



การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylobacteria (PPFMs) ที่สามารถผลิต Indole Acetic Acid จากหญ้าปักกิ่ง

ศิริพรรณ สารินทร์^{a*} ธนวุฒิ พรหมบุญชัย^b นารีลักษณ์ นาแก้ว^a และ อภิชาติ ชิดบุรี^b

Isolation of Indole Acetic Acid Producing Pink Pigmented Facultative Methylobacteria (PPFMs) from *Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy

Siripun Sarin^{a*}, Thanawut Prombunchachai^b, Nareeluk Nakaew^a and Aphichat Chidburee^b

^aภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

^bสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง

^aDepartment of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

^bAgricultural Technology Research Institute, Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang Province.

*Corresponding author. E-mail: siripunc@nu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylobacteria (PPFMs) ที่สร้างฮอร์โมนพืชออกซินชนิด Indole-3-acetic acid (IAA) จากใบหญ้าปักกิ่ง (*Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy) จากผลการวิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม endophytic PPFMs ที่ให้โคโรเนียมได้ทั้งหมด 34 ไอโซเลต และมีแบคทีเรียกลุ่ม endophytic PPFMs จำนวน 18 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสาร IAA ได้มากกว่า 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ในสภาพการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติม L-tryptophan โดยแบคทีเรีย endophytic PPFMs ไอโซเลต ED5-9 สามารถสร้างสาร IAA ได้สูงที่สุด เท่ากับ 3.472 ไมโครกรัมต่อ และผลจากการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต ED5-9 ด้วยการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยาแบบ Partial 16S rDNA gene sequencing พบว่ามีความเหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831(T) ผลที่ได้จากการวิจัยนี้จะถูกนำไปศึกษาประสิทธิภาพของฮอร์โมนชนิด IAA ที่สร้างจากแบคทีเรียนี้ในการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่งต่อไป

คำสำคัญ: แบคทีเรียกลุ่ม PPFMs, ฮอร์โมนพืช

Abstract

The objective of this research was to isolate Pink Pigmented Facultative Methylobacteria (PPFMs) which capable of producing a phytohormone, indole-3-acetic acid (IAA), from leaves of *Murdannia loriformis*. (Hassk.) R. Rao & Kammathy 34 morphologically different isolates were found and were identified as endophytic PPFMs isolates by showing pink colony. There were 18 endophytic PPFMs isolates produced IAA more than 2.0 µg/ml when incubation in the medium without L-tryptophan supplement. Endophytic PPFMs isolate ED5-9 gave the highest of IAA production of 3.472 µg/ml, and were identified as similar as a strain of *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831(T) by partial 16S rDNA gene sequencing. This effective result will be used for further investigation on the potential of bacterial indole acetic acid to enhance growth of *Murdannia loriformis* in tissue culture.

Keywords: Pink Pigmented Facultative Methylobacteria, indole-3-acetic acid

บทนำ

หญ้าปักกิ่งหรือหญ้าเทวดา (angle grass) มีชื่อเป็นภาษาจีนว่า เล่งจื่อเช่า มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy วงศ์ Commelinaceae เป็นสมุนไพรจีนที่เข้ามาแพร่หลายในประเทศไทย มีการนำต้นพันธุ์มาจากบริเวณสิบสองปันนาทางตอนใต้ของมณฑลยูนนาน ประเทศจีน ปัจจุบันนิยมนำมาใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งปอด เป็นต้น จากรายงานการใช้หญ้าปักกิ่งในผู้ป่วยหลายรายพบว่าทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตขึ้น (สุภาภรณ์ และสุดใจ, 2555) โดยมีรายงานการศึกษาวิจัยพบว่า สามารถลดการจับกันของสารเคมีกับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ (DNA adduct) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเอโซซิมิเทน (azoxymethane) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ และมีฤทธิ์อย่างอ่อนในการป้องกันการเกิดรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ (aberrant crypt foci) (เขมาเรศ และคนอื่นๆ, 2542, น. 1-6) โดยพบสารออกฤทธิ์สำคัญในการต้านเซลล์มะเร็งในกลุ่มไกลโคสฟิงโกลิพิด (glycosphingolipid) คือ 1- β -O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-6'-ene-cosamide)-sphingosine ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และเซลล์มะเร็งลำไส้ของคน (SW620) ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ทำให้เซลล์มะเร็งตายประมาณร้อยละ 50 (Jiratchariyakul, et al., 1998, pp. 10-20) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สมุนไพรได้รับความนิยมนับอย่างมา ส่งผลให้มีความต้องการวัตถุดิบสมุนไพรเป็นจำนวนมาก ทำให้ต้องใช้สารเคมีสังเคราะห์ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) หรือฮอร์โมนพืช (phytohormones) และสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชให้ได้ผลผลิตเร็ว แต่เนื่องจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์เป็นข้อกำหนดที่ต้องควบคุมในมาตรฐานคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรซึ่งต้องมีความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภคไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้สารเคมีสังเคราะห์ดังกล่าวโดยเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตยังมีราคาแพงซึ่งต้องคำนึงถึงต้นทุนในการผลิตด้วย ดังนั้นการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบจากสมุนไพรตั้งแต่การผลิตที่ทางเกษตรที่ถูกต้องและเหมาะสมซึ่งส่งเสริมการ

