ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการผลิตสารแอนโธไซยานิน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก

Effect of Plant Growth Regulators on Anthocyanin Production from Shoot Culture of *Gymnocalycium damsii*

ฉัตรทริกา ฤทธิรงค์[1] สุจิรา คีรีเพ็ชร[1] ผการัตน์ โรจน์ดวง[1*] และสุภาวดี รามสูตร[2]

Chattarika Rittirong[1], Sujira Keereeped[1], Phakarat Rotduang[1] and Supawadee Ramasoot[2]

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกระบองเพชรยิมโนแม่ลูกดกมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของ benzylaminopurine (BA) และ naphthaleneacetic (NAA) ต่อการชักนำแคลลัสและการสร้างสารแอนโธไซยานินของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก โดยนำชิ้นส่วนยอดกระบองเพชรยิมโนแม่ลูกดกขนาด 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร murashige and skoog (MS) เติม NAA เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำแคลลัสสูงสุด 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาการสร้างแอนโธไซยานินในชิ้นส่วนแคลลัส โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโธไซยานินด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 ถึง 657 นาโนเมตร พบว่าแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนยอดกระบองเพชรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแอนโธไซยานินสูงสุด 1.8000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด

คำสำคัญ: แอนโธไซยานิน กระบองเพชรยิมโนแม่ลูกดก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

[1] สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

[2] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

* Corresponding author e-mail: phakarat.r@gmail.com.

Received: 11 June 2020, Revised: 15 October 2020, Accepted: 28 October 2020

Abstract

The purpose of this study was to study the effects of different concentrations of benzylaminopurine (BA) and naphthaleneacetic (NAA) on callus induction and anthocyanin production of *Gymnocalycium damsii*. The shoot tips (0.5 cm size) were cultured on MS medium supplemented with 0.0, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg/l NAA and 0.0, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg/l BA. After 3 months of culture, the results showed that shoot tips cultured on MS medium supplemented with 4 mg/l BA gave the highest survival rate at 100%. MS medium supplemented with 2 mg/l and 3 mg/l NAA gave the highest callus induction at 20%. When studying anthocyanin formation in callus fragments by analyzing the anthocyanin contents with the spectrophotometer machine at 530 to 657 nm wavelength, the result showed that callus obtained from shoot tips cultured on MS medium supplemented with 2 mg/l NAA gave the highest anthocyanin content at 1.8000 µg/gFW.

Keywords: Anthocyanin, *Gymnocalycium damsii*, Plant tissue culture

บทนำ

กระบองเพชรสกุล Gymnocalycium ชื่อสกุลมาจากภาษากรีก 2 คำ คือคำว่า gymnos แปลว่า เปลือย และ calyx แปลว่า วงกลีบเลี้ยง รวมหมายถึงกลีบเลี้ยงเปลือยหรือไม่มีขน มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้แถบอาร์เจนตินา อุรุกวัย ปารากวัย และโบลิเวีย มีอยู่ราว 80 ชนิด สกุลนี้มีชื่อสามัญว่า “Chin Cactus” ส่วนนักปลูกเลี้ยงชาวไทยเรียกว่า “ยิมโน” บางชนิดได้รับความนิยมและมีราคาสูงกว่าปกติ สกุลนี้มีผู้นำมาปลูกเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์เป็นเวลานานแล้วจนได้ลูกผสมที่แปลกแตกต่างจากเดิม เช่น ยิมโนด่าง หรือบางต้นมีหนามยาวและใหญ่กว่าเดิมทนสภาพอากาศร้อน กระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกนับเป็นกระบองเพชรที่ปลูกเลี้ยงในประเทศไทยเนื่องจากเลี้ยงง่ายและมีลักษณะเด่นสะดุดตา คือ มีลำต้นเดี่ยวหรือแตกหน่อจากตุ่มหนาม หนามมีรูปทรงและขนาดหลากหลาย ดอกออกจากตุ่มหนามบริเวณยอด มีหลายสีทั้งขาว ชมพู เขียว และเหลือง บานตอนกลางวันและหุบตอนกลางคืน แต่ละดอกบานได้นาน 3-4 วัน ผลรูปไข่ถึงรูปกระสวย เมื่อสุกมีสีแดงส้ม เขียวอมฟ้า หรือชมพูสด ภายในมีเมล็ดขนาดเล็กจำนวนมาก (ภวพล, 2559) นอกจากนี้กระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกยังเป็นที่ต้องการของตลาดเนื่องด้วยเป็นไม้ประดับที่มีความสวยงาม แต่ทั้งนี้มีการขยายพันธุ์ที่ล่าช้าและเกิดโรคได้ง่าย (เศรษฐมันตร์, 2557) ซึ่งส่งผลให้ต้นกระบองเพชรตายและ

