ผลของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพต่อการเจริญเติบโตภายในหลอดทดลองของ *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.

Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles on *in vitro* growth of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.

ปรียานุช ลาขุนทด (Preeyanuch Lakhunthod)* อรรถชัย ตรันเจริญ (Attachai Trunjaruen)*
ดร. ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์ (Dr. Piyada Theerakulpisut)**

บทคัดย่อ

เนื่องจากอนุภาคนาโนเงินมีคุณสมบัติฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ จึงมีการใช้อนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดที่ใช้ในชีวิตประจำวัน ซึ่งอาจทำให้มีการปนเปื้อนของอนุภาคนาโนเงินสู่สิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดผลเสียต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพต่อการเจริญของกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยศึกษาผลของอนุภาคนาโนเงินต่อการเพิ่มจำนวนและการเจริญของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ (PLBs) ของกล้วยไม้กะเรกะร่อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) โดยนำเมล็ดกล้วยไม้จากฝักที่มีอายุ 10 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดกล้วยไม้จะงอกและเจริญเป็นโปรโตคอร์ม เมื่อโปรโตคอร์มอายุ 60 วัน นำไปเลี้ยงลงในอาหารเหลวเพื่อให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ โดยใช้อาหารสูตร ND ที่เติม naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับอนุภาคนาโนเงินและซิลเวอร์ไนเตรทที่ระดับความเข้มข้น 2, 4 และ 6 mg/l ตามลำดับ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรก (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2-4 (เติมอนุภาคนาโนเงิน ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 mg/l) และ กลุ่มที่ 5-7 (เติมซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 mg/l) ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วย 6 ซ้ำ (แต่ละซ้ำใช้จำนวน 10 โปรโตคอร์ม) เป็นเวลา 45 วัน จากการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนเงินความเข้มข้น 4 และ 6 mg/l และซิลเวอร์ไนเตรททุกความเข้มข้น ทำให้น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และจำนวน PLBs ที่เกิดใหม่ต่อโพรโตคอร์ม ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้อาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งสำหรับใช้การทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโนต่อเซลล์พืช หรือใช้ในการคัดเลือกเซลล์พืชที่ทนทานต่อความเป็นพิษของโลหะหนัก

ABSTRACT

Due to its bactericidal property silver nanoparticles (AgNPs) have been incorporated in several industrial products widely used in everyday life. These AgNPs if leaked into the environment in high concentrations can create a cause of concern due to its toxicity to living organisms. This study was conducted to determine the effects of biosynthesized AgNPs on growth of an *in vitro* cultured orchid, Kare Karon (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.). Seeds from the 10-month-old fruits of the orchid were cultured on solid ND medium supplemented with 1% sucrose to produce protocorms. The 60-day-old protocorms were then transferred to liquid ND medium supplemented with 0.5 mg/l naphthalene acetic acid (NAA) to induce the production of protocorm-like bodies (PLBs). Seven experimental groups were set up as follows: the first group (control), the second to the fourth groups (adding AgNPs at 2, 4 and 6 mg/l) and the fifth to the seventh groups (adding silver nitrate at 2, 4 and 6 mg/l). Each treatment

consisted of six replicates (10 protocorms in each replicate). After 45 days in culture it was found that AgNPs (4 and 6 mg/l) and silver nitrate significantly decreased fresh weight, dry weight and number of PLBs per protocorm compared to the control group. This *in vitro* study may serve as an alternative method for testing cytotoxicity of nanoparticles on plants or for selecting somatic cells tolerant to heavy metals for future plant improvement.

