

## บทความวิจัย (Research Article)

ประสิทธิผลของน้ำหมักจาก *Methylobacterium radiotolerans* กลุ่มแยก ED5-9 ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของหญ้าปักกิ่งอภิชาติ ชิดบุรี<sup>1\*</sup>, ธนวุฒิ พรหมบัญญัติ<sup>2</sup>, นารีลักษณ์ นาแก้ว<sup>2</sup>, ศิริพรรณ สารินทร์<sup>2</sup>Effect of fermentation broth from *Methylobacterium radiotolerans* isolate ED5-9 on callus culture of *Murdannia loriformis*Aphichat Chidburee<sup>1\*</sup>, Thanawut Prombunchachai<sup>2</sup>, Nareeluk Nakaew<sup>2</sup>, Siripun Sarin<sup>2</sup><sup>1</sup> Agricultural Technology Research Institute, Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang Province 52000<sup>2</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phisanulok Province 65000

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

Naresuan Phayao J. 2015;8(2):93-95.

## บทคัดย่อ

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

คำสำคัญ: เมทิลโอบาคทีเรียม เรดิโอโทเรอแรน อีดี 5-9, แคลลัส, หญ้าปักกิ่ง

## Abstract

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

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

<sup>1</sup> สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง 52000

<sup>2</sup> ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000  
รับต้นฉบับวันที่ 8 ธันวาคม 2558, รับลงตีพิมพ์วันที่ 17 มิถุนายน 2558

## บทนำ

หญ้าน้ำปักกิ่ง (*Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy) ใช้บรรเทาอาการของมะเร็ง ร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบัน [1] เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขยายพันธุ์สมุนไพรรสขมเพื่อให้เกิดสารทุติยภูมิในกระบวนการสร้างและสลาย (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาปริมาณมาก ภายในระยะเวลาอันสั้น รวมถึงปราศจากการปนเปื้อน สารเคมี [2] สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) หรือ ฮอโมนพืช (plant hormone) เป็นสารเคมีสังเคราะห์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) เช่น กรดน้ำส้มอินโดล-3 (indole-3-acetic acid - IAA) หรือ ออกซิน [3] *Methylobacterium radiotolerans* ไอโซเลท ED5 แยกจากหญ้าน้ำปักกิ่งที่มีกรดน้ำส้มอินโดล-3 อันคุณสมบัติเป็นฮอโมนพืช [4]

คณะผู้วิจัยมุ่งหมายกำหนดหาประสิทธิภาพของน้ำหมัก *M. radiotolerans* ไอโซเลท ED5-9 เป็นส่วนผสมอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสหญ้าน้ำปักกิ่ง

## วัสดุและวิธีการ

ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ *M. radiotolerans* ไอโซเลท ED5-9 อายุ 3 วัน ร้อยละ 10 ในอาหารเพาะเลี้ยงสารอาหารต่ำ ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 กรัม  $\text{KNO}_3$  3.03 กรัม  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125 กรัม  $\text{NaCl}$  0.5 กรัม  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.002 กรัม yeast extract 0.1 กรัมและเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำปริมาตร 1 ลิตร (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มบนเครื่องเขย่า 180 รอบต่อ นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แยกแบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บน้ำหมักส่วนใส (supernatant) และระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กรองน้ำหมักเข้มข้นด้วยชุดกรองแบคทีเรียขนาด 0.1 ไมครอน และเก็บน้ำหมักในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เพาะเลี้ยงแคลลัสของหญ้าน้ำปักกิ่งแบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มทดลองเติมน้ำหมักที่มีกรดน้ำส้มอินโดล-3 จำนวน 4 ความเข้มข้น 0.156, 0.312, 0.474 และ

0.632 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยง Murashige and Skoog 1962 (MS 1962) ส่วนกลุ่มควบคุมสูตรอาหารเพาะเลี้ยง MS 1962 ที่เติม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D แต่ไม่เติมน้ำหมัก ส่วนพืชศึกษาใช้แคลลัสเลี้ยงในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแบบกลุ่มควบคุมนาน 4 สัปดาห์ ตัดให้มีขนาด 0.5 คูณ 0.5 เซนติเมตร (น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.2 กรัม) ทดลองที่อุณหภูมิห้องทั้ง 5 กรรมวิธี วิธีละ 10 ซ้ำ ให้แสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน หลัง 6 สัปดาห์บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับส่วนยอดและราก สถิติใช้โปรแกรมประมวลผล Minitab 17 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย least significant difference - LSD)