ไม่เพียงพอต่อการผลิตเพื่อการค้า ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยเพิ่มจำนวนต้นให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น รวมทั้งยังประยุกต์ใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อขยายพันธุ์พืชในเชิงการค้าได้ จากการศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเป็นกระบวนการเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อช่วยร่นระยะเวลาในการผลิตพืชต้นใหม่และสามารถสร้างคุณลักษณะใหม่ ๆ ให้กับเซลล์พืชที่เราต้องการเพาะเลี้ยงได้ โดยผ่านการชักนำการกลายพันธุ์รวมทั้งการผลิตสารชีวเคมีทุติยภูมิของเซลล์พืช ในส่วนของการผลิตสารชีวเคมีนี้ถือว่าเป็นผลพลอยได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงแคลลัสซึ่งแคลลัสของพืชหลายชนิดที่สามารถผลิตสารเหล่านี้ออกมาในระหว่างการเพาะเลี้ยง (สุภาวดี, 2559) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารแอนโธไซยานินนั้น พบว่าแคลลัสหรือเซลล์ส่วนใหญ่มักจะเกิดในหลายลักษณะโดยพบทั้งเซลล์ที่ผลิตและไม่ผลิตสารอยู่ปนกันในเซลล์แคลลัสจะเกิดการสะสมของแอนโธไซยานินจากเซลล์ผิวด้านนอกก่อนเมื่อระยะเวลานานขึ้นจึงจะมีการสะสมที่บริเวณเซลล์ด้านใน สำหรับการเกิดแอนโธไซยานินกับการพัฒนาของเซลล์พบว่าการเกิดแอนไซยานินสัมพันธ์กับการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ ทั้งสองกระบวนการนี้ได้รับมาจากปัจจัยทั้งภายนอกและภายในเซลล์ (Hara *et al*., 2003) สำหรับการเกิดแอนโธไซยานินกับการพัฒนาของเซลล์ พบว่าการเกิดแอนโธไซยานินสัมพันธ์กับการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ ทั้งสองกระบวนการนี้ได้รับมาจากปัจจัยทั้งภายนอกและภายในเซลล์เช่น ชนิดและแหล่งของชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน สภาวะที่เพาะเลี้ยงเซลล์ และระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร นอกจากนี้แหล่งของไนโตรเจนหรือคาร์บอน รวมทั้งชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลก็ล้วนแล้วแต่ส่งผลต่อการสร้างแอนโธไซยานินในหลอดทดลอง การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตแอนโธ-ไซยานินของระหว่างเซลล์พืชนอกหลอดทดลองและในหลอดทดลองเป็นเรื่องสำคัญ เพื่อยืนยันว่าแอนโธไซยานินที่ผลิตออกมาได้นั้นมีปริมาณหรือคุณสมบัติเหมือนหรือต่างกันอย่างไรบ้าง (Maharik *et al*., 2009) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกต่อการผลิตสารแอนโธไซยานิน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ BA และ NAA ต่อการชักนำแคลลัสและการผลิตสารแอนโธไซยานินของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมวัสดุพืช

การศึกษานี้ใช้เมล็ดกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก โดยนำชิ้นส่วนเมล็ดมาล้างออกด้วยน้ำประปา และนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการจุ่มแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่ต่อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วย