คำสำคัญ: อนุภาคนาโนเงิน กล้วยไม้กะเรกะร่อน โปรโตคอร์มไลค์บอดี้

Keywords: silver nanoparticles, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., Protocorm-like body

**นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

***ศาสตราจารย์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

กล้วยไม้ป่ากะเรร่อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) เป็นกล้วยไม้ป่าประเภทอิงอาศัยพบในป่าเต็งรัง ป่าผลัดใบและป่าไม่ผลัดใบ มีรายงานว่ามีสรรพคุณทางยา โดยมีการนำส่วนของรากไปใช้ประโยชน์ในรักษาลดอาการอัมพาต (Dash et al., 2008) นอกจากนี้ยังนิยมปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับและเป็นที่ต้องการของตลาด ด้วยเหตุนี้กล้วยไม้ป่ากะเรกะร่อนมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม และการกระทำของมนุษย์ที่ลักลอบนำกล้วยไม้ออกจากป่าเพื่อประโยชน์ทางการค้าและใช้เป็นสมุนไพร เป็นต้น

โปรโตคอร์ม หมายถึงต้นอ่อนของกล้วยไม้ที่เจริญมาจากไซโกติกเอ็มบริโอ (zygotic embryo) ของเมล็ดกล้วยไม้ ส่วนโปรโทคอร์มไลค์บอดี้ (protocorm-like bodies; PLBs) หมายถึงโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายโปรโตคอร์ม แต่ PLBs เจริญมาจากเซลล์ร่างกาย (somatic cell) เมื่อนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพหลอดทดลอง (Cardoso et al., 2020; Lee et al., 2013) การชักนำให้เกิด PLBs มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไม้โดยเฉพาะกล้วยไม้ที่หายากใกล้สูญพันธุ์ และสามารถชักนำให้เกิดได้จากหลายชิ้นส่วน (Park et al., 2003)

ในปัจจุบันความรู้ด้านนาโนเทคโนโลยีของโลหะเป็นที่สนใจเนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารชนิดเดียวกันที่มีขนาดใหญ่ โลหะหลายชนิดถูกนำมาสังเคราะห์ให้มีขนาดระดับนาโนซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 1 ถึง 100 นาโนเมตร เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น โลหะเงิน โลหะทองแดง โลหะทอง และ โลหะไทเทเนียม (Kalimuthu et al., 2008) เป็นต้น อนุภาคนาโนเงินสามารถสังเคราะห์ได้ทั้งวิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ ปัจจุบันนักวิจัยเริ่มให้ความสนใจในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยวิธีการทางชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษจากกระบวนการสังเคราะห์ และเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้สารจากธรรมชาติที่ได้จากจุลินทรีย์และพืชเป็นตัวรีดิวซ์ และสารให้ความคงตัว ทำให้มีต้นทุนการผลิตต่ำ (Balashanmugam et al., 2017) กาลพฤกษ์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia bakeriana* Craib. อยู่ในวงศ์ Fabaceae จัดเป็นพรรณไม้ยืนต้นผลัดใบขนาดเล็กถึงขนาดกลางสูงได้ประมาณ 5-15 เมตร ในฤดูหนาวของประเทศไทยต้นกาลพฤกษ์จะผลัดใบทิ้งเกือบหมดและเหลือเพียงดอกซึ่งหากเราสามารถนำใบกาลพฤกษ์มาใช้ประโยชน์ก็อาจจะสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มได้อีกด้วย จากงานวิจัยของ Ahmed et al. (2012) รายงานว่าพืชในจีนัส *Cassia* ส่วนของลำต้น และ ใบมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น สารแอลคาลอยด์ ฟีนอลิก เฟลโวนอยด์ เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถใช้เป็นตัวรีดิวซ์ในกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้ ปัจจุบันได้มีการนำอนุภาคนาโนเงินไปประยุกต์ใช้ทางด้านต่างๆ เช่น อิเล็กทรอนิกส์ การแพทย์ การเกษตร และ สิ่งแวดล้อม (Ge et al., 2014) เนื่องจากอนุภาคนาโนเงินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อรา จึงมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ใน

ชีวิตประจำวันจำนวนมาก ได้แก่ ผงซักฟอก การบรรจุหีบห่ออาหาร สิ่งทอที่ต้านทานการเกิดกลิ่น อุปกรณ์เครื่องใช้ในบ้าน และอุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นต้น