เจริญของต้นพืชสมุนไพรให้สามารถเจริญเติบโตได้เร็วและให้ผลผลิตที่มีคุณภาพ จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในการขยายพันธุ์พืชสมุนไพรสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในปริมาณที่สูง ให้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาไม่นาน (Nalawade, et al., 2006, pp. 143-154) แต่เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีการเติมฮอร์โมนพืชที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ เช่น ออกซิน (auxin) เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) ดังนั้นการใช้ฮอร์โมนพืชที่เป็นสารอินทรีย์ชีวภาพซึ่งจะทำให้เกิดผลดีต่อการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพและลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ จึงเป็นทางเลือกอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งโดยปกติในธรรมชาตินอกจากพืชที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืชสำหรับส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้ว ยังมีจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชบางชนิดสามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนพืชได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม Pink Pigmented Facultative Methylobacteria (PPFMs) ในสกุล *Methylobacterium* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช (endophytic bacteria) โดยไม่ก่อโรคกับพืช (Aken, et al., 2004; Mano, & Morisaki, 2008, 109-117; Knief, et al., 2010, pp. 440-452) เป็นแบคทีเรียที่มีโคไลนัสซึมพบสามารถใช้เมทานอลซึ่งปล่อยออกมาจากพืชเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานโดยผ่านวิถีเซอริน (serine pathway) และสามารถสร้างฮอร์โมนพืชออกซินชนิด Indole-3-acetic acid (IAA) โดยสามารถถูกกระตุ้นด้วยการเติมกรดอะมิโนแอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan) ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เนื่องจาก tryptophan เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการสร้าง IAA โดยการสังเคราะห์ผ่านสารประกอบ indole-3-pyruvic acid และ indole-3-acetamide ซึ่งพบในเฉพาะพวก methylobacteria (Ivanova, et al., 2001, pp. 452-458; Green, 2005, pp. 567-571) ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนพืชนี้สามารถนำมาใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ (Ali, & Hasnain, 2007, pp. 128-133; Subbarayan, et al., 2010, pp. 257-262) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs สกุล *Methylobacterium* ที่อาศัยร่วมกับหญ้าปักกิ่ง



เพื่อพัฒนาไปสู่การนำไปใช้เพื่อการปรับปรุงวิธีการปลูกหญ้าปักกิ่งในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของหญ้าปักกิ่งในช่วงของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์แบบเกษตรอินทรีย์เพื่อนำไปสู่การเป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs จากใบหญ้าปักกิ่ง (Corpe, 1985, pp. 215–221; Madhaiyan et al., 2007, pp. 1645–1654)

เลือกเก็บใบหญ้าปักกิ่งที่ไม่มีร่องรอยของแมลงหรือหนอนกัดแทะและรอยต่างจากยอดบนสุดลงมา 5 ใบ ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาใช้กรรไกรตัดให้มีขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร มาเช็ดที่พื้นผิวใบโดยล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 1 นาที และ 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง โดยทดสอบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยการนำชิ้นส่วนใบทดลองบนจานอาหาร tryptic soy agar (TSA) และนำน้ำกลั่นที่ใช้ล้างครั้งสุดท้ายไปเกลี่ยลงบนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำใบพืชที่ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวแล้วหนัก 10 กรัม ไปบดให้ละเอียดด้วยทรายละเอียดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilutions) นำไปเกลี่ยลงบนอาหาร ammonium mineral salts agar (AMS) ที่เติมเมทานอลร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร (v/v) และ cycloheximide 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–10 วัน เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้ระยะเวลาในการเจริญแตกต่างกัน ทำการนับจำนวนโคโลนีสีชมพูคำนวณค่า $\log CFU/g$ ของใบพืช เลือกโคโลนีที่มีความแตกต่างกันมาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak บนอาหาร glycerol-peptone agar (GP)