น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ก่อนนำชิ้นส่วนเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

2. ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก

นำชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม benzylaminopurine (BA) เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตรของ Murashige and Skoog (1962) (MS) เติม naphthaleneacetic (NAA) เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองสูตรอาหารละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน สังเกตและบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัส ระยะเวลา 3 เดือน โดยทำการย้ายเลี้ยงเดือนละ 1 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT)

3. ศึกษาผลของ BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตสารแอนโธไซยานิน ของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก

นำชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองสูตรอาหารละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วนสังเกตและบันทึกผลการผลิตปริมาณสารแอนโธไซยานินหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือนวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานิน

นำชิ้นส่วนแคลลัสที่ชักนำได้จากการทดลองที่ 2.3 น้ำหนัก 0.5 มิลลิกรัม มาทำการสกัดสารแอนโธไซยานินตามวิธีการของ Ereifej *et al.* (2015) โดยสุ่มตัวอย่างแคลลัสในแต่ละขวด ขวดละ 2 ตัวอย่าง และนำแคลลัสไปแช่ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 โมลลาร์ เติมเมทานอล 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่น

เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 และ 657 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาค่าปริมาณแอนโธไซยานินตามวิธีการของ Rabino and Mancinelli (1986)

การคำนวณหาแอนโธไซยานินโดยใช้สูตร

$$AC = [absorbance \times 449.2 \times DF] / [29,000 \times sample\ weight\ (g)]$$

โดยที่ AC = anthocyanin contents (mg/gFW)

absorbance (A) = $(A_{530} - 0.25\ A_{657})$

dilution factor (DF) = final volume/initial volume (ml)

ผลการวิจัย

1. ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก

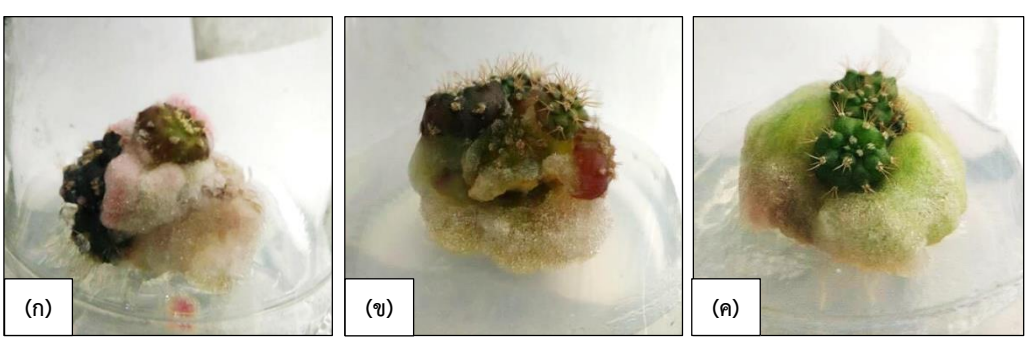
นำชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่ายอดของกระบองเพชรที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ และยอดของกระบองเพชรที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำสุด คือ 80 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ทุกระดับความเข้มข้น และเติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการชักนำแคลลัส ในขณะที่ยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำแคลลัสมากที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดการชักนำแคลลัส 6.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) และมีการสร้างสารแอนโธไซยานิน (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)±S.D.	การชักนำแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)±S.D.
BA	NAA		
0	0	93.00±0.56^{b}	0.00±0.00^{c}
1	0	80.00^{c}±0.41^{c}	0.00±0.00^{c}
2	0	96.00±0.59^{b}	0.00±0.00^{c}
3	0	90.00±0.54^{b}	0.00±0.00^{c}
4	0	100.00±0.72^{a}	0.00±0.00^{c}
0	1	83.00±0.44^{c}	0.00±0.00^{c}
0	2	93.00±0.56^{b}	20.00±0.50^{a}
0	3	80.00±0.41^{c}	20.00±0.50^{a}
0	4	86.00±0.47^{c}	6.67±0.14^{b}
F-test		*	*
C.V. (เปอร์เซ็นต์)		3.63	5.56