การที่อนุภาคนาโนเงินถูกนำมาใช้ในภาคอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากขึ้นทำให้มีความกังวลถึงการปนเปื้อนของอนุภาคนาโนเงินในสิ่งแวดล้อม ทำให้มีความเสี่ยงในเรื่องของความเป็นพิษต่อสุขภาพของมนุษย์ และผลกระทบต่อการเจริญและความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ สัตว์ และพืชในธรรมชาติ อนุภาคนาโนเงิน (Ag^{o}) เมื่ออยู่ในน้ำสามารถแตกตัวเป็นไอออนอิสระ (Ag^{+}) ซึ่งประจุบวกของซิลเวอร์อิออนสามารถเกิดอันตรกิริยากับประจุลบของสารชีวโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ได้ การเกิดอันตรกิริยากับหมู่ไทออล (-SH) ของโปรตีน และหมู่ซัลเฟต ($-PO_4^{2-}$) ของกรดนิวคลีอิก ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านั้นไม่สามารถทำหน้าที่ได้ อีกทั้งยังมีรายงานว่าอนุภาคนาโนเงินมีการสะสมในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้ เช่น แบคทีเรีย สาหร่าย หอย กุ้ง ปู (Chen and Zhang, 2014) ทำให้เกิดการเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต จากรายงานของ Teixeira da Silva (2014) ทำการศึกษาผลของโลหะหนักหลายชนิด (Al, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Zn) ต่อการเจริญของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ในกล้วยไม้ *Cymbidium* ลูกผสม (hybrid) พบว่า โลหะหนักส่งผลทำให้น้ำหนักสด การเกิดใหม่ของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย Cd ทำให้โปรโตคอร์มไลค์บอดี้เกิดขึ้นใหม่น้อยที่สุด

จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีรายงานถึงผลของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพต่อการเจริญของโปรโตคอร์มไลบอดี้กล้วยไม้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานและนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้ หากเราสามารถใช้กล้วยไม้เป็นพืชตัวแทน (plant model) ในการศึกษาผลของความเป็นพิษของโลหะหนักในพืช ซึ่งปัจจุบันมีการปลดปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้นทุกวัน หรืออาจจะใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กล้วยไม้ที่ทนทานต่อโลหะหนักได้ อีกทั้งยังสามารถศึกษาเพื่อหาสาร secondary metabolite ที่เป็นประโยชน์เนื่องจากกล้วยไม้หลายชนิดมีคุณสรรพคุณทางยาที่จะมีการผลิตออกมามากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคนาโนชนิดต่าง ๆ ต่อไปได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ (protocorm-like bodies; PLBs) ภายในหลอดทดลองของกล้วยไม้กะเรกะร่อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.)

วิธีการวิจัย

การศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีทางชีวภาพ

นำใบกาลพฤกษ์ (*Cassia bakeriana* Craib) มาล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งให้ได้น้ำหนัก 20 กรัม แช่ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำสกัดใบกาลพฤกษ์ผสมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (อัตราส่วน 1:6) ไปฉายด้วยคลื่นไมโครเวฟเป็นเวลา 90 วินาทีเพื่อเร่งปฏิกิริยา ใช้สารสกัดจากใบกาลพฤกษ์เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agents) ซิลเวอร์ไอออน (Ag^{+}) ที่แตกตัวมาจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ให้ได้เป็นอนุภาคนาโนเงิน (Ag^{o}) ตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคนาโนเงินด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) การเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (EDX) และฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟาเรดสเปกโทรสโกปี (FTIR)

การเตรียมโปรโตคอร์ม (Protocorm)

นำฝักกล้วยไม้กะเรกะร่อน อายุ 10 เดือน มาตัดส่วนหัวและส่วนปลายฝักกล้วยไม้ออกเล็กน้อย จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด และฟอกฆ่าเชื้อโดยจุ่มฝักในเอทานอล 70 เปอร์เซนต์ ตามด้วยเอทานอล 20 เปอร์เซนต์ และโซเดียมไฮโปคลอ