เก็บรักษาโคโลนีเดี่ยวในอาหารเหลว GP ที่มี glycerol ร้อยละ 10 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมีและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* (Lo, & Lee, 2007, pp. 25–34)

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่แยกได้บนอาหาร AMS, GP, Nutrient Agar (NA) และ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตขนาด รูปร่าง สี การส่องผ่านของแสง ความหนืด และเนื้อโคโลนี และศึกษาลักษณะเซลล์ การเรียงตัวของเซลล์ การสร้างแคปซูลและเอนโดสปอร์ การติดสีแกรม และการสร้างสาร polyhydroxybutyrate (PHB) ศึกษาลักษณะทางชีวเคมีเช่น การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase), ออกซิเดส (oxidase) และยูรีเอส (urease) การทดสอบ methyl red และ Voges-Proskauer (MR-VP) การทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate) การทดสอบการย่อยสลายเมดเลียด แป้ง เคซีน (casein) และ เจลาติน การทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) อินโดล (indole) และการเคลื่อนที่ในอาหาร SIM medium อ่านผลหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1–14 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแต่ละการทดสอบ ทำการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาโดยดูจากการเจริญในสภาวะต่างๆ เช่น การทดสอบความสามารถในการทนเกลือโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ และการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 2, 25, 30, 37 และ 45 เป็นเวลา 14 วัน สังเกตโคโลนีสีชมพูทุกวัน และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุชีววิทยาแบบ partial 16S rDNA gene sequencing ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กรุงเทพฯ โดยศึกษาเฉพาะแบคทีเรียโอไซเลตที่ให้ผล การทดลองที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างฮอริโมนพืช ออกซิน

3. การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในการสร้างฮอริโมนพืชออกซิน (Ivanova, et al., 2001, pp. 452–458; Omer, et al., 2004, Shirokikh, et al., 2007, pp. 308–310)ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบต่อปริมาตร 1 ลิตรคือ KH_2PO_4 2 กรัม



(NH₄)₂SO₄ 2 กรัม Mg₂SO₄·7H₂O 0.125 กรัม NaCl 0.5 กรัม FeSO₄·7H₂O 0.002 กรัม Yeast extract 0.1 กรัม และเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยแบ่งเป็นไม่เต็มและเต็ม L-tryptophan 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 3 มิลลิลิตรทุกวัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารส่วนใส (supernatant) ไปวัดปริมาณของ IAA โดยใช้ supernatant ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับ salkowski reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร คำนวณหา IAA เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารประกอบ IAA และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (P < 0.05) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics เวอร์ชัน 17.0

ผลการศึกษา

การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs จากใบหญ้าปักกิ่ง สามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่มีลักษณะโคโลนีสีชมพูได้ และจากผลการนับจำนวนโคโลนีพบว่า มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 2.5×10^3 cfu/g ของใบหญ้าปักกิ่ง และสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้จำนวน 34 ไอโซเลท จากการตรวจสอบน้ำ

กลั่นที่ใช้ล้างใบหญ้าปักกิ่งครั้งสุดท้ายหลังจากทำการฆ่าเชื้อที่พื้นผิว และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำใบพืชให้ละเอียด ก่อนนำไปใช้ ไม่พบลักษณะโคโลนีสีชมพูและโคโลนีลักษณะอื่นๆ ขึ้นบนอาหารที่เพาะเลี้ยง แสดงว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และแบคทีเรียที่แยกได้นั้นเป็นชนิด endophytic PPFMs (ED)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสกุล

Methylobacterium

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีสีชมพูและลักษณะของเซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์กลุ่ม PPFMs จำนวน 34 ไอโซเลท พบว่า โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม หนูนโค้งจากผิวหน้าอาหารและนูนเป็นปุ่มตรงกลาง ผิวหน้าโคโลนีเกลี้ยงแต่เป็นคลื่นที่ไม่แน่นอน พบทั้งแบบขอบเรียบและหยัก โปร่งแสงและทึบแสง เนื้อโคโลนีละลายเนยเหลว และจากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ มีรูปร่างท่อน และมีการสร้าง PHB โดยส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับความเข้มข้นของสารประกอบ NaCl 2 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลการทดสอบ catalase, oxidase และ motility เป็นผลบวก ผลการทดสอบ indole, MR-VP, H₂S, การย่อยสลายแป้ง เจลาติน เคซีน และเม็ดเลือดแดง เป็นลบ ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* แต่จะมีความแตกต่างของการใช้ citrate และการสร้างเอนไซม์ urease ทำให้สามารถจัดได้เป็น 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการจัดกลุ่มแบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* ตามลักษณะทางชีวเคมีของการใช้สาร Citrate และการสร้างเอนไซม์ Urease

ลักษณะทางชีวเคมี	ไอโซเลท
Citrate (-), Urease (+)	ED2-1, ED3-8
Citrate (+), Urease (+)	ED1-4, ED1-9, ED1-10, ED2-3, ED2-5, ED2-4, ED2-6, ED2-8, ED2-9, ED2-10, ED2-11, ED3-1, ED3-2, ED3-3, ED 3-4, ED3-5, ED3-6, ED3-7, ED, 3-9, 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



การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ในการสร้างฮอร์โมนพืชออกซิน

จากการศึกษาการสร้างฮอร์โมนพืชออกซินชนิด IAA ของแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จำนวน 34 ไอโซเลท พบว่าสามารถสร้าง IAA ได้ในปริมาณแตกต่างกัน และสามารถสร้างได้ทั้งในอาหารเหลว LNM ที่เติมและไม่เติม L-tryptophan โดยแบคทีเรียไอโซเลท ED5-9 ให้ปริมาณ IAA เฉลี่ยสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ

($P < 0.05$) เท่ากับ 3.472 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในอาหารเหลว LNM ที่ไม่เติม L-tryptophan (ตารางที่ 2) เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์นี้จะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* ที่เจริญในอาหารเหลวที่ไม่เติม L-tryptophan และสามารถสร้าง IAA ได้มากกว่า 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งพบว่ามีจำนวนทั้งหมด 18 ไอโซเลท

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของปริมาณ IAA ที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* (N=9)

ไอโซเลท	IAA ($\mu\text{g/ml}$)	ไอโซเลท	IAA ($\mu\text{g/ml}$)
	ไม่เติม L-tryptophan		เติม L-tryptophan 0.2 mg/ml
ED5-9	3.472 a	ED2-8	2.569 a
ED4-4	2.639 b	ED2-10	2.500 ab
ED3-1	2.569 bc	ED2-3	2.326 abc
ED1-10	2.569 bc	ED2-6	2.326 abc
ED3-5	2.500 bcd	ED1-9	2.257 abcd
ED5-6	2.500 bcd	ED5-9	2.257 abcd
ED3-2	2.465 bcd	ED2-12	2.188 abcde
ED1-9	2.396 bcde	ED1-10	2.083 abcdef
ED2-6	2.361 bcdef	ED3-1	2.083 abcdef
ED2-8	2.361 bcdef	ED4-4	2.049 abcdef
ED3-9	2.222 bcdefg	ED4-5	1.979 bcdefg
ED2-11	2.188 bcdefg	ED5-2	1.910 cdefg
ED4-5	2.153 cdefg	ED1-5	1.875 cdefg
ED2-3	2.118 cdefgh	ED2-11	1.701 defgh
ED3-7	2.083 defgh	ED1-2	1.667 efghi
ED1-2	2.049 defghi	ED2-5	1.597 fghi
ED2-5	1.979 efghij	ED5-6	1.528 fghij
ED5-2	1.979 efghij	ED3-9	1.493 ghij
ED5-12	1.910 fghijk	ED3-5	1.458 ghijk
ED2-12	1.875 ghijk	ED3-7	1.215 hijkl
ED2-4	1.875 ghijk	ED5-12	1.181 hijklm
ED5-5	1.840 ghijk	ED3-2	1.146 ijklm
ED2-10	1.667 hijkl	ED2-4	1.042 jklmn
ED1-5	1.597 ijkl	ED2-1	1.007 jklmn
ED1-4	1.563 jkl	ED3-4	0.938 klmn
ED4-3	1.563 jkl	ED3-6	0.938 klmn
ED2-1	1.528 jkl	ED5-5	0.938 klmn
ED3-4	1.458 klm	ED4-3	0.833 lmn
ED4-1	1.389 lm	ED3-8	0.694 lmn
ED3-3	1.319 lm	ED4-1	0.694 lmn



ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	IAA ($\mu\text{g/ml}$) ไม่เติม L-tryptophan	ไอโซเลท	IAA ($\mu\text{g/ml}$) เติม L-tryptophan 0.2 mg/ml
ED3-6	1.285 lmn	ED2-9	0.694 lmn
ED3-8	1.250 lmn	ED1-4	0.625 mn
ED2-9	1.076 mn	ED3-3	0.625 mn
ED5-3	0.938 n	ED5-3	0.556 n

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุชีววิทยาของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sequencing พบว่ามีความเหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831(T) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยมีค่าการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (similarity) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลท ED5-9 กับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831(T)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3')
1	ED5-9	16S rDNA	GCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGC CCTTCGGGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTG GGAACGTGCCTTCTGGTTCGGAATAACCTGGGAACT AGGGCTAATACGGATACGCCCTTTGGGGAAAGGTTT ACTGCCGGAAGATCGGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTG GTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCT GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGAC ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT ATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCG CGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTT ATCCGGGACGATAATGACGGTACCGGAGGAATAAGCC CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAA GGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGG GCGCGTAGGCGGCGTTTAAAGTCGGGGGTGAAAGCCT GTGGCTCAACCACAGAATGGCCTTCGATACTGGGACG CTTGAGTATGGTAGAGGTTGGTGGAAGTGCAGTGTA GAGGTGAAATTCGTAGATATTCGAAGAACACCGGTG GCGAAGGCGGC



ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
2	<i>M. radiotolerans</i> JCM2831(T)	16S rDNA Accession: CP001001	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCA GGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGCCCTTCGGGGT CAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGAACGTGCC TTCTGGTTCGGAATAACCCTGGGAACTAGGGCTAATA CCGGATACGCCCTTTTGGGGAAGGTTTACTGCCGGAA GATCGGCCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAC GGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAG GATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAT GAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTATCCGGGACG ATAATGACGGTACCGGAGGAATAAGCCCCGGCTAACT TCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGC GTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCTAGGC GGCGTTTTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAAC CACAGAATGGCCTTCGATACTGGGACGCTTGAGTATG GTAGAGGTTGGTGAACTCGGAGTGTAGAGGTGAAAT TCGTAGATATTCGCAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGG CCAACTGGACCATCACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCG TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAATGCCAGCTGTTGGGGTGCTTGC ACCGCAGTAGCGCAGCTAACGCTTTGAGCATTCCGCCT GGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAAGGAATT GACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA ATTGGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCATCCTTTGACA TGGCGTGTACCCAGAGAGATCTGGGGTCCCCCTTCGGG GGCGCGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG CAACCCACGTCCTTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCAC TCTAGGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGT GTGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGATGG GCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAGG CGAAGGAGCGATCTGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTC TCAGTTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAG GCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGG TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCATGGGAGTTGGTCTTACCCGACGGCGCTGCGCCA ACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGCGA CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA



อภิปรายผลการศึกษา

จากผลการวิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้โคโลนีสีชมพูอ่อนซึ่งเป็นสารพวกคาร์โรทีนอยด์ (carotenoid) ที่ไม่แพร่ลงในอาหารซึ่งเป็นลักษณะเด่นของแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Corpe, et al., 1982, pp. 483-494) และจากผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* ซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้สามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนอะตอมเดียวโดยผ่านทาง serine pathway โดย *Methylobacterium* ส่วนใหญ่จะไม่สามารถย่อยสารประกอบ casein, starch, gelatin, cellulose, และ lecithin สามารถสร้างเอนไซม์ urease แต่ไม่สร้างเอนไซม์ β -galactosidase, L-ornithine decarboxylase, L-lysine decarboxylase และ L-arginine dihydrolase ไม่สร้างสารประกอบ indole และ H_2S ให้ผลการทดสอบ MR-VP เป็นลบ ส่วนผลการทดสอบ catalase และ oxidase เป็นบวก บางชนิดสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้ (Green, 2005, pp. 567-571; Green, 2006, pp. 257 - 265) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ (Pirttia, et al., 2000) ที่สามารถแยกแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาของต้นสน และ (Mano, & Morisaki, 2008) ที่พบแบคทีเรีย endophytic PPFMs อยู่ภายในเนื้อเยื่อต้นข้าว และสอดคล้องกับการศึกษาของ (Araujo, et al., 2002) ซึ่งพบแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ในสกุล *Methylobacterium* spp. เช่น *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans* และ *M. zatmanii* ในเนื้อเยื่อของต้นส้ม (*Citrus sinensis*) สำหรับการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 2 และ 45 องศาเซลเซียส และในการทดสอบการทนต่อเกลือ NaCl ซึ่งพบว่าไม่สามารถทนต่อเกลือที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าและมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ ดังนั้นจึงสามารถจัดไอโซเลทที่แยกได้จากใบหญ้าปักกิ่งอยู่ในสกุล *Methylobacterium* (Lo, et al., 2007, pp. 25-34) และจากผลการศึกษาทางอนุชีววิทยา

เฉพาะแบคทีเรียไอโซเลท ED5-9 ที่ให้ผลการทดลองที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยการวิเคราะห์แบบ Partial 16S rDNA sequencing พบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831(T) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ (Podolich, et al., 2009) ซึ่งพบแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs สายพันธุ์ใหม่ คือ *M. radiotolerans* IMBG290 ที่แยกได้หลังจากการทดลองปลูกต้นมันฝรั่งพร้อมกับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* IMBG163 โดยใช้วิธี in situ hybridization method (ISH/FISH) โดยพบตามใบและลำต้น แต่ไม่พบที่ราก

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกลุ่ม endophytic *Methylobacterium* ที่แยกได้ในการสร้างฮอร์โมนพืชออกซินชนิด IAA พบว่าสามารถสร้างฮอร์โมนได้ทั้งในสภาพการเพาะเลี้ยงในอาหารที่การเติมและไม่มีการเติม L-tryptophan ในปริมาณแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลท ED5-9 ให้ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองสูงที่สุด เท่ากับ 3.472 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่ไม่มีการเติม L-tryptophan ในขณะที่ให้ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง เท่ากับ 2.257 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่มีการเติม L-tryptophan ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียมีการสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถีของ indole-3-pyruvic acid แทนการผ่านทาง L-tryptophan ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ (Ivanova, et al., 2001) พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs สามารถสร้างฮอร์โมนพืชออกซินชนิด IAA ได้ในปริมาณ 3-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถพบ indole-3-pyruvic acid และ indole-3-acetamide ในเฉพาะพวก methylotrops ที่มีวิถีเมแทบอลิซึมสารประกอบคาร์บอนอะตอมเดียวผ่านทาง serine ถึงแม้ว่าการสร้างออกซินของแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs สามารถถูกกระตุ้นโดยการเติมแอล-ทริปโตเฟนในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแต่จะถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียมไอออน (ammonium ions) นอกจากนี้ อาจเกิดเนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวอาจจะไม่มีเอนไซม์ tryptophan decarboxylase และ tryptophan side-chain oxidase แต่มีเอนไซม์ aminotransferase ที่หลากหลาย ดังนั้นจึงอาจมีการสังเคราะห์ IAA ของ PPFMs โดยผ่าน indole-3-pyruvic acid และการศึกษาของ (Doronina, et al., 2002) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม PPFMs ในสายพันธุ์



M. radiotolerans VKM B-2144 (= JCM 2831(T)) สามารถสร้างฮอร์โมนพืชออกซินชนิด IAA ได้ในปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุปผลการศึกษา

จากผลการวิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม endophytic PPFMs ในสกุล *Methylobacterium* จากใบหญ้าปักกิ่ง ได้ทั้งหมดจำนวน 34 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืชออกซินชนิด IAA ในปริมาณแตกต่างกัน ทั้งในสภาพการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมและไม่เติม L-tryptophan และมีแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 18 ไอโซเลท ที่สามารถสร้าง IAA ได้มากกว่า 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียไอโซเลท ED5-9 ให้ผลการทดลองสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เท่ากับ 3.472 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาพการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม L-tryptophan และพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีเอกลักษณ์ทางอนุชีววิทยาของสายพันธุ์เหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831(T) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยนี้จะถูกนำไปศึกษาประสิทธิภาพของฮอร์โมนชนิด IAA ที่สร้างจากแบคทีเรียนี้ในการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าปักกิ่งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2555 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่ รวมทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดการวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- เยาวเรศ อินทียศ, Kinouchi, T., อุษณีย์ วินิจเขต คำนวน และ Ohnishi, Y. (2542). ผลของสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งต่อการเกิด Aberrant Crypt Foci และ DNA Adduct ในลำไส้ใหญ่ของหนูขาว. *เชียงใหม่เวชสาร*, 38(1-2), 1-6.
- สุภาภรณ์ ปิติพร และสุดใจ พรหมเกิด. (2555). *หญ้าปักกิ่ง : สมุนไพรทางเลือกของผู้ป่วยโรคมะเร็ง* (พิมพ์ครั้งที่ 6). กรุงเทพฯ: แปลนพรีนติ้ง จำกัด.
- Aken, B. V., Yoon, J. M., & 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., & Hasnain, S. (2007). Potential of Bacterial Indoleacetic Acid to Induce Adventitious Shoots in Plant Tissue Culture. *Letters in Applied Microbiology*, 45(2), 128-133.
- Araujo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., Jr., Elsas, J. D., Vuurde, J. W. L., & 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.
- Corpe, W. A. (1985). A Method for Detecting Methylophilic Bacteria on Solid Surfaces. *Journal of Microbiological Methods*, 3(3-4), 215-221.



- Corpe, W. A., & Basile, D. V., (1982). Methanol-Utilizing Bacteria Associated with Green Plant. *Developments in Industrial Microbiology*, 23, 483-494.
- Debnath, M., Malik, C. P., & Bisen, P. S. (2006). *Micropropagation: A Tool for the Production of High Quality Plant-based Medicines*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(1), 33-49.
- Doronina, N. V., Ivanova, E. G., & Trotsenko, Yu. A. (2002). New Evidence for the Ability of Methylobacteria and Methanotrophs to Synthesize Auxins. *Microbiology*, 71(1), 130-132.
- Green, P. N. (2005). Methylobacterium. 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 & E. Stackebrandt (Eds.). *The Prokaryotes* :Vol.5 (pp. 257 -265). Singapore: Springer Science+Business Media, LLC.
- Jiratchariyakul, W., Okabe, H., Moongkarn, P., & Frahm, A. W. (1998). Cytotoxic Glycosphingolipid from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao & Kam. *Thai Journal of Phytopharmacy*, 5(1), 10-20.
- Ivanova, E. G., Doronina, N. V., & Trotsenko, Yu. A. (2001). Aerobic Methylobacteria Are Capable of Synthesizing Auxins. *Microbiology*, 70(4), 452-458.
- Knief, C., Frances, L., & 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.
- Lo, J. M. L., & Lee, C. (2007). Phenotypic Characterization of Air-Borne Pink Pigmented Facultative Methylobacterium Bacteria from a High Vehicular Traffic Density Environment in Manila, Philippines. *The Philippine Scientist*, 44, 25-34.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., & Sa, T. (2007). Influence of Plant Species and Environmental Conditions on Epiphytic and Endophytic Pink-Pigmented Facultative Methylobacterium Bacterial Populations Associated with Field-grown Rice Cultivars. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(10), 1645-1654.
- Mano, H., & Morisaki, H. (2008). Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes and Environments*, 23(2), 109-117.
- Nalawade, S. M., & Tsay, H. S. (2004). In Vitro Propagation of Some Important Chinese Medicinal Plants and Their Sustainable Usage. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40(2), 143-154.
- Omer, Z. S., Tombolini, R., Broberg, A., & Gerhardson, B. (2004). Indole-3-acetic Acid Production by Pink-Pigmented Facultative Methylobacterium Bacteria. *Plant Growth Regulation*, 43(1), 93-96.
- Pirttilä, A. M., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllylä, R., & Hohtola, A. (2000). Detection of Intracellular Bacteria in the Buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3073-3077.
- Podolich, O. V., Ovcharenko, L. P., Kozhyrovska, N. O., & Pirttilä, A. M. (2009). Detection of Methylobacterium radiotolerans IMBG290 in Potato Plants by In situ Hybridization. *Biopolymers and Cell*, 25(2), 115-119.



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

Subbarayan, K., Varadharajan, N., & 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.