หมายเหตุ: * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 1 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (bar = 1 เซนติเมตร)

(ก) อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ข) อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ผลของ BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตสารแอนโธไซยานินของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก

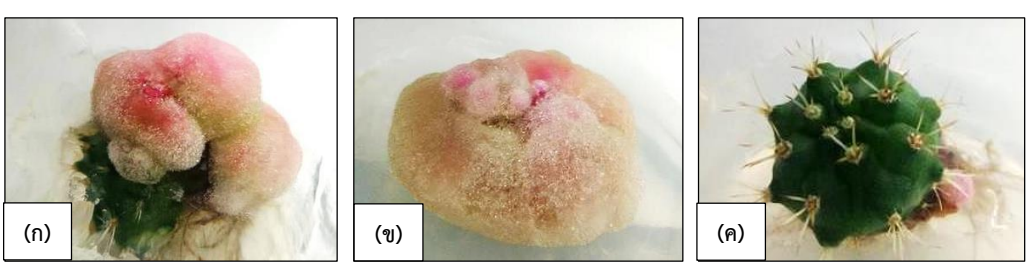
นำชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ทุกระดับความเข้มข้น และเติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการสร้างสารแอนโธไซยานิน เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบมีความเข้มข้นไม่มากพอสำหรับการสร้างสารแอนโธไซยานิน ในขณะที่แคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างสารแอนโธไซยานิน

เมื่อนำชิ้นส่วนแคลลัสที่ชักนำได้น้ำหนัก 0.5 มิลลิกรัม มาทำการสกัดสารแอนโธไซยานินตามวิธีการของ Ereifej *et al*. (2015) เพื่อคำนวณหาค่าปริมาณสารแอนโธไซยานินตามวิธีการของ Rabino and Mancinelli (1986) และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 และ 657 นาโนเมตร พบว่าที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร แคลลัสของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมานสารแอนโธไซยานินสูงสุด 1.8000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด รองลงมาอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมานสารแอนโธไซยานิน 1.3000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด และ 0.9000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสดตามลำดับ และที่ความยาวคลื่น 657 นาโนเมตร พบว่าแคลลัสของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมานสารแอนโธไซยานินสูงสุด 0.8000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด รองลงมาอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมานแอนโธไซยานิน 0.7 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของ BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตสารแอนโธไซยานินของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		**ปริมาณแอนโธไซยานิน 530 นาโนเมตร (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด)±S.D.**	**ปริมาณแอนโธไซยานิน 657 นาโนเมตร (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด)±S.D.**
Control		0.0000±0.000^{c}	0.0000±0.000^{b}
BA	1	0.0000±0.000^{c}	0.0000±0.000^{b}
	2	0.0000±0.000^{c}	0.0000±0.000^{b}
	3	0.0000±0.000^{c}	0.0000±0.000^{b}
	4	0.0000±0.000^{c}	0.0000±0.000^{b}
NAA	1	0.0000±0.000^{c}	0.0000±0.000^{b}
	2	1.8000±0.015^{a}	0.8000±0.002^{a}
	3	0.9000±0.005^{b}	0.7000±0.002^{a}
	4	1.3000±0.011^{ab}	0.7000±0.002^{a}
F-Test		*	*
C.V. (%)		11.12	14.22

หมายเหตุ: * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 2 ลักษณะการสร้างสารแอนโธไซยานินของ *G. damsii* หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (bar = 1 เซนติเมตร)