ไรด์ (sodium hypochlorite) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ทำการผ่าฝักออกตามแนวยาว แล้วใช้ปากคีบเขี่ยเมล็ดลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ที่ 5.4 และใช้ผงวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการของ Trunjaruen and Taratima (2018) เพาะเลี้ยงเมล็ดให้เจริญไปเป็นโปรโตคอร์ม ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16/8 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ เป็นเวลา 60 วัน สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของอนุภาคนาโนเงินและซิลเวอร์ไนเตรตต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ (protocorm-like bodies; PLBs)

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้กะเรกะร่อนอายุ 60 วันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง จากการทดลองก่อนหน้านี้ เลือกโปรโตคอร์มให้มีขนาดเท่าๆกัน นำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตามวิธีของ Trunjaruen and Taratima (2018) ที่มีการเติมอนุภาคนาโนเงิน (AgNPs) และซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ความเข้มข้น 2, 4, และ 6 mg/l ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely block design; CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 6 ซ้ำ (แต่ละซ้ำใส่ 10 โปรโตคอร์ม) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ND เพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ร่วมกับเติมอนุภาคนาโนเงิน ความเข้มข้น 2 mg/l

กลุ่มที่ 3 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ร่วมกับเติมอนุภาคนาโนเงิน ความเข้มข้น 4 mg/l

กลุ่มที่ 4 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ร่วมกับเติมอนุภาคนาโนเงิน ความเข้มข้น 6 mg/l

กลุ่มที่ 5 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ร่วมกับเติมซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 2 mg/l

กลุ่มที่ 6 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ร่วมกับเติมซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 4 mg/l

กลุ่มที่ 7 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ร่วมกับเติมซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 6 mg/l

ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้ห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16/8 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ เป็นเวลา 45 วัน จากนั้นทำการเก็บข้อมูลค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ร้อยละการเกิด PLB และ จำนวน PLBs ที่เกิดใหม่ต่อโพรโตคอร์ม

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS version 19

ผลการวิจัย

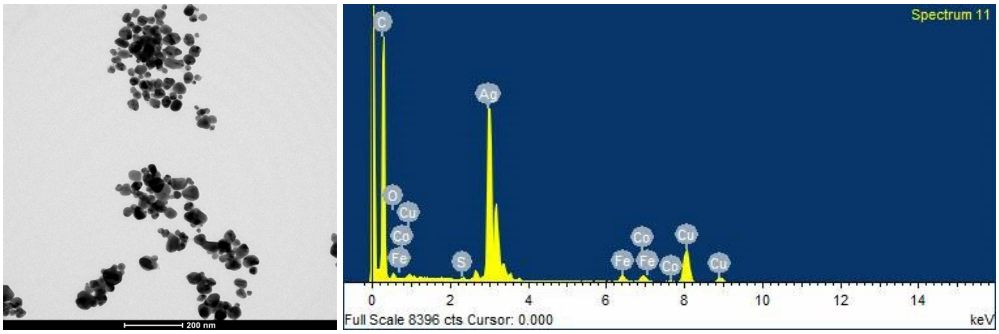
ผลการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินวิธีทางชีวภาพ

ผลของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินยืนยันได้จากการเปลี่ยนสีของสารสกัดใบกาลพฤกษ์จากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลเข้ม หลังจากผ่านการฉายด้วยคลื่นไมโครเวฟเป็นเวลา 90 วินาที (ภาพที่ 1B) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี พบว่าอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้เกิดปรากฏการณ์เซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์ (SPR) ที่ 450 นาโนเมตร และเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟาเรดสเปกโทรสโกปี พบหมู่ฟังก์ชัน –OH ของสารชีวโมเลกุลในสารสกัดจากใบกาลพฤกษ์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดิวซ์ Ag^+ ให้เป็น Ag^0 (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

(A) (B)

ภาพที่ 1 ต้นกาลพฤกษ์ (A) การเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดใบกาลพฤกษ์จากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำตาลเข้ม (B)

การตรวจสอบขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนเงินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่ามีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลมและมีขนาดระหว่าง 20-40 นาโนเมตร (ภาพที่ 2A) และจากสเปกตรัมของ EDX พบองค์ประกอบของธาตุ Ag บนพื้นผิวผลึกของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จากสารสกัดใบกาลพฤกษ์ (ภาพที่ 2B) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวช่วยยืนยันได้ว่าอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้เป็นอนุภาคนาโนเงิน



(A) (B)

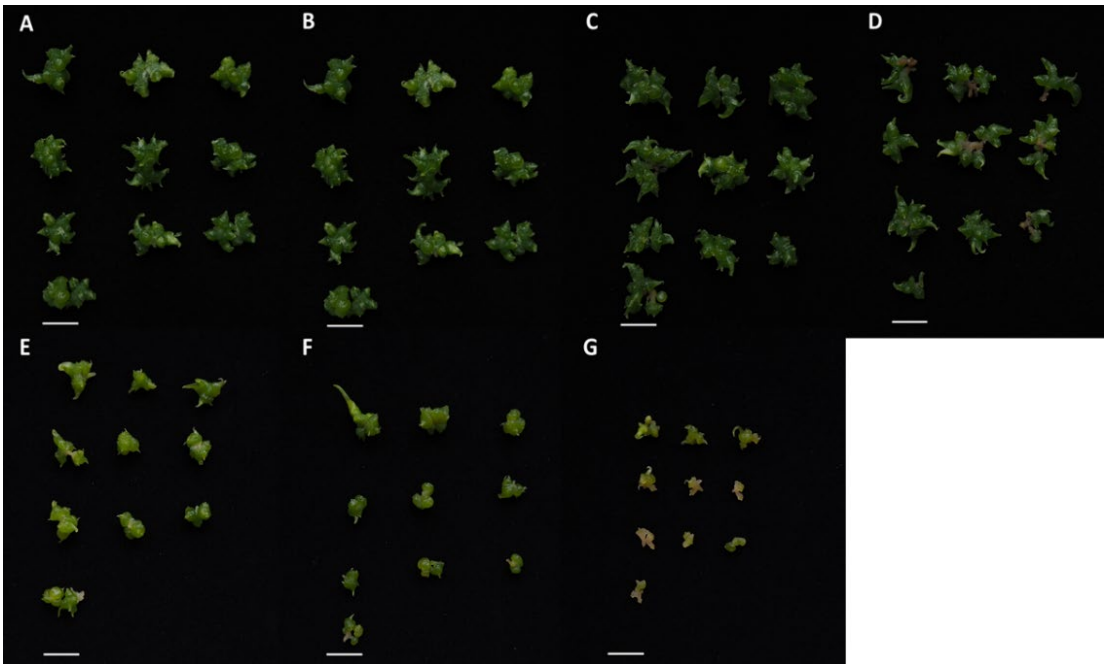
ภาพที่ 2 ภาพถ่ายอนุภาคนาโนเงินด้วย TEM (A) และสเปกตรัมของธาตุที่ปรากฏบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนเงิน (B)

ผลของความเข้มข้นอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ทางชีวภาพและซิลเวอร์ไนเตรทต่อการเจริญของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้กล้วยไม้กะเรกะร่อน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ PLBs ในกลุ่มควบคุมมีลักษณะสมบูรณ์มีสีเขียวเข้ม มีขนาดใหญ่ ชิ้นส่วนของแต่ละ PLBs ที่เกิดขึ้นใหม่เกาะกลุ่มกันเป็นก้อนแน่น ไม่ค่อยแยกออกจากกัน (ภาพที่ 3 A)

กลุ่มที่เติม AgNPs เป็นที่น่าสังเกตว่าที่ความเข้มข้น AgNPs 6 mg/l PLBs มีรูปร่างผิดปกติ มีจุดสีน้ำตาล และ PLBs ที่เกิดขึ้นใหม่นั้นไม่เกาะกลุ่มกันแน่น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องมาจากอนุภาคนาโนเงินอาจจะไปมีผลทำให้เนื้อเยื่อบางส่วนของ PLBs เสียหายไป (ภาพที่ 3 B-D)