## ผลการศึกษา

แคลลัสเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเติมน้ำหมักปนเปื้อนแบคทีเรียระหว่างร้อยละ 25 ถึง 50 หลัง 6 สัปดาห์กลุ่มทดลองน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กลุ่มควบคุมไม่เกิดส่วนยอดและราก ส่วนกลุ่มทดลองที่ต่างความเข้มข้นจำนวนยอดและรากไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนยอดและรากในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองน้ำหมักต่างความเข้มข้นหลัง 6 สัปดาห์

	ยอด	ราก
กลุ่มควบคุม	-	-
กลุ่มทดลอง		
ความเข้มข้น 0.156 มก. ต่อลิตร	2.0	7.0
ความเข้มข้น 0.312 มก. ต่อลิตร	1.8	8.3
ความเข้มข้น 0.474 มก. ต่อลิตร	2.4	8.2
ความเข้มข้น 0.632 มก. ต่อลิตร	2.4	8.5

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## วิจารณ์

แคลลัสเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเติมน้ำหมักปนเปื้อนแบคทีเรียเกิดจากการผลิตแบคทีเรียของกรดน้ำส้มอินโดล-3 รวมถึงสารอาหาร ฮอโมนพืช และไวดามิน [5] กลุ่มทดลองสารเพาะเลี้ยง MS 1962 เติมน้ำหมักต่างความเข้มข้นของกรดน้ำส้มอินโดล-3 ความ

เข้มข้นขึ้นต่ำ 0.156 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำการเกิดยอดและราก [6-8] ส่วนกลุ่มควบคุมสารเพาะเลี้ยงเติม 2,4-D เป็นผลให้แคลลัสพัฒนาต่อเนื่องแต่ไม่เกิดยอดและราก [9,10]

โดยสรุปความเข้มข้นของกรดน้ำส้มอินโดล-3 ต่อประสิทธิภาพชักนำการเกิดยอดและรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนาประเภทยังเป็นคำถามเพื่อการศึกษาคือ

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรผู้ให้การสนับสนุนทางการเงิน รวมถึงภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสตีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ผู้สนับสนุนการใช้เครื่องมือและห้องปฏิบัติการ

### เอกสารอ้างอิง

1. สุภาภรณ์ ปิติพร, สุตใจ พรหมเกิด. หญ้าปักกิ่ง: สมุนไพรทางเลือกของผู้ป่วยโรคมะเร็ง. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ: แปลนพริ้นติ้ง จำกัด; 2555. หน้า 34-67.
2. สมภพ ประธานธรรารักษ์. วัตถุประสงค์สมุนไพรที่มีคุณภาพ: กรณีศึกษาขมิ้นชัน. งานเสวนาขมิ้นชันกินทุกวันป้องกันมะเร็ง; 21 พฤษภาคม 2554; ปราจีนบุรี: มูลนิธิโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร; 2554. หน้า 10-24.
3. รังษฤษฏ์ กาวีติเต. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ; สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2554. หน้า 20-32.
4. ศิริพรรณ สารินทร์, ธนวุฒิ พรหมบัญญัติ, นารีลักษณ์ นาแก้ว, อภิชาติ ชิดบุรี. การคัดแยก

แบคทีเรียกลุ่ม Pink-Pigmented Facultative Methyloprophs (PPFMs) ที่สามารถผลิต Indole Acetic acid จากหญ้าปักกิ่ง. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร. 2556;21(2):14-24.

5. Koenig RL, Morris RO, Polacco JC. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methlobacterium* spp. *J Bacteriol.* 2002;184(7):1832-42.
6. Bonga, JM, Von Aderkas P. In vitro Culture of Tree. *Forestry Sciences.* Vol 38. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1992.
7. Ali B, Hasnain S. Potential of bacterial indoleacetic acid to induce adventitious shoots in plant tissue culture. *Lett Appl Microbiol*, 2007;45(2):128-33.
8. Parimala Devi RP, Sundaram SP, Poorniammal R. Effect of facultative methyloprophs on tissue culturing of rice. *Asian J Bio Sci.* 2010;4(2):207-9.
9. Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 1996;32(4):272-89.
10. Long R, Morris R, Polacco J. Cytokinin production by plant-associated methyloprophic bacteria [Internet]. Abstr No. 1168. *Am Soc Plant Physiol*; 1997. [Cited 2013 March 6]. Available from <http://abstracts.aspb.org/pb1997/public/P54/1471.shtml>