(ก) อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ข) อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ค) อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาเห็นได้ว่า ยอดของกระบองเพชรยิมโนลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำแคลลัสมากที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก NAA ที่มีความเข้มข้นสูงจะเหมาะสมกับการชักนำแคลลัส ส่วนสูตรอาหารที่เติม BA ทุกสูตรไม่มีการชักนำแคลลัส เนื่องจากอาจจะเกิดสภาวะเครียดต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยง มีผลไปลดการเจริญเติบโตของเซลล์ จากการผลการทดลองพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสค่อนข้างต่ำ เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงแต่ละสูตรอาหารใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียว ทำให้เกิดการชักนำแคลลัสได้น้อย ซึ่ง George and Sherrington (1984) อธิบายว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีความสัมพันธ์ระหว่างสารในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินต่อการพัฒนาไปเป็นอวัยวะของพืช การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียวอาจทำให้การพัฒนาไปเป็นอวัยวะของพืชเกิดขึ้นได้น้อยหรืออาจไม่มีการพัฒนาเลย ซึ่งจากการศึกษางานวิจัยของนูรมา และคณะ (2559) จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของ BA เพียงชนิดเดียว และ BA ร่วมกับ NAA พบว่าอาหารสูตร MS เติม BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการสร้างแคลลัสของฮาโวเทีย 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าการใช้ออกซินเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส มักใช้ควบคู่ไปกับไซโตไคนิน (พรพิมล, 2545)

นำชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม BA เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าแคลลัสที่เกิดจากยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ทุกระดับความเข้มข้น และเติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการสร้างสารแอนโธไซยานิน ในขณะที่แคลลัสที่เกิดจากยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างสารแอนโธไซยานิน เนื่องจากการสร้างสารแอนโธไซยานินนั้นเกิดจากปัจจัยหลายอย่างในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความเข้มแสง อุณหภูมิ ระยะเวลาในการย้ายเลี้ยง ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และปัจจัยทางชีวภาพ เช่น พันธุกรรมของต้นแม่ ชนิดของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารแอนโธไซยานินที่ได้จากการศึกษานี้ ยังคงมีปริมาณน้อย ทั้งนี้อาจจะต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย รวมทั้งการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว (Nagata and Ebizuka, 2002)

เมื่อนำชิ้นส่วนแคลลัสอายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนัก 0.5 มิลลิกรัม มาทำการสกัดสารแอนโธไซยานินตามวิธีการของ Ereifej *et al*. (2015) เพื่อคำนวณหาค่าปริมาณสารแอนโธไซยานินตามวิธีการของ Rabino and Mancinelli (1986) และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 และ 657 นาโนเมตร พบว่าที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร แคลลัสของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมานสารแอนโธไซยานินสูงสุด 0.0018 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด รองลงมาอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมานสารแอนโธไซยานิน 1.3000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสดและ 1.3000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสดตามลำดับ และที่ความยาวคลื่น 657 นาโนเมตร พบว่าแคลลัสของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสารแอนโธไซยานินสูงสุด 0.8000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด รองลงมาอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมานแอนโธไซยานิน 0.7000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด สรุปได้ว่าที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร สามารถวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินได้มากกว่าความยาวคลื่น 657 นาโนเมตร ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความยาวคลื่น 530 และ 657 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก เพราะค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรจะมีความสัมพันธ์กับสีแดงที่เกิดจากเม็ดสีแอนโธไซยานิน และเป็นเครื่องชี้ถึงปริมาณของสารแอนโธไซยานิน (Watada and Abbott, 1975) สำหรับการผลิตสารแอนโธไซยานินจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิดเช่นสูตรอาหารสารควบคุมการเจริญเติบโตค่าความเป็นกรด-ด่างอุณหภูมิแสงรวมทั้งน้ำตาลซูโครสซึ่งมีผลต่อความเสถียรของสารแอนโธไซยานินที่เซลล์พืชสร้างขึ้น (Tsai *et al*., 2005) น้ำตาลซูโครสนอกจากจะเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นกับเซลล์พืชแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ในการเติมหมู่น้ำตาลให้กับสาร aglycone ในกระบวนการ glycosylation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน (Mano *et al*., 2007) และจากการศึกษางานวิจัยของ Elias *et al*. (2015) พบว่าการเกิดแอนโธไซยานินมากที่สุดคือ 63 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีสีชมพูอย่างไรก็ตามสีของแคลลัสจะแปรผันตามอายุ สามารถเห็นได้ชัดเจนในการเปลี่ยนแปลงสีแคลลัสจากสีเขียวเป็นสีชมพูภายใน 2 เดือน หลังจากวางเลี้ยงและแคลลัสสีชมพูนี้จะเปลี่ยนกลับเป็นสีเขียวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือนสายพันธุ์และชนิดของพืชก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตสารแอนโธไซยานิน

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก พบว่ายอดของกระบองเพชรที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำแคลลัสมากที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ และมีการสร้างสารแอนโธไซยานิน และจากการศึกษาผลของ BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตสารแอนโธไซยานินของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดก พบว่าแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.0 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างสารแอนโธไซยานิน เมื่อนำชิ้นส่วนแคลลัสที่ชักนำได้น้ำหนัก 0.5 มิลลิกรัม มาทำการสกัดสารแอนโธไซยานินตามวิธีการของ Ereifej *et al*. (2015) เพื่อคำนวณหาค่าปริมาณสารแอนโธไซยานินตามวิธีการของ Rabino and Mancinelli (1986) และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 และ 657 นาโนเมตร พบว่าที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร แคลลัสของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมานสารแอนโธไซยานินสูงสุด 1.8000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด และที่ความยาวคลื่น 657 นาโนเมตร พบว่าแคลลัสของกระบองเพชรสายพันธุ์ยิมโนแม่ลูกดกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมานสารแอนโธไซยานินสูงสุด 0.8000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่เอื้อเฟื้อในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นูรมา มาสากี สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต. (2559). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัส และยอดของฮาโวเทียในหลอดทดลอง. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 3(2), 76-82.

พรพิมล สุริยจันทราทอง. (2545). *หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ*. อุบลราชธานี: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ภวพล ศุภนันทนานนท์. (2559). *แคคตัส*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล. (2557). *ร้อยพรรณพฤกาแคคตัส*. กรุงเทพฯ: วี.พริ้นท์.

สุภาวดี รามสูตร. (2559). *ตำราการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Plant Tissue culture*. นครศรีธรรมราช: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

Elias, H., Taha, R., Hasbullah, N., Aziemah, A., Noraini, M. and Sadegh, M. (2015). The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens* in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 120(2), 729-739.

Ereifej, K.I., Feng, H., Rababah, T., Almajwal, A., Alu'datt, M., Gammoh, S. and Oweis, L.I. (2015). Chemical composition, phenolics, anthocyanins concentration and antioxidant activity of tenwild edible plants. *Food and Nutrition Sciences*, 6(7), 581-590.

George, E.F. and Sherrington, P.D. (1984). *Plant propagation by tissue culture: a hand book and dictionary of commercial laboratories*. England: Exgetics Ltd.

Hara, M.K., Oki, K., Hoshino, K. and Kuboi, T. (2003). Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. *Plant Science*, 164(2), 259-265.

Maharik, N., Elgengaihib, S. and Taha, H. (2009). Anthocyanin production in callus cultures of Crataegus Sinaica Boiss. *International Journal of Academic Research*, 1(1), 30-34.

Mano, H., Ogasawara, F., Sato, K., Higo, H. and Minobe, Y. (2007). Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physiology*, 143(3), 1252-1268.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaccotissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

Nagata, T. and Ebizuka, Y. (2002). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 51*, *Medicinal and Aromatic plants 1st Ed XII.* New York: Springer-Verlag.

Rabino, I. and Mancinelli, A. (1986). Light, temperature, and anthocyanin production. *Plant Physiology*, 81(3), 922-924.

Tsai, P.J., Delva, L., Yu, T.Y., Huang, Y.T. and Dufosse, L. (2005). Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating. *Food Research International,* 38(8-9), 1059-1065.

Watada, A.E. and J.A. Abbott. (1975). Objective method of estimating anthocyanin content fordetermining color grade of grapes. *Food Sci*ence, 40, 1278-1279.