กลุ่มที่เติม $AgNO_3$ พบว่า PLBs มีสีเขียวซีด มีขนาดเล็กลงตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น $AgNO_3$ 6 mg/l มีขนาดเล็กที่สุด มีการตายของ PLBs เกิดขึ้น (ภาพที่ 3 E-G)



ภาพที่ 3 โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ (PLBs) ของกล้วยไม้กะเรกะร่อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND เป็นเวลา 45 วัน กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (A); กลุ่มที่ 2 AgNPs ความเข้มข้น 2 mg/l (B); กลุ่มที่ 3 AgNPs ความเข้มข้น 4 mg/l (C); กลุ่มที่ 4 AgNPs ความเข้มข้น 6 mg/l (D); กลุ่มที่ 5 $AgNO_3$ ความเข้มข้น 2 mg/l (E); กลุ่มที่ 6 $AgNO_3$ 4 mg/l (F); และ กลุ่มที่ 7 $AgNO_3$ 6 mg/l (G) ตามลำดับ

จากผลการศึกษาพบว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดมากที่สุด เท่ากับ 2.56 กรัม รองลงมาคือ กลุ่ม AgNPs ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 mg/l (2.41, 2.34 และ 1.60 กรัม) และ กลุ่ม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 mg/l (1.17, 1.09 และ 0.33 กรัม) ตามลำดับ เช่นเดียวกับค่าน้ำหนักแห้ง พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 0.14 กรัม รองลงมาคือ กลุ่ม AgNPs ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 mg/l (0.13, 0.12 และ 0.09 กรัม) และ กลุ่ม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 mg/l (0.08, 0.08 และ 0.07 กรัม) ตามลำดับ

จำนวนชิ้นโปรโตคอร์มที่เกิดใหม่ (Number of PLBs per protocorm) พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่ามากที่สุด เท่ากับ 8.84 ชิ้น รองลงมาคือ กลุ่ม AgNPs ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 mg/l (8.50, 7.44 และ 6.44 ชิ้น) และ กลุ่ม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 mg/l (3.82, 3.18 และ 2.88 ชิ้น) ตามลำดับ และพบว่าทั้ง 7 กลุ่มการทดลองมีค่าร้อยละการเกิดโปรโตคอร์ม (%PLB formation) เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์

จากการศึกษาพบว่าผลของ AgNPs และ $AgNO_3$ ส่งผลให้ค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และ จำนวนชิ้นโปรโตรคอร์มที่เกิดใหม่ มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของอนุภาคนาโนเงิน (AgNPs) และซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ต่อการเจริญของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้กล้วยไม้กะเรกะร่อน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 45 วัน

Medium composition	Concentration (mg/l)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Number of PLBs per protocorm	PLB formation (%)
Control	0	2.56±0.13[a]	0.14±0.01[a]	8.84±0.34[a]	100±0.00[a]
AgNPs	2	2.41±0.08[b]	0.13±0.00[ab]	8.50±0.37[a]	100±0.00[a]
AgNPs	4	2.34±0.09[b]	0.12±0.00[b]	7.44±0.57[b]	100±0.00[a]
AgNPs	6	1.60±0.05[c]	0.09±0.00[c]	6.44±0.20[c]	100±0.00[a]
$AgNO_3$	2	1.17±0.08[d]	0.08±0.00[d]	3.82±0.08[d]	100±0.00[a]
$AgNO_3$	4	1.09±0.09[d]	0.08±0.00[d]	3.18±0.08[e]	100±0.00[a]
$AgNO_3$	6	0.33±0.08[e]	0.07±0.00[e]	2.88±0.08[e]	100±0.00[a]
F-test		*	*	*	ns

Means ± SE followed by the different letter are significantly different according to ANOVA and Dancan's Multiple Range Test ($p<0.05$).

