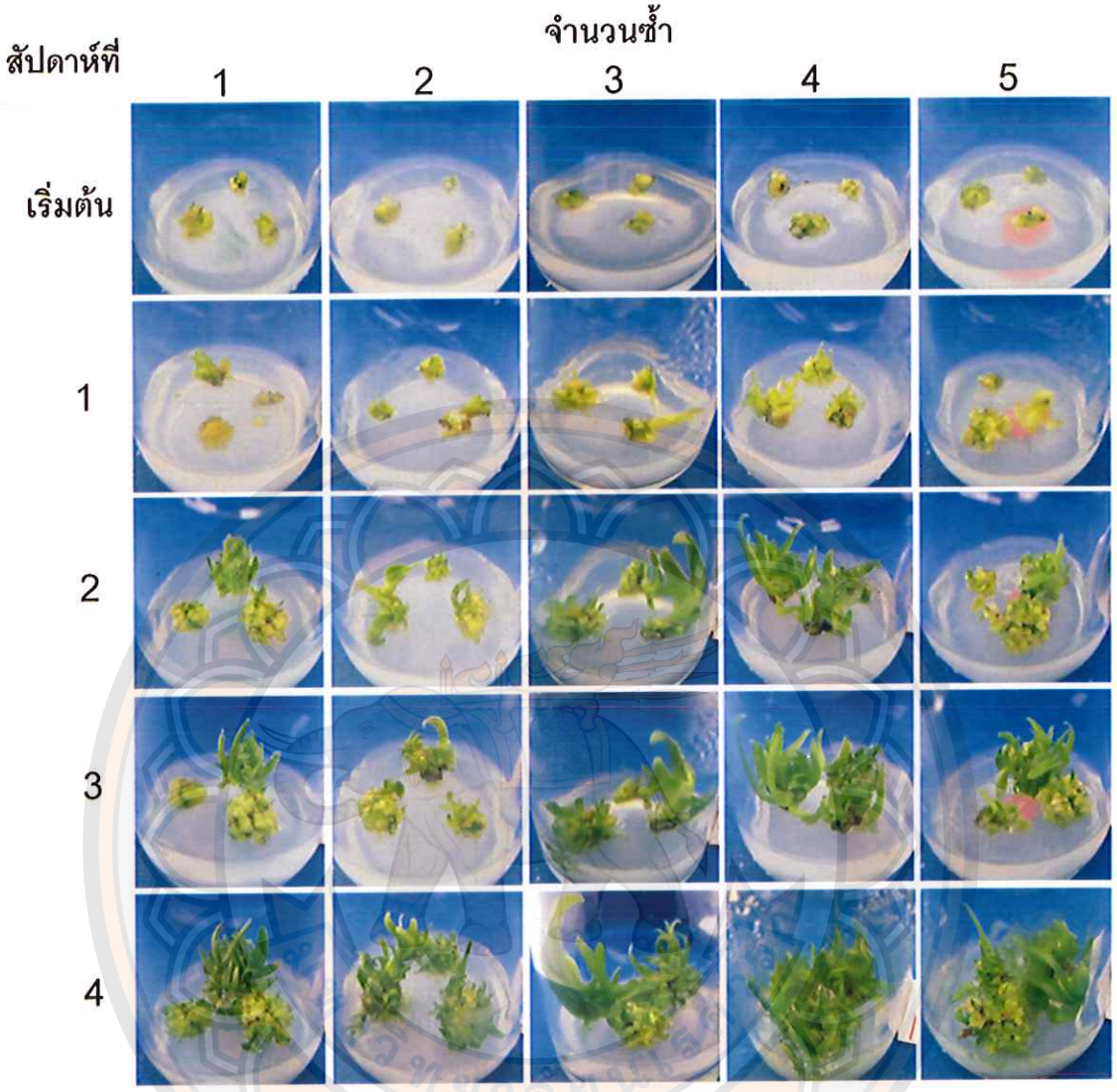

ภาพ 91 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 1 (MS(1962)/Cell 1 min) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4




ภาพ 92 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 2 (MS(1962)/Cell 3 min) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4




ภาพ 93 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 3 (MS(1962)/Cell 5 min) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4




ภาพ 94 ลักษณะของชิ้นส่วนหญ้าปักกิ่งในกรรมวิธีที่ 4 (MS(1962) + BA(2.00 mg/l)) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสัปดาห์ที่ 4