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สารสกัดจากใบกัลพฤกษ์สามารถใช้เป็นตัวรีดิวซ์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้ จากผลการทดลองพบว่าอนุภาคนาโนเงินที่ความเข้มข้น 4 และ 6 mg/l มีผลยับยั้งการเกิดและการเจริญของ PLBs ของกล้วยไม้กะเรกะร่อน โดยทำให้จำนวนการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ และน้ำหนักแห้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม มีรายงานว่าอนุภาคนาโนสามารถเคลื่อนที่ผ่านรูภายในผนังเซลล์ของพืช จากนั้นเคลื่อนที่ผ่านพลาสมาเมมเบรนโดยกระบวนการเอนโดไซโทซิสหรือผ่านเข้าทางไอออนแชนเนล เข้าสู่ไซโทพลาสซึม (Navarro et al., 2008) กลไกความเป็นพิษของอนุภาคนาโนเงินต่อเซลล์ เกิดจากอนุภาคนาโนเงินที่มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตรมีพื้นที่ผิวสัมผัสสูง อนุภาคนาโนเงิน (Ag^{o}) เมื่ออยู่ในไซโทพลาสซึมสามารถแตกตัวเป็นซิลเวอร์อิออนอิสระ (Ag^{+}) ซึ่งประจุบวกของซิลเวอร์ไอออนสามารถเกิดอันตรกิริยากับประจุลบของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์โดยเฉพาะโปรตีน และดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านั้นไม่สามารถทำหน้าที่ได้ (Ferdous and Nemmar, 2020) นอกจากนี้ยังพบว่า อนุภาคนาโนเงินชักนำให้เซลล์พืชสังเคราะห์อนุมูลอิสระออกซิเจนมากเกิน ทำให้เกิดสภาพเครียดออกซิเดทีฟ (oxidative stress) ซึ่งทำให้เกิดการทำลายเมมเบรนโดยปฏิกิริยาลิพิดเปอรอกซิเดชัน การทำลายโปรตีน และดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Nair et al., 2014; Tripathi et al., 2017)

อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าการใช้อนุภาคนาโนเงินในความเข้มข้นต่ำ (2 mg/l) ไม่มีผลยับยั้งการเกิดและการเจริญของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ ดังนั้นการใช้อนุภาคนาโนเงินในความเข้มข้นต่ำที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญ อาจชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาหรือชีวเคมีต่อเซลล์พืชในแง่ที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังตัวอย่างการใช้ประโยชน์จากอนุภาคนาโนเงินและทองต่อแคลลัสของ *Prunella vulgaris* L. ซึ่งเป็นพืชสมุนไพร พบว่ากลุ่มที่มีการเติมอนุภาคนาโนเงินร่วมกับอนุภาคนาโนทองช่วยเพิ่มน้ำหนักสด และมีการเพิ่มขึ้นของสาร secondary metabolites เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Fazal et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาผลของอนุภาคนาโน ZnO และ CuO ต่อแคลลัสของ *Stevia rebaudiana* Bertoni พบว่าอนุภาคนาโน ZnO และ CuO สามารถช่วยให้แคลลัสผลิตสาร secondary

metabolites เช่น สารฟีนอลิก และ เฟลโวนอยด์ สูงขึ้น รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (โดย DPPH assay) เพิ่มขึ้น (Javed et al., 2018) นอกจากนี้การศึกษาผลของอนุภาคนาโนในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาจมีประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์กล้วยไม้ที่ทนต่อโลหะหนักและอนุภาคนาโนต่าง ๆ ซึ่งทำได้ง่ายในสภาพหลอดทดลอง และสามารถนำองค์ความรู้การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในสภาพหลอดทดลองไปใช้ในการขยายพันธุ์เพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ได้

แม้ว่ากล้วยไม้ที่เจริญเติบโตอยู่ในสภาพธรรมชาติ การเพาะเลี้ยงในสภาพหลอดทดลอง หรือเพาะเลี้ยงในสภาพเรือนกระจก อาจจะมีโอกาสน้อยมากที่จะสัมผัสกับอนุภาคนาโนเงินหรือโลหะหนักอื่น ๆ แต่หากมีการใช้อนุภาคนาโนเงินจำนวนมากขึ้น และมีการสะสมหรือตกค้างในตะกอนดิน และแหล่งน้ำในที่ต่าง ๆ ก็อาจจะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หรือพืชชนิดอื่น ๆ ได้เช่นกัน งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่ทำการศึกษาผลของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ทางชีวภาพต่อการเจริญของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตามยังมีคำถามสำคัญที่จำเป็นต้องหาคำตอบคือ (1) กล้วยไม้มีกลไกตอบสนองหรือมีการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการทางชีวเคมีต่ออนุภาคนาโนเงินอย่างไร (2) อนุภาคนาโนเงินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนในโปรโตคอร์มไลค์บอดี้กล้วยไม้หรือไม่อย่างไร (3) มีการสะสมของอนุภาคนาโนเงินในออร์แกเนลล์และส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้อย่างไร ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยสำหรับคณาจารย์บัณฑิตศึกษาเพื่อให้สามารถรับนักศึกษาที่มีความสามารถและศักยภาพสูงเข้าศึกษาในหลักสูตรและทำวิจัยในสาขาที่อาจารย์มีความเชี่ยวชาญ ประจำปี 2558 ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยข้าวทนเค็ม สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รวมทั้งขอขอบคุณสาชาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Ahmed, S., Zahid, A., Abidi, S. and Meer, S. Anti-emrtic activity of four species of genus *Cassia* in chicks. Journal of Pharmacy 2012, 2 (3): 380-384.

Balashanmugam, P., Balakumaran, M.D., Murugan, R., Dhanapal, K. and Kalaichelvan, P.T. Phytogenic synthesis of silver nanoparticles, optimization and evaluation of *in vitro* antifungal activity against human and plant pathogens. Microbiological Research 2016; 192: 52-64.

Cardosa, J.C., Zanello, C.A. and Chen, J-T. An over view of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. International Journal of Molecular Sciences 2020; 21: 985.

Chen, S.-F. and Zhang, H. Stability and sedimentation of silver nanoparticles in the presence of monovalent, divalent and trivalent electrolyte solutions. Water Science and Technology 2014; 70 (2): 361-366.

Dash, P.K., Sahoo, S. and Bal, S. Ethnobotanical Studies on Orchids of *Niyamgiri* Hill Ranges, Orissa, India. Ethnobotanical Leaflets 2008; 12: 70-78.

Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N. and Ali, M. Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with silver and gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L. Applied Biochemistry and Biotechnology 2016; 180: 1076-1092.

Ferdous, Z. and Nemmar, A. Health impact of silver nanoparticles: A review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. International Journal of Molecular Sciences 2020; 21: 2375.

Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X., Xing, M.M.Q. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. International Journal of Nanomedicine 2014; 9: 2399-2407.

Javed, R., Yucesan, B., Zia, M. and Gurel, E. Elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown under ZnO and CuO nanoparticles stress. Sugar Tech 2018; 20 (2): 194–201.

Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ramkumarpandian, S., Nellaiah, H. and Sangiliyandi, G. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. Materials letters 2008; 62 (29): 4411–4413.

Lee, Y-I., Hsu, S-T., and Yeung, E.C. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. American Journal of Botany 2013; 100 (11): 1211-1231.

Nair, P.M.G., Chung, I. M. Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Chemosphere 2014; 112: 105-113.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.J., Quigg, A., Santschi, P.H. and Sigg, L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 2008; 17: 372-386.

Park, S.Y., Murthy, H.N. and Paek, K.Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. Plant Science 2003; 164: 919-923.

Teixeira da Silva, J.A. Heavy metals and nanoparticles: Impact on protocorm-like body formation in hybrid Cymbidium. Plant Tissue Culture and Biotechnology 2014; 24 (1): 45-55.

Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V.P., Sharma, N.C., Prasad, S.M., Dubey, N.K., and Chauhan, D.K. An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, acuumulation and phytotoxicity. Plant Physiology and Biochemistry 2017; 110: 2-12.

Trunjaruen, A. and Taratima, W. An effective micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. Thai Journal of Botany 2018; 10 (1): 77